

BEBEK MAMALARINDA ENTEROBACTER SAKAZAKII VE ÖNEMİ**ENTEROBACTER SAKAZAKII AND ITS IMPORTANCE IN INFANT FORMULA**Gökçe POLAT¹, A. Kadir HALKMAN

Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş Tarihi: 26.12.2006

ÖZET: *Enterobacter sakazakii*, bebeklerde hayati tehlike yaratan menenjit, sepsis ve nekrotizan enterokolit enfeksiyonlarının önemli bir sebebidir. Erken doğmuş ve düşük kilolu bebekler ile 28 günden küçük olan bebekler *E. sakazakii* enfeksiyonu riski altındadır. Toz bebek maması ile beslenme, çeşitli klinik vakalarda epidemiyolojik olarak ilişkili bulunmuştur. Bu derlemede, *E. sakazakii*'nin biyokimyasal özellikleri, kontaminasyon kaynakları, patojenitesi, neden olduğu salgınlar, izolasyon ve identifikasyon yöntemleri ile antibiyotiklere karşı direnç ve bebek mamalarındaki davranışı üzerine bilgi verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Enterobacter sakazakii*, bebek maması, menenjit

ABSTRACT: *Enterobacter sakazakii* is an important cause of the infections such as meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis which is life threatening for babies. Premature and underweight babies and, the babies less than 28 days old are under the risk of *E. sakazakii* infection. Feeding with powdered infant formula has been found epidemiologically linked with it in various clinic cases. In this review, information about *E. sakazakii*'s biochemical features, contamination sources, its pathogenity the epidemics it caused, the methods of isolation and identification, its resistance against antibiotics, its behavior in infant formula have been given.

Key Words: *Enterobacter sakazakii*, powdered infant formula, menengitis

GİRİŞ

Son yıllarda önemi artan bir patojen olan *Enterobacter sakazakii*, bebeklerde hayati risk oluşturan menenjit, sepsis ve nekrotizan enterokolit enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Henüz tam olgunlaşmamış bağırsak yapısına sahip olan; prematüre, 28 günden daha küçük yaşta, 2 kg'dan az ağırlığa sahip ve medikal bakım gören bebekler *E. sakazakii* enfeksiyonu riski altındadırlar. Pek çok ülkede *E. sakazakii* enfeksiyonlarının çoğunun toz bebek mamaları ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Salgınlar da çoğunlukla yenidoğan bakım ünitelerinde gerçekleşmektedir.

E. sakazakii ilk kez 1958 yılında İngiltere'de iki bebeğin ölümü ile sonuçlanan bir salgında yenidoğanlarla ilişkilendirilmiştir. Son dönemde *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* tip A ve tip B ve *Cryptosporidium parvum* gibi gıda ya da su kaynaklı patojenlerle aynı sınıfta yer almıştır. Dünya üzerinde şimdiye kadar, 76 adet *E. sakazakii* enfeksiyonu vakası rapor edilmiştir. Bu salgınlarda hastalığa yakalanan bebeklerde ölüm oranı %40-80 ve hayatta kalanlar için süregelen sorunların nörolojik rahatsızlıklarla sonuçlanabildiği bildirilmiştir. Bunun üzerine toz bebek maması kullanımı ile ortaya çıkan sağlık riskini azaltmak için uygun stratejilerin uygulamasına yönelik çabalar artmıştır (1-6).

¹ E-posta: gpolat@eng.ankara.edu.tr

Genel Özellikleri

Enterobacter sakazakii, Enterobacteriaceae familyasına ait Gram negatif, fakültatif anaerob, çubuk şeklinde, spor oluşturmayan, peritrik flagellalarıyla hareketli bir bakteridir. *E. sakazakii* önceleri *Enterobacter cloacae* 'nın sarı pigment veren bir tipi olarak tanımlanırken, 1980 yılında DNA-DNA hibridizasyonu, biyokimyasal reaksiyonları, pigment üretimi ve antibiyotik duyarlılıklarındaki farklılıklar nedeniyle yeni bir tür olarak adlandırılmıştır (1-7).

Adını bir Japon mikrobiyolog olan Riichi Sakazaki'den alan ve günümüzde *E. sakazakii* olarak bilinen bu bakterinin menenjit etmeni olduğuna dair ilk açıklama, Urmenyi ve Franklin (1961) tarafından yapılmıştır. 1958 yılında, İngiltere'nin St. Albans bölgesinde yeni doğmuş iki bebekteki menenjit vakasında ve daha sonra Danimarka'da menenjitten sağ kurtulan fakat muhtelif zihinsel ve nörolojik bozukluklar yaşayan bir çocukta hastalık etmeni atipik sarı pigmentli *E. cloacae* olarak kaydedilmiştir. *E. sakazakii* isminin kayıtlara geçmiş ilk kullanımı, Farmer ve Brenner (1977) tarafından yapılmıştır. Koliform için daha önceden kullanılan beş isim Urmenyi ve Franklin basili, sarı koliform, sarı *Enterobacter*, pigmentli *cloacae* A organizması ve özellikle de sarı pigmentli *E. cloacae* 'dır (2, 3).

E. sakazakii 'nin *Enterobacter* ve *Citrobacter* türleri ile %53-54 oranında yakınlık gösterdiği, *C. freundii* ile %41, *E. cloacae* ile de %51 oranında ilişkili olduğu belirlenmiştir (2). Bunun ardından mikroorganizmanın fenotipik açıdan *E. cloacae* 'ye daha yakın olmasından dolayı *Enterobacter* cinsinde yer almasına karar verilmiştir. DNA-DNA hibridizasyonu ile yapılan çalışmalar sonunda sarı pigmentli suşların, pigmentsiz suşlarla %50'den az homoloji gösterdiğinin belirlenmesi üzerine sarı pigmentli *E. cloacae* 'nın yeni bir türü kapsamı gerektiği öne sürülmüştür (3, 7).

E. sakazakii 'nin D-sorbitol negatif olması, DNaz testinde geç pozitif sonuç vermesi ve Tryptic Soy Agarda 25 °C'deki inkübasyonda yayılmayan sarı renkli bir pigment üretmesi ile *E. cloacae* 'dan ayrıldığı belirlenmiştir (7). Test edilen 129 adet *E. sakazakii* suşunun tamamında α -glukosidaz aktivitesi belirlenmesine karşın, *E. aerogenes*, *E. cloacae* ve *E. agglomerans* 'ı içine alan diğer 97 adet *Enterobacter* türünün hiçbirinde bu tür bir aktiviteye rastlanmamıştır (8). *E. sakazakii* izolatlarının %97.3'ünün, ayrıca süttozu ve bebek mamasından izole edilen 6 adet suşun 25 ve 37 °C'de 7 gün inkübasyondan sonra Tween esteraz ürettiği tespit edilmiş ve enzimin *E. sakazakii* 'yi, esteraz negatif olan *E. cloacae* 'dan ayırmak için kullanılabileceği belirtilmiştir (9). *E. sakazakii* D-laktik asit üretmektedir ve mucate-negatiftir (2). *E. sakazakii* ve *E. cloacae* türlerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. *E. sakazakii* ve *E. cloacae* türlerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler (6)

Biyokimyasal reaksiyon	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>
α -glukosidaz	+	-
Tween 80 esteraz	+	-
Sarı pigment oluşumu	+	-
Fosfoamidaz	+	-
D-sorbitol fermentasyonu	-	+

Iversen vd (10), 16S ribozomal DNA ve *hsp60* dizisi kullanarak *E. sakazakii* 'nin filogenetik ilişkilerini araştırdıkları çalışmalarında suşların, taksonomik heterojenlik gösteren dört gruba ayrıldığını ve 16S rDNA dizisinin, *Citrobacter roseri* ile %97.8, *E. cloacae* ile %97.0 oranında benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Bakteri, besiyeri ve suşa bağlı olarak iki koloni türü (parlak ve mat) oluşturmaktadır. Tryptic Soy Agarda oluşan koloni çaplarının, 36 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra 2-3 mm, 25 °C'de 24 saat ve 48 saat inkübasyon sonrasında sırasıyla 1-1.5 ve 2-3 mm olduğu belirlenmiştir. Sıvı besiyerinde gelişen *E. sakazakii* 'nin kümelenme ve sediment oluşturma eğiliminde olduğu gözlenmiştir (2, 4, 7).

E. sakazakii 6-47 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilmektedir. *E. sakazakii* 'nin gelişme sıcaklığı aralığı Farmer vd (7) tarafından 57 suşta araştırılmıştır. Buna göre, 4 ve 50 °C'de gelişme olmazken, suşların çoğu 47 °C'de gelişim göstermiştir. Kindle vd (11), *E. sakazakii* ve *Klebsiella pneumoniae* 'nın test edilen diğer mikroorganizmalara göre (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium terrae* ve *Candida albicans*) rekonstitüe bebek mamasında daha hızlı geliştiklerini tespit etmişlerdir. Nazarowec-White ve Farber (12) tarafından, gelişme sıcaklığı, beş klinik izolat, beş gıda izolatu ve standart suş kullanılarak araştırılmış ve maksimum gelişme sıcaklığının 41-45 °C, minimum gelişme sıcaklığının 5.5-8 °C arasında olduğu bildirilmiştir. Iversen vd (13), altı klinik ve gıda suşunun 6-45 °C arasında ve en iyi 37-43 °C'de geliştiğini belirlemişlerdir. Yapılan başka bir araştırmada, bakterinin rekonstitüe bebek mamasında 8-47 °C'de geliştiği tespit edilmiştir (14). *E. sakazakii* için generasyon ve lag sürelerinin, diğer *Enterobacter* türleri için rapor edilen sürelerle yakın olduğu, fakat süt ürünlerinde bulunan diğer organizmalardan daha kısa olduğu belirlenmiştir. *E. sakazakii* için generasyon süresinin oda sıcaklığında 40 dakika olduğu bildirilmiştir. *E. sakazakii* 'nin hızlı gelişiminin, yeni doğmuş bebeklerde hastaneden kaynaklanan ve patojenle ilgili enfeksiyonların nedeni olabileceği tahmin edilmektedir (12).

E. sakazakii, %29-32 glukuronik asit, %23-30 D-glikoz, %19-24 D-galaktoz, %13-22 D-fukoz ve %0-8 D-mannozdan oluşan bir heteropolisakkarit üretmektedir. Bileşiğin ayırt edici özelliklerinin, yüksek viskozitesi ve jel formasyonu olduğu bildirilmiştir. En uygun üretim, azot oranının düşük olduğu gelişme koşullarında (C/N oranı 20:1) gerçekleşmektedir (2).

E. sakazakii 'nin asit pH'ya önemli ölçüde direnç gösterdiği belirlenmiştir. Edelson-Mammel ve Buchanan (15), HCl ile pH 3.0 ve 3.5'e ayarlanmış Tryptic Soy Brothda (TSB) 12 *E. sakazakii* suşunun canlı kalma düzeylerini incelemişlerdir. On iki suştan onunun, 37 °C'de 5 saatten fazla bir sürede 1 logaritmadan az düşüş gösterdiği, pH 3.0'da TSB'deki indirgemenin 4.9->6.3 log kob/mL düzeyinde olduğu belirtilmiştir. Skladal vd (16), 10-15 kob/500 mL düzeyinde *E. sakazakii* ile aşılınmış ve 30 °C'de inkübasyona bırakılmış sütün fermantasyonunu incelemişlerdir. Araştırmada pH, L-laktat ve D-laktat üretimindeki değişimler belirlenmiştir. *E. sakazakii* 'nin sütü hızlı bir şekilde fermente edip, pH'yı 20 saatten az bir sürede 6.6'dan 5.6'ya düşürdüğü belirtilmiştir. L-laktat ve D-laktat yoğunluklarının sırasıyla, 0.40 mM ve 10.7 mM'ye ulaştığı belirlenmiştir.

Kontaminasyon Kaynakları

E. sakazakii 'nin doğal yaşam alanı bilinmemekle beraber, bu bakteri çevrede ve gıdalarda bulunabilmektedir. Yenidoğan bebeklerde görülen enfeksiyonlar sebebiyle *E. sakazakii* 'nin, bebek maması ve süt tozu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ancak, bu bakteri gıdadan ve çevreden izole edilmiştir. Organizma, havyan ve insan bağırsak florasının bir üyesi değildir. *E. sakazakii* 'nin temel çevresel kaynaklarının su, toprak ve sebzeler olduğu, ikincil bir kontaminasyon yolunun da sinekler ve kemirgenler gibi vektörler olabileceği belirtilmiştir (2). *E. sakazakii* serebrospinal sıvılar, kan, kemik iliği, balgam, idrar, bağırsak ve solunum sistemleri, göz, kulak, yaralar ve dışkı dâhil olmak üzere çok geniş klinik kaynaklardan izole edilmiştir (1, 3). *E. sakazakii* 'nin gıdalarda ve çevrede, klinik ortamlarda olduğundan daha yaygın olduğu belirtilmiştir. Organizma, peynir, süttozu, bebek mamaları, fermente edilmiş ekmekek, tofu, ekşi çay, kürlenmiş et, dana kıyma, sosis eti ve sebzeler de dâhil olmak üzere bir dizi gıdadan izole edilmiştir. *E. sakazakii*, işleme fabrikaları ortamlarından ve kontamine olmuş UHT sütünden izole edilmiştir. Organizmanın daha çeşitli gıda içeriğinde görülebileceği, ancak mevcut izolasyon yöntemlerinin etkinliğinin kanıtlanmadığı ve bu yüzden de günümüze dek yapılmış çalışmaların, organizmanın gıdalardaki yaygınlığı ve yoğunluğu hakkında gerçek değerleri yansıtmamış olabileceği belirtilmiştir (2, 16).

E. sakazakii 'nin hayvansal kaynaklardan (Meksika'daki meyve sineği *Anastrepha ludens* ve ahır sineği larvası olan *Stomoxys calcitrans* 'dan) izole edildiği bildirilmiştir (17, 18). Kandhai vd (19) *E. sakazakii* 'yi süttozu üretim

tesislerinden (9 örneğin 8'i) ve ev tipi elektrik süpürgesinden (16 örneğin 5'i) izole etmişlerdir. Elde edilen bulgular bakterinin her yerde bulunabilen dağılımını doğrulamıştır. Engelleyici kontrol önlemleri tasarlanırken, *E. sakazakii* 'nin geniş ölçüde yaygın doğasının da göz önünde bulundurulması tavsiye edilmiştir.

E. sakazakii, pek çok gıdada tespit edilmiş olmasına rağmen, güçlü bir ilişki sadece toz bebek maması ile arasında bulunmuştur. Bebek mamasının *E. sakazakii* ile kontaminasyonu doğrudan ve dolaylı yoldan olabilir. Doğrudan kontaminasyon bakterinin, üretimin bir aşamasında bebek mamasına bulaşmasından kaynaklanmaktadır. Dolaylı kontaminasyon bebek mamasının hazırlanması sırasında blender ve kaşık gibi kirli mutfak araçlarının kullanımından kaynaklanabilmektedir (1). Beş neonatal menenjit vakasından oluşan bir salgında, bebek mamasını hazırlamak için kullanılan bir karıştırma kaşığı ve bir tabak fırçasından ve hazırlanmış bebek mamasından *E. sakazakii* izole edilmiştir (20).

Bebek mamasında *E. sakazakii* varlığına yönelik çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Muyltjens vd (21) 35 ülkeden 141 toz bebek maması örneğinin %52.2'sinin Enterobacteriaceae ile kontamine olduğunu, bunlardan %25'inin *E. agglomerans*, %21'inin *E. cloacae* ve %14'ünün *E. sakazakii* içerdiğini belirlemişlerdir. Kontaminasyon düzeyinin 0.36-66.0 kob/100 g arasında olduğu belirtilmiştir. Bu düzey, yenidoğan yoğun bakım ünitesindeki bir salgın sırasında kullanılmış olan açık bir toz mama kutusu için Simmons vd (22)'nin belirlediği 8 hücre/100 g'lık değere yakındır. Nazarowec-White ve Farber (11), Kanada'daki beş farklı şirketten alınan 120 bebek maması kutusunu test ederek bunlardan % 6.7'sinin *E. sakazakii* içerdiğini tespit etmişlerdir. Pozitif örneklerdeki *E. sakazakii* düzeylerinin sıklıkla 0.36 kob/100 g arasında olduğu belirtilmiştir. Heuvelink vd tarafından toz bebek maması ve süt tozu örneklerinde 25 g'da var/yok testi yapılmış, incelenen 170 süt tozu örneğinin 7'sinde ve 40 toz bebek mamasının 1'inde *E. sakazakii* belirlenmiştir (3).

Iversen vd (23), 82 toz bebek maması örneğini ve 404 gıda ürününü *E. sakazakii*, *Salmonella* ve Enterobacteriaceae varlığı açısından incelemişlerdir. Bakteri, 82 mamanın 2'sinden (%2.4), 49 kurutulmuş bebek gıdasının 5'inden (%10.2), 72 süt tozunun 3'ünden (%4.1), 62 peynir ürününün 2'sinden (%3.2) ve 122 bitki ve baharatın 40'ını (%37.8) kapsayan çeşitli kuru gıda maddelerinden izole edilmiştir. Bebek maması, kurutulmuş bebek gıdası ve süttozu örneklerinden *Salmonella* izole edilmemiştir. Mama ve süttozunun, *Salmonella* kontrolü ile gözlem altında tutularak hijyenik üretiminin ve Enterobacteriaceae sayımının *E. sakazakii* 'yi kontrol altına almadığı sonucuna varılmıştır. Yapılan başka bir araştırmada 58 bebek maması örneğinin 8'inde (%13.8) *E. sakazakii* belirlenmiştir (24)

***E. sakazakii* 'nin Neden Olduğu Salgınlar ve Patojenite**

E. sakazakii enfeksiyonları bebeklerde hayati tehlike yaratan menenjit, sepsis ve nekrotizan enterokolit vakalarının önemli bir sebebidir. Özellikle erken doğmuş ve düşük kilolu bebekler ile 28 günden küçük olan bebeklerin daha fazla risk altında olduğu düşünülmektedir. Yetişkinlerde ise çok daha az sayıda *E. sakazakii* enfeksiyonu bildirilmiştir ve genellikle hayati tehlike yaratmadığı saptanmıştır (1-4).

E. sakazakii 'den kaynaklanan enfeksiyonlar nadiren rapor edilmiştir. Bakteri, en çok yeni doğmuş bebekler ve 3 günlük ile 4 yaş arası çocuklarda hastalığa neden olarak kendini göstermiş olup, bebek ve çocuklarda en az 76 adet *E. sakazakii* enfeksiyonu vakası ve 19 adet ölüm rapor edilmiştir (2). Ancak, epidemiyolojik araştırmalarla doğrulanan çalışmalar, sulandırılmış toz bebek mamasının yanı sıra, hastane ortamlarında sulandırılmış mamaların hazırlanması için kullanılan araç-gereçleri kontaminasyon kaynağı olarak göstermiştir (20, 25).

Rapor edilmiş ilk *E. sakazakii* vakası, 1958'de İngiltere'de gerçekleşmiştir. Bunlara ek olarak, Kanada, Belçika, Danimarka, İzlanda, Almanya, Yunanistan, İsrail, Hollanda, İspanya, Amerika Birleşik Devletleri ve Fransa'da yeni doğmuş bebeklerde görülen *E. sakazakii* enfeksiyonu vakaları rapor edilmiş ve enfeksiyon etmeni kesin olarak tanımlanmıştır (Çizelge 2). Raporların çoğunun hastane kreşleri ve neonatal yoğun bakım ünitelerinden olduğu bildirilmiştir. Prematüre bebeklerin ve medikal sağlık sorunları olan bebeklerin *E. sakazakii* enfeksiyonuna yakalanma riski daha yüksektir. Ancak, İzlanda'da sağlıklı, zamanında doğmuş bir bebeğin,

hastaneden çıkarılmadan önce hasta olduğu ve *E. sakazakii* enfeksiyonunun kalıcı nörolojik bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir. Yeni doğmuş bebeklerde enfeksiyon riskini arttırmaya katkıda bulunan faktörler, prematüre doğum ve düşük doğum ağırlığıdır (1-3).

Çizelge 2. Dünya üzerinde *E. sakazakii* 'nin neden olduğu salgınlar ve kaynakları (6)

Yer (yıl)	Vaka (Ölüm)	Kaynak
İngiltere (1958)	2 (2)	Bilinmiyor
Danimarka (1958)	1 (1)	Bilinmiyor
ABD, Georgia (1958)	1 (0)	Bilinmiyor
ABD, Oklahoma (1958)	1 (1)	Bilinmiyor
Hindistan (1981)	1 (0)	Bilinmiyor
Danimarka (1977-1981)	8 (6)	Bebek maması
Yunanistan (1977-1981)	1 (1)	Bilinmiyor
Yunanistan (1984)	11 (4)	Bilinmiyor
ABD, Missouri (1984)	1 (0)	Bilinmiyor
ABD, Massachusetts (1984)	2 (1)	Bilinmiyor
İzlanda (1986-1987)	3 (1)	Bebek maması
ABD, Tennessee (1988)	4 (0)	Bebek maması, blender
ABD, Maryland (1990)	1 (0)	Bebek maması, blender
ABD, Ohio (1990)	1 (0)	Bilinmiyor
Belçika (1998)	12 (2)	Bebek maması
İsrail (1999-2000)	2 (0)	Bebek maması, blender
ABD, Tennessee (2001)	11 (1)	Bebek maması
Belçika (2002)	1 (1)	Bebek maması
Yeni Zelanda (2004)	5 (1)	Bebek maması
Fransa (2004)	4 (2)	Bebek maması

Van Acker vd (26) 1998'de Belçika'da nekrotizan enterokolit görülen 12 bebeğin etkilendiği bir *E. sakazakii* salgını bildirmişlerdir. Bu salgında *E. sakazakii* toz bebek mamasından hazırlanan sıvı formülden izole edilmiştir. Belçika'da 2002 yılında ticari olarak piyasa sürülmüş bir bebek maması tüketiminin ardından *E. sakazakii* kaynaklı menenjit nedeniyle bir bebek hayatını yitirmiştir. Hastalığın bulaştığı bebek mamasında düşük değerlerde *E. sakazakii* belirlenmesinin ardından ürün piyasadan toplatılmıştır. Haziran 2004'te Yeni Zelanda'da erken doğan bir bebekte *E. sakazakii* kaynaklı menenjit belirlenmiş ve ölümle sonuçlanmıştır. Bunun ardından yürütülen incelemede neonatal yoğun bakım ünitesinde diğer 4 bebeğin de bu organizmayı taşıdığını ortaya çıkarmış ancak bebeklerden hiçbirinin durumu kötüleşmemiştir. İnceleme sonunda, mikroorganizmanın kaynağının kullanılan bebek maması olduğu öne sürülmüştür (1).

Menenjit, neonatal *E. sakazakii* enfeksiyonlarında rapor edilen en sık görülen durumdur. *E. sakazakii* menenjiti için bebek ölüm oranı %40-80 olup ölüm genellikle enfeksiyonun birkaç saati içinde gerçekleşmektedir. Hayatta kalanlar için süregelen sorunların nörolojik rahatsızlıklarla sonuçlanabildiği bildirilmiştir. Pek çok neonatal *E. sakazakii* menenjiti vakasının yeni doğmuş bebeklerde en yaygın görülen gastrointestinal hastalık olan nekrotizan enterokolitle bir ilişkisi olabileceği bildirilmiştir. Hastalık; yaklaşık %2-5 oranında prematüre bebeği etkilerken, %10-55'inde ölüme yol açmaktadır. Anne sütüyle beslenmiş bebeklere kıyasla, bebek mamasıyla beslenmiş bebeklerde nekrotizan enterokolitin 10 kat daha yaygın olduğu belirtilmiştir (1-3).

Pagotto vd (27) süt emen fare modelini kullanana kadar, *E. sakazakii* 'nin minimum bulaşıcı dozunu, öldürücü dozunu veya virülenliğini belirli bir biçimde gösteren hiçbir hayvan modeli tanımlanmamıştır. Araştırmacılar, *E. sakazakii* 'nin, ağız yoluyla veya peritonlar arası aşılınmış süt emen fareler için patojenik olduğunu ve enterotoksin benzeri bir bileşen üretmeye yatkın olduğunu bulmuşlardır. Bugüne kadar *E. sakazakii* enfeksiyonu saptanmış 76'dan fazla neonatal vakada bulaşıcı doz belirlenmemiştir. Enfeksiyon dozu ile ilgili yeterli düzeyde epidemiyolojik çalışmanın bulunmamasına karşın bakterinin enfeksiyon oluşturması için gerekli hücre sayısının *Neisseria meningitidis*, *E. coli* O157 ve *Listeria monocytogenes* 4b gibi patojen bakteriler ile benzerlik göstereceği (~1000 kob) tahmin edilmektedir. Bulaşıcı doz, organizmanın geçmişi, konakçının durumu ve gıda matrisine bağlı olarak çeşitlilik gösterebilmektedir. Bu bakterinin, yeni doğmuş bebeklerin üst gastrointestinal sistemlerinde düşük pH koşullarıyla karşılaşmayacakları ve hızla ince bağırsaklara geçecekleri belirtilmiştir (2, 3).

İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri

FDA'nın (Food and Drug Administration) (28), *E. sakazakii* 'nin toz bebek mamasından izolasyonu ve sayımı için önerdiği bir yöntem mevcuttur. Yöntem, toplam 333 g ürünü (3x100 g, 3x10 g, 3x1 g) analize alan En Muhtemel Sayı (EMS) yaklaşımına dayanmaktadır. İşlem, steril saf su ile ön zenginleştirme, Enterobacteriaceae Enrichment Broth besiyerinde selektif zenginleştirme ve Violet Red Bile Glucose Agarda (VRBG) izolasyon aşamalarını kapsar. VRBG Agardan 5 adet olası *E. sakazakii* kolonisi seçilir ve Tryptic Soy Agarda 25 °C'de 48-72 saat inkübasyon sonunda pigment üretimi belirlenir. Bunu takiben API 20E biyokimyasal identifikasyon sistemi ve oksidaz testi kullanılarak doğrulanır. Ancak bu protokol yalnızca Enterobacteriaceae için seçici olup, *E. sakazakii* için belirleyici değildir. Ayrıca tamamlanması için 5 günlük bir süre gerekmektedir. Heuvelink vd (2001), ön zenginleştirme besiyeri olarak Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) kullanarak 25 g bebek maması örneğini var/yok yöntemiyle analiz etmişlerdir. Bugüne kadar, bu yöntemlerden hiçbirinin geçerliği kanıtlanmamıştır. Yine de, süt tozunda *Salmonella* tespitine benzer şekilde, 25 g toz bebek mamasında <1 hücrelik bir tespit limitinin kullanılmasının mantıklı olduğu bildirilmiştir (2).

Toz bebek mamalarında *E. sakazakii* 'nin belirlenmesinde FDA tarafından önerilen metodun uzun sürmesi ve izolasyonda kullanılan besiyerinin (VRBG Agar) *E. sakazakii* için yeterince ayırt edici ve seçici olmaması nedeniyle son yıllardaki çalışmalarda doğru sonucu daha hızlı şekilde veren besiyeri arayışına gidilmiş ve *E. sakazakii* izolasyonu için kromojenik ve florojenik besiyerleri formüle edilmiştir.

E. sakazakii α -glukosidaz pozitif olup 4-nitrophenyl- α -D-glukopyranoside içeren besiyerlerinde belirlenebilir. Bu özellik *E. sakazakii* 'yi izole etmek için geliştirilmiş besiyerlerinde diferansiyel reaksiyon için temel oluşturmaktadır. *E. sakazakii* 'nin izolasyonunu kolaylaştırmak için, Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) Agar (29), Oh-Kang Agar (30), Leuscher-Baird-Donald-Cox Agar (24) ve ESPM (R&F *Enterobacter sakazakii* Chromogenic Plating Medium) Agarın da (31) içinde bulunduğu besiyerleri, bu indikatör biyokimyasal özelliğin kullanımı ile formüle edilmişlerdir. Ancak, α -glukosidaz aktivitesi yalnızca *E. sakazakii* ile sınırlı değildir.

E. sakazakii 'nin hassas tespiti için kromojenik bir besiyeri olan DFI Agar, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranoside ($X\alpha$ Glc) kullanılarak tespit edilen α -glukosidaz aktivitesine dayanmaktadır. *E. sakazakii* 'nin 95 adet klinik ve gıda izolatinin DFI Agarda FDA yöntemine kıyasla iki gün daha kısa zamanda sonuç verdiği gösterilmiştir. *E. sakazakii* dışında Enterobacteriaceae familyasının 17 cinsine ait 148 adet suşun özellikleri DFI Agar ve standart yöntem kullanılarak karşılaştırılmıştır. Sonuçta, DFI Agar standart yöntemle göre daha avantajlı olarak bulunmuştur (29).

Leuschner vd (24) tarafından, bebek mamasında *E. sakazakii* 'nin belirlenmesi için bir besiyeri geliştirilmiştir. Bu besiyeri, *E. sakazakii* 'yi Enterobacteriaceae familyasındaki diğer türlerden ayıran α -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine kurulmuştur. *E. sakazakii*, 4-methylumbelliferyl α -D-glucoside (α -MUG) eklenmiş Nutrient Agarda UV ışığı altında ışımaya veren sarı koloniler oluşturmaktadır. Bebek mamalarından izole edilmiş olan

Acinetobacter sp., *Escherichia hermannii*, *Cedaceae lepagii*, *Leclercia acecarboxylata* ve *Enterobacter agglomerans* da sarı pigment üretmiş, fakat koloniler UV ışığı altında ışığa vermemiştir. Besiyeri, toz bebek mamasında *E. sakazakii* tespit etmek için tasarlanmış laboratuvarlar arası bir çalışmada iyi performans göstermiştir. Başka bir çalışmada, α -MUG içeren kromojenik besiyerinin *E. sakazakii* 'nin ayırt edilmesi ve izolasyonu için güvenilir olduğu gösterilmiştir (30, 32).

Leclercq vd (33), Fekal Koliform Agarda *E. sakazakii* 'nin gelişimini incelemişler ve bu besiyerinin geri alma düzeyinin Violet Red Bile Lactose Agardan biraz daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Kandhai vd (34), Tryptic Soy Agarda sarı pigmentli hücreler tarafından α -glukosidaz üretimine dayalı bir 4-h kolorimetrik analiz geliştirmişlerdir. Koloni, paranitrophenyl- α -D-glucopyranoside içeren ortamda çözülmüş, 37 °C'de inkübasyona bırakılmış ve sarı renkli paranitrophenyl hidrolizat formasyonu spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Bu yöntemle üç süt tozu üretim fabrikasından toplanan 152 çevresel örneğin 18'inden *E. sakazakii* izole edilmiştir.

ISO (International Standards Organization) tarafından 2006 yılında süt ve süt ürünlerinde *E. sakazakii* 'nin belirlenmesine yönelik standart bir analiz yöntemi yayınlanmıştır. Bunu, FDA yönteminden ayıran en önemli özellik, izolasyonda *E. sakazakii* için belirleyici olan kromojenik besiyerinin kullanımıdır. Bu yöntemde ön zenginleştirme TPS'de, selektif zenginleştirme mLST (vankomisin katkılı)'de ve izolasyon kromojenik katı besiyerinde gerçekleştirilmektedir. Kromojenik besiyerinde gelişen tipik kolonilerin doğrulanması için öncelikle sarı pigment oluşumu ve diğer biyokimyasal testler gerçekleştirilmektedir (35).

Antibiyotiklere Karşı Dirençlilik

Bakteriyel menenjit etkili bir tedavi gerektirdiği için, neonatal *E. sakazakii* enfeksiyonlarında antibiyotik duyarlılığı büyük önem taşımaktadır. *E. sakazakii* 'nin, aminoglikozitler, üredopenisilinler, ampisilin ve karboksipenisilinlere karşı tipik duyarlılık göstermekle beraber, bazı antibiyotiklere karşı diğer *Enterobacter* türlerinden daha duyarlıdır. *E. sakazakii* tüm makrolidlere, linkomisin, klindamisin, streptogramin, rifampisin, fusidik asit ve fosfomisine karşı doğal direnç göstermektedir. Tetrasiklin, aminoglikozit, birçok β -laktam, kloramfenikol, antifolat, ve kinolonun da içinde bulunduğu bazı antibiyotiklere karşı duyarlılık göstermektedir. *E. sakazakii* enfeksiyonları geleneksel olarak ampisilin-gentamisin ya da ampisilin-kloramfenikol ile tedavi edilmektedir (1, 3, 36).

Enterobacter türlerinin, β -laktamaz üretimlerine bağlı olarak penisilinler ve sefalosporinlere karşı direnç oluşturduğu bilinmektedir ve bu özellik *E. sakazakii* suşları arasında yaygınlaşmaktadır. Bu nedenle, bir aminoglikozit veya trimetofrim-sulfometaksazolla beraber karbapenem ya da daha yeni üçüncü nesil sefalosporinlerin kullanılması önerilmiş, trimetofrim de uygun bir alternatif olarak gösterilmiştir (36, 37).

Farmer vd (7), test edilen *E. sakazakii* suşlarının gentamisin, kanamisin, kloramfenikol ve ampisiline duyarlı olduğunu; %87'si veya daha fazlasının nalidiksik asit, streptomisin, tetrasiklin ve karbenisiline duyarlı olduğunu; %71 ve 67'sinin sırasıyla sülfadiazin ve kolitsine; yalnızca %13'ünün sefalotine duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Tüm suşların penisiline dirençli olduğu, test edilen 100'den fazla suştan yalnızca 1'inin multi-antibiyotik direnci olduğu görülmüştür.

Muytjens vd (38), 25 antibiyotiğe karşı test edilen 195 *E. sakazakii* suşunun %90'ı için MIC değerlerinin *E. cloacae* için belirlenen değerlerden en az iki kat daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Nazarowec-White ve Farber (39), gıda suşlarından 5/8'inin, klinik suşlardan da 8/9'unun yalnızca sülfisoksazol ve sefalotine karşı dirençli olduğu belirlemişlerdir. Diğer klinik suşun tüm ajanlara karşı duyarlılık gösterdiği, diğer üç gıda izolatının ise kloramfenikole dirençli olduğu saptanmıştır.

Kuzina vd (17), Meksika meyve sineklerinin bağırsaklarından izole edilen *E. sakazakii* 'nin, ampisilin, sefalotin, eritromisin, novobiyosin ve penisiline karşı dirençli olduğunu belirlemişlerdir. Muytjens vd (20), araştırdıkları vakalardaki *E. sakazakii* izolatlarının in vitro testlerde ampisilin, gentamisin, kloramfenikol ve kanamisine duyarlılık göstermesine rağmen, sekiz hastadan altısının yetersiz cevap verdiği ve öldüğünü rapor etmişlerdir.

Termal Direnç

E. sakazakii termotoleransı bir dizi araştırma ile belirlenmiştir. Isıl direnci konusunda önemli farklılıklar gözlenirse de, *E. sakazakii* 'nin süt ürünlerinde diğer *Enterobacter* 'lerden daha yüksek termotolerans değerine sahip olduğu görülmüştür. Termal dirençte görülen bu değişikliklerin *E. sakazakii* 'nin genetik farklılıklarıyla ilişkili olup olmadığı henüz ortaya konmamıştır (13, 40, 41, 42).

Nazarowec-White ve Farber (40), sulandırılmış toz bebek mamasındaki *E. sakazakii* 'nin termal inaktivasyon ve direnç özelliklerini bebek mamasında belirlemiştir. 7 log kob/mL popülasyonda 5 gıda ve 5 klinik izolati olmak üzere 10 *E. sakazakii* suşu 52; 54; 56; 58 ve 60 °C'de ısıtılmıştır. Sonuçta elde edilen D değerleri 5.82 °C'lik bir z değeriyle birlikte sırasıyla 54.8; 23.7; 10.3; 4.20; 2.50 dk olarak bulunmuştur. Buna göre, 6-7 log düzeyinde bir azalmanın sağlanabilmesi için 60 °C'de 15-17.5 dk ısıtım işlem gerekmektedir.

Breeuwer vd (41) ise durağan evredeki 5 adet *E. sakazakii* suşunun 58 °C'deki D değerlerinin, 0.48 dk'lık bir ortalama ile 0.30 ile 0.60 dk arasında olduğu bildirilmiştir. Diğer çalışmalarda *E. sakazakii* 'nin sulandırılmış bebek mamasındaki termal direnci test edilmişken, bu çalışmada disodyum hidrojen fosfat/ potasyum dihidrojen fosfat tamponu kullanılmıştır. Bu çalışmada, ısıtım ortamı bileşiminin D değerlerinde önemli olduğu, bebek mamasındaki yükseltilmiş yağ, protein ve karbohidrat içeriğinin *E. sakazakii* 'yi termal inaktivasyondan koruyabileceği, dolayısıyla daha yüksek D değerlerinin elde edileceği sonucuna varılmıştır.

Iversen vd (13), sulandırılmış toz bebek maması içindeki *E. sakazakii* için D değerlerini araştırmışlar ve standart suş için, 54; 56; 58; 60 ve 62 °C'de sırasıyla 16.4; 5.1; 2.6; 1.1 ve 0.3 dk'lık D değerleri bildirmişlerdir. Buna göre bebek mamasının HTST pastörizasyonu (71.2 °C'de 15 s) ile *E. sakazakii* hücreleri yeterince inaktive edilebilmektedir.

Edelson-Mammel ve Buchanan (42) tarafından 12 *E. sakazakii* suşunun termal direncinin incelendiği araştırmada, sulandırılmış bebek maması yaklaşık 8 log kob/mL düzeyinde *E. sakazakii* ile aşılabilir ve 56; 58; 60; 65 ve 70 °C'de ısıtım uygulanmıştır. İzolatlar arasında termal dirençlilik açısından yaklaşık 20 kata varan farklar olduğu belirlenmiştir. ATCC 51329 suşunun en düşük termal dirence sahip suş olduğu, en yüksek termal dirence sahip suş ise klinik bir izolat olduğu saptanmıştır.

Kindle vd (11), elektromanyetik radyasyonun (2450 MHz) *E. sakazakii* ATCC 29544 suşu ve diğer iki suş üzerindeki etkilerini incelemiştir. Test bakterileri, 5 log kob/mL'lik bir popülasyonda sulandırılmış beş farklı toz bebek mamasına aşılabilir ve mamalar ilk kaynama belirtilerine kadar mikrodalga fırında ısıtılıp, ardından soğutulmuştur. Beş örnekten dördünün *E. sakazakii* için negatif sonuç verdiği, bir mama örneğinin ise 20 kob/mL düzeyinde *E. sakazakii* içerdiği saptanmıştır. Mama bileşimindeki farklılıkların, *E. sakazakii* 'nin farklı inaktivasyon oranlarının nedeni olabileceği belirtilmiştir. Bebek mamasının biberonlarda 85-100 s boyunca 82-93 °C'de mikrodalgada ısıtılmasının, *E. sakazakii* sayısında >4 log kob/mL'lik bir indirgeme sağlayabileceği bildirilmiştir. Mikrodalga uygulamasının, sağladığı ısıtım etkisi nedeniyle, sulandırılmış bebek mamasının yeniden ısıtılmasında geleneksel yöntemlerin yerine mikrodalga kullanılması tavsiye edilmiştir.

Ozmotik Ortam ve Kurutma Koşullarına Karşı Direnç

Toz bebek maması yaklaşık 0.2 a_w değerine sahiptir. *E. sakazakii* ozmotik ortam ve kurutma gibi stres koşullarına diğer Enterobacteriaceae üyelerine kıyasla daha dirençlidir ve toz bebek mamasında uzun süre canlılığını korumaktadır (41, 43).

Oda sıcaklığında tutulmuş toz bebek mamasındaki *E. sakazakii* canlılığının incelendiği bir araştırmada, 10⁶ kob/g düzeyinde *E. sakazakii* içeren toz bebek maması 2 yıl süre ile depolanmıştır. Depolamanın ilk 5 ayında popülasyonun 2.4 log azaldığı, bu süreyi takip eden 19 ay boyunca popülasyonun 1 log daha azaldığı belirlenmiştir (43). Bu durum, *E. sakazakii* 'nin toz bebek mamasında uzun süreler boyunca canlı kalabileceğini göstermektedir. Bakterinin bu gibi koşullar altında 2 yıla varan süreler boyunca yaşamını sürdürmesinin, kapsül oluşumuna bağlanabileceği öne sürülmüştür (2).

Caubilla-Barron vd (2004) ise, *E. sakazakii* 'nin 9 klinik ve 1 gıda izolatının toz bebek mamasında canlılık düzeyini inceledikleri çalışmalarında ilk 6 ay içinde 2-4 log ve sonrasında 4-7 log düzeyinde bir azalma olduğu belirlenmiştir (3).

Bebek mamalarında *E. sakazakii* inaktivasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, anne ve inek sütünde doğal olarak bulunan kaprilik asidin monogliserit esterinin (monokaprilin) sulandırılmış bebek mamalarında *E. sakazakii* üzerine antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Araştırmada, 0.25 mM ve 50 mM monokaprilin içeren 10 mL sulandırılmış bebek mamaları 6 log kob/mL düzeyinde *E. sakazakii* ile aşılanmış ve 4; 8; 23 ve 37 °C sıcaklıkta inkübasyona tabi tutulmuş ve inkübasyonun 0; 1; 6; 24 ve 48 saatlerinde canlılık düzeyleri belirlenmiştir. 50 mM monokaprilin içeren bebek mamalarında 23 ve 37 °C'de inkübasyonun 1. saatinde *E. sakazakii* popülasyonunda >5 log kob/mL düzeyinde indirgeme sağlanmıştır. Araştırma sonunda FDA tarafından GRAS olarak değerlendirilen monokaprilinin, sulandırılmış bebek mamalarında *E. sakazakii* inaktivasyonunda potansiyel olarak kullanılabileceği ancak duyuşal çalışmalar ile bu uygulamanın desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır (44).

Türkiye'de *E. sakazakii* Araştırmaları

Konunun önemi nedeni ile gerek araştırma gerek konu taraması açısından Türkiye'de de bu konu üzerinde yoğunlaşma başlamıştır. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesinde "Toz Bebek Mamalarının *Enterobacter sakazakii* Varlığı Yönünden İncelenmesi; Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Ahmet Güner" ve Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesinde "*Enterobacter sakazakii* Gelişme Kinetiğinin İncelenmesi ve İzolasyon Yönteminin Geliştirilmesi; Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Kadir Halkman" adlı konu ile ilgili doğrudan 2 araştırma yanında web ortamında <http://www.food-info.net/tr/qa/sakazakii.htm> ve basılı derleme makalelerine de rastlanmaktadır. Derleme makale olarak erişilebilenler Çelikel ve ark. (45) ile Gültekin ve Demirel (46)'dır. Konu üzerindeki gerek araştırma gerek derleme çalışmaları sevindiricidir.

SONUÇ

Bebekler ve küçük çocuklar, gıdadan kaynaklanan enfeksiyonlara karşı çok hassastır. Bu nedenle, bebek ve devam mamalarının mikrobiyolojik güvenliği çok önemlidir. Bebek maması gibi ürünlerin, üretim, dağıtım ve kullanımı sırasında yüksek düzeyde mikrobiyolojik kalite kontrolünden geçmeleri gerekmektedir. Dolayısıyla, bebek mamasının hazırlanması ve kullanımı, hem üreticinin hem de ev veya hastane ortamındaki kullanıcının özenini gerektirmektedir (2). Hastanelerin yenidoğan ünitelerindeki bakıcılar, bebek mamasının steril bir ürün olmadığı ve bu nedenle hazırlama esnasında hijyenik önlemler alınmasının gerekli olduğu konusunda uyarılmalıdır. Hazırlanan bebek mamalarının bekleme ve yeme zamanları kısaldığında enfeksiyon riski düşmektedir. Bu gibi kontrol ölçümleri riskin azalmasına katkıda bulunacaktır. Medikal personel ve bakıcılar arasında *E. sakazakii* enfeksiyonu bilincinin artırılması ve mikroorganizmanın potansiyel tehlikelerine karşı tüm bakıcılara sürekli eğitim verilmesi, yüksek risk altındaki bebeklerin korunması için önemlidir (1).

Ülkemizde geçerli kayıt sistemlerinin yetersiz oluşu nedeniyle şimdiye kadar bebek maması kontaminasyonuna bağlı olarak gelişen *E. sakazakii* enfeksiyonu bildirilmemiştir. 2006 yılı sonu itibarıyla Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğ ve Bebek Mamaları-Bebek Formülleri Tebliği'nde yer alan mikrobiyolojik kriterlerde *E. sakazakii* 'ye ilişkin herhangi bir kısıtlama bulunmamaktadır (47). Ülkemizde tüketilen bebek mamalarının *E. sakazakii* enfeksiyon potansiyeli araştırılarak, bebek mamalarının mikrobiyolojik kalitesi ve risk potansiyelleri ortaya konulmalıdır. Bebek mamalarındaki denetim ve kayıt sistemlerinin tekrar gözden geçirilmesi, bebek maması standartlarında mikrobiyolojik kriterlere ilişkin yeni bir düzenlemenin sağlanarak gerçekçi kriterlerin yürürlüğe konulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Drudy D, Mullane NR, Quinn T, Wall PG, Fanning S. 2006. *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. Clin. Infect. Dis, 42:996-1002.
2. Iversen C, Forsythe S. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends Food Sci. Tech, 14: 443-454.
3. Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR. 2005. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. Int. J. Food Microbiol, 104: 1-34.
4. Nazarowec-White M, Farber JM. 1997. *Enterobacter sakazakii*: A review. Int. J. Food Microbiol, 34:103-113.
5. Lehner A, Stephan R. 2004. Review Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. J. Food Protect, 67(12):2850-2857.
6. Mullane NR, Drudy D, Whyte P, O'Mahony M, Scannell AGM, Wall PG, Fanning S. 2006. *Enterobacter sakazakii*: Biological properties and significance in dried infant milk Formula (IMF) powder. Int. J. Dairy Technol, 59(2):102-111.
7. Farmer JJ, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ. 1980. *Enterobacter sakazakii*, new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Bacteriol, 30:569-584,
8. Mutyjens HL, Van Der Ros-Van De Repe J, Van Druuten HAM. 1984. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha glucosidase reaction and reproducibility of the test system. J. Clin. Microbiol, 20:684-687.
9. Aldova E, Hauser O, Postuba R. 1983. Tween-esterase activity in *Enterobacter sakazakii*. Zbl. Bakt. Hyg A, 256:103-108.
10. Iversen C, Vaddington M, On SLW, Forsythe S. 2004. Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. J. Clin. Microbiol, 42:5368-5370.
11. Kindle G, Buse A, Kampa D, Meyer-Koenig U, Daschner FD. 1996. Killing activity of microwaves in milk. J. Hosp. Infect, 33:273-278.
12. Nazarowec-White M, Farber JM. 1997. Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. J. Food Protect, 60:226-230.
13. Iversen C, Lane M, Forsythe SJ. 2004. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. Lett. Appl. Microbiol, 38:378-382.
14. Kandhai MC, Reij MW, Grogno C, Van Schothorst M, Gorris LGM, Zwietering MH. 2006. Effects of Preculturing Conditions on Lag Time and Specific Growth Rate of *Enterobacter sakazakii* in Reconstituted Powdered Infant Formula. Appl. Environ. Microb, 72(4):2721-2729.
15. Edelson-Mammel S, Porteous MK, Buchanan RL. 2006. Acid Resistance of Twelve Strains of *Enterobacter sakazakii*, and the Impact of Habituating the Cells to an Acidic Environment. J. Food Sci, 71(6):201-207.
16. Skladal, P., Mascini, M., Salvadori, C., Zannoni, G. 1993. Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an L-lactate biosensor. Enzyme Microb. Tech, 15, 508-512
17. Kuzina LV, Peloquin JJ, Vacek DC, Miller TA. 2001. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephritidae). Curr. Microbiol, 42:290-294.
18. Hamilton JV, Lehane MJ, Braig HR., 2003. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. Emerg. Infect. Dis, 9, 1355-1356.
19. Kandhai MC, Reij MW, Gorris LGM, Guillaume-Gentil O, van Schothorst M. 2004. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. Lancet, 363:39-40.
20. Mutyjens HL, Zanen HC, Sonderkamp HJ, Kolee LA, Wachsmuth IK, Farmer J.J. 1983. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. J. Clin. Microbiol, 18:115-120.
21. Mutyjens HL, Roelofs-Willems H, Jaspar GH. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol, 26:743-746.
22. Simmons BP, Gelfand MS, Haas M, Metts L, Ferguson J. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. Infect. Cont Hosp. Ep, 10:398-401.
23. Iversen C, Forsythe S. 2004. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. Food Microbiol, 21: 771-777.
24. Leuschner RGK, Baird F, Donald B, Cox LJ. 2004. A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. Food Microbiol, 21: 527-533.
25. Noriega FR, Kotloff KL, Martin MA, Schwalbe RS. 1990. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. Pediatr. Infect. Dis, 9, 447-449.

26. Van Acker J, De Smet F, Muyldermans G, Bougateg A, Naessens A, Lauwers S. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol*, 39, 293-297.
27. Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S, Farber JM. 2003. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and on vivo. *J. Food Protect*, 66, 370-377.
28. FDA. 2002. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>.
29. Iversen C, Druggan P, Forsythe S. 2004. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol*, 96:133-139.
30. Oh S-W, Kang D-H. 2004. Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microb*, 70:5692-5694.
31. Restaino L, Frampton EW, Lionberg WC, Becker RJ. 2006. A Chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients and environmental sources. *J. Food Protect*, 69:315-322.
32. Oh S-W, Kang D-H. 2005. Rapid enumeration of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted milk formula by fluorogenic most-probable-number assay using 96-well microtiter plate. *J. of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 13(4):318
33. Leclercq H, Mossel DAA, Edberg SC, Struijk CB. 2001. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. *Appl. Environ. Microb*, 68:1631-1638.
34. Kandhai MC, Reij MW, van Puyvelde K, Guillaume-Gentil O, Beumer RR, van Schothorst M. 2004. A new protocol for the detection *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. *J. Food Protect*, 67: 1267-1270.
35. International Standards Organization. 2006. Milk and milk products - Detection of *Enterobacter sakazakii*, ISO/TS 22964, 13 p
36. Lai KK. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: Case reports and a review of the literature. *Med Baltimore*, 80:113-122.
37. Weir E. 2002. Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*. *Can. Med. Assoc. J*, 166:1570.
38. Mutyjiens HL, Van Der Ros-Van De Repe J. 1986. Comparative in vitro susceptibilities of eight *Enterobacter* species with special reference to *Enterobacter sakazakii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29:367-370.
39. Nazarowec-White M, Farber JM. 1999. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. *J. Med. Microbiol*, 48:559-567.
40. Nazarowec-White M, Farber JM. 1997. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried infant formula. *Lett. Appl. Microbiol*, 24:9-13.
41. Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J. Appl. Microbiol*, 95:967-973.
42. Edelson-Mammel SG, Buchanan RL. 2004. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *J. Food Protect*, 67:60-63.
43. Edelson-Mammel SG, Porteus MK, Buchanan RL. 2005. Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula. *J. Food Protect*, 68(9): 1900-1902.
44. Nair MKM, Joy J, Venkitanarayanan KS. 2004. Inactivation *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by monocaprylin. *J. Food Protect*, 67(12):2815-2819.
45. Çelikel N, Kavas G, Kınık Ö. 2005. *Enterobacter sakazakii* ve sağlık açısından önemi. *Türk Tarım (Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Dergisi) Sayı 162 (Mart-Nisan 2005)*: 44-53.
46. Gültekin M, Demirel NN. 2006. Hazır toz bebek mamaları ve *Enterobacter sakazakii*. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 36(1): 67-74.
47. www.kkgm.gov.tr web sayfası.