

Bakterie rodu *Cronobacter* – nebezpečí sušené mléčné výživy pro kojence?

MVDr. Šárka Cupáková, Ph.D., MVDr. Lenka Necedová, Ph.D.

Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Abstrakt

Publikace přináší informace o bakteriích rodu *Cronobacter* a jejich významu při onemocnění malých dětí, které je spojeno s konzumací kojenecké mléčné výživy. Preventivní opatření jsou zaměřena především na dodržování zásad správné výrobní a hygienické praxe.

Úvod

První zprávy o infekci způsobené bakteriemi rodu *Cronobacter* se datují do roku 1958, kdy se v Anglii vyskytl fatální případ meningitidy a septikémie u novorozence. Původce onemocnění byl popsán jako žlutě pigmentující *Enterobacter cloacae*. V roce 1965 byla od pacienta s meningitidou izolována bakterie tvořící žlutý pigment, která byla identifikována opět jako *E. cloacae*. Teprve na základě analýzy DNA bylo zjištěno, že žlutě pigmentující kmeny *E. cloacae* jsou z 50 % odlišné od kmenů netvořících pigment a byly v roce 1980 zařazeny do nového druhu nazvaného *Enterobacter sakazakii*. Výsledky genotypových analýz izolátů *E. sakazakii* daly v roce 2008 podnět pro vznik nového rodu *Cronobacter* zahrnujícího 5 druhů – *Cronobacter sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii* a *C. dublinensis*, který je dále dělen do tří poddruhů (5).

Základní charakteristika

Bakterie rodu *Cronobacter* (čeleď *Enterobacteriaceae*) jsou pohyblivé, fakultativně anaerobní, nesporotvorné, gramnegativní tyčinky o velikosti asi 1 x 3 μm (obr. 1). Při růstu na neselektivních půdách produkují žlutý pigment (obr. 2). Rostou v širokém rozmezí teplot 6 – 47 °C s optimem při 39 °C. Ačkoli jsou obecně považovány za termotolerantní, pasterační teploty je devitalizují. Odolnost k záhřevu (termotolerance) je u jednotlivých kmenů značně rozdílná. Ke kontaminaci pasterovaných výrobků dochází pravděpodobně při jejich sušení, plnění či rekonstituci. Odolnost bakterií vůči záhřevu je ovlivněna hodnotou pH a vodní aktivitou (5).

Mají dobrou odolnost k nízkému pH, o tom svědčí např. jejich růst v rajčatových šťávách či přežívání ve fermentovaných potravinách. Na rozdíl od salmonel či *Escherichia coli* (obojí též čeleď *Enterobacteriaceae*) vykazují bakterie *Cronobacter* spp. extrémní odolnost vůči vysokému osmotickému tlaku a vysychání, a proto jsou schopny dlouhodobě přežít v potravinách s velmi nízkou aktivitou vody (a_w) jako je kojenecká mléčná výživa (a_w 0,25 – 0,5) či kojenecké obilné kaše (a_w 0,3 – 0,69) (5). Díky svým vlastnostem se bakterie rodu *Cronobacter* stávají dominantními v teplém a suchém prostředí (např. v blízkosti sušících zařízení) a zvyšuje se tak riziko post-procesní kontaminace (3).

Některé kmeny produkují extracelulární heteropolysacharidové pouzdro, které bakteriím umožňuje přilnout k různým povrchům a vytvářet biofilm. Předpokládá se, že pouzdro hraje roli také v ochraně bakterií proti vysychání, protože polysacharid je vysoce hydratovaný (3). Tvorba biofilmu zvyšuje odolnost bakterií ke stresu, účinku antibiotik a sanitačních prostředků, což představuje velký problém zejména v nemocnicích, školkách či jídelnách (5).

Patogeneze onemocnění

Všechny druhy rodu *Cronobacter* jsou považovány za oportunní patogeny, přesné mechanismy vzniku onemocnění nejsou zatím známy. Bakterie vyvolávají sporadické infekce

i hromadná onemocnění postihující zejména centrální nervovou soustavu. Nejčastěji se jedná o zánět mozkových blan (meningitidu) či nekrotizující enterokolitidu při infekci střev. Ta se vyskytuje 10× častěji u dětí krmených mléčnou výživou oproti dětem krmeným mateřským mlékem. Další symptomy zahrnují sepsi (otravu krve), krvavý průjem či abscesy na mozku. Průběh onemocnění bývá obvykle závažný. Úmrtnost se pohybuje mezi 10 – 80 %, ke smrti dochází během několika dnů (3, 5).

Infekce postihuje všechny věkové skupiny, vysoce riziková je pro předčasně narozené děti a novorozence s nízkou porodní váhou či oslabenou imunitou. Jsou popsány i infekce zdravých dětí. Ojedinele se infekce způsobená *Cronobacter* spp. vyskytla i u dospělých osob, obvykle v kombinaci s jiným onemocněním (5).

Infekční dávka, tj. množství bakterií potřebné k vyvolání onemocnění, nebyla zatím přesně stanovena. Předpokládá se, že její výše je ovlivněna zdravotním stavem pacienta, zralostí jeho imunitního systému a vlastnostmi mikroorganismu. Někteří autoři udávají infekční dávku 10^3 (tj. tisíc) buněk. Na základě provedených růstových studií bylo vypočítáno, že bude-li mléčná výživa kontaminována jedinou buňkou *Cronobacter* spp., potom k dosažení hodnoty 10^3 bude zapotřebí minimálně 13 hodin kultivace při pokojové teplotě. Z tohoto důvodu je nepravděpodobné, že by infekci způsobil nízký počet bakterií v sušené mléčné výživě a hlavní příčinou jsou pravděpodobně nedostatečné hygienické podmínky přípravy stravy (3, 5).

Výskyt a epidemiologický význam

Rezervoár bakterií rodu *Cronobacter* ani způsob šíření nejsou zatím známy. Předpokládá se, že se u lidí a zvířat přirozeně nevyskytují, některé studie naznačují, že se může jednat o bakterie vázané na rostliny. Hlavními zdroji kontaminace potravin jsou pravděpodobně půda, voda a zelenina, jako sekundární zdroj přenosu mohou sloužit mouchy nebo hlodavci. Ačkoli byly bakterie izolovány z řady potravin živočišného a rostlinného původu (např. syrové mléko, sýry, masné výrobky) i klinických vzorků, onemocnění je epidemiologicky spojeno s konzumací kojenecké mléčné výživy (5).

Sušená kojenecká mléčná výživa není sterilní produkt, k redukci mikrobiální kontaminace dochází zejména při pasteraci mléčné směsi a následně při jejím sprejovém sušení. Předpokládá se, že ke kontaminaci produktu může docházet při přidavku některých ingrediencí po sušení či jeho balení. Významnější vliv na kontaminaci konečného produktu má zřejmě prostředí výrobního podniku než samotný výrobní proces (5).

V letech 1958-2005 bylo analyzováno 46 případů dětské infekce vyvolané *Cronobacter* spp. Porovnání jednotlivých případů objasnilo, že vznik a fatální průběh infekce ovlivňuje porodní váha, předčasný porod a věk novorozence. V 92 % byli pacienti krmeni sušenou kojeneckou výživou. Autoři poukázali na nutnost zajištění bezpečnosti sušené kojenecké výživy (1). V další studii bylo mezi roky 2000 a 2008 potvrzeno přes sto neonatálních infekcí vyvolaných *Cronobacter* spp. se smrtností 26,9 % v důsledku meningitid, bakteriemií a nekrotických enterokolitid (4).

Povinnost vyšetřovat nepřítomnost *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) ve 25 g počáteční sušené kojenecké výživy vyplývá z požadavků nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, ve znění pozdějších předpisů. V minulých letech, kdy se u nás sušená dětská výživa vyráběla např. v Opočně, spadal její dozor pod kompetenci Státní veterinární správy ČR. V současné době se sušená kojenecká výživa v ČR nevyrábí, proto se vyšetření zaměřená na průkaz *Cronobacter* spp. provádí jen zřídka. Například v SVÚ Jihlava byly v roce 2012 vyšetřeny pouze dva vzorky sušené dětské výživy (dovoz ze států EU), a to s negativním výsledkem. Od počátku platnosti nařízení (ES) č. 2073/2005 nebyl na SVÚ Jihlava žádný záchyt bakterie *Cronobacter* spp. potvrzen.

Počty infekcí vyvolaných *Cronobacter* spp. nejsou v ČR v systému Epidat evidovány a nejsou tedy oficiálně známy. Podle platné legislativy v zemích EU dosud nepatří tato infekce mezi povinně hlášená onemocnění.

Stanovení *Cronobacter* spp. v potravinách

Podle ČSN P ISO/TS 22964 (2) je stanovení *Cronobacter* spp. kvalitativní a zahrnuje čtyři kroky. Vzorek se nejdříve homogenizuje v pufrované peptonové vodě. Poté se získaná kultura přeočkuje do selektivní tekuté půdy s vankomycinem. Následuje vyočkování na *Enterobacter sakazakii* izolační agar (obr. 3) či jinou vhodnou chromogenní půdu. U vybraných suspektních kolonií se provede posouzení tvorby žlutého pigmentu a biochemická confirmace. Při druhové identifikaci a typizaci izolátů se používají molekulárně biologické metody.

Závěr

Preventivní strategie pro omezení infekce bakteriemi rodu *Cronobacter* je zaměřena na zajištění bezpečné výroby, skladování a používání sušené mléčné výživy v souladu s principy správné výrobní a hygienické praxe.

Poděkování

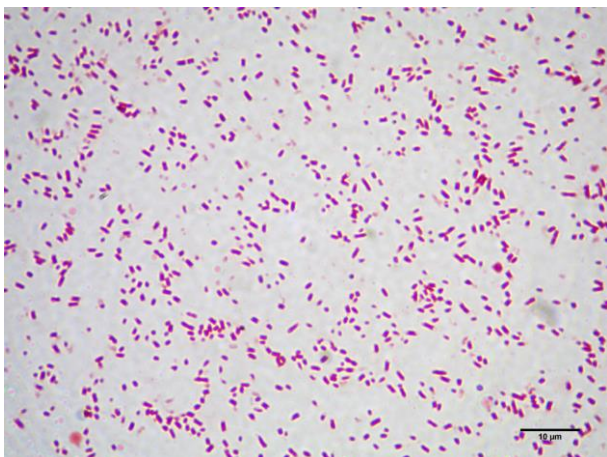
Autorky děkují MUDr. Čestmíru Benešovi za poskytnutí údajů z databáze Epidat SZÚ ČR a MVDr. Evě Klímové z SVÚ Jihlava za informace o počtech vyšetřovaných vzorků.

Použitá literatura

- 1) BOWEN, A.B. – BRAVEN, CH.R. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, roč. 12, č. 8, s. 1185 – 1189.
- 2) ČSN P ISO/TS 22964. Mléko a mléčné výrobky – Průkaz *Enterobacter sakazakii*. Praha: Český normalizační institut, 2006, 16 s.
- 3) DEMNEROVÁ, K. – PAZLAROVÁ, J. *Enterobacter sakazakii* alias *Cronobacter sakazakii* – nová hrozba? *Chemické listy*, 2009, roč. 103, č. 8, s. 641 – 646.
- 4) FRIEDEMANN, M. Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2009, roč. 28, č. 11, s. 1297 – 1304.
- 5) STRYDOM, A. aj. Species of *Cronobacter* – A review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. *International Dairy Journal*, 2012, roč. 27, č. 1-2, s. 3 – 12.

Článek byl publikován v roce 2013 v časopise *Výživa a potraviny*:

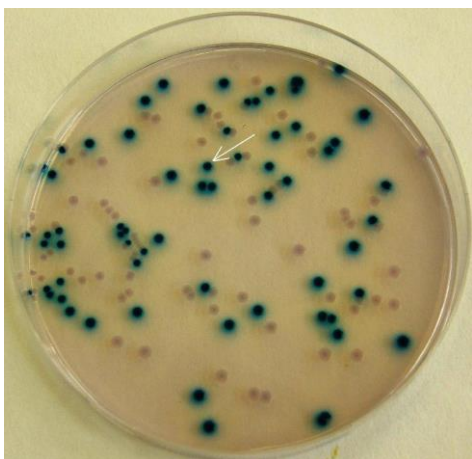
CUPÁKOVÁ, Š., NECIDOVÁ, L. Bakterie rodu *Cronobacter* – nebezpečí sušené mléčné výživy pro kojence? *Výživa a potraviny*, 2013, roč. 68, č. 4, s. 99-101.



Obrázek 1: *Cronobacter* spp. – barvení dle Grama, zvětšení 1000×



Obrázek 2: *Cronobacter* spp. – produkce žlutého pigmentu



Obrázek 3: Růst *Cronobacter* spp. na *Enterobacter sakazakii* izolačním agaru (modrozelené kolonie)