



Advies 28-2004: Risico's verbonden aan Enterobacter sakazakii. (dossier Sci Com 2004/09)

Het Wetenschappelijk Comité van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen geeft het volgende advies:

Referentietermen

De Gedelegeerd Bestuurder van het FAVV heeft aan het Wetenschappelijk Comité een aantal vragen gesteld in verband met risico's verbonden aan Enterobacter sakazakii in zuigelingenvoeding.

Vraag 1

Binnen hoeveel tijd moet de bereide zuigelingenvoeding gekoeld worden en tot op welke temperatuur om het risico op besmetting zo klein mogelijk te houden?

Vraag 2

Hoelang mag bereide zuigelingenvoeding bewaard worden in de koelkast en bij welke temperatuur ?

Vraag 3

Hoelang mag bereide zuigelingenvoeding op temperatuur (bain-marie) gehouden worden voor toediening aan de zuigeling?

Vraag 4

Hoelang mag toediening van zuigelingenvoeding in beslag nemen en bij welke temperatuur ?

Vraag 5

Is het toegestaan om tijdens dezelfde maaltijd de bereide zuigelingenvoeding nogmaals op te warmen ?

Algemene beschouwingen

Enterobacter sakazakii is een zeldzame maar bekende oorzaak van neonatale sepsis en een ernstig verlopende vorm van meningitis (Van Acker et al., 2001)¹ met een mortaliteit van 10 tot 80 % (Peter et al., 1999; Agostini et al., 2004). Verschillende infecties zijn in verband gebracht met de consumptie van zuigelingenvoeding. Het Wetenschappelijk Comité heeft een

¹ Een referentielijst is opgenomen in de bijlage van het advies.

studie van de wetenschappelijke literatuur uitgevoerd met het oog informatie te verwerven omtrent de prevalentie, de mogelijkheden tot groei en overleving en de risico's verbonden aan het voorkomen van *E. sakazakii* in zuigelingenvoeding.

Contaminatieniveau van melkpoeders

Momenteel zijn in de EU geen criteria beschikbaar voor *E. sakazakii* in melkpoeder. Wel wordt gesteld dat in melkpoeder coliformen moeten afwezig zijn in 0.1 g ($< 10/g$) (EU wetgeving). The FAO "code of practice" eist < 3 coliformen per g in minimum 4/5 monsters met maximum $1/5 > 3$ maar ≤ 20 coliformen per g. Verschillende firma's hanteren voor vrijgave van melkpoeder een criterium van afwezigheid van *E. sakazakii* per 10 g (Iversen en Forsythe, 2003).

Het productieproces van melkpoeder bestaat uit een aantal verschillende stappen nl. ontvangst en selectie van rauwe melk, clarificatie, koeling, opslag rauwe melk, standaardisatie, hittebehandeling, evaporatie, homogenisatie, sproeidrogen en verpakken en opslag. Enterobacteriaceae zullen bij een procesuitvoering onderworpen aan het verplicht autocontrolesysteem het productieproces van melkpoeder niet overleven. Deze groep van micro-organismen is echter dikwijls aanwezig in de omgeving van het productieproces. *E. sakazakii* werd teruggevonden in de productieomgeving van vier fabrieken die melkpoeder produceerden, maar *Enterobacter* werd ook teruggevonden in de productieomgeving van fabrieken die ontbijtgranen, chocolade en pasta produceerden (Kandhai et al., 2004).

E. sakazakii blijkt resistenter te zijn dan andere Enterobacteriaceae tegenover drogen wat de persistentie van dit micro-organisme in deze fabrieksomgeving kan verklaren (Breeuwer et al., 2003).

Deze micro-organismen kunnen uiteindelijk in het afgewerkte product (melkpoeder) terechtkomen als er post-procescontaminatie optreedt.

Enterobacteriaceae werden geïsoleerd uit 52% van 141 productmonsters zuigelingenvoeding afkomstig van 35 landen. De species die het meest geïsoleerd werden zijn *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii* en *Klebsiella pneumoniae*. In geen enkel product was de concentratie hoger dan 1 kve/g en in 78% van alle positieve productmonsters was de concentratie 1 kve/100g of lager, en dus binnen de huidige wettelijke bepalingen. De hoogste concentratie die werd vastgesteld was 92 kve/100g (*Enterobacter cloacae*) (Muytjens et al., 1988). Door Nazarowec-White en Farber (1997) werden 8 van de 120 onderzochte monsters melkpoeder positief bevonden voor *E. sakazakii* waarbij het niveau max 1 kve per 100g bedraagt. In melkpoeder geassocieerd met een *E. sakazakii* infectie werd een initieel contaminatieniveau van 4 kve/100 g (zie proces-verbaal) tot 8 kve/100g vastgesteld (Iversen en Forsythe, 2003).

Minimum temperatuur voor groei

De minimale temperatuur voor groei van 10 geteste isolaten varieert tussen 5,5°C tot 8°C. Gedurende bewaring bij 4°C zal het micro-organisme langzaam afsterven. De gemiddelde generatietijd in de studie van Nazarowec-White en Farber (1997) was 40 minuten (0,67h) bij 23°C en 4,98h bij 10°C. De lag-fase bij 10°C bedroeg gemiddeld 32,8h (met een minimum van 18,96h) en bij 23°C gemiddeld 2,76h (met een minimum van 1,76h). Deze waarden zijn laag in vergelijking met de waarden van andere Enterobacteriaceae. De lag-fase werd bepaald met stammen gekweekt onder optimum laboratoriumcondities. Er werd hierbij geen rekening gehouden met een eventuele verlenging van de lag-fase ten gevolge van voorafgaandelijke blootstelling aan stressomstandigheden (vb. dehydratatie in melkpoeder).

Iversen en Forsythe (2003) en Iversen et al. (2004) rapporteerden generatietijden van 13,6h; 2,9h; 1,3h en 0,5h bij respectievelijk 10°C; 18°C; 21°C en 37°C.

Hoewel er telkens slechts lage hoeveelheden *E. sakazakii* worden teruggevonden in melkpoeder kan dit organisme door zijn relatief korte lag-fase en generatietijd redelijk vlug uitgroeien in gerehydrateerd melkpoeder wanneer dit niet bij de juiste temperatuur wordt bewaard.

Hitteresistentie

Wat betreft hiteresistentie zijn er uiteenlopende rapporteringen.

Door Nazarowec-White en Farber (1997) werden D-waarden vermeld van 4,20 minuten bij 58°C en 2,50 min bij 60°C.

Recent toonden Breeuwer et al. (2003) aan dat *E. sakazakii* niet uitzonderlijk thermotolerant was maar wel geadapteerd is aan osmotische stress en droogte. De D-waarde bij 58°C bedroeg 0,39-0,60 minuten.

Door Edelson-Mammel en Buchanan (2004) werden D-waarden vastgesteld bij 58°C in gerehydrateerd melkpoeder voor diverse stammen van *E. sakazakii* die uiteenlopen van 30,5 sec tot 591,9 sec (9,86 min) waarbij twee fenotypes met betrekking tot hiteresistentie werden vastgesteld. Voor de meest hiteresistente stam werd een z-waarde van 5,6°C vastgesteld. Wanneer rehydratatie van melkpoeder werd uitgevoerd met water van minimum 70°C werd voor deze stam ook een 4-log reductie vastgesteld. Rehydrateren met water bij verhoogde temperatuur kan aldus een beheersmaatregel zijn maar het is niet duidelijk of dit eventueel de nutritionele waarde niet beïnvloedt. Tevens moet in dit geval ook gezorgd worden dat de bereide zuigelingenvoeding voldoende wordt afgekoeld voor toediening om te voorkomen dat de zuigeling zich verbrandt.

Op basis van de bepaling van de thermotolerantie van *E. sakazakii* kon afgeleid worden dat de decimale reductietijd van de pathogeen bij 71,2°C 0,7 seconden bedraagt en aldus de standaard hoge temperatuur, korte tijd pasteurisatie (HTST) van 15 seconden bij 71,7°C zal resulteren in ca. 21 log reductie (Iversen et al., 2004).

Infectieve dosis

De manifestatie van de ziekte in neonatale infecties is ernstig. Vooral premature pasgeborenen zijn vatbaar en kunnen sterven als gevolg van de infectie. Een sterftcijfer tot 40 en zelfs 80% wordt vermeld. Er is geen enkele literatuurbron die de mechanismen van pathogeniciteit of de mogelijke virulentiefactoren van *E. sakazakii* beschrijft. *E. sakazakii* zou bepaalde enterotoxines produceren. De pathogeniciteit bij muizen werd eveneens aangetoond bij proeven waarbij *E. sakazakii* aan muizen oraal (10^7 cellen bij 2 van de 18 stammen, $> 10^8$ bij de overige stammen nodig voor infectie) of intraperitonaal (10^5 cellen bij 2 van de 18 stammen nodig voor infectie) werden toegediend (Pagotto et al., 2003). Het is echter niet duidelijk hoe deze proeven bij muizen moeten geïnterpreteerd worden in termen van infectieve dosis bij zuigelingen. Het is wel duidelijk dat verschillende stammen van *E. sakazakii* zullen verschillen in pathogeniciteit en infectieus vermogen.

Er is in de literatuur geen rapportering omtrent de infectieve dosis van *E. sakazakii*.

Bij het opstellen van een risicoprofiel voor *E. sakazakii* door Iversen en Forsythe (2003) werd een infectieve dosis verondersteld van 1000 cellen (naar analogie met *E. coli* O157 en *Listeria monocytogenes*) maar met betrekking tot deze veronderstelling werd de volgende commentaar en aanvulling geleverd door Havelaar en Zwietering (2004).

- Op basis van een studie van Nazarowec-White en Farber (1997) waarbij de concentratie gemiddeld 0.36 cellen per 100g bedraagt (of 0.065 cellen per fles bereid met 18 g melkpoeder) werd berekend dat in dit geval 6.5% van de flesjes gecontamineerd zal zijn

met maximum 1 cel (kleine kans van 0.2% dat één flesje 2 cellen bevat werd verwaarloosd).

- Wat betreft de infectieve dosis die op 1000 cellen werd verondersteld werd de opmerking gemaakt dat een infectieve dosis nooit een absolute grens is maar er eerder sprake is van een dosis-respons curve waarbij werd verondersteld dat ook één cel theoretisch een heel kleine kans op infectie zou hebben. Deze kans werd berekend op basis van een model dat werd opgesteld waarbij de auteurs veronderstellen dat 1000 cellen de dosis is die bij 50% van de blootgestelde personen infectie veroorzaakt en hieruit bleek dat de kans op infectie voor 1 cel dan 7×10^{-4} zou bedragen.
- Zelfs indien geen groei zou optreden tijdens bereiding en bewaring en dus enkel 1 cel aanwezig zou zijn dan zou de kans op infectie bij consumptie van een ad random genomen flesje volgens de auteurs gelijk zijn aan $0.065 \times 7 \times 10^{-4} = 5 \times 10^{-5}$ (= basisrisico zonder uitgroei van de pathogeen). Dit risico is redelijk hoog terwijl in praktijk het aantal gerapporteerde gevallen van *E. sakazakii* zeer laag is. Dit laat uitschijnen, zo vermelden Havelaar en Zwietering, dat de door hen gemaakte veronderstelling omtrent het dosis-respons curve model van *E. sakazakii* niet klopt met de realiteit en dit waarschijnlijk aanduidt dat het infectief karakter van *E. sakazakii* (voor één enkele cel) helemaal niet zo hoog is. Zij verwijzen daarbij ook naar de waarneming van Pagotto et al. (2003) waarbij lethale infecties waarbij *E. sakazakii* aan muizen oraal werd toegediend slechts optreden bij ingestie van 10^7 cellen bij 2 van de 18 stammen en $> 10^8$ nodig is voor infectie bij de overige stammen.

Op basis van de bovenvermelde literatuurgegevens en naar analogie met de conclusie van Iversen et al. (2004) wordt er verondersteld dat het weinig waarschijnlijk is dat de geringe hoeveelheden van *E. sakazakii* die in melkpoeders worden aangetoond een infectie kunnen veroorzaken. Langdurig bewaren van in water opgelost melkpoeder op kamer- en/of drinktemperatuur is evenwel de ideale groeibodem voor *E. sakazakii*. Het gebruik van fles(sen)verwarmers om de klaargemaakte voeding langdurig op temperatuur te houden moet bijgevolg vermeden worden. Een Duits artikel maakt in dit verband de aanbeveling om bereide zuigelingenvoeding niet langer dan 4 uren bij kamertemperatuur te bewaren (Koletzko, 2004). Bewaring in de koelkast en pas kort voor gebruik op temperatuur brengen is een betere methode.

Het gebruik van kant- en klare commercieel steriele vloeibare voeding vormt een alternatief maar het betreft hier de vraag of dit nutritioneel evenwaardig is (zie verslag van de HGR op website http://www.health.fgov.be/CSH_HGR/Nederlands/inhoud.htm). Bovendien zijn slechts een minderheid van de voedingen in vloeibare vorm beschikbaar.

Antwoord op de vragen

Vraag 1

De tijd en temperatuur van bereiding van de zuigelingenvoeding heeft niet zozeer invloed op het risico op besmetting (wel de hygiënische maatregelen genomen) maar de tijd en temperatuur van bereiding hebben wel een invloed op het risico voor groei van *E. sakazakii* indien aanwezig in het melkpoeder aangewend voor bereiding. De wijze van bereiding heeft wel een invloed op het risico op besmetting. Bereiding moet gebeuren door goed opgeleid personeel dat kennis heeft van het feit dat melkpoeder niet absoluut steriel is en een mogelijks lage besmetting (< 1 kve per 10g) met *E. sakazakii* kan aanwezig zijn. Bij bereiding moeten

de nodige hygiënische maatregelen in acht worden genomen en de punten van aandacht of kritische punten in de melkkeuken moeten gekend zijn en beheerst worden in overeenstemming met de HACCP principes zoals tevens van toepassing voor “grootkeukens”. Wat betreft groei van *E. sakazakii* tijdens bereiding wordt verondersteld dat melkpoeder wordt gerehydrateerd bij kamertemperatuur met water bij kamertemperatuur (de exacte temperatuur van bereiding verschilt van poeder tot poeder afhankelijk van de oplosbaarheid). Er wordt verondersteld dat het melkpoeder voldoet aan de minimum norm (*E. sakazakii* afwezig per 10g) zodat er gezien de geringe hoeveelheid melkpoeder die gehanteerd wordt voor de bereiding van flessenvoeding voor zuigelingen (15-40g) een begincontaminatie per flesje van ca. 1-2 cellen wordt verondersteld. Vervolgens wordt ook aangenomen dat na bereiding direct wordt gekoeld en niet wordt opgewarmd tot 37°C (opwarmen wordt behandeld in vraag 3). Gezien de lag-fase bij kamertemperatuur (23°C) gemiddeld 2,76h bedraagt (minimum 1,76h), de generatietijd gemiddeld 40 minuten en de minimum groeitemperatuur 5,5°C-7°C wordt aanbevolen de bereide zuigelingenvoeding binnen maximaal 2h te koelen tot 5°C. De gehanteerde generatietijden en lag-fases zijn gebaseerd op literatuurgegevens die betrekking hebben op stammen die voorafgaandelijk onder optimale laboratoriumcondities werden opgekweekt en het is inderdaad zo dat gestresseerde bacteriën een aanzienlijke verlenging van hun lag-fase kunnen vertonen. De waarden uit de literatuur hanteren aldus een “worst case” scenario.

Vraag 2

Gezien groei bij < 5,5°C niet mogelijk is, is er geen probleem de bereide zuigelingenvoeding na bereiding en koeling binnen de 2h tot 5°C te bewaren bij de maximale vermelde koeltemperatuur van 5°C.

Eventueel transport van bereide zuigelingenvoeding dient gekoeld te gebeuren.

In het buitenland wordt een maximum bewaartijd van zuigelingenvoeding (bereid via gereconstitueerd melkpoeder) aangeraden van 24h. Dit wordt vermeld in een Nederlands (‘Handhavingsactie *Enterobacter sakazakii* in zuigelingenvoeding’, Heuvelink et al., 2003, hoofdstuk Risicomanagement in Nederlandse ziekenhuizen) en een Canadees (‘Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*’, JAMC juni 2002, 166 (12), Canadian Medical Association Erica Weir) rapport.

Vraag 3

Verondersteld wordt dat de temperatuur van de “bain-marie” (of equivalente verwarmingsmogelijkheid) voor opwarmen van de bereide zuigelingenvoeding voor toediening aan de zuigeling 37°C betreft. Gezien bij 37°C geen lag-fase wordt verondersteld en de gemiddelde generatietijd 30 minuten betreft (er wordt aangenomen dat omwille van variatie tussen stammen zoals vastgesteld bij 23°C de minimum generatietijd 20 minuten betreft) dan betekent dit dat 30 minuten bij 37°C maximaal aanleiding geeft tot 1 à 2 vermenigvuldigingen. De beginconcentratie in een fles bereide zuigelingenvoeding wordt maximaal ca. 1-2 cellen geacht (zie vraag 1) want tijdens bereiding en opslag in de koeling wordt geen groei verondersteld indien uitgevoerd onder de condities vermeld in vraag 1. Dus de aantallen *E. sakazakii* na 30 minuten zouden 4 tot 8 cellen per flesje zuigelingenvoeding bedragen. Beperkend om deze vraag 3 te beantwoorden is de kennis van de infectieve dosis van *E. sakazakii* (1000 cellen?). Voor een premature neonaat zou de infectieve dosis echter nog lager kunnen liggen, bvb. 100 cellen. Om voldoende veiligheid met deze onzekerheid betreffende infectieve dosis in te bouwen wordt geadviseerd om het houden van bereide zuigelingenvoeding in een bain-marie op 37°C te beperken tot 30 minuten.

Vraag 4

Deze vraag wordt impliciet reeds beantwoord in vraag 3. Bij het toedienen van de zuigelingenvoeding zal de temperatuur van de zuigelingenvoeding schommelen tussen 37°C en kamertemperatuur (23°C) met generatietijden die respectievelijk zullen schommelen tussen 30-40 minuten. Opnieuw wordt geadviseerd om voldoende veiligheid te garanderen en de tijd van toediening te beperken tot 30 minuten waarbij maximum 1 vermenigvuldiging zal optreden.

In acht name van Vraag 3 en 4 samen zouden er dan in het slechtste geval 3 vermenigvuldigingen plaatsvinden (bv. van 1-2 cellen tot 8 à 16 cellen, een toename van ca. 1 log-eenheid) tijdens bereiden, warm houden en toedienen van bereide zuigelingenvoeding, een totaalproces dat maximum 1h in beslag neemt.

Op voorwaarde dat er maar 1h verloopt vanaf de opwarming van het gerehydrateerd melkpoeder tot 37°C tot het einde van de maaltijd is er een redelijke marge tussen aantal uitgegroeide *E. sakazakii* cellen (8 tot 16 cellen) en de infectieve dosis (100 tot 1000 cellen?).

Vraag 5

De terminologie “nogmaals opwarmen” zorgt voor verwarring en is niet wenselijk daar men in praktijk niet steeds de toegestane totale maximale periode bij 37°C van 1 h (zoals afgeleid uit combinatie van vraag 3 en 4) bij een dergelijke praktijk van opwarming, eerste toediening, heropwarmen en tweede toediening kan controleren. Wat eventueel kan bedoeld worden met vraag 5 is “mag de bereide zuigelingenvoeding warm gehouden worden?”. Dit verwijst echter opnieuw naar de antwoorden op vraag 3 en 4 waar gesteld wordt dat vanaf de opwarming van het gerehydrateerd melkpoeder tot 37°C tot het einde van de maaltijd maximaal 1 h mag verstreken zijn.

Opmerkingen

Opmerking 1

Door het opvolgen van de richtlijnen voorgesteld in dit advies zal men het risico op neonatale *E. sakazakii*-infecties virtueel uitschakelen. Dit geldt evenwel enkel op voorwaarde dat men een productienorm van afwezigheid van *E. sakazakii* per 10g melkpoeder, die niet wettelijk verplicht is, respecteert.

Opmerking 2

In het kader van dit advies is het interessant te verwijzen naar de besluiten van de FAO/WHO workshop “Enterobacter sakazakii and other microorganisms in Powdered Infant Formula”, Genève, February 2004

(<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/feb2004/en>).

Naast andere aspecten, stelt het Wetenschappelijk Comité o.a. dat

- het gebruik van commercieel steriele vloeibare kant en klaar formuleringen van zuigelingenvoeding of formuleringen die een effectieve hittebehandeling hebben ondergaan (bvb. door rehydratie met voldoende warm water of door voldoende verhitting van het gerehydrateerd melkpoeder) is aanbevolen voor zuigelingen met

verhoogd risico voor infectie met *E. sakazakii* (prematuren, zuigelingen waarvan de moeder met AIDS besmet is);

- de voedingsindustrie moet aangemoedigd worden om :
 - 1° een grotere range van commercieel beschikbare kant- en klare melken te produceren en
 - 2° effectieve environmental monitoring in de productiesites uit te voeren;
- in de “code of practice” van de Codex Alimentarius meer rekening moet gehouden worden met de microbiologische risico’s van melkpoeder en dat eventueel overwogen moet worden adequate specificaties voor *E. sakazakii* toe te voegen.

Opmerking 3

In het huidige advies wordt de problematiek van de enterale voedingslijnen niet besproken. Deze komen wel aan bod in de 2 buitenlandse rapporten met de volgende richtlijnen:

- In een Nederlands rapport (‘Handhavingsactie Enterobacter sakazakii in zuigelingenvoeding’, Heuvelink et al., 2003, hoofdstuk Risicomanagement in Nederlandse ziekenhuizen): Beperk de verblijfstijd in gevulde reservoirs (en de enterale voedingslijnen) tot een minimum met dien verstande dat een periode van 8 uren niet wordt overschreden.
- In een Canadees rapport en in een aanbeveling van de FDA (<http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>) wordt aangeraden de tijd dat de voeding op kamertemperatuur wordt gehouden in een zak en in de bijhorende leidingen tijdens enterale voeding te beperken met een maximum van 4 uur. Er wordt duidelijk gewaarschuwd om langere tijden te vermijden.

Gezien het Wetenschappelijk Comité niet bekend is met de enterale voedingswijze en de normale toedieningstijd van dit proces is het wenselijk dit gegeven voor te leggen aan bevoegde experts.