

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÇEŞİTLİ GIDA VE ÇEVRESEL ÖRNEKLERDE (*Cronobacter spp.*)
Cronobacter sakazakii İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU ve VİRULANS
FAKTÖRLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLE BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Ülkü DEMİRCİ
(Y1315.710002)

Gıda Güvenliği Ana Bilim Dalı
Gıda Güvenliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

Nisan, 2018



ONAY FORMU







09/04/2018

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DOKTORA TEZ ONAY BELGESİ

Enstitümüz Gıda Güvenliği Ana Bilim Dalı, Gıda Güvenliği Doktora Programı Y1315.710002 numaralı öğrencisi Ülkü DEMİRCİ'nin "ÇEŞİTLİ GIDA VE ÇEVRESEL ÖRNEKLERDE CRONOBACTER SPP. ENTEROBACTER SAKAZAKİİ İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ" adlı doktora tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 10/10/2017 tarih ve 2017/23 sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından ile Doktora tezi olarak edilmiştir.

	Unvan- Ad-Soyad	İmza
Danışman	Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR	
Üye (TİK)	Prof. Dr. Güner ARKUN	
Üye (TİK)	Prof. Dr. Zeynep Dilek HEPERKAN	
Üye	Prof. Dr. Gürhan Raif ÇİFTÇİOĞLU	
Üye	Prof. Dr. Özer ERGÜN	

Tezin Savunulduğu Tarih: 09/04/2018

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yadigar İZMİRLİ
(Enstitü Müdürü Uhdesinde)

Enstitü Müdürü





Aileme..



ÖNSÖZ

“Çeşitli Gıda ve Çevresel Örneklerde (*Cronobacter spp.*) *Cronobacter sakazakii* İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Virulans Faktörlerin Moleküler Yöntemle Belirlenmesi ” adlı doktora çalışmamın oluşmasında çok değerli görüşleri ve yönlendirmeleri ile bana yol gösteren saygıdeğer hocam, tez danışmanım Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR’a bütün içtenliğimle teşekkürü bir borç bilirim.

Tez İzleme Komitesi Üyeleri Sayın Prof. Dr. Dilek HEPERKAN ve Sayın Prof. Dr. Güner ARKUN’a destekleri, eleştirileri ve yönlendirmeleri için teşekkür ederim.

Doktora tez dönemimde değerli zamanlarını esirgmeden bana ayıran ve beni destekleyen; Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı TEKİNER, Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÇAKMAK, Sayın Haluk CAMCI, Gıda Teknikeri Muhammed GÖKÇE, Biyolog Shila VAHABZADEH ve Arşş. Gör. Tuğçe BAHÇECİ’ ye teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan hayattaki en büyük şansım olan Aile’me sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Nisan, 2018

Ülkü DEMİRCİ



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
ABSTRACT	xxi
1 GİRİŞ ve AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 <i>Cronobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter spp.</i>)	5
2.1.1 <i>C. sakazakii</i> 'nin morfolojik ve fizyolojik özellikleri	6
2.1.2 <i>C. sakazakii</i> kontaminasyon kaynakları	6
2.1.3 Fenotipik ve kültürel özellikler	9
2.1.4 <i>Cronobacter sakazakii</i> tarafından biyofilm oluşumu.....	13
2.1.5 <i>Cronobacter sakazakii</i> 'nin antibiyotik duyarlılığı ve direnci.....	14
2.2 <i>Cronobacter</i> 'in neden olduğu hastalıklar ve salgınlar	15
2.2.1 İnfantil veya neonatal enfeksiyonlar	15
2.2.2 Nekrotizan enterokolit (NEK).....	17
2.2.3 Merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonları	18
2.2.4 Yetişkinlerle ilişkili enfeksiyonlar	18
2.3 Virulans genleri ve plazmitleri	19
2.3.1 OmpA ve OmpX	23
2.3.2 Cpa	26
2.3.3 zpx	27
2.3.4 Diğer virulans karakterleri	28
2.4 Klinik, gıda ve genel ortamlarda <i>Cronobacter sakazakii</i> izolasyonu ile ilgili çalışmalar.....	29
2.4.1 Klinik ortam	29
2.4.2 Gıda ortamı.....	30
2.4.2.1 Farklı kaynaklar	30
2.4.2.2 Genel gıda ürünleri.....	31
2.4.2.3 Toz bebek formülleri.....	31
2.5 <i>Cronobacter sakazakii</i> 'nin saptama ve tanımlama yöntemleri	34
2.5.1 Geleneksel bakteriyolojik kültür	34
2.5.2 Moleküler tabanlı algılama protokolleri.....	36
3 GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1 Gereç.....	39
3.1.1 Örnek hazırlama	39
3.2 Yöntem	39
3.2.1 Biyokimyasal inceleme	40
3.2.1.1 İzolatların API 20E hızlı test kiti ile identifikasyonu.....	40

3.2.2	Moleküler inceleme.....	41
3.2.2.1	Real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR).....	41
3.2.3	İstatistiksel İncelemeler.....	44
4	BULGULAR.....	45
4.1	<i>C. sakazakii</i> (<i>Cronobacter spp.</i>) varlığının araştırılması.....	45
4.2	<i>C. sakazakii</i> pozitif örneklerde API 20E analiz sonuçlarının değerlendirilmesi.....	46
4.3	<i>C. sakazakii</i> pozitif örneklerde RT-PZR analiz sonuçlarının değerlendirilmesi.....	47
4.4	RT-PZR sonuçlarına göre pozitif örneklerde virulans genlerin karakterizasyonu.....	47
4.4.1	<i>C. sakazakii</i> (<i>Cronobacter spp.</i>) pozitif örneklerde Ct değerleri.....	52
4.4.1.1	<i>OmpA</i> izole edilen örneklerde Ct değerleri.....	52
4.4.1.2	<i>OmpX</i> izole edilen örneklerde Ct değerleri.....	53
4.4.1.3	<i>zpx</i> izole edilen örneklerde Ct değerleri.....	54
4.4.1.4	<i>Cpa</i> izole edilen örneklerde Ct değerleri.....	55
5	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	57
	KAYNAKLAR.....	65
	ÖZGEÇMİŞ.....	79

KISALTMALAR

°C	:Santigrat
A.B.D	:Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	:American Type Culture Collection
BOS	:Beyin Omurilik Sıvısı
<i>C. sakazakii</i>	: <i>Cronobacter sakazakii</i>
Caco-2	:Kolon Adeno Carcinoma, Kolon Kanseri
CHO	:Chinese Hamster Ovary
Cpa	:Cronobacter plasminogen activator
DFI	:Druggan-Forsythe-Iversen agar
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
<i>E. cloacae</i>	: <i>Enterobacter cloacae</i>
ESIA	: <i>Cronobacter sakazakii</i> Isolation agar
FAO	:Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	:Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GIS	:Gastrointestinal Sistem
ICMSF	:International Commission on Microbiological Specifications for Foods
IMF	:Infant Milk Formula
KBB	:Kan Beyin Bariyeri
LPS	:Lipopolisakkarit
mLST	:Modified Laurly Sulfate Tryptose Broth
MLST	:Multilocus Sequence Typing
MSS	:Merkezi Sinir Sistemi
NEK	:Nekrotizan Enterokolit
OmpA	:Dış membran Protein A
OmpX	:Dış membran Protein X
P	:İstatiksel P Değeri veya Olasılığı
Ph	:Çözeltinin Asitlik-Bazlık derecesini belirleyen ölçü birimi.
TBF	:Toz Bebek Formulası
RT-PZR	:Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
spp.	:Alt Tür
TPS	:Tamponlanmış peptonlu su
TSA	:Tyrptone Soy Agar
TSB	:Tyrptone Soy Broth
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü
Zpx	:Çinko metalloproteaz



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1: API 20E (BioMérieux, Fransa) biyokimyasal doğrulama test örneği.....	40
Şekil 3.2: <i>OmpA</i> real-time PZR termal profili.....	42
Şekil 3.3: <i>OmpX</i> real-time PZR termal profili.....	42
Şekil 3.4: <i>zpx</i> real-time PZR termal profili.....	43
Şekil 3.5: <i>Cpa</i> real-time PZR termal profili	43
Şekil 4.1: Örneklerde <i>C. sakazakii</i> görülme oranlarının % dağılımı.....	46
Şekil 4.2: <i>OmpA</i> amplifikasyon eğrileri (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Piriç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol).....	48
Şekil 4.3: <i>OmpA</i> erime eğrisi analizi (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Piriç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol).....	48
Şekil 4.4: <i>OmpX</i> amplifikasyon eğrileri (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Piriç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol).....	49
Şekil 4.5: <i>OmpX</i> erime eğrisi analizi (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Piriç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol).....	49
Şekil 4.6: <i>zpx</i> amplifikasyon eğrileri (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Piriç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol).....	50
Şekil 4.7: <i>zpx</i> erime eğrisi analizi (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Piriç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol).....	50
Şekil 4.8: <i>Cpa</i> amplifikasyon eğrileri (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Piriç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol).....	51
Şekil 4.9: <i>Cpa</i> erime eğrisi analizi (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Piriç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol).....	51



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: <i>Cronobacter spp.</i> gruplandırması.....	5
Çizelge 2.2: <i>C. sakazakii</i> kaynakları.....	8
Çizelge 2.3: <i>C. sakazakii</i> ve <i>E. cloacae</i> türlerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler	10
Çizelge 2.4 : <i>C. sakazakii</i> analizinde kullanılan kromojenik agarlar	12
Çizelge 2.5: Dünya genelinde <i>Cronobacter</i> enfeksiyonu salgınlarında rol oynayan Toz Bebek Formülü (TBF)	17
Çizelge 2.6: <i>Cronobacter sakazakii</i> 'nin karakteristik majör virulans faktörleri	23
Çizelge 2.7: Toz bebek mamalarında <i>Cronobacter</i> saptama yöntemleri	37
Çizelge 3.1: Örnek dağılımı.....	39
Çizelge 4.1: Örneklerde <i>C. sakazakii</i> görülme oranlarının değerlendirilmesi (n:20)	45
Çizelge 4.2: <i>C. sakazakii</i> açısından incelenen örneklerin API 20E analiz sonuçları	46
Çizelge 4.3: <i>C. sakazakii</i> açısından incelenen örneklerin RT-PZR analiz sonuçları.	47
Çizelge 4.4: <i>OmpA</i> izole edilen örneklerde Ct değerleri	52
Çizelge 4.5: <i>OmpX</i> izole edilen örneklerde Ct değerleri	53
Çizelge 4.6: <i>zpx</i> izole edilen örneklerde Ct değerleri	54
Çizelge 4.7: <i>Cpa</i> izole edilen örneklerde Ct değerleri.....	55



**ÇEŞİTLİ GIDA VE ÇEVRESEL ÖRNEKLERDE (*Cronobacter spp.*)
Cronobacter sakazakii İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU ve VİRULANS
FAKTÖRLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLE BELİRLENMESİ**

ÖZET

Cronobacter sakazakii, özellikle erken doğmuş ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde hayati risk oluşturan enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir. Farklı gıdalarda ve diğer çevresel kaynaklarda tespit edilmiş olmasına rağmen, sadece kontamine olmuş toz bebek mamaları (bebek formülü) *C. sakazakii*'nin neden olduğu bebek enfeksiyonları ile epidemiyolojik olarak ilişkilendirilmiştir. Çevresel ve gıda kaynaklı *C. sakazakii* türlerine maruz kalmak insan sağlığı açısından ciddi risk taşımaktadır. *C. sakazakii* türlerinin hızlı ve hassas moleküler yöntemlerle tespiti üzerine yeterli sayıda çalışma ülkemizde bulunmamaktadır. Moleküler tanımlama yöntemleri gelişmekte olan teknolojinin mikrobiyoloji alanında sunduğu en önemli yeniliklerden biridir. Moleküler tanımlama tekniklerine her geçen gün bir yenisinin eklenmesi, farklı amaçlarla yürütülen bilimsel çalışmalara büyük yarar sağlamaktadır. Bu çalışmada çeşitli gıdalar ve çevresel örneklerde öncelikle *C. sakazakii*'nin varlığının tespiti yapılacak ve bu bakteri üzerindeki *OmpA*, *OmpX*, *zpx* ve *Cpa* genlerinin varlıkları incelenecektir. Çalışma kapsamında 2015-2016 yılında İstanbul il sınırları içinde temin edilen paketsiz süttozu, paketli nişasta, paketli pirinç unu, paketli irmik, paketli bebek maması ve toz olmak üzere herbirinden 20 adet numune araştırma için toplanmıştır. Toplam 120 adet gıda ve toz örneklerinde biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak hızlı test kiti API 20E (BioMérieux, Fransa) ve Real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) analizler gerçekleştirilmiştir. Sonuçta; API 20E ile identifiye edilen 7 adet paketsiz süttozu, 2 adet paketli pirinç unu, 1 adet paketli irmik, 3 adet çevresel toz örneği için RT-PZR gen karakterizasyonu yapılmıştır. Şüpheli olan tüm izolatlarda *OmpA*, *OmpX*, *zpx* ve *Cpa* virulans genleri saptanmıştır. *C. sakazakii* varlığı saptanan farklı örnek grupları arasındaki parametreler incelenmiş ve bulgular ışığında parametreler arasındaki verilerin karşılaştırılmasında Fisher Freeman Halton testi ile değerlendirme yapılmıştır. Paketsiz süt tozunda *C. sakazakii* görülme oranı (%35), paketli nişasta (%0), paketli irmik (%5), paketli pirinç unu (%10), çevresel (%15) ve paketli bebek mamasında (%0) *C. sakazakii* görülme oranlarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Bulgular neticesinde, Türkiye açısından gıda ve çevresel kaynaklı *C. sakazakii* türlerinin genotipik faktörlerinden virulans özellik gösteren *OmpA*, *OmpX*, *zpx* ve *Cpa* genlerinin varlığı ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: *Cronobacter sakazakii*, virulans genler, Real-Time PZR



**ISOLATION, IDENTIFICATION AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF (*Cronobacter spp.*) *Cronobacter sakazakii*
VIRULENCE FACTORS FROM VARIED FOODS AND ENVIRONMENTAL
SAMPLES**

ABSTRACT

Cronobacter sakazakii is an opportunistic pathogen that causes life-threatening infections, especially in preterm and low birth weight infants. Although it has been detected in various nutrients and other environmental sources, only contaminated powder infant formulas have been epidemiologically associated with infections caused by *C. sakazakii*. Exposure to environmental and foodborne *C. sakazakii* species pose a serious human health risk. A sufficient number of studies on the detection of *C. sakazakii* species by rapid and sensitive molecular methods are not available in our country. Molecular identification methods are one of the most important innovations of developing technology in the field of microbiology. The addition of new molecular identification techniques day by day is of great benefit to scientific studies carried out for different purposes. The aim of this study was to genotypically identify *C. sakazakii* species in various nutrients and environmental samples in a sensitive and reliable way by using fingerprints of *OmpA*, *OmpX*, *zpx* and *Cpa* genes which enable *C. sakazakii* to easily reach organs and tissues in all mammals. Within the scope of the study, a total of 120 nutrients and environmental samples, including 20 unpackaged milk powder, 20 packaged starch, 20 packaged rice flour, 20 packaged semolina, 20 packaged baby formulas and 20 environmental samples, collected in the provincial borders of Istanbul in 2015-2016, were analysed using the rapid test kit API 20E (BioMérieux, France) and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in order to compare the cultural, biochemical and molecular methods. As a result, RT-PCR gene characterization was performed for 7 unpackaged milk powder, 2 packaged rice flour, 1 packaged semolina and 3 environmental samples identified with API 20E. *OmpA*, *OmpX*, *zpx* and *Cpa* virulence genes were detected in all suspected isolates. The parameters between different sample groups in which *C. sakazakii* were detected were examined and Fisher Freeman Halton test was used for the comparison of the data between the parameters based on the findings. Incidence rate ratio of *C. sakazakii* in unpackaged milk powder (35%) was significantly higher than that of starch (0%), semolina (5%), rice flour (%10), environmental (15%), and baby formula (0%) ($p < 0.05$). Based on the findings, the presence of *OmpA*, *OmpX*, *zpx* and *Cpa* genes, which display virulent characteristics, and are among the genotypic factors of *C. sakazakii* species of nutrient and environmental origin were shown.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*, virulence factors, Real-Time PCR



1 GİRİŞ ve AMAÇ

Cronobacter sakazakii, bebeklerde hayati risk oluşturan menenjit, sepsis ve nekrotizan enterokolit enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı bir patojendir (Huertas ve ark., 2014; Hu ve ark., 2015; Park ve ark., 2016). Enfeksiyonlar, özellikle düşük doğum ağırlıklı, prematüre bebeklerde risk oluşturmakta ve bu enfeksiyonlardaki bebek ölüm oranları % 40-80 arasında değişmektedir (Bowen ve Braden, 2006; Shaker ve ark., 2007; Jaradat ve ark., 2014). *C. Sakazakii*'nin ilk kez yeni doğan bebeklerle ilişkilendirilmesi, 1958 yılında İngiltere'de iki bebeğin ölümü ile sonuçlanan bir vaka sonucunda yapılmış ve bu bakterinin menenjit etmeni olduğu belirtilmiştir (Urmenyi ve Franklin, 1961; Iversen ve Forsythe, 2003). Uluslararası Mikrobiyolojik Gıda Standartları Komisyonu (ICMSF) 2002 yılında *C. sakazakii*'yi, bağışıklık sistemi zayıf insanlar için yaşamı tehdit eden bir etken olarak bildirmiş ve ardından su ve gıda kaynaklı *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* tip A ve B ve *Cryptosporidium parvum* gibi patojenlerle aynı kategoride sınıflandırmıştır (Iversen ve Forsythe, 2003). Gıda ve Tarım Örgütü ile Dünya Sağlık Örgütü (FAO/WHO) tarafından 2004 yılında düzenlenen bir toplantıda, toz bebek mamalarında (bebek formüllerinde) bulunabilen ve bebeklerde enfeksiyona neden olabilen mikroorganizmalar, oluşturdukları risklere göre A, B ve C olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Buna göre *C. sakazakii*, *Salmonella enterica* ile birlikte A grubuna sınıflandırılmıştır (Anonim, 2004). Bebeklerde görülen *C. sakazakii* kaynaklı enfeksiyonlarda riskli gıda grubunu bebek mamaları (formülleri) oluşturmaktadır (Hunter ve Bean, 2013; Jaradat ve ark., 2014). Bu nedenle ülkemizde Türk Gıda Kodeksi'nde 2008 yılında yapılan değişiklikle bebek formülleri ve devam formüllerinde *C. sakazakii* analizinin yapılması zorunlu hale getirilmiştir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne göre bebek formülleri ve devam formüllerinin (özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar dahil) 25g veya 25 mL'sinde *C. sakazakii* bulunmamalıdır (n=10, c=0, m= 0/25 M=0/25g-mL) (Anonim, 2011).

C. sakazakii kaynaklı infeksiyonların prevalansı ya da insidansı üzerine Dünya üzerinde yeterli ve doyurucu bilgi mevcut değildir. Bu gerçeğin arkasında yatan temel nedenler infeksiyon vakalarının sık gözükmemesi ve birçok ülkede rapor edilmemesidir (Telli ve Güner, 2011). *C. sakazakii*, tüm yaş gruplarında hastalığa yol açabilmektedir. Literatür bilgilerine bakıldığında görülme sıklığının özellikle yeni doğanlar ve bir yaşın altında olan çocuklar ile bir nedenle bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde olduğu bilinmektedir. *C. sakazakii*'nin ana kolonizasyon alanının; enterositlerle internalizasyonlarından veya lamina propria yoluyla sistemik kan akışına geçişinden önce ilk olarak mukus membranlarında, gastrik ve bağırsak epitelyal veya endotelyal dokularda kolonileştiği ve ardından beyinde envazyon gerçekleştirildiği düşünülmektedir (Hunter ve Bean, 2013). Yenidoğan, infant ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde klinik semptomları ventrikülitis, beyin apseleri, serebral infarkt ve kist oluşumu ile komplike menenjitis, bakteriyemi, nekrotik enterokolitis, ince ve kalın bağırsak iltihabı ve sepsiseyi kapsamaktadır (Holy ve Forsythe, 2014). Organizma sistemik dolaşıma girdiğinde, MSS'ne doğru yönelir; bu yolla düşük kiloyla doğmuş yenidoğanlarda ve bebeklerde menenjite neden olma meyilini artırırken, yüksek kiloyla doğmuş bebek ve yetişkinlerde bakteriyemi veya sepsise neden olur. Patojen, KBB'yi geçtiğinde ve beyne girdiğinde; beyinde aşırı miktarda serebrospinal sıvının (SSS) oluştuğu hidrosefaliye dönüşebilecek kist ve beyin apselerine ve ventrikülite yol açabilir. SSS'nin orantısız birikimi, beyindeki ventrikül adlı boşlukların anormal bir şekilde genişlemesine yol açar. Genişleyen ve içi SSS ile dolu ventriküller, potansiyel anlamda beyin dokularındaki kafatası basıncının artmasına yol açabilen SSS üretimi ve emilimi arasındaki dengenin bozulduğu bir durum oluşturur (Fakruddin ve ark, 2014).

Araştırmalar *C. sakazakii*'nin dış yüzeyini kaplayan Protein A (Outer Membrane Protein A; *OmpA*) 'nın en belirgin virulans karakter özelliği gösteren potansiyel biyomarkör olduğunu göstermiştir. Potansiyel biyomarkör *OmpA* geni neredeyse tüm memelilerde *C. sakazakii*'nin en hayati organlar ve dokulara ulaşmasını sağlamakta önemli rol oynamaktadır (Zimmerman ve ark, 2014).

Cronobacter türleri üzerine yapılan araştırmalarda selektif besiyerinden izole edilen bakterinin hızla, kolaylıkla, düşük maliyetlerle ve en önemlisi doğrulukla tanımlanması gerekmektedir. *C. sakazakii*, D- sorbitolü fermente edememekte,

DNaz enzimi üretimi daha geç olmaktadır. Katı besiyerinde düzgün ve parlak veya lastiğimsi ve mat yapıda iki farklı morfolojide koloni oluşturmaktadır. Tripton soy agar (TSA), BHI agar ve kanlı agarda 48-72 saat içerisinde sarı pigmentli koloniler oluşturmaktadır. Geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilen bakterinin (6-47°C) farklı suşlarının üreyebildiği en düşük sıcaklıklar 3.4°C, 5.5°C ve 5.7°C olarak tespit edilmiştir. Minimal infektif doz olarak *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* 4b gibi patojenlerle aynı infektif doz (1000 bakteri hücresi) kabul edilmektedir (Holy ve Forsythe, 2014). Enzim aktiviteleri ile ilgili yapılan çalışmalarda *C. sakazakii*'nin diğer *Enterobacter* türlerinden farklı olarak α -glukosidaz ve tween esteraz aktivitesi gösterdiği, buna karşın diğer türlerde görülen fosfoamidaz enzimi üretmediği bildirilmiştir (Holy ve Forsythe, 2014).

C. sakazakii, insan ve hayvan bağırsağının normal florasında bulunmaması nedeniyle, gıdaların primer kontaminasyon kaynaklarının toprak ve su olduğu ifade edilmektedir. İkincil bir kontaminasyon yolunun da sinekler ve kemirgenler gibi vektörler olabileceği belirtilmektedir. Analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ve bu bakteri üzerinde yapılan araştırmaların artması ile *C. sakazakii*'nin peynir, fermente ekmek, tofu, ekşi çay, kürlenmiş ve fermente et ürünleri, kıyma vb. gibi ürünlerden izole edildiği bildirilmektedir (Holy ve Forsythe, 2014).

Çevresel ve gıda kaynaklı *C. sakazakii* türlerine maruz kalmak insan sağlığı açısından ciddi risk taşımaktadır. *C. sakazakii* türlerinin hızlı ve hassas moleküler yöntemlerle tespiti üzerine yeterli sayıda çalışma ülkemizde bulunmamaktadır. Moleküler tanımlama yöntemleri gelişmekte olan teknolojinin mikrobiyoloji alanında sunduğu en önemli yeniliklerden biridir. Moleküler tanımlama tekniklerine her geçen gün bir yenisinin eklenmesi, farklı amaçlarla yürütülen bilimsel çalışmalara büyük yarar sağlamaktadır. Bu yöntemlerden tüm dünyada yaygın şekilde yararlanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada toplanacak çeşitli gıdalar ve çevresel örneklerde tüm memelilerde organ ve dokulara *C. sakazakii*'nin rahatlıkla ulaşmasını sağlayan *OmpA*, *OmpX*, *zpx* ve *Cpa* geninin parmak izi olarak kullanılarak *C. sakazakii* türlerinin genotipik olarak hassas ve güvenilir şekilde tespiti amaçlanmıştır



2 GENEL BİLGİLER

2.1 *Cronobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.)

Farmer ve ark. tarafından 1980’li yılların başına kadar *Enterobacter cloacae* olarak bilinen bu bakteri Japon bakteriyolog Richi Sakazakii’nin çalışmaları sonucu DNA-DNA hibridizasyonu, biyokimyasal reaksiyonlar, sarı pigment oluşturan koloniler ve antibiyotik duyarlılığındaki farklılıklardan dolayı *Cronobacter sakazakii* (*C. sakazakii*) adıyla yeni bir tür olarak tekrar tanımlanmıştır (Toğay ve ark. 2008; Koluman, 2011). 2007 yılında daha ileri polifazik taksonomik yaklaşımlar (16s rRNA, ribotipleme ve DNA-DNA hibridizasyonu) sayesinde tanımlanmış 16 adet *C. sakazakii* biyotipik grupların taksonomik sınıflandırılması değiştirilerek *Cronobacter* cinsi altında tekrar ifade edilmiştir (FAO/WHO, 2008). *Cronobacter* ismi bu bakterinin yeni doğarlarda sebep olduğu ölüm oranının yüksekliği nedeniyle Yunan mitolojisindeki yeni doğan bebekleri yutan “Cronos” adındaki tanrıdan esinlenerek verilmiştir (Iversen ve ark. 2008). Günümüz literatüründe bu cinse ait bakteriler ifade edilirken *Cronobacter* spp. ve *C. sakazakii* isimleri birlikte kullanılmaktadır (Koluman, 2011). *Cronobacter* familyasına ait alt türler *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter universalis* ve *Cronobacter condimenti*’den oluşmaktadır (Jaradat ve ark. 2014).

Çizelge 2.1: *Cronobacter* spp. gruplandırması (Forsythe, 2010)

<i>Cronobacter</i> spp.	16S küme grubu	Biyotipler	MLST
<i>C. sakazakii</i>	1	1, 2, 3, 4, 7, 8,11,13	1,3,4,8,9,12-18
<i>C. malonaticus</i>	1	5,9,14	7,10,11
<i>C. turicensis</i>	2	16	-
<i>C. muytjensii</i>	3	15	-
<i>C. dublinensis</i>	4	6,10,12	-
Genom türleri 1	4	16	-

2.1.1 *C. sakazakii*'nin morfolojik ve fizyolojik özellikleri

C. sakazakii, *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi gram negatif, peritrik flagellalı, hareketli, sporsuz, fakültatif anaerob fırsatçı patojen bir basildir (Gültekin ve Demirel, 2006; Koluman, 2011). *C. sakazakii*, D- sorbitolü fermente edememekte, DNaz enzimi üretimi daha geç olmaktadır. Katı besiyerinde düzgün ve parlak veya lastiğimsi ve mat yapıda iki farklı morfolojide koloni oluşturmaktadır. Tripton soy agar (TSA), BHI agar ve kanlı agarda 48-72 saat içerisinde sarı pigmentli koloniler oluşturmaktadır. Geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilen bakterinin (6-47°C) farklı suşlarının üreyebildiği en düşük sıcaklıklar 3.4°C, 5.5°C ve 5.7°C olarak tespit edilmiştir. Minimal infektif doz olarak *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* 4b gibi patojenlerle aynı infektif doz (1000 bakteri hücresi) kabul edilmektedir (Holy ve Forsythe, 2014). Enzim aktiviteleri ile ilgili yapılan çalışmalarda *C. sakazakii*'nin diğer *Cronobacter* türlerinden farklı olarak α -glukosidaz ve tween esteraz aktivitesi gösterdiği, buna karşın diğer türlerde görülen fosfoamidaz enzimi üretmediği bildirilmiştir (Holy ve Forsythe, 2014).

2.1.2 *C. sakazakii* kontaminasyon kaynakları

C. sakazakii'nin insan ve hayvanların sindirim sisteminden izole edilemediği, başlıca kontaminasyon kaynaklarının toprak, su ve sebzeler olduğu, ayrıca kemirgenler ve sineklerin de taşıyıcı olabileceği belirtilmektedir (Iversen ve Forsythe, 2003).

C. sakazakii birçok gıdada tespit edilmiş olmakla birlikte bebeklerde neden olduğu enfeksiyonların özellikle kontamine olmuş toz bebek mamalarından kaynaklandığı belirtilmektedir (Jaradat ve ark., 2014). Bebek mamalarının *C. sakazakii* ile kontaminasyonu doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Doğrudan kontaminasyon, bakterinin üretimin herhangi bir aşamasında bebek mamasına bulaşmasından, dolaylı kontaminasyon ise bebek mamasının hazırlanması sırasında kullanılan ve hijyenik olmayan kaşık, biberon, mama tabağı gibi malzemelerden kaynaklanmaktadır. Toz bebek maması üreten işletmelerde üretimin yapıldığı hat boyunca ve söz konusu işletmelerin toprak, su gibi çevresel kaynaklarında *C. sakazakii*'ye farklı düzeylerde rastlanıldığı belirtilmektedir (Craven ve ark., 2010; Reich ve ark.,

2010; Fu ve ark., 2011; Fang ve ark., 2015). Reich ve ark., (2010) toz bebek maması üreten bir işletmenin vakumlu temizleyicileri, doldurma makineleri ve doldurma hattından topladıkları örneklerden sırasıyla %28, %5,3 ve %8 oranında *Cronobacter spp.* tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Toz bebek mamalarının dışında *C. sakazakii*'nin tespit edildiği bazı gıdalar ve içecekler arasında peynir, yumurta, balık, süt, tavuk eti, sucuk, kabuklu deniz ürünleri, karides, arpa, kahvaltılık gevrek, baharatlar, marul, pirinç, çay ve domatesin bulunduğu da ifade edilmektedir (Beuchat ve ark., 2009).

C. sakazakii'nin doğal yaşam alanı henüz bilinmemektedir. *C. sakazakii*, çevrede ve gıdalarda bulunmakta olup en olası gıda kaynakları su, toprak ve sebzelerdir. Organizmanın fizyolojik özelliklerinden bazılarına dayalı olarak, doğal yaşam alanının bitki materyali üzerinde bulunması olasıdır (Kandhai ve ark., 2004). Bu fizyolojik özellikler organizmanın ortamda sağ kalmasına yardımcı olup bunlar kapsamında, güneş ışığında hücreyi UV ışınlarına karşı koruyan sarı pigment üretebilme kabiliyeti, diğer hücre tipleri de dahil olmak üzere yüzeylere tutunmaya yardımcı olan kapsül ve fimbria oluşturma, ve uzun kuru dönemlerde kuruma direnci oluşturma özellikleri yer alır. Bu durum aynı zamanda organizmanın, kuru otlar ve bitkiler de dahil olmak üzere bazı bitki kökenli ürünlerden ve bileşenlerden nasıl izole edildiğini açıklamaktadır (Iversen ve ark., 2004a). Bu özellikler ayrıca, organizmanın bebek mamaları, üretim ve ev ortamları içerisindeki persistan yapısına katkı sağlıyor da olabilir. Kandhai ve ark., (2004) süt tozu üretim tesisleri ve ev amaçlı elektrikli süpürgeler dahil olmak üzere, incelenen ortamların neredeyse tümünden *C. sakazakii* izole etmiştir. Dokuz tesisin sekizinde numuneler pozitif olup 16 haneden 5'i de *C. sakazakii* yönünden pozitif bulunmuştur. Bu kanıt, bu patojen organizmanın yaygın niteliğini teyit etmektedir. Buna ilave olarak, bebek maması hazırlamak için kullanılan kontamine olmuş aletler, blendırlar ve kaşıklar, ve bunun yanı sıra rekonstitüe edilmiş bebek sütü formüllerinin şişe ısıtıcılar içerisinde uzun süre saklanması, bebeklerde *C. sakazakii* enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Bar-Oz ve ark., 2001; Noriega ve ark., 1990; Iversen ve ark., 2004b). *Cronobacter sakazakii* aynı zamanda süt tozları, peynir ürünleri ve bebek mamaları gibi süt ürünlerinden de izole edildiğine dair çalışmalar vardır (Leclercq ve ark., 2002). Ayrıca bu organizma dana kıymasından, sucuk etinden

ve sebzelerden de kültürlenmiştir (Muytjens ve Kollee, 1990). *C. Sakazakii*'yi; yüzey suyu, toprak, çamur, çürümüş tahta, tahıl, kuş pislikleri, evcil hayvanlar, sığır ve inek sütü dahil olmak üzere diğer çevresel ve doğal ortamlardan kültürlenmek için geçmişte çeşitli girişimlerde bulunulmuştur (Biering ve ark., 1989). Bu ortamlardan hiçbirinde organizma tespit edilmemiştir. Her ne kadar bulaşma şekli her zaman belirgin olmasa da, kontamine bebek sütü formülleri, *C. sakazakii*'nin bilinen bir kaynağıdır ve yeni doğan bebekler için ciddi bir enfeksiyon riski teşkil etmektedir (Himmelright ve ark., 2002; Pagotto ve ark., 2003; Healy ve ark., 2009).

Literatürde tespit edilen çalışmalar ve kaynaklar Çizelge 2.2'de sunulmaktadır.

Çizelge 2.2: *C. sakazakii* kaynakları (Gültekin ve Demirel, 2006)

Kaynak	Detaylar	Referanslar
Yeni Doğanlar	Menenjit Bakterisemi Kangrene yol açan bağırsak iltihabı Yam., apandisit, konjonktiv iltihabı	Umenyi ve Finikin (1961), Muytjens ve Kollee (1983), Biering ve ark. (1989), Clark ve ark. (1990), Bar-Oz ve ark. (2001), Lai (2001) Monroe ve Tift (1979), Clark ve ark. (1990), Bar-Oz ve ark. (2001) Van Acker ve ark. (2001) Reina ve ark. (1989)
Yetişkinler	Bakterisemi	Jimenez ve Gimenez (1982), Pribyl ve ark. (1985), Murray, Welch ve Kahls (1990), Hawkins ve ark. (1991), Lai (2001), Dennison ve Morris (2002)
Yiyecek ve İçecek	Yeni doğanlar için süt tozu Kullanılan ekipmanlar (blender, kaşık gibi) Süt tozu Su, boru hatı & biofilm Hidrotermal su Pirinç Bira bardağı Tutulmuş et Fermante ekmekek Marul Tofu Ekşi çay (sour tea) Peynir, klyma, sosis, sebzeler	Fanner ve ark. (1980), Postupa ve Aldova (1984), Block ve ark. (1988), Smeets ve ark. (1998), Bar-Oz ve ark. (2001), Heuvelink ve ark. (2001), Himmelright ve ark. (2002) Block ve ark. (1988), Clark ve ark. (1990), Smeets ve ark. (1998), Bar-Oz ve ark. (2001) Postupa ve Aldova (1984), Muytjens ve ark. (1988), Heuvelink ve ark. (2001) Battolucci, Pariani, Westall, Gardini, Geraoni (1995), Al-Hadithi ve Al-Edani (1995), Oliver (1997) Mosso, de la Rosa, Vivar, Medina (1994) Cottyn ve ark. (2001) Schindler ve Metz (1990) Watanabe ve Esaki (1994) Gasse (1999) Soriano, Rico, Molto ve Manes (2001) No, Park, Lee, Hwang, Meyem (2002) Tamura, Kato, Omon, Nanba, Miyagawa, Wang ve Zhou (1995) Leclezq, Wanegue ve Baylac (2002)
Çevresel	Hastane havası Klinik malzemeleri Sinekler Sıçanlar Toprak Rizosfer Bataklık İçlenmemiş yağ	Masaki ve ark. (2001) Tuncer ve Özkan (1988), Janicka, Kania, Ulatowska, Kuznetska ve Wojda (1999) Kuzina ve ark. (2001) Gakuya, Kyule, Gathura ve Karinki (2001) Neelam, Nawaz ve Riazuddin (1987) Emilani, Lajmanovich ve Gonzalez (2001) Espeland ve Wetzel (2001) Assadi ve Mathur (1991)

2.1.3 Fenotipik ve kültürel özellikler

C. sakazakii, enterik organizmaları izole etmek için kullanılan besiyerlerde yetişir ve besiyere ve suşa bağlı olarak mat veya parlak koloniler oluşturabilir (Iversen ve Forsythe, 2003). Yeni izole edilmiş *C. sakazakii* suşları, iki ayrı morfolojiye sahip koloniler üretebilir (Farmer ve ark. 1980). Birinci tip, kuru ya da mukoid tırtıllı (çentikli veya taraklı) olarak tarif edilmekte olup bir metal öze ile dokunulduğunda lastiksi özellik gösterir ve koloni agara geri döndüğünden çok az bir kitle çıkarılabilir. İkinci tip, tipik düz bir koloni olup, bir metal öze ile kolaylıkla çıkarılabilir. Farmer ve ark. (1980), birinci türe ait özellikleri meydana getiren kolonilerin, alt kültürlenme sonrası ikinci tip özelliklere ayrışma eğiliminde olduklarını gözlemlemiştir.

C. sakazakii'nin, 48 ila 72 saat sonra 25°C'de Triptik Soya Agarı (TSA) üzerindeki kolonileri, *C. sakazakii*'nin tanımlanmasında sıklıkla geçen bir özellik olan "dağılmaz bir sarı pigment" meydana getirir. Farmer ve ark., 36°C'de daha zayıf bir sarı pigment gözlemlemiştir. Sarı pigmentin oluşması, alt kültürlenme sonrası kaybolabilir (Krieg ve Holt, 1984). Keyser ve ark. (2003), yukarı yatay akışlı anaerobik çamur yataklarından *C. sakazakii* suşları izole etmişlerdir ve bu suşlar sarı pigment oluşturamamıştır. Yakın geçmişte Iversen ve Forsythe (2007), 25°C'de 48 saat inkübasyon sonrası TSA'da sarı pigment oluşturamayan *C. sakazakii* suşları bildirmiştir. Iversen ve ark. (2007b) ayrıca, 25°C'de 72 saat inkübasyon sonrası TSA'da sarı pigment oluşturamayan on yedi suş saptamıştır.

Sarı pigment; Toluidin Mavisı agarında 36°C'de 7 gün sonra ekstraselüler DNaz üretimi ve sorbitol fermente edememe durumu (24 saat sonra 37°C'de) eşliğinde, *C. sakazakii*'nin *E. cloacae*'den ayırt edilmesinde kullanılmıştır (Farmer ve ark., 1980). *C. sakazakii* 'nin *Cronobacter* ve *Citrobacter* türleri ile %50 oranında yakınlık gösterdiği, *C. freundii* ile %41, *E. cloacae* ile de %51 oranında ilişkili olduğu belirlenmiştir (Iversen ve Forsythe, 2003). Bunun ardından mikroorganizmanın fenotipik açıdan *E. cloacae* 'ye daha yakın olmasından dolayı *Cronobacter* 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* 'nin yeni bir türü kapsamı gerektiği öne sürülmüştür

(Gurtler ve ark, 2005, Farmer ve ark, 1980). *C. 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 (Farmer ve ark, 1980). Test edilen 129 adet *C. sakazakii* suşunun tamamında α -glukosidaz aktivitesi belirlenmesine karşın, *E. aerogenes*, *E. cloacae* ve *E. agglomerans* 'ı içine alan diğer 97 adet *Cronobacter* türünün hiçbirinde bu tür bir aktiviteye rastlanmamıştır (Muytjens ve ark, 1984). *C. 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 *C. sakazakii* 'yi, esteraz negatif olan *E. cloacae* 'dan ayırmak için kullanılabileceği belirtilmiştir (Aldova ve ark, 1983). *C. sakazakii* D-laktik asit üretmektedir ve mucate-negatiftir (Iversen ve Forsythe, 2003). *C. sakazakii* ve *E. cloacae* türlerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3: *C. sakazakii* ve *E. cloacae* türlerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler (Polat ve Halkman, 2007)

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

Bu bulguların aksine, Iversen ve Forsythe (2003), D-sorbitol fermente edebilme özelliğine sahip *C. sakazakii*'nin izole edildiği araştırmalar bildirmiştir, ancak başka hiçbir araştırmacı bu bulguları teyit etmemiştir.

C. sakazakii, α -glukozidaz enzimi üretebilir ve bu özellik *C. sakazakii* için, *Cronobacter* türü içerisinde benzersizdir (Muytjens ve ark. 1984). Bu bulguların aksine, Kämpfer ve ark. (1991), α glukosidaz olarak negatif olan *C. sakazakii* suşları bildirmiştir. Ancak, Iversen ve ark. (2007b) bu bulguları reddetmiş ve bunları, *Cronobacter* türünün yanlış tanımlanmasına bağlamıştır. Muytjens ve ark. (1984), α -glukozidaz aktivitesi yönünden test edilmiş tüm *C. sakazakii* suşlarının (n=129) pozitif olduğunu, ancak diğer tüm *Cronobacter* türlerinin (n=97) negatif olduğunu bildirmiştir. Son bahsedilen *Cronobacter* türleri, *E.*

aerogenler (19 suş), *E. cloacae* (60 suş) ve *E. agglomeranlar* (18 suş) içermektedir.

Iversen ve ark. (2004a) ayrıca, *C. sakazakii*'nin izole edilmesi ve tespiti için α -glukozidaz aktivitesine dayalı bir kromojenik besiyeri olan Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) adlı besiyerini formüle etmiştir. Besiyeri, Chromogenic *Cronobacter sakazakii* Agar (Oxoid CM1055, Oxoid, İngiltere) adıyla piyasada satılmaktadır. Bu besiyeri, α -glukozidaz aktivitesini saptayan 5-bromo-4-kloro-3-indolil- α -D-glikopiranozit ihtiva etmektedir. Enzim, 5-bromo-4-kloro-3-indolil- α -D glikopiranoziti hidrolize ederek, oksijen varlığında mavi-yeşil pigment bromo kloro-indolili oluşturacak şekilde dimerleşen 5-bromo-4-kloro-3-indolil aglikonunu hidrolize eder (Iversen ve ark., 2004b). Bu ortam üzerinde *C. sakazakii* suşları 37 ° C'de 24 saat inkübasyondan sonra mavi-yeşil koloniler üretmektedir. Bu araştırmacılar, bu agarı kullanarak, *C. sakazakii*'nin 95 suşunu α -glukosidaz aktivitesi yönünden test etmiş ve tüm *C. sakazakii* suşlarının mavi-yeşil koloniler ürettiğini saptamıştır (Iversen ve ark., 2004a).

Cronobacter sakazakii İzolasyon Agarı (ESIA) aynı zamanda, DFI agarına çok benzer şekilde bir kromojenik besiyeridir ve *C. sakazakii*'nin saptanması için bir ISO (2004) protokolünde kullanılmaktadır. Bu besiyeri, AES Laboratories, Fransa'dan temin edilebilmektedir. ESIA aynı zamanda DFI agarında olduğu gibi 5-bromo-4-kloro-3-indolil- α -D-glükopiranosit içerir, ancak besiyerine ayrıca kristal violet de ilave edilir ve 5-bromo-4-kloro-3-indolil- α -D-glikopiranoziti çözmek için dimetilformamid kullanılır, diğer yandan DFI agarında bu iki bileşen ilave edilmemektedir. Ayrıca ESIA üzerinde *C. sakazakii* suşları DFI agarına benzer şekilde mavi-yeşil koloniler üretmektedir.

Kromojenik agar ticari besiyeri üreten farklı firmalardan toz formda veya kullanıma hazır petride temin edilebilir. Bu amaçla kullanılacak besiyerleri ve oluşan kolonilerin renkleri Çizelge 2.4'de verilmiştir (Lehner ve Stephan, 2004; Manafi ve Lang, 2005; Restaino ve ark. 2006; Iversen ve Forsythe, 2007; Sylviane ve ark. 2007).

Çizelge 2.4 : *C. sakazakii* analizinde kullanılan kromojenik agarlar

Üretici firma	Besiyeri adı	<i>C. sakazakii</i> kolonileri
AES	ESIA® Agar	Mavi koloniler
Biokar Diagnostics	COMPASS <i>C. sakazakii</i> Agar	Mavi-yeşil koloniler
Biomerieux	Chrom ID™ <i>Sakazakii</i> Agar	Mavi-gri'den mavi siyaha kadar değişen renklerdeki koloniler. Nadiren yeşil-siyah koloniler
LAB M	Harlequin™ <i>Cronobacter sakazakii</i> Isolation Medium (CSIM)	Mavi-yeşil koloniler
Merck	ChromoCult® <i>C. sakazakii</i> Agar	Turkuaz renkli koloniler
Oxoid	Chromogenic <i>C. sakazakii</i> Agar (DFI formülasyonu)	Mavi yeşil koloniler
R&F Laboratories	R&F® <i>C. sakazakii</i> Chromogenic Plating Medium	Zonlu veya zonsuz mavi-siyah ve mavi-gri koloniler
Sigma-Aldrich	HiCrome™ <i>C. sakazakii</i> Agar	Mavi-yeşil koloniler

Kandhai ve ark. (2004a), yine α -glukosidaz varlığına dayalı olan 4 saatlik bir kolorometrik tarama testi geliştirmiştir. Bu analizde, TSA'dan gelen sarı koloniler, p -nitrofenil- α -D-glikopiranozit ihtiva eden bir tuzlu su çözeltisi içerisinde dağıtılır ve dört saat boyunca 37°C'de inkübe edilmektedir. Çözelti daha sonra sarı renkli p -nitrofenil hidrolizatın oluşumu yönünden gözle veya spektrofotometre ile incelenmektedir. Kandhai ve ark. (2004a ,2004b), iki farklı çalışmada ayrıca, test ettikleri tüm *C. sakazakii* suşlarının (sırasıyla n=35; n=29) pozitif olduğunu saptamıştır.

C. sakazakii suşlarının ondalıklı indirgenme süresi üzerine yapılan çalışmalar, bu organizmaların termo dirençleri ile ilgili çelişkili sonuçlar doğurmuştur. Nazarowec-White ve Farber (1997b), test ettikleri *C. sakazakii* suşları (n = 10) için 58°C'de 4,2 dakikalık bir D değeri bildirmiştir. *C. sakazakii*'nin, süt ürünlerinde, diğer birçok Enterobacteriaceae'a göre ısıya daha fazla dayanıklı olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun aksine, Breeuwer ve ark. (2003), test ettikleri suşlarda (n=4) 58°C'de 0,48 dakikalık daha düşük bir D değeri bildirmiştir. Bu çalışmaya dayalı olarak, *C. sakazakii*'nin ısıya dirençli olmadığı sonucuna varılmıştır. Edelson-Mammel ve Buchanan (2004b), *C. sakazakii*'nin, değerlendirdikleri on iki suşunun D-değerlerinin önemli derecede değişkenlik

gösterdiğini bildirmiştir. D değerleri 58°C'de 0.51 ila 10.4 dakika arasında değişiklik göstermiştir.

Her ne kadar yapılan çalışmalar sonucunda *C. sakazakii* için değişken D değerleri bildirilmiş olsa da, araştırmacıların tümü, *C. sakazakii*'nin pastörizasyon sonrası canlı kalmayacağı sonucuna varmıştır (Nazarowec White ve Farber, 1997b; Breeuwer ve ark. 2003; Edelson-Mammel ve Buchanan, 2004a).

2.1.4 *Cronobacter sakazakii* tarafından biyofilm oluşumu

Cronobacter'in, paslanmaz çelik, cam, lateks, silikon, polivinil klorür ve polikarbonata yapıştığı ve bunlar üzerinde biyofilmler oluşturduğu bildirilmiştir (Iversen ve ark. 2004; Lehner ve ark. 2005). Bakteriyel hücre yüzeyi üzerindeki kapsül polisakaritleri, biyofilm oluşumunda çok önemli bir rol oynar. Kolanik asit üretimi, tüm *Cronobacter spp.*'de, wzABCKM geni ESA_0115-01175 tarafından kodlanır (Joseph ve ark. 2012c). Bakteri hücrelerinin, teflon ve plastik gibi hidrofobik polar olmayan malzemelere, cam veya metal gibi hidrofilik yüzeylere kıyasla daha hızlı yapıştığı görülmektedir (Lehner ve ark. 2005). Ayrıca, Cruz-Co'rdova ve ark. (2012), *C. sakazakii* kaynaklı flagella'nın biyofilm oluşumunda rol oynadığını bildirmiştir. Flagella'ya ilave olarak, iki hipotetik protein (ESA_00281 ve ESA_00282), biyofilm oluşumuna katkıda bulunabilecek olası adhesin proteinleri olarak tanımlanmıştır (Cruz-Co'rdova ve ark. 2012). Flagella'nın, *Cronobacter* hücrelerinin Caco-2 gibi memeli hücrelerine ve diğer epitel hücrelere tutunmasına yardım ettiği görülmektedir.

Cronobacter spp.'nin biyofilm oluşturabilme özelliği, temizleyici ve sterilize edici ajanlara direnç kazandıran çevresel streslerden korunma sağlar (Ravishankar ve Juneja, 2003; FAO/WHO, 2006). Kim ve ark. (2007) *Cronobacter spp.*'nin dezenfektan maddelere karşı direncinin, kültür içerisinde paslanmaz çelik veya hatta planktonik hücrelerin yüzeyine aşılma ve kurutulmuş plankton hücrelerine kıyasla, biyofilm oluşturduklarında arttığını ispat etmiştir. Ayrıca, bir biyofilm içinde çoğalan *Cronobacter*'i öldürmek için, planktonik durumda çoğalmaya kıyasla daha yüksek bir UV dozu gerekli olduğu saptanmıştır (Jo ve ark. 2010).

Biyofilm oluşumu besin endüstrisinde özel bir önem taşır, çünkü biyofilmler, gıdaların bozulmasına veya işlemden geçen gıda ürünlerinin kirlenmesine yol açabilecek bir mikrobik kontaminasyon kaynağı olarak etki gösterebilmektedir (Lehner ve ark. 2005; Hartmann ve ark. 2010). Gıda alanlarında ve formül hazırlamada kullanılan ekipman yüzeylerinde oluşan *Cronobacter* biyofilmlerinin, çeşitli yenidoğan salgınlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Kim ve ark. 2006). Bu gözlemler, formül ile beslenen bebekler için *Cronobacter* enfeksiyon riskini arttırdığını desteklemektedir.

2.1.5 *Cronobacter sakazakii*'nin antibiyotik duyarlılığı ve direnci

1985 yılı öncesinde, *Cronobacter* enfeksiyonu olan hastalar sıklıkla ampisilin, gentamisin ve/veya kloramfenikol ile tedavi edilmiştir. Willis & Robinson (1988), *Cronobacter*'in neden olduğu menenjitin tedavi edilmesinde gentamisin ve ampisilin kombinasyonunu önermiştir. Buna karşın, Lai (2001), tüm *Cronobacter* izolatlarının ampisilin, sefazolin ve genişlemiş spektrumlu penisilinlere karşı aynı oranda dirençli olurken, trimetoprim/sulfametoksazol ve aminoglikozitlere karşı aynı oranda duyarlı olduklarını belirlemiştir. Yakın geçmişte, Al-Nabulsi ve ark. (2011) streptomisin, gentamisin, kanamisin ve siprofloksasinin hem gerili hem de gerili olmayan *C. sakazakii* hücrelerine karşı etkili olduğunu, ve bu nedenle bu antibiyotiklerin hasta tedavi rejimleri için uygun seçenekler olabileceğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, Nazarowec-White ve Farber (1999), sekiz *Cronobacter* suşundan ikisinin tetrasikline ve kloramfenikole dirençli olduğunu saptamıştır. Kim ve ark. (2008), gıdalardan kazanılmış olan, sefalotine veya ampisiline dirençli ve tetrasikline duyarlı *Cronobacter* suşlarını tarif etmiştir. Hochel ve ark. (2012), tüm *Cronobacter* izolatlarının, tetrasiklin duyarlılıkları olarak farklılık gösterdiğini saptamıştır.

Muytjens ve van der Ros-van de Repe (1986), *Cronobacter*'in 29 antimikrobiyal ajana duyarlılığını incelemiş ve *Cronobacter*'in, incelenen diğer *Enterobacteriaceae*'ler arasında en duyarlı olduğunu saptamıştır. Bu bulgu, b-laktamaz ekspresyonuna ilişkin herhangi bir kanıt olmaksızın *Cronobacter*'in tekrarlı olarak b-laktamlara duyarlı olduğunu ispat eden Stock & Wiedemann'ın (2002) bulguları tarafından desteklenmiştir. Bunun tersine, Pitout ve ark. (1997), bazı *Cronobacter* suşlarının düşük seviyelerde b-laktamaz ürettiğini

ortaya koymuştur. Caubilla-Barron ve ark. (2007) genişlemiş spektrumlu b-laktamaz aktivitesine sahip iki *Cronobacter* izolatu tespit etmiştir. Bunun yanı sıra, Zhou ve ark. (2011), PIF'den elde edilmiş bir *Cronobacter* izolatının geniş spektrumlu b-laktamaz ürettiğini ispat etmiştir. Aynı çalışmaya göre duyarlılık sonuçları, her bir izolatın b-laktam antibiyotiklerine karşı farklı direnç seviyelerine sahip olduğunu göstermiştir (Zhou ve ark., 2011).

Her ne kadar *Cronobacter*'de çok sayıda antibiyotik direnci (mar) operonu bulunsa da (Burgos ve Varela, 2002), toplam antibiyotik direnci düzeyi diğer gıda kaynaklı patojenlere kıyasla düşük olup antibiyotik dirençli *Cronobacter*'deki artış, antibiyotiklerin fazla kullanılmasının bir sonucu olabilir (Lee ve ark., 2012).

2.2 *Cronobacter*'in neden olduğu hastalıklar ve salgınlar

2.2.1 İnfantil veya neonatal enfeksiyonlar

Bu organizmalar, ağırlıklı olarak yenidoğanlarda (bebekler, 4 haftalık) yaşamı tehdit eden enfeksiyonlarla bağlantılı fırsatçı patojenler olarak görülür (Bar-Oz ve ark., 2001; Mullane ve ark., 2008). Bebeklerde *Cronobacter* enfeksiyonlarının klinik prezentasyonu kapsamında NEC, bakteremi ve menenjit yer alırken, vaka ölüm oranının %40 ila 80 arasında değiştiği bildirilmektedir (Bowen ve Braden 2006; Friedemann, 2007). Normal doğum süresinde doğan bebeklerde de enfeksiyonlar kaydedilmiştir (Bowen ve Braden, 2006).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü 2006 istatistiklerinde, ABD'de 2500 g ağırlığında ve 1 yaşındaki düşük doğum ağırlıklı bebekler arasındaki yıllık insidans oranının 100000'de 8,7 olduğu tahmin edilmiştir (FAO/WHO, 2006). Global ölçekte, bu patojenin takip edilmesi için aktif bir izleme sistemi yoktur; ancak WHO Uzman Heyeti, 2008 raporunda, 1961'den 2008'e kadar olan vakaları takip etmiş ve bebekler ile 3 yaşındaki çocuklar arasında 120 kayıtlı *Cronobacter* vakası belirlemiştir (FAO/WHO, 2008). Dünya genelinde sadece yaklaşık 120 vaka bildirilmiş olmasına rağmen, fiili vaka sayısının çok daha yüksek olduğu kabul edilmektedir (CDC, 2009; Friedemann, 2009; Teramoto ve ark., 2010). Stoll ve ark. (2004) 10660 yenidoğan arasında *Cronobacter*'in neden olduğu sadece tek

bir sepsis vakasının teşhis edildiğini bildirmiş olup bu durum, epidemik salgınlar dışında *Cronobacter*'in düşük doğum ağırlıklı bebeklerde çok nadir olduğunu göstermektedir. Bu tek vakada tanı septisemi olsa da bebek anne sütüyle besleniyor olması, ayrıca, nozokomiyal bulaşmanın diğer yollarının mevcut olabileceğini vurgulamaktadır. Yine de sorun, *Cronobacter*'in neden olduğu enfeksiyon sayısı değil, bundan ziyade hastalıkla bağlantılı %80 ölüm oranıdır. Buna ilave olarak, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları düzelen tüm hastaların kronik nörolojik ve gelişimsel bozukluklar geliştirdikleri bildirilmiştir (Lai, 2001).

Cronobacter enfeksiyonunun erken evreli bir hipotetik kaynağı doğum kanalıdır. Ancak, vajinal yolla doğmuş bebeklerin hiç birinin doğumdan birkaç gün sonrasına kadar enfeksiyon bulgusu geliştirmiş olmaması nedeniyle bu kaynağın şu an pek ihtimal dahilinde olmadığı görülmektedir, ve aynı zamanda *Cronobacter*'in vajina mikroflorasının bir parçasını oluşturması da olası değildir (Yan ve ark., 2012; Hunter & Bean, 2013). Buna ilave olarak, Biering ve ark. (1989) *Cronobacter* enfeksiyonu ile menenjit sergileyen bebeklerin tümünün, hastalanmadan önce rekonstitüe toz süt formülü aldığını gözlemlemiştir. Ayrıca, beslenme prosedürlerine ilişkin bir inceleme sonrası, bazı toz bebek formülasyonu markalarının tüketimi, yenidoğanlarda NEC gelişimi ve *Cronobacter*'in izole edilmesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Van Acker ve ark., 2001). Kontamine toz bebek formülleri (TBF) ile epidemiyolojik olarak bağlantılı olan yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde çeşitli *Cronobacter* salgınları meydana gelmiştir (Himmelright ve ark., 2002; Teramoto ve ark., 2010). Bir araştırmada, bebek formülü paketlerinin çoğunluğunun, herhangi bir mikro organizmadan tamamen yoksun olduğu görülmüştür (Jaradat ve ark., 2009). Ancak, açılmış TBF kutularının veya formül hazırlama gereçlerinin ekstrinsik kontaminasyonu da bildirilmiştir (Noriega ve ark., 1990; Friedemann, 2009; Jaradat ve ark., 2009). Enfeksiyon riski; ürünü kirleten bakteri hücrelerinin sayısı, *Cronobacter* kaynağı, hazırlama sonrası işlem ve bebeklerin sağlık durumu (örn., düşük doğum ağırlığı, prematüre doğum veya immünoşüpresyon) gibi çeşitli faktörlere bağlı olabilir (Himmelright et ark., 2002).

Çizelge 2.5: Dünya genelinde *Cronobacter* enfeksiyonu salgınlarında rol oynayan Toz Bebek Formülü (TBF) (Singh ve ark, 2015)

Ülke	Yıl	Vaka sayısı/Ölüm sayısı
Yeni Meksika	2008	2/2
Fransa	2004	4/2
ABD	2004	1/0
Yeni Zelanda	2004	1/1
Tennessee	2001	10/1
İsrail	1999-2000	2/0
Belçika	1998	12/2
Hindistan	1992	1/1
Maryland	1990	1/0
Tennessee	1988	4/0
İzlanda	1986-1987	3/1
Danimarka	1983	1/1

2.2.2 Nekrotizan enterokolit (NEK)

Genel düşünce, *Cronobacter*'in, gastrointestinal sistem (GIS) yoluyla insan vücuduna girdiği ve burada NEK'e neden olabilme ihtimalidir (Liu ve ark, 2012b). Grishin ve ark. (2013), NEK gelişiminin duyarlı bir konak, tipik olarak fizyolojik bozulma (örn., hipoksi, hipotermi, bağırsak iskemisi) yaşayan prematüre bir bebek, enteral formül mamalarının (normalde anne sütünün yararlı koruyucu bileşenlerini içermeyen) verilmesi ve kontrolsüz bakteri kolonizasyonu gerektirdiğini belirtmektedir. Bu koşullar yüksek dereceli bir mukozal inflamasyona yol açar; bu da, apikal GIS epiteline daha da fazla zarar veren sitokinler, nitrik oksit, trombosit aktive edici faktör ve prostanoidler dahil olmak üzere yüksek düzeyde konak enflamatuar faktörün üretilmesine neden olur. Araştırmacılar aynı zamanda, *Cronobacter spp.*'nin virülansının doza bağımlı olduğunu, ancak bunun bir bütün olarak belirli bir bakteri türünün niteliğinden değil, bundan ziyade, normal zamanında doğmuş bir bebekte zararsız olurken preterm bir bebekte patojenik olabilen belirli suşların karakteristik(ler)inden kaynaklandığını öne sürmektedir (Hamby ve ark., 2011; Cetinkaya ve ark., 2013). *In vitro* enfeksiyon modelleri ayrıca, organizmanın

GIS epitelyumunun transsitozu yoluyla sistemik dolaşıma girebildiğini de düşündürmektedir (Giri ve ark., 2012).

2.2.3 Merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonları

Organizma sistemik dolaşıma girdikten sonra MSS'ye karşı bir yönelim gösterir, böylece düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlarda ve bebeklerde menenjit oluşturma eğilimini arttırırken, biraz daha yüksek doğum ağırlıklı bebekler (Yan ve ark., 2012) ya da yetişkinler arasında bakteriyemi veya sepsise neden olur. Patojen, KBB'ni geçip beyine girdiğinde ventrikülit meydana getirebilir ve kist veya beyin apseleri oluşturabilir, bunlar daha sonra, beyinde aşırı miktarda beyin omurilik sıvısının (BOS) birikmesi durumu olan hidrosefalusa dönüşebilir (Bowen ve Braden, 2006; Chenu ve Cox, 2009). Orantısız olarak BOS birikmesi, beyinde ventriküller olarak isimlendirilen alanların anormal genişlemesine yol açar. BOS ile dolu genişlemiş ventriküller, BOS üretimi ile absorpsiyon arasındaki dengenin bozulduğu bir durum yaratır; bu da potansiyel olarak beynin dokularında kafa basıncının artmasına neden olur.

2.2.4 Yetişkinlerle ilişkili enfeksiyonlar

Bebek vakalar ile karşılaştırıldığında, *Cronobacter*'e yetişkinlerde daha sık rastlanmakta olup çoğu olgu sunumunda, daha önce hasta olan veya immün yetmezliği olan yaşlı hastalarla ilgili enfeksiyonlar tarif edilmektedir. *Cronobacter* enfeksiyonu olan yetişkinlerin %50'sine kadar olan diliminde altta yatan bir malignite vardır (Lai, 2001; See ve ark., 2007). Bununla birlikte, *Cronobacter*, inmeli hastalarda sepsis, konjonktivit, aspirasyon pnömonisine, osteomyelit, diyare, akut kolesistit, yara enfeksiyonları, kalıcı kateterler ile ilişkili abseler ve idrar yolu enfeksiyonları meydana getirebilen bir patojen ile ilişkilendirilmiş veya böyle bir patojen olarak değerlendirilmiştir (Gosney ve ark. 2006; Friedemann, 2009; Flores ve ark. 2011; Yan ve ark. 2012; Tsai ve ark. 2013).

Aspirasyon pnömonisi, üriner sistem enfeksiyonları ve konjonktivit gibi *Cronobacter*'in yol açtığı nozokomiyal enfeksiyonların kontamine TBF ile ilişkili olma olasılığı düşüktür, bu nedenle tıbbi ekipman yüzeyleri, su giderleri ve kişiler arası temaslar bu enfeksiyonların olası kaynakları olabilir (Friedemann, 2009; Flores ve ark. 2011). Ancak, diğer çevresel kirlenme

kaynakları da mümkündür. Jaradat ve ark. (2009) baharatlardan izole edilmesinin yanı sıra *Cronobacter*'i ev ortamındaki elektrikli süpürge tozundan da izole etmiştir, bu da patojenin çeşitli kuru gıda ürünleri ve çevresel faktörler ile arasındaki güçlü ilişkiyi göstermektedir. See ve ark. (2007), 75 yaşında bakım evinde yaşayan bir kadında birden çok dalak apsesinin eşlik ettiği bir *Cronobacter* bakteriyemi vakasını ortaya koymuştur. Bu vaka, splenik apselerin eşlik ettiği ilk bildirilen *Cronobacter* vakası olmakla birlikte immun yetmezliği olmayan bir yetişkindeki ilk vakadır.

2.3 Virulans genleri ve plazmitleri

Enfeksiyon hastalığı oluşması için, patojen bakterinin konak ile temasa geçmesi, konak hücrelerine tutunması, kolonize olması, hücre ve dokuların içine girmesi ve sonunda hasar oluşturması gereklidir. Bakteri bu kademeleri geçerken konak bağışık yanıtından kurtulmalıdır. Bakterinin konak hücre yüzeyine tutunma işlemine aderans denir. Patojen bakterinin konak dokusunda çoğalması enfeksiyon olarak ifade edilir. Normal flora üyesi olan bakteriler için bu deyim yerine kolonizasyon deyimi kullanılır. Konak dokusuna tutunan ve enfeksiyon oluşturan bakterinin içeri girmesine invazyon denilir. Bakterinin enfeksiyon oluşturma kabiliyetine patojenite ve enfeksiyon oluşturan bakteriye patojen adı verilir. Aynı tür içindeki suşlar arasındaki patojen olanı belirtmek için virulan kelimesi kullanılır. Konakta oluşan enfeksiyon, klinik belirtiler ile seyrederse enfeksiyon hastalığı gelişmiştir. Bazı bakteriler her zaman patojen olduğu halde bazıları konak bağışıklık sisteminin hasara uğraması veya yabancı cisim varlığı gibi kolaylaştırıcı faktörler olduğu zaman enfeksiyon oluştururlar. Bu tür patojenlere fırsatçı patojen denir. Bakteriler enfeksiyon hastalıklarını toksin olarak nitelendirilen maddeleri salgılayarak oluşturabilir. Toksin salgılayan bakterilere toksijenik bakteriler denir.

Bakteri organizmaya girdikten sonra genellikle epitel hücrelerine tutunur. Daha sonra çoğalır. Bu aşamada bakteri virulans faktörleri hastalık oluşturma mekanizmasını belirler. Bazı bakteriler içeri girer, lenfatik sistem yoluyla kana karışır, kanda geçici veya kalıcı bakteriyemiye neden olur. Bakteriyemi sayesinde doku ve organa ulaşarak oralarda da çoğalır. Bazı bakteriler ise konakta tutunma işlemini başardıktan sonra orada kolonize olurlar. Daha sonra

toksinini salgılayarak hastalık oluştururlar. Konak tarafından alındıktan sonra kolonize olur ve translokasyon ile epitel hücrelerini geçerek kan dolaşımına katılmaktadır. Kapsül, doğal fagositoz ve kompleman etkisinden bakteriyi korumaktadır. Bakteri, kapsüle karşı gelişmiş antikoru olmayan bireylerde, epiglottit, menenjit ve pnömoniye neden olur. Bakteriyal virulans faktörleri kolonizasyon, konak bağışık yanıtından kurtulma ve hasar oluşturma için gerekli faktörler olarak incelenmektedir. Bakterinin hastalık oluşturabilmesi için önce konakta kolonize olması gereklidir. Konak hücresine tutunmalı ve çoğalmalıdır.

C. sakazakii'nin benzersiz osmotolerans fenotipi, muhtemelen, PIF aracılığıyla oldukça duyarlı bir konakçıya erişim sağlayarak bakterinin patojenitesine yardımcı olurken, diğer faktörler *C. sakazakii*'nin virulansını etkilemektedir. Sistemik enfeksiyona ve NEK, sepsis veya menenjit gibi bazı şiddetli *Cronobacter* enfeksiyon klinik tablolarına neden olmak için, *C. sakazakii* ya doğrudan iç bağırsak yolu hücrelerini enfekte etmeli ya da bu bariyeri aşarak kan dolaşımına ulaşmalıdır. Yapılan bir çalışmada, *C. sakazakii*'nin mukoza zarlarını, mide ve bağırsak epitelini ve endotel dokuları enfekte ettiği ispat edilmiştir (Liu ve ark. 2013; Kim ve ark. 2008; Mange ve ark. 2006). Bu çerçevede, gen kodlayıcı *C. sakazakii*'nin iç bağırsak yolu hücrelerine tutunma ve bunları istila etme yeteneği, majör virulans faktörlerini temsil eder.

Birkaç virulans geni ve plazmiti tanımlanmış ve bunların *Cronobacter spp.*'ye spesifik olduğu görülmüştür. Kothary ve ark. (2007) doku kültüründe CHO hücrelerinin yuvarlanmasına neden olan bir protein olan *çinko ihtiva eden metalloproteazın* (zpx) bir gen loküsünü tanımlamıştır. Buna ilave olarak, putatif *sodA* genlerinin varlığı, hücre içi makrofaj oksidazına ve asidik koşullara karşı *Cronobacter* için direnç sağlayabilir ve hücre içi persistansına katkıda bulunabilir (Townsend ve ark., 2007b). Ancak, bu genler ve OmpA ve OmpX tüm *Cronobacter spp.*'de görülmüştür ve bu nedenle farklı *Cronobacter* suşları arasındaki patojenite farklılıklarından sorumlu olamazlar (Joseph ve ark., 2012c). *C. sakazakii* ATCC BAA-894'ün tam genom sekansı, Cruz ve ark.'nın (2011), virulans genlerini tanımlamaya yönelik çalışmalarında diğer *Cronobacter* genom sekanslarını *C.sakazakii* sekansı ile karşılaştırmasına olanak vermiştir. Üç putatif virulans geni - tip III hemolizin (hly), sideroforla

etkileşen protein (sip) ve plazminojen aktivatörü (cpa) tanımlanmıştır. İncelenen ek açıklamalı genler arasında, Kucerova ve ark. (2010) ayrıca, katyon dış akış sisteminin tam katyonunun (cusA, cusB, cusC ve cusF) ve bunun düzenleyici geninin cusR neonatal enfeksiyonlarla ilişkili suşlarda bulunduğunu, ancak diğer suşlarda bulunmadığını da ispat etmiş, bu durum, tüm *Cronobacter spp.*'nin eşit derecede patojenik olmamasını ve menenjit oluşturmamasını açıklayabilir.

Buna ilave olarak, Franco ve ark. (2011a), tüm *Cronobacter RepFIB* plazmidlerinin, bir siderofor aracılı demir toplama sistemi (iucABCD/iutA operonu) ve ATP bağlayıcı kaset aktarımı aracılı demir alımı ve siderofor sistemi (eitCBAD operonu) olmak üzere iki demir toplama sistemi kodladığını kanıtlamıştır - bu durum, bu plazmidlerin yaygın önemli virulans plazmidleri olduğunu ve aynı zamanda *Cronobacter*'in sağkalımına katkıda bulunabildiğini ortaya koymaktadır. Çoğu patojen için, bir konakçı hücreye girdikten sonra enfeksiyon oluşturmada demir kazanma özelliği çok önemlidir. Franco ve ark. (2011b), iucABCD/iutA sideroforunun (*cronobactin*), *Cronobacter*'in sahip olduğu tek fonksiyonel siderofor olduğunu ortaya koymuştur. Ancak, Grim ve ark. (2013), bir hidrokamat tipi aerobaktin benzeri siderofor olan *cronobactin*'in *Cronobacter* içerisinde sahip olunan tek demir kazanma sistemi olmadığını ortaya koymuştur. *Cronobactin* loküsü, biyosentetik genler iucABCD'ye ve reseptör geni iutA'ya homolog olan beş genden meydana gelir. Çalışmada, demir kazanımının, sütteki demirden faydalanım ile ilişkili olması itibarıyla büyümeyi hızlandırdığı kabul edilmiş; ancak demir faydalanım genleri tüm *Cronobacter spp.* bakterileri içerisinde bulunduğundan, bunun rolü hala anlaşılammıştır (Joseph ve ark, 2012c). Grim ve ark. (2013), dokuz *Cronobacter* genomunun siliko içi hedefli sekans analizini bildirmiş ve *Cronobacter*'in, yedi tür arasında demir kazanım sistemlerini paylaştığını ve aynı zamanda ferrik ve ferröz taşıyıcıları kodlayan demir kazanım genlerine ve hem-demir sağlayıcılarına, ve bunun yanı sıra putatif TonB'ye bağımlı demir reseptörlerine ve ferrik redüktazlara sahip olduğunu ispat etmiştir. Ferröz demir kazanımı için, tüm *Cronobacter* bakterileri hem Feo hem de Efe sistemlerine sahiptir ve ferrik demirin taşınması için, tüm plazmit barındıran suşlar (% 97) aerobaktin benzeri siderofor *cronobactin*'ine sahiptir. Tüm *Cronobacter*,

enterobactin benzeri siderofor kodlayan genlere sahiptir, ancak bu sideroforun fonksiyonel olmadığı düşünülmektedir. Grim ve ark. (2013) ayrıca, cronobactin ve enterobactin reseptörlerine ilave olarak, tüm *Cronobacter* bakterilerinin, sideroforlar için ayrıca diğer organizmalar tarafından da üretilen beş ortak reseptöre (FhuA, YncD, FoxA, FhuE ve PfeA) sahip olduğunu bildirmiştir. Ferrik disitrat aktarma sistemi spesifik olarak, çoğu klinik örneklerden izole edilmiş *C. sakazakii* ve *C. malonaticus* suşlarının küçük bir alt kümesinde bulunmuş; bu durum, bu demir kazanım sisteminin *Cronobacter* virulansında rol oynadığını düşündürmektedir. Bu çalışmalar aynı zamanda, *C. dublinensis* ve *C. muytjensii*'nin, bitki patojenleri tarafından üretilen heterolog sideroforlar için Fct ve FcuA olmak üzere iki başka reseptöre sahip olduğuna dair kanıt sağlamış; bu durum bu reseptörlerin *Cronobacter spp.* bakterilerine, bir bitki hücresi içerisinde demir için daha başarılı rekabet etme avantajı sağlayabildiğini göstermektedir. Aynı zamanda, *Cronobacter*'in, türler arası iki yönlü ayrımından önce, bitki ile ilişkili bir yaşam biçimine sahip ortak bir atadan geldiği hipotezini desteklemektedir. Proteinleri ve nükleoprotein komplekslerini aktarabilen tip IV salgılama sistemleri olarak adlandırılan salgı sistemleri, *C. sakazakii* ve *C. turicensis*'te plazmid kaynaklı (*pESA2/pCTU2*) bir gen kümesi olarak tanımlanmaları itibariyle önemli virülans faktörleri olarak düşünülmektedir (Franco ve ark. 2011b). Çoğu *Cronobacter spp.* kromozomunda ve bunun yanı sıra *C. sakazakii ST4* suşları da dahil olmak üzere *C. sakazakii* tarafından taşınan pESA3 üzerinde yeni tanımlanmış birkaç tip VI salgılama sistemi (T6SS) saptanmıştır. Bununla birlikte, T6SS'nin, BBB'nin *E.coli K1* istilası için de önemli olduğu görülmüştür (Joseph ve ark. 2012c).

Çizelge 2.6: *Cronobacter sakazakii*'nin karakteristik majör virulans faktörleri (Singh ve ark, 2015)

Faktörler	Gen	Potansiyel rol
Dış membran proteinleri	<i>OmpX-OmpA</i>	Epitel hücre invazyonu
Enterotoksin	Henüz bilinmiyor	Patojenin ısıya dayanıklı toksin üretimi
Dış membran proteazı	<i>cpa</i>	Serum bakterisidal aktiviteye karşı direnç oluşumunu; plazminojen aktivasyonu, α 2-AP inaktivasyonunu sağlar.
Sialik asit Kullanımı	<i>iuc</i>	Demir transportu ve regülasyonu
Efflux sistem	<i>ibeB</i>	Beyin mikrovasküler endotel hücre invazyonu
Proteolitik enzimler	<i>zpx</i>	Hücre deformasyonu
Lipopolisakkaritler	Kromozom kodlu genler	Epitelyal sıkı bağlantı bölgelerinde hasar
Tip III hemolisin	<i>hly</i>	Hemolitik aktivite

2.3.1 OmpA ve OmpX

Cronobacter sakazakii'nin dış membran proteini olarak bilinen OmpA'nın gastrointestinal sistemde kolonizasyonu ile intestinal epitel ve beyin endotel hücrelerinde invazyona sebep olduğu ve neonatal menenjitin patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Gastrointestinal sistemin istilasında ilk adım, bakterilerin bu dokuların yüzeyine tutunmasıdır. İç epitel bariyerlerin in situ istilasının incelenmesi alışılmış değildir ve bağırsak dokusundan izole edilen Caco-2 gibi birkaç hücre dizisi, laboratuvar modelleri olarak tespit edilmiştir (Gahring ve ark., 1990; Jumarie ve Malo, 1991; Harmsen ve ark., 2000; Sambuy ve ark., 2005). *C. sakazakii*'nin Caco-2 insan epitel hücre dizilerine tutunmasını araştırmak üzere ilk çalışmada (Sharma, 1997) farklı çevresel nişlerden gelen *C. sakazakii* suşları yer almıştır. Bu izolatların yirmi sekizinin Caco-2 hücrelerinin yüzeyine tutunduğu belirlenmiştir (Mange ve ark. 2006). *C. sakazakii*'nin test edilen hücre modellerine tutunma kabiliyeti

bakteriyel fimbria oluşumundan bağımsız olsa da, Hartmann ve ark. (2010), *C. sakazakii* ES5 suşunun belirli mutantlarının Caco-2 hücrelerine tutunma etkinliğini araştırmış ve flagella yokluğunun, bakterinin tutunma kabiliyetini azalttığını belirlemiştir. Bu durum, flagella'nın bu süreç için önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer araştırmacılar, Fransa'daki bir salgından ortaya çıkan klinik izolatların tutunma kabiliyetini araştırmıştır. Bu araştırma, ilişkili hasta bilgileri eşliğinde klinik örneklerin kullanıldığı ve bu nedenle genotipler ile semptomlar ve enfeksiyon şiddeti arasında bağ kurabilen ilk in vitro çalışma olmuştur. Bu genotiplerle ilişkili klinik tablolar nekrotizan enterokolit (NEK), bakteriyemi, sepsis ve menenjit olduğu saptanmış ve çalışma, suşların virulansı ile bunların Caco-2 hücrelerine tutunma ve bunları istila etme kabiliyeti arasında bir bağ tespit etmiştir (Townsend ve ark., 2008). *C. sakazakii*'nin istilasına yol açan hücre yüzeyi üzerindeki etkileşimleri daha iyi anlamak amacıyla, bu patojen-konak etkileşimi için konakçı reseptörlerin tanımlanmasına yönelik kaydadeğer çabalar gösterilmiştir. Ökaryotik dokunun hücre dışı matrisinin bir parçasını oluşturan bir glikoprotein olan fibronektin, konak hücreye tutunma, hareket etme, büyüme ve farklılaşma süreçlerine katılır ve çeşitli patojen organizmaların tutunma sürecindeki birincil hedeflerden birisidir (Pankov ve Yamada, 2002). Çalışmalar, fibronektinin bağlanmasını, *C. sakazakii*'nin gastrointestinal sistem hücrelerine tutunmasında önemli bir adım olarak tanımlamıştır (Mange ve ark., 2006). Fibronektin düzeylerinin azalmasının, bir in vitro embriyonik bağırsak hücre modeli olan, *C. sakazakii*'nin INT-407 hücrelerine bağlanmasını bozduğu ispat edilmiştir. Bunun nedeni muhtemelen, konakçı reseptörler ile bakteri hücrelerinin yüzeyindeki adezinler arasındaki etkileşimdir. *C. sakazakii* dış zar proteini A (OmpA), bu gastrointestinal patojenin yenidoğan ve immün yetmezlikli konakçılara tutunmasında kaydadeğer bir rol oynayan önemli bir fibronektin bağlayıcı protein olarak tanımlanmıştır (Nair ve Venkitanarayanan, 2007; Mohan ve ark., 2009) . Ancak, cinsin fazla çeşitliliği nedeniyle, tüm *Cronobacter spp.* bakterileri bu yeteneğe sahip değildir.

Birçok patojenik bakteride, konakçı dokulara tutunma sürecini, patojenin ilk savunma hattını aşmasına izin verecek şekilde doku istilasını izler. Gastrointestinal istila, *Salmonella typhimurium* gibi diğer patojen bakterilerle

(60 dakikada bağıl istila oranı %60) yaygın iken, *C. sakazakii*'de sadece orta dereceli istila oranları gözlemlenmiştir (60 dakikada %0,2). Bu, orta dereceli invazif gastrointestinal patojen *Campylobacter jejuni*'ye (%0,1-%0,4) benzerdir (Hu ve Kopecko, 1999). *C. sakazakii*'deki istila mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır, ancak, bu sürece birkaç konakçı faktörün ve bakteriyel membran proteininin katıldığı görülmektedir. Konakçı tarafında, bağırsak epitelinin hücreler arası sıkı kavşakları, moleküllerin ve bakterilerin, sağlıklı bireylerin epitel hücrelerini atlamalarını önlemede rol oynar. Bu nedenle, *C. sakazakii* suşu ATCC 29544 istilasının, Gram negatif bakterilerden kaynaklanan (Moriez ve ark., 2005) lipopolisakkaritler (LPS) tarafından sıkı kavşakların bozulmasıyla büyük oranda artması şaşırtıcı değildir (Kim ve Loessner, 2008). Ayrıca, yenidoğanların epitel hücresi sıkı kavşakları ve bağırsak mikrobiyal florası henüz tam olarak gelişmemiştir ve bu nedenle, *C. sakazakii* gibi patojen istilasının kan dolaşımına girmesinin önlenmesinde etkili olmayacaktır (Anderson ve ark., 2010). PIF'de bulunan yüksek LPS düzeyleri ve *C. sakazakii*'nin yol açtığı PIF kontaminasyonu ile bir arada değerlendirildiğinde, bu durum, anne sütüyle beslenen bebeklere kıyasla, PIF ile beslenen bebeklerde gözlemlenen on kat daha büyük NEK insidans oranı için altta yatan bir mekanizma sağlayabilir (Iversen ve Forsythe, 2003). Bir Δ ompA mutantının invazifliğinin Caco-2'de %80, INT407 hücrelerinde %87 oranında azalması itibariyle (Kim ve ark, 2010), *C. sakazakii*'nin dış membran proteini A (OmpA)'nın, Caco-2 ve INT407 hücrelerinin istilasını için gerekli olduğu ispat edilmiştir (Emami ve ark. 2011; Verhoeff ve ark. 2008; Kim ve ark. 2010). Ancak, Kim ve ark. (2010) ayrıca, başka bir dış zar proteini olan OmpX'in de, Caco-2 epitel hücrelerinin istilasında önemli bir rol oynadığını ve *Yersinia pestis* ve *C. sakazakii* tarafından Hep-2 hücrelerinin istilasını için gerekli olduğunu ispat etmiştir (Kolodziejek ve ark. 2007; De Kort G. ve ark. 1994). Sonuç olarak OmpA/X delesyon mutantlarının, bakterinin karaciğer ve dalak gibi diğer organlara in vivo yayılımı bakımından kaydadeğer oranda daha az etkili olduğu gözlemlenmiştir (Kim ve ark., 2010). *C. sakazakii*, kan-beyin bariyerlerine nüfuz edebilen, eşsiz bir mikroorganizma alt grubunun bir üyesidir. Bu özellik, organizmanın, menenjit oluşturan organizmalar için vazgeçilmez bir özellik olan, insan beyninin mikrovasküler endotel hücrelerini (HBMEC) istila etme kabiliyeti ile kolaylaştırılır. Nitekim *C. sakazakii* suşları

tarafından HBMEC'in istilasının, yenidoğan *E. coli* menenjit suşu K1'inkine eşdeğer veya bundan daha büyük olduğunu ortaya konmuştur (Townsend ve ark., 2008). Daha yakın tarihli bir çalışmada, HBMEC'nin sıkı bir tek tabaka boyunca kaydadeğer transsitoz seviyeleri gözlenmiş ve elektron mikroskobu analizi yapılmış, bu analizde bazolateral yüzeyde transitoza uğramanın yanı sıra konakçı HBMEC vakuelleri içerisinde *Cronobacter* varlığı ortaya konmuştur (Giri CP ve ark., 2012). Bir yandan gerilmede kaydadeğer bir farklılaşma kaydedilirken, bu çalışma, gastrointestinal patojenin kan beyin bariyeri (BBB) 'ne nasıl nüfuz ettiğini ve nihayetinde menenjite nasıl neden olduğunu anlamamıza katkıda bulunmaktadır. *C. sakazakii*'nin gastrointestinal sisteme tutunmasında rol oynayan daha önce bahsedilen OmpA proteini aynı zamanda HBMEC'nin istilası ile de ilişkilendirilmiştir. Nair ve ark (2007), bu proteinin eksikliğinin HBMEC istilasında % 83 oranında azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur. OmpA ve OmpX, kan-beyin bariyerine nüfuz ederek organizmada muhtemel bir rol oynarken, beyin hücrelerinin ölümüne yol açan mekanizma henüz bilinmemektedir ve konakçının immün yanıtı da bir rol oynayabilir (Joseph ve Forsythe, 2012). Bunun yanı sıra, *C. sakazakii*, kollajenin lizisinden sorumlu olan çinko ihtiva eden bir metalloproteazı kodlayan ve patojenin kan beyin bariyerini geçmesine izin verebilen bir gen olan *zpx*'e sahiptir (Kothary ve ark., 2007). Ancak, tüm *C. sakazakii* suşlarının menenjit yaratmış olmadığının dikkate alınması önemlidir. Geniş ölçekli, çok odaklı bir sekans tipleme (MLST) yönteminde, neonatal menenjit vakalarına ait beyin-omurilik sıvısında bulunan baskın sekans tipi olarak *C. sakazakii* sekansı tip 4 tanımlanmıştır (Joseph ve Forsythe, 2012).

2.3.2 Cpa

C. sakazakii BAA-894'ün tüm genom dizilimi, bu suşun iki plazmide sahip olduğunu göstermiştir (pESA2 ve pESA3). In-silico analiz kullanarak, pESA3'ün omptin ailesine ait proteinlerle önemli bir özdeşliğe sahip bir dış membran proteazını kodladığını saptanmıştır. Omptinler, Enterobacteriaceae'nin birçok üyesi tarafından ifade edilen, yüzey yönelimli dış membran proteinleri olan bir aspartat proteaz ailesini içerir. Bilinen omptinlerin çoğu bakteri virülans faktörleridir ve proteaz, adhesin veya invazinler olarak işlev görürler (Kucerova ve ark.,2010).

Bilinen omptin proteinlerinin aminoasit sekansı analizleri, ailenin içinde iki grup bulunduğunu öngörür. Pla alt ailesi adı verilen ilk grup, *Salmonella enterica*'nın PgtE'sinden, *Yersinia pestis*'in Pla'sından ve *Erwinia spp*'nin PlaA'sından oluşur. OmpT olarak adlandırılan ikinci alt ailede ise *Escherichia coli*'nin OmpT ve OmpP'si ve *Shigella flexneri*'nin SopA'sı bulunur. Ayrıca, çalışmalar, her alt ailedeki üyelerin işlevsel olarak benzer olduğunu göstermiştir (Kukhonen ve Korhonen, 2004). PgtE ve Pla, insan proenzimi olan plazminojenin plazmine etkin bir şekilde dönüştürülmesi, ve plasmin inhibitörleri 2 antiplasmin (2-AP) ve plazminojen aktivatör inhibitörü 1 (PAI-1) inaktivasyonu ile kontrolsüz plasmin aktivitesinde rol oynarlar. Bu özellikler konakçıdaki *Y. pestis* ve *S. enterica*'nın yayılma ve çoğalmasını artırır. Pla ve PgtE ayrıca dolaşımdaki kompleman da dahil olmak üzere bir seri serum proteinini parçalayarak (degrade ederek) *Y.pestis* ve *S.enterica*'ya kompleman kaynaklı serum ölümünden koruma sağlarlar. PlaA'nın bakteri-bitki etkileşimlerinde önemli bir rol oynaması olasıdır. OmpT alt ailesi üyeleri, OmpT ve SopA da dahil olmak üzere yavaş bir şekilde plazminojen'i plazmin'e parçalar ve plazmin 2-AP vasıtasıyla hızla inhibe edilir (Kukhonen ve ark., 2001; Sebbane ve ark., 2006; Sodeinde ve ark,1992). OmpT ve SopA'nın ayrıca bakteri virulansında plazminojen aktivasyonu ile ilgisiz olan bir rolü olduğu da bulunmuştur. *E. coli* OmpT'si, antibiyotik aktiviteye sahip protamin ve diğer katyonik peptidlerin parçalanmasına neden olur (Stumpe ve ark., 1998) ve *S. flexneri*'nin SopA'sı, *Shigellae*'nin aktin bazlı mobilite yoluyla komşu konakçı hücrelere hücrelerarası yayılmasında önemli bir gereklilik olan IscA'yı parçalamaktadır. *C. sakazakii* dış membran proteazının aminoasit dizisinin, omptin ailesinin farklı üyeleri ile hizalanması, proteazın Pla alt ailesine ait olduğunu işaret etmektedir. Pla ile yüksek benzerlik nedeniyle, bu dış membran proteazı "Cpa", "*Cronobacter plazminojen aktivatörü*" olarak adlandırılmıştır.

2.3.3 zpx

Ekstraselüler çinko içeren metalloproteazlar, bakteriyel dünyada yaygın olarak bulunur. Üzerinde en yoğun olarak çalışılanlar, patojen bakteriler veya endüstriyel önemi olan bakteriler ile ilişkili olanlardır. Neredeyse her yerde, gram-negatif ve gram pozitif mikroorganizmalarda, aerobik veya anaerobik olmaları fark etmeksizin, bulunurlar. Bu yayılım, bu enzimlerin, onları üreten

organizmalar için önemli fonksiyonlara hizmet ettiğine işaret eder. Çinkonun enzimatik aktivite için önemi nedeniyle, bu enzim ailesinin primer yapısında kaynağından bağımsız olarak yaygın bir aminoasit dizilimi homolojisinin olması şaşırtıcı değildir. Kanıtlar, konverjen (yakınsayan) ve diverjen (uzaksayan) evrim güçlerinin iş başında olduğunu göstermektedir. Bakteriyel çinko içeren metaloendopeptidazların geniş ailesinde, çeşitli bakteri türlerinde termolizin-benzeri, elastaz-benzeri ve Serratia proteaz-benzeri metaloproteazlar gibi daha küçük aile birimleri gözlemlenir. Bu inceleme hazırlanma aşamasındayken çinko içeren metaloproteazların yeni bir fonksiyonu keşfedilmiştir. *Clostridium tetani* ve *Clostridium botulinum* tip B nörotoksinlerin, nörotransmisyonunda rol alan küçük sinaptik veziküllerin ayrılmaz bir membran proteini olan sinaptobrevin için spesifitesini olan çinko metaloproteazları olduğu gösterilmiştir. Patojeniteye neden olan proteazların etki şekilleri hakkında diğer bir anlayış, hastalık sürecini önleyebilecek veya kesebilecek bağlayıcı moleküller (şelatörler), vekil substratlar veya antikorlar gibi inhibitörlerin geliştirilmesine yol açabilir. Bu geniş metaloproteaz ailesi üzerinde yapılacak daha fazla çalışma, enzimlerin patogeneze ve yapı-fonksiyon ilişkisinde önemli ek bilgiler sağlayacak ve endüstriyel ve/veya terapötik açıdan yararlı olabilecek "tasarım proteinleri" de dahil olmak üzere farklı ürünlerin geliştirilmesine yol açacaktır (Hase ve Finkelstein, 1993). zpx geni tarafından kodlanan çinko içeren metaloproteazlar, bir seri patojen bakteri tarafından üretilir. İntravenöz (IV) kollajen gibi ekstraselüler matriks protein bileşenlerinin spesifik degradasyonu, kılcal damarların endotel hücre membranlarının tahrip edilmesine ve kan bileşenlerinin çevre dokulara sızmasına neden olabilir ve böylece patojenler kan-beyin bariyerini geçebilirler (Mohan ve ark., 2009).

2.3.4 Diğer virulans karakterleri

Cronobacter için yapılan tam-genom çalışmaları, *C. sakazakii*'nin, bir karbon kaynağı olarak ekzojen siyalik asit kullanımını kodlayan nanAKT gen kümesine sahip tek *Cronobacter* türü olduğunu ortaya koymuştur (Joseph ve ark., 2013b). Diğer genom sekanslama çalışmaları, *Sakazakii* BAA-894 genomunda siyalik asit kullanımına katılan iki genomik bölgenin (GR127 ve GR129) varlığını göstermiştir (Grim ve ark., 2013). Bunun yanı sıra Grim ve ark. (2013), *C. sakazakii*'nin 57 suşundan 55'inin siyalik asitten veya onun türevi N-

asetilnöraminik asitten yararlanabildiğini, öte yandan diğer hiçbir *Cronobacter* suşunun bunu yapamadığını saptamıştır. Siyalik asit, anne sütünde, bebek formülünde, bağırsak yolunun müsin hattında bulunur ve beyin gangliosid kompleksinin bir bileşenidir (Siqueira Santos ve ark., 2013). Dolayısıyla, *C. sakazakii*'nin siyalik asitten faydalanma özelliğinin, yenidoğanlar ve genç bebekler için patojenitesini artıracakı olasıdır. *Cronobacter*, siyalik asidi kullanarak immün sistemden kaçınmasına yardımcı olan eksopolisakkaridini (kapsül) üretebilir ve bu davranış, muhtemelen, siyalik asit veya onun prekürsörlerini de ihtiva eden farklı süt kaynakları ve ürünleri varlığında daha da ciddileşir. Buna ilave olarak *C. sakazakii* siyalik asidi aynı zamanda, konakçı müsinlerle etkileşimler aracılığıyla bağırsak yolunun kolonize edilmesine de yardımcı olabilir (Joseph ve ark., 2012c). İnositol fermentasyonu, yakın geçmişte, bazı patojenik suşlarda inositol monofosfataz geninin (suhB) varlığına dayalı olarak *Cronobacter* için bir patojenite belirteci olarak öne sürülmüştür. Ancak, GR29 inositol faydalanım operonu, ortamdan izole edilmiş *Cronobacter* suşlarında bulunurken, aynı zamanda patojen suşların genomlarında bulunmamaktadır (Grim ve ark., 2013). Bu nedenle virülanstaki rolü günümüzde belirsizdir.

2.4 Klinik, gıda ve genel ortamlarda *Cronobacter sakazakii* izolasyonu ile ilgili çalışmalar

2.4.1 Klinik ortam

C. sakazakii, beyin-omurilik sıvısı, karaciğer, kemik iliği, kan, deri, yaralar, balgam, solunum yolu, sindirim sistemi, dışkı ve idrar gibi çeşitli klinik materyallerden izole edilmiştir (Farmer ve ark., 1980; Lai , 2001). *C. sakazakii* nedeniyle ikizlerini kaybeden bir annenin servikal, vajinal ve fekal numuneleri test edildiğinde bu organizma yönünden negatif çıkmıştır (Muytjens ve ark., 1983). Her iki ikizin cilt, burun, dış kulak, umbilikus ve anüslerinden alınan örnekler, doğdukları gün itibariyle *C. sakazakii* varlığı açısından negatiftir. *C. sakazakii* enfeksiyonlarından ötürü hayatını kaybeden iki diğer bebek de, doğdukları gün test edildiklerinde bu organizma açısından negatif çıkmıştır (Muytjens ve ark. 1983). Sezaryenle doğan bebeklerde *C. sakazakii* enfeksiyonu vakaları da bildirilmiştir (Urmenyi ve Franklin, 1961; Muytjens ve ark., 1983;

Muytjens ve Kollee, 1990). Araştırmacılar, yukarıdaki bulgulara dayalı olarak, *C. sakazakii* enfeksiyonlarının annenin doğum kanalı yoluyla geçişi olasılığını ekarte etmiştir.

C. sakazakii hastane ve klinik ortamdanda izole edilmiştir (Iversen ve Forsythe, 2003; Gurtler ve ark., 2005). Bir hekimin stetoskopundan (Farmer ve ark., 1980) ve aynı zamanda Hollanda'daki bir hastanede bir pediatri servisindeki bir bulaşık fırçasından ve çay kaşığında izole edilmiştir (Muytjens ve ark. 1983). Farklı dönemlerde (sırasıyla 1981, 1990 ve 1992) Kanada'daki bir hastane kültürü arşivinden izole edilen üç *C. sakazakii* suşu, ribotiplendirme yöntemi kullanılarak karakterize edilmiş ve ilişkili oldukları saptanmıştır (Nazarowec-White ve Farber, 1999). Araştırmacılar, *C. sakazakii*'nin, hastane ortamlarında uzun süreler boyunca persistan kalabildiği sonucuna varmıştır.

2.4.2 Gıda ortamı

2.4.2.1 Farklı kaynaklar

Muytjens ve Kollee (1990) *C. sakazakii*'yi Hollanda'daki kemirgenlerden, yüzey sularından veya topraktan izole edememiştir. Ancak, *C. sakazakii* normal hayvan ve insan bağırsak florasının bir parçası olmadığından, gıdaların *C. sakazakii* ile kontamine olduğu başlıca kaynakların toprak, su ve sebzeler olduğuna inanılmaktadır (Iversen ve Forsythe, 2003). Sıçanların ve sineklerin ayrıca gıdalar için ek kontaminasyon kaynakları olduğu düşünülmektedir (Iversen ve Forsythe, 2003). Kuzina ve ark. (2001) Meksika sirke sineklerinden; Keyser ve ark. (2003) ayrıca, Güney Afrika'da şaraphane atıklarının arıtımında kullanılan yukarı yatay akışlı anaerobik çamur yataklı reaktörden *C. sakazakii* izole etmiştir. Öte yandan Zamxaka ve ark. (2004), Güney Afrika Eastern Cape'de bulunan Gogogo ve Nkonkobe kırsal alanlarındaki evsel su kaynaklarından *C. sakazakii* izole etmiştir.

Kandhai ve ark. (2004a) farklı gıda fabrikalarından ve hanelerden alınan numuneleri test etmişlerdir. Üretimhane ortamını kazıyarak veya süpürerek ya da elektrikli süpürgelerden torba örnekleri alarak fabrika numuneleri toplamış; ev örnekleri sadece elektrikli süpürge torbalarından alınmıştır. *C. sakazakii*, süt tozu fabrikası numunelerinin %21'inden, çikolata fabrikası numunelerinin %25'inden, tahıl fabrikası numunelerinin %44'ünden, patates fabrikası

numunelerinin %27'sinden, makarna fabrikası numunelerinin %23'ünden ve ev numunelerinin %31'inden izole edilmiştir. Baharat fabrikası numunelerinden izole edilmemiştir.

Bir takip çalışmasında Kandhai ve ark. (2004b), üç süt tozu fabrikasından alınmış 152 numuneyi test etmiştir. Numuneler zemin süpürme işlemlerinden, dökülmüş kuru ürünlerden, kazıma işlemlerinden veya elektrikli süpürge torbalarından elde edilmiştir. *C. sakazakii*, test edilen 152 numunenin onsekizinden (%11,8) izole edilmiştir. Shaker ve ark. (2007) ayrıca, bebek maması ve tahıl fabrikalarında üretim alanlarından, zeminlerden, duvarlardan, ekipmanlardan ve dökülen kuru ürünlerden toplanmış 47 çevresel numuneyi analiz etmiştir. Bu numunelerin hiçbirinde herhangi bir *C. sakazakii* kolonisi bulunmamıştır.

2.4.2.2 Genel gıda ürünleri

C. sakazakii, peynir, dana kıyması, sosis eti ve sebzelerden (Leclercq ve ark. 2002); dondurulmuş börek, bezelye çorbası ve hazır çorbadan da izole edilmiştir (Leuschner ve ark. 2003). Soriano ve ark. (2001) çiğ maruldan *C. sakazakii* izole ederken, hazır maruldan izole edilemiştir. Gurtler ve ark. (2005) pirinç nişastasından, pirinç unundan ve yumurtadan *C. sakazakii* izole ederken, Iversen & Forsythe (2004), peynirden, otlardan, baharatlardan ve kurutulmuş gıda maddelerinden (tahıllar, meyveler ve kuruyemişler) *C. sakazakii* izole etmiştir. Shaker ve ark. (2007) tahıl ürünlerinden *C. sakazakii* izole ederken, Nazarowec-White & Farber (1997b) ise kıymadan *C. sakazakii* izole edildiğini bildirmiştir. Mevcut izole etme yöntemlerinin etkinliği kanıtlanmamış olduğundan, *C. sakazakii*'nin, bildirilenlerden daha geniş bir yelpazede meydana gelebileceği akla yatkındır (Iversen & Forsythe, 2003). Yukarıda görüldüğü gibi, *C. sakazakii* her yerde bulunan bir organizmadır.

2.4.2.3 Toz bebek formülleri

C. sakazakii'nin doğal rezervi ve epidemiyolojisi bilinmemekle birlikte, toz bebek mamaları (PIF) epidemiyolojik olarak *C. sakazakii* enfeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (Iversen ve Forsythe, 2003). *C. sakazakii*, bir salgın sırasında hastane mutfaklarında hazırlanan PIF'den birkaç kez izole edildi ancak tozun kendisinden kültürlenmemiştir (Muytjens ve ark. 1983). Muytjens ve ark.

(1988) bunun, *C. sakazakii*'nin toz içinde eşit olarak dağılmamasından ya da çok düşük konsantrasyonlarda bulunmasından kaynaklandığından ve geleneksel yöntemlerle saptanamayacağından şüphelendi. *C. sakazakii*, 1958 yılındaki erken evreli menenjit vakasından bu yana yıllardır süttozu ürünlerinde bulunmuştur (Urmenyi ve Franklin, 1961). *C. sakazakii*, çok çeşitli gıda ürünlerinden izole edilmiştir ancak PIF, epidemiyolojik veya mikrobiyolojik anlamda *C. sakazakii* enfeksiyonlarının kaynağı olarak düşünülmüş tek kaynaktır (FAO/WHO, 2006a). *C. sakazakii*'nin PIF ile ilişkisi ilk olarak Muijtens ve ark. (1983) tarafından bildirilmiştir.

Muijtens ve ark. (1988) *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinin varlığı yönünden 141 PIF örneğini (35 ülkeden alınmış) analiz etti. Bu organizmalar, 0,36 ile 66 cfu/100g arasında değişen konsantrasyon düzeylerinde 35 ülkenin 28'inde temin edilmiş numunelerin %52,5'inden izole edildi. Diğer yandan *C. sakazakii*, 13 ülkeden temin edilmiş PIF numunelerinden izole edilmiştir. *C. sakazakii*, *Enterobacter cloacae*'dan (%21,3) ve *Enterobacter agglomeranlar*'dan (%24,8) sonra %14,2 ile en sık izole edilen üçüncü organizma oldu. Leuschner ve ark. (2004), 11 ülkeden temin edilmiş 58 PIF numunesini *Enterobacteriaceae* üyeleri yönünden analiz etmiştir. Bu ailenin üyeleri yirmi bir numuneden (%36) izole edilmiş ve bu değer, Muijtens ve ark. tarafından (1988) bildirilen insidansa göre daha düşüktür. Araştırmacılar *C. sakazakii*'yi sadece sekiz numuneden (%13,8) kültürlenmiştir.

Nazarowec-White ve Farber (1997c), Kanada'daki beş farklı şirketten alınan 120 kutu PIF analiz etti. Ortalama 0,36 cfu/g'lık konsantrasyon seviyelerinde sekiz kutudan (%6,7) *C. sakazakii* izole edilmiştir. Bu seviyeler, Muijtens ve ark. (1988) tarafından bildirilen seviyelere benzerdi. Iversen ve Forsythe (2004), 82 PIF numunesinin 2'sinden (%2,4), 49 kurutulmuş gıda numunesinin 5'inden (%10,2) ve 72 süt tozu numunesinin 3'ünden (%4,1) *C. sakazakii* izole etmiştir. Shaker ve ark. (2007) inceledikleri sekiz PIF'nin ikisinden ve 15 bebek maması numunesinin ikisinden *C. sakazakii* izole etmiştir. Witthuhn ve ark. (2006) Güney Afrika pazarından topladıkları 22 ürünün dördünden *C. sakazakii* izole etti; bu ürünler kapsamında PIF, çocuklar için UHT içme sütü, bebek tahılı, keçi sütü ve soya sütü yer almıştır. Her ne kadar *E.sakazakii*, gelişmekte olan

ülkelerde PIF ve bebek maması ürünlerinden izole edilmiş olsa da, bu ülkelerden bildirilen bir enfeksiyon vakası halen yoktur.

İnsan sütünün alternatifi olarak ilk tam bebek formülünün geliştirilmesi üzerinden neredeyse 100 yıl geçmiştir (Lenati ve ark. 2007). PIF, ya kuru işlem ya da ıslak işlem kullanılarak üretilir (Nazarowec-White ve Farber, 1997a). Kuru prosedürde, tek tek kurutulmuş bileşenler kuru harmanlanarak nihai ürün haline getirilir (Nazarowec-White ve Farber, 1997a). Kuru prosedürde kullanılan münferit bileşenler, mamül toz bebek formülüyle aynı mikrobiyolojik kalite şartlarını sağlamalıdır (FAO/WHO, 2004). Islak işlemde ise aşağıdaki ısı uygulamaları kullanılır (Nazarowec-White ve Farber, 1997c):

- Sıvı yağsız süt, işlenmeden önce 20 saniye boyunca 82°C'de ısıtılma tabii tutulur.
- Yağsız süt ve yağ bileşenlerinden meydana gelen ön karışım, 20 saniye süreyle 80°C'de ısıtılma tabii tutulur.
- Tüm bileşenleri ihtiva eden toplam karışım, 60 saniye boyunca 107-110°C'de ısıtılma tabii tutulur.
- Sıvı karışım, düşen film evaporatörler kullanılarak konsantre edilir.
- Konsantrat yeniden 80°C'de ısıtılma tabii tutulur ve hemen spreyle kurutulur.

Islak işlem genellikle bebek formülü baz tozu üretmek için kullanılır (FAO/WHO, 2004). Bu nedenle vitaminler, mineraller ve ek karbonhidratlar gibi kuru, minör ısıya dayanıksız bileşenler baz toz halinde harmanlanarak nihai ürün imal edilir ve bu işlem kombine proses olarak adlandırılır (FAO/WHO, 2004).

Mevcut hijyen standartlarını karşılamak için imal edilmiş olsa bile PIF steril bir ürün değildir (FAO/WHO, 2006b). Dünya Sağlık Örgütü toplantı raporunda (FAO/WHO, 2006a), paketlenmiş PIF'de *Enterobacteriaceae* varlığının, prosesden sonra sağ kalan organizmalardan kaynaklanmadığı, bundan ziyade PIF'nin yine kontamine olması sonucu gerçekleştiği bildirilmiştir. Yeniden kontaminasyon; kurutma, taşıma, boşaltma, ilave bileşenlerle dolun veya paketlenme gibi ısıtma sonrası proseslerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, yeniden kontaminasyonun işleme ortamındaki mikroorganizmaların varlığı ve ürünle

temas halinde olan ekipmanlarla ilişkili olduğu ileri sürüldü. Ancak Arku ve ark. (2008) yakın geçmişte, *C. sakazakii*'nin spreyli kurutmadan sonra sağ kalabildiğini ortaya koymuştur. Sonrasında, *C. sakazakii*'yi spreyli kurutma öncesi tamamen elimine etmek için kontrol noktalarının oluşturulması gerektiği sonucuna varılmıştır.

FAO/WHO (2004) uzman toplantısında *C. sakazakii* için bir ön risk değerlendirmesi yapılmıştır ve bu değerlendirmede, hazırlık aşamasında ölümcül patojen işlemlerinin dahil edilmesinin (yani, PIF'nin 70°C'den düşük olmayan su ile rekonstitüe edilmesi) ve bekletme ve besleme sürelerinin azaltılmasının enfeksiyon riskini etkili bir şekilde azaltacağı öngörülmüştür. PIF yeniden hidrate edildiğinde, bakteri büyümesindeki ve enfeksiyon riskindeki artış önünde kalan tek engelin süre ve sıcaklık olduğu saptanmıştır. WHO, FAO ile işbirliğiyle, FAO/WHO uzman toplantısında (2004) önerildiği gibi PIF'in güvenli hazırlanması, depolanması ve taşınması hakkında tavsiyeler hazırlamıştır (FAO/WHO, 2006b).

2.5 *Cronobacter sakazakii*'nin saptama ve tanımlama yöntemleri

2.5.1 Geleneksel bakteriyolojik kültür

Cronobacter türleri için geliştirilen ilk saptama yöntemi Muyltjens ve ark. (1988) tarafından tarif edilmiştir. Bu protokole dayalı olarak, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA) 2002 yılında toz haldeki bebek mamalarından *C. sakazakii*'yi izole etmek ve sıralamak için bir yöntem önermiştir. 2006'da Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO 2009) ve Uluslararası Süt Ürünleri Federasyonu, süt esaslı toz formülden *Cronobacter* türlerinin saptanması için ISO/TS 22964 olarak bilinen bir teknik standart protokolü hazırlamıştır (Anonim 2006a,b). Daha yakın bir geçmişte, US-FDA yöntemi, saptama tekniği için, hem bir PZR analizi hem de yeni geliştirilen iki kromojenik agarı birleştirecek şekilde revize edilmiştir (Chen ve ark. 2009; Chen 2011). Bu üç protokolda, test edilecek olan PIF numunelerinin ön zenginleştirilmesi bir zorunluluktur ve süre, maksimum gece periyodundan (18 ila 24 saat arası) minimum 6 saatlik bir süre arasında değişir, bunu seçici zenginleştirme ve seçici agarlar/vasatlar kullanılarak izole etme işlemi izler. Tipik koloniler, seçici bir agar ve/veya uygun bir gerçek zamanlı PZR testi kullanılarak teyit edilir ve ya biyokimyasal ya da moleküler

karakterizasyona dayalı olarak nihai tanımlama yapılır. Revize edilmiş US-FDA protokolünde bir zenginleştirme aşaması mevcuttur, bunu daha sonra hızlı teyit için kullanılan bir moleküler yöntem izler. Bu yaklaşımda, orijinal protokole kıyasla saptama prosedüründen iki gün ortadan kaldırılır. Muytjens ve ark. (1984) tarafından tanımlanan α -glikozidaz enzim belirtecine (Iversen ve ark., 2004b) ve tüm *Cronobacter* suşlarında mevcut olan β -selobiosidaz etkinliğine (Restaino ve ark., 2006) dayalı olarak Leuschner-Bew agarı (Leuscher ve Bew 2004), Druggan-Fosythe-Iversen agarı (Iversen ve ark., 2004b), Oh-Kang agar (Oh ve Kang 2004), ESPM agarı (Restaino ve ark., 2006) ve HiCrome *Cronobacter spp.* agarı (Sigma-Aldrich, İsviçre) dahil olmak üzere *Cronobacter* için seçici besiyeri geliştirilmiştir. Ayrıca, *Cronobacter*'in gıdalardan izole edilmesi için (Druggan ve Iversen 2009; Forsythe 2009), gram-negatif bakterilere yönelik seçici olan mor kırmızı safra agarı (VRBA), MacConkey agarı ve desoksikolat agarı elverişlidir. Ancak, seçici agarların elverişliliğine rağmen, bazılarının, tüm *Cronobacter* suşlarının (Iversen ve Forsythe 2007) ve genellikle aynı ekolojik nişler içerisinde bulunan *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* ve *Enterobacter turicensis* gibi diğer ilgili türlerin büyümesini yetersiz derecede desteklediği ispatlanmıştır. Bu nedenle, *Cronobacter*'in izole edilmesi ve tanımlanması için seçici besiyerlerinin tasarlanmasında gelişmelere ihtiyaç duyulmuştur. O'Brien ve ark. (2009) bir kromojenik besiyerinin kullanıldığı tek adımlı bir ön zenginleştirme ve zenginleştirme protokolünün tasarlanmasını önermiştir. Bu saptama stratejisinde, geliştirilen spesifik besiyer [*Cronobacter* zenginleştirme besiyeri (CZB) olarak ifade edilir], PIF'de *Cronobacter* türünün saptanması için iki günlük kısa bir kültür yönteminin hazırlanmasına katkıda bulunmuştur. Mullane ve ark. (2006), PIF'den *Cronobacter* saptama hassasiyetini arttırmak için bir katyonik manyetik boncuk yakalama tekniği kullanmıştır. Piyasada bulunan *Cronobacter* tanımlama kitlerinin doğruluğu ve güvenilirliği, yanlış-negatif ve yanlış-pozitif tanımlama raporlarıyla sorgulanmıştır (Restaino ve ark. 2006; Iversen ve Forsythe, 2007). Ancak, Gen III, kapsamında orijinal altı türün yer aldığı piyasada halihazırda bulunan tek tanımlama kitidir (Healy 2010).

2.5.2 Moleküler tabanlı algılama protokolleri

Moleküler saptama teknikleri her zaman, bir organizmanın epidemiyolojisini daha iyi anlamamız için faydalı araçlar olarak görülmüştür. Genellikle, bu analizler, hedef patojende bulunan benzersiz genleri hedef alacak şekilde tasarlanmıştır. Geliştirilmiş olan daha yakın geçmişli analiz formatlarının birçoğu, gerçek zamanlı PZR'ye dayalıdır ve bazıları, *Cronobacter*'in spesifik saptanmasına yönelik tasarlanmıştır (Malorny ve Wagner, 2005; Seo ve Brackett, 2005; Drudy ve ark. 2006; Nair ve Venkitanarayanan, 2006; Kothary ve ark. 2007; Zhou ve ark. 2008). Kullanılan hedefler 16S rRNA genini, 16S - 23S rDNA intergenik bölgesini, dnaG genini, ompA genini, 1,6 α -glukozidaz kodlayıcı geni (gluA) ve bir çinko ihtiva eden metalloproteazı (zpx) içermektedir. Daha yakın geçmişte, Stoop ve ark. tarafından geliştirilmiş olan PZR'ye dayalı bir yöntem, tarif edilen yeni türleri kapsayacak şekilde A. Lehner, C. Fricker-Feer ve R. Stephan (veriler yayınlanmamıştır) tarafından genişletilmiştir. Bu protokol, bir mismatch-PZR'ye dayalı yaklaşım kullanılarak *Cronobacter* cinsi içerisinde bilinen yedi türün tümünün saptanmasını kolaylaştırmıştır. Bu moleküler tabanlı protokollerin uygulamaları, geleneksel kültüre dayalı yaklaşımları destekleyebilir. Şaşırtıcı şekilde, bahsedilen son protokol kullanılarak, *C. malonaticus* ve *C. sakazakii* bu yaklaşımla ayırt edilememiş ve bu nedenle, bu türlerin her birini doğru bir şekilde tanımlamak için ikinci bir PZR gereği oluşmuştur. 2011'de Yan ve ark. (2011), *Cronobacter spp*'nin saptanması ve tanımlanması için bir PCR'ye ve diziye dayalı biyolojik belirteç doğrulama çalışması yayınlamıştır. Araştırmacılar, *Cronobacter spp*'yi ve *Salmonella spp*'yi diğer gıda kökenli patojenlerden ayırt etmek için biyolojik belirteç olarak yararlı olabilecek virülans belirteçlerine ışık tutmayı amaçlamaktadır. Bu putatif belirteçler tanımlanmış olsa da, halihazırda daha ileri doğrulama deneyleri yapılmaktadır. Moleküler alt tipleme, belirli bir ekolojik nişi kolonize eden bu bakterilerin doğasını aydınlatmak için uygulanabilen bir yaklaşım olarak kabul görmüştür. Mullane ve ark. (2007b) bir PIF işleme tesisindeki *Cronobacter* türlerini karakterize etmek ve izlemek için değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE) uyguladı. Çalışma, PIF üretim ortamında *Cronobacter*'in azaltılmasına katkıda bulunan etkili müdahale uygulamalarının geliştirilmesi için bir temel oluşturmuştur. Daha sonra, geno-

ve fenotipik farklı *Cronobacter* izolatları arşivinin bir alt tiplemesini gerçekleştirmek üzere, ikinci nesil alt tipleme yöntemi olan çok odaklı değişken sayılı tandem-tekrar analizi (MLVA) kullanılarak geliştirilen bir yaklaşım uygulanmıştır. Ancak, standardize edilmiş bir PFGE protokolü son şeklini almaya çok yakındır ve gıda kaynaklı enfeksiyonları izlemeye yönelik ulusal ve bölgesel laboratuvar ağları PulseNet tarafından valide edilmiştir.

Çizelge 2.7: Toz bebek mamalarında *Cronobacter* saptama yöntemleri (Yan ve ark, 2011)

Prosedür	FDA (Orjinal)	ISO/TS 22964	FDA (Revize)
Ön zenginleştirme	1:10 oranında hazırlanan örnek ve distile su karışımı 36 ⁰ C de 24 saat inkübasyona bırakılır.	Tamponlanmış peptonlu su içinde 1:10 oranında örnek hazırlanır ve 37 ⁰ C de 18 ± 2 saat inkübasyona bırakılır.	Tamponlanmış peptonlu su içinde 1:10 oranında örnek hazırlanır ve 36 ⁰ C de 6 saat inkübasyona bırakılır
Selektif zenginleştirme	10 ml ön zenginleştirilmiş karışım 90 ml EE broth içine aktarılır ve 36 ⁰ C 24 saat inkübasyona bırakılır.	100 µL ön zenginleştirilmiş karışım 10 ml mLST/vancomycin medium içerisine aktarılır ve 44 ⁰ C de 24 ± 2 saat inkübasyona bırakılır.	
Seleksiyon/ İzolasyon	Her bir EE broth dan alınan örnekten VRBG agara ekim gerçekleştirilir ve 36 ⁰ C de 24 saat inkübasyona bırakılır.	mLST/ vancomycin medium dan alınan bir öze örnek kromojenik ağara ekilir. Petri kutuları 44 ⁰ C de 24 ± 2 saat inkübasyona bırakılır.	40 ml örnek santrifüj edilerek 200 µL PBS içerisinde tekrar süspanse edilir; 100 µL öze ile alınarak kromojenik agara ekilir ve 36 ⁰ C de 24 saat inkübasyona bırakılır.

Çizelge 2.7: (devam) Toz bebek mamalarında *Cronobacter* saptama yöntemleri (Yan ve ark, 2011)

Konfirmasyon	5 adet şüpheli pozitif koloni alınarak TSA a ekim gerçekleştirilir ve 25⁰C de 24 saat inkübasyona bırakılır.	5 adet şüpheli pozitif koloni alınarak TSA a ekim gerçekleştirilir ve 25⁰C de 48 ± 4 saat inkübasyona bırakılır.	Her bir kromojenik agardan 2'şer şüpheli koloni seçilerek real-time PCR, API 20E, ID32 E ile konfirmasyonu sağlanır.
İdentifikasyon	Sarı koloniler API 20E hızlı test kiti ile konfirme edilir.	Her bir TSA kutusundan seçilen 1 sarı koloninin biyokimyasal karakterizasyonu sağlanır.	
Saptama süresi(gün)	5	6	3

Genom sekanslama ile ilişkili olarak hem zaman hem de maliyet anlamında elde edilen kaydadeğer azalma, moleküler saptama yöntemlerini giderek erişilebilir hale getirmiştir.

Kuhnert ve ark. (2009) tarafından *Cronobacter* genlerinin genomik benzerliğinin tarif edilmesinde recN, rpoA ve thdF genlerine dayalı çok odaklı sekans analizi (MLSA) kullanılmıştır (2009).

El-Sharoud ve ark. (2009), süttozu ve ilgili ürünlerden kazanılmış *Cronobacter* suşlarının izole edilmesi için recN gen sekansı analizini uygulamıştır. Baldwin ve ark. (2009) tarafından, şu yedi referans gen kullanılarak benzer bir MLST tiplleme programı geliştirilmiş olup hâlihazırda, Oxford Üniversitesi'nde, tüm *Cronobacter* spp'yi kapsayan tanımlı sekans tiplerini ihtiva eden bir veritabanı tutulmaktadır: *atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB*, *infB*, *ppsA* (3036 nt bitişirilmiş uzunluk). Veritabanı ve MLST analitiklerine www.pubMLST.org/cronobacter adresinden ulaşılabilir. Ancak, program, devam eden herhangi bir epidemiyolojik araştırmada kullanılmak üzere uygulanmamıştır.

3 GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Örnek hazırlama

Tez çalışması kapsamında 2015-2016 yılında İstanbul il sınırları içinde hepsinden 20 adet olmak üzere paketsiz süttozu, paketlenmiş nişasta, paketlenmiş pirinç unu, paketlenmiş irmik, paketlenmiş bebek maması ve çevre tozları olmak üzere toplam 120 adet örnek toplanmıştır. Alınan numune materyaller 4⁰C’de özel numune taşıma kutusu (Avitherm, Türkiye) içinde gıda mikrobiyolojisi laboratuvarına getirilmiş biyokimyasal analize alınmıştır. İncelenen örneklerin dağılımı Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1: Örnek dağılımı

No	Gıda cinsi	Örnek sayısı (n)
1	Süttozu (paketsiz)	20
2	Nişasta	20
3	Pirinç unu	20
4	İrmik	20
5	Bebek maması	20
6	Çevresel	20
	Toplam	120

3.2 Yöntem

Elde edilen izolatların identifikasyonu API 20 E (BioMérieux, Fransa) hızlı test kiti kullanılarak Agrolab Gıda Laboratuvarı’nda yapılmıştır. Okumalar <https://apiweb.biomerieux.com/jsp/ident/index.jsp> adresli web sitesinde yer alan yazılıma göre değerlendirilmiştir (BioMérieux, 2008; Anonymous 2002; Iversen ve ark, 2004)).

Araştırmadaki moleküler tanımlama testi Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu İstanbul Aydın Üniversitesi Gıda Mühendisliği Teknoloji, Araştırma/Uygulama Laboratuvarı’nda yürütülmüştür.

3.2.1 Biyokimyasal inceleme

3.2.1.1 İzolatların API 20E hızlı test kiti ile identifikasyonu

Elde edilen izolatların identifikasyonu API 20E (BioMérieux, Fransa) hızlı test kiti kullanılarak incelenmiştir. Buna göre, TSA besiyeri üzerine yapılan ekimi takiben 37°C sıcaklıkta 20 saatlik inkübasyon ile aktiveleştirilen kültürler öze yardımı ile alınarak ve %0,85'lik fizyolojik tuzlu su içinde homojenize edilerek test gözeneklerine aşılanmıştır. API 20E (BioMérieux, Fransa) hızlı test kiti ile tanımlama için test kartları tekrar 37°C sıcaklıkta 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar <https://apiweb.biomerieux.com/jsp/ident/index.jsp> sitesinde yer alan yazılıma göre değerlendirilmiştir (BioMérieux, 2008).

APIweb™ - Identification result - Internet Explorer

http://localhost:8080/identify

API 20 E V4.1 Printout Export New test Modify

REFERENCE: DATE: 4/21/16

COMMENT:

EXCELLENCE IDENTIFICATION TO THE GENUS

Strip	API 20 E V4.1
Profile	3 3 0 5 1 7 3
Note	POSSIBILITY OF Enterobacter cloacae

Significant taxa	% ID	T	Tests against
Enterobacter sakazakii	51.1	0.92	IND 75%
Enterobacter amnigenus 1	31.7	0.89	ADH 25%
Enterobacter cloacae	17.0	0.85	SOR 90%

Next taxon	% ID	T	Tests against
Enterobacter amnigenus 2	0.1	0.39	SOR 99% SAC 1%

Complementary test(s)	YELLOW	ESC (HYD.)
Enterobacter amnigenus	0%	96%
Enterobacter cloacae	0%	30%
Enterobacter sakazakii	98%	100%

Hazır Ortalama: 55383,89054 Sayı: 356 Toplamı: 13845974,63 %100

15:26 21.04.2016

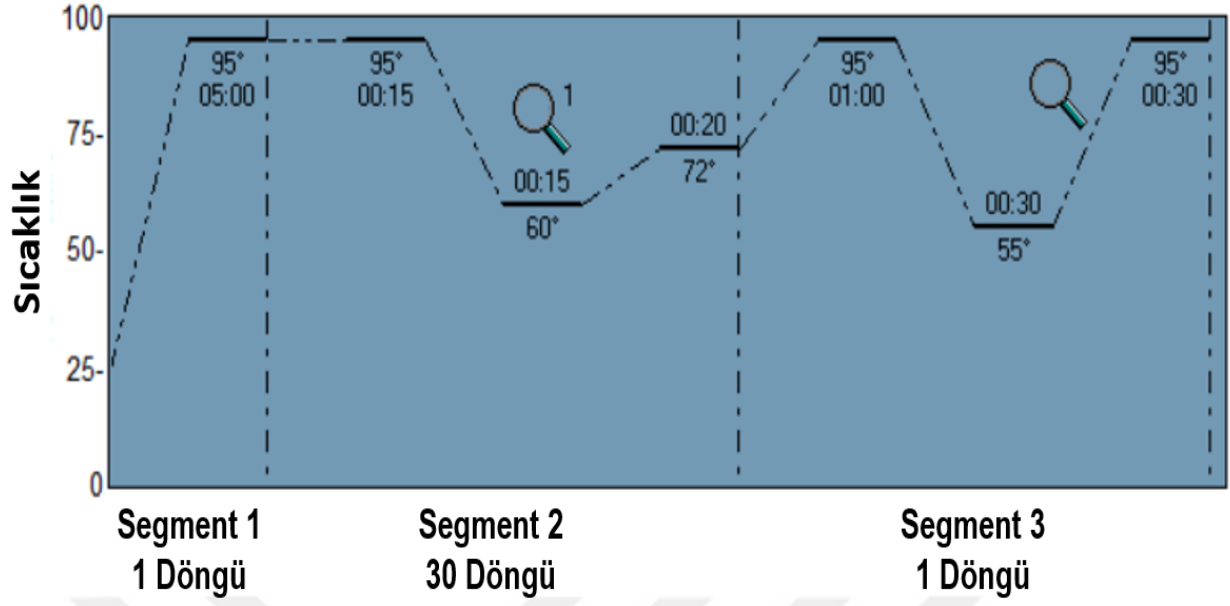
Şekil 3.1: API 20E (BioMérieux, Fransa) biyokimyasal doğrulama test örneği

3.2.2 Moleküler inceleme

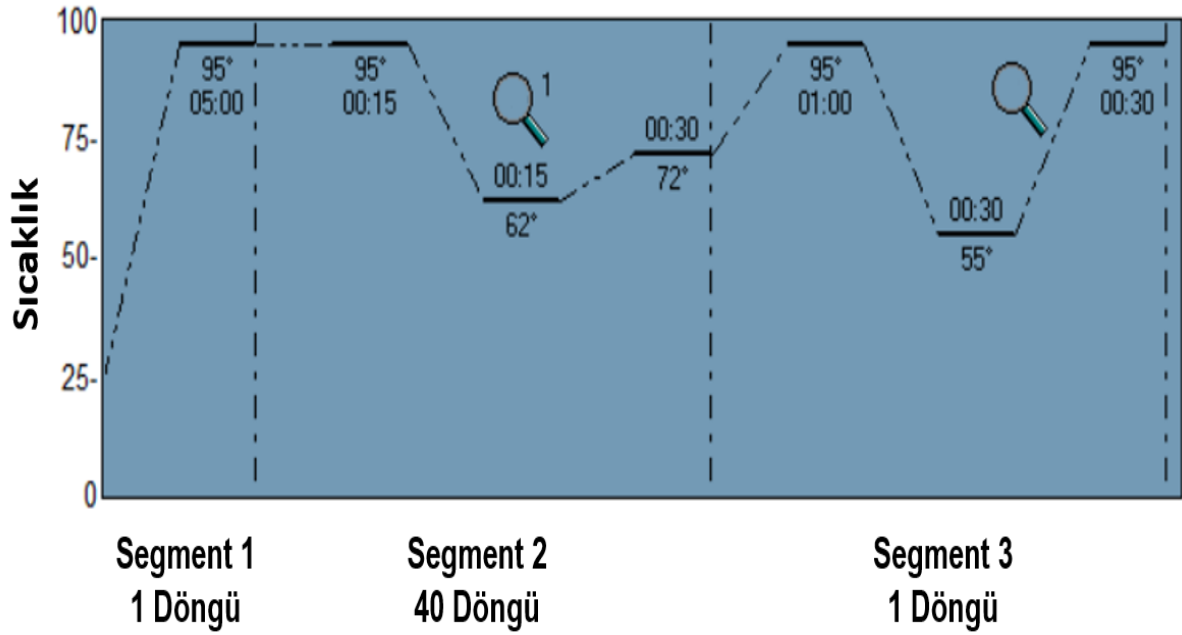
3.2.2.1 Real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

API 20E (BioMérieux, 2008) sonuçlarının Real-Time PZR ile doğrulanması için, analiz edilen örneklerin LB Besiyerinde inkübasyonu ile elde edilen süşlardan FastLyse Miniprep Kit (MDI Membran Tech.) ile plasmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen pDNA'lar nano-volume spektrofotometrede okutularak polimeraz zincir reaksiyonuna kadar -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

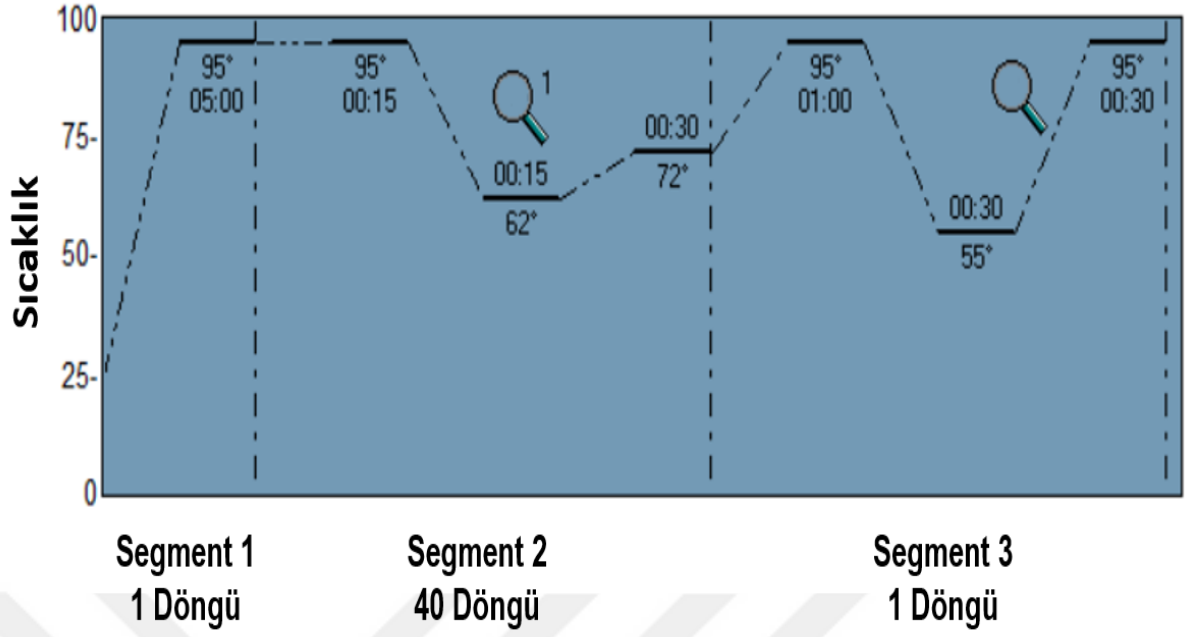
Real-Time PZR çalışması için *Cronobacter* (*Cronobacter sakazakii*) türüne ait sırasıyla *OmpA*, *OmpX*, *zpx*, *Cpa* genlerine spesifik olan ESOMP5-F: 5'-GGT GAA GGA TTT AAC CGT GAA CTT-3' ve ESOMP5-R: 5'-GCG CCT CGT TAT CAT CCA AA-3'; OMPX-F: 5'-GTC TTT CAG CAC TGG CTT GTG T-3' ve OMPX-R: 5'-GGT GCC AGC AAC AGC AGA A-3'; Es_Pro-F: 5'-GAA AGC GTA TAA GCG CGA TTC-3' ve Es_Pro-R: 5'-GTT CCA GAA GGC GTT CTG GT-3'; CPA-F: 5'-GCC TGG CGG AAT TCA ATG G-3' ve CPA-R: 5'-GAT CAA AGC TGC AGT CAG AAA CG-3' primer çifti IDT (Integrated DNA Technologies) tarafından sentezlenmiştir. Real-Time PZR çalışması total reaksiyon hacmi 20 µL olan innuMIX qPCR MasterMix SyGreen (Analytik Jena) kullanılarak Strategene Mx3005P (Agilent) cihazında gerçekleştirilmiştir. dNTP, MgCl₂, polimerazı içeren tampon çözeltinin içerisine, haricen final konsantrasyonu 0,3 µM olacak şekilde her bir primerden ve örnek DNA'larından uygulanarak reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. *OmpA* geni için 30 döngülük; *OmpX*, *zpx*, *Cpa* genleri için 40 döngülük PZR reaksiyonu erime-eğrisi analizini de içerecek şekilde ayarlanmıştır (Xian-Quan Cai et al., 2013; Mary Anne Roshni Amalaradjou et al., 2014; Kothary et al., 2007; Franco et al., 2011).



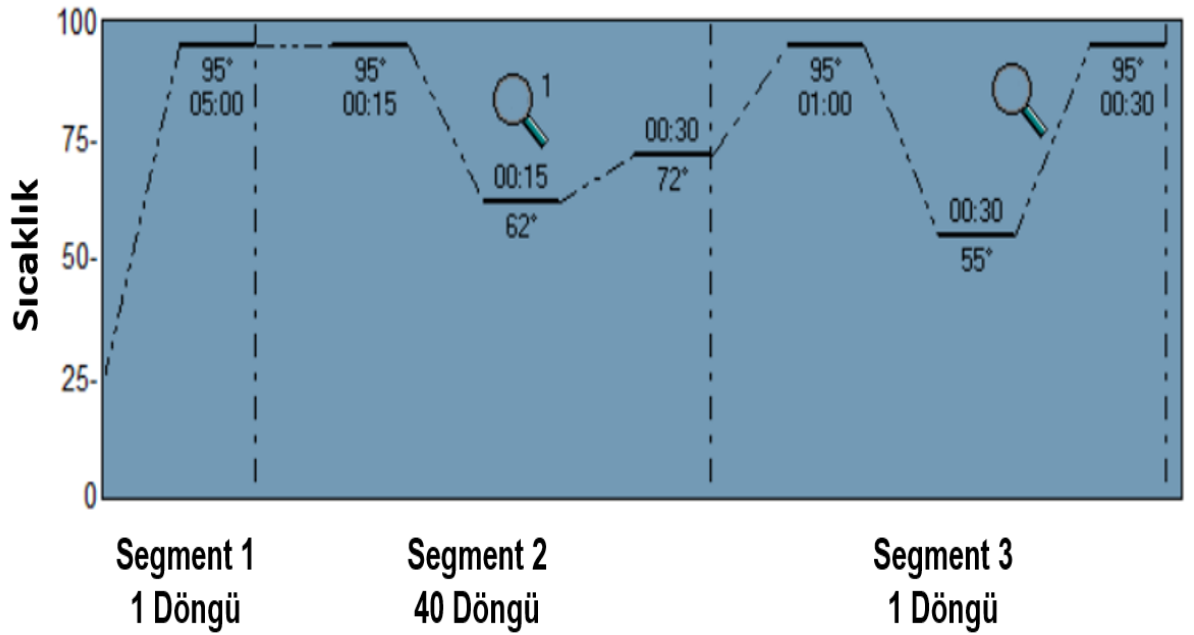
Şekil 3.2: *OmpA* real-time PZR termal profili



Şekil 3.3: *OmpX* real-time PZR termal profili



Şekil 3.4: *zpx* real-time PZR termal profili



Şekil 3.5: *Cpa* real-time PZR termal profili

3.2.3 İstatistiksel İncelemeler

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanılmıştır. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında Fisher Freeman Halton testi kullanılmıştır. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.



4 BULGULAR

4.1 *C. sakazakii* (*Cronobacter spp.*) varlığının araştırılması

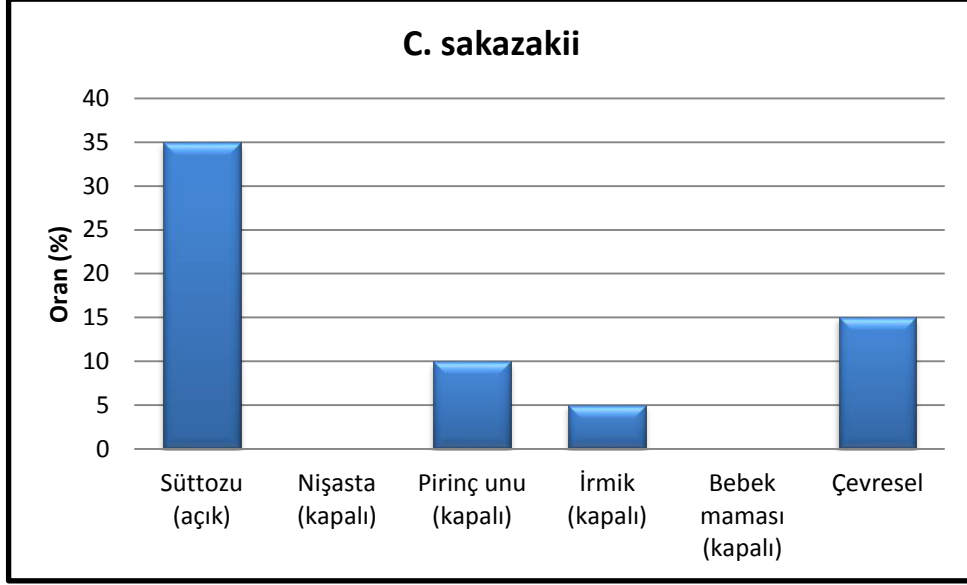
İstanbul ili sınırları içinde temin edilen 120 adet gıda ve çevre tozu örneklerde *C. sakazakii* varlığı araştırılmıştır. İdentifikasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilen *C. sakazakii* varlığı saptanan farklı örnek grupları arasındaki parametreler incelenmiş ve bulgular ışığında parametreler arasındaki verilerin karşılaştırılmasında Fisher Freeman Halton testi ile değerlendirme yapılmıştır. Çalışmada üç yöntem ile *C. sakazakii* açısından incelenip pozitif bulunan örneklerin sayısı Çizelge 4.1’de ve Şekil 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1: Örneklerde *C. sakazakii* görülme oranlarının değerlendirilmesi (n:20)

	<i>C. sakazakii</i>	
	n	%
Süttozu (paketsiz)	7	35
Nişasta (paketli)	0	0
Pirinç unu (paketli)	2	10
İrmik (paketli)	1	5
Bebek maması (paketli)	0	0
Çevresel	3	15
p	0,004*	

Fisher Freeman Halton test

* $p < 0.05$



Şekil 4.1: Örneklerde *C. sakazakii* görülme oranlarının % dağılımı

Paketsiz süt tozunda *C. sakazakii* görülme oranı (%35), paketli nişasta (%0), paketli irmik (%5), paketli pirinç unu (%10) ve paketli bebek mamasında (%0) *C. sakazakii* görülme oranlarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.2 *C. sakazakii* pozitif örneklerde API 20E analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

Çizelge 4.2: *C. sakazakii* açısından incelenen örneklerin API 20E analiz sonuçları

No	Örnek cinsi	<i>C. sakazakii</i> örnek sayısı (n)
1	Süttozu (paketsiz)	7
2	Nişasta	-
3	Pirinç unu	2
4	İrmik	1
5	Bebek maması	-
6	Çevresel	3
Toplam		13

4.3 *C. sakazakii* pozitif örneklerde RT-PZR analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

Çizelge 4.3: *C. sakazakii* açısından incelenen örneklerin RT-PZR analiz sonuçları

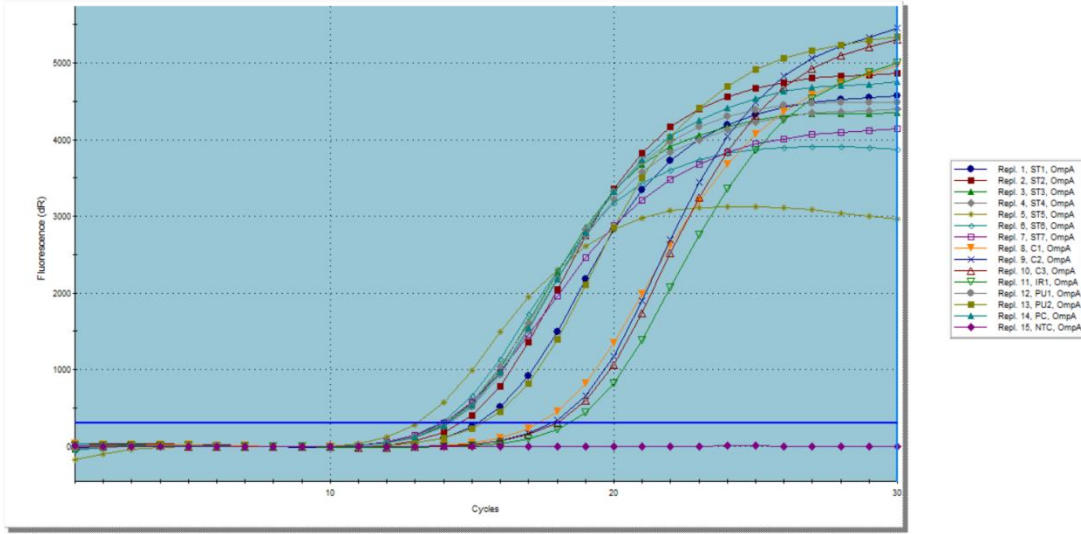
No	Örnek cinsi	<i>C. sakazakii</i> içeren örnek sayısı (n)			
		<i>ompA</i> (n)	<i>ompX</i> (n)	<i>zpx</i> (n)	<i>Cpa</i> (n)
1	Süttozu (paketsiz)	7	7	7	7
2	Nişasta	-	-	-	-
3	Pirinç unu	2	2	2	2
4	İrmik	1	1	1	1
5	Bebek maması	-	-	-	-
6	Çevresel	3	3	3	3
Toplam		13	13	13	13

4.4 RT-PZR sonuçlarına göre pozitif örneklerde virulans genlerin karakterizasyonu

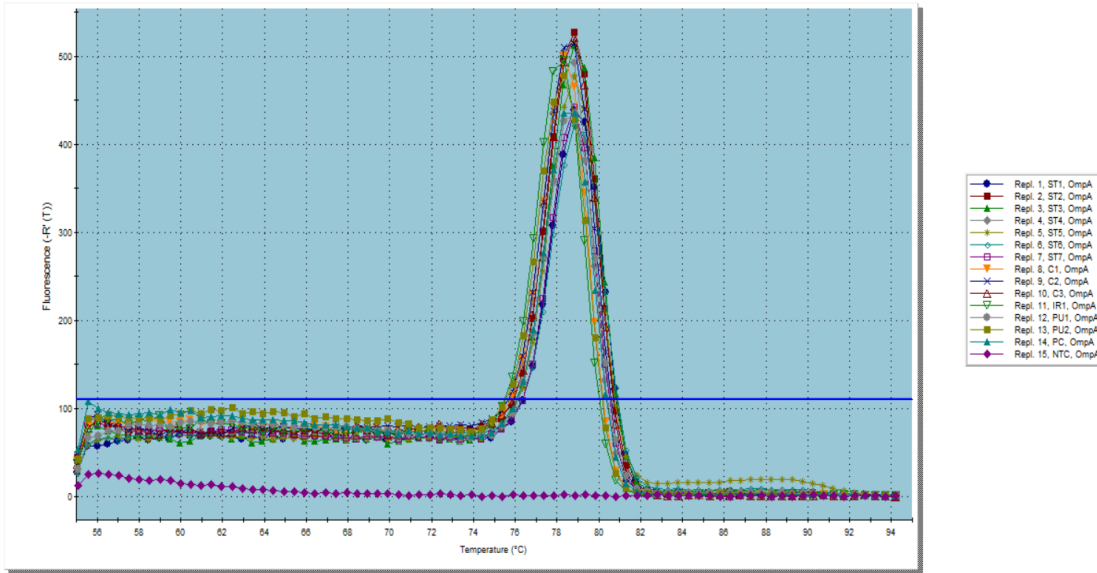
API 20E sonuçlarına göre pozitif olan 7'si (paketsiz) süt tozu, 2'si (paketli) pirinç unu, 1'i (paketli) irmik ve 3'ü çevre tozu toplam 13 örnekle yapılan Real-Time PZR çalışması sonuçları, *OmpA*; *OmpX*; *zpx*; *Cpa* genlerinin amplifikasyon ve erime eğrileri aşağıdaki çizelgelerde sırasıyla belirtilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak *Cronobacter sakazakii* (ATCC® 29544™) referans suşundan elde edilen DNA kullanılmıştır ve tüm örnekler duplike çalışılmıştır.

Analiz sonuçlarına göre negatif kontrolde her hangi bir amplifikasyon görülmemiştir. Ct (cycle threshold), gerçek zamanlı PCR deneylerinde floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısına (eşik döngüsü) verilen addır. Pozitif referans suşu ve diğer pozitif olduğu düşünülen API 20E örneklerinde ise amplifikasyon görülmüş ve Ct elde edilebilmiştir. Ayrıca tüm örneklerde PZR sonucu üretilen amplikonlar, pozitif kontrol ile beraber 78,5 °C bandında tek bir pik vermiştir. Bu da her hangi bir spesifik olmayan amplikon oluşmadığını göstermekle

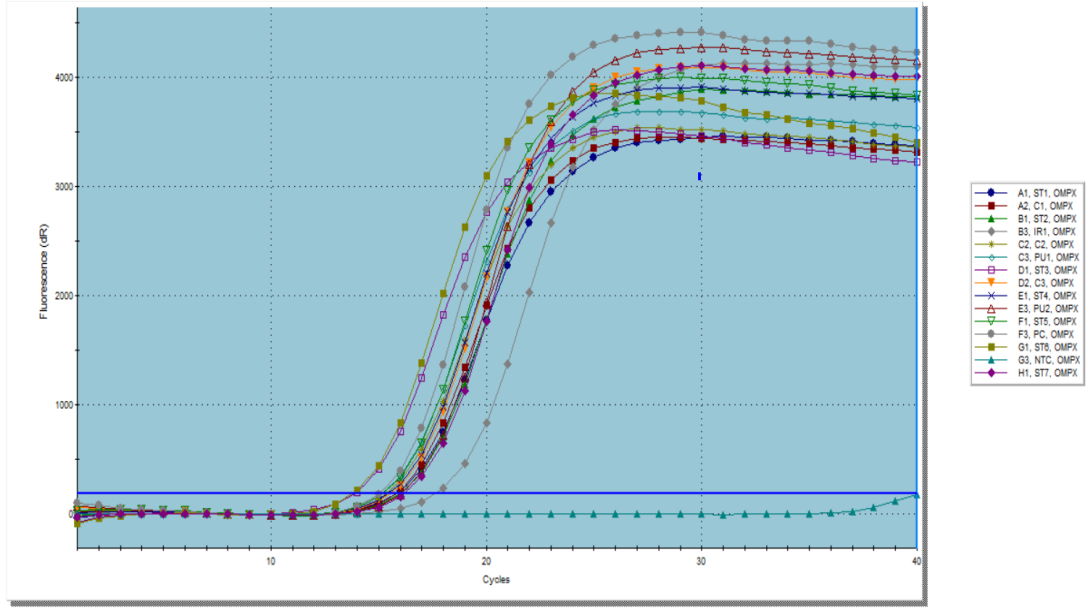
birlikte örneklerde *OmpA*, *OmpX*, *zpx* ve *Cpa* genlerinin bulunduğunu kanıtlamaktadır.



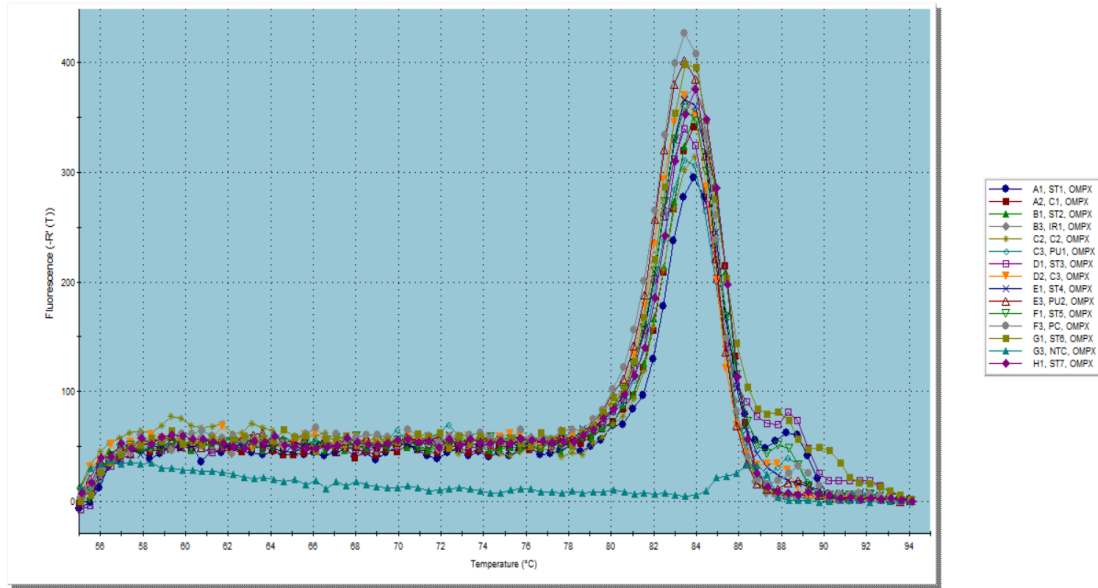
Şekil 4.2: *OmpA* amplifikasyon eğrileri (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Pirinç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol)



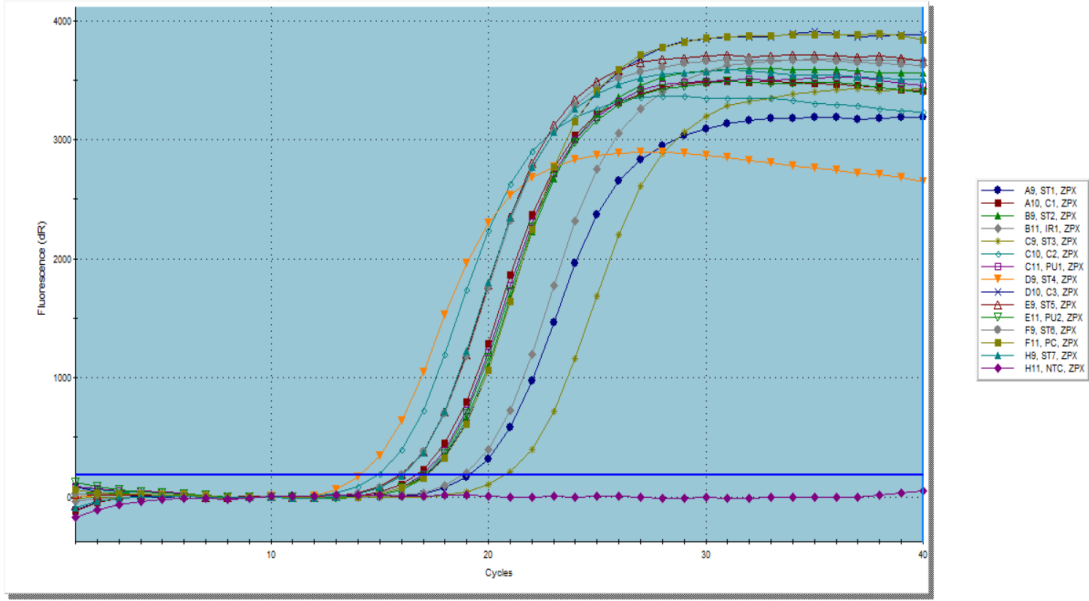
Şekil 4.3: *OmpA* erime eğrisi analizi (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Pirinç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol)



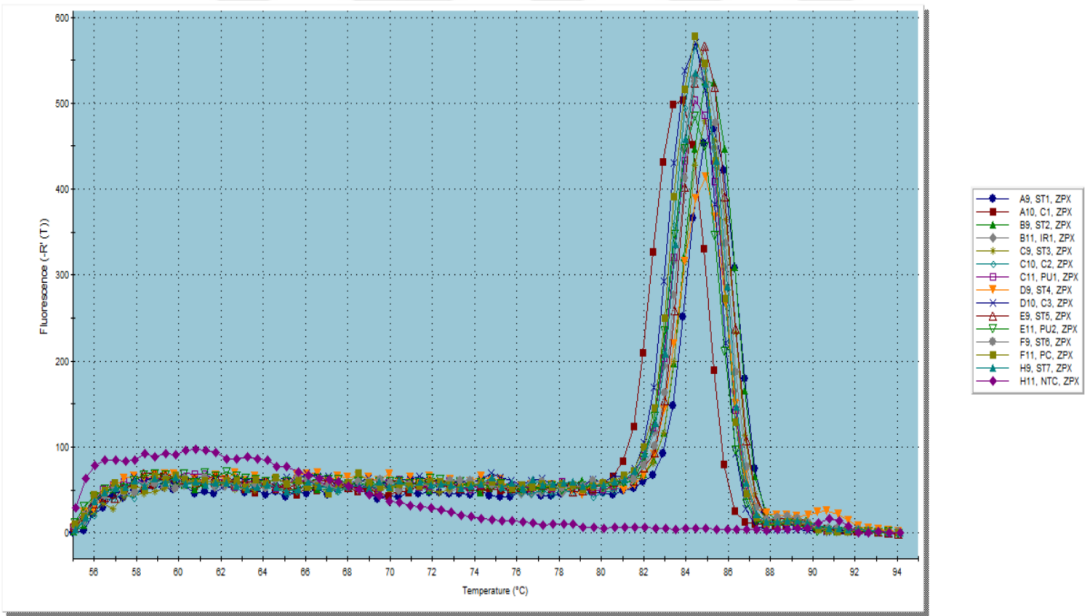
Şekil 4.4: *OmpX* amplifikasyon eğrileri (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Piriç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol)



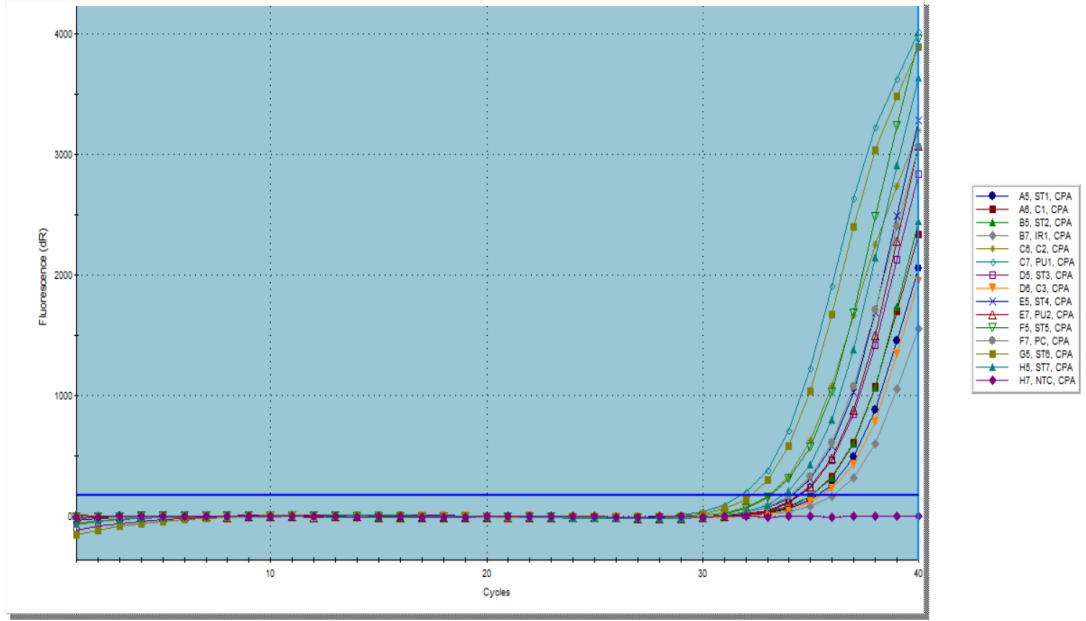
Şekil 4.5: *OmpX* erime eğrisi analizi (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Piriç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol)



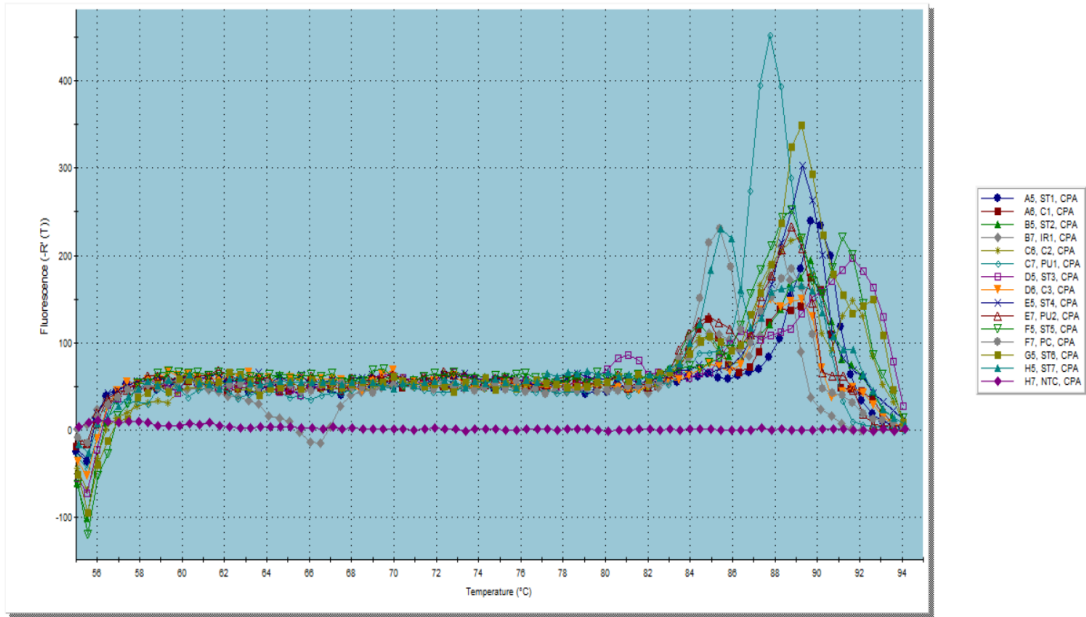
Şekil 4.6: *zpx* amplifikasyon eğrileri (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Pirinç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol)



Şekil 4.7: *zpx* erime eğrisi analizi (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Pirinç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol)



Şekil 4.8: *Cpa* amplifikasyon eğrileri (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Piriç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol)



Şekil 4.9: *Cpa* erime eğrisi analizi (ST: Süt Tozu, C: Çevresel, IR: İrmik, PU: Piriç Unu, PC: Pozitif Kontrol, NTC: Negatif Kontrol)

4.4.1 *C. sakazakii* (*Cronobacter spp.*) pozitif örneklerde Ct değerleri

4.4.1.1 *OmpA* izole edilen örneklerde Ct değerleri

Çizelge 4.4: *OmpA* izole edilen örneklerde Ct değerleri

Örnek No	Örnek Adı	Hedef Gen	Ct	Tm Ürünü
1	ST1	OmpA	15,28	78,82
2	ST2	OmpA	14,69	78,82
3	ST3	OmpA	14,16	78,82
4	ST4	OmpA	14,04	78,31
5	ST5	OmpA	13,14	78,84
6	ST6	OmpA	13,92	78,82
7	ST7	OmpA	14,04	78,82
8	C1	OmpA	17,43	78,34
9	C2	OmpA	17,85	78,84
10	C3	OmpA	18,00	78,84
11	IR1	OmpA	18,50	78,34
12	PU1	OmpA	14,29	78,85
13	PU2	OmpA	15,45	78,35
14	PC	OmpA	14,21	78,35
15	NTC	OmpA	No Ct	N/A

4.4.1.2 *OmpX* izole edilen örneklerde Ct değerleri

Çizelge 4.5: *OmpX* izole edilen örneklerde Ct değerleri

Örnek No	Örnek Adı	Hedef Gen	Ct	Tm Ürünü
1	ST1	OMPX	15,85	83,88
2	ST2	OMPX	16,01	83,9
3	ST3	OMPX	13,89	83,45
4	ST4	OMPX	15,46	83,45
5	ST5	OMPX	15,24	83,45
6	ST6	OMPX	13,82	83,49
7	ST7	OMPX	16,20	83,97
8	C1	OMPX	15,85	83,88
9	C2	OMPX	15,40	83,92
10	C3	OMPX	15,59	83,45
11	IR1	OMPX	17,69	83,9
12	PU1	OMPX	15,21	83,45
13	PU2	OMPX	16,07	83,45
14	PC	OMPX	15,04	83,45
15	NTC	OMPX	No Ct	N/A

4.4.1.3 *zpx* izole edilen örneklerde Ct değerleri

Çizelge 4.6: *zpx* izole edilen örneklerde Ct değerleri

Örnek No	Örnek Adı	Hedef Gen	Ct	Tm Ürünü
1	ST1	ZPX	19,17	85,33
2	ST2	ZPX	17,21	84,88
3	ST3	ZPX	20,82	84,9
4	ST4	ZPX	14,15	84,92
5	ST5	ZPX	15,96	84,9
6	ST6	ZPX	15,99	84,9
7	ST7	ZPX	16,04	84,46
8	C1	ZPX	16,73	83,88
9	C2	ZPX	14,93	84,4
10	C3	ZPX	17,15	84,45
11	IR1	ZPX	18,88	84,38
12	PU1	ZPX	16,97	84,4
13	PU2	ZPX	17,07	84,42
14	PC	ZPX	17,22	84,42
15	NTC	ZPX	No Ct	N/A

4.4.1.4 Cpa izole edilen örneklerde Ct değerleri

Çizelge 4.7: Cpa izole edilen örneklerde Ct değerleri

Örnek No	Örnek Adı	Hedef Gen	Ct	Tm Ürünleri	
1	ST1	CPA	35,42	89,67	N/A
2	ST2	CPA	35,09	89,67	N/A
3	ST3	CPA	34,63	91,67	N/A
4	ST4	CPA	34,24	89,30	N/A
5	ST5	CPA	33,22	88,80	91,19
6	ST6	CPA	32,31	89,28	92,65
7	ST7	CPA	33,77	85,45	89,28
8	C1	CPA	35,14	89,67	N/A
9	C2	CPA	33,11	89,21	91,65
10	C3	CPA	35,64	89,25	87,8
11	IR1	CPA	36,12	88,25	N/A
12	PU1	CPA	31,85	87,78	N/A
13	PU2	CPA	34,58	88,80	N/A
14	PC	CPA	34,13	85,40	88,8
15	NTC	CPA	No Ct	N/A	N/A



5 TARTIŞMA ve SONUÇ

C. sakazakii, özellikle bebeklerde menenjit, sepsis ve nekrotizan enterokolit enfeksiyonları gibi hayati risk oluşturan *H. İnfluezae*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Neisseria meningitidis*'den sonra en önemli patojen mikroorganizmalardan birisidir. Henüz tam olgunlaşmamış bağırsak yapısına sahip olan; prematüre, 28 günden daha küçük yaşta, 2 kg'dan az ağırlığa sahip ve medikal bakım gören bebekler *C. sakazakii* enfeksiyonu riski altındadırlar. Pek çok ülkede *C. sakazakii* enfeksiyonlarının çoğunun toz bebek mamaları ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Salgınlar da çoğunlukla yenidoğan bakım ünitelerinde gerçekleşmektedir. *C. 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 *C. 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. *C. sakazakii*, insan ve hayvan bağırsağının normal florasında bulunmaması nedeniyle, gıdaların primer kontaminasyon kaynaklarının toprak ve su olduğu ifade edilmektedir. Pastörizasyon işlemi ile inaktive olduğu bilinen etkenin, açılmamış mama kutularından izole edilmesi, toz bebek mamalarının pastörizasyon sonrası aşamada vitamin ve mineraller gibi sıcaklığa duyarlı katkıların eklenmesi esnasında kontamine olabileceği görüşünü kuvvetlendirmiştir. Toz bebek mamalarındaki *C. sakazakii* düzeyinin oldukça düşük olduğu (0.36 kob/100g). Son yıllarda yoğunlaşan çalışmalar, bebek mamalarının yanı sıra deve eti, domuz eti, kanatlı eti, et ürünleri, su ürünleri, yumurta, süt, hububat, bisküvi, pastacılık ürünleri, sebze ve salata gibi çeşitli gıdalarda *C. sakazakii* varlığını

göstermiş olmakla birlikte yetersizdir (Holy ve Forsythe, 2014; Beuchat ve ark., 2009; Iversen ve ark., 2003; Drudy ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalarda, moleküler seviyede *C. sakazakii* patojenezinde rol oynayan faktörlerin oldukça az anlaşıldığı görülmektedir. Pagotto ve ark. (2003); *C. sakazakii* enfeksiyonunda varsayılan virülans faktörlerini ve doz-yanıt ilişkisini araştıran ilk kişiler olmuştur.

C. sakazakii'nin gıda tedarikinde her an her yerde görülme özelliğine rağmen, PIF ile yakın bir ilişki vardır. Üretim sürecinde intrinsik kontaminasyon ya da PIF'nin yeniden oluşturulması sırasında kullanılan blender ve kaşık gibi aletlerden kaynaklı ekstrinsik kontaminasyon meydana gelebilir (Simmons ve ark., 1989; van Acker ve ark., 2001; Caubilla-Barron ve ark., 2007). PIF, insan sütüne besleyici özellikte bir analog olarak formüle edilmiştir (Breeuwer ve ark., 2003); öyle ki, Dünya Sağlık Örgütü, bebeklerin ilk 6 ay boyunca yalnızca anne sütüyle beslenmesi ya da uygun bir anne sütü ikamesi sağlanması gerektiğini önermektedir. PIF steril olmadığından *Cronobacter* ile kontamine olabilir ve matris bir kez yeniden yapılandırıldığında enfeksiyona neden olabilen *Cronobacter*'in büyümesini destekler. Bir grup PIF'de *C. sakazakii* bulunması ile hastanede bir salgın arasında net bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Himmelright ve ark., 2002). PIF' de *C. sakazakii* varlığına ilişkin çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Muytjens ve ark. (1988); CFU/100 gram için 0 ila 36 arasında değişen seviyelerde 20 numuneden alınan *C. sakazakii* suşlarını en muhtemel sayı yöntemini kullanarak numaralandırmış; 35 ülkeden 141 farklı anne sütü yerine kullanılan tozları incelemiştir. Kanada' da yürütülen bir araştırmada *C. sakazakii*, beş farklı üreticiden gelen 120 PIF örneğinin sekizinden izole edilmiştir (Nazarowec-White ve Farber 1997c). İngiltere genelindeki perakendecilerden satın alınan 82 PIF tozu üzerine yapılan bir incelemede bunlardan ikisinin *C. sakazakii* için pozitif olduğu tespit edilmiştir (Iversen ve Forsythe 2004). Mullane ve ark. (2007); bebek maması üretim tesisindeki *C. sakazakii* prevalansını izlemek için darbeli alan jel elektroforezi uygulamış ve imalat ortamının PIF' nin sporadik kontaminasyonu için başlıca bir hat görevi gördüğünü tespit etmiştir. Bu çalışmada da İstanbul ili ve çevresinde toplanan açık süt tozları örneklerinde de *C. sakazakii* %35 oranında saptanmıştır.

C. sakazakii, peynir ürünleri, et, pirinç ve diğer tahıllar, sebzeler, otlar ve baharatlar, fermente ekmekler, kanatlı hayvanlar, aşırı ısıl işlem görmüş süt, bozuk tofu ve kefir gibi çeşitli gıdalardan izole edilmiştir (Iversen and Forsythe, 2004; Friedemann, 2007). Bu nedenle, önleyici kontrol tedbirleri tasarlanırken organizmanın genele yayılan doğası dikkate alınmalıdır (Kandhai ve ark., 2004a). Bu çalışmada da pirinç unu incelenmiş ve %10 oranında *C. sakazakii* saptanmıştır.

Bu çalışmada *C. sakazakii* izolatlarında sadece dört virülans kodlayıcı gen (*OmpA*, *OmpX*, *zpx* ve *Cpa*) varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla Real time PZR yöntemi kullanılmıştır.

C. sakazakii organizmalarının geçmişi kısadır fakat milyonlarca yıldır var oldukları kesindir. *C. sakazakii* (Eski adıyla *Enterobacter sakazakii*) yedi türü bulunan (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, *C. condimenti*, ve *C. universalis*) yeni sınıflandırılmış bir cinstir (Singh ve ark., 2015). Bunlar arasında *C. sakazakii*, bebeklerde, çocuklarda ve özellikle yaşlılarda ve bağışıklığı zayıflayan yetişkinlerde %40 ila %80 oranında yüksek mortalite sahip en sık görülen ve en çok izole edilen türdür (Heperkan ve ark., 2017). Bu fırsatçı mikroorganizma *C. sakazakii* cinsinde bazı klinik olarak önemli olan anne sütü ve bebek mamalarında bulunan bileşik olarak önemli bir evrimsel konak adaptasyonu olan sialik asit gibi eksojen maddelerin kullanılmasına olanak tanıyan gen kodlama açısından benzersiz özelliktedir (Joseph ve ark., 2012). Son birkaç yıldır, ilk olarak 1980' de *Cronobacter sakazakii* olarak tanımlanan *C. sakazakii*' nin karmaşıklığı hakkında çok şey öğrenilmiştir (Shashkov ve ark., 2015). Bununla birlikte, bu patojen tarafından oluşturulan halk sağlığı riskinin değerlendirilmesine ilişkin hala birçok belirsizlik bulunmaktadır (Healy ve ark., 2010; Bao ve ark., 2017). Özellikle de *C. sakazakii* enfeksiyonunu kapsayan hastalık gözetim ve/veya salgın raporlama sistemleri, bebekler ve çocukların gıda kaynaklı *C. sakazakii* enfeksiyonu sebebiyle ciddi hastalık ve ölüm riski altında olduklarını ortaya koymaktadır (FAO/WHO, 2008). Çalışmamız, analiz edilen gıdaların ve gıda üretim ortamlarının, *C. sakazakii* kontaminasyonu nedeniyle yenidoğanlar, bebekler ve çocuklara yönelik bir sağlık tehdidi oluşturduğu kanıtlamıştır.

2008 ve 2014 arasında yapılan uluslararası çalışmalar, hayvansal kökenli gıda numunelerinin %5,7' si ve bitki ile ilgili gıda numunelerinin %19' unun *C. sakazakii* dahil olmak üzere *C. sakazakii* türlerini içermekte olduğunu göstermektedir (Sani ve Odevemi, 2015). Çek Cumhuriyeti' ndeki bir başka araştırmada, *C. sakazakii* ile en sık kontamine olmuş (%54,7) numunelerin bitki kökenli gıdalar olduğunu göstermiştir (Hochel ve ark., 2012). Ancak bizim çalışmamız, *C. sakazakii* suşlarının %35' inin süt tozundan izole edildiğini, ardından toz, pirinç unu ve irmik izlediğini tartışmalı olarak göstermiştir. Mevcut veriler, bebeklerin ve çocukların, *C. sakazakii*' yi barındıran analiz edilen gıdalar ve çevresel kaynaklarla enfeksiyon sebebiyle hastalanma ve ölüm riski altında olduğunu göstermektedir.

C. sakazakii birçok gıdadan izole edilmiştir (Jason, 2015). Ürdün'de, Shaker ve ark. (2007) ile Jaradat ve ark. (2009) bebek mamalarında ve irmikte (%1,4 ve %17,4) bu bakteriyi tespit etmiş olup, Mısır'da yapılan bir başka araştırmada ise süt tozu ve bebek mamalarında bulunmuştur (El-Sharoud ve ark., 2009). Xu ve ark. (2014) ile Huang ve ark. (2015) bu fırsatçı organizmayı 2010 ile 2012 yılları arasında Çin' de tüketilen genel mama (%6,25), bebek maması (%1,82- %16,9), devam maması (% 3,64), büyüme maması (%5,45), çocuk maması (%2,5) ve pirinç ununda (% 28,8) tespit etmiştir. Süt tozu, pirinç unu ve irmik, çeşitli bebek ve çocuk gıdalarının üretimi için maddeler olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamız, analiz edilen süt tozu örneklerinde *C. sakazakii* ile kontaminasyon düzeyinin uluslararası çalışmaların sonuçlarına göre daha yüksek iken irmik ve pirinç ununun ise Jaradat ve ark. (2009) ile Xu ve ark. (2014) tarafından yapılan diğer çalışmalardan daha düşük olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan, bu çalışmada, nişasta ve bebek maması numunelerinde *C. sakazakii* tespit edilmemiştir. Bulgularımız daha önce Miranda ve ark. (2017) tarafından ABD' de ve Hochel ve ark. (2012) tarafından Çek Cumhuriyeti' nde açıklanan çalışmalarla benzerlik göstermiştir. Türkiye' de bazı çalışmalar, *C. sakazakii* türlerinin özellikle de *C. sakazakii*' nin farklı kaynaklardaki sıklığına ilişkin önemli veriler sağlamıştır. Buna paralel olarak, *C. sakazakii* süt tozunda (%5 ila %7,5), nişastada (%5), pirinç ununda (%5), irmikte (%5) ve peynir altı suyu tozunda (7,5) bulunmuş (Gökmen ve ark., 2010; Gümüş ve ark., 2017; Heperkan ve ark., 2017) olmasına karşın Gökmen

ve ark. (2010) ve Güner ve ark. (2011) 'nın yapmış olduğu çalışmalara göre üç perakende markanın peynir altı suyu tozu ve toz haline getirilmiş bebek mamalarında bulunmamaktadır. Sonuçlarımız, süt tozu, pirinç unu ve irmiğin önemli bir *C. sakazakii* taşıyıcısı olduğunu ve bebekler ve çocuklar için bir sağlık riski teşkil ettiğini işaret etmektedir.

C. sakazakii gıda üretim alanlarından da izole edilmiştir (Jason, 2015). Ürdün' de bir gıda üretim tesisinin vakum tozundaki *C. sakazakii* sıklığı %18 olarak bulunmuştur (Shaker ve ark., 2007). Müller ve ark. (2013) *C. sakazakii*' nin İsviçre'de toz haline getirilmiş bir bebek maması işleme tesisinde tanımlanan en yaygın tür (%93,6) olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, Mozrová ve ark. (2014) Çek Cumhuriyeti' ndeki bir süt çiftliğinden ve elektrikli süpürgelerden alınan toz örneklerinde ona rastlamıştır. Örneğin, bir süt tozu üretim tesisinde sprey kurutma kulelerinin egzoz havası için tekstil filtreleri *C. sakazakii*' nin dahili rezervuarları olduğu bulunmuştur. Bu durum ekonomik nedenlerden ve üretimde optimizasyon ve maliyet azaltma hedefleri nedeniyle atık tozun filtrelerden ürün akışı içine yeniden girişinden kaynaklanmaktadır (Jacobs ve ark., 2011). *C. sakazakii*' nin üretim alanındaki kontaminasyon riskini azaltmak için, havadaki nem oranı ve toz parçacıklarının sayısı daha düşük tutulmalı ve bunun yanı sıra sıklıkla üretim ekipmanları temizlenmeli ve atık tozunun etkili işlenmesi yapılmalıdır (Fei ve ark., 2015). Bu çalışmada, analiz edilen toz örneklerinin %25' inin *C. sakazakii* için pozitif olduğunu kanıtladık. Buna göre, gelecekteki çalışmalar, *C. sakazakii*' nin yaygınlaştırılmasına yönelik risk faktörleri olarak üretim alanının ve ekipmanın etkisini ortaya çıkaracak olup bu patojenin enfeksiyonlarını azaltmak için onu daha iyi kontrol edilmesine yol açacaktır.

Virülans faktörleri, *C. sakazakii*' nin patojenik potansiyelini klinik belirtiler ile olan makul bağlantıları ile belirtmektedir (Singh ve ark., 2017). Bununla birlikte *C. sakazakii*' nin virülans faktörleri ve patojenezi çok az anlaşılmıştır. Bu nedenle, toksikolojik deneyler, *C. sakazakii* alt tiplemesi, moleküler ve proteomik analizler, *C. sakazakii*' nin virülans ile ilgili özelliklerini kapsamlı olarak değerlendirmektedir.

C. sakazakii cinsinin ISO/TS 22964' e göre tespit edilmesi bir hafta kadar sürer ve geleneksel yöntemler bir suşun virülans potansiyeli hakkında bize hiçbir şey

söylemez. Bu sebepten ötürü, hızlı ve hassas yöntemler geliştirilmiştir (Yan ve ark., 2012). Örneğin, menenjit başlangıcından önce kan-beyin bariyerinin keşişmesinde potansiyel bir virülans faktörü olan OmpA dış zar proteini, tanımlama amacıyla kullanılmış olup (Fei ve ark., 2015) diğer bazı virülans genleri ile sinerjik olarak *in vitro* şeklinde çalışmasının yanı sıra *C. sakazakii* patojenezinde *in vivo* olarak da çalışır (Chandrapala ve ark., 2014). Son yapılan araştırmalar da seksen dokuz proteininin en az onbirinin virülansla ilgili potansiyel gösterdiğini ortaya koymuştur. *Cronobacter* virülansı birden çok etmene bağlıdır (Jaradat ve ark., 2014).

Son yıllarda, birçok araştırma çok çeşitli kaynaklardan izole edilmiş olan *C. sakazakii*' nin virülans özelliklerini incelemiştir. Bir araştırma bir toz haline getirilmiş bebek maması fabrikasından alınan on üç izolatin *zpx* virülans genleri barındırdığını, hiçbir izolatin ise OmpA içermediğini göstermiştir (Jaradat ve ark., 2009). Başka bir araştırma ise toz haline getirilmiş bebek maması içeren düşük nemli gıda ürünlerinde test edilen *Cronobacter* suşlarının % 64,7' sinde OmpA geninin bulunduğunu ortaya koymuştur (Yan ve ark., 2011). Benzer şekilde, OmpA ve OmpX tüm *Cronobacter* türlerinde bulunurken, *Cronobacter* suşlarının %98' inde *Cronobacter* plazminojen aktivatör geni (*Cpa*) taşımaktadır (Jaradat ve ark., 2014). Almanya' da araştırmacılar, *C. sakazakii*' nin bebek ve bebek gıdalardan izolatlarının %11' inin oldukça öldürücü olduğunu ortaya koymuştur (Zimmermann ve ark., 2014; Akineden ve ark., 2017). Çin' de bulunan bir süt tozu fabrikasında, *Cpa*-OmpX taşıyan virülans genotiplerinin oranı %79,3 olarak bulunmuştur (Wang ve ark., 2015). Benzer şekilde, 2010 ile 2012 yılları arasında Çin' de süt bazlı bebek maması numunelerinden izole edilen *C. sakazakii* izolatları çoğunlukla OmpA geni barındırmış olup bazı virülans genleri beraber taşımıştır (Li ve ark., 2016). Bir başka araştırmada, *C. sakazakii* izolatlarının bitki kökenli materyallerden türetildiği ve çevresel numunelerin *Cpa* (%60)' yı takiben OmpA içerdiğini göstermiştir (Singh ve ark., 2017). Bu çalışmada, izole edilen suşların OmpA, OmpX, *zpx* ve *Cpa* olmak üzere dört virülans geninin tamamını aynı anda barındırdıklarını kanıtladık. Bu nedenle, bu rapor bazı gıdalardan ve gıda tesislerinin toz toplama sistemlerinden kaynaklı *C. sakazakii* izolatlarındaki farklı virülans genlerinin özelliklerine yönelik Türkiye'de yapılan ilk kapsamlı rapordur.

Cronobacter türleri yakın zamanda sınıflandırılmış bir cins olup bu benzersiz organizma grubunu daha iyi anlamak için henüz tamamlanmamış çalışmalar bulunmaktadır. Gıdalar ve klinik ortamlar açısından güvenilir algılama ve doğru tanımlama en üst seviyede önemlidir. Moleküler algılama yöntemleri, geleneksel mikrobiyolojik (fenotip) tabanlı yöntemlerle karşılaştırıldığında genellikle daha hızlı olmasına rağmen, özel ekipman ve operatör eğitimi gereksinimi bazı sektörleri bu protokolleri uygulamaktan alıkoymaktadır. Bununla birlikte, klinik ortamda hızlı tanı protokolleri esas teşkil eder. Ticari olarak bulunan algılama sistemlerine yönelik veritabanlarının güncellenmesi için çaba gösterilmesine rağmen, *Cronobacter* türlerinin tanımlanması ve farklılaştırılmasında geliştirmeler yapılabilir. Karşılaştırmalı genom analizi, transkriptomik ve biyoenformatik ile birlikte proteomik gibi tekniklerin uygulanması, patojen ile konakçı arasındaki karmaşık etkileşimleri ortaya çıkarmak ve *Cronobacter* türlerinde yeni ve ortaya çıkmakta olan özellikleri tanımlamak için elzemdir. Dahası, enfeksiyonları tedavi etmek ve kontrol altına almak için kullanılan terapilerin tasarımında çok önemli olan *Cronobacter* türlerinin *in vivo* virülans faktörleri ve patojenitesi hakkında çok az şey bilinmektedir. *Cronobacter* türleri ile ilişkili hastalıkların ilerlemesi ve patojenezinin özellikle de hayvan model çalışmaları ile kombine edilmiş *in vitro* hücre bazlı analizler kullanılarak daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, bu çalışmada bebek beslenmesinde kullanılan bazı gıdaların *C. sakazakii* ile bulaş oldukları, elde edilen izolatların virülans genlere sahip oldukları ve bu bakımdan sağlık açısından son derece risk taşıdıkları gösterilmiştir. Klasik mikrobiyolojik yöntemlerin virülans genleri tanımlamakta yetersiz kaldığı, DNA-tabanlı moleküler algılama yöntemlerinin virülans faktörlerin belirlenmesinde gerekli olduğu gösterilmiştir. Pek çok patojenik organizmada olduğu gibi *Cronobacter* türleri de PIF işleme tesislerinde karşılaşılanlar gibi belirli olumsuz çevre koşullarında hayatta kalma kabiliyeti sayesinde daha geniş bir bakteri popülasyonundan ortaya çıkmıştır. Bu şekilde yeni patojenik organizmaların ortaya çıkışı kaçınılmaz gibi gözüktüğünden, gelecekte iyileştirilmiş gıda güvenliği sistemlerinin uygun kontrol ve yönetim çözümlerini belirlemek için bilimsel risk değerlendirmesine dayandırılması oldukça önemlidir. Bu tür sistemler, ancak en güncel ve hassas mikrobiyolojik

yöntemlerle üretilen verilerle desteklendiğinde etkili olabilir. Bu nedenle, yeni teknolojilerin, protokollerin ve gıda güvenliği konularının sanayiye, otoritelere, araştırmacılara ve tüketicilere iletilmesi ve dağıtılmasına çok önem verilmelidir.



KAYNAKLAR

- Akineden, Ö., & et al., (2017) “Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Cronobacter sakazakii* from infant food”, *Food Microbiol*, vol. **65**, pp. 44-50, 2017.
- Aldova, E., Hauser, O., Postuba, R. (1983). Tween-esterase activity in *Cronobacter sakazakii*. *Zbl. Bakt. Hyg A*, **256**:103108.
- Almajed, F., S., & Forsythe S. J., (2016). “*Cronobacter sakazakii* clinical isolates overcome host barriers and evade the immune response”, *Microb Pathog* , vol. **90**, pp. 55-63.
- Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., Elabedeen, N. A., Jaradat, Z. W., Shaker, R. R., Kheirallah, K. A., Tarazi, Y. H. & Holley, R. A. (2011). Impact of environmental stress desiccation, acidity, alkalinity, heat or cold on antibiotic susceptibility of *Cronobacter sakazakii*. *Int J Food Microbiol* **146**, 137–143.
- Amalaradjou, M., A., & et al, (2014). “Sub-inhibitory concentrations of trans-cinnamaldehyde attenuate virulence in *Cronobacter sakazakii* in vitro”, *Int J Mol Sci*, vol. **15**, no. 5, pp. :8639-8655.
- Anderson R, Dalziel J, Gopal P, Bassett S, Ellis A, Roy N. (2010) The Role of Intestinal Barrier Function in Early Life in the Development of Colitis, *Colitis*, Dr Fukata (Ed.), ISBN: 978-953-307-799-4, InTech, DOI: 10.5772/25753.
- Anonymous (2006a) Milk and Milk Products – Detection of *Cronobacter sakazakii*. Technical Specification ISO/TS 22964. ISO/TS 22964:2006(E) and IDF /RM 210:2006(E), 1st edn.Geneva: International Organization for Standardization.
- Anonymous (2006b) *Cronobacter sakazakii* and Salmonella in powdered infant formula. Available at: http://www.fao.org/ag/agn/agns/jemra_riskassessment_enterobacter_en.asp. Second Risk Assessment Workshop. Joint FAO /WHO Workshop: Rome, Italy.
- Arku, B., Mullane, N., Fox, E., Fanning, S. & Jordan, K. (2008) *Cronobacter sakazakii* survives spray drying. *International Journal of Dairy Technology* **6(1)**; Feb: 102-108.
- Baldwin, A., Loughlin, M., Caubilla–Barron, J., Kucerova, E., Manning, G., Dowson, C. and Forsythe, S. (2009) Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. *BMC Microbiol* **9**, 223.
- Bao, X., & et al., (2017) “Analysis on pathogenic and virulent characteristics of the *Cronobacter sakazakii* strain BAA-894 by whole genome sequencing”, *Microb Pathog*, pii: S0882-4010(17)30492-8.
- Bar-Oz, B., Preminger, A., Peleg, O.,Block, C.& Arad, I. (2001). *Cronobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediatr* **90**, 356–358.

- Beuchat, L.R., H. Kim, J.B. Gurtler, L.C. Lin, J.H. Ryu and G.M. Richards.** (2009) *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *Int. J. Food Microbiol.* 136:204–213.
- Biering G, Karlsson S, Clark N C, Jonsdottir K E, Ludvigsson P, Steingrimsson O.** (1989) Three cases of neonatal meningitis caused by *Cronobacter sakazakii* in powdered milk. *J Clin Microbiol* 27: 2054– 56.
- Biering, G., Karlsson, S., Clark, N. C., Jonsdottir, K. E., Ludvigsson, P. & Steingrimsson, O.** (1989). Three cases of neonatal meningitis caused by *Cronobacter sakazakii* in powdered milk. *J Clin Microbiol* 27, 2054–2056.
- Block C, Peleg O, Minster N, Bar-Oz B, Simhon A, Arad I, Shapiro M.** (2002) Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Cronobacter sakazakii*. *European J Clin Microbiol Infect Dis* 21:613–16.
- Bowen, A. B. & Braden, C. R.** (2006). Invasive *Cronobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg Infect Dis* 12, 1185–1189.
- Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M. & Joosten H.M.** (2003) Desiccation and heat tolerance of *Cronobacter sakazakii*. *J Appl Microbiol* 95, 967–973.
- Breeuwer, A., Lardeau, A., Peterz, M. & Joosten, HM.** (2003) Desiccation and heat tolerance of *Cronobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 967-973.
- Burgos, J. & Varela, M.** (2002). Multiple antibiotic resistant dairy soil bacteria. Abstracts of the 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology; Salt Palace Convention Center, May 19–23, 2002, Session 25, Paper A-31. American Society for Microbiology.
- Cai, X., Q., & et al,** (2013) “Rapid Detection and Simultaneous Genotyping of *Cronobacter* spp. (formerly *Cronobacter sakazakii*) in Powdered Infant Formula Using Real-time PCR and High Resolution Melting (HRM) Analysis”, *PLoS ONE*, vol. 8, no. 6, e67082.
- Caubilla-Barron, J., Hurrell, E., Townsend, S., Cheetham, P., LocCarrillo, C., Fayet, O., Prere, M. F. & Forsythe, S. J.** (2007). Genotypic and phenotypic analysis of *Cronobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. *J Clin Microbiol* 45, 3979–3985.
- Cava Gümüş, P., & et al.,** (2017). “Investigation of Extended Spectrum B-Lactamases (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae and *Cronobacter* Spp in Infant Formulas and Cereal-Based Foods for Children”, *İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, vol. 1, pp. 19-32.
- CDC** (2009). *Cronobacter* species isolation in two infants – New Mexico, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58, 1179–1183.
- Cetinkaya, E., Joseph, S., Ayhan, K. & Forsythe, S. J.** (2013). Comparison of methods for the microbiological identification and profiling of *Cronobacter* species from ingredients used in the preparation of infant formula. *Mol Cell Probes* 27, 60–64.
- Chandrapala, D., & et al.,** (2014). “Putative Inv is essential for basolateral invasion of Caco-2 cells and acts synergistically with OmpA to affect in vitro and in vivo virulence of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544”, *Infect Immun*, vol. 82, no. 5, pp. 1755-1765.
- Chen, Y.** (2011) Development and validation of a revised FDA method for the detection of *Cronobacter* in powdered infant formula. Department Seminar

Series in University of Helsinki, April 21 2011, Latokartanonkaari, Finland.

- Chen, Y., Hammack, T.S., Song, K.Y. and Lampel, K.A.** (2009) Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration for the detection and isolation of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula: precollaborative study. *J AOAC Int* **92**, 862–872.
- Chenu, J. W. & Cox, J. M.** (2009). *Cronobacter* (*'Cronobacter sakazakii'*): current status and future prospects. *Lett Appl Microbiol* **49**, 153–159.
- Craven, H. M., C.M. McAuley, L.L. Duffy and N. Fegan.** (2010) Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter* (*Cronobacter sakazakii*) in the nonprocessing and processing environments of five milk powder factories. *Journal of applied microbiology*, 109(3):1044- 1052.
- Cruz, A., Xicohtencatl-Cortes, J., Gonza' lez-Pedrajo, B., Bobadilla, M., Eslava, C. & Rosas, I.** (2011). Virulence traits in *Cronobacter* species isolated from different sources. *Can J Microbiol* **57**, 735–744.
- Cruz-Co 'rdova, A., Rocha-Rami'rez, L. M., Ochoa, S. A., Gonza 'lezPedrajo, B., Espinosa, N., Eslava, C., Herna 'ndez-Chin 'as, U., Mendoza-Herna 'ndez, G., Rodri 'guez-Leviz, A. & other authors** (2012). Flagella from five *Cronobacter* species induce pro-inflammatory cytokines in macrophage derivatives from human monocytes. *PLoS ONE* **7**, e52091.
- De Kort G, Bolton A, Martin G, Stephen J, Van De Klundert J.** (1994) Invasion of rabbit ileal tissue by *Enterobacter cloacae* varies with the concentration of OmpX in the outer membrane. *Infect Immun* **62**:4722- 6.
- Drudy, D., O'Rourke, M., Murphy, M., Mullane, N., O'Mahony, R., Kelly, L., Fischer, M., Sanjaq, S. et al.** (2006) Characterization of a collection of *Cronobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources. *Int J Food Microbiol* **110**, 127–134.
- Edelson-Mammel, SG. & Buchanan, RL.** (2004a) Thermal inactivation of *Cronobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *Journal of Food Protection*, **67**(1): 60-63.
- Edelson-Mammel, SG. & Buchanan, RL.** (2004b) Acid resistance of twelve strains of *Cronobacter sakazakii*. Abstract #P170 in: proceedings of the 91st Annual Meeting of International Association of Food Protection, held in United States of America on 8-11 August, 2004.
- El-Sharoud, W.M., O'Brien, S., Negrodo, C., Iversen, C., Fanning, S. and Healy, B.** (2009) Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiol* **9**, 24.
- Emami CN, Mittal R, Wang L, Ford HR, Prasadarao NV.** (2011) Recruitment of dendritic cells is responsible for intestinal epithelial damage in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by *Cronobacter sakazakii*. *J Immunol* **186**:7067-79.
- Eshwar, A., K., & et al.,** "Linking Genomo- and Pathotype: Exploiting the Zebrafish Embryo Model to Investigate the Divergent Virulence Potential among *Cronobacter* spp.", *PLoS One*, vol. 11, no. 6, pp. e0158428.
- Fakruddin M, Rahman MM, Ahmed MM, Hoque MM.** (2014) Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food. *Biol Res* **47**(1): 63.
- Fang, R., Q. Wang, B. Yang, J. Zhang, B. Cao, W. Geng, X. Feng, J. Yang and W. Ge.** (2015) Prevalence and subtyping of *Cronobacter* species in goat milk powder factories in Shaanxi province, China. *Journal of Dairy Science*, 98(11): 7552-7559.

- FAO & WHO** (2008) *Cronobacter sakazakii* (Cronobacter spp.) in powdered following formula: meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No.15, Rome, Italy.
- FAO/WHO** (2004). *Cronobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: Meeting report, MRA 6.
- FAO/WHO** (2006). “*Cronobacter sakazakii* (Cronobacter spp.) in powdered follow-up formulae”, Microbiological Risk Assessment Series No. 15. Rome. 90pp. Retrieved from <http://www.who.int/foodsafety>.
- FAO/WHO** (2006). *Cronobacter sakazakii* and Salmonella in Powdered Infant Formula (Meeting Report). Microbiological Risk Assessment Series 10. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization.
- FAO/WHO** (2006a). *Cronobacter sakazakii* and Salmonella in powdered infant formula. Meeting report number 10.
- FAO/WHO** (2006b). Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula guidelines.
- FAO/WHO** (2008). *Cronobacter sakazakii* (Cronobacter spp.) in Powdered Follow-Up Formulae. Microbiological Risk Assessment Series 15. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization.
- Farmer, JJ., Asburry, MA., Hickman, FW., Brenner, DJ. & Enterobacteriaceae Study Group (USA)**. (1980). *Cronobacter sakazakii*: A new species of “Enterobacteriaceae” isolated from clinical specimens. International Journal of Systematic Bacteriology, **30** (3), Jul.: 569–584.
- Fei, P., & et al.**, (2015) “Genotyping and Source Tracking of Cronobacter Sakazakii and C. Malonaticus Isolates from Powdered Infant Formula and an Infant Formula Production Factory in China”, Applied and Environmental Microbiology, vol. **81**, no. 16, pp. 5430–5439.
- Flores, J. P., Medrano, S. A., Sanchez, J. S. & Fernandez-Escartin, E.** (2011). Two cases of hemorrhagic diarrhea caused by Cronobacter sakazakii in hospitalized nursing infants associated with the consumption of powdered infant formula. J Food Prot **74**, 2177–2181.
- Forsythe S.** (2010) Cronobacter species. School of Science and Technology, Nottingham Trent University Nottingham, UK. March; **31**; 1.
- Franco, A. A., Hu, L., Grim, C. J., Gopinath, G., Sathyamoorthy, V., Jarvis, K. G., Lee, C., Sadowski, J., Kim, J. & other authors** (2011b). Characterization of putative virulence genes on the related RepFIB plasmids harbored by Cronobacter spp. Appl Environ Microbiol **77**, 3255–3267.
- Franco, A. A., Kothary, M. H., Gopinath, G., Jarvis, K. G., Grim, C. J., Hu, L., Datta, A. R., McCardell, B. A. & Tall, B. D.** (2011a). Cpa, the outer membrane protease of Cronobacter sakazakii, activates plasminogen and mediates resistance to serum bactericidal activity. Infect Immun **79**, 1578–1587.
- Friedemann, M.** (2007). *Cronobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). Int J Food Microbiol **116**, 1–10.
- Friedemann, M.** (2009). Epidemiology of invasive neonatal Cronobacter (*Cronobacter sakazakii*) infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **28**, 1297–1304.

- Fu, S., J. Gao, Y. Liu and H. Chen.** (2011) Isolation of *Cronobacter* spp. isolates from infant formulas and their survival in the production process of infant formula. *Czech. J. Food Sci.* **29**: 391- 399.
- Gahring LC, Heffron F, Finlay B, Falkow S.** (1990) Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect Immun* **58**:443-8.
- Giri, C. P., Shima, K., Tall, B. D., Curtis, S., Sathyamoorthy, V., Hanisch, B., Kim, K. S. & Kopecko, D. J.** (2012). *Cronobacter* spp. (previously *Cronobacter sakazakii*) invade and translocate across both cultured human intestinal epithelial cells and human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* **52**: 140–147.
- Gökmen, M., & et al.,** (2010). “Presence of *Cronobacter sakazakii* in Milk Powder, Whey Powder and White Cheese Produced in Konya”, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, vol.16, no. Suppl-A, pp. 163-166.
- Gosney, M. A., Martin, M. V., Wright, A. E. & Gallagher, M.** (2006). *Cronobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. *Eur J Intern Med* **17**, 185–188.
- Grim, C. J., Kotewicz, M. L., Power, K. A., Gopinath, G., Franco, A. A., Jarvis, K. G., Yan, Q. Q., Jackson, S. A., Sathyamoorthy, V. & other authors** (2013). Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation. *BMC Genomics* **14**, 366.
- Grishin, A., Papillon, S., Bell, B., Wang, J. & Ford, H. R.** (2013). The role of the intestinal microbiota in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* **22**, 69–75.
- Gültekin M, Demirel NN.** (2006). Hazır toz bebek mamaları ve *Cronobacter sakazakii*. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* **36(1)**: 67-74.
- Güner, A., & et al.,** (2011). “An investigation on the prevalence of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula consumed in Turkey”, *Journal of Food Agriculture and Environment*, vol. 9, no. 2, pp. 82-84.
- Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., & Beuchat, L.R.** (2005) *Cronobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol*, **104**: 1-34.
- Hamby, S. E., Joseph, S., Forsythe, S. J. & Chuzhanova, N.** (2011). In silico identification of pathogenic strains of *Cronobacter* from biochemical data reveals association of inositol fermentation with pathogenicity. *BMC Microbiol* **11**, 204.
- Harmsen HJM, Wildeboer–Velloo ACM, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW.** (2000) Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30**:61-7.
- Hartmann, I., Carranza, P., Lehner, A., Stephan, R., Eberl, L. & Riedel, K.** (2010). Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* **76**, 2251–2261.
- Healy B, Huynh S, Mullane N, O'Brien S, Iversen C, Lehner A et al.** (2009) Microarray-based comparative genomic indexing of the *Cronobacter* genus (*Cronobacter sakazakii*). *Intl J Food Microbiol* **136 (2)**, 159-164.
- Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., Whyte, P., Nally, J., Callanan, J.J. and Fanning, S.** (2010) *Cronobacter* (*Cronobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathog Dis* **7**, 339–350.
- Heperkan, D., & et al.** (2017). “*Cronobacter sakazakii* in baby foods and baby food

ingredients of dairy origin and microbiological profile of positive samples”, *Lebensmittel-Wissenschaft+[i.e.und] Technologie*, vol. 75, pp. 402-407.

- Himelright I, Harris E, Lorch V and Anderson M.** (2002) *Cronobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula: Tennessee. *J Am Med Ass* **287**: 2204–05.
- Hochel, I., Ruzickova, H., Krasny, L. & Demnerova, K.** (2012). Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. *J Appl Microbiol* **112**, 1257–1265.
- Holý O, Forsythe S.J.** (2014) *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare associated
- Hoque A, Ahmed T, Shahidullah M, Hossain A, Mannan A ve ark.** (2010) Isolation and molecular identification of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula (PIF) in Bangladesh. *Int J Food Microbio* **1142**: 375–378.
- Hu L, Kopecko DJ.** (1999) *Campylobacter jejuni* 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infect Immun* **67**:4171- 82; PMID:10417189
- Huang, Y., & et al.,** (2015). “Occurrence and Characterization of *Cronobacter* spp. in Dehydrated Rice Powder from Chinese Supermarket”, *PLoS ONE*, vol. **10**, no. 7, pp. e0131053.
- Hunter CJ, Bean JF** (2013) *Cronobacter*: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis. *J. Perinatol. Aug*; **33(8)**:581-5.
- ICMSF** (2002) International Commission of Microbiological Specification for Foods Microbiological Testing in Food Safety Management (**Vol 7**) New York: Academic/Plenum Publisher 364 p.
- Infection. *J Hosp Infect* **86**:3, 169-177.
- International Organization for Standardization** (2009) ISO 9000 Essentials. Available at: http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/management_standards/iso_9000_iso_14000/iso_9000_essentials.htm.
- ISO/TS 22964.** (2006). International Organization for Standardization Milk and milk products – Detection of *Cronobacter sakazakii*.
- Iversen C, Druggan P, Forsythe S.** (2004a) A selective differential medium for *Cronobacter sakazakii*, a preliminary study. *Intl J Food Microbiol* **96 (2)**: 133-139.
- Iversen C, Druggan P, Schumacher S, Lehner A, Feer C, Gschwend K, Joosten H, Stephan R.** (2008) Development of a novel screening method for the isolation of “*Cronobacter*” spp. (*Cronobacter sakazakii*). *Appl Environ Microbiol.* **74(8)**:2550-2553.
- Iversen C, Forsythe S.J.** (2003) Risk profile of *Cronobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Technol.* **14**:443-454.
- Iversen C, Forsythe SJ.** (2004b) Isolation of *Cronobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula and related products. *Food Microbiol* **21**: 771–776.
- Iversen, C., & Forsythe, S.** (2007) Comparison of media for the isolation of *Cronobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol*, **73**: 48-52.

- Iversen, C., Druggan, P. and Forsythe, S.** (2004b) A selective differential medium for *Cronobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int J Food Microbiol* **96**, 133–139.
- Iversen, C., Lane, M. & Forsythe, S. J.** (2004). The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett Appl Microbiol* **38**, 378–382.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, J., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., & Joosten, H.** (2007b) Identification of “Cronobacter” spp. (*Cronobacter sakazakii*). *Journal of Clinical Microbiology*, **45(11)**; Nov: 3814-3816.
- Ivy, R., A., & et al.,** (2013). “International Life Science Institute North America Cronobacter (Formerly *Cronobacter sakazakii*) isolate set”, *J Food Prot*, vol. **76**, no. 1, pp. 40-51.
- Jacobs, C., & et al.,** (2011). “Reservoir and routes of transmission of *Cronobacter sakazakii* (Cronobacter spp.) in a milk powder-producing plant”, *J Dairy Sci*, vol. **94**, no. 8, pp. 3801-3810.
- Jaradat Z.W., Ababneh Q.O., Saadoun I.M., Samara N.A. & Rashdan A.M.** (2009). Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Cronobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. *BMC Microbiology* **9**: 225.
- Jason, J.,** (2015) “The Roles of Epidemiologists, Laboratorians, and Public Health Agencies in Preventing Invasive Cronobacter Infection”, *Front Pediatr*, vol. **3**, pp. 110.
- Jo, S. H., Baek, S. B., Ha, J. H. & Ha, S. D.** (2010). Maturation and survival of Cronobacter biofilms on silicone, polycarbonate, and stainless steel after UV light and ethanol immersion treatments. *J Food Prot* **73**, 952–956.
- Joseph S, Forsythe S.** (2012). Insights into the emergent bacterial pathogen Cronobacter spp, generated by multilocus sequence typing and analysis. *Front Microbiol* **3**:3.
- Joseph, S., & et al.,** (2012) “Comparative analysis of genome sequences covering the seven cronobacter species”, *PLoS One*, vol. **7**, no. 11, pp. e49455.
- Joseph, S., Desai, P., Ji, Y., Cummings, C. A., Shih, R., Degoricija, L., Rico, A., Brzoska, P., Hamby, S. E. & other authors** (2012c). Comparative analysis of genome sequences covering the seven Cronobacter species. *PLoS ONE* **7**, e49455.
- Joseph, S., Hariri, S., Masood, N. & Forsythe, S. J.** (2013b). Sialic acid utilization by Cronobacter sakazakii. *Microb Inform Exp* **3**, 3.
- Jumarie C., Malo C.** (1991) Caco-2 cells cultured in serumfree medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol* **149**:24-33.
- Kampfer, P., Rauhoff, O. & Dott, W.** (1991) Glycosidase profile of members of the family Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, **29(12)**; Dec: 2877-2879.
- Kandhai, MC., Reij MW., Gorris LG., Guillaume-Gentil, O., van Schothorst, M.** (2004) Occurrence of *Cronobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet*; **363**: 39–40.
- Kandhai, MC., Reij, MW., Van Puyveld, K., Guillaume-Gentil, O., Beumer, RR. & Van Schothorst, M.** (2004a) A new protocol for the detection of

- Cronobacter sakazakii* applied to environmental samples. Journal of Food Protection, **67**(6): 1267-1270.
- Kandhai, MC., Reij, MW., Van Puyveld, K., Guillaume-Gentil, O., Beumer, RR. & Van Schothorst, M.** (2004b) Occurrence of *Cronobacter sakazakii* in food production environments and households. The Lancet, **363**: 39-40.
- Keyser, M., Witthuhn, R.C., Ronquest, L.-C. & Britz, T.J.** (2003) Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB) – granular sludges enriched with *Cronobacter sakazakii*. Biotechnology Letters, **25**:1893-1898.
- Kim K, Kim K-P, Choi J, Lim J-A, Lee J, Hwang S, Ryu S.** (2010) Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. Appl Environ Microbiol **76**:5188-98.
- Kim, H., Ryu, J. H. & Beuchat, L. R.** (2006). Attachment of and biofilm formation by *Cronobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. Appl Environ Microbiol **72**, 5846–5856.
- Kim, H., Ryu, J. H. & Beuchat, L. R.** (2007). Effectiveness of disinfectants in killing *Cronobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. Appl Environ Microbiol **73**, 1256–1265.
- Kim, K. P. & Loessner, M. J.** (2008). *Cronobacter sakazakii* invasion in human intestinal Caco-2 cells requires the host cell cytoskeleton and is enhanced by disruption of tight junction. Infect Immun **76**, 562– 570.
- Kolodziejek, AM., Sinclair, DJ, Seo, KS., Schnider, DR., Deobald, CF., Rohde, HN., Viall AK., Minnich, SS., Hovde, CJ., Minnich, SA.** (2007) Phenotypic characterization of OmpX, an Ail homologue of *Yersinia pestis* KIM. Microbiology **153**:2941-51.
- Koluman, A.** (2011) “Isolation and identification of *Cronobacter* spp. (*Cronobacter sakazakii*) from different foods” Electronic Journal of FoodTechnologies, **6**(2):16-19.
- Kothary, M. H., McCardell, B. A., Frazar, C. D., Deer, D. & Tall, B. D.** (2007). Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Cronobacter sakazakii*. Appl Environ Microbiol **73**, 4142–4151.
- Krieg, NR. & Holt, JG.** (1984) Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology Volume 1. Baltimore: Willian and Wilkins.
- Kucerova, E., Clifton, S. W., Xia, X. Q., Long, F., Porwollik, S., Fulton, L., Fronick, C., Minx, P., Kyung, K. & other authors** (2010). Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. PLoS ONE **5**, e9556.
- Kucerova, E., et al.** (2010) Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. PLoS One **5**:e9556.
- Kuhnert, P., Korczak, B.M., Stephan, R., Joosten, H. And Iversen, C.** (2009) Phylogeny and prediction of genetic similarity of *Cronobacter* and related taxa by multilocus sequence analysis (MLSA). Int J Food Microbiol **136**, 152–158.
- Kukkonen, M., and T. K. Korhonen.** (2004) The omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. Int. J. Med. Microbiol. **294**:7–14.

- Kukkonen, M., et al.** (2001) Protein regions important for plasminogen activation and inactivation of 2-antiplasmin in the surface protease Pla of *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 40:1097–1111.
- Kuzina, L.V., Peloquin, J.J., Vacek, D.C. & Miller, T.A.** (2001) Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology*, **42**: 290-294.
- Lai, K. K.** (2001). *Cronobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **80**, 113–122.
- Leclercq, A., Wanegue, C. & Baylac, P.** (2002) Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal enumeration in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **68(4)**; Apr: 1631-1638.
- Lee, Y., Parka, J. & Chang, H.** (2012). Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. *Food Contr* **24**, 225–230.
- Lehner, A. and Stephan, R.** (2004) Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Cronobacter sakazakii*. *Journal of Food Protection*, **67 (12)**, 2850-2857.
- Lehner, A., Riedel, K., Eberl, L., Breeuwer, P., Diep, B. & Stephan, R.** (2005). Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Cronobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. *J Food Prot* **68**, 2287– 2294.
- Lenati, R.F., O 'Connor, D.L., Hebot, K.C., Farber, J.M. & Pagotto, F.J.** (2007) Growth and survival of *Cronobacter sakazakii* in human breast milk with and without fortifiers as compared to powdered infant formula. *International Journal of Food Microbiology*, **122**: 171-179.
- Leuscher, R.G. and Bew, J.** (2004) A medium for the presumptive detection of *Cronobacter sakazakii* in infant formula: interlaboratory study. *J AOAC Int* **87**, 604–613.
- Leuschner, R.G.K., Baird, F., Donald, B. & Cox, L.J.** (2004) A medium for the presumptive detection of *Cronobacter sakazakii* in infant formula milk. *Food Microbiology*, **21**: 527-533.
- Li Z., & et al,** (2016). “Prevalence and Characterization of *Cronobacter sakazakii* in Retail Milk-Based Infant and Baby Foods in Shaanxi, China”, *Foodborne Pathog Dis*, vol. **13**, no. 4, pp. 221-227.
- Liu, L., Yang, Y., Cui, J., Liu, L., Liu, H., Hu, G., Shi. Y. & Li, J.** (2013). Evaluation and implementation of a membrane filter method for *Cronobacter* detection in drinking water. *FEMS Microbiol Lett* **344**, 60–68.
- Liu, Q., Mittal, R., Emami, C. N., Iversen, C., Ford, H. R. & Prasadarao, N. V.** (2012b). Human isolates of *Cronobacter sakazakii* bind efficiently to intestinal epithelial cells in vitro to induce monolayer permeability and apoptosis. *J Surg Res* **176**, 437–447.
- Malorny, B. and Wagner, M.** (2005) Detection of *Cronobacter sakazakii* strains by real-time PCR. *J Food Prot* **68**, 1623–1627.
- Manafi, M. and Lang, K.,** (2005) Comparison of three chromogenic media for detection of *Cronobacter sakazakii*; a preliminary study, American Society for Microbiology Conference “Beneficial microbes”, 17-21 April, Nevada.

- Mange, J. P., Stephan, R., Borel, N., Wild, P., Kim, K. S., Pospischil, A. & Lehner, A.** (2006). Adhesive properties of *Cronobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. *BMC Microbiol* **6**, 58.
- Miranda, N., & et al.,** (2017). “Molecular Surveillance of Cronobacter spp. Isolated from a Wide Variety of Foods from 44 Different Countries by Sequence Typing of 16S rRNA, rpoB and O-Antigen Genes”, *Foods*, vol. **6**, no. 5, pp. E36.
- Mohan Nair, M.K., Venkitanarayanan, K., Silbart, L.K., Kim, K.S.** (2009) Outer membrane protein A (OmpA) of *Cronobacter sakazakii* binds fibronectin and contributes to invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Foodborne Pathog Dis* **6**:495-501.
- Moriez, R., Salvador-Cartier, C., Theodorou, V., Fioramonti, J., Eutamene, H., Bueno, L.** (2005) Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am J Pathol* **167**:1071-9.
- Mozrová, V., & et al.,** (2014). “Surveillance and characterisation of Cronobacter spp. in Czech retail food and environmental samples”, *Folia Microbiol (Praha)*, vol. **59**, no. 1, pp. 63-68.
- Mullane, N. R., O’Gaora, P., Nally, J. E., Iversen, C., Whyte, P., Wall, P. G. & Fanning, S.** (2008). Molecular analysis of the *Cronobacter sakazakii* O-antigen gene locus. *Appl Environ Microbiol* **74**, 3783– 3794.
- Mullane, N.R., Murray, J., Drudy, D., Prentice, N., Whyte, P., Wall, P.G., Parton, A. and Fanning, S.** (2006) Detection of *Cronobacter sakazakii* in dried infant milk formula by cationic–magnetic–bead capture. *Appl Environ Microbiol* **72**, 6325–6330.
- Mullane, N.R., Whyte, P., Wall, P.G., Quinn, T. and Fanning, S.** (2007b) Application of pulsed–field gel electrophoresis to characterise and trace the prevalence of *Cronobacter sakazakii* in an infant formula processing facility. *Int J Food Microbiol* **116**, 73–81.
- Müller, A., & et al.,** (2013). “Genetic diversity of Cronobacter sakazakii isolates collected from a Swiss infant formula production facility”, *J Food Prot*, vol. **76**, no. 5, pp. 883-887.
- Muytjens HL, Van Der Ros-Van De Repe J, Van Druten HAM.** (1984) Enzymatic profiles of *Cronobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha glucosidase reaction and reproducibility of the test system. *J. Clin. Microbiol*, **20**:684-687.
- Muytjens, H. L. & van der Ros-van de Repe, J.** (1986). Comparative in vitro susceptibilities of eight Enterobacter species, with special reference to *Cronobacter sakazakii*. *Antimicrob Agents Chemother* **29**, 367–370.
- Muytjens, H.L. & Kollee, L.A.** (1990) *Cronobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula. *Pediatric Infectious Disease*, **9**: 372-373.
- Muytjens, H.L., Roelofs-Willems, H. & Jasper, G.H.J.** (1988) Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, **26** (4); Apr.: 743-746.
- Muytjens, H.L., Zanen, H.C., Sonderkamp, H.J., Kollee, L.A., Wachsmuth, I.K. & Farmer, J.J.** (1983) Analysis of eight cases of neonatal meningitis and

- sepsis due to *Cronobacter sakazakii*. Journal of Clinical Microbiology, **18(1)**; Jul.: 115-120.
- Nair, M.K. & Venkitanarayanan, K.S.** (2006) Cloning and sequencing of the ompA gene of *Cronobacter sakazakii* and development of an ompA-targeted PCR for rapid detection of *Cronobacter sakazakii* in infant formula. Appl Environ Microbiol **72**, 2539–2546.
- Nair, M.K. & Venkitanarayanan, K.S.** (2007) Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Cronobacter sakazakii*. Pediatric Res **62**:664-9.
- Nazarowec-White, M. & Farber, J.M.** (1997a) *Cronobacter sakazakii*: a review. International Journal of Food Microbiology, **37**: 103-113.
- Nazarowec-White, M. & Farber, J.M.** (1997b) Thermal resistance of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted dried infant formula. Letters in Applied Microbiology, **24**: 9-13.
- Nazarowec-White, M. & Farber, J.M.** (1997c) Incidence, survival and growth of *Cronobacter sakazakii* in infant formula. Journal of Food Protection, **60** (3): 226-230.
- Nazarowec-White, M. & Farber, J.M.** (1999) Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Cronobacter sakazakii*. Journal of Medical Microbiology, **48**: 559-567.
- Noriega, F. R., Kotloff, K. L., Martin, M. A. & Schwalbe, R. S.** (1990). Nosocomial bacteremia caused by *Cronobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. Pediatr Infect Dis J **9**, 447–449.
- O'Brien, S., Healy, B., Negredo, C., Fanning, S. and Iversen, C.** (2009) Evaluation of a new one-step enrichment in conjunction with a chromogenic medium for the detection of *Cronobacter* spp. (*Cronobacter sakazakii*) in powdered infant formula. J Food Prot **72**, 1472–1475.
- Ogihara, H., & et al.,** (2014). “*Cronobacter* spp. in commercially available dried food in Japan”, Biocontrol Sci., vol. 19, no. 4, pp. 209-213.
- Oh, S.W. & Kang, D.H.** (2004) Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Cronobacter sakazakii*. Appl Environ Microbiol **70**, 5692–5694.
- Pagotto, F.J., Nazarowec-White M, Bidawid S., Farber, J.M.** (2003) *Cronobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. J Food Protect **66** (3), 370-375.
- Pankov, R., & Yamada K.M.** (2002) Fibronectin at a glance. J Cell Sci **115**:3861-3.
- Parra-Flores, J., & et al,** (2015). “Investigation on the Factors Affecting *Cronobacter sakazakii* Contamination Levels in Reconstituted Powdered Infant Formula”, Front Pediatr, vol. 3, pp. 72.
- Pitout, J. D., Moland, E. S., Sanders, C. C., Thomson, K. S. & Fitzsimmons, S. R.** (1997). Beta-lactamases and detection of betalactam resistance in *Enterobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother **41**, 35–39.
- Polat, G., Halkman, K.** (2007) “ *Cronobacter sakazakii* and its importance in infant formula” Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, **32** (3) : 151-161.
- Ravishankar, S., & Juneja, V. K.** (2003). Adaptation or resistance responses of microorganisms to stresses in the food processing environment. In Microbial Stress Adaptation and Food Safety, pp. 105– 158. Edited by A. E. Yousef & V. K. Juneja. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Reich, F., R. König, W. Von Wiese and G. Klein.** (2010) Prevalence of *Cronobacter spp.* in a powdered infant formula processing environment. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2): 214-217.
- Restaino, L., Frampton, E.W., Lionberg, W.C. and Becker, R.J.** (2006) A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Cronobacter sakazakii* from foods, food ingredients and environmental sources. *J Food Prot* **69**, 315–322.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M., Stamatii, A., Zucco, F.** (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* **21**:1-26.
- Sani, N., A., Odeyemi, O., A.,** (2015). “Occurrence and prevalence of Cronobacter spp. in plant and animal derived food sources: a systematic review and meta-analysis”, Springerplus, vol. **4**, pp. 545.
- Sebbane, F., C. O. Jarrett, D. Garner, D. Long, and B. J. Hinnebush.** (2006) Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:5526–5530.
- See, K. C., Than, H. A., & Tang, T.** (2007). *Cronobacter sakazakii* bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report. *Age Ageing* **36**, 595–596.
- Seo, K.H. & Brackett, R.E.** (2005) Rapid, specific detection of *Cronobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J Food Prot* **68**, 59–63.
- Shaker, R., Osaili, T., Al-Omary, W., Jaradat, Z. & Al-Zuby, M.** (2007) Isolation of *Cronobacter sakazakii* and other Enterobacter sp. from food and food production environments. *Food Control*, **18**: 1241-1245.
- Sharma, S.C.** (1997) A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **152**:11-5.
- Shashkov, A., S., & et al.,** (2015). “Structural and genetic relationships of closely related O-antigens of Cronobacter spp. and Escherichia coli: C. sakazakii G2594 (serotype O4)/E. coli O103 and C. malonaticus G3864 (serotype O1)/E. coli O29”, *Carbohydr Res*, vol. 404, pp. 124-131.
- Singh, N., et al.,** (2017). “Profiling of Virulence Determinants in Cronobacter sakazakii Isolates from Different Plant and Environmental Commodities”, *Curr Microbiol*, vol. **74**, no. 5, pp. 560-565.
- Singh, N., Goel, G., & Raghav, M.** (2015) Insights into virulence factors determining the pathogenicity of Cronobacter sakazakii. *Virulence* **6**:5, 433-440.
- Siqueira Santos, R. F., da Silva, N., Amstalden Junqueira, V. C., Kajsik, M., Forsythe, S. J. & Pereira, J. L.** (2013). Screening for Cronobacter species in powdered and reconstituted infant formulas and from equipment used in formula preparation in maternity hospitals. *Ann Nutr Metab* **63**, 62–68.
- Sodeinde, O. A., et al.** (1992) A surface protease and the invasive character of plague. *Science* 258:1004–1007.
- Soriano, J.M., Rico, H., Molto, J.C. & Manes, J.** (2001) Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. *Food Microbiology*, **18**: 159-163.

- Stock, I., & Wiedemann, B.** (2002). Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Cronobacter sakazakii* strains. *Clin Microbiol Infect* **8**, 564–578.
- Stoll, B. J., Hansen, N., Fanaroff, A. A., & Lemons, J. A.** (2004). *Cronobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *J Pediatr* **144**, 821–823.
- Stumpe, S., R. Schmid, D. L. Stephens, G. Georgiou, and E. P. Bakker.** (1998) Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:4002–4006.
- Sylviane, D., Françoise, D., Veronique, M., Nicole, S., Alexandre, L., Bertrand & Veronique, L.,** (2007) Comparison of three chromogenic media and evaluation of two molecular-based identification systems for the detection of *Cronobacter sakazakii* from environmental samples from infant formula factories. *Journal of Food Protection*, **70** (7), 1678- 1684.
- Telli, N., Güner, A.** (2011) ‘‘The Importance of *Cronobacter sakazakii* in Food Microbiology’’ *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* **6**(3): 251-263.
- Teramoto, S., Tanabe, Y., Okano, E., Nagashima, T., Kobayashi, M. & Etoh, Y.** (2010). A first fatal neonatal case of *Cronobacter sakazakii* infection in Japan. *Pediatr Int* **52**, 312–313.
- Toğay, S.Ö., Bağcı U., Şener, A.** (2008) *Cronobacter sakazakii* ve Gıda Endüstrisindeki Önemi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum.
- Townsend, S. M., Hurrell, E., Gonzalez-Gomez, I., Lowe, J., Frye, J. G., Forsythe, S. & Badger, J. L.** (2007b). *Cronobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. *Microbiology* **153**, 3538–3547.
- Townsend, S., Hurrell, E., Forsythe, S.** (2008) Virulence studies of *Cronobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. *BMC Microbiol* **8**:64.
- Tsai, H.-Y., Liao, C. H., Huang, Y.-T., Lee, P.-I. & Hsueh, P.-R.** (2013). *Cronobacter* infections not from infant formula, Taiwan. *Emerg Infect Dis* **19**, 167–169.
- Urmenyi, A.M.C. & Franklin, A.W.** (1961) Neonatal death from pigmented coliform infection. *The Lancet*, **277** (7172):313-315.
- Van Acker, J., de Smet, F., Muyldermans, G., Bougateg, A., Naessens, A. & Lauwers, S.** (2001). Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Cronobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol* **39**, 293–297.
- Verhoeff-Bakkenes, L., Hazeleger, W., Zwietering, M., De Jonge, R.** (2008) Lack of response of INT-407 cells to the presence of non-culturable *Campylobacter jejuni*. *Epidemiol Infect* **136**:1401-6.
- Wang Q., & et al.,** (2015). ‘‘Isolation, identification, virulence genes detection and antimicrobial susceptibility test of *Cronobacter sakazakii* in goat milk powder production process’’, *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, vol. 15, no. 5, pp. 175-181.
- Willis, J., & Robinson, J. E.** (1988). *Cronobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr Infect Dis J* **7**, 196–199.
- Witthuhn, R.C., Kemp, F., & Britz, T.J.** (2006) Isolation and PCR detection of *Cronobacter sakazakii* in Sout African food products, specifically infant

- formula milks. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23(2)**; Feb:151-157.
- Xin-jun, D., & et al.**, (2015). “Comparative proteomic analysis of *Cronobacter sakazakii* isolates with different virulences”, *Journal of Proteomics*, vol. **128**, pp. 344-351.
- Xu, X., & et al.**, (2014). “Occurrence and characterization of *Cronobacter* spp. in powdered formula from Chinese retail markets”, *Foodborne Pathog Dis*, vol. **11**, no. 4, pp. 307-312, 2014.
- Yan, Q. Q., Condell, O., Power, K., Butler, F., Tall, B. D. & Fanning, S.** (2012). *Cronobacter* species (formerly known as *Cronobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. *J Appl Microbiol* **113**, 1–15.
- Yan, X., Gurtler, J., Fratamico, P.M., Hu, J., Gunther IV, N.W., Juneja, V.K. and Huang, L.** (2011) Comprehensive approaches for molecular biomarker discovery for the detection and identification of *Cronobacter* spp. (*Cronobacter sakazakii*) and Salmonella. *Appl Environ Microbiol* **77**, 1833–1843.
- Ye, Y., & et al.**, (2016). “Identification of potential virulence factors of *Cronobacter sakazakii* isolates by comparative proteomic analysis”, *International Journal of Food Microbiology*, vol. **217**, pp. 182-188.
- Zamxaka, M., Pironcheva, G. & Muyima, N.Y.O.** (2004) Bacterial community patterns of domestic water sources in the Gogogo and Nkonkobe areas of the Eastern Cape Province, South Africa. *Water SA*, **30(3)**; Jul:341-346.
- Zhou, X., Gao, J., Huang, Y., Fu, S. & Chen, H.** (2011). Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Cronobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. *Afr J Microbiol Res* **5**, 3073– 3077.
- Zhou, Y., Wu, Q., Xu, X., Yang, X., Ye, Y. and Zhang, J.** (2008) Development of an immobilization and detection method of *Cronobacter sakazakii* from powdered infant formula. *Food Microbiol* **25**, 648–652.
- Zimmerman, J., Schmidt, H., Loessner, MJ, Weiss, A.** (2014) Development of a rapid detection system for opportunistic pathogenic *Cronobacter* spp. in powdered milk products. *Sep*; **42**:19-25.

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı: Ülkü DEMİRCİ

İletişim Bilgileri

E-posta: ulkudemirci@hotmail.com / ulkudemirci@arel.edu.tr

Doğum Tarihi: 04.01.1984

Ünvanı: Öğretim Görevlisi

Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Hacettepe Üniversitesi	2007
Lisans-Erasmus	Global Nutrition and Health	Metropolitan University College	2008
Yüksek Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Haliç Üniversitesi	2012
Doktora	Multidisipliner Gıda Güvenliği ve Beslenme	İstanbul Aydın Üniversitesi	2018

Görevler

- **Öğretim Görevlisi**, *İstanbul Arel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü*, 2015-
- **Uzm. Diyetisyen**, *Özel SCULPTURE Nişantaşı Polikliniği*, 2013-2015
- **Diyetisyen**, *Memorial Hastanesi*, 2009-2011
- **Diyetisyen**, *RAFİNERA, Kişiyeye Özel Beslenme Alternatifleri*, 2008-2009

Seminer ve Sempozyum Katılımı

- Gıda, Metabolizma ve Sağlık: Biyoaktif Bileşenler ve Doğal Katkılar Kongresi, (İstanbul Teknik Üniversitesi), 2016
- Klinik Beslenme Günleri I, Beslenme ve Moleküler Mekanizmalar, (Biruni Üniversitesi), 2016
- Bilimsel Araştırma Yöntemleri, (İstanbul Aydın Üniversitesi), 2015

- İstanbul Sağlık ve Beslenme Bienali, 9-12 Şubat 2012, Sheraton Hotel, Maslak
- TFF Sağlık Eğitim Programı, Sağlık Ekipleri Çalışanları, Futbolcu Beslenmesi Diyetisyen Eğitim Programı-Haziran 2010 (Bu konuda sertifika alan 18 diyetisyenden biriyim)
- 7. Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi ve “Bebek ve Çocuk Beslenmesi Kursu” 2010 İstanbul
- Sporda Beslenme Stratejileri Sempozyumu 2009, İstanbul
- Türkiye Diyetisyenler Derneği – ILSI North America, Uluslararası Sıvı Tüketimi ve Sağlık Konferansı, 2009, İstanbul
- ”Metabolik Sendromda Tıbbi Beslenme Tedavisi” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Nutrigenetik ve Kanser” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Toplu Beslenme Sistemlerinde Stratejik Planlama 1 ve 2” Konulu Seminerler (Hacettepe Üniversitesi)
- “Hastanelerde HACCP Uygulamaları” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Çocuk Beslenmesinde Ek Besinler” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Obezitede Diyet Planlama İlkeleri” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Diyabet ve Egzersiz” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Yaşlılık ve Diyabet” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Yüksek Performansta Beslenme” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Takım Diyetisyenliği” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Sağlıklı Beslenmeye Çevresel Engeller” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Kültürler ve Beslenme, Besin Fadizmi” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Diyetisyenlik Mesleğinin Gelişimi” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Nutrigenetik” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Diyabette Tıbbi Beslenme Tedavisi” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)
- “Dağcılık ve Beslenme” Konulu Seminer (Hacettepe Üniversitesi)

Son iki yılda verdiği dersler

Akademik	Dönem	Dersin Adı	Haftalık Saati		Öğrenci
Yıl			Teorik	Uygulama	Sayısı
2015-2016	Güz	Genel Mikrobiyoloji	0	2	45
2015-2016	Güz	İş Yerinde Uygulama I	2	24	14
2015-2016	Güz	Dönem Projesi I	3	2	6
2015-2016	Güz	Beslenme Eğit. ve Danş.	2	0	71
2015-2016	Bahar	Dünya Mutfakları	3	0	65
2015-2016	Bahar	Beslenme Giriş	2	0	97
2015-2016	Bahar	İş Yerinde Uygulama II	2	16	39
2015-2016	Bahar	Dönem Projesi II	3	2	39
2016-2017	Güz	Beslenme Biyokimyası I	3	0	66
2016-2017	Güz	Dönem Projesi I	3	2	65
2016-2017	Güz	İş Yerinde Uygulama I	2	16	55
2016-2017	Güz	Beslenme İlkeleri	3	2	97
2016-2017	Bahar	Beslenme Biyokimyası II	3	0	66
2016-2017	Bahar	Dönem Projesi II	3	2	65
2016-2017	Bahar	İş Yerinde Uygulama II	2	16	55
2016-2017	Bahar	Beslenme İlkeleri	3	2	97
2016-2017	Bahar	Beslenmeye Giriş	2	0	97

