

ELŻBIETA MAĆKIW, KATARZYNA RZEWUSKA, KATARZYNA TOMCZUK,  
DARIUSZ IZAK, KATARZYNA STOŚ

## WYSTĘPOWANIE *CRONOBACTER* SP. W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

### Streszczenie

Celem badań było określenie częstości występowania bakterii *Cronobacter* sp. w wybranych produktach spożywczych, w szczególności w preparatach dla niemowląt i małych dzieci. Przebadano 160 próbek pochodzących z zakładów mleczarskich: mleka świeżego i mleka w proszku, a także pochodzących z handlu: preparaty dla niemowląt i małych dzieci, przyprawy i herbaty i herbatki (czarne, ziołowe, owocowe). W preparatach dla niemowląt nie stwierdzono obecności bakterii *Cronobacter* sp., natomiast wyizolowano je ze świeżego mleka pochodzącego z zakładu mleczarskiego oraz z przypraw i herbaty.

**Słowa kluczowe:** *Cronobacter* sp., produkty spożywcze

### Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* zostały opisane przez Farmera i wsp. w 1980 r. jako *Enterobacter sakazakii*. Późniejsza analiza sekwencji genów zarówno 16S rRNA, jak i hsp60 wykazała, że izolaty *E. sakazakii* tworzą co najmniej cztery oddzielne grupy genomowe, które mogą być oddzielnymi gatunkami. Gatunek *E. sakazakii* został więc ponownie sklasyfikowany i obecnie występuje jako rodzaj *Cronobacter*. Podstawą wyodrębnienia tego rodzaju były analizy genotypowe zweryfikowane analizami fenotypowymi. Do nowo powstałego rodzaju *Cronobacter* zaliczono następujące gatunki: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* oraz szósty bezimienny, nie nazwany jeszcze gatunek [2].

Do niedawna bakterie *Cronobacter* sp. nie budziły większego zainteresowania diagnostycznego, gdyż rzadko były przyczyną chorób u ludzi. Stwierdzono jednak, że schorzenia wywołane przez te drobnoustroje cechuje wysoki wskaźnik śmiertelności, a infekcje dotyczą głównie noworodków. Z tych względów mikroorganizmy te stały

się obiektem wzrastającego zainteresowania zarówno lekarzy, epidemiologów, jak i higienistów żywności [8]. *Cronobacter* sp. największe zagrożenie stanowią dla noworodków, szczególnie dla wcześniaków, noworodków z niską masą urodzeniową i niską odpornością, również dla dzieci matek-nosicielek wirusa HIV, ponieważ dzieci te są najczęściej karmione sztucznie. Zagrożenia, jakie powoduje spożycie żywności zanieczyszczonej *Cronobacter* sp., to m.in. zapalenie opon mózgowych, zapalenie jelit, a także zaburzenia neurologiczne [1]. Pierwszy przypadek zakażenia *Cronobacter* sp. odnotowano w Anglii w 1958 r. W latach 1958 - 2003 udokumentowanych zostało 76 przypadków zakażeń noworodków bakteriami *Cronobacter* sp., między innymi w: Kanadzie, Belgii, Danii, Islandii, Niemczech, Grecji, Izraelu, Holandii, Hiszpanii oraz USA. W Stanach Zjednoczonych przypadki zakażenia wśród noworodków zostały odnotowane w co najmniej 9 stanach [3].

Nie ustalono dotychczas dawki minimalnej do wywołania objawów chorobowych przez *Cronobacter* sp. Przyjmuje się, że dawka infekcyjna jest podobna jak dla *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* O157 czy *Listeria monocytogenes* i wynosi około 1000 komórek. Uzależniona jest ona od różnorodnych czynników, takich jak m.in. stan zdrowia, wiek dziecka czy rodzaj produktu, w którym te bakterie się znajdują. Istotne znaczenie może mieć również to, czy drobnoustroje były wcześniej poddawane działaniu czynników stresowych podczas procesu produkcji (suszenie, działanie ciepła) w wyniku, czego mogą stać się bardziej odporne na działanie systemu immunologicznego [9].

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* powszechnie występują w środowisku naturalnym. Jedną z przypuszczalnych nisz *Cronobacter* sp. jest materiał roślinny. Bakterie te zostały wyizolowane z pszenicy, kukurydzy, soi, ryżu, płatków zbożowych, ziół, przypraw, warzyw i sałatek. Szczury i muchy mogą stanowić dodatkowe źródła zanieczyszczenia tą bakterią. *Cronobacter* sp. wyizolowany został także z artykułów spożywczych, takich jak ser, mięso, sproszkowane mleko – w tym dla niemowląt – i znacznej ilości innych składników oraz półproduktów żywnościowych. Jego izolaty uzyskano także z otoczenia szpitalnego, próbek klinicznych z uwzględnieniem płynu mózgowo-rdzeniowego, krwi, szpiku kostnego, płwociny, moczu, wyrostka robaczkowego objętego zapaleniem, przewodów doprowadzających przy karmieniu dojelitowym niemowląt, sklepieniu spojówki. Stwierdzano również przypadki bezobjawowego nosicielstwa u ludzi [6, 7].

Zgodnie z aktualnie obowiązującymi kryteriami mikrobiologicznymi, zawartymi w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. [15], bakterie *Cronobacter* sp. (*Enterobacter sakazakii*) nie mogą być obecne w 10 g preparatów w proszku dla niemowląt oraz w żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego, wykorzystywanej w żywieniu niemowląt do 6. miesiąca życia.

Celem badań było określenie obecności *Cronobacter* sp. w produktach spożywczych dostępnych na polskim rynku, ze szczególnym uwzględnieniem preparatów do żywienia niemowląt.

### Material i metody badań

Badania przeprowadzono w 2010 r. w Pracowni Mikrobiologii Instytutu Żywności i Żywnienia. Przebadano łącznie 160 próbek produktów spożywczych w kierunku obecności bakterii *Cronobacter* sp. (*Enterobacter sakazakii*). Do badań pobrano próbki pochodzące z zakładów mleczarskich: 63 próbki świeżego mleka oraz 10 próbek mleka w proszku. Przebadano również próbki pochodzące z handlu detalicznego: 45 preparatów w proszku dla niemowląt (mleka początkowe – 15, mleka następne – 15, mleka powyżej 1 roku – 15) oraz 30 przypraw (ziołowe – 14, korzenne – 9, mieszanki przyprawowe – 7) i 12 herbat (ziołowe – 3, owocowe – 2, czarne – 7).

Bakterie *Cronobacter* sp. (*Enterobacter sakazakii*) izolowano zgodnie z procedurą opisaną w PKN-ISO/TS 22964:2008 [17]. Wyizolowane szczepy z charakterystyczną morfologią, ujemnym testem na oksydazę, niewytwarzające dekarboksylazy L-lizyny, wytwarzające dekarboksylazę L-ornityny i hydrolazę L-argininy, niefermentujące D-sorbitolu, fermentujące L-ramnozę, D-sacharozę i hydrolizujące cytrynian były dalej identyfikowane przy użyciu techniki PCR. Genomowe DNA izolowano z wykorzystaniem zestawu Gemoni Mini. Reakcję amplifikacji genu kodującego 16S rRNA wykonywano metodą opracowaną przez Hassan i wsp. [4]. Kontrolę pozytywną reakcji PCR stanowiło genomowe DNA izolowane ze szczepu referencyjnego *Cronobacter mytjensii* 51329 ATCC. Produkty amplifikacji rozdzielano w żelu agarozowym. Elektroforezę DNA prowadzono w żelach agarozowych o stężeniu 2 % w buforze TAE przy napięciu 120 V, przez 40 min. Po rozdziale elektroforetycznym żele umieszczano (15 min) w wodnym roztworze bromku etydyny. DNA wizualizowano przy użyciu UV transiluminatora przy długości fali 300 nm. Wielkość produktów amplifikacji porównywano ze wzorcem wielkości DNA – Fermentas MassRuler™ DNA, Low Range.

### Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badania wykazały obecność *Cronobacter* sp. (*E. sakazakii*) w 9 próbkach, co stanowi 5,6 % wszystkich przebadanych próbek żywności. W 10 g badanych preparatów dla niemowląt i małych dzieci nie wykryto bakterii *Cronobacter* sp. Natomiast stwierdzono obecność tych bakterii w próbce mleka świeżego (1,6 %) i 7 próbkach przypraw (23,3 %) oraz 1 próbce herbaty (8,3 %) (tab. 1 i 2).

Tabela 1

Wstępowanie bakterii *Cronobacter sp.* w mleku i jego przetworach.  
Occurrence of *Cronobacter sp.* bacteria in milk and its products.

Próbki / Samples	Mleko świeże Fresh milk	Mleko w proszku Powdered milk	Mleko w proszku dla niemowląt i małych dzieci Powdered milk for infants and babies		
			początkowe for newborns	następne for infants	powyżej 1 roku for babies aged 1 year and more
Liczba / Count	63	10	15	15	15
Obecność <i>Cronobacter sp.</i> (w 10 g lub 10 ml) Occurrence of <i>Cronobacter sp.</i> (in 10 g or 10 ml)	1	0	0	0	0

Tabela 2

Wstępowanie bakterii *Cronobacter sp.* w przyprawach i herbatach.  
Occurrence of *Cronobacter sp.* in seasoning products and teas.

Próbki / Samples	Przyprawy / Seasoning products			Herbatki i Herbaty / Teas		
	ziołowe herbs	korzenne spices	mieszanki przyprawowe seasoning mixtures	ziołowe herbal	owocowe fruit	czarne black
Liczba / Count	14	9	7	3	2	7
Obecność <i>Cronobacter sp.</i> (w 10 g). Occurrence of <i>Cronobacter sp.</i> (in 10 g)	2	1	4	1	0	0

Dotychczas bakterie *Cronobacter sp.* stwierdzano w różnych rodzajach żywności zarówno pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego, m.in. w: tofu, herbacie, serach, wędzonym mięsie, mielonej wołowinie oraz w mięsie mielonym przeznaczonym do produkcji wędlin. Soriano i wsp. [18] oraz Richards i wsp. [14] stwierdzili obecność tych bakterii w 4,2 % próbek mleka w proszku, 3,2 % próbek sera i różnych składników dodawanych do żywności, 20 % suszonych ziół, przypraw i warzyw.

Badania nad występowaniem *Cronobacter sp.* w żywności prowadzili również Shaker i wsp. [16]. Próbki do badań pochodziły z 13 krajów. Autorzy przebadali 59 różnych próbek żywności, w tym 15 gotowych do spożycia obiadów dla niemowląt powyżej 6 miesiąca życia, 8 próbek mleka dla niemowląt od urodzenia do 1 roku, 10

próbek mleka pełnego w proszku, 18 produktów zbożowych, 5 przypraw i 3 próbek cukru. Ponadto autorzy przebadali 47 próbek pobranych ze środowiska produkcji żywności. Wymazy robiono z drzwi, ścian, sprzętu i z rozypanych suchych produktów. *E. sakazakii* (*Cronobacter* sp.) wyizolowano z 2/15 obiadów dla niemowląt, 2/8 prób mleka dla niemowląt, 1/18 produktów zbożowych. W żadnej z próbek mleka w proszku, przypraw, cukru i próbek środowiskowych nie stwierdzono obecności *E. sakazakii* (*Cronobacter* sp.), stwierdzono natomiast obecność *E. agglomerans*. W próbkach mleka dla niemowląt został wyizolowany *E. cloacae*. Nazarowec-White i Farber [12] po przebadaniu 141 odżywek dla niemowląt pochodzących z 35 krajów potwierdzili obecność bakterii należących do rodzaju *Enterobacteriaceae* w 52,2 %, wśród nich *E. sakazakii* (*Cronobacter* sp.) aż w 14 % próbek odżywek dla niemowląt. Badania prowadzone przez Heuvelink i wsp. [5] wykazały obecność *E. sakazakii* (*Cronobacter* sp.) w 2,5 % badanych preparatów dla niemowląt oraz w 4,2 % mleka w proszku. Iversen i Forsythe [11] przebadali 82 próbki mleka w proszku dla niemowląt i 404 próbki innych produktów spożywczych i *E. sakazakii* (*Cronobacter* sp.) wyizolowali z 2/82 próbek mleka w proszku dla niemowląt, 5/49 suszonej żywności dla niemowląt, 3/72 mleka w proszku, 2/62 serów i 40/122 różnych suchych składników żywności, zwłaszcza ziół i przypraw. Oonaka i wsp. [13] przebadali 149 próbek mleka w proszku dla niemowląt (61 próbek produkowanych w Japonii i 88 próbek importowanych). Probki pobrane zostały z obrotu w okresie od listopada 2006 do lutego 2008 r. *E. sakazakii* (*Cronobacter* sp.) wyizolowano z 9 (6,0 %) spośród 149 próbek mleka w proszku dla niemowląt. Wśród próbek pochodzących z kraju *E. sakazakii* (*Cronobacter* sp.) został wyizolowany z 4 próbek, natomiast spośród próbek pochodzących z importu *E. sakazakii* (*Cronobacter* sp.) został wyizolowany z 5. Ponadto autorzy półilościowo zmierzili poziom *E. sakazakii* (*Cronobacter* sp.) w każdym z 9 próbek. Poziom był szacowany na 0,36 jtk/100 g w 4 produkowanych w kraju próbkach oraz 0,36 i 0,91 jtk/100 g w 4 i 1 na 5 próbek importowanych. Natomiast Stasiak-Rożańska i wsp. [20] wykazały w Polsce dobrą jakość produktów przeznaczonych do żywienia niemowląt i dzieci. Autorki nie stwierdziły obecności *E. sakazakii* (*Cronobacter* sp.) w żadnej z 30 badanych próbek. Podobne rezultaty uzyskała Ścieżyńska i wsp. [21] po przebadaniu 80 preparatów do początkowego żywienia niemowląt do 6. miesiąca życia oraz 35 kaszek dla dzieci.

Pomimo że bakterie te występują w różnych rodzajach żywności, potencjalnym źródłem *Cronobacter* sp. są preparaty w proszku [20]. Do tej pory w Polsce nie zarejestrowano jednak przypadków zachorowań ludzi spowodowanych bakteriami *Cronobacter* sp. Natomiast w innych krajach Unii Europejskiej i na świecie zatrucia pokarmowe spowodowane tymi bakteriami stanowią ważny problem epidemiologiczny [1]. W raportach RASFF w 2009 r. zgłoszono 6 meldunków, jeden z nich pochodził z Polski. Dotyczył występowania bakterii *Cronobacter* sp. w produktach dla niemowląt

[21]. Zatem konieczny jest ciągły monitoring obecności bakterii *Cronobacter sp.*, szczególnie w preparatach przeznaczonych dla niemowląt do 6. miesiąca życia.

### Wnioski

1. Nie wykazano obecności *Cronobacter sp.* w produktach dla niemowląt i małych dzieci.
2. Obecność bakterii *Cronobacter sp.* stwierdzono w 23 % przypraw oraz w pojedynczych próbkach mleka i herbatki ziołowej.

### Literatura

- [1] Drudy D., Mullane N., Quinn T., Fanning S.: *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in powdered infant formula. Clin. Infect. Dis., 2006, **42**, 996-1002.
- [2] Forsythe S.: *Cronobacter* species. Culture, 2010, **31** (1), 1-5.
- [3] Gurtler J.W., Kornacki J.L., Beuchat L.R.: *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. Int. J. Food Microbiol., 2005, **104**, 1-34.
- [4] Hassan A.A., Akineden O., Kress C., Estuningsih S., Schneider E., Usleber E.: Characterization of the gene encoding the 16S r RNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR metod. Int. J. Food Microbiol., 2007, **116**, 214-220.
- [5] Heuvelink A.E., Kodde F.D., Zwartkruis-Nahuis J.T.M., de Boer E.: *Enterobacter sakazakii* in melkpoeder. Keuringsdienst van Waren Oost, Project number OT 011015, 2001.
- [6] Hurrell E., Kucerova E., Loughlin M., Caubilla-Barron J., Hilton A., Armstrong R., Smith C., Grant J., Shoo S., Forsythe S.: Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonization by members of the *Enterobacteriaceae*. BMC Infect Dis., 2009, **9**, 146.
- [7] Iversen C., Forsythe S.: Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends Food Sci. Technol., 2003, **14** (11), 443-454.
- [8] Kandhai M.C., Heuvelink A.E., Reij M., Beumer R.R., Dijk R., van Tilburg J.J.H.C., van Schothorst M., Gorris L.G.M.: A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in The Netherlands between 2001 and 2005. Food Control, 2010, **21**, 1127-1136.
- [9] Korpysa-Dzirba W., Rola J. G., Osek J.: *Enterobacter sakazakii* – zagrożenie mikrobiologiczne w żywności. Med. Wet., 2007, **63**, 11, 1277-1280.
- [10] Lai K.: *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. Case reports and a review of the literature. Medicine, 2001, **80**, 113-122.
- [11] Iversen C., Forsythe S.: Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. Food Microbiol., 2004, **21**, 771-777.
- [12] Nazarowec-White M., Farber J. M.: Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. J. Food Protect, 1997, **60**, 226-230.
- [13] Oonaka K., Furuhashi K., Hara M., Fukuyama M.: Powder infant formula milk contaminated with *Enterobacter sakazakii*. Jpn. J. Infect. Dis., 2010, **63**, 103-107.
- [14] Richards G.M., Gurtler J.B., Beuchat L.R.: Survival and growth of *E. sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula or apple juice. J. Appl. Microbiol., 2005, **99**, 844-850.
- [15] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz. U. Urz. UE Nr 322 z 07.12.2007 r.

- [16] Shaker R., Osaili T., Al-Omary W., Jaradat Z., Al-Zuby M.: Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control*, 2007, **18**, 1241-1245.
- [17] PKN-ISO/TS 22964: 2008. Mleko i przetwory mleczne. Wykrywanie *Enterobacter sakazakii*.
- [18] Soriano J.M., Rico H., Mnes J.: Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. *Food Microbiol.*, 2001, **28**, 159-165.
- [19] Stoll B.J., Hansen N., Fanaroff A.A., Lemons J.A.: *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *J. Pediatr.* 2004, **144**, 821-823.
- [20] Stasiak-Rożańska L., Garbowska M., Berthold A., Molska I., Ciepiewska-Janaszek J.: Jakość mikrobiologiczna preparatów do żywienia niemowląt i małych dzieci ze szczególnym uwzględnieniem *Enterobacteriaceae* i *E. sakazakii*. *Med. Wet.* 2010, **66** (9), 622-625.
- [21] Ścieżyńska H., Gorecka K., Grochowska A., Pawłowska K., Windyga B., Mąka Ł., Karłowski K.: Ocena narażenia na *Cronobacter sakazakii* w preparatach do początkowego żywienia niemowląt w Polsce. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2010, **3**, 266-269.

## OCURRENCE OF CRONOBACTER SP. IN SELECTED FOOD PRODUCTS

### S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the occurrence frequency of *Cronobacter* sp bacteria in some selected food products, particularly in the preparations for infants and babies. Analyzed were 160 samples from dairy factories; the samples tested comprised fresh and powdered milk products. The retail product samples comprised the preparations for infants and babies, seasoning products, and teas (black, herbal, and fruit teas). The *Cronobacter* sp bacteria were not found in the preparations for infants, however, these bacteria were isolated from fresh milk obtained in a dairy factory, as well as from some seasoning products and teas.

**Key words:** *Cronobacter* sp, food products 