

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Marija M. Stojanović

**Izolacija i karakterizacija *Cronobacter sakazakii* iz
formula za odojčad i iz biljnih čajeva**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Marija M. Stojanović

Isolation and characterization of *Cronobacter sakazakii* from power infant formula and herbal teas

PhD thesis

Belgrade, 2014

MENTOR

prof. dr Vera Katić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd,

Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica

ČLANOVI KOMISIJE

- 1. prof. dr Vera Katić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine,
Beograd, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica**
- 2. dr Dragana Jošić, naučni savetnik, Institut za zemljište, Beograd, Odeljenje
genetike**
- 3. dr Nada Šmigić, docent, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Katedra za
upravljanje bezbednošću i kvalitetom hrane**

Zahvaljujem se mojoj profesorki i mentorki prof. dr Veri Katić koja je bila uz mene sve ove godine i koja je umela da izazove u meni uvek novi početak, trud i želju da nastavim i završim ovaj rad. Bez njenog velikog poverenja, rada, zalaganja i smirenosti ne bi moglo da se uokviri sve što je sada u sadržaju ovog rada.

Zahvaljujem se dr Dragani Jošić koja mi je pokazala osnove molekularnih metoda, koja mi je omogućila da uradimo deo eksperimentalnog rada i koja je nesebično prenela svoja znanja i iskustvo i time doprinela da se ovaj rad privede kraju.

Zahvaljujem se dr Nadi Šmigić, mojoj drugarici, na velikoj pomoći kad je bila najpotrebnija, na lepim rečima i osmehu koji pokreće.

Sa velikim zadovoljstvom želim da se zahvalim direktoru Željku Huljevu, kao i celom kolektivu Centra za ispitivanje namirnica, koji su verovali u mene sve ove godine i koji su pružili bezgraničnu pomoć i omogućili sprovođenje svih faza ovog doktorata. Posebno ističem značaj mojih „bakterija“ iz mikrobiološkog odeljenja: koje su bile tu za mene i pružile podršku, pomoć, pa čak bile i moja fizička zamena i koje su deo ovog rada... Mojim koleginicama Jeki i Makici koje su bile tu i udisale zajedno razne „mirise“ predobogaćenja i obogaćenja svih ovih čajeva. Dani i ostalim koleginicama koje su me primile u odeljenje i naučile me najdivnije mikrobiološke tajne koje su me potpuno opčinile.

Mojim prijateljima hvala na veri i podstreku u teškim trenucima koje smo zajedno prošli, koji su bili uz mene i koji su me tolerisali, nasmejivali, izvodili, navodili...

Hvala Mami i Ani što su moje, hvala za svu ljubav bez koje ne bi bila ja.

Mojim najdražima Goranu i Vukašinu, što su tu, uvek i sada.

Ovaj rad posvećujem mom tata Miletu, bez koga ničeg ne bi bilo.

Tata Miletu

Apstrakt

Cronobacter sakazakii je patogeni mikroorganizam poreklom iz hrane koji je jako privukao pažnju celokupne javnosti i prehrambene industrije, jer može da izazove smrtne posledice kod odojčadi. Osnovni izvor infekcije su formule za odojčad u prahu u kojima ova bakterija može da se održava duže vreme zbog specifičnih osobina, kao što su: otpornost na nisku a_w , termorezistentnost, otpornost na promene pH, visoku osmotsku koncentraciju i sposobnost stvaranja egzopolisaharida.

Cilj ovog rada je bio da se istraži prisustvo *Cronobacter sakazakii* u formulama za odojčad i biljnim čajevima koji se po tradiciji koriste u lečenju svih rizičnih grupa, uključujući novorođenčad, imunokompromitovanu odojčad i odrasle i da odrede genotipske karakteristike izolata *Cronobacter sakazakii*.

Ispitano je 360 uzoraka mleka za odojčad i 520 uzoraka čaja različitog porekla, a posebna pažnja posvećena je čajevima za decu i odojčad, kao i biljnim čajevima koji se prelivaju vodom ispod 72°C. Za izolaciju *Cronobacter sakazakii* je korišćena standardna metoda ISO/TS 22964. Fenotipizacija izolata *Cronobacter sakazakii* je urađena primenom komercijalnog testa API 20E.

U okviru genetičkih istraživanja izvršen je izbor reprezentativnih izolata i selekcija metoda za izolaciju DNK. Fragmenti DNK su umnožavani metodom lančane reakcije polimeraze - PCR. Ova *in vitro* tehnika korišćena je za: 1. amplifikaciju različitih delova genoma koji obezbeđuju DNK fingerprinting (rep-PCR i RAPD) i 2. amplifikaciju ciljne sekvence (16S rDNA). Za razdvajanje umnoženih fragmenata DNK molekula na osnovu njihove veličine i naelektrisanja korišćen je metod gel-elektroforeze. Koncentraciju agaroze i uslove pod kojima je rađeno elektroforetsko razdvajanje je prilagođeno broju i veličini fragmenata DNK. Za analizu diverziteta korišćena je rep-PCR metoda sa specifičnim sekvencama - repetitivnim elementima DNK: ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) i BOX elemenata. Pri ERIC amplifikaciji korišćen je set prajmera ERIC 1R/2. U okviru BOX tipa rep-PCR korišćen je (GTG)₅ prajmer (de Bruijn, 1992). Amplifikacija 16S rDNA izvršena je univerzalnim prajmerima fd1/rD1 i amplifikovani fragmenti su prečišćeni i sekvencirani (Weisburg et al, 1991).

Termorezistentnost *Cronobacter sakazakii* izolovanih iz biljnih čajeva, koji se u pripremi prelivaju hladnom vodom, je ispitana u čaju pripremljenom sa vodom zagrejanom na

temperaturu 60 °C i 72 °C, kao i ključalom vodom. Postojanost izolata *Cronobacter sakazakii* u već napravljenim čajevima, koji se drže na sobnoj temperaturi (22-24°C) ispitana je posle 48 i 72 sata, a u uzorcima čaja držanim pri temperaturi frižidera (4°C) ispitana je posle 7, 14 i 21 dana.

Reprezentativni izolati *Cronobacter sakazakii* su ispitani dalje genetskim metodama. Na osnovu rep-PCR metoda ispitana je sličnost sa referentnim sojevima: *Cronobacter sakazakii* NCTC 8155- klinički izolat iz grupe najpatogenijih i *Cronobacter muytjensii* ATCC 51329, manje patogenosti.

Primenom standardne metode ni iz jednog od 360 uzoraka hrane za odojčad u prahu nije izolovan *Cronobacter* spp. U 193 (38%) ispitana čaja je potvrđeno prisustvo *Cronobacter sakazakii*, a od 127 uzorka „bebi“ čaja, iz 56 (44%) je izolovan *Cronobacter sakazakii*, a od 81 uzorka raznih mešavina napravljenih za imunokopromitovane grupe, 31 (38%) je bilo pozitivno na prisustvo *Cronobacter sakazakii*.

Za ispitivanje uticaja temperature na rast *Cronobacter sakazakii* korišćeni su sojevi M3 i K2 (iz belog sleza), S8 (iz bebi čaja) i S11 (izolovan iz mešavine biljaka koja je preporučena da se koristi za gastrointestinalne probleme). Najveće smanjenje broja je postignuto dejstvom ključale vode u vremenu od 2 minuta. Svi ispitivani izolati su preživeli 21 dan na temperaturi frižidera. Rezultati održivosti ove bakterije u biljnim čajevima namenjenim za odojčad i osobe sa oslabljenim imunitetom, mogu se koristiti u proceni rizika od infekcije *Cronobacter sakazakii* putem čajeva.

U okviru rep-PCR izvršene su ERIC i BOX-PCR analize. Upotrebom (GTG)₅ prajmera za BOX-PCR i seta prajmera ERIC 1R/2 dobijeni su reproducibilni profili izolata, a na osnovu njihovog poređenja izolati su grupisani u 3 grupe. Referentni soj R1- *Enterobacter (Cronobacter) muytjensii* ATCC 51329 na osnovu BOX-PCR svrstan je u istu grupu sa izolatima S5 (iz biljnih mešavina) i S6 (iz biljnih mešavina), a na osnovu ERIC u istu grupu sa izolatima M2, poreklom iz sene. Na osnovu zbirne rep-PCR analize, ovaj referentni soj se izdvojio od svih ispitivanih izolata i referentnog soja R2- *Cronobacter sakazakii* NCTC 8155. Ustanovljena razlika je veća od 58%. Najveći procenat sličnosti (78) sa referentnim sojem R2 ispoljili su izolati S7 i S8, a u istoj grupi, sa oko 76% sličnosti su izolati S2, S3, S10 i S11. Ovi izolati potiču iz biljnih mešavina.

Kombinovanom RAPD analizom profila, dobijenih u pojedinačnim amplifikacijama prajmerima AP10, AP11 i SPH1, izolati su grupisani u 2 grupe. Izolat S10 se izdvojio od

ostalnih i razlikuje se preko 50%. Druga grupa sadrži dve podgrupe međusobno različite 43%. Prva podgrupa obuhvata oba referentna soja, sa visokom stepenom međusobne razlike od 42%, i sve M i K izolate, kao i izolat S6. Druga podgrupa obuhvata sve S izolate, osim pomenutih S10 i S6. Izolati M1 i M2 pokazali su najviši procenat sličnosti referentnom soju R2 (83) prema rezultatima zbirne RAPD analize.

Većina ispitivanih izolata iz biljnih čajeva na osnovu rep-PCR i RAPD analize pokazali su veću sličnost sa referentnim izolatom *Cronobacter sakazakii* NCTC 8155, koji je jedan od najpatogenijih kliničkih sojeva, izolovan iz mozga novorođenčeta.

Amplifikacija 16S rDNK i njeno sekvenciranje omogućili su precizniju identifikaciju izolata i poređenje sa velikim brojem deponovanih sekvenci za 16S rRNK gene. Na osnovu analize 16S rDNK sekvenci, reprezentativni izolati M1, K2, K5 i S11 identifikovani su kao *C. sakazakii*.

KLJUČNE REČI: *Cronobacter sakazakii*, formule za odojčad, biljni čajevi, RAPD, rep-PCR, fenotipizacija, genotipizacija

NAUČNA OBLAST: Veterinarska medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: Higijena i tehnologija namirnica

UDK BROJ: 614.778:579.63

Abstract

Cronobacter sakazakii is a pathogen originating from food that increased the attention of the general public and the food industry, because it can cause fatal consequences in infants. The main source of infection is powder infant formula (PIF) in which the bacteria can be maintained for a long time due to its specific characteristics, such as resistance to low a_w , thermo resistance, resistance to changes in pH, high osmotic concentration and ability to produce exopolysaccharides.

The aim of this study was to investigate the presence of *Cronobacter sakazakii* in infant formulas and herbal teas that are traditionally used in the treatment of high-risk groups, including infants, immunocompromised infants and adults and to determine the genotypic characteristics of isolates of *Cronobacter sakazakii*.

We examined 360 samples of powder infant formula and 520 herbal tea samples of different origins, particular attention is paid to tea for children and infants, as well as herbal teas that are made with water tempered below 72°C. For the isolation of *Cronobacter*. *Cronobacter sakazakii* a standard method ISO / TS 22964 has been used. *Cronobacter sakazakii* phenotyping was performed using a commercial test API 20E.

In the area of genetic studies representative isolates have been selected and the selection of methods for isolating the DNA had been made. DNA fragments were multiplied using the polymerase chain reaction - PCR. This *in vitro* technique was used to: 1. amplify different parts of the genome that provide DNA fingerprinting (rep-PCR and RAPD) and 2. amplify target sequences (16S rDNA). Gel-electrophoresis was used for the separation of the amplified DNA fragments on the basis of their molecular size and charge. Concentration of agarose and conditions, under which the electrophoresis separation was done, was performed according to number and size of DNA fragments. For the analysis of diversity rep-PCR method was used with specific sequences - repetitive DNA elements: ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) and BOX elements. In ERIC amplification, we used set of primers ERIC 1R / 2. Within the BOX type, rep-PCR was used (GTG)₅ primer (de Bruijn, 1992). Amplification of 16S rDNA was performed using fD1/rD1 universal primers and the amplified fragments were purified and sequenced (Weisburg et al, 1991).

Thermo resistance of *C. sakazakii* strains isolated from herbal tea for children, has been tested in the preparation of a hot water overflow. For that purpose, water was preheated to a temperature of 60°C and 72°C, or boiling water was used. Survival of *C. sakazakii* isolates in ready-to-use tea, which were kept at room temperature (22-24°C), was examined after 48 and 72 hours, and those kept at refrigerator temperature (4°C), had been examined after 7, 14 and 21 days of incubation.

Representative *C. sakazakii* isolates were tested further by genetic methods. Based on the rep-PCR method, the similarity with reference strains was tested: *Cronobacter sakazakii* NCTC 8155 - a clinical isolate one of the most pathogenic isolate, and *Cronobacter muytjensii* ATCC 51329, isolate which is less pathogenic.

Our results indicated that no *Cronobacter* spp. was found in 360 samples of powder infant formula using standard method. The presence of *Cronobacter sakazakii* was confirmed in 193 (38%) tested tea, while in 56 out of 127 (44%) "baby" tea samples was positive for *Cronobacter sakazakii*, and 31 out of 81 (38%) different herbal teas for immunocompromised groups, was positive for presence of *Cronobacter sakazakii*.

The effect of temperature on the growth of *Cronobacter sakazakii* was tested using isolates: M3 and K2 (marshmallow), S8 (isolated from baby tea) and S11 (isolated from a mixture of herbs recommended for gastrointestinal problems). The greatest reduction in numbers was accomplished by the action of boiling water after 2 minutes. Regarding the ability of *C. sakazakii* to survive incubation fridge temperature, all tested samples survived 21 days.

These results related to survival ability of bacteria in herbal teas designed for infants and people with weakened immune systems, can be used to estimate the risk of *Cronobacter sakazakii* infection through tea consumption.

Within rep-PCR ERIC and BOX-PCR analysis were performed. Using (GTG)₅ primer for BOX-PCR and primer set ERIC 1R/2, reproducible profiles of isolates were obtained and isolates were grouped into 3 groups. Reference strain R1-*Enterobacter (Cronobacter) muytjensii* ATCC 51329 based on BOX-PCR was assigned in the same group with isolates S5 (from herb mixture tea) and S6 (from herb mixture tea), but based on ERIC-PCR results, reference strain was in same group with isolates M2, originating from senna herb tea. Based on the summary rep-PCR analysis, this reference strain is separated from all tested isolates and from the reference strain R2- *Cronobacter sakazakii* NCTC 8155, with difference being greater than 58%. The isolates S7 and S8 showed the highest percentage

of similarity (78%) with reference strain R2 , and isolates S2, S3, S10 and S11 were in the same group, with about 76% similarity . These isolates derived from herb mixture.

Combined analysis of RAPD profiles obtained in each primer amplifying AP10, AP11 and SPH1, isolates were grouped into two groups. The isolate S10 is separated from the others, and varies over 50%. The second group consists of two subgroups which are 43% different from each other. The first subgroup includes both reference strains, with a high degree of mutual differences of 42%, and all M and K isolates and S6. The second subgroup includes all S isolates, except the already mentioned S10 and S6. Isolates M1 and M2 showed the highest percentage of similarity with the reference strain R2 (83%) according to the summary of the results of RAPD analysis.

Most of the tested isolates from herbal teas based on rep-PCR and RAPD analysis showed greater similarity to the reference isolate *Cronobacter sakazakii* NCTC 8155, which is one of the most pathogen clinical strain, isolated from the brain of a newborn.

The amplification of 16S rDNA and its sequencing enabled the precise identification of isolates, and comparison with a large number of deposited sequences in 16S rRNA gene. Based on the analysis of 16S rDNA sequences, representative isolates M1, K2, K5 and S11 were identified as *C. sakazakii*.

KEY WORDS: *Cronobacter sakazakii*, powder infant formula, herbal teas, RAPD, rep-PCR, phenotyping, genotyping

SCIENTIFIC FIELD: Veterinary Medicine

FIELD OF ACADEMIC EXPERTISE: Hygiene and Technology of Food

UDK NUMBER: 614.778:579.63

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	PREGLED LITERATURE	3
2.1.	Taksonomija i biohemijske karakteristike	3
2.2.	Klinička etiologija i patogenost	10
2.2.1.	Karakteristike patogenosti	10
2.2.2.	Epidemiološki podaci i prijavljene infekcije	18
2.3.	Antibiotska terapija	25
2.4.	Uticaj temperature na <i>C. sakazakii</i>	27
2.5.	Otpornost na promene pH vrednosti	30
2.6.	Lipid A	31
2.7.	Opstanak <i>C. sakazakii</i> u mleku u prahu za prehranu odojčadi	31
2.8.	Formiranje biofilma	34
2.9.	<i>Cronobacter spp.</i> u životnoj sredini i hrani	35
2.9.1.	<i>Cronobacter sakazakii</i> u formuli za odojčad u prahu - način kontaminacije	37
2.9.2.	Mere higijene i upravljanja bezbednošću pri proizvodnji početne formule za odojčad u prahu	40
2.10.	Savremen pristup dijagnostifikovanju i identifikaciji sojeva <i>Cronobacter spp.</i>	41
2.10.1.	Osnove PCR- metode lančanog umnožavanja DNK	43
2.10.2.	DNK "fingerprinting" na osnovu PCR	45
2.10.3.	PFGE tipizacija	47
3.	CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	49
4.	MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	50
4.1.	Materijal	50
4.1.1.	Formule za odojčad u prahu	50
4.1.2.	Biljni čajevi	51
4.1.3.	Referentni sojevi	55
4.1.4.	Podloge i reagensi	55
	Podloge za izolaciju i identifikaciju <i>Cronobacter sakazakii</i>	55
	Podloge za izolovanje i određivanje broja <i>Enterobacteriaceae</i>	60
4.1.5.	Reagensi za tipizaciju molekularnim metodama	65
4.1.6.	Oprema	65
4.2.	Metode ispitivanja	66

4.2.1.	Izolovanje i identifikacija <i>C. sakazakii</i> u formulama za odojčad i biljnim čajevima	66
4.2.2.	Izolovanje i određivanje broja <i>Enterobacteriaceae</i> u formulama za odojčad	67
4.2.3.	Ispitivanje promene broja izolovanih <i>C. sakazakii</i> tokom pripreme biljnih čajeva korišćenjem vode različite temperature	68
4.2.4.	Ispitivanje promene broja izolovanih <i>C. sakazakii</i> u biljnim čajevima tokom čuvanja na različitim temperaturama	69
4.2.5.	Određivanje broja <i>C. sakazakii</i>	69
4.2.6.	Molekularne metode identifikacije i karakterizacije <i>C.sakazakii</i>	69
4.2.7.	Kompjuterski program korišćen pri obradi dobijenih rezultata	74
5.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	75
5.1.	<i>C. sakazakii</i> u formulama za odojčad	75
5.2.	Određivanje broja <i>Enterobacteriaceae</i> u formulama za odojčad	75
5.3.	<i>C. sakazakii</i> u biljnim čajevima	76
5.3.1.	Prisustvo <i>C. sakazakii</i> u biljnim čajevima	76
5.3.2.	Promena broja <i>C. sakazakii</i> u biljnim čajevima tokom pripreme čaja (voda temperature 60°C, 72°C i temperature ključanja)	80
5.3.3.	Promena broja <i>C. sakazakii</i> u pripremljenim biljnim čajevima tokom čuvanja na sobnoj temperaturi (23±1°C)	84
5.3.4.	Rezultati ispitivanja promene broja <i>C.sakazakii</i> na temperature frižidera 4±2°C	85
5.4.	Identifikacija i genetička karakterizacija izolata <i>C. sakazakii</i> poreklom iz čajeva	88
5.4.1.	rep – PCR	88
5.4.2.	RAPD	91
5.4.3.	Identifikacija <i>Cronobacter</i> spp. na osnovu 16S rDNK	95
6.	DISKUSIJA	10
	0	
7.	ZAKLJUČCI	111
8.	LITERATURA	112

1. UVOD

Cronobacter sakazakii (do 2007. godine poznat kao *Enterobacter sakazakii*) je patogeni mikroorganizam koji dobija novi značaj poslednjih 10-tak godina i sve se više proučava njegova rasprostranjenost i patogenost. *C. sakazakii* postaje poznat kao bakterija koja može izazvati smrtne posledice. Iako je infekcija ovom bakterijom karakteristična za novorođenčad, od 1990. godine do danas je prijavljeno 8 slučajeva dece starije od 6 meseci i 13 slučajeva zaraženih odraslih osoba (Bar-Oz i sar.2001; Mullane i sar. 2007).

Pangalos (1929) je prijavio neidentifikovanu koliformnu bakteriju koja ima sposobnost da proizvodi žuti pigment, a uzročnik je septikemije novorođenčadi. Urmenyi i Franklin (1961) su prvi izolovali bakteriju roda *Enterobacter* spp. za koju je danas dokazano da je soj *C. sakazakii* koja je izazvala meningitis 1958. godine u St. Albans u Engleskoj. Sledeći put se pominje kao dokazani uzročnik meningitisa kod deteta u Danskoj, posle čega je dete preživelo, ali sa ozbiljnim oštećenima nervnog sistema i mentalnom retardiranošću (Joker i sar., 1965). Sve prijave infekcija u tom periodu u Engleskoj i Danskoj pominju uzročnika epidemija kao „atipični žuto obojen *Enterobacter cloacae*”.

Prvo zabeleženo ime *E. sakazakii* je bilo 1977. godine. *Enterobacter sakazakii* je ime dobio po Japanskom mikrobiologu Richi Sakazaki-iju. *E. sakazakii* se zatim izdvojio sve više od *E. cloacae* zahvaljujući razlikama u strukturi DNK, razlici u produkciji pigmenta, biotipovima i osetljivošću na antibiotike (Farmer i sar.,1980). U pet slučajeva se on opisuje na različite načine, uglavnom kao žuto pigmentisan koliform, Urmenyi i Franklin ga opisuju kao *Bacillus*, ali najčešće kao žuto-pigmentisan *E. cloacae*. Dodatno, NTCC kulture prethodno potvrđene kao *Serratia* i *Chromobacter typhiflavum* su kasnije preimenovane u *E. sakazakii*.

Infekcije čiji je uzročnik *E. sakazakii* se retko prijavljuju, imajući u vidu da je infekcija praćena ili blagim simptomima ili bez njih. Kod dece uzrasta od 3 dana do 4 godine zabeleženo je ukupno 76 slučajeva infekcije, sa 19 smrtnih ishoda (Iversen i Forsythe, 2003). Prijavljeno je 9 slučajeva oboljenja kod odraslih u Sjedinjenim Američkim državama, u osam različitih država. Međunarodna komisija za mikrobiologiju hrane je 2002. godine svrstala *E. sakazakii* zajedno sa bakterijama *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* tipa A i B i *Cryptosporidium parvum*, u grupu izuzetno opasnih bakterija koje se veoma retko javljaju, ali imaju visok stepen smrtnosti posebno kod najosetljivije populacije.

Sve više raste interesovanje za proučavanje karakteristika i patogenosti ove bakterije. Proučavaju se otpornost na dejstvo visoke temperature, rezervoari i rasprostranjenost u spoljašnjoj okolini, patogenost, otpornost na antibiotike, sposobnost stvaranja egzopolisaharida. Metode za izolaciju i identifikaciju se razvijaju i usavršavaju. Pagoto i sar. (2003) su analizirali rizik i pojave infekcija i karakteristične kliničke slike zbog prisustva *C. sakazakii* i dokazali su da pojedini sojevi imaju sposobnost da stvaraju enterotoksine. Svi ostali faktori patogenosti su i dalje nepoznati.

Ispituje se preživljavanje *C. sakazakii* u suvoj i rekonstituisanoj formuli za odojčad. Velika pažnja se obraća i na sposobnost *C. sakazakii* da formira biofilmove, što je posebno opasno u fabrikama za proizvodnju mleka u prahu za ishranu odojčadi. Proučavaju se načini suzbijanja, poboljšavaju se tehnike dezinfekcije, menjaju se dezinficijensi, njihova efektivnost, provera celokupne proizvodnje mleka u prahu za ishranu odojčadi, sve da bi se sprečila pojava infekcija dece, posebno novorođenčadi u inkubatorima, na odeljenju intenzivne nege.

Poreklo *C. sakazakii* kao primarnog uzročnika infekcije u najvećem broju slučajeva nije dokazano. Radovi koji se bave epidemiološkim istraživanjima ističu mleko u prahu za ishranu odojčadi kao osnovni izvor infekcija. Pored ovoga, veliku ulogu ima neodgovarajuća higijena u bolnicama pri pripremi ovog mleka, obzirom da je *E. sakazakii* izolovan sa opreme i pribora (Muytjens i sar., 1983; Biering i sar., 1989; Clark i sar., 1990; Muytjens & Kollee, 1990; Noriega i sar., 1990; Simmons i sar., 1989; Bar-Oz i sar., 2001.).

Raste i zainteresovanost za ispitivanje inaktivacije ovog uzročnika u formuli za odojčad u prahu, pa je ispitivana primena γ zračenja (Lee i sar. 2006 i Osaili i sar. 2007a), dodavanje probiotika (Osaili i sar. 2007b), primena bakteriofaga (Kim i sar., 2007a), primena visokog pritiska u toku proizvodnje formule (Gonzales i sar., 2006), primena naizmjeničnog električnog polja (Perez i sar., 2007) i dodatna toplotna obrada (Edelson-Mammel & Buchanan, 2004c).

Dobrovoljno povlačenje proizvoda sa tržišta prvi put se desilo u Americi, posle čega je Agencija za hranu i lekove propisala primene oštrijih mera higijene u bolnicama ili fabrikama gde se sumnjalo da se pojavio *E. sakazakii* (FDA 2002a, 2002b, 2002c, 2002d).

2. PREGLED LITERATURE

U pregledu literature prikazana su dosadašnja naučna saznanja o strukturnim, fiziološkim, patološkim i epidemiološkim saznanjima vezanim za *Cronobacter sakazakii*.

2.1. Taksonomija i biohemijske karakteristike

C. sakazakii je gram negativna, nesporogena bakterija, koji pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Taksonomija, klasifikacija i nomenklatura porodice *Enterobacteriaceae* je poslednjih godina dinamično menjana zahvaljujući novim serološkim i biohemijskim testovima, kao i razvoju metoda molekularne genetike. Rod *Enterobacter* sadrži 14 vrsta i biogrupa (Farmer, 1995; Kampfer i sar., 2005). Od toga 9 pripada grupi sojeva *Enterobacter cloacae* i *Enterobacter sakazakii* i *E. gergoviae*. Najveći broj infekcija je povezan sa bolničkim infekcijama, posebno nastalim posle operacija. *E. cloacae* je najčešće izolovana patogena bakterija u kliničkoj praksi, kod infekcija koje potiču iz bolničkog okruženja (Hofmanfann i Roggenkamp, 2003). Komplikacije izazvane *E. cloacae* najčešće nastaju kod infekcija pluća i oboljenja kardiovaskularnog sistema. Ova bakterija pokazuje veliku heterogenost i na osnovu 3 različita housekeeping gena (*hsp60*, *rpoB* i *hemB*) definisano je 7 novih vrsta *E. cloacae*, i to: 1. *Enterobacter asburiae*, 2. *Enterobacter cancerogenus* (*Enterobacter taylorie*), 3. *Enterobacter dissolvens*, 4. *Enterobacter hormahaechei*, 5. *Enterobacter kobei*, 6. *Enterobacter ludwigii* i 7. *Enterobacter nimipressuralis*.

Enterobacter gergoviae je bakterija koja je izolovana 1980. godine iz urinarnih infekcija i plućnih infekcija (Brenner i sar., 1980).

Enterobacter sakazakii je izdvojen kao posebna vrsta tek 1980. godine, a do tada je nazivan „žuti *Enterobacter cloacae*“ (Farmer i sar., 1980). *E. sakazakii* pokretljiv, gram-negativan, nesporogen štapić sa peritrihim flagelama, svrstavan je u rod *Enterobacter* iako se od njih dosta razlikovao (Monroe & Tift, 1979; Muytjens i sar., 1983 i Nazarowec-White & Farber, 1997b). Početkom devedesetih godina se smatralo da *E. sakazakii*, za razliku od drugih bakterije iz roda *Enterobacter*, ne feremetiše D-sorbitol i stvara i luči ekstracelularnu deoksiribonukleazu (Farmer i sar., 1980). Međutim, u kasnijim istraživanjima je utvrđeno da neki izolati *E. sakazakii* mogu da fermentišu D-sorbitol (Heuvelink i sar., 2001). *E. sakazakii* je α -glukozidaza pozitivan, što se može videti na podlozi koja sadrži 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (Muytjens i sar., 1984).

Brenner (1980) je predložio da se žuto pigmentisan *E. cloacae* imenuje za novu vrstu, kada je dokazano da su DNK molekuli sojeva koji proizvode žuti pigment manje od 50% homologni sa DNK molekulima ostalih sojeva istog roda. Fenotipska karakterizacija i izučavanje biohemijskih karakteristika, serotipizacija i ispitivanja osetljivosti na antibiotike su u narednom periodu doveli do novih podela izolata koji su svi svrstavani do tada kao žuto pigmentisan *E. cloacae* (Einstein, 1990; Arbeit, 1995; Nazarowec-White i Farber, 1999). Proizvodnja žutog pigmenta je osobina koja se može izgubiti presejavanjem sojeva. *E. sakazakii* nema sposobnost proizvodnje kiseline iz D-adonitola, D-arabitolu, dulcitolu, eritritolu i glicerolu (Farmer i sar., 1980).

Soj *E. sakazakii* ATCC 29544 je bio predmet izučavanja Farmer i sar. (1980), koji su definisali njegove biohemijske osobine: Pozitivne reakcije na Voges-Proskauer, citrat-Simmons, arginin-Moellers, ornitin-Moellers, pokretljivost na 36°C, rast u podlozi sa KCN, produkcija gasa iz D-glukoze, hidroliza eskulina, upotreba acetata, redukcija nitrata u nitrite, pokretljivost na 22°C i reakcija sa toluidin plavim za 5 dana na 25°C i za 3 dana na 36°C. Ovaj soj proizvodi kiselinu iz D-arabinoze, celobioze, *D*-inozitola, laktoze, maltoze, D-manitola, D-manoze, melibioze, *α*-metil-D-glukozida, rafinoze, sukroze, L-ramanoze, trehaloze i D ksiloze (Farmer i sar., 1980). Negativne biohemijske reakcije i testovi koje su naveli Farmer i sar. (1980) bili su: produkcija indola, metil crveno, stvaranje vodonik sulfita, lizin-Moellers, upotreba malonata, hidroliza pektata i razgradnja tirozina. Iversen i Forsythe (2003) navode da reakcija toluidin plavim može da bude pozitivna posle 7 dana. Krieg i Holt (1984) su kasnije dokazali da 10% sojeva *E. sakazakii* ima sposobnost stvaranja indola.

Kada je definisana vrsta, 1980. godine 15 biogrupa je opisano i tada je predpostavljeno da može biti više vrsta umesto jedne *E. sakazakii*. U tabeli 2.2.1. su date biohemijske karakteristike *E. sakazakii* po grupama.

Naknadno je dodata i 16. biogrupa koja je imala 2 izolata (Iversen i sar., 2007).

Tabela 2.1.1. Karakteristike biogrupa *E. sakazakii* (Farmer i sar., 1980).

Biogrupa	Fenotip											
	VP	MR	Nit	Orn	Mot	Ino	Dul	Ind	Malo	Gas	AMG	
1	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
2	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
3	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	
4	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	
5	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
6	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	
7	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	
8	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	
9	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
10	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	
11	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	
12	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
13	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
14	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	
15	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

VP: Voges-Proskauer; MR: methyl crveno; Nit: redukcija nitrata; Orn: dekarboksilacija ornitina; Mot: pokretljivost na 37°C; Ino: proizvodnja kiselina od inozitola; Dul: proizvodnja kiselina od dulcitolu; Ind: proizvodnja indola; Malo: upotreba malonata; Gas: proizvodnja gasa od glukoze; AMG: proizvodnja kiselina od metil- α -D-glukozeida;

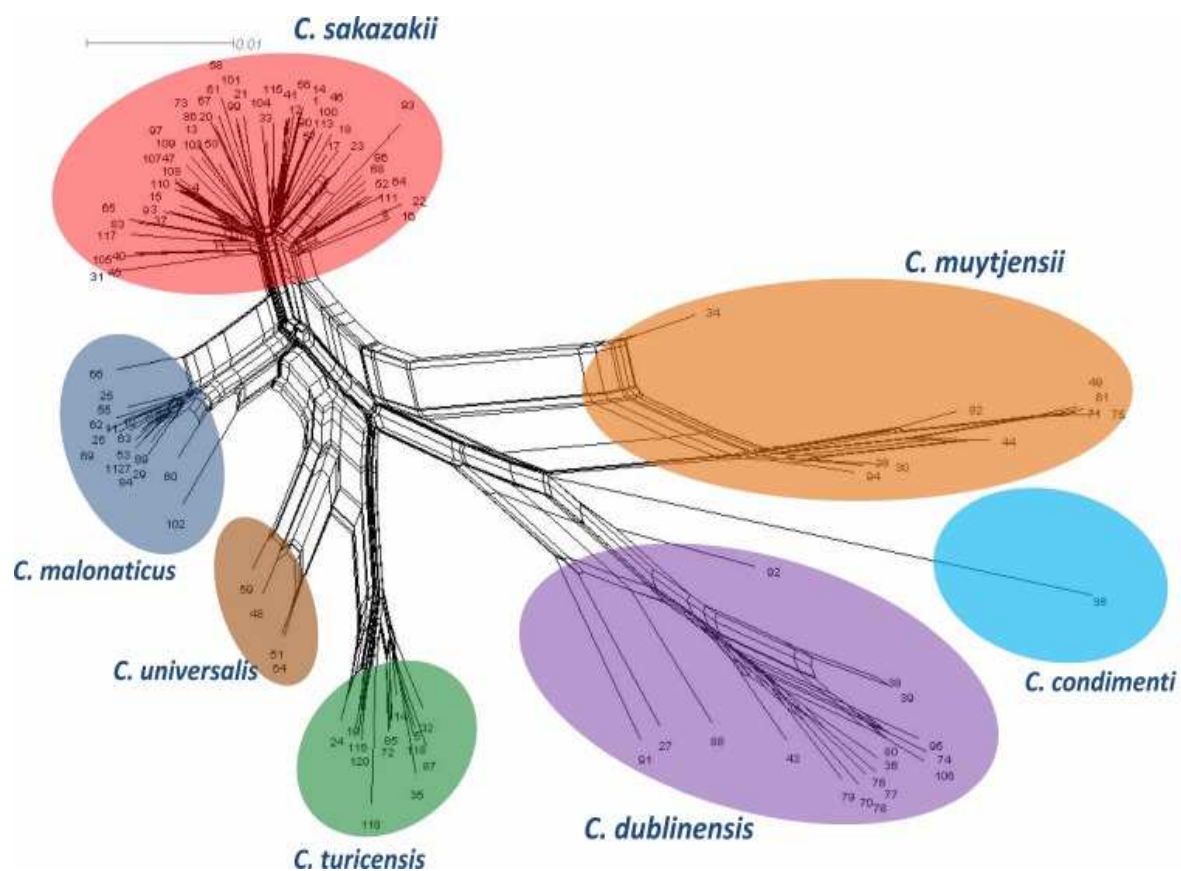
Nema dovoljno dokaza za patogenost pojedinačnih sojeva, tako da ne može ni da se poredi njihova patogenost. Svi ovi sojevi su izolovani iz materijala kliničkih slučajeva novorođenčadi sa smrtnim ishodom (Iversen i sar., 2007).

Prethodno definisan *E. sakazakii* je podeljen na 4 vrste i 2 podvrste koje pripadaju novom rodu u okviru familije *Enterobacteriaceae*. Ovaj mikroorganizam je nov i najčešće se povezuje sa proizvodnjom formula za odojčad u prahu i sa slučajevima teških infekcija i smrti novorođenčadi (Lai, 2001).

Sledeća promena u nomenklaturi i taksonomiji u okviru familije *Enterobacteriaceae* izvršena je 2007. godine kada je reklasifikovan u poseban rod *Cronobacter spp.* pod nazivom *Cronobacter sakazakii* (Iversen i sar., 2007; Iversen i sar., 2008).

Rod *Cronobacter* je nazvan po Grčkom bogu iz mitologije - Cronos-u, koji je poznat po tome da je gutao decu po rođenju (Graves, 1992). Ovaj rod obuhvata nove vrste, *C. sakazakii* comb. nov. (obuhvata sojeve grupe 1) sa *C. sakazakii* subsp. *sakazakii* comb. nov. i *C. sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov.; *C. muytjensii* sp. nov. (sojevi grupe 3); *C. dublinensis* sp. nov. (sojevi grupe 4); *C. turicensis* sp. nov. (većina sojeva iz grupe 2); i sojevi NCTC 9529 i E680 se

fenotipski razlikuju i spadaju u *Cronobacter* genomospecies 1 za sada. Filogenetsko stablo *Cronobacter* spp. je prikazano na slici 2.1.1.



Slika 2.1.1. Filogenetsko stablo sojeva *Cronobacter* spp. (Joseph i sar., 2012)

Osnovne karakteristike roda *Cronobacter* su: oksidaza negativne, katalaza pozitivne, fakultativno anaerobne bakterije, peritrihne, gram negativne, veličine od 1 μ m do 3 μ m. Uglavnom je većina pokretna, redukuju nitrate, koriste citrate, hidrolizuju eskulin i arginin i proizvode kiselinu od D-glukoze, D-saharoze, D-rafinoze, D-melibioze, D-celobioze, D-manitola, D-manoze, L-ramnoze, L-arabinoze, D-ksiloze, D-trehaloze, galakturonata i D-maltoze. Bakterije iz roda *Cronobacter* metabolizuju supstrate: 5-bromo-4-hloro-3-indolil- α -D-glukopiranozid, 4-metilumbeliferil- α -D-glukopiranozid, 4-nitofenil- α -D-glukopiranozid, 4-nitofenil- β -D-glukopiranozid, 4-nitofenil- α -D-galaktopiranozid i 4-nitofenil- β -D-galaktopiranozid. Većina daje pozitivnu Voges-Proskauer reakciju i negativnu metil crveno reakciju. Negativne su i sledeće reakcije: proizvodnja vodonik sulfida, hidroliza uree, lizin dekarboksilacije, β -D-glukuronidaze i prerade D-sorbitola, eritola, tartrata, 5-ketoglukonata, D-saharozne kiseline, natrijum piruvata, glukoza-1-fosfata, glukoza-6-fosfata, adonitola i arabitola (Farmer i sar., 1980; Farmer 1999; Iversen i sar., 2004d; Iversen i

sar., 2006a, 2006b.; Iversen i sar., 2007). U Tabeli 2.1.2. su prikazane razlike koje postoje između *Cronobacter* vrsta i podvrsta.

Tabela 2.1.2. Statistički značajne razlike između *Cronobacter* vrsta i podvrsta (Iversen i sar., 2007)

	Broj izolata	Dul	Ind	Malo	AMG
<i>Cronobacter sakazakii</i> subsp. <i>sakazakii</i>	163	-	-	-	+
<i>Cronobacter sakazakii</i> subsp. <i>malonaticus</i>	22	-	-	+	+
<i>Cronobacter muytjensii</i>	7	+	+	+	-
<i>Cronobacter dublinensis</i>	8	-	+	v	+
<i>Cronobacter turicensis</i>	8	+	-	+	+
<i>Cronobacter genomospecies 1</i>	2	+	-	+	+

Dul: proizvodnja kiseline od dulcitol; Ind: proizvodnja indola; Malo: upotreba malonata; AMG: proizvodnja kiseline od metil- α -D-glukozida +: 85–100% pozitivno; v: 15–85% pozitivno; -: manje od 15% pozitivno.

Cronobacter sakazakii **comb. nov.** je dobio ime u čast Japanskog mikrobiologa Riichi Sakazakija, kada je 1980. godine pronađena nova vrsta *Enterobacter sakazakii* koja je deponovana u kolekcijama kao: ATCC 29544^T (ATCC, Manassas, VA, SAD) i NCTC 11467^T (NCTC, London, Velika Britanija). Ovaj soj je izolovan iz grla obolelog deteta. *C. sakazakii* subsp. *sakazakii*, obuhvata biogrupe: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11 i 13 koje su ranije opisane (Farmer i sar., 1980) i uglavnom su indol, dulcitol i malonat - negativne, ali metil- α -D-glukopiranozid pozitivne (Tabela 2.1.2.).

Cronobacter sakazakii subsp. *malonaticus* **subsp. nov.** (malonas -atis, malonate; L. suff. -icus, ime je dobio zbog korišćenja malonata) sastoji se od biogrupa: 5, 9 i 14. Karakterističan predstavnik je soj CDC 1058-77, koji je izolovan iz abscesa dojke i deponovan kao LMG 23826^T (BCCM/LMG, Belgium) i DSMZ 18702^T (DSMZ, Nemačka). *C. sakazakii* subsp. *malonaticus* je indol i dulcitol negativan, ali malonat i metil- α -D-glukopiranozid pozitivan.

Cronobacter muytjensii **sp. nov.** (muytjensii, od Muytjens) je podvrsta nazvana u čast holandskog mikrobiologa Harry Muytjens-a koji je među prvima proučavao karakteristike *E. sakazakii* (Muytjens i sar., 1983, 1984, 1986, 1988, 1990). Ova vrsta obuhvata ranije opisanu biogrupu 15 (Farmer i sar., 1980). Predstavnik ove vrste je soj ATCC 51329^T (ATCC, Manassas, VA, SAD) koji se nalazi u kolekciji CIP 103581^T (Collection de l'Institut Pasteur, Paris, Francuska). Ovaj soj je prvi put deponovan od strane firme bioMérieux, La Balme-les-Grottes,

Francuska. Bakterija *C. mytjensii* sp. nov. je indol, dulcitol i malonat pozitivna, ali palatinoza i metil- α -D-glukopiranozid negativna.

***Cronobacter dublinensis* sp. nov.** (dublinensis, ime je dobio po gradu Dublinu u Irskoj, gde je pronađen i obuhvata biogroupe 6, 10 i 12. Soj CFS237. Izolovan je iz fabrike za proizvodnju formule za prehranu odojčadi u prahu, deponovan je kao LMG 23823^T (BCCM/LMG, u Gentu, u Belgiji) i kao DSMZ 18705^T (DSMZ, u Nemačkoj). *C. dublinensis* sp. nov je dulcitol negativan i metil- α -D-glukopiranozid i indol pozitivan.

***Cronobacter turicensis* sp. nov.** (turicensis je dobio ime po latinskom nazivu Ciriha-Turicum, jer je pronađen u Švajcarskoj, u Cirihi). Predstavnik je soj 3032, deponovan kao LMG 23827^T (BCCM/LMG, Gent, Belgija) i DSMZ 18703^T (DSMZ, Nemačka). Izolovan je kao klinički uzročnik smrtnog slučaja meningitisa novorođenčeta u Cirihi, 2005. godine (Mange i sar., 2006).

***C. turicensis* sp. nov.** je indol negativan, ali malonat, dulcitol i metil- α -D-glukopiranozid pozitivan.

Opis *Cronobacter* genomospecies 1

Grupa je predstavljena sojem NCTC 9529, fenotipski se ne razlikuju od biogroupe 16. Izolovan je u Engleskoj iz vode, 1954.godine i čuva se u Londonu. *Cronobacter* genomospecies 1 sojevi su indol negativni, a malonat, dulcitol i metil- α -D-glukopiranozid pozitivni.

Joseph i sar. (2011), dodaju novu vrstu ***Cronobacter condimenti* sp. nov.**, izolovanu iz sečenog mesa i ***Cronobacter universalis* sp. nov.**, koja je pripadala grupi *Cronobacter* spp. genomospecies 1, izolovanoj iz infekcije rane na nozi, vode i iz hrane.

Brady i sar. (2013) predlažu da se u rod *Cronobacter* uključe još 3 vrste *E. turicensis*, *E. helveticus* i *E. pulveris* i preimenuju u: ***Cronobacter zurichensis* nom. nov.**, ***Cronobacter helveticus* comb. nov.** i ***Cronobacter pulveris* comb. nov.**

Na čvrstoj hranljivoj podlozi *C. sakazakii* može da formira dva morfološki različita tipa kolonija (Farmer i sar., 1980), što se može videti na slici 2.1.2.

Prvi tip kolonija su mukozne ili suve, bez jasnih ivica, koje se razvlače pri dodiru sa ezom, dajući utisak gumaste konzistencije, pri čemu vrlo malo biomase ostaje na ezi, a većina se vraća na agar. Ove karakteristike su posledica sposobnosti stvaranja heteropolisaharida (Harris i Oriol, 1989).

Drugi tip su kožaste mat ili sjajne kolonije koje imaju manju sposobnost stvaranja pigmenta (Iversen i Forsythe, 2003).

tip I



tip II



Slika 2.1.2. *Cronobacter* spp. na tripton soja agaru, posle 48 sati inkubacije na 25°C

Približno 58% (33 od 57) sojeva *E. sakazakii* spadaju u fekalne koliformne bakterije, jer stvaraju gas pri kultivaciji u *Escherichia coli* (EC) bujonu tokom inkubacije 48 sati na 44.5°C.

U izdanju Bergey iz 1984. godine, navedeno je 5 bakterija koje imaju sposobnost da stvaraju pigment: *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter agglomerans*, *Leclercia adecarboxylata*, predhodno poznata kao *Escherichia adecarboxylata* (Tamura i sar., 1986), *Xenorhabdus luminescens* i *Xenorhabdus nematophilus* (Krieg i Holt, 1984).

U ovu grupu su dodate i vrste: *Escherichia hermanii*, *E. vulneris* i soj *Yersinia enterocolitica* (soj 195A14J) izolovan iz mleka u Francuskoj (Brenner i sar., 1980; Brenner i sar., 1984; Vidon i sar., 1987). Analiza plazmidnih profila nakon elektroforetskog razdvajanja iz sojeva koji stvaraju žuti pigment pokazala je prisustvo plazmida od 42-kb (Gantiottie i Beer, 1982), dok kod ostalih sojeva nije utvrđeno prisustvo ovog plazmida.

Nazarowec-White i Farber (1999) su, primenom biohemijskog testa API 20E Biomerieux, ispitali 9 klinički izolata *E. sakazakii* i 8 izolata iz hrane, kao i referentni soj ATCC 29544 i na osnovu rezultata ispitivanja svrstali ih u biotip 3.

Ovi rezultati se poklapaju sa rezultatima istraživanja Postupa i Aldove (1984) koji pokazuju da je 75% od 57 sojeva *E. sakazakii*-inozitol pozitivno, dok je 98% Voges-Proskauer pozitivno. Inozitol negativni sojevi podižu pH podloge, dok inozitol-pozitivni proizvode kiselinu koja snižava pH podloge. Muytjens i sar. (1984) su utvrdili da *E. sakazakii* jedini nema enzim fosfoamidazu. Preko 97% od 73 izolata *E. sakazakii* proizvodi Tween 80 esterazu (Postupa i Aldova, 1984).

2.2. Klinička etiologija i patogenost

Enterobakterije su izazivači masovnih epidemija, koje se komplikuju dodatnim ko-infekcijama (Borderon i sar., 1996; Nazarowec-White i Farber, 1997b; Chang i sar., 2000; Hervas i sar., 2001; Huang i sar., 2001).

2.2.1. Karakteristike patogenosti

Faktori virulencije su i dalje nepoznati, iako je dokazano prisustvo egzotoksina, aerobaktina i hemaglutina na mestu infekcije (Keller i sar., 1998). *E. sakazakii* izaziva kod novorođenčadi sa malom telesnom masom teške infekcije, tešku kliničku sliku koja je posledica razvoja sepse, meningitisa ili nekrotičnog enterokolitisa (Urmenyi & Franklin, 1961; Joker i sar., 1965; Monroe & Tift, 1979; Adamson & Rogers, 1981; Kleiman i sar., 1981; Muytjens i sar., 1983; Arseni i sar., 1987; Willis & Robinson, 1988; Biering i sar., 1989; Simmons i sar., 1989; Clark i sar., 1990; Noriega i sar., 1990; Gallagher i Ball, 1991; Borderon i sar., 1996; Fotopoulos i sar., 1997; Sakata & Maruyama, 1997; Nazarowec-White & Farber, 1997b; Burdette & Santos, 2000; Bar-Oz i sar., 2001; Gebremariam, 1998; Hervas i sar., 2001; Huang i sar., 2001; Van Acker i sar., 2001; Lai, 2001; Weir, 2002; Himelright i sar., 2002; Iversen & Forsythe, 2003).

Istraživanja pokazuju da su posebno u opasnosti od infekcije pacijenti u intenzivnoj nezi, imunokompromitovane grupe, hronični bolesnici, oni već lečeni jakim antibioticima, starije osobe, pacijenti posle teških operacija u prvim danima posle operacije (Gallagher, 1991; Pitout i sar., 1997; Sanders & Sanders, 1997; Farber & Forsythe, 2008).

Međunarodna Komisija za mikrobiološke specifikacije za hranu (The International Commission for Microbiological Specifications for Foods) je 2002. godine definisala *C. sakazakii* kao ozbiljan patogen mikroorganizam koji napada imunokompromitovane grupe, izazivajući teška oštećenja u nervnom sistemu, stvaranje sekula, ili bolesti koje završavaju trajnim posledicama, ako dođe do preživljavanja.

Centar za praćenje bolesti prenosivih hranom u Njujorku (FoodNet) dao je izveštaj da na 100.000 stanovnika dođe jedna beba koja ima simptome meningitisa i septikemije sa fatalnim ishodom, ali zato na 100.000 prevremeno rođenih beba i nedonoščadi (1500g), ta frekvencija je 9,4 (Stoll i sar., 2004).

Tabela 2.2.1.1. Simptomi infekcija *C. sakazakii* (Farber & Forsythe, 2008)

Simptomi infekcije-novorodenčad i deca	Reference
Meningitis, ventrikulitis, absces mozga, formiranje cista na mozgu sa trajnim oštećenjem tkiva	Kleiman i sar., 1981; Gallagher & Ball, 1991; Willis & Robinson, 1988; Kline, 1988a; Ries i sar., 1994; Nazarowec-White & Farber, 1997b
Konjuktivitis	Reina i sar., 1989; Bar-Oz i sar., 2001; Block i sar., 2002
Hidrocefalus, deformiteti fontanele, uništenje prednjih delova mozga, napadi, hipotermija, bradikardija meningoencefalitis, nekroza mekog tkiva mozga, razgradnja bele moždane mase, ozbiljna neuro oštećenja	Willis & Robinson, 1988
Infekcije izazvane kateterom (u bolničkim uslovima)	Arseni i sar., 1985; Block i sar., 2002
Meningitis sa ranijim znacima cijanoze, kolapsa, konvulzija, hipertoničnih napada.	Muytjens i sar., 1983
Nekrotični entreokolitis novorođenčadi	Muytjens i sar., 1983; Van Acker i sar., 2001
Absces mozga i meningitis novorođenčadi	Kleiman i sar., 1981; Muytjens i sar., 1983; Ries i sar. 1994; Burdette & Santos, 2000
Ventrikulitis, ciste na mozgu, sa kasnijim formiranjem hidrocefalusa i abscesa na mozgu	Gallagher i Ball, 1991; Bar-Oz i sar., 2001; Burdette & Santos, 2000
Bakterijemija	Monroe & Tift, 1979; Noriega i sar., 1990; Nazarowec-White & Farber, 1997b; Burdette & Santos, 2000; Block i sar., 2002
Simptomi infekcije- Odrasli	
Ulceracije na dijabetičnom stopalu, zajedno sa još 2 bakterije	Pribyl i sar., 1985
Upala debelog creva	Reina i sar., 1989
Sepsa kao posledica pucanja žučne kese	Lai, 2001
Urosepsa	Jimenez & Gimenez, 1982
Bakterijemija	Hawkins & sar., 1991
Infekcija krvnih sudova i infekcije rana	Dennison & Morris, 2002
Upala pluća	Lai, 2001

Muytjens i sar. (1983) su ispitivanjem i statističkom obradom dostupnih podataka prijavljenih infekcija došli do saznanja da je 50–75% septikemija i meningitisa kod novorođenčadi izazvano bakterijama *Streptococcus agalactiae* i *E. coli*. *E. sakazakii* je patogen koji prvenstveno izaziva

infekcije kod imunokompromitovane novorođenčadi (Willis & Robinson, 1988). *E. sakazakii* kod novorođenčadi izaziva bakterijemiju i/ili sepsu, infekciju cerebrospinalne tečnosti i meningitis, abscese na mozgu, smanjenje ventrikula na mozgu, koje je praćeno nekrozom i razgradnjom bele moždane mase, ciste na kranijalnom delu mozga, intracerebralne hemoragije koje dovode do infarkta delova mozga, što rezultuje encefalomalacijom tog dela moždanog tkiva (omekšavanje mozga) (Kleiman i sar., 1981; Kline, 1988a; Ries i sar., 1994; Nazarowec-White & Farber, 1997b i Weir, 2002).

Za rano otkrivanje eventualne infekcije, poželjno je da se uradi ultrazvuk (ultrasonografiju) kranijalnog dela, skener glave i magnetna rezonanca (Kline, 1988b; Gallagher & Ball, 1991; Bar-Oz i sar., 2001; Burdette & Santos, 2000; Iversen & Forsythe, 2003).

Monroe i Tift (1979) su prvi zvanično prijavili slučaj infekcije *E. sakazakii*, koji je izazvao bakterijemiju, a da nije došlo do meningitisa. Mnoge infekcije *E. sakazakii* novorođenčadi mogu primarno da se razviju u meningitis, mogu biti povezane istovremeno sa razvojem nekrotičnog kolitisa koji ima više različitih uzročnika, a predstavlja najčešću infekciju gastrointestinalnog trakta zabeleženu kod novorođenčadi (Muytjens i sar., 1983 i Van Acker i sar., 2001).

Infekcije izazvane *E. sakazakii* su povezivane samo sa posledicama infekcije kroz porođajni kanal, što se pokazalo kao potpuno pogrešno (Muytjens i sar., 1983).

Tabela 2.2.1.2. Infekcije kod kojih je *E. sakazakii* bio jedini uzročnik, Lai (2001)

U Kliničkom Centru u Masačusetsu 3.6% pacijenata sa septikemijom u periodu 1994-1996. godine bili su pozitivni na <i>Enterobacter</i> vrste, a kod 0.4% od tih pacijenata jedini uzročnik infekcije je bio <i>E.sakazakii</i> .
Ukupno je zabeležen 31 slučaj dece uzrasta od 3 dana do 4 godine, gde je uzročnik bio <i>E. sakazakii</i> .
50% inficirane dece sa <i>E. sakazakii</i> je bilo < 1 nedelje staro.
75% inficirane dece sa <i>E. sakazakii</i> je bilo < 1 meseca staro.
43% od ovih slučajeva je imalo simptome težeg meningitisa sa nervnim napadima.
33% je smrtnost kod pacijenata koji nisu imali nervne simptome, a 45% kod pacijenata sa znacima meningitisa.
Posle 1985, pacijenti su lečeni III- generacijom cefalosporina, u kombinaciji sa ampicilinom, gentamicinom i to je smanjilo smrtnost sa 62% na 14%.
Mali je broj pacijenata u starijem životnom dobu, a oboleli su svi bili stariji od 56 godina (uglavnom period 68-76. godine), a samo jedan 39. godišnji muškarac je oboleo. Stopa smrtnosti varira od 50-75% , u zavisnosti od ostalih simptoma i drugih bolesti.
Najveći broj obolelih pacijenata u starijem životnom dobu je bio već sa ozbiljnim primarnim oboljenjima, a kod 50% je već bio dijagnostifikovan maligni tumor.
Predilekciona mesta kod odraslih pacijenta su komplikacije na plućima, septikemija, osteomijelitis stopala i sepsa na jetri.

Patogeneza i razvoj infekcije meningitisa gde je uzročnik jedino *E. sakazakii* nije još potpuno objašnjen. *E. sakazakii* translocira kroz kičmeni splet i intracelularno invadira okolno tkivo od strane sekretornih faktora koji se tu izluče (na pr. elastastaze, glikopeptidi, endotoksini, kolagenaze i proteaze), što izaziva poremećaj barijere krv-centralni nervni sistem, uzročnik prodire do mozga i dovodi do oštećenja moždanog tkiva (Iversen & Forsythe, 2003). Postoji jednako izražen tropizam ka nervnom tkivu bakterija *E. sakazakii* i *C. diversus*, pa one izazivaju slične infekcije i oštećenja centralnog nervnog sistema (Willis & Robinson, 1988; Kline, 1988a, Kline, 1988b i Burdette & Santos, 2000).

Tokom razvoja fetusa u organizmu majke, digestivni trakt nema saprofitnu floru, ona počinje da se razvija od porođaja i kontakta sa spoljnom okolinom i početka hranjenja *per os* (Kien i sar., 1987; Kirjavainen & Gibson, 1999; Wold & Adlerberth, 2000). Još uvek nije razjašnjeno od čega zavisi sastav flore digestivnog trakta, a utvrđeno je da na vrstu mikroorganizama koji će se tu naseliti utiču: dijeta, razvoj imunog sistema... Mikrobiota digestivnog trakta svakog čoveka je jedan kompleksan ekosistem i može imati velike uticaje na metabolizam, patološke procese u organizmu, kao i na funkciju imunog sistema (Bach, 2002).

Imuni sistem se postepeno razvija kod novorođenčadi i postoji više razloga zbog čega su baš oni kritična grupa koja podleže infekciji bakterijom *C.sakazakii*, koja u tom slučaju može imati i fatalan ishod. Prva linija odbrane u digestivnom traktu odnosi se na brzi odgovor na unošenje infektivnog agensa, kao što su povećanje ekskrecije, ubrzanje peristaltičkih pokreta, lučenje fagocita i aktiviranje komplementa. Međutim, na prvo unošenje infekta odgovor je spor ili uopšte ne dođe do njega, tako da kod novorođenčadi može doći do razvoja nekrotičnog enterokolitisa. Epitelijalna barijera se postepeno razvija u digestivnom traktu i kod prevremeno rođenih beba ima samo 3 sloja, umesto 16 i više slojeva koliko je neophodno za normalnu funkciju. Kod njih je manja količina želudačne kiseline, zaštitne sluzi u crevima, sporija je peristaltika, manji je broj T i B limfocita, kao i sekretornog imunoglobulina Ig A i defensina koji inače imaju ulogu da spreče inicijalno vezivanje infektivnog agensa za sluzokožu creva (Evans & Rutter, 1986; Udall, 1990).

Druga linija odbrane obuhvata reakciju organizma koja omogućava adekvatan odgovor organizma (preko makrofaga, neutrofila i "ćelija ubica"- NK ćelija) da bi se neutralizovao i uklonio zapaljenjski proces. Monociti novorođenčadi su isti kao kod odraslih, samo što imaju mnogo manje razvijene hemotaksične, fagocitne i baktericidne mogućnosti (Schelonka i sar., 1994). Neutrofili (polimorfonuklearni granulociti) su osnova nespecifične reakcije imunog

sistema i dovode do oštećenja membrane mikroorganizma i njegovog uništavanja (Christensen i sar., 1982). Međutim, neutrofili postoje u značajnom broju u cirkulaciji novorođenčadi do 32 sata po rođenju i posle odlaze u ostala tkiva, a u telu novorođenčadi još uvek nije aktiviran mehanizam ubrzane proliferacije ovih ćelija iz koštane srži, tako da se kod njih u slučaju infekcije u cirkulaciji javlja i neutropenija (Christensen i sar., 2006).

Sa razvojem deteta, jača i njegov imuni sistem zahvaljujući ubrzanom razvoju komponenti imunog odgovora koji se razvijaju u prvih 6 meseci života. Od druge do 5 nedelje života počinje sinteza sekretornog IgA. Komponente sistema komplementa dostižu očekivanu koncentraciju u serumu do 3 meseca. Sekundarni imunitet se razvija više meseci, pa i do godinu dana. Kod dece koja se doje, dominiraju gram pozitivne bifido-bakterije, za razliku od onih koji se prehranjuju veštački, kod kojih dominiraju *Enterobacteriaceae* (*E.coli* i *Klebsiella*), *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* i *Bacteroides* roda (Shiokawa i sar., 1999). U Tabeli 2.2.1.3. navedeni su nedostaci imunog odgovora kod prerano rođenih beba.

Tabela 2.2.1.3. Nedostaci imunog odgovora prerano rođenih beba (Kaufman & Fairchild, 2004).

Mehanizam odbrambenog sistema	Nedostatak kod prevremeno rođenih beba	Posledice
Epidermalne i epitelijalne barijere	Nezrela, tanka koža i sluzokoža	Podloga pogodna za razvoj i kolonizaciju bakterija
Nepovređen endotel i epitel	Traume i povrede izazvane nekim medicinskim intervencijama	Povreda barijera gde se razvija infekcija
Mukoza gastrointestinalnog trakta	Manje zaštitne sluzi, želudačne kiseline, proteolitičkih enzima i sporija peristaltika creva	Lakše vezivanje mikroorganizama za membranu enterocita, povećano oslobađanje toksina
Komplement	Manja koncentracija, pogotovo kod prevremeno rođenih	Manja baktericidna aktivnost, manja sposobnost hemotakse
Citokini, defensini	Manja produkcija IL-1, IL-8, IFN- γ , TNF- α , Th2-vezan imuni odgovor	Nemogućnost adekvatne odbrane organizma prema infekciji gram negativnim bakterijama
Neutrofili	Manji broj u koštanoj srži, povećan prolazak kroz membrane, nemogućnost oksidacije, smanjena količina azurofilnih granula	Nemogućnost adekvatne odbrane organizma prema infekciji gram negativnim bakterijama.
Monociti	Smanjen broj, mogućnost adherencije, kao i adherencija.	Smanjeno izražavanje antigena i citokina što dovodi do nedovoljne stimulacije humoralnog imuniteta
T i B limfociti, Antitela	Smanjen broj limfocita u crevima, IgG koji se prenesu od majke, smanjena sinteza antitela i smanjena proliferacija T-ćelija	Povećana mogućnost infekcije, redukovan imuni odgovor

Klinička slika

Simptomi dosta variraju. Ako se infekcija javi već prve nedelje života, počinje sa znacima sepse, opšte letargije, znacima intermitentne febre, kao i potpunim odbijanjem hrane. Najčešće prisustvo ove gram negativne bakterije u krvi prate promene na centralnom nervnom sistemu i pad krvnog pritiska. Obavezno se javlja meningitis, koji je praćen krvarenjem u mozgu, infarktima, nekrozom, likvefakcijom i formiranjem cista različitih veličina. Smrtnost dece kod kojih se jave simptomi sa znacima meningitisa je 42%. Oni koji prežive, obavezno imaju kasnije posledice, u zavisnosti od vremena i mesta zahvaćenosti infekcije. Najčešće komplikacije su zaostajenje u rastu i mentalna retardiranost (Bowen & Braden, 2006).

Meningitis je najčešće prijavljivana posledica infekcije novorođenčadi sa *E. sakazakii*, što rezultuje u 90% slučajeva stvaranjem abscesa na mozgu (Kline, 1988a ; Gallagher & Ball, 1991; Chang i sar., 2000 i Burdette & Santos, 2000).

Simptomi meningitisa se najviše pokazuju između 4. i 5. dana posle rođenja i mogu dovesti do nagle smrti za par sati, do par dana (Muytjens i sar., 1983). Smrtnost kad se infekcija razvije za par sati posle rođenja kod novorođenčadi je 40–80%. Meningitis novorođenčadi uzorkovan vrstama *Enterobacter* odnosno infekcije opisane uzročnikom: „žuto obojen *E. cloacae*” statistički imaju mortalitet 92%. Nedonoščad (bebe rođene sa telesnom masom ispod 2,5 kg) imaju mnogo veću šansu da obole i imaju teže simptome (Urmenyi & Franklin, 1961; Rance i sar., 1962; Joker i sar., 1965; Adamson i Rogers, 1981; Kleiman i sar., 1981; Muytjens i sar., 1983; Arseni i sar., 1987; Willis & Robinson, 1988; Nazarowec-White & Farber, 1997b).

Enterobacter sakazakii napadom na centralni nervni sistem uništava tkivo, povećava intrakranijalni pritisak. Sanacija zahteva drenažu i izbacivanje cerebralne tečnosti, ponekad i ugrađivanje posebnog ventrikuloperitonealnog stenta da bi se izbeglo oštećenje mozga. Do 20% novorođenih, koji prežive infekciju sa *E. sakazakii* ima trajne nervne posledice sa (Gebremariam, 1998). Napadi koji liče na epileptične se javljaju u jednom od tri slučaja meningitisa, a variraju od konvulzija, do trzanja i povećanja kranijalnog dela i ispućenja fontanela (Muytjens i sar., 1983 i Weir, 2002). U slučaju sepse bez meningitisa, smrtnost je manja (oko 9%), međutim, kod takvih pacijenata razvija se nekrotični enterokolitis.

Osim ovih specifičnih infekcija, *E. sakazakii* može da inficira rane, posle hirurških zahvata ili kod dijabetičara kod periferne vaskularne bolesti gde izaziva osteomijelitis (Reina i sar., 1989; Dennison & Morris, 2002).

Bowen i Braden (2006) su u cilju utvrđivanja faktora rizika sproveli studiju u koju je bilo uključeno 46 slučajeva infekcija *E. sakazakii*. Utvrdili su da je 40% inficiranih novorođenčadi bilo porođeno carskim rezom, eliminišući time mogućnost infekcije prilikom prolaza kroz porođajni kanal. Od ukupno obolelih, kod 92% novorođenčadi korišćena je za prihranjivanje formula za odojčad u prahu, a iz 68% u 22 ispitivana slučaja infekcije iz tih formula je izolovan *E. sakazakii*. Isti autori su utvrdili da se 87% izolata *E. sakazakii* nije razlikovalo od kliničkih izolata kad su poredili biotip ili genotip.

Više autora je dokazalo da postoji velika povezanost između konzumacije formule za odojčad u prahu i razvoja nekrotičnog kolitisa (Kosloske, 1984; Van Acker i sar., 2001; Iversen & Forsythe, 2003). Bebe koje se hrane samo formulom za odojčad u prahu imaju 10 puta veću šansu da dobiju nekrotični kolitis (Lucas & Cole, 1990). U drugom istraživanju koje je obuhvatilo 125 slučajeva novorođenih beba, koje su lečene antibioticima protiv *Enterobacter* vrsta, *E. sakazakii* je bio uzročnik u 29% slučajeva (Chan i sar., 1994).

Kod nekrotičnog kolitisa smrtnost je 10–55% (Peter i sar., 1999), a infekcija izaziva ishemiju, kolonizaciju i prodor bakterija kroz gastrointestinalni trakt, sa velikim povećanjem proteina unutar lumena, što je posledica konzumiranja formule za odojčad u prahu (Iversen & Forsythe, 2003).

Nekrotični kolitis se javlja samo kod beba sa nedovoljno razvijenim crevima (Bell i sar., 1978). Osim toga, dodatni faktori koji doprinose nastanku nekrotičnog enterokolitisa su: peritonealne infekcije, bebe koje se rađaju sa jako malom kilažom zbog drugih faktora, bolest hijalinskih omotača, mali Apgar skor, umbilikalne infekcije posle kateterizacije. Sistemski se manifestuje kao: apnea, bradikardija, intermitentna temperatura sa intravaskularnom koagulacijom i mogućim septičkim šokom. Intestinalni simptomi obuhvataju abdominalne grčeve i krvavu stolicu, moguć ileus i pojava gasa u portalnoj veni. Postoje 3 stadijuma razvoja nekrotičnog enterokolitisa (NEC), samim tim se menjaju patomorfološke promene: mukozno zapaljenje gastrointestinalnog trakta i peritoneuma, hemoragije, ishemije i nekroze (Boccia i sar., 2001).

Mehanizmi koji dovode do ishemične nekroze creva nisu potpuno određeni. Zna se da u razvoju ove zapaljenjske reakcije učestvuju faktor aktivacije trombocita (Platelet Activating Factor- PAF) koji je fosfolipidni zapaljenjski medijator i TNF- α (Tumore Necrosis Factor Alpha) - jedan od citokina koji aktiviraju makrofage. PAF se luči iz endotelijalnih ćelija, neutrofila, trombocita i makrofaga kao odgovor na određene stimulse, kao što su endotoksini, hipoksija.

LPS (Lipopolysaccharide factor) kod Gram negativnih bakterija je deo ćelijske membrane, spada u endotoksine i aktivira makrofage, leukocite, ćelije endotela i epitela. Oslobađaju se citokini, TNF, Interleukini 1 i 8 (IL-1 i IL-8), PAF i slobodni oksidativni radikali, koji razvijaju dalje zapaljenjski proces. Jedan je od osnovnih faktora razvoja septičnog šoka jer dovodi do brzog oslobađanja medijatora zapaljenjske reakcije po celom organizmu i to može imati fatalni ishod (Townsend & Forsythe, 2008).

S obzirom na proučavane slučajeve i znake nekrotičnog kolitisa, uvek postoji kompleks uzroka koji dovode do karakteristične kliničke slike: prehrana formulom za odojčad, prerano rođene bebe, ishemija i enteralno hranjenje. Nekrotičnom enterokolitisu novorođenčadi obično predhodni enterokolitis izazvan uobičajenim bakterijama: *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *E. coli*, ali se njihov broj u duodenumu povećava na preko 10^8 cfu/g (Hoy i sar., 2000). U toku istraživanja, ispitivana je mikrobiota creva nedonoščadi (<1,5kg). Ispitano je 422 uzorka, od toga je pola imalo pomenute bakterije a kod 13 novorođenčadi se razvio u toku ispitivanja nekrotični enterokolitis.

Boccia i sar. (2001) su ispitivali 17 slučajeva nekrotičnog enterokolitisa u periodu od 1973. do 1999. godine. Srednja starost beba je bila 9,5 dana, a mortalitet 6,25%.

U cilju određivanja infektivne i letalne doze, kao i faktora virulencije *C. sakazakii* Pagotto i sar. (2003) izvršili biološki ogled na miševima. Za ispitivanje sposobnosti stvaranja enterotoksina i faktora patogenog delovanja miševima su aplikovali intraperitonealno i peroralno osam izolata *C. sakazakii* izolovanih iz hrane i jedan referentni soj ATCC 29544. Po završetku eksperimenta miševima su žrtvovali i ispitivali patološke promene na crevima i nalaz *C. sakazakii* u crevnom sadržaju. Od ispitivanih sojeva, 22% su sintetisali enterotoksin, što je posle dokazano njegovim uticajem na kulturi tkiva (uticaj na ćelije: CHO, Vero i Y-1). Jedan izolat je pokazao citopatogeni efekat na sve ispitivane ćelijske culture. Referentni soj *C. sakazakii* ATCC 29544 nije stvarao enterotoksin. *C. sakazakii* je vrlo lako prolazio kroz sve ćelije gastrointestinalnog trakta, kao i kroz mikrovaskularne ćelije endotela mozga zahvaljujući adhezinu (Mange i sar., 2006).

Kothary i sar. (2007) su utvrdili da metalo-proteaza, enzim koji sadrži cink, učestvuje u adheziji bakterije za ćelije. Ovaj enzim je kodiran nukleotidnom sekvencom (ZPX) koja je ista za sve ispitivane sojeve (135 sojeva). U eksperimentu na kineskom hrčku su utvrdili da je metalo-

proteaza aktivna prema azokazeinu koji se nalazi u omotaču jajnih ćelija. Na osnovu rezultata iz navedenog eksperimenta su prepostavili da postoji mogućnost prelaska barijere iz krvi u moždane ćelije ili da metalo-poteinaze imaju ulogu u uništavanju ćelija u toku nekričnog enterokolitisa.

Hunter i sar. (2008) su utvrdili povezanost velike količine interleukina-6 i apoptoze ćelija tek rođenih pacova, i smatraju da je isti mehanizam patogenog delovanja *C. sakazakii* u slučajevima nekrotičnog kolitisa novorođenčadi. Za bolje vezivanje i prolaz kroz ćelije *C. sakazakii* koristi i citoskeleton domaćina (aktivne filamente i strukturne mikrotubule) (Kim & Loessner, 2008). *C. sakazakii* koristi i citoskeleton domaćina (aktivne filamente i strukturne mikrotubule), migrira kroz mikrovaskularne ćelije endotela mozga lakše nego kroz epitelne ćelije mozga i za to koristi membranski protein A (ompA) i izaziva narušavanje građe mikrotubula (Singamsetty i sar. 2008).

Adegbola i Old (1983) su opisivali sposobnost hemaglutinacije fimbrijalnog dela roda *Enterobacter*. Fimbrije su najčešće prečnika 7-8 nm, manozna i hemaglutinin pozitivne, sa velikim brojem predilekcionih mesta za vezivanje antitela i početka antigen-antitelo reakcija. Proteaza, fosfataza i lipaza mogu doprineti citopatogenom dejstvu na ćelije domaćina.

Lipopolisaharid koji stvara *C. sakazakii* je termostabilan i omogućava uzročniku lakši prolaz iz digestivnog trakta u krv, tako da povećava mogućnost nastanka teže kliničke slike koja se javlja kod bakterijemije i posle prolaza barijere iz krvi u mozak (Townsend i sar. 2007). Lipopolisaharid izolovan iz lipopolisaharidnog omotača *C. sakazakii* je pokazao toksično dejstvo na N2 ćelije, što je dokazano MTT testom (Iversen i sar., 2004e).

Kod 75 uzoraka formula za odojčad u prahu od 31 različitih proizvođača iz 9 zemalja je potvrđeno prisustvo endotoksina od 5.5 do 40×10^4 internacionalnih jedinica u gramu (Townsend i sar., 2007).

Letalna doza od 10^8 cfu/po mišu je određena posle intraperitonealne aplikacije. Ovaj model se teško može preračunati za humanu populaciju i danas se smatra da infektivna doza, kada se *C. sakazakii* unese *per os*, varira od 10^3 do 10^8 cfu (FAO/WHO, 2004).

2.2.2. Epidemiološki podaci i prijavljene infekcije

Prva dva dokumentovana slučaja meningitisa novorođenčadi su bila 1958. godine (Urmenyi & Franklin, 1961). U to vreme, ova infekcija je opisana kao neobičan slučaj izazvan sa

Enterobacter vrstom koja stvara pigment. Obolelo je dvoje dece, a bolest se završila smrću. Iz promenjenih tkiva preminule dece (mozak, cerebralna tečnost, bronhijalni brisevi i tkiva slezine) izolovan je *E. sakazakii*. *E. sakazakii* nije izolovan iz briseva uzetih 7 dana posle infekcija iz okoline kao i iz inkubatora. Klinički izolat je pokazao blago lučenje pigmenta na 37°C, ali je na sobnoj temperaturi formirao jako žuto obojene kolonije. Iako je Pangalos još 1929. godine opisao slučaj septikemije izazvane koliformnom bakterijom koja stvara žuti pigment, danas se kao prvi slučajevi meningitisa novorođenčadi izazvanih *E. sakazakii* prihvataju, opisani i dokumentovani slučajevi iz 1958. godine (Urmenyi & Franklin, 1961).

Broj slučajeva koji su prijavljeni kao infekcija sa *C. sakazakii* je mali, smrtnost je velika. Poslednjih godina, broj prijavljenih infekcija se povećava. Procena učestalosti bolesti izazvane invazivnim *Cronobacter spp.*, urađena na osnovu izveštaja, CDC upita FoodNet sajtova u SAD za 2002. godinu., pokazuje da je procenjena učestalost oboljenja 4 slučaja sa 1 invazivnim slučajem na 100 000 dece godišnje. U prikazanim dostupnim podacima je navedeno da su u pitanju sporadični slučajevi. Na primer, uz podatke dostavljene sa Filipina je navedeno da su to slučajevi evidentirani u državnim bolnicama jer su samo one u obavezi da prema programu laboratorijskog nadzora evidentiraju sve potvrđene slučajeve bolesti. U izveštajima iz Mađarske se navodi da je *Cronobacter spp.* u periodu između 2002. i 2006. godine izolovan u 25 do 29 slučajeva infekcija ljudi. U pet slučajeva su to bila deca mlađa od godinu dana, od kojih je jedno dete bilo starosti 6 do 12 meseci (FAO / WHO, 2006).

U Velikoj Britaniji je sakupljeno najviše podataka. Oni nisu prikupljeni tokom sistematskog nadzora, već u naknadnim revizijama kliničkih slučajeva koji su opisani simptomima sličnim sa simptomima u slučaju infekcije bakterijom *C. sakazakii*. Od 570 infekcija, laboratorijski je potvrđeno 15 infekcija kod male dece (8 izveštaja).

Razvoj metoda za izolaciju *C. sakazakii*, kao i nova saznanja o značaju ove bakterije za zdravlje novorođenčadi, povećano ispitivanje kliničkih materijala u slučajevima oboljenja novorođenčadi sa simptomima do kojih dovodi *C. sakazakii* su doveli do povećanja broja prijavljenih slučajeva oboljenja novorođenčadi. Kod nedonoščadi u intenzivnoj nezi, incidenca pojave infekcije raste na 9,4 slučaja na 100 000 dece godišnje. U Tabeli 2.2.1. su navedeni potvrđenih infekcija u Velikoj Britaniji u periodu 1999-2007. godine.

Tabela 2.2.1. Laboratorijski potvrđeni slučajevi infekcija *Cronobacter* spp. u Velikoj Britaniji (Engleska, Škotska, Vels i Severna Irska) u periodu 1999-2007. godine prikazani po starosnim grupama

Starosna grupa	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Ukupno
< 1 god*	0	0	1	3	5	1	3	2	0	15
14 god.	2	3	4	2	1	0	0	3	1	16
5- 9 god.	1	1	0	0	2	0	0	0	0	4
10-14 g	1	2	0	1	0	2	1	0	0	7
15-44	8	9	7	6	13	10	10	10	6	79
45-64	9	17	16	27	22	19	13	29	11	163
65-74	11	13	13	12	23	21	6	9	11	119
75+ god	16	5	19	14	15	23	23	22	15	152
Nepoz.	1	1	6	4	2	0	1	0	0	15
Ukupno	49	51	66	69	83	76	57	75	44	570

* Uključeni su podaci za odojčad mlađu od 1 meseca, Izvor podataka: Health Protection Agency (HPA); Health Protection Scotland (HPS); Communicable Disease Surveillance Center Northern Ireland (CDSC (NI))

Za procenu učestalosti pojave infekcija korišćeni su raspoloživi podaci iz Engleske i Velsa i Filipina o slučajevima oboljenja sa laboratorijskom potvrdom *Cronobacter* spp. Podaci iz Engleske i Velsa obuhvataju samo bakterijemije i nisu uporedivi sa podacima sa Filipina koji obuhvataju sve infekcije izazvane *Cronobacter* spp., što je prikazano u Tabeli 2.2.2.

Tabela 2.2.2. Laboratorijski potvrđeni slučajevi infekcija *Cronobacter* spp. u Engleskoj i Velsu u periodu 1999-2007. godine prikazani po starosnim grupama

Starosna grupa	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Ukupno
<1meseci	0	3	0	1	2	3	0	0	0	1	1	0	0	3	0	0	14
1-11mes	1	1	1	3	2	2	1	0	0	0	2	2	1	0	2	0	18
1-4 g	0	2	4	2	2	3	2	2	2	3	2	0	0	0	2	1	27
5-9 g	0	0	1	0	3	3	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	11
10-14 g	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	0	2	1	0	0	8
15-44 g	5	1	4	5	6	15	6	7	6	7	5	12	10	9	10	6	114
45-64 g	4	1	8	15	8	26	21	8	16	14	20	20	17	10	25	9	222
65-74g	1	6	17	8	20	18	14	8	11	9	9	17	20	6	7	8	179
75+ god.	5	6	7	6	15	19	12	14	4	17	10	14	21	20	20	12	202
Nepoz.	2	2	0	0	2	2	3	1	1	5	4	2	0	0	0	0	22
Ukupno	18	22	42	40	60	91	60	42	43	56	54	69	71	49	66	36	819

Izvor podataka: Health Protection Agency, Center for Infections Environmental i Enteric Diseases

Ostale infekcije novorođenčadi su prijavljivane u više država u svetu: Danska (Joker i sar., 1965), Grčka (Arseni i sar., 1985), Island (Biering i sar., 1989), Nemačka (Ries et al., 1994), Izrael (Bar-Oz i sar., 2001 i Block i sar., 2002), Holandija (Muytjens i sar., 1983), Španija (Reina i sar., 1989), Kanada i Belgija (Van Acker i sar., 2001) i Sjedinjene Američke države (Monroe i Tift, 1979; Kleiman i sar., 1981; Willis & Robinson, 1988; Simmons i sar., 1989; Noriega i sar., 1990; Gallagher & Ball, 1991; Burdette & Santos, 2000; Himelright i sar., 2002; Lai, 2001 i Weir, 2002). U slučajevima u SAD, postporođajne infekcije ovim uzročnikom prijavljene su u 9 država. Iversen i Forsythe (2003) su ustanovili da je 76 prijavljenih slučajeva širom sveta u periodu od 1958 i 2003. godine, bilo izazvano ovom enterobakterijom. Faktori koji su doprineli razvoju težih simptoma i razvoju infekcije su imunosupresija, rođenje deteta pre termina i mala telesna masa (Himelright i sar., 2002).

O težini i posledicama bolesti novorođenčadi izazvanih *E. sakazakii* u literaturi je opisano više slučajeva. Joker i sar. (1965) su prijavili slučaj meningitisa novorođenčadi, izazvan atipičnom bakterijom roda *Enterobacter*, koja stvara žute kolonije na običnim podlogama. *Enterobacter* je izolovan sa 3 mesta iz cerebrospinalne tečnosti, ali ne iz u krvi, grla i fecesa. Dete se oporavilo posle 27 dana i optušteno je iz bolnice. Sa napunjenja 2 meseca primljeno je opet u bolnicu sa konvulzijama, i poremećajem rada mozga što se pokazalo na encefalogramu. Primenjena je agresivna terapija antibioticima u kombinaciji sterptomycin, hloramfenikol, ampicilin, sulfadiazin, sulfadimidin, sulfamerazin i sulfakombin, dete se oporavilo sa 4 meseca, međutim

pretrpelo je jaka oštećenja nervnog sistema. Joker i sar. (1965) nisu uzeli u obzir da se dete hranilo zamenom za mleko u prahu i meningitis su pripisali posledici komplikacija od dugotrajnog porođaja.

Monroe i Tift (1979) su kod novorođenčeta, male telesne mase od 2,6 kg, sedam dana po rođenju utvrdili bakterijemiju izazvanu sa *E. sakazakii*. Davanjem ampicilina su ublažili simptome. Ovo je prvi slučaj gde su se razvili samo simptomi bakterijemije, sa periodom inkubacije od 6 dana, a da se nije razvio meningitis.

Kleiman i sar. (1981) su prijavili slučaj deteta starog 5 nedelja, koje je pokazalo znake meningoencefalitisa i cerebralnih šupljina, izazivajući pulsiranje i povećan pritisak u predelu fontanele i jake nervne napade. Detetu su dati ampicilin i gentamicin i stanje se popravilo, dete je otpušteno iz bolnice. Dva meseca kasnije, došlo je do povećanja lobanje deteta, pa je morao da se ugradi ventrikulo-peritonealni stent. Dete je preživelo, ali sa teškim posledicama usporenog nevnog razvoja.

U periodu od šest godina, za 8 različitih neonalnih meningitisa je dokazano da su bili izazvani sa *E. sakazakii*, od kojih je kod 2 bilo i slučajeva nekrotičnog kolitisa. Bakterija je izolovana iz cerebrospinalne tečnosti i krvi kod svih 8 pacijenata, od kojih je dva deteta porođeno carskim rezom. Takođe je dokazano za 4 novorođenčeta da nisu inficirani u porođajnom kanalu (Muytjens, 1985). Dvadeset tri *Enterobacter* izolata je pronađeno u cerebrospinalnoj tečnosti i moždanom tkivu od analiziranih 6 pacijenata, od kojih je 8 bilo *E. sakazakii*. Od ostalih 15 je bilo *E. cloacae*, a manje *E. agglomerans* i *E. aerogenes*.

U slučaju meningitisa izazvanog *E. sakazakii*, bakterija je izolovana iz cerebrospinalne tečnosti i hrane pripremljene za odojčad. Analizom rezultata utvrđeno je da su izolati *E. sakazakii* iz hrane pripremljene za odojčad i cerebrospinalne tečnosti identični. Autori ovog rada smatraju da je jedan od izvora kontaminacije hrane za odojčad loša higijena pri pripremanju hrane. U svojim kasnijim studijama autori navode da od kada se koristi samo sterilan pribor za pripremu hrane za odojčad u narednih 8 godina nije prijavljena nijedna infekcija sa *E. sakazaki* (Muytjens & Kollee, 1990).

Arseni i sar. (1985) su prijavili slučaj septikemije novorođenčadi izazvane sa *E. sakazakii* i *K. pneumoniae* u intenzivnoj jedinici dečije bolnice. Dete je rođeno pre termina a septikemija se razvila za 3 dana. Iz pupčanog katetera je izolovan *E. sakazakii*, a obe bakterije su bile u krvi.

Ova 2 izolata su bila potpuno rezistentna na ampicilin, metilmicin, cefotaksim i amikacin. Dok je ovo dete bilo na terapiji, još par dece je bilo inficirano, ali su imali jako blage simptome.

Na Islandu su opisana tri slučaja meningitisa kod dece rođene bez komplikacija, od kojih je jedno dete bilo staro preko 3 mesec (Biering i sar., 1989). Jedno dete je lečeno kombinacijom antibiotika i preživelo je uz ogromne posledice kvadriplegije i mentalne zaostalosti. Drugo dete je imalo Daunov sindrom i umrlo je petog dana po rođenju od komplikacija infekcije sa *E. sakazakii*. Kod trećeg deteta, lečenog antibioticima, došlo je do usporenog razvoja i pojave nervnih napada. Svo troje dece je hranjeno hranom za odojčad u prahu, koja im je davana najkasnije 2 sata posle pripreme. Iz briseva uzetih iz ambijenta gde su boravila deca nije izolovan *E. sakazakii*. Iz jednog uzorka hrane pripremljene za odojčad, koja je držana u frižideru, izolovan je *E. sakazakii*. U cilju utvrđivanja izvora infekcije ispitano je više partija rehidrirane hrane za odojčad koja je inkubirana 4 sata na 36°C. *E. sakazakii* je izolovan iz 5 različitih rehidriranih partija hrane za odojčad. Ponovnim ispitivanjem hrane za odojčad u prahu je utvrđeno prisustvo koliformnih bakterija, od kojih je najviše bilo *E. cloaca* i *E. agglomerans*. *E. sakazakii* je izolovan i iz urina, kao i iz analnog brisa deteta starog 3 dana koje je imalo atipične simptome. Izolati *E. sakazakii* iz rekonstituisane hrane za odojčad, 22 od 23 izolata i izolovani u slučaju oboljenja dece su pripadali istom biotipu, a antibiotski i plazmidni profil su bili identični (Clark i sar., 1990). Na osnovu rezultata dobijenih u istraživanjima je utvrđeno da je hrana za odojčad u prahu bila izvor infekcije dece. Razvoj simptoma i težina bolesti su zavisili od više faktora. U prilog ovoj konstataciji ide i podatak da se nije razboleo brat blizanac jednog od obolele dece iako su se hranili istom hranom. Smatra se da je u ovom slučaju došlo do umnožavanja *E. sakazakii* u pripremljenoj hrani za odojčad koja je ostavljena duže vreme pri temperaturi 35–37°C.

U slučaju oboljenja 2 deteta, starosti 4 nedelje i 8 dana, došlo je do razvoja meningitisa sa nervnim posledicama i do razaranja moždanog tkiva, iako su oba deteta primala terapiju moksalaktamom. U ovim slučajevima nije utvrđen izvor infekcije dece (Willis & Robinson, 1988).

Izvor kontaminacije hrane pripremljene za odojčad može da bude i blender za pripremu hrane o čemu ima nekoliko podataka u literaturi. Simmons i sar. (1989) su opisali epidemiju septikemije i meningitisa koja je povezana sa kontaminiranom hranom za odojčad u kojoj je dokazan *E. sakazakii* u broju od 8 cfu/100 g i 48 cfu/100 g. Epidemija je bila kod nedonoščadi koji su već imali simptome bakterijemije, septikemije, infekcije urinarnog trakta, gastrointestinalnog trakta

i krvavu stolicu i proliv. Posle sprovedene istrage, utvrđeno je da je kontaminacija nastala pri pripremi hrane za odojčad u blenderu, što je potvrđeno na osnovu rezultata dobijenih mikrobiološkim ispitivanjem brisa uzetog iz blendera. Iz brisu uzetog iz blendera izolovani su *E. sakazakii*, *E. cloacae*, *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas maltophilia*. Izolati *E. sakazakii* izolovani u slučaju obolele dece i izolat iz brisa uzetog iz blendera su imali iste enzime i isti plazmide. Infekcije su prestale kada su počeli za pripremom hrane za odojčad da koriste samo sterilisane blendere (Clark i sar., 1990). Noriega i sar. (1990) opisuju slučaj 6-mesečne bebe kod koje došlo do pojave septikemije i infekcije u digestivnom traktu. Iz krvi su izolovali *E. sakazakii* i *Leuconoctoc mesenteroides*. Posle terapije ampicilinom i vankomicinom infekcija je eliminisana. Iz blendera u bolnici, koji je služio za rekonstituisanje hrane za odojčad u prahu su izolovane obe bakterije.

Gallagher i Ball (1991) su opisali slučaj deteta kod kojeg su se razvile komplikacije posle 2 dana od rođenja. Iz krvi obolelog deteta je izolovan *E. sakazakii* i terapija je sprovedena sa visokim dozama ampicilinom i cefotaksimom. Ultrazvuk i skener glave, koji su rađeni 4, 6, i 20 dana po rođenju, su pokazali ozbiljna krvarenja, abscese i oštećenja mozga. Posle 28 dana terapije, stanje se popravilo i dete je otpušteno iz bolnice. Samo 12 dana kasnije, dete je opet došlo u bolnicu sa simptomima meningitisa i skener glave je pokazao veliku kranijalnu cistu iz koje je izolovan *Staphylococcus aureus*.

U Bostonu je u periodu između januara 1995. godine i decembra 1996. godine prijavljeno pet slučajeva infekcije izazvanih sa *E. sakazakii*. U epidemiji je obolelo jedno dete od 3 godine i starije osobe od 39, 73, 76 i 82 godine starosti (Lai, 2001). Svi oboleli u ovoj epidemiji su već bolovali od neke primarne bolesti i pripadali su imunokompromitovanim grupama. Samo 2 najmlađa pacijenta su preživela uz terapiju sa gentamicinom, cefotaksimom i klindamicinom.

Van Acker i sar. (2001) su opisali 12 slučajeva nekrotičnog enterokolitisa koji su se dogodili u Belgiji 1998. godine. Kod 4 obolela deteta morala je da se radi operacija, a 2 blizanca su umrla u bolnici na intenzivnoj nezi. Svih 12 pacijenata je koristilo hranu za odojčad u prahu. Iz krvi, creva i briseva šestoro obolele dece je izolovan *E. sakazakii*. Iz preostalih pakovanja hrane za odojčad izolovano je 14 izolata koji primenom PCR metode pomoću prajmera ERIC2 (enterobacterial repetitive intergenic consensus motif) identifikovani kao *E. sakazakii*.

Burdette i Santos (2000) su opisali slučaj u Winston Salem, SAD, devojčice teške 3,3 kg, rođene u 35 nedelji trudnoće, kod koje se posle 6 dana javio apsces na mozgu, visoka temperatura, nervni napadi. Skenerom glave je zapažena nepravilnost frontalne regije mozga, a magnetnom

rezonancom su tačnije locirane lezije i šupljine. *E. sakazakii* je izolovan iz cerebrospinalne tečnosti i krvi obolele devojčice. Posle primene terapije ampicilinom, cefotaksimom i intravenozno baktrimom, urađena je kraniotomija i drenaža gnojnog apscesa. U dreniranom sadržaju je dokazan *E. sakazakii*. Ovo je bilo prvi put da je neko direktno iz apscesa na mozgu izolovao *E. sakazakii*.

Bar-Oz i sar. (2001) su prijavili više slučajeva meningitisa novorođenčadi u lokalnoj bolnici u Izraelu. Obe bebe su imale malu telesnu masu po rođenju (ispod 2 kg).

Himelright i sar. (2002) i Weir (2002) opisuju 2001. godine veliku epidemiju u Tenesiju u kojoj je obolelo 49 novorođenčadi sa simptomima nekrotičnog enterokolitisa, 10 sa septikemijom. U jednom slučaju meningitisa, iako su devet dana davani antibiotici intravenski, nastupila je smrt. Iz uzoraka stolice sedmoro dece, kod koje se nisu javili znaci bolesti, izolovan je *C. sakazakii*.

Vertikalni put transmisije (sa majku na dete) je skoro isključen, jer takvi slučajevi nisu zabeleženi, a i kod nekih žena koje su među uzorčnicima infekcija genitalnih organa imale *C. sakazakii*, nije bilo prenošenja na novorođenčad. Takođe se i smatra da skoro ne postoji mogućnost prenosa infekcije kontaktom između 2 osobe, osim što se ne može isključiti kontaminacija okoline od strane osobe koja je na neki način nosilac bakterije *C. sakazakii*, pa samim tim, indirektno unakrsna kontaminacija drugih osoba.

2.3. Antibiotička terapija

Učestalo davanje koktela antibiotika u bolnicama u kritičnim slučajevima doprinelo je razvoju multi-rezistentnih sojeva svih bakterija, kao i bakterija iz roda *Enterobacter* (Landry i sar., 1991; Ehrhardt & Sanders, 1993; Wust i sar., 1994; Borderon i sar., 1996; Pitout i sar., 1997; Sakata & Maruyama, 1997; Sanders & Sanders, 1997; Hervas i sar., 2001 i Huang i sar., 2001).

Efektivna terapija na rezistentne sojeve je ograničena, a najčešće se primenjuju fluorokinoloni i karbapenemi (Sanders & Sanders, 1997). *E. sakazakii* ima veću osetljivost na antibiotike od ostalih *Enterobacter* vrsta, pa je osetljiv na aminoglikozide, ureidopeniciline, ampicilin i karboksipenicilin (Monroe & Tift, 1979; Farmer i sar., 1980; Adamson & Rogers, 1981; Jimenez & Gimenez, 1982; Muytjens & Van der Ros-van De Repe, 1986; Willis & Robinson, 1988; Hawkins i sar., 1991; Nazarowec-White & Farber, 1999). Ispitujući osetljivost na antibiotike 10 izolata *E. sakazakii*, Farmer i sar. (1980) su utvrdili minimalne inhibitorne koncentracije za hloramfenikol (4–8 µg/ml) i za ampicilin (2–4 µg/ml).

Ispitivanjem osjetljivosti na antibiotike 24 izolata *E. sakazakii* primenom disk difuzione metode, Lai (2001) je utvrdio da je 96% ispitanih izolata bilo osjetljivo na nalidiksinsku kiselinu (30 µg), 100% na gentamicin (10 µg), 92% na streptomycin (10 µg), 100% na kanamicin (30 µg), 87% na tetraciklin (30 µg), 100% na hloramfenikol (30 µg), 100% na ampicilin (10 µg) i 87% na karbenicilin (100 µg).

E. sakazakii infekcije se najviše tretiraju ampicilinom u kombinaciji sa gentamicinom i hloramfenikolom (Lai, 2001). Terapija ampicilin-gentamicin je važeća najbolja kombinacija (Willis & Robinson, 1988).

E. sakazakii je postao rezistentan na čitav spektar penicilina i cefalosporina zbog moćnosti sojeva da luče β-laktamazu (Lai, 2001). Zbog toga su počeli da se primenjuju antibiotici treće generacije cefalosporina u kombinaciji sa aminoglikozidima ili trimetoprim-sulfametoksozolom (Lai, 2001; Weir, 2002). Lai (2001) je opisao 5 izolata *E. sakazakii* infekcije koji su bili rezistentni na cefazolin, ampicilin, cefotaksim, ceftazidim, piperacilin-tazobaktam, gentamicin, ofloksacin i cefuroksim. Jedan soj, izolovan u slučaju oboljenja 76 godina stare osobe, bio je osjetljiv samo na kombinaciju trimetoprim-sulfametoksazol i aminoglikozida. Drugi soj izolovan od istog pacijenta, bio je osjetljiv na već pomenute kombinacije antibiotika u kombinaciji sa kinolonima.

Pitout i sar. (1997) su ispitali 8 izolata *E. sakazakii* na prisustvo β-laktamaze i osjetljivost na: ampicilin, ampicilin-sulbaktam, amoksacilin-klavulansku kiselinu, tikarcilin, tikarcilin-klavulansku kiselinu, piperacilin, piperacilin-tazobaktam, aztreonam, cefalotin, cefazolin, cefoksitin, cefotaksim, cetriksazon, ceftazidim, cefepim i imipenem. Svi sojevi kod kojih su dokazali β-laktamazu su bili osjetljivi na ampicilin, cefalotin i cefoksitin, dok je divlji soj *E. sakazakii* bio osjetljiv na ampicilin, cefoksitin i cefalosporine. Svi ispitani izolati su imali istu "Bush" grupu 1 β-laktamaze (cefalosporinaza).

Block i sar. (2002) su ispitivali kliničke izolate *E. sakazakii* od 6 novorođenčadi i starije dece i kod svih su dokazali grupu 1 β-laktamaze (cefalosporinaza).

Nazarowec-White i Farber (1999) su ispitali 17 sojeva *E. sakazakii*. Pet kliničkih izolata i svi izolati iz hrane su bili rezistentni na cefalotin, a osjetljivi na ampicilin, cefotaksim, hloramfenikol, gentamicin, kanamicin, tetracikline i streptomycin.

Muytjens i sar. (1983) opisali slučaj infekcije kliničkim sojem *E. sakazakii* koji je u *in vitro* uslovima bio osetljiv na ampicilin, gentamicin, hloramfenikol i kanamicin, ali je ipak u 6 od 8 kliničkih slučajeva, terapija bila bezuspešna i pacijenti su umrli.

Muytjens i van der Ros-van De Repe (1986) su ispitali osetljivost *E. sakazakii* na 29 antimikrobnih lekove. Od 195 izolata *E. sakazakii*, 157 je bilo poreklom od potvrđenih kliničkih slučajeva. Najviše je izolata poticalo iz respiratornog trakta (35), zatim iz digestivnog trakta (31), sa instrumenata i opreme (21), iz cerebrospinalne tečnosti (17), površinskih rana (12), iz urina (9), iz gornjeg dela respiratornog trakta (9) i iz krvi (5). Većina (90%) ispitanih izolata *E. sakazakii* je bila osetljiva na male koncentracije antimikrobnih lekova ($\leq 8 \mu\text{g/ml}$). Izolati *E. sakazakii* su bili osetljivi na hloramfenikol (16 $\mu\text{g/ml}$), cefaloridin (16 $\mu\text{g/ml}$), cefsulodin (32 $\mu\text{g/ml}$), cefalotin ($> 128 \mu\text{g/ml}$) i sulfametoksazole ($> 128 \mu\text{g/ml}$). Koncentracije antibiotika za inhibiciju 90% *E. sakazakii* sojeva su bile više od dva puta manje nego one potrebne za *E. cloacae*. Kleiman i sar. (1981) su opisali slučaj infekcije kod devojčice stare 5 godina, koja je imala meningoencefalitis, a izolat je pokazao rezistentnost na cefalotin u dozi od 16 $\mu\text{g/ml}$. Naqvi i sar. (1985) su uspešno izlečili infekciju *E. sakazakii* pomoću cefotaksima.

Willis i Robinson (1988) su detaljno opisali 2 izolata *E. sakazakii* izolovanih u slučaju meningitisa potpune rezistencije na terapiju penicilin-gentamicin. Uspeh u terapiji je postignut kada je u terapiju uključen moksalaktam. Block i sar. (2002) su zaključili da nema posebne preporučene terapije, već se za svaki slučaj određuje terapija posebno po težini simptoma i na osnovu antibiograma.

2.4. Uticaj temperature na *C. sakazakii*

Za ispitivanje mogućnosti rasta *C. sakazakii* na različitim temperaturama, korišćeni su različiti supstrati, uključujući i rekonstituisano mleko u prahu za odojčad. *C. sakazakii* može da raste u širokom temperaturnom opsegu od približno 5,5 do 47°C. Rast ove bakterije se udvostručuje u hranljivijim podlogama kao što je BHI bujon i mleku u prahu za prehranu odojčadi, pri temperaturi inkubacije od 37°C za oko 20 minuta, u zavisnosti od vrste (Nazarowec-White & Farber, 1997a; Breeuwer i sar., 2003; Iversen i sar., 2004a, 2004c; Kandhai i sar., 2006). Uticaj temperature na stopu rasta opisan je proširenim korenom kvadrata po modelu Ratkowsky i sekundarnom Rosso jednačinom. Rezultirajuće minimalne i maksimalne temperature rasta dobijene ovim jednačinama iznose 3,6°C i 47,6°C (Kandhai i sar., 2006). Temperatura 3,6°C je više teorijska granica, a rast na toj temperaturi nije se praktično pokazao u vremenski ograničenim eksperimentima. U istoj studiji, spori rast bakterije *C. sakazakii* u formuli za

odojčad u prahu, kao i na podlozi za obogaćenje, istražena je detaljnije i pokazalo se da na optimalnoj temperaturi za rast, bakterije brzo počinju da rastu nakon rekonstitucije, a odlaganje rasta bilo je približno 1,7 sata na 37°C. Ovo odlaganje u podlozi za obogaćenje očigledno nije lag faze izolata. Značaj ovih karakteristika u vezi sa rastom ubrzo su uočili eksperti institucija kao što su Evropskog udruženja za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i nutricionizam, *Food Standards Agency* Velike Britanije, *Food and Drug Administration* SAD-a i Svetske zdravstvene organizacije. Ove insitucije su dale konkretna uputstva za pripremu mleka u prahu, kako bi se sprečio rast *C. sakazakii* nakon rekonstitucije, npr. mleko u prahu za prehranu odojčadi bi trebalo da bude sveže pripremljeno neposredno pre hranjenja bebe (Agostoni i sar., 2004; Food Standards Agency, 2005; Organizacija za hranu i poljoprivredu -FAO i Svetska zdravstvena organizacija -WHO, 2008).

Farmer i sar. (1980) su ispitivali 57 izolata *E. sakazakii* i svi su pokazali rast na 25°C i 45°C. Nijedan izolat nije rastao na 4°C ili 50°C, dok je na temperaturi od 47°C, 7 (12%) ispitanih izolata i dalje uvećavalo svoju populaciju. *C. sakazakii* i *Klebsiella pneumoniae* rastu brže u rekonstituisanoj formuli za odojčad od *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium terrae* i *Candida albicans* (Kindle i sar., 1996). Nazarowec-White & Farber (1997c) su pokazali da svih 12 ispitanih sojeva *E. sakazakii* raste na temperaturama između 41°C i 45°C. Breeuwer i sar. (2003) su ispitivali 22 soja *E. sakazakii*, i svi su pokazali rast u BHI bujonu na 47°C.

Brzo hlađenje formule za odojčad posle rekonstitucije, jedan je od najboljih načina za suzbijanje rasta bakterije *E. sakazakii*. Da bi se dobile informacije o potencijalu rasta *E. sakazakii* tokom hlađenja i skladištenja, izmerena je stopa smanjivanja temperature u mleku u prahu za odojčad (Kandhai, 2006). Rezultati ove studije pokazuju da rekonstitucija na 40°C, a kasnije i skladištenje u standardnim frižiderima u domaćinstvima, nije zaustavilo povećanje od skoro 1-log jedinice bakterije *E. sakazakii* u roku od 24 sata. Osim toga, korišćenje veće gramaže istog uzorka rekonstituisane formule znatno je produžilo vreme potrebno da se dostigne temperatura frižidera i samim tim se povećala mogućnost za rast *E. sakazakii*. Opstanak različitih izolata *E. sakazakii* ispitan je na temperaturi od 4°C (Breeuwer, 2003). Na petri ploči pri temperaturi od 4°C, *E. sakazakii* kolonije opstale su kraće od kolonija *E. coli*, *Klebsiella* spp. i *Salmonella* spp., ali su se ipak održale najmanje 140 dana. U tečnoj podlozi, kada je za eksperimentalnu kontaminaciju korišćena kultura *C. sakazakii* u stacionarnoj fazi, *C. sakazakii* je ostao održiv na 4°C duže od 210 dana. Kada je za eksperimentalnu kontaminaciju korišćena kultura *C. sakazakii* u ekspanzionalnoj fazi pri temperaturi od +4°C broj *C. sakazakii* su lagano smanjivao tokom

ispitivanja i 210. dana nije više bilo vitalnih ćelija koje su mogle da rastu na hranljivoj podlozi, a pri temperaturi od 8°C *C. sakazakii* je opstao duže od 210 dana.

Otpornost na toplotu bakterije *E. sakazakii* je bila tema istraživanja nekoliko timova autora (Nazarowec-White & Farber, 1997b; Breeuwer i sar., 2003; Edelson-Mammel & Buchanan, 2004c; Iversen i sar., 2004a). Najvažniji zaključci ovih ispitivanja su da je otpornost na toplotu izolata *E. sakazakii* veoma različita i da postoji, kako se čini, podgrupa izolata sa većom tolerancijom na toplotu (prosečna D vrednost na 58°C je 9,9 min) u odnosu na većinu *Enterobacteriaceae* (Edelson-Mammel & Buchanan, 2004b). U pratećem istraživanju pokazalo se da su sojevi u ovim termotolerantnijim podgrupama proizveli protein homologan proteinu u termotolerantnoj bakteriji *Methylobacillus flagellatus* (Williams i sar., 2005). Ostaje da se potvrdi da li taj protein zaista povećava otpornost na toplotu. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da se će i najotporniji soj *E. sakazakii* biti redukovan za više od 8-log jedinica standardnim postupkom pasterizacije (15s na 72°C). Slično tome, smanjenje od 5-log jedinica bakterije izračunato je u studiji u kojoj je *C. sakazakii* stavljen na 68°C na 16s (Nazarowec-White i sar., 1999). Iz ovih podataka, eksperti Svetske zdravstvene organizacije je zaključili da se *E. sakazakii* brzo inaktivira na temperaturama iznad 70°C, i u celju smanjenja rizika od nalaza *E. sakazakii* u rekonstituisanom PIF-u preporučuje korišćenje ove temperature pri pripremi infant formula za odojčad (WHO, 2004, 2006).

Rekonstruisana formula je posebno dobra podloga za rast bakterija roda *Cronobacter* (Nazarowec-White & Farber 1997b; Iversen i sar. 2004b; Gurtler & Beuchat 2007) i zato postoji velika potreba da se ova bakterija u potpunosti eliminiše ili bar kontroliše mogućnost rasta. Jedan od načina smanjenja potencijalno prisutne bakterije u formuli u prahu jeste upotreba vode za rekonstrukciju mleka temperature preko 70°C, jer su rezultati istraživanja pokazali da u ovim uslovima može doći će do redukcije broja za više od 4 log cfu/ml (Edelson-Mammel & Buchanan, 2004c).

Jedna od mogućnosti inaktivacije *C. sakazakii* je i primenom monokaprilinom, obzirom da rezultati ukazuju da je primenom monokaprilonu na mešavinu 5 sojeva u rekonstituisanim formulama zaustavljen rast vegetativnih oblika izolata posle 24 sata inkubacije (Nair i sar. 2004).

Gurtler i Beuchat (2007) su dokazali antimikrobnu aktivnost sistema laktoperoksidaza na uzorcima u koje su dodati *Cronobacter* sojevi i inkubirani su na 21°C, 30°C i 37°C u formulama za odojčad u prahu.

Kompletna inhibicija bakterija roda *Cronobacter* u rekonstituisanim formulama za odojčad na temperaturama od 12°C, 24°C i 37°C se može postići dodavanjem bakteriofaga, ali u visokim dozama i do 10⁹ bakteriofaga/ml. Alkohol, fenolna kiselina i kvaternarna amonijačna jedinjenja pokazuju različite efekte na bakterije roda *Cronobacter*, koji zavise od vremena dejstva i kao i od toga da li se bakterija nalazi u matriksu hrane, da li je na nekoj radnoj površini, da li je formirala biofilm ili ne. Dezinficijensi koji se danas koriste rutinski u bolnicama, menzama i kuhinjama u vrtićima, su potpuno neefikasni kada je reč o bakterijama roda *Cronobacter*, jer ne deluju na biofilmove koji se stvaraju na površinama, posuđu, flašicama, itd (Kim i sar. 2007).

U toku proizvodnje formule za odojčad, podaci ispitivanja otpornosti na toplotu pokazuju da *C. sakazakii* neće preživeti prve postupke obrade, uključujući i postupak pasterizacije. Shodno tome, treba naglasiti da je tokom proizvodnje neophodno sprečiti kontaminaciju nakon postupka pasterizacije, dakle unakrsnu kontaminaciju iz okruženja fabrike ili preko suvih sastojaka koji se dodaju u gotovu formulu nakon procesa pasterizacije.

2.5. Otpornost na promene pH vrednosti

Nema mnogo objavljenih informacija o otpornosti *C. sakazakii* na kiselu sredinu. Modelne projekcije Nestle istraživačkog centra pokazuju da minimalna pH vrednost za rast u tripton soja bujonu sa HCl kiselinom na temperaturi od 30°C iznosi oko 3,9 (Lambert-Legace, 1982). Međutim, pri ovoj kiselosti vreme za uočavanje rasta je bilo veoma dugo (> 5 dana da postignu optičku gustinu od 0,2 pri 600 nm, počev od nivoa inokulacije 10⁵ cfu/ml). Tek pri pH od 4,3 početak rasta je uočen posle 20 sati. Ipak, u pirinačnim žitaricama za prehranu odojčadi rekonstituisanim u soku od jabuke pri pH od 4,3 na 30°C, rast *E. sakazakii* nije mogao biti detektovan tokom 72h (Richards i sar., 2005). Ovo je verovatno posledica prisustva drugih faktora inhibicije (npr. jabučne kiseline) u rekonstituisanoj mešavini žitarica. U praksi, povećavanje kiselosti je koncept koji se dobro pokazao za suzbijanje rasta patogenih bakterija iz familije *Enterobacteriaceae*. Ovo je ilustrovano u ispitivanju patogenih bakterija (uključujući i *C. sakazakii*) u mleku u prahu za prehranu odojčadi. Pokazalo se da kiselost dobijena dodavanjem mlečne kiseline (ili fermentacijom) na pH < 5 ima snažno bakteriostatsko dejstvo (Joosten & Lardeau, 2004).

E. sakazakii je pokazao otpornost na niske vrednosti pH. Edelson- Mammel & Buchanan (2004a) su ispitivali 12 sojeva *E. sakazakii* u tripton soja bujonu kome je smanjena pH na 3,0 i 3,5 dodavanjem HCl. Deset od 12 sojeva je smanjilo svoj broj za manje od 1 log jedinice posle 5 sati na 37°C; na pH 3,0 smanjenje je bilo za 4,9 do 6,3 log cfu/ml. Nije dokazana veza između termorezistnosti ispitivanih sojeva i otpornosti na niske pH <3,0 (Edelson-Mammel & Buchanan, 2004c).

Skladal i sar. (1993) su ispitivali fermentaciju mleka kome je dodato 10 – 15 cfu kulture *E. sakazakii* u 500 ml mleka i inkubirano je na 30°C. Pratili su promene pH, lučenje L-laktata i D-laktata. *E. sakazakii* je brzo fermentisao mleko, smanjujući pH od 6,6 do 5,6 za manje od 20 sati. Za to vreme, koncentracije L-laktata i D-laktata su dostigle 0,40 mM i 10,7 mM.

2.6. Lipid A

Lipid A je hidrofobni deo lipopolisaharida spoljne membrane gram negativnih bakterija (Wang & Quinn, 2010). U okviru njega se nalazi TLR4/MD2 receptor koji je pokretač imunog sistema, učestvuje u inicijaciji zapaljenjske reakcije dovodeći do preterane produkcije citokina koja može dovesti do septičkog šoka (Miller i sar., 2005; Triantafilou, M.& Triantafilou, K., 2005; Raetz i sar., 2006).

Cronobacter sakazakii sintetiše 2 vrste lipida A, ali način još nije tačno definisan (Zhang i sar., 2010; Chen i sar., 2011). Cai i sar. (2013) su otkrili 3 gena koji su odgovorni za sintezu lipida A: ESA02293, ESA02951 i ESA01386 koji kodiraju ključne aciltransferaze koje omogućavaju biosintezu lipida A. Oni su takođe i dokazali da su broj i dužina acil lanaca u lipidu A važni za prepoznavanje i vezivanje za TLR4/MD2 receptor lipopolisaharidnog omotača, ove aciltransferaze mogu da se koriste za proučavanje imunog odgovora na prisustvo bakterije *C. sakazakii*.

2.7. Opstanak *C. sakazakii* u mleku u prahu za prehranu odojčadi

Opstanak *C. sakazakii* u PIF i njegov potencijal razmnožavanja u rekonstituisanom mleku u prahu povećavaju rizik oboljevanja kod odojčadi. Jedan od pokazatelja da *E. sakazakii* može da opstane pri niskoj aktivnosti vode je njegoova česta izolacija iz formule za odojčad u prahu (Muytjens i sar., 1988). Osim toga, nivo *E. sakazakii* bakterije u veštački kontaminiranom mleku

u prahu za prehranu odojčadi opao je samo za 3 log jedinice tokom 1,5 godine (Edelson-Mammel i sar., 2005).

Vegetativni oblici *E. sakazakii* u stacionarnoj fazi pokazuju mnogo veću otpornost na promenu osmotske koncentracije i na sušenje nego ostale *Enterobacteriaceae*. Ostala ispitivanja pokazala su da *E. sakazakii* opstaje duže pri promeni osmotskog pritiska i sušenja vazduhom nego npr. sojevi *E. coli*, *Salmonella* i *Citrobacter* spp. (Breeuwer i sar., 2003). Slično ispitivanje pokazalo je da bakterija može da opstane više od 2 godine u formuli za odojčad u prahu (Caubilla-Barron i Forsythe, 2007).

Gurtler i Beuchat (2007) su proučavali opstanak *C. sakazakii* u pirinčanim pahuljicama (a_w 0,3-0,69) i formuli za odojčad u prahu (a_w 0,25-0,5). Rezultati ovog eksperimenta pokazuju da je povećanje aktivnosti vode uticalo na ubrzano smanjenje broja vegetativnih oblika bakterija. Više vegetativnih oblika je nađeno u formuli za odojčad u prahu čija je $a_w = 0.25-0.30$, nego u formulama koje su imali višu aktivnost vode $a_w = 0.43-0.50$ na temperaturama od 21°C i 30°C.

Dalje naznake dobrog opstanka u suvim sredinama su prisustvo *E. sakazakii* u više od 30% usisivača u domaćinstvima ($n = 16$) (Kandhai i sar., 2004) i u šest od sedam usisivača u drugom istraživanju (Breeuwer, 2003). Ovi rezultati jasno ukazuju na relativnu otpornost *E. sakazakii* pri suvim uslovima i može se pretpostaviti da upravo ova karakteristika doprinosi povećanoj učestalosti pojave ove bakterije u mleku u prahu za prehranu odojčadi.

Mehanizam kojim *C. sakazakii* opstaje u suvim sredinama nije potpuno jasan. Analiza polimorfizma dužine fragmenata DNK ekstraktovanog posle isušivanja ukazuje na to da na opstanak *C. sakazakii* bakterije u suvim uslovima utiče grupa funkcionalno različitih gena na nivou genoma. Međutim, nijedan poseban mehanizam zaslužan za rezistenciju bakterije *C. sakazakii* nije se mogao uočiti. Pretpostavlja se da je trehaloza zaslužna za rezistenciju, jer se ova kompatibilna rastvoriva supstanca intenzivno akumulira pri izloženosti bakterije suvoj sredini (Breeuwer i sar., 2003). Postoji najmanje tri načina kojima dolazi do biosinteze trehaloza, ali najčešći način kod bakterija je OtsA-OtsB. Trehaloza se sintetiše iz uridin difosfat glukoze (UDP-glukoze) i glukoze 6-fosfata. U ispitivanju koje su sproveli Diep i Breeuwer (2006), blokiran je *otsA* gen koji kodira sintazu trehaloze u *E. sakazakii* i *Escherichia coli* i poredio se opstanak mutiranih i divljih tipova sojeva u suvoj sredini. Suprotno svim očekivanjima, oštećena sinteza trehaloze mutiranih *otsA* sojeva nije uticala na opstanak *C. sakazakii* pri sušenju. Međutim, ista mutacija u *E. coli* dovela je do osetljivosti ove bakterije u suvim sredinama. Ovo

sugerirše na to da *C. sakazakii* ima mehanizme da nadoknadi gubitak trehaloze, ali potrebna su dodatna istraživanja da bi se ovo tačno utvrdilo.

Druga hipoteza je da na opstanak u suvoj sredini utiču ekstracelularni polisaharidi (EPS). Ispitivani su i uticaji različitih faktora na formiranje egzopolisaharida *E. sakazakii*. Heteropolisaharid *E. sakazakii* je prvo pronađen u čaju i prijavljen je kao „čaj-polisaharid”. Najbolja sinteza heteropolisaharida je utvrđena kod soja ATCC *E. sakazakii* 53017 koji je izolovan iz tradicionalnog zelenog čaja sušenog na suncu par dana. Osnovne razlike kompleksa rastvora sa i bez egzopolisaharida su bile u viskoznosti i formiranju gela zahvaljujući prisutnim trovalentnim jonima. Odnos ugljenik/azot je modifikovan da bi se izjednačila sposobnost formiranja EPS u podlozi. Najveća količina EPS formirana je u podlozi sa dodatom glukozom na temperaturi inkubacije od 27°C. Najbolja podloga za formiranje EPS bakterije *E. sakazakii* je hranjivi bujon kod koga je odnos ugljenik/azot 20.2:1 i gde je izvor ugljenika glukoza (15 g/l). Izvor ugljenika je važan za produkciju EPS, glicerol je najbolji, a lošiji izvori su maltoza, fruktoza, sukroza, glukoza, manoz, galaktoza, etanol i ksiloza. Izvori azota za EPS po opadajućem redu su: L-glutamin, D,L-alanin, ekstrakt kvasca + izolat kazeina, kazein hidrolizat, urea, NO₃⁻ i NH₄⁺. Produkcija EPS *E. sakazakii* počinje posle 4 sata u eksponencijalnoj fazi rasta i svoj maksimum ima posle 18 sati, što se poklapa sa povećanjem viskoznosti podloge u kojoj se razmnožava. Pri poređenju sa *Arthrobacter viscosus*, *E. sakazakii* ima veću viskoznost i koncentraciju heteropolisaharida za 0,25%. Kada je koncentracije heteropolisaharida 1%, viskoznost rastvora *E. sakazakii* je oko 2.500 mPa·s u odnosu na 1.000 mPa·s viskoznosti polisaharida *A. viscosus* (Scheepe-Leberkuhne & Wagner, 1986).

Harris i Oriol, su 1989. godine dobili nagradu i patentirali (broj patenta: US 4806636 A) način pravljenja heteropolisaharida od strane *E. sakazakii*. Korišćeni su sojevi: *E. sakazakii* ATCC 53017, *E. sakazakii* ATCC 29004 i *E. sakazakii* ATCC 12868. Sastav polisaharida je sa malim varijacijama: 13 do 22% je L-frukoza, od 19 do 24% težine je D-galaktoza, od 23 do 30% je D-glukoza, 0 do 8% čini D-manoza, 29 do 32% težine je glukuronska kiselina. Sve sposobnosti da stvara heteropolisaharid nestaju na pH većim od 10. Heteropolisaharid se najviše proizvodi na Castenholtz podlozi, čija je pH= 7,2. Da bi došlo do polimerizacije u modifikovanu Castenholtz podlogu se inokuliše *E. sakazakii* i sve se inkubira 24 sata na 30°C, posle čega cela podloga postane potpuno gelasta, viskoelastična, tako da se vraća brzo u prvobitno stanje ako je povučete. Heteropolisaharidi koje proizvodi *E. sakazakii* su viskozno-elastični, koriste se za smanjenje otpora tečnosti. Potrebna je koncentracija od samo 0,01 do 2,0% da se smanji otpor tečnosti i da se ubrza protok kroz cevi, sisteme, što je od velikog značaja za vodovode,

navodnjavanje, gašenje požara, prolazak spreja pri primeni herbicida i pesticida (Harris & Oriel, 1989).

Heteropolisaharidi imaju veliku primenu: pomažu suspenziju, učvršćavanje, to su faktori stabilizacije u vodenim sistemima. Heteropolisaharidi kao što je ksantan guma koju proizvodi *Xanthomonas* se koriste kao gelovi u deterdžentima, rastvarači i stabilizatori u skrobu, bojama, petroleumu i kao stabilizator i redukciono sredstvo u industriji hrane. *K. pneumoniae* i *Bacillus polymyxa* takođe proizvode heteropolisaharide koji su patentirani i zaštićeni.

Cijanobakterijski *Nostoc commune* soj i EPS brzo upijaju vodu i okolnu vlagu. Čelije uronjene u EPS *Nostoc* soja odolevale su isušivanju. Osim toga, uklanjanje ćelija iz EPS-a rezultiralo je njihovom osetljivošću na suve uslove. *C. sakazakii* može da proizvede EPS koji ima strukturu sličnu celulozi i kolanskoj kiselini. Heteropolisaharidna kapsula bakterije *C. sakazakii* omogućava joj stvaranje biofilмова na površinama, otpornost na dezinficijense i pomažu preživljavanje u formuli za odojčad i do 24 meseca (Iversen & Forsythe 2003; Lehner i sar. 2005; Grimm i sar. 2008).

E. sakazakii raste u kontaktu sa manje od 1M NaCl na mezofiličnom rastu temperature. Na 45°C bakterija i dalje dobro raste u kontaktu sa 0,5 M NaCl (Guillaume-Gentil i sar., 2005). Pomoću ove korisne informacije dolazi do boljeg razvoja specifičnih selektivnih podloga za izolovanje *Cronobacter sakazakii*, pošto najrelevantnija konkurentna flora, poput *Citrobacter* spp, *Serratia* spp, *Pantoea agglomerans* i *Escherichia vulneris* ne rastu pod tim uslovima.

2.8. Formiranje biofilma

Biofilmovi se definišu kao veća količina bakterijskih ćelija vezane za površinu i međusobno, pomoću polimernih supstanci koje proizvodi sama bakterija (Marshall, 1992; Kumar i sar., 1998). Vezivanje za površine žive i nežive okoline, pomaže ćelijama bakterije da prežive stresne promene sredine i daju joj veću otpornost na dezinfekciona sredstva (Kumar i sar., 1998; Norwood i sar., 2000; Frank i sar., 2003; Ryu & Beuchat, 2005). Faktori koji mogu da utiču na formiranje biofilma su: hranljiva vrednost, pH sredine, osobine bakterije, ali i površine na kojima se formira biofilm (Frank, 2001). Za bakteriju *C. sakazakii* je utvrđeno da formira biofilmove na silikonu, lateks materijalu, polikarbonatu, nerđajućem čeliku, staklu i polivinilhloridu (Lehner i sar. 2005).

Formula za mleko u prahu, kao i različite površine, posude, blenderi i ambalaža za pripremu formule pre konzumacije su pogodne za formiranje biofilma i upravo su biofilmovi bili razlog i

izvor infekcije (Muyetens i sar., 1983; Simmons i sar., 1989; Noriega i sar., 1990; Bar-Oz i sar., 2001). Ponovna upotreba cevčica za enteralno hranjenje i kesa sa pripremljenom hranom posle upotrebe povećava rizik od infekcije, pa se preporučuje upotreba sredstava za jednokratnu upotrebu (Oie i sar., 2001).

Biofilm može da se formira i na svežim biljkama, posebno na svežem voću i povrću tokom rasta, ali i u fazama skladištenja, prerade i transporta, što povećava potencijalni rizik od zaraze pojedinaca koji mogu da konzumiraju ove proizvode (Beuchat, 2002).

2.9. *Cronobacter* spp. u životnoj sredini i hrani

Prirodno stanište *Cronobacter* spp. je trenutno nepoznato. Ova bakterija se može naći u okruženju, ali i u hrani (Iversen i sar., 2004e).

Usled povezanosti *C. sakazakii* i neonatalnih oboljenja, ovaj mikroorganizam je prvenstveno povezuje sa korišćenjem kontaminiranog mleka u prahu za ishranu odojčadi. Međutim, *C. sakazakii* je široko rasprostranjen u životnoj sredini i hrani, a najverovatnije prvobitno poreklo mikroorganizma su voda, zemljište i biljke, koje omogućavaju stalno preživljavanje ovog uzročnika ukoliko se nađe u određenom distriktu (rejonu) (Lehner, 2009). Na osnovu nekih fizioloških svojstava ovog mikroorganizma, verovatno je da mu je ekološka niša na nekom biljnom materijalu (Iversen & Forsythe, 2004e). Ove fiziološke karakteristike pomažu u opstanku u toj sredini i uključuju sposobnost proizvodnje žutog pigmenta, koji štiti ćelije od UV zračenja na suncu, kapsularnu građu i formiranje fimbrije koji pomažu pri prijanjanju za površine i sposobnost odolevanja isušivanju tokom dugih sušnih perioda od preko 2 godine (Caubilla-Baron & Forsythe, 2007). Ovo objašnjava zašto je ovaj mikroorganizam izolovan iz različitih biljnih proizvoda i namirnica, uključujući žitarice, krompirovo brašno, testenine, lekovito bilje i začine. Ove osobenosti mogu da budu i dodatna pomoć u opstanku ovog mikroorganizma tokom proizvodnje formula za odojčad u prahu ili u domaćim sredinama.

Takođe, *C. sakazakii* je izolovan iz niza mlečnih proizvoda (sir, mleko pasterizovano na jako visokoj temperaturi, mleko u prahu, formule za odojčad) i proizvoda koji ne sadrže mleko (fermentisani hleb, tofu sir, kiseli čaj), uključujući i meso (suvomesnati proizvodi, mleveno meso i kobasice). Gassem je u istraživanju 1999. godine, pronašao *C. sakazakii* u Khamir hlebu, budući da je bakterija deo flore na površini semena kineske šećerne trske. Takođe je izolovan iz semena pirinča, zelene salate, klice lucerke i paradajza. U ispitivanju preko 500 uzoraka hrane za životinje i namirnica, pokazalo se da veliki deo (~ 25%) biljaka i začina sadrži *C. sakazakii*

(Iversen & Forsythe, 2004e). Pregledom 150 uzoraka čajeva sa tržišta iz Srbije, *C. sakazakii* je izolovan iz 48 (32%) ispitanih uzoraka biljnih čajeva (Stojanović i sar., 2011).

Enterobacter sakazakii je takođe izolovan iz mleka u prahu, sira, hrane za odojčad, mlevenog mesa, goveđe kobasice i povrća (Leclercq, 2002; Iversen i sar., 2004). Pored toga, pronađen je u vinskoj mušici (Kuzina i sar., 2001; Leclercq i sar. 2002). *E. sakazakii* je izolovan iz širokog spektra kliničkog materijala, uključujući cerebrospinalnu tečnost, krv, koštanu srž, sputum, urin, tkiva kod apendicitisa, iz crevnih i disajnih puteva, očiju, uha, rana, i fekalija. Takođe je izolovan iz briseva sa svih površina u bolnicama (Masaki i sar. 2001).

Iako su izvedena obimna istraživanja sa ciljem da se utvrdi izvor infekcije ljudi, ona do danas nisu bila dovoljna da se objasni prirodno stanište *Cronobacter* spp. Međutim, najveći broj istraživača je utvrdio da je u slučajevima oboljenja odojčadi izazvanih ovim mikroorganizmom izvor infekcije bila početna formula za odojčad u prahu. Sredina u želucu novorođenčadi, posebno prevremeno rođene dece je slabije kisela nego kod odraslih osoba, što bi moglo doprineti razvoju infekcije *Cronobacter* spp. kod odojčadi (Kien i sar., 1987).

Cronobacter spp. je izolovan u objektima za proizvodnju početnih formula za odojčad, što navodi na zaključak da kontaminacija početnih formula za odojčad može da nastane iz okruženja u pogonu za proizvodnju nakon pasterizacije uključujući sušenje i pakovanje. Nalaz *Cronobacter* spp. u fazi posle sušenja bi se mogao dovesti u vezu sa povećanom otpornošću ovog mikroorganizma na osmotski stres i sušenje (Breeuwer i sar., 2003; Riedel & Lehner, 2007; Arku i sar., 2008). *Cronobacter* spp. u početne formule za odojčad može dospeti i putem vazduha.

U cilju utvrđivanja potencijalnih izvora kontaminacije Reich i sar. (2010) su ispitali 867 uzoraka uzetih u objektu za proizvodnju početnih infant formula koji su obuhvatili prah iz ciklona i sita za prosejavanje mleka u prahu, uzorke otpadnih voda i briseve sa površina koje dolaze u kontakt sa proizvodom. Prisustvo *Cronobacter* spp. su utvrdili u 35 uzoraka uzetih sa 14 od 35 ispitivanih mesta. Najčešće su *Cronobacter* spp. dokazali u prahu iz ciklona (28%), dok je u prahu sa sita za prosejavanje dokazan u 10,7% uzoraka. *Cronobacter* spp. je dokazan i u uzorcima uzetim sa linija za punjenje početnih formula za odojčad.

U cilju sprečavanja kontaminacije u objektima za proizvodnju početnih formula za odojčad, kako u visokorizičnim zonama tako i u nisko rizičnim zonama vazduh treba da bude strogo kontrolisan. Prašina se generiše tokom različitih tehnoloških postupaka, a kapljice vode nastaju tokom operacija čišćenja i pranja. Klima sistem u visokorizičnim zonama treba da obezbedi

odgovarajući kvalitet vazduha i nadpritisak koji sprečava prodiranje spoljašnjeg vazduha. Nesporogeni mikroorganizmi se mogu naći u kapljicama vode ili u česticama prašine (Drudy i sar. 2006).

Zbog specifičnih osobina ove bakterije i činjenice da stvara biofilme, u fabrikama se lako zadržava na svim površinama u proizvodnji. 2002. godine je pronađen u klimatskim sistemima u tragovima i na brisevima sa radnih površinama u prostorijama za pripremu hrane za bebe, ali u nedovoljnoj količini da bi se sa sigurnošću tvrdilo da je to bio glavni uzrok infekcija u određenim bolnicama. Kontaminirane posude u kojima se priprema hrana za bebe, blenderi i kašike, kao i produženo čuvanje rekonstituisanih formula u grejačima za flašice su značajno povećali obim infekcija i doprineli su širenju zaraze koja može da ima fatalne posledice kod novorođenčadi (Jaspar i sar., 1990;. Noriega i sar., 1990; Bar-Oz i sar., 2001; Block i sar., 2002).

U jednom nemačkom istraživanju bakterijske flore ispranih krigli piva, *E. sakazakii* je pronađen kao uobičajeni mikroorganizam, što pokazuje da nehigijensko pranje sudova može da ima važnu ulogu u epidemiologiji klinički relevantnih mikroorganizama (Schindler i Metz, 1990).

Dva izveštaja dokumentovala su izolaciju *E. sakazakii* iz pacova u Keniji (Gakuya i sar., 2001) i iz meksičke voćne mušice u Kaliforniji (Kuzina i sar., 2001). Uprkos listi kontaminiranih namirnica i drugih izvora, učestalost kontaminacije se ne zna, pa se samim tim i rizik od izloženosti ne može pouzdano odrediti.

Iversen i Forsythe (2003) su prvi definisali strategiju i konkretne mere da bi se smanjila kontaminacija formule za odojčad u prahu sa *C. sakazakii*. Preporučeni su strogi higijenski kriterijumi, provera okoline fabrika, provera ulaznih sirovina i povećana kontrola finalnog proizvoda, zajedno sa posebnim uputstvima za pravilnu upotrebu i rekonstruisanje formule pre konzumacije.

Mala doza Gama zračenja takođe može biti letalna za *C. sakazakii* koji se nalazi u okruženju, pa se čak može koristiti i za eliminaciju ovog uzročnika u formuli za odojčad u prahu, ukoliko se to zakonski odobri (Osaili i sar., 2007a).

2.9.1. *Cronobacter sakazakii* u formuli za odojčad u prahu - način kontaminacije

Iako način prenosa nije uvek jasan, kontaminirana formula za odojčad je potvrđeni izvor *C. sakazakii*. Takva kontaminacija predstavlja ozbiljnu opasnost za novorođenčad zbog visoke stope morbiditeta i ponekad i mortaliteta (Bowen & Braden, 2006; Forsythe, 2008). Pored toga,

Postupa i Aldova (1984) su izolovali dva soja *E. sakazakii* iz formule za odojčad i decu do 6 meseci u tadašnjoj Čehoslovačkoj. Clark i sar. (1990) istraživali su dva nepovezana slučaja koji su uključivali meningitis i bakterijemiju i otkrili da su sve žrtve dovedene u vezu sa određenom formulom za prehranu odojčadi i dece do 6 meseci starosti. Za razliku od gotovih tečnih formula, one u prahu nisu sterilne. Jedan od sojeva, koji su Farmer i sar. koristili za definisanje *E. sakazakii* (1980), bio je soj koji je prvobitno Thornlei (1960) izolovao iz mleka u prahu. *E. sakazakii* je verovatno bio prisutan u proizvodima od mleka u prahu decenijama, uključujući i 1958. godinu kada je prijavljen prvi slučaj *C. sakazakii* meningitisa (Urmenyi & Franklin, 1961).

Poznate su dve glavne putanje kojima *C. sakazakii* može da se nađe u rekonstituisanoj formuli za odojčad u prahu:

1. unutrašnjom kontaminacijom, putem kontaminiranih sastojaka dodatih posle sušenja ili putem kontaminirane sredine pri preradi sastojaka posle sušenja i pre pakovanja, i / ili
2. spoljašnjom kontaminacijom formule tokom rekonstituisanja i rukovanja (npr. loše očišćenim priborom).

Muytjens i sar. (1988) sproveli su istraživanje prisutnosti bakterije *E. sakazakii* u komercijalno prisutnim formulama za odojčad u prahu. *Enterobacter* vrste su pronađene u više od polovine 141 ispitanih formula iz 35 različitih zemalja. Pored toga, *Pantoea agglomerans*, *E. cloacae*, *C. sakazakii* i *Klebsiella pneumoniae* bile su najčešće izolovani mikroorganizmi. Dvadeset od 141 uzoraka bilo je iz 13 od 35 zemalja. Dalja istraživanja o *Enterobacteriaceae* u formulama za odojčad u prahu i mleku u prahu potvrdila su ovaj spektar mikroorganizama (Iversen & Forsythe, 2004f).

Broj bakterija koji su utvrdili Muytjens i sar. (1988) bio je ispod dozvoljene granice od 1 cfu/g praha, svi uzorci su bili u skladu sa mikrobiološkim pravilima tog vremena i prema zahtevima Međunarodne komisije za mikrobiološke specifikacije za hranu (ICMSF) (<http://www.nap.edu/books/O309034973/152.html>). Zapaženi nivo *C. sakazakii* kretao se od 0,36 do 66 cfu/100 g. Evropska Unija (EU) revidirala je ove kriterijume tokom 2005. godine i u procesu su revizije od strane Codex Alimentarius Komisije. Prema kanadskom istraživanju o učestalosti pojave *E. sakazakii* u formulama za odojčad u prahu uzetih sa tržišta, izolovan je uzročnik u 8 od 120 konzervi (6,7%) pet različitih proizvođača, a broj bakterija je bio 0,36 cfu/100 g (Nazarowec-White i sar., 1999).

Nakon povećanja svesti o bakteriji *C. sakazakii* i stepenu rizika o mogućnosti kontaminacije formule za odojčad u prahu, objavljena su brojna istraživanja. Za istraživanja korišćene su različite metode identifikovanja i određivanja zapremine uzoraka. Ipak, učestalost uočenog *C. sakazakii* se kretala od 2 do 14%. Samo tri izveštaja odredila su koncentraciju ovog mikroorganizma između 0,2 i 92 cfu/100g (Santos, 2006). *C. sakazakii* nikada nije prijavljen na nivou većem od 1 cfu/g. Ovo je približno količini od 8 ćelija/100g, kako su procenili Simmons i sar. (1989) za jednu otvorenu konzervu formule za odojčad korišćenu tokom neonatalnog perioda.

C. sakazakii u formulu za odojčad u prahu može doći iz kontaminirane vode, sirovine, naknadne kontaminacije od nosioca (rezervoara) ili okoline. Postoji i zabluda da je flaširana voda sterilna. Schindler (1994) je istražio 54 proizvođača mineralne, izvorske i stajaće vode i pronašao *E. cloacae* u 17 uzoraka, kao i *E. amnigenus* u 11 uzoraka.

Pored kontaminacije u objektu za proizvodnju početnih formula za odojčad, posle pasterizacije, može nastati i kontaminacija tokom rekonstituisanja početnih formula za odojčad (sa pribora koji se koristi za rekonstituisanje) i tokom dalje manipulacije (čuvanje više sati posle rekonstituisanja pri sobnoj temperaturi).

2.9.2. Mere higijene i upravljanja bezbednošću pri proizvodnji početne formule za odojčad u prahu

Koncepti upravljanja bezbednošću hrane (Analiza hazarda i kritične kontrolne tačke) i preduslovni programi koji moraju biti zadovoljeni tokom procesa (Dobra higijenska praksa, Dobra proizvođačka praksa, itd.) proizvodnje početne formule za odojčad (infant formulae) u prahu su definisani u dokumentima FAO/WHO (2004 i 2006). U cilju osiguranja bezbednosti početnih formula za odojčad i praćenje higijene u procesu proizvodnje Codex Alimentarius Komisija je preporučila da se za ocenu bezbednosti početnih formula za odojčad primenjuje plan dve klase. Prema ovim preporukama u početnim formulama za odojčad, koje su stavljene u promet, ne sme biti *Cronobacter* spp. ni u jednoj od 30 jedinica uzorka od 10 g ($n = 30$, $M =$ odsustvo u 10 g, $C = 0$). U Uredbi EC 2073/2005 u kojoj su definisani mikrobiološki kriterijumi za hranu je predviđeno da za početne formule za odojčad u prahu i sušene dijetetske proizvode za posebne medicinske namene namenjenim za decu mlađu od 6 meseci, tokom roka upotrebe odsustvo *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) u svih 30 ispitivanih jedinica uzorka. Ukoliko se dokaže prisustvo *Cronobacter* spp. u bilo kojoj od 30 ispitivanih jedinica uzorka proizvodna partija koja se nalazi u prometu mora se hitno opozvati i povući. Prisustvo *Cronobacter* spp. u ovoj vrsti hrane predstavlja opasnost po zdravlje odojčadi, posebno kada nakon njihove pripreme postoje uslovi za razmnožavanje (čuvanje tokom nekoliko sati na sobnoj temperaturi). Naučni panel o biološkim hazardima (BIOHAZ Panel) Evropske Agencije za Bezbednost Hrane (European Food Safety Authority - EFSA) je mišljenja da se prisustvo bakterija iz familije *Enterobacteriaceae*, koje se češće javljaju, može koristiti kao indikator rizika od nalaza *Cronobacter* spp. Stoga je preporuka ovog panela da se vrši ispitivanje prisustva *Enterobacteriaceae* kako u proizvodnoj sredini uzimanjem briseva, tako i u gotovom proizvodu. U okviru kriterijuma higijene u procesu proizvodnje mleka i proizvoda od mleka tačka 2.2.9 navedene Uredbe je definisano da ni jedna od 10 jedinica u 10 grama uzorka početne formule za odojčad u prahu i dijetetske hrane u prahu za posebnu medicinsku namenu za odojčad do 6 meseci starosti na kraju procesa proizvodnje ne sadrži *Enterobacteriaceae*. Ako se otkriju *Enterobacteriaceae* u bilo kojoj jedinici uzorka, primenjuju se mere unapređenja higijene proizvodnog procesa kako bi se kontaminacija svela na najmanji mogući nivo, a proizvodna partija se mora ispitati na prisustvo *Cronobacter* spp. U prvoj verziji srpskog Pravilnika o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda (Sl. glasnik RS br. 45/2010 i 27/10) je definisano da ni jedna od 10 jedinica uzorka početne formule za odojčad (infant formulae), pored drugih

mikroorganizama, ne sme sadržavati *Enterobacter sakazakii* u 10g uzorka. U istom pravilniku je definisan i kriterijum higijene procesa kojim je propisano da svih pet jedinica uzorka ne smeju sadržavati >1 cfu/g *Enterobacteriaceae*. Promena Pravilnika o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda usledila je 2012. godine (Sl. glasnik 52/12), kada je promenjen i kriterijum bezbednosti koji sada zahteva da 10 jedinica uzorka početne formule za odojčad, pored drugih mikroorganizama, ne sme sadržavati *Cronobacter sakazakii* u 25 g uzorka.

Imajući uvidu da heterogena distribucija mikroorganizama u hrani utiče na dobijene rezultate mikrobioloških ispitivanja, posebno u slučajevima niskog nivoa kontaminacije, veoma je važno da se pravilno odredi reprezentativan broj uzoraka i učestalost uzorkovanja tokom proizvodnje jedne proizvodne partije kako bi se na osnovu rezultata ispitivanja što tačnije ocenila bezbednost proizvoda iz te proizvodne partije.

2.10. Savremen pristup dijagnostifikovanju i identifikaciji sojeva *Cronobacter* spp.

Proučavanje mikroorganizama u poslednjih 30 godina bazira se na integraciji različitih vrsta podataka, kako bi se validno utvrdila njihova taksonomska pripadnost. Taksonomija obuhvata 3 dela:

1. klasifikaciju, tj. svrstavanje mikroorganizama u taksonomsku grupu na osnovu sličnosti,
2. nomenklaturu,
3. identifikacija nepoznatog organizma, tj. određivanje sličnosti sa nekom od postojećih taksonomskih grupa i adekvatno obeležavanje.

Pravilna taksonomska pripadnost podrazumeva fenotipsko, genotipsko i filogenetsko slaganje tj. polifaznu klasifikaciju, pa je uveden tzv. polifazni pristup koji podrazumeva istovremeno korišćenje više različitih metoda za karakterizaciju (Vandamme i sar., 1996).

Fenotipska karakterizacija, pored osnovnih morfoloških, fizioloških i biohemijskih osobina, obuhvata i serotipizaciju, fagotipizaciju, EPS tipizaciju, kompoziciju ćelijskog zida, prirodnu rezistentnost prema antibioticima (IAR- Intrinsic Antibiotic Resistance) i tolerantnost prema teškim metalima (HMT-Heavy metal tolerance). Metode zasnovane na fenotipskim analizama generalno se smatraju nepouzdanima zbog nestabilnosti pojedinih markera. Zbog toga su postupci koji uključuju DNK analize vrlo zahvalna alternativa. Proučavanje genetičkih

karakteristika bakterija dobijenih profiliranjem proteina ili nukleinskih kiselina svakako su dobar pristup u ispitivanju epidemioloških osobina izolata uključenih u izbijanje oboljenja poreklom iz hrane.

Molekularna determinacija obuhvata sadržaj lipopolisaharida, masnih kiselina u ćeliji, izoprenoidnih kinona, poliamina, multilokus enzim elektroforezu, analizu ukupnih ćelijskih proteina. Pored toga, molekularna determinacija obuhvata i analizu genomske DNK, tj. genotipsku karakterizaciju.

Genotipska karakterizacija obuhvata analize GC sastava, plazmidnih profila, elektroforezu u pulsirajućem polju (PFGE - Puls Field Gel Electrophoresis), DNK hibridizaciju, rRNK homologe analize, analize dužine restrikcionih fragmenata (RFLP - Restriction Fragments Length Polymorphisms), kao i različite metode koje se baziraju na lančanoj reakciji polimeraze (PCR - Polymerase Chain Reaction) tehnici. U njih spadaju: analiza repetitivnih elemenata tj. rep-PCR (Repetitive Sequence Based PCR), nasumično umnožena polimorfna DNK (RAPD- Random Amplified Polymorphic DNA), TPF- Target PCR Fingerprinting, analiza intergenskih sekvenci - ITS (Intergenic Sequences), polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata (AFLP- Amplified Fragments Length Polymorphisms), 16S rRNK analiza, restrikciona analiza ribozomalne DNK (ARDRA- Amplified rDNA Restriction Analysis).

Molekularno-genetičke metode su primenljive na više nivoa, a najvažnije je definisati koja vrsta informacije je potrebna, pa se u zavisnosti od toga i bira metoda koja će se primeniti. Za svaku grupu bakterija preporučene su adekvatne metode koje omogućavaju najefikasniju tipizaciju u pogledu diskriminativnosti, ekonomičnosti i vremena potrebnog za analize.

Tabela 2.10.1. Relativna rezolucija različitih fingerprinting i DNK tehnika (De Bruijn, 1992)

Familja	Rod	Vrsta	Podvrsta	Soj
DNK sekvenciranje				
16 S rDNK sekvenciranje				
	ARDRA			
	DNK-DNK reasocijacija			
	tRNK-PCR			
		ITS-PCR		
		RFLP		
		Multilokus izozimi		
		RAPD		
		rep-PCR		
		AFLP		
		~Profiling~ ukupnih ćelijskih proteina		

U cilju boljeg definisanja fenotipskih karakteristika *E. sakazakii*, u poslednje vreme se ubrzano adaptiraju molekularne metode za ispitivanje genetskih karakteristika *E. sakazakii*: PCR, rep-PCR, RAPD, PFGE, restrikciona analiza hromozomske DNK, ribotipizacija i ispitivanje plazmida (Grant & Kroll, 1993; Farber, 1996 i Nazarowec-White & Farber, 1999). Nazarowec-White i Farber (1999) su na osnovu ribotipizacije *E. sakazakii* nakon delovanja restriktivne endonukleaze *EcoR1* grupisali 18 izolata u 10 različitih biotipova.

Farmer et al. (1980) su proučavali 57 kliničkih izolata *E. sakazakii*, na osnovu DNK hibridizacije, osetljivosti na antibiotike i biohemijskih reakcija. Dalje podele su usledile zahvaljujući razlikama u produkciji pigmenta na temperaturi ispod 36°C (izolati su imali optimalnu temperaturu rasta na 25°C), upotrebi citrata kao jedinog izvora ugljenika za sintezu, 31–49% DNK–DNK homologiji sa *E. cloacae* i 57% guanine + citozin zastupljenosti. Najotporniji izolati su preživeli bez presejavanja i do 8 godina na temperaturi 17–30°C (Farmer i sar., 1980).

2.10.1. Osnove PCR- metode lančanog umnožavanja DNK

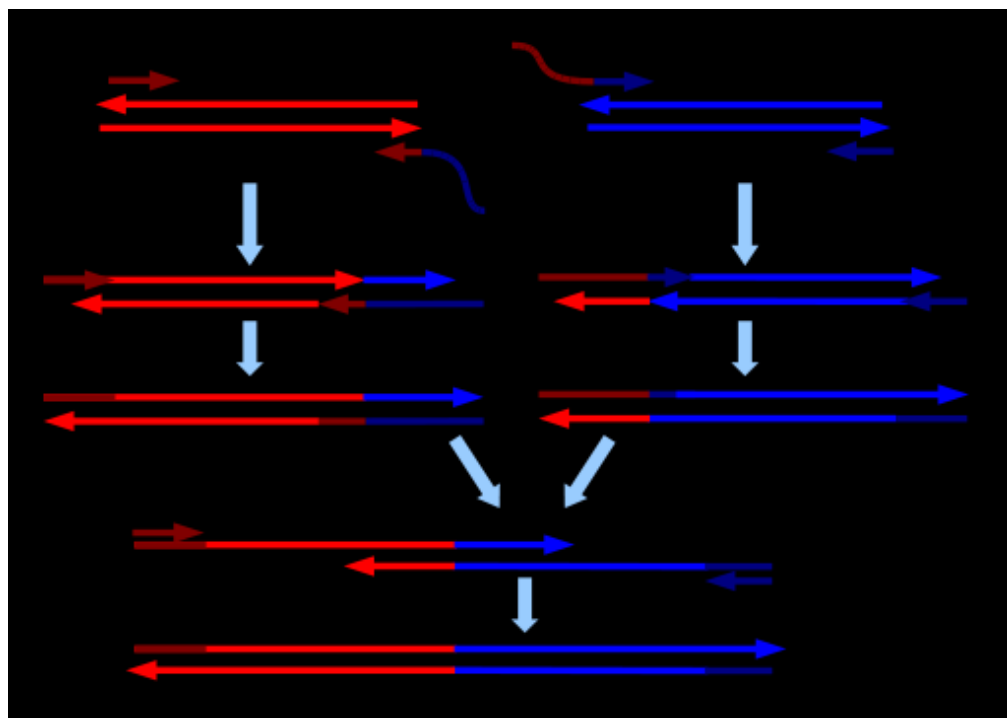
PCR je *in vitro* tehnika za amplifikaciju ciljnog regiona molekula DNK koji se nalazi između 2 regiona poznate sekvence. PCR amplifikacija koristi oligonuleotidne prajmere, koji predstavljaju kratke, jednolančane oligonukleotide koji su komplementarni spoljnim (graničnim) regionima sekvence koju umnožava. Ovi oligonukleotidi- prajmeri služe kao mesta vezivanja za enzim DNK polimerazu, dok denaturisani delovi molekula DNK služe kao osnova (matrica) za sintezu novih lanaca, koji su komplementarni matričnim. Novosintetisani delovi DNK lanaca mogu služiti kao matrica za sintezu sledeće generacije amplikona pri odgovarajućim uslovima.

Korišćenjem enzima termostabilne DNK polimeraze, koja je otporna na denaturaciju tj. inaktivaciju pri visokim temperaturama, omogućeno je sintetisanje velikog broja fragmenata DNK tokom mnogobrojnih ciklusa PCR-a. Prva termostabilna DNK polimeraza je bila izolovana iz bakterije *Thermus aquaticus*, iz termalnih izvora (sa temperaturama preko 85°C) (Brock & Freeze, 1969).

Tipičan ciklus PCR amplifikacije sadrži:

- denaturaciju ciljne DNK (template denaturation)
- vezivanje prajmera (primer annealing)
- izduživanje prajmera duž matične DNK (primer extension).

Posle svakog ciklusa novosintetisani lanci DNK služe kao matrica za sintezu u sledećem ciklusu.



Slika 2.10.1. PCR amplifikacija

2.10.2. DNK “fingerprinting” na osnovu PCR

2.10.2.1. rep-PCR

rep-PCR je razvijen na osnovu repetitivnih elemenata koji su prisutni u genomima bakterija, čime se dobijaju jedinstveni DNK profili (“otisci”) pojedinačnih sojeva. Oko 5% genoma bakterija čine repetitivni segmenti, pri čemu je funkcija mnogih nepoznata, a lokalizovani su u intergenskim i u ekstragenskim regionima DNK molekula. Ova tehnika je poboljšala mogućnost definicije diverziteta u prirodnim populacijama bakterija korišćenjem specifičnih DNK sekvenci – repetitivnih DNK elemenata: REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) i BOX elemenata (Versalovic i sar., 1991).

Objavljeno je nekoliko metoda zasnovanih na upotrebi specifičnih prajmera za spoljne delove repetitivnih elemenata pronađene u bakterijskim genomima. BOX elementi su visoko konzervativni kod gram- negativnih bakterija i sadrže samo box A subjedinicu. Gram –pozitivne bakterije sadrže različiti broj kopija box A, box B, box C subjedinica repetitivnih elemenata, koji su pogodni za karakterizaciju ovih mikroorganizama (Versalović i sar., 1994). ERIC-PCR je fokusiran na enterobakterijske repetitivne intergenske konsenzus-sekvence i primenjen je na *C. sakazakii* (Ye i sar., 2008; 2009; 2010).

2.10.2.2. RAPD

Palindromske strukture se nalaze samo u okviru hromozomalnog dela genoma, pa se za kompletniju tipizaciju preporučuje dodatni “fingerprinting” koji obuhvata kompletan genom. U novijim proučavanjima genetičkog polimorfizma koristi se nasumično umnožena DNK (RAPD- Randomly Amplified Polymorphic DNA). Krajem 1990. godine, dva tima su istovremeno objavila razvoj nove tehnike za molekularni skrining bazirane na PCR reakciji. Dve tehnike su bile praktično identične, iako su istraživači definisali 2 termina za istu proceduru: “Arbitrary Primed AP –PCR” i “Random Amplified Polymorphic DNA- RAPD”. Danas je u upotrebi uglavnom termin RAPD.

Ova vrsta molekularnih markera obuhvata PCR umnožavanje genomske DNK pomoću jednog prajmera koji ima arbitarno izabranu sekvencu, što omogućava neograničen broj sekvenci koje mogu biti izabrane kao prajmer. Pojedinačni prajmeri mogu da hibridizuju sa nekoliko stotina mesta u ciljnoj DNK, ali da bi došlo do stvaranja PCR produkata, neophodno je da sekvence

nisu udaljene više od 2 kb, što približno odgovara maksimalnoj veličini PCR fragmenata (Fani i sar., 1993). Pri ispunjenim ovim uslovima, može doći do amplifikacije delova molekula DNK i formiranja RAPD profila uzorka, koji se obično sastoji od 1-20 traka.

RAPD je najviše rasprostranjena varijanta PCR-a sa nasumičnim prajmerima i ima široku primenu. Metoda je dobro prilagođena za sisteme skrininga velikog broja uzoraka. Osnovni nedostatak metode je u tome što RAPD tehnika nije savršeno reproducibilna i vrlo male promene u uslovima reakcije mogu značajno uticati na RAPD profil, što ponekad ostavlja sumnju u pouzdanost rezultata i znatno otežava razmenu rezultata između laboratorija. Međutim, poređenje ovih profila u okviru iste laboratorije pod standardizovanim uslovima je nesumnjivo pouzdano, što se i koristi pri analizi genodiverziteta (Bazzicalupo i sar., 1996).

Nazarowec-White i Farber (1997) su poredili 18 izolata *C. sakazakii* koristeći dva prajmera od po 10 nukleotida (10-mera). Drudy i sar. (2006) su upoređivali RAPD profile 56 izolata *E. sakazakii* i određenog broja sojeva koji su izolovani iz životnog okruženja, hrane i kliničkih izvora.

2.10.2.3. Analiza 16S rRNK gena

Najznačajniji doprinos taksonomiji bakterija je upoređivanje sekvenci rRNK i gena koji kodiraju rRNK (rDNK). Ovaj deo se najčešće koristi za analizu filogenetskih odnosa, jer je zastupljen kod svih bakterija, funkcionalno je konstantan, a posebno jer sadrži i visoko konzervativne i varijabilne domene. Primenom metoda sekvenciranja formirane su baze podataka o ovim regionima kod velikog broja bakterijskih vrsta, kako bakterija koje se mogu kultivisati na hranljivim podlogama, tako i nekulturable vrsta. Na ovaj način je omogućeno upoređivanje ispitivane DNK sa velikim brojem molekula iz baze podataka delimičnih (partial) ili kompletnih i još neobjavljenih sekvenci i određivanje stepena sličnosti (Vandamme i sar., 1996).

Iversen i sar. (2004d) su klasifikovali izolate kao *E. sakazakii* i izučavali njihove filogenetske sličnosti pomoću parcijalne sekvence 16S rRNK gena (550bp); sojevi su se rasporedili u 4 različite grupe, pokazujući taksonomsku heterogenost. Korišćenjem nezavisne metode sekvencioniranja *hsp60* (Heat Shock Protein 60) gena potvrdili su grupisanje izolata u 2 različite grupe koje se dalje dele u 2 podgrupe. Dva glavna genotipa *E. sakazakii*, dobijena na osnovu sekvenci *hsp60* gena, uključuju kliničke izolate i ne pokazuju biohemijsku podudarnost.

2.10.2.4. ARDRA

Restrikciona analiza amplifikovane ribozomalne DNK (ARDRA - Amplified rDNA Restriction Analysis) se bazira na kombinaciji PCR-a i digestije restrikcionim endonukleazama. PCR produkt može biti 16S ili 23S rDNK, sa ili bez regiona između njih („spacer“ region). Amplifikacija se zasniva na upotrebi prajmera koji su locirani u konzervativnim delovima gena. Amplikon se zatim obrađuje selektivnom kombinacijom restrikcionih enzima. Za razliku od većine DNK metoda, ARDRA generiše uglavnom profile specifične za vrstu, što je očekivano uzimajući u obzir stepen konzervativnosti rRNK gena. U novije vreme se češće koristi termin RFLP amplifikovane 16S rDNK (ili 23S rDNK), jer se RFLP metoda sve više koristi na različitim amplifikovanim ciljnim sekvencama, pa se zato pored metode specificira ime te sekvence.

Messaoudi i sar. (2009) su koristili ARDRA kao dodatni metod za karakterizaciju različitih izolata iz uzoraka mesa, među kojima i 3 izolata *E. sakazakii*, koji su prethodno identifikovani API 20E metodom. ARDRA je obuhvatila korišćenje 3 restrikcione endonukleaze - *AluI*, *MspI*, *RsaI*. Identifikacija metodama ARDRA i API 20E pokazala je slaganje u 90,2 % (44/51) izolata različitih vrsta.

2.10.3. PFGE tipizacija

PFGE metod tipizacije sojeva se bazira na isticanju razlika na nivou celog genoma i takođe predstavlja nešto izmenjenu metodu tradicionalne analize restrikcionim enzimima. Presecanje DNK restrikcionim enzimima na malom broju mesta, kao npr. *XbaI* enzimom, ostavlja dovoljno velike fragmente za dalje poređenje, posle odvajanja na osnovu veličine pomoću elektroforeze u pulsirajućem polju. Specifični genetski profil nekog soja poseduje sve varijacije na mestu presecanja DNK molekula restrikcionom endonukleazom, pa se zato naziva i makrorestrikcioni profil. PulseNet je standardizovan protokol razvijen u Centru za kontrolu i prevenciju bolesti koji omogućava direktno poređenje DNK materijala sakupljenog u laboratorijama različitih geografskih regiona pod standardizovanim uslovima (Swaminathan i sar., 2001). Makrorestrikcioni profili mogu se direktno porediti nakon prenosa na internet. Ovaj sistem omogućava praćenje više vrsta patogenih enterobakterija na globalnom nivou. Očekuje se da će *C. sakazakii* biti obeležen na PulseNet listi mikroorganizama u budućnosti, nakon razvitka dogovorenog pristupa tipizacije pomoću PFGE.

Nazarowec-White i Farber (1997) su poredili 18 izolata *E. sakazakii* pomoću tri metode: ribotipizaciju, PFGE i RAPD. PFGE profili izolata *E. sakazakii* dobijeni su obradom genomske DNK *XsbaI* i *SpeI* enzimima u odvojenim reakcijama. Ustanovili su da je rezolutivna moć

PFGE metode sična RAPD metodi. Fanning i Forsythe (2007) su analizirali više od 500 *C. sakazakii* izolata pomoću *XsbaI* PFGE i utvrdili postojanje 19 grupa na nivou od 95% sličnosti.

Genetički diverzitet među sojevima *C. sakazakii* je otežao razvoj procedura koje bi se zasnivale na fenotipskoj razlici. Malorny i Wagner (2005) su izvršili validaciju real-time PCR metode koja se zasniva na detekciji 16S rRNK gena. Ova metoda je vrlo korisna za brze analize velikog broja uzoraka. Osetljivost je 10^3 cfu/ml u uzorku posle prvog obogaćenja. Real-time PCR analiza *C. sakazakii* omogućava dobijanje rezultata za 2 sata, što je neuporedivo sa dužinom trajanja klasične analize koja traje i do 7 dana.

Primena metoda molekularne biologije olakšava nadzor sojeva, jer omogućava praćenje izolata izazivača iz kliničkih izvora do kontaminiranih primeraka formule za odojčad u prahu i/ili fabričkog okruženja. Pored toga, ove metode su korisne za mikrobiološko anticipiranje i osmišljavanje plana za kontrolu i umanjivanje rizika od širenja infekcija.

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je bio da se mikrobiološkim metodama ispita prisustvo *Cronobacter sakazakii* u biljnim čajevima i formulama za odojčad u prahu i da se odrede genotipske karakteristike dobijenih izolata *Cronobacter sakazakii*. Za ostvarivanje ovih ciljeva postavljeni su sledeći zadaci:

1. Izolovati *C. sakazakii*, primenom standardne mikrobiološke procedure, iz uzoraka formula za odojčad u prahu i biljnih čajeva.
2. Izvršiti identifikaciju izolata na osnovu biohemijskih osobina.
3. Ispitati uticaj različitih temperatura na preživljavanje *C. sakazakii* u čajevima.
4. Izvršiti genotipsku karakterizaciju izolata *C. sakazakii* i uporediti ih sa postojećim referentim sojevima.

4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Materijal

4.1.1. Formule za odojčad u prahu

Formule za odojčad koje su korišćene u ovom istraživanju su bile dostupne na tržištu Republike Srbije. Istraživanjem su bile obuhvaćene formule za odojčad kako stranih, tako i domaćih proizvođača, i nabavljene su u periodu od 2007. do 2012. godine i to iz komercijalnih prodavnica i apoteka na prostoru Republike Srbije. Pregled broja ispitanih formula za odojčad u prahu po godinama dat je u Tabeli 4.1.1.1. Određen broj formula (157 od 360) koje su korišćene u ovom istraživanju su uzorci granične sanitarne inspekcije, koji su ispitivani u Centru za ispitivanje namirnica, u Beogradu.

Ukupno je 360 uzoraka formule za odojčad u prahu ispitano na prisustvo bakterije *Cronobacter sakazakii*. Pored *C. sakazaki*, u ispitnim uzorcima je i određivan je broj *Enterobacteriaceae*.

Tabela 4.1.1.1. Broj ispitanih formula za odojčad u prahu po godinama

Godina ispitivanja	Broj ispitinih uzoraka formula za odojčad u prahu
2007	44
2008	50
2009	45
2010	70
2011	67
2012	84
UKUPNO	360

Imajući u vidu činjenicu da su formule za odojčad u prahu koje su bile dostupne na tržištu Srbije, proizvodi kako domaće proizvodnje, tako i iz uvoza, pregled porekla ispitanih formula je dat u Tabeli 4.1.1.2.

Tabela 4.1.1.2. Poreklo ispitanih formula za odojčad u prahu

	Zemlja porekla	Vrste formula
1.	Holandija marka A.	1. za odojčad do 6 meseci; 2. za odojčad od 6 meseci; 3. za decu do 36 meseci;
2.	Holandija marka B.	1. za odojčad do 6 meseci; 2. za odojčad od 6 meseci; 3. za decu do 36 meseci; 4. sa dodatkom prebiotika; 5. sa dodatkom vitamina i minerala; 6. za bolju probavu; 7. bez laktoze; 8. za malapsorbicije i alergije; 9. sa sporosvarljivim ugljenim hidratima, do 36. meseci starosti;
3.	Švajcarska	1. za odojčad do 6 meseci; 2. za odojčad od 6 meseci; 3. za decu do 36 meseci; 4. sa dodatkom prebiotika; 5. za prevremeno rođene bebe; 6. bez laktoze; 7. hipoalegena, sa vitaminima
4.	Nemačka marka A.	1. za odojčad do 6 meseci; 2. za odojčad od 6 meseci; 3. za decu do 36 meseci; 4. sa dodatkom prebiotika; 5. organska formula za sve uzraste;
5.	Nemačka marka B.	1. za odojčad do 6 meseci; 2. za odojčad od 6 meseci; 3. za decu do 36 meseci; 4. sa dodatkom prebiotika; 5. za odojčad od 6 meseci, za laku noć; 5. za prevremeno rođene bebe; 6. za decu sa gastroezofagealnim refluksom (protiv regurgitacije); 7. bez laktoze, na bazi soje; 8. sa prebioticima; 9. za bolju probavu; 10. sa probioticima i vitaminima, hipoalegena(sa manje laktoze), do 36 meseci starosti;
6.	Nemačka marka C.	1. za odojčad do 6 meseci; 2. za odojčad od 6 meseci; 3. za decu do 36 meseci; 4. za prevremeno rođene bebe; 5. sa probavnim smetnjama, od 4. meseca starosti;
7.	Francuska	1. za odojčad do 6 meseci; 2. za odojčad od 6 meseci; 3. za decu do 36 meseci; 4. za prevremeno rođene bebe; 5. za probavu; 6. bez laktoze, bez proteina mleka; 7. za decu sa gastroezofagealnim refluksom (protiv regurgitacije);
8.	Srbija	1. za odojčad do 6 meseci; 2. za odojčad od 6 meseci; 3. za decu do 36 meseci; 4. za prevremeno rođene bebe;



4.1.2. Biljni čajevi

Pored formula za odojčad, ovo istraživanje je obuhvatilo i analizu biljnih čajeva za decu i odrasle, sa ukupnim brojem od 520 uzoraka čaja. Uzorci su kupovani nasumično na području Republike Srbije. Najveći broj uzoraka biljnih čajeva su bili čajevi za decu pod nazivom: „Bebi čaj” (127 uzoraka) i „Dečji čaj” (62 uzorka), čija priprema obuhvata prelivanje čaja ključalom vodom. Ispitivani su i uzorci upakovanih čajeva koji u svom nazivu nemaju naznaku da su čajevi za bebe ili decu, a daju se deci i bebama, i to čajevi tipa beli slez, sena i žalfija. Treba napomenuti da priprema ovih vrsta čajeva ne podrazumeva prelivanje čaja ključalom vodom.

Osim toga, ispitivani su čajevi koji se koriste kao pomoćna lekovita sredstva, a na ambalaži imaju tekst koji ukazuje na preporuku da se čaj preporučuje za različite imunokompromitovane grupe ljudi. Priprema ovih vrsta čajeva obuhvata ili prelivanje čajne sadržine vreloom vodom ili se pravi macerat (prelivanje hladnom vodom i čuvanje na sobnoj temperaturi). Preporučena količina čaja koja bi trebala da se konzumira nije naznačena na pakovanju. Tabela 4.1.2.1 daje pregled svih vrsta čajeva, kao i način pripreme čajeva, koji su bili obuhvaćeni ovim istraživanjem.

Tabela 4.1.2.1. Uzorci čaja koji su ispitivani komercijalnim nazivima sa tržišta

Komercijalni naziv uzorka		Latinski naziv, sastav	Broj uzoraka	Način pripreme sa deklaracije
Bebi čaj		Mešavine	127	Prečiti vrelom proključalom vodom
Dečiji čaj		Mešavine	62	
Razne mešavine (voćne, sa aromama)		Mešavine	29	
Mešavine koje su deklarirane da pomažu ranim bolestima		Mešavine	81	
Beli slez		<i>Althaeae radix</i>	30	Prečiti hladnom vodom
Sena		<i>Sennae folium</i>	16	
Žalfija		<i>Salviae folium</i>	14	
Matičnjak		<i>Melissae folium</i>	10	Prečiti vrelom vodom, ili se pravi macerat (prelivanje hladnom vodom i čuvanje na sobnoj temperaturi)
Uva		<i>Uvae ursi folium</i>	14	Prečiti vrelom vodom
Kamilica		<i>Chamomilae flos</i>	18	Prečiti vrelom proključalom vodom
Lipa		<i>Tilia cordata</i>	9	Prečiti vrelom proključalom vodom
Kopriva		<i>Urticae folium</i>	7	Prečiti vrelom proključalom vodom

Kantarion		<i>Hyperici herba</i>	4	Preliti vreloom vodom, ili se pravi macerat (prelivanje hladnom vodom i čuvanje na sobnoj temperaturi)
Majčina dušica		<i>Thymi serpylli herba</i>	4	Preliti vreloom vodom, ili se pravi macerat (prelivanje hladnom vodom i čuvanje na sobnoj temperaturi)
Rtanjski čaj		<i>Satureja montana</i>	6	Preliti vreloom proključalom vodom
Nana		<i>Menthae piperitae folium</i>	8	Preliti vreloom proključalom vodom
Hibiskus		<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	11	Preliti vreloom vodom
Hajdučka trava		<i>Millefolii herba</i>	8	Preliti vreloom vodom
Maslačak		<i>Taraxacum officinale</i>	4	Preliti vreloom proključalom vodom
Kora krušine		<i>Frangulae cortex</i>	5	Preliti vreloom proključalom vodom
Komorač		<i>Foeniculum vulgare</i>	3	Preliti vreloom proključalom vodom
List breze		<i>Betulae folium</i>	10	Preliti vreloom proključalom vodom
List borovnice		<i>Myrtilli folium</i>	10	Preliti vreloom vodom
Crni čaj		<i>Camelia sinensis, fermentisani</i>	15	Preliti vreloom proključalom vodom
Zeleni čaj		<i>Camelia (Thea) sinensis</i>	15	Preliti vreloom proključalom vodom
Ukupno pregledano			520	

Istraživanje je obuhvatilo i grupu čajeva koji služe u lečenju bolesti, otklanjanju simptoma nekih bolesti i poboljšanju opšteg stanja organizma, i to na osnovu podataka / informacija koje su date na samoj deklaraciji čaja (Tabela 4.1.2.2).

Tabela 4.1.2.2. Biljni čajevi koji na deklaraciji imaju neku preporuku da služe u lečenju, otklanjanju simptoma bolesti i poboljšanju opšteg stanja organizma

Lekovite mešavine	Namena	Sastav	Preporuke
xxx10A	Cirkulacija, Holesterol, Psorijaza, Sterilitet, Nervni sistem	Glog-Crataegus oxiacanta; Breza-Betula Albachillea; Dan i noć-Viola tricolor; Valerijana-Valeriana officinalis; Ruzmarin-Rosmarinus officinalis	Minimum 1 put dnevno, bez preskripcije o količini; Preliva se vrelom vodom
xxx20C	Bubrezi, Bešika, Bakterije, Nefritis	Kukuruzna svila-Zea mays; Breza-Betula Alba; Rastavić-Equisetum arvense; Uva Arcostaphylos uva ursi; Zova-Sambucus nigra; Borovnica-Vaccinium myrtillis; Artičoka-Cynara scolymus;	Minimum 1 put dnevno, bez preskripcije o količini; Preliva se vrelom vodom
xxx7B	Jetra, Hepatitis, Žuč, Kamenac	Petrovac-Agrimonia eupatoria; Breza-Betula Alba; Hmelj-Humulus lupulus; Troskot-Polygonum aviculare; Maslačak-Taraxacum officinale; Artičoka-Cynara scolymus;	Minimum 1 put dnevno, bez preskripcije o količini; Preliva se vrelom vodom
xxx3-5H	Hormoni, Sterilitet, Ciste, Miomi, Tumori	Neven-Calendula officinalis; Hajdučka trava-Achilla millefolium; Hrastova kora- Quercus robur; Jagorčevina-Primulla officinalis; Hajdučka trava-Achillea millefolium; Rusomača-hoću, neću-Caspela B. pastoris; Petrovac-Agrimonia eupatoria;	Minimum 1 put dnevno, bez preskripcije o količini; Preliva se vrelom vodom
xxx3	Gastritis, Čir, Krenova dijeta, Nervni sistem	Kičica -Erythraea centaurium; Petrovac-Agrimonia eupatoria; Hajdučka trava-Achilla millefolium; Dubac-Teuricum chamaedrys; Gavez-Symphytum officinale; Maslačak-Taraxacum officinale; Hajdučka trava-Achilla millefolium;	Minimum 1 put dnevno, bez preskripcije o količini; Preliva se vrelom vodom
xxx bronhi	Bronhijalni putevi	Bokvica- Plantago major - širokolisna, zenska bokvica, Plantago lanceolata - uskolisna, muska bokvica; Plantago media - srednja bokvica;	Po potrebi, preliava se mlakom vodom
Za decu	Respiratorni trakt	Bokvica- Plantago major; Timijan-Thymus vulgaris; Cvet bagrema- Robinia pseudoacacia; Propolis; Borove iglice	Po potrebi, preliava se mlakom vodom (max.60°C)
Čaj za mršavljenje I		Krušina- Rhamnus frangula; Sena – Cassia angustifolli, kukuruzna svila-Zea mays; Peršun-Petroselinum sativum; Matičnjak- Melissa officinalis; Kopriva-Urtica dioica; Zeleni čaj - Camellia sinensis; Pitoma nana- Mentha piperita; Kamilica - Matricaria chamomilla; Zova- Sambucus nigra; Zubača - Cynodon dactylon;	Po potrebi, preliava se vrelom vodom
Čaj za mršavljenje II		Krušina - Rhamnus frangula, Matičnjak - Melissa officinalis, Zova-Sambucus nigra, Rastavić herba, Sena – Cassia angustifolli, breza list- Betula pendula, Žalfija-Salvia officinalis, pirevina koren- Agropyrum repens	Po potrebi, preliava se vrelom vodom

Lekovite mešavine	Namena	Sastav	Preporuke
Planinski čaj (za poboljšanje imuniteta, bolje varenje, resp. puteve)	List sene - <i>Sennae folium</i> i kora krušine - <i>Frangulae cortex</i> . Pomoćne supstance: Cvet prave kamilice - <i>Matricariae flos</i> 15 %, list paprene metvice - <i>Menthae pip. folium</i> 5% , plod kima <i>Carvi fructus</i> 5%, plod gorkog komorača <i>Foeniculi amari fructus</i> 5%, Plod borovice <i>Juniperi fructus</i> 5%, Koren sladila <i>Glycyrrhizae radix</i> 5%.		Preлива se vreлом водом

4.1.3. Referentni sojevi

U ovom istraživanju su korišćena dva referentna soja:

- **NCTC 8155** - *Enterobacter sakazakii*, , izolat iz mozga novorođenčeta. Proizvođač: British Health Agency, Engleska (NCTC- National Collection of Typo Cultures);
- **ATCC 51329** - *Enterobacter (Cronobacter) muytjensii*, klinički izolat. Proizvođač: MicroBioLogics, SAD.

Ovi referentni sojevi su korišćeni u okviru genetičkih ispitivanja, za poređenje sa izolatima iz biljnih čajeva pri njihovoj molekularnoj karakterizaciji.

4.1.4. Podloge i reagensi

Podloge za izolaciju i identifikaciju *Cronobacter sakazakii*

U tekstu koji sledi dat je sastav i način pripreme podloga i reagenasa koji su korišćeni za izolaciju i identifikaciju *Cronobacter sakazakii*, prema standardnoj metodi ISO 22964:2006, otkrivanje *Enterobakter sakazakii*.

Puferisana peptonska voda (BPW)

Sastav:

Enzimski ekstrakt kazeina	10,0g
NaCl	5,0g
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	9,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
Voda	1000ml

U cilju pripreme puferisane petonske vode potrebno je suspendovati sve gore navedene sastojke u vodi, zagrevati ako je potrebno. Podesiti pH, tako da posle sterilizacije bude 7,0±0,2 na 25°C. Pripremljenu puferisanu peptonsku vodu razliti u epruvete ili erlenmajere dovoljnog kapaciteta. Sterilisati u autoklavu 15 min na 121 °C.

Modifikovan lauril-sulfat triptozni bujon sa dodatkom vankomicina (mLST+VANCOMYCIN) (Biokar, Francuska)

Sastav:

NaCl	34.0g
Enzimski digest životinjskog i biljnog tkiva	20.0g
Laktoza	5.0g
KH ₂ PO ₄	2.75g
K ₂ HPO ₄	2.75g
Natrijum lauril sulfat	0.1g
Vankomicin	0.01
Voda	1000ml

U cilju pripreme bujona, potrebno je suspendovati 64,6 grama gotove podloge u 1 litar destilovane vode, zagrevati ako je potrebno. Podesiti pH, tako da posle sterilizacije bude $6,8 \pm 0,2$ na 25°C. Razliti po 10 ml bujona u epruvete, koje je potrebno sterilisati u autoklavu tokom 15 min na 121 °C.

Hromogena podloga za *Cronobacter sakazakii*

Korišćene su hromogene podloge za *C. sakazakii* nabavljene od 3 proizvođača, i to:

1. Compass Enterobacter sakazakii agar – Biokar, Francuska,
2. Enterobacter sakazakii agar – Chromocult – Merck, Nemačka,
3. Brilliance Enterobacter sakazakii agar (DFI) – Oxoid, Engleska.

Sastav podloge od sva tri proizvođača je identičan i obuhvata:

Tripton	15,0g
Pepton soja	5,0g
NaCl	5,0g
Natrijum dezoksiholat	1,0g
Gvožđe-amonijum citrat	1,0g
Natrijum tio sulfat	1,0g
Hromogen	0,1 g
Agar	15g*
Voda	1000ml

Hromogene podloge se pripremaju tako što se najpre suspenduju sve komponente u vodi (43,1 g gotove mešavine po litru destilovane vode), po potrebi smeša se zagreva. Podesiti pH, tako da posle sterilizacije bude $7,0 \pm 0,2$ na 25°C. Sterilisati u autoklavu 15 min na 121 °C. Nakon sterilizacije, rashladiti podlogu na temperaturu između 44 °C i 47 °C. Razliti po 15 ml podloge u

sterilne Petrijeve ploče i ostaviti da se stvrdnu i da se ohladi površina. Ovako pripremljene podloge se mogu čuvati 14 dana na temperaturi 0-5 °C.

Tripton soja agar (TSA) (Merck, Nemačka)

Sastav:

Enzimski derivat kazeina	15,0 g
Enzimski derivat soje	5,0g
NaCl	5,0 g
Agar	9,0-18,0g*
Destilovana voda	1000 ml

* Zavisí od čvrstoće agara

U cilju pripreme TSA, potrebno je suspendovati komponente u vodi, zagrevanjem ako je potrebno. Podesiti pH, tako da posle sterilizacije bude $7,3\pm 0,2$ na 25°C. Sterilisati u autoklavu 15 min na 121 °C. Nakon sterilizacije, rashladiti podlogu na temperaturu između 44 °C i 47 °C. Razliti po 15 ml TSA podloge u sterilne Petrijeve ploče i ostaviti da se stvrdnu i da se ohladi površina.

Tripton soja bujon (Merck, Nemačka)

Sastav:

Trypton	17,0g
Soja	3,0g
Glukoza	2,5g
K ₂ PO ₄	2,5g
Na Cl	5,0g

Tripton soja bujon se priprema tako što se rastvora 30g gotovog medijuma u 1 litar destilovane vode, do potpunog rastvaranja. Nakon toga se vrši sterilizacija u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 min i podešava se pH na $7,3\pm 0,2$ pri 25°C.

Podloge i reagensi za biohemijsku karakterizaciju

L-lizin dekarboksilaza (LDC) podloga (Torlak, Srbija; Sigma-Aldrich, SAD)

Sastav:

L-lizin monohidrohlorid	5,0
Ekstrakt kvasca	3,0
Glukoza	1,0
Brom krezol ružičasto	0,015

Voda 1000ml

Rastvoriti komponente u vodi zagrevanjem, ako je potrebno. Podesiti pH, tako da posle sterilizacije bude $6,8 \pm 0,2$ na 25°C . Razliti po 2-5 ml pripremljene podloge u epruvete. Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C .

L-ornitin dekarboksilaza podloga (Torlak, Srbija; Sigma-Aldrich, SAD)

Sastav:

L-ornitin monohidrohlorid	5,0
Ekstrakt kvasca	3,0
Glukoza	1,0
Brom krezol ružičasto	0,015
Voda	1000ml

Rastvoriti komponente u vodi zagrevanjem, ako je potrebno. Podesiti pH, tako da posle sterilizacije bude $6,8 \pm 0,2$ na 25°C . Razliti po 2-5ml pripremljene podlogu u epruvete. Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C .

L-Arginin dehidroksilaza podloga (Torlak, Srbija; Sigma-Aldrich, SAD)

Sastav:

L-arginin monohidrohlorid	5,0
Ekstrakt kvasca	3,0
Glukoza	1,0
Brom krezol ružičasto	0,015
Voda	1000ml

Rastvoriti komponente u vodi zagrevanjem, ako je potrebno. Podesiti pH, tako da posle sterilizacije bude $6,8 \pm 0,2$ na 25°C . Razliti po 2-5ml pripremljene podloge u epruvete. Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C .

Podloge za fermentaciju ugljenih hidrata (šećera) (Torlak, Srbija)

Osnovna podloga ima sledeći sastav:

Enzimski derivat kazeina	10,0g
NaCl	5,0g
Fenol crveno	0,02g
Voda	1000ml

Suspendovati komponente u vodi, zagrevati ako je potrebno. Podesiti pH, tako da posle

sterilizacije bude $6,8 \pm 0,2$ na 25°C . Razliti u epruvete ili erlenmajere dovoljnog kapaciteta. Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C .

Rastvori ugljenih hidrata

(D-sorbitol , L-ramnoza, D-sukroza, D-melibioza i amigdalini 80mg/ml).

Ugljeni hidrati	8g
Voda	100ml

Pripremiti 4 pojedinačna rastvora, rastvoranjem svakog pojedinačnog ugljenog hidrata u vodi.

Kompletna podloga za fermentaciju šećera

Sastav:

Osnovna podloga	875ml
Rastvor šećera	125ml

Dodati pripremljen rastvor u svaku osnovnu podlogu i pomešati. Razliti po 10 ml podloge u sterilne epruvete.

Simmons citratna podloga (Torlak, Srbija)

Sastav:

Natrijum citrat	2.0g
NaCl	5.0g
K_2HPO_4	1.0g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1.0g
MgSO_4	0,2g
Bromtimol plavo	0,08g
Agar	9,0-18,0g*
Destilovana voda	1000 ml

* Zavisi od čvrstoće agara

Suspendovati komponente u vodi, zagrevati ako je potrebno. Podesiti pH , tako da posle sterilizacije bude $6,8 \pm 0,2$ na 25°C . Razliti po 10 ml Simmons citrata u epruvete dimenzije. Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C . Ostavite epruvete u kosom položaju tako da podloga na dnu bude 2,5 cm debljine.

Podloge za izolovanje i određivanje broja *Enterobacteriaceae*

Broj *Enterobacteriaceae* u uzorcima formula za odojčad i biljnih čajeva su određene prema standardnoj metodi ISO 21528-2, Mikrobiologija hrane i hrane za životinje- horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Enterobacteriaceae*, deo 2: Metoda brojanja kolonija.

Fiziološki rastvor sa peptonom

Sastav:g/l

Pepton	1,0
NaCl	8,5
Destilovana voda	1000ml

Rastvoriti u vodi komponente uz zagrevanje ako je to potrebno. Podesiti pH tako da posle sterilizacije iznosi 7,0 pri 25 °C. Sipati rastvor u dispensetu i razlivati po 9 ml fiziološkog rastvora u sterilne epruvete ili po 90ml u erlenmajere određene zapremine. Sterilisati u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 min. Čuvati na sobnoj temperaturi, zaštićene od zagađenja.

VRB glukozni agar (ljubičasto-crveni žučni glukozni agar) (Oxoid, Velika Britanija)

Sastav:g/l

Pepton	7,0
Ekstrakt kvasca	3,0
Žučna so	1,5
Glukoza	10,0
NaCl	5,0
Neutral crveno	0,03
Kristal violet agar	0,002
Agar	12,0
Destilovana voda	1000

Komponente rastvoriti u destilovanoj vodi. Ako je potrebno podesiti pH na $7,4 \pm 0,2$ pri 25°C. Ne autoklavirati. Podlogu pripremiti neposredno pre upotrebe, a najduže četiri sata pre upotrebe ili jedan dan, ako se čuva u frižideru.

Hranljivi agar (Merck, Nemačka)

Sastav:

Pepton	15,0g
NaCl	5,0g
Mesni ekstrakt	3,0g

KH ₂ PO ₄	0,3g
Agar	18,0g

Suspendovati 41,3 g podloge u 1 litri destilovane vode i polako mešati dok se potpuno ne rastvori. Ostaviti 15 minuta i potom pažljivo zagrijati do ključanja da se potpuno rastvori. Podesiti pH tako da posle sterilizacije iznosi $7,3 \pm 0,2$ pri 25 °C. Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C. Nakon hlađenja na 50°C sterilno razliti u Petri ploče.

Glukozni agar (Torlak, Srbija)

Sastav:

Tripton	10,0g
Ekstrakt kvasca	1,5g
Glukoza	10,0g
NaCl	5,0g
Bromkrezol purpur	0,015g
Agar	15,0g
Destilovana voda	1000g

Rastvoriti komponente u destilovanoj vodi. Ako je potrebno podesiti pH na 7,0 pri 25°C. Razliti u epruvete u količini od 15 ml i sterilisati u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 min. Ostaviti epruvete u vertikalnom položaju da se ohlade. Ovako pripremljena podloga može da se čuva sedam dana na temperaturi 0-5°C. Pre upotrebe podlogu otopiti u ključaloj vodi, ohladiti do temperature inkubacije 37°C.

Tripton soja bujon sa 20% glicerolom (Becton Dickenson, Sjedinjene Američke Države)

Tripton	17,0g
Papain iz soje	3,0g
Dekstroza	2,5g
NaCl	5,0g
Di-kalijum-fosfat	2,5g
Glicerol	200ml

Pripremljena tečna podloga se kupuje u pakovanju od 100 x 1,5ml i služi za čuvanje izolata u zamrzivaču. Do upotrebe se čuva u frižideru, na temperaturi do 8°C.

API 20E (Biomerieux, Francuska)

Za identifikaciju kolonija, korišćen je API 20 E standardizovani identifikacioni sistem, za *Enterobacteriaceae* i druge neosetljive Gram-negativne rodove, koji koristi 23 minijaturna biohemijska testa i bazu podataka (API WEB, Biomeriex, Francuska).

Princip rada API 20 E strip (traka) se sastoji u reakciji između proizvoda metabolizma i podloge / reagensa koji se nalazi u gotovom identifikacionom sistemu tokom perioda inkubacije.

Rezultati se tumače prema Interpretacijskoj Tabeli, a identifikacija se vrši pomoću Identifikacione Tabele Analitičkog Profilnog Indexa ili pomoću API WEB programa.

Za upotrebu API 20 E korišćeni su suspenziona podloga, 5 ml (ref. 20110), komplet sa reagensima (ref. 20120) ili pojedinačni reagensi (ref. 70400 do 70460 i 70540), Zn reagens (ref.70380), Mineralno ulje (ref.70100), Pipete ili psi-pipete (ref. 70250) i API 20 E Analytical Profile Index (ref.20190) ili softver, kao i držač za ampule (ref.70200), -termostat (35-37°C), frižider.

Sastojci podloga i reagenasa:

Suspenziona podloga (ref.20110):	Demineralizovana voda
TDA reagens (ref.70400) za otkrivanje triptofan deaminaze	Gvožđe hlorid 3,4 g
Reagensi za otkrivanje indola:	Demineralizovana voda 100 ml
JAMES Reagens (ref.70540)	Sastojak J 2183 0,5 g
Voges Proskauer reagensi za dokazivanje acetona:	HCl N qsp 100 ml
VP 1 (ref.70420):	Kalijum hidroksid 40 g
VP 2 (ref.70430):	Demineralizovana voda 100 ml
Gries reagens za otkrivanje nitrita:	Alfa naftol 6 g
NIT 1 (ref.70440):	Etanol 100 ml
NIT 2 (ref.70450):	Sulfanilna kiselina 0,8 g
OX (ref.70460) za otkrivanje oksidaze:	Sirćetna kiselina 5N 100 ml
	N-N-dimetil-aftilamine 0,6 g
	Sirćetna kiselina 5N 100 ml
	Tetrametil-p-fenilenediamine 1
	Izoamil alkohol 100 ml

U cilju pripreme inokuluma potrebno je najpre otvoriti ampulu sa suspenzionom podlogom (ili sterilnu destilovanu vodu bez dodataka), pomoću vrha psi pipete pikirati jednu koloniju sa podloge i pažljivo umešati u ampulu u cilju što bolje homogenizacije bakterijske suspenzije

Koristeći istu psi pipetu puniti do vrha tube, testove za CIT, VP, GEL (uokvireni testovi), bakterijskom suspenzijom puniti samo do otvora tuba sve druge testove, stvoriti anaerobnu sredinu za testove ADH, LDC, ODC, URE i H₂S (podvučeni testovi) tako što se tube dopune do vrha mineralnim uljem, zatvoriti kutiju za inkubaciju i termostatirati na 35-37°C tokom 18-24 h.

Nakon 18-24 h čitati stripove pomoću Interpretacione Tabele, zapisati sve spontane reakcije na izveštajnom listu.

Ukoliko je glukoza pozitivna i / ili još 3 testa ili više su pozitivna potrebno je uraditi testove koji zahtevaju dodatak reagensa:

-VP Test: dodati 1 kap VP 1 i VP 2 reagensa, sačekati najmanje 10 min. Svetlo ružičasta ili crvena boja pokazuju pozitivnu (+) reakciju, što treba zapisati na izveštajnom listu.

-TDA Test: dodati 1 kap TDA reagensa. Tamno braon boja pokazuje pozitivnu (+) reakciju, što takođe treba zapisati.

-IND Test: dodati 1 kap JAMES regensa, reakcija se odmah razvija, a ružičasta boja pokazuje pozitivnu (+) reakciju, što treba zapisati, dodati 1 kap IND reagensa. Sačekati 2 minuta. Pojava crvenog prstena pokazuje pozitivnu (+) reakciju, što treba zabeležiti.

-NO₂ Test: dodati po jednu kap NIT 1 i NIT 2 reagensa u GLU tubu. sačekati 2-3 minuta. crvena boja pokazuje pozitivnu (+) reakciju.

Negativna reakcija (žuta boja) može se javiti i kao rezultat redukcije N (ponekad su vidljivi mehurići gasa): dodati 2 do 3 mg Zn u GLU tubu. Posle 5 minuta, ukoliko tuba ostane žuta to pokazuje prisustvo N i pozitivnu (+) reakciju, što treba zapisati u izveštaju. Ako test postane ružičasto crven, to je negativna reakcija: nitrat koji je još uvek prisutan u tubi redukovan je Zn.

Ukoliko je glukoza negativna, a broj pozitivnih testova manji ili jednak 2 ne dodavati reagense.

Upotrebom identifikacione tabele porede se dobijeni rezultati upisani u izveštajnom listu sa onim na tabeli sa Analytical Profile Indexom ili sa softverom rezultat dobijenih reakcija mora biti kodiran u numerički profil.

Na izveštajnom listu testovi su razdvojeni u grupe od po 3, a brojevi 1,2 i 4 su indikatori za svaki test. Sabiranjem brojeva koji odgovaraju pozitivnom testu u grupi, dobijamo za svaku grupu

jedan broj što daje sedmocifreni broj koji korespondira sa 20 testova API 20 E. Reakcija na oksidazu je 21 test i ima vrednost 4 ako je pozitivna.

Za čitanje reakcija za L-lizin dekarboksilazu, L-ornitin dekarboksilazu i L-Arginin dehidrolazu, pojava ljubičaste boje je pozitivna reakcija, a pojava žute je negativna reakcija. Za reakcije fermentacije različitih šećera, žuta boja posle inkubacije je pozitivna reakcija, a crvena je negativna. Kod reakcije korišćenja citrata, reakcija je pozitivna ako se boja promeni u plavo.

U Tabeli 4.1.4.1 je dato tumačenje i karakteristični biohemijski rezultati za *C. sakazakii*.

Tabela 4.1.4.1. Interpretacija biohemijskih rezultata za *C. sakazakii*

Reakcija konfirmacije	Pozitivno/negativno	Procenat sojeva <i>C. sakazakii</i> koji pokazuju ovu reakciju
Produkcija žutog pigmenta	+	>99
Oksidaza	-	>99
L-lizin dekarboksilaza	-	>99
L-ornitin dekarboksilaza	+	±90
L-arginin dehidrolaza	+	>99
Kiselina iz fermentacije:		
- D-sorbitola	-	±95
- L-ramnoze	+	>99
- D-sukroze	+	>99
- D-melibioze	+	>99
- amigdalina	+	>99
- hidrolize citrata	+	>95

4.1.5. Reagensi za tipizaciju molekularnim metodama

U cilju tipizacije izolovanih kolonija *C. sakazakii* korišćeni su sledeći reagensi:

- Polimeraze:
 - a) Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoScientific, Vilnius, Litvanija)
 - „ready to use“ rastvor koji sadrži DreamTaq Green Pufer, magnezijum hlorid ($MgCl_2$) i mešavinu dNTP. Ovaj master miks sadrži i dve boje koje se koriste za praćenje elektroforetskog kretanja molekula, kao i reagens za podešavanje gustine što omogućava direktno nanošenje PCR proizvoda na gel.
 - b) DreamTaq Green polimeraza, Fermentas, Litvanija
- Prajmeri (Metabion International AG, Martinsried, Germany)
- Marker molekulske težine GeneRuler DNATM Ladder Mix SM0331 (Thermo Scientific, Vilnius, Litvanija)
- TBE (Tris borat EDTA pufer): 89 mM Tris-HCl, 89 mM borna kiselina, 2,5 mM EDTA [pH8.2]
- Agarozna: Agarose Neo ultra qualitat (Carl ROTH, GmbH, Karlsruhe, Nemačka)
- Gelovi za elektroforezu: 1,5% agarozna u 0,5x TBE.

4.1.6. Oprema

Tokom istraživanja korišćena je standardna laboratorijska oprema za molekularna ispitivanja:

- centrifuga: MPW 350R, MPW Medical Instruments, Poland
- PCR aparat: Eppendorf MasterCycler Personal thermocycler, Eppendorf, Nemačka
- mikrotalasna peć: Neo
- magnetna mešalica: Raypa AG 2, Španija
- vorteks: Velp Scientifica, Italija
- termoblok: CH 100, BioSan, Španija
- uobičajen laboratorijski pribor

4.2. Metode ispitivanja

4.2.1. Izolovanje i identifikacija *C. sakazakii* u formulama za odojčad i biljnim čajevima

4.2.1.1. Izolacija *C. sakazakii*

U formulama za odojčad i biljnim čajevima je, primenom metode ISO 22964:2006, određeno prisustvo *C. sakazakii*. Metoda ISO 22964:2006 se sastoji iz predobogaćenja, selektivnog obogaćenja, izolacije *C. sakazakii* na hromogenim podlogama i konfirmacije potencijalnih kolonija.

Predobogaćenje

U svrhu predobogaćenja, uzorak (25 g formule za odojčad ili 10 g biljnog čaja) je pomešan sa puferisanom peptonskom vodom (225 ml za formule za odojčad i po 90 ml za biljne čajeve) i inkubiran je na $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ tokom narednih 18-24 sata.

Selektivno obogaćenje

Nakon predobogaćenja, 0,1 ml suspenzije je prebačeno u 10 ml selektivnog bujona mLST/vankomicin. Dobijena suspenzija je inkubirana na $44^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ tokom 24 ± 2 sata.

Izolacija *C. sakazakii* kolonija

Posle inkubacije zasejane mLST/vankomicin podloge, suspenzija je presejana ezom (10 μl) na selektivni hromogeni agar za izolaciju *C. sakazakii*. Inkubacija hromogenih ploča je vršena na $44^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ tokom 24 ± 2 sata.

Posle inkubacije, pregledane su hromogene podloge u cilju utvrđivanja tipičnih ili sumnjivih kolonija *C. sakazakii*, koje su promera 1-3 mm, zelene do plavo-zelene boje. Treba napomenuti da su netipične kolonije providne i ljubičaste boje.

U cilju identifikacije izolata, izabrano je 1 do 5 tipičnih kolonija karakterističnih za *C. sakazakii* sa hromogenih podloga. Izabrane kolonije su zatim presejane na TSA. TSA podloge su inkubirane na $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ tokom narednih 44 do 48 sati. Posle inkubacije pregledane su TSA podloge i utvrđeno prisustvo žutih kolonija.

Kada je samo jedna kolonija izabrana i presejana na TSA i posle inkubacije se nisu pojavile žute kolonije, izabrane su još 4 tipične kolonije. Ako je bilo manje od 5 tipičnih kolonija, presejavane su sve pojedinačno na tripton soja agar.

4.2.1.2. Biohemijska potvrda

Žute kolonije izrasle na TSA podlozi mogu potencijalno biti bakterije *C. sakazakii*. Da bi se ove pretpostavke potvrdile, u ovom istraživanju je korišćena biohemijska konfirmacija korišćenjem gotovog biohemijskog kita API 20E, BioMeurieux, Francuska. Po 1 žuta kolonija sa TSA podloge je suspendovana u 5 ml Api NaCl 0.85% suspenzije i za dalju biohemijsku potvrdu je postupano po uputstvu proizvođača opisano u prethodnom poglavlju.

4.2.1.3. Priprema sojeva i izolata

Odabrani izolati su adekvatno čuvani, presejavani i aktivirani i ispitivani morfološki i biohemijski pre svake faze eksperimenta. Svi izolati su presejavani na Trypton Soja bujon sa dodatkom glicerola 20% (Beckon Dickenson, SAD), inkubirani na 37°C, 24 sata u aerobnim uslovima. Tako izrasle kulture su zamrzavane i čuvane u zamrzivaču (na -18°C). Po potrebi se određen izolat odmrzavao i zasejavan je na hromogenu podlogu za *C. sakazakii*. Posle inkubacije na 44°C±1°C tokom 24±2 sata, plave kolonije su presejavane na TSA i inkubirane na 25°C±1°C tokom narednih 44 do 48 sati. Birane su kolonije sa intenzivno žutom bojom, koje su korišćene za veštačku kontaminaciju u eksperimentu, tako što je 1 kolonija rastvarana u 10 ml fiziološkog rastvora sa dodatkom peptona i izmiksovana. Po 1 ml ove suspenzije i njeno razređenje 1:10 su korišćeni za dalji eksperiment.

4.2.2. Izolovanje i određivanje broja *Enterobacteriaceae* u formulama za odojčad

Izolovanje i određivanje broja *Enterobacteriaceae* u formulama za odojčad je urađeno prema standardnoj metodi ISO 21528-2, deo 2: Metoda brojanja kolonija u formulama za prehranu odojčadi.

Količina od 10 g formule za odojčad korišćena je za određivanje broja *Enterobacteriaceae* metodom ISO 21528-2, tako što je dodato 90 ml fiziološkog rastvora sa dodatkom peptona. Ako se formula nije rastvorila tokom 30 minuta, onda se uzorak lagano mešao sterilnom kašičicom.

Od osnovnog razblaženja (10 grama uzorka + 90 ml fiziološkog rastvora sa peptonom) je odpipetirano po 0,33 ml inicijalne suspenzije razređenja 10⁻¹ u tri Petri šolje u kojoj je razlivena

VRBG podloga (2 ponavljanja). U sledeće dve Petri šolje je otpipetirano po 0,1 ml inicijalne suspenzije razređenja u 2 Petri šolje za razređenje 10^{-2} i postupak je ponavljen za svako sledeće razređenje. U svaku Petri šolju je razliveno još po 10 ml VRBG agara temperiranog na 44°C. Nakon očvršćavanja podloge na svaku ploču je dodatno naliveno po 15 ml VRBG agara temperiranog na 44°C. Dodavanjem ovog sloja sprečeno je prerastanje i omogućeni su poluanaerobni uslovi. Ploče sa okrenutim poklopcem nadole su inkubirane na temperaturi od $37\pm 1^\circ\text{C}$ tokom 24 ± 2 sata. Nakon inkubacije izbrojane se izrasle karakteristične kolonije (crvene ili purpurne boje, sa poreolima taloga ili bez njih).

Za potvrdu da su izrasle kolonije iz familije *Enterobacteriaceae*, uzimano je pet karakterističnih kolonija i presejane su a na ploče sa hranljivim agarom, koje se inkubiraju na 37°C narednih 24 ± 2 sata. Pomoću eze kolonije se testiraju na reakciju oksidaze tako što se nanose na filter papir na kome se nalazi oksidaza. Posle 10 sekundi se procenjuje da li je reakcija oksidaze pozitivna / negativna i to na osnovu promene boje papira u ljubičasto. Ako nema promene boje, reakcija oksidaze je negativna, što je inače očekivana reakcija za familiju *Enterobacteriaceae*.

Oksidaza negativne kolonije se dalje zasejavaju na glukozni agar, ubodom u dubinu agara u epruveti. Zasejane podloge se inkubiraju na 37°C tokom 24 ± 2 sata. Ukoliko se razvije žuta boja kroz ceo sadržaj epruvete, smatra se da je test fermentacije pozitivan. Kolonije koje su negativne na oksidazu, a pozitivne na glukozu se smatraju bakterijama iz familije *Enterobacteriaceae*.

4.2.3. Ispitivanje promene broja izolovanih *C. sakazakii* tokom pripreme biljnih čajeva korišćenjem vode različite temperature

Nakon aktivacije izolata obeleženih šiframa M3, K2, S8 i S11, izrasle kolonije su prenete u 10 ml fiziološkog rastvora sa dodatkom peptona i ceo sadržaj je izmiksovan. Po 1 ml ove suspenzije je prelivan preko 10 g suvog čaja iste vrste, istog proizvođača.

Ovako kontaminirani biljni čajevi koji su prethodno eksperimentalno kontaminirani prelivevani su sterilnom destilovanom vodom zagrejanom na 60°C , 72°C i ključalom vodom i određen je broj *C. sakazakii* (poglavlje 4.3.3.1.) odmah nakon preliivanja vodom, i nakon 2, 4, 6 i 8 min od momenta preliivanja vodom, pri čemu je uzorak stajao na sobnoj temperaturi. Inicijalni spajkovan broj *C. sakazakii* je bio između 6 i 8 log cfu/g.

4.2.4. Ispitivanje promene broja izolovanih *C. sakazakii* u biljnim čajevima tokom čuvanja na različitim temperaturama

U cilju određivanja promene broja *C. sakazakii* u uzorcima čaja tokom vremena na sobnoj ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) i na temperaturi frižidera ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$), uzorci od 10 g biljnih čajeva su prethodno pripremljeni prelivanjem ključalom vodom (po 90 ml), zatim rashlađeni do sobne temperature i inokulisani supenzijom bakterija *C. sakazakii* (izolati M1, M2, M3, K1, K2, K3, K4, K5, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11 i S12). Izolati su aktivirani, izrasle kolonije su prenete u 10 ml fiziološkog rastvora sa dodatkom peptona i ceo sadržaj je izmiksovan. Po 1 ml ove suspenzije je još jednom prenet u 9ml fiziološkog rastvora sa peptonom i dobijena suspenzija je dalje korišćena za eksperiment.

Za određivanje promene broja na sobnoj temperaturi, uzorci čaja su analizirani posle 48 i 72 sata. Takođe, uzorci čaja čuvani u frižideru su analizirani i određen je broj *C. sakazakii* u pripremljenim čajevima nakon 7, 14 i 21 dan.

4.2.5. Određivanje broja *C. sakazakii*

Na hranljivim podlogama TSA i hromogenoj podlozi za *C. sakazakii*, 0,1 ml razređenja je naneto na već razliveno podloge (metoda razmazivanja). Za svako razređenje zasejavane su hromogene podloge i TSA. Hromogene podloga su inkubirane na $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ tokom 24 ± 2 sata. Nakon inkubacije, izbrojane su samo tipične kolonije *C. sakazakii* i to kolonije promera 1-3mm, zelene do plavo-zelene boje. Ploče TSA su inkubirane na $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, tokom 48 sati. Posle inkubacije brojane su žute kolonije *C. sakazakii* sa TSA ploča.

4.2.6. Molekularne metode identifikacije i karakterizacije *C.sakazakii*

4.2.6.1. Izolacija DNK

Izolacija nukleinskih kiselina je prvi stepen u većini molekularno-bioloških ispitivanja i svim tehnikama rekombinantne DNK. Ekstrakcija nukleinskih kiselina iz biološkog materijala zahteva lizu ćelija, inaktivaciju nukleaza prisutnih u ćeliji (enzima koji prekidaju DNK i RNK lance) i odvajanje ciljne DNK od ostalog ćelijskog materijala.

Tradicionalne metode za prečišćavanje DNK iz ćelijskog ekstrakta predstavljaju kombinaciju ekstrakcije, precipitacije, centrifugiranja, elektroforeze i afinitetnog razdvajanja. Najvažnije je

prečistiti mikroorganizme od interesa iz matriksa životne sredine, kao i od nekulturable bakterijskih vrsta.

Za potrebe ovog istraživanja, korišćena je brza izolacija DNK po Ibekwe i sar. (2000)

- u 300 μ l sterilne destilovane vode resuspendovati svežu kulturu dobijenu iz 1 kolonije (1 μ l kulture ili dobro izraslu koloniju);
- prokuvati na 95°C 10 minuta (termoblok);
- odmah staviti na led 5 minuta do 8 minuta (u zamrzivač)(nagla promena temperature dovodi do lize ćelija).
- Centrifugirati 12 minuta na 12000 obrtaja/minuti.
- Supernatant sa DNK se koristi direktno kao materijal za PCR ili se čuva na -20°C u zamrzivaču.

4.2.6.2. Gel elektroforeza

Gel elektroforeza je metod za razdvajanje molekula na osnovu njihove veličine i naelektrisanja. Molekuli se razdvajaju pod dejstvom električnog polja u inetrtnim medijumima. Negativno naelektrisani molekuli se kreću ka pozitivnoj elektrodi-katodi, dok se pozitivno naelektrisani molekuli kreću ka negativnoj elektrodi- anodi. Gel elektroforeza se koristi za karakterizaciju najznačajnije osobine- molekulske mase polinukleotida i polipeptida. Takođe, ona služi i za proveru čistoće uzoraka, heterogenosti i stepena degradacije molekula.

Elektroforetsko migraciono rastojanje DNK kroz gel zavisi od 4 glavna parametra: molekulske mase, konformacije DNK, koncentracije gela i primenjenog napona struje. Za pripremu medijuma u kome će se vršiti razdvajanje molekula mogu se koristiti različite vrste i koncentracije medijuma, koje su uslovljene veličinom pora i sposobnošću da razdvoje fragmente sličnih veličina. Najčešće korišćeni materijali su agarozna i akrilamid. Agarozni gelovi razdvajaju DNK fragmente od 100 i više baznih parova, dok poliakrilamidni gelovi mogu razdvojiti DNK fragmente koji se razlikuju u 1 baznom paru. Agarozna je visoko prečišćen agar, koji se rastvara u određenom puferu. Molekuli agarozne formiraju matriks sa porama između molekula. Koncentrovaniji rastvor agarozne formira gušći matriks i manje pore.

Agarozni gelovi prave se tako što se agarozna rastvara u puferu i zagreva do tačke topljenja u mikrotalasnoj peći, zatim se sipa u kalup koji određuje dimenzije gela. Dok je agarozna tečna, u nju se postavlja „češalj“ kojim se u gelu prave „bunarčići“ tj. mesta u gelu koja će se popuniti

uzorkom. Kada se agarozna ohradi do 50-60°C i polimerizuje, boja se promeni od prozirne do mlečno bele. Češljevi se polako izvuku iz gela, tako da se ne oštete bunarčići. Formirani gel se prebaci u kadu za elektroforezu koja je napunjena puferom. Jačina pufera u kadi i u gelu mora biti ista.

Osnovni princip elektroforetskog razdvajanja zasnovan je na činjenici da čestice različitog naelektrisanja i različite mase, pod uticajem električnog polja za isto vreme prelaze različite putanje na agaroznom nosaču. Po standardnoj proceduri, produkti PCR reakcija se razdvajaju na 1-1,5% agaroznom gelu (1-1,5 % agarozna u TBE), pri konstantnoj struji jačine 5V/cm (napajač struje EPS 600, Pharmacia Biotech).

Produkti u gelu se boje etidijum bromidom (0,5µg/ml TBE). Etidijum bromid (EtBr) se ugrađuje u lance nukleinskih kiselina i omogućava njihovu vizuelizaciju pod UV svetlom. DNK apsorbuje UV zračenje 254-320 nm koje se transmituje kroz boju, a energija se re-emituje na 590 nm u crveno-narandžastom regionu spektra.

Etidijum bromid se obično priprema kao štok koncentracije 5 ili 10 mg/ml u vodi, čuva se zaštićen od svetla na sobnoj temperaturi ili na 4°C. Boja se može dodati gelu i puferu za elektroforezu, ili se gel može naknadno bojiti potapanjem u rastvor etidijum bromida (0,5µg/ml tokom 30 minuta), što je primenjeno u ovim istraživanjima. Produkti su posmatrani na transiluminatoru nad UV svetlom (Macro Vue Uvis-20, Hoefer). Korišćen je zaštitni poklopac transiluminatora, jer usmereno UV zračenje može dovesti do trajnog oštećenja očiju. Sve se radi sa rukavicama, jer je etidijum bromid jak mutagen i ima svojstvo da se interkalira u molekule DNK živih organizama, pa izaziva neželjene opasne mutacije. Nukleinske kiseline u čije je lance inkorporiran EtBr raspoznaju se kao svetle trake na gelu. U cilju čuvanja rezultata PCR analize, gelovi se fotografišu.

DNK standardi (markeri) za procenu molekularnih masa molekula koji se elektroforetski razdvajaju sadrže mešavinu standarda DNK poznatih veličina (molekularnih masa). Izbor markera zavisi od očekivane veličine ispitivanih fragmenata i koncentracije gela. U eksperimentima je korišćen GeneRuler DNA LadderMix (SM0331), Fermentas, Litvanija.

4.2.6.3. rep-PCR

rep-PCR je metoda koja omogućava proučavanje diverziteta izolata korišćenjem specifičnih DNA sekvenci - repetitivnih DNA elemenata: REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) i BOX elemenata. Pri ERIC amplifikaciji koristi se ERIC 1R/2 set prajmera. U okviru BOX tipa rep-PCR korišćen je (GTG)₅ prajmer (de Bruijn, 1992. -iz Josic 2011).

4.2.6.3.1. ERIC PCR

Reakciona smeša za ERIC:

16,6mM (NH₄)₂SO₄;

67 mM Tris HCL pH 8,8;

6,7 mM MgCl₂;

6,7 mM EDTA;

30 μM β-merkaptto etanol;

4 μg bovin serum albumin;

1mM dNTP;

po 50 pM prajmera (ERIC 1R i ERIC 2), Metabion;

1 U DreamTaq polimeraze, Fermentas/Litvanija;

50ng DNK.

4.2.6.3.2. BOX PCR

Reakciona smeša za BOX PCR, tj. za (GTG)₅ prajmer koji pripada ovoj vrsti, može se odvijati pod standardnim uslovima reakcione smeše kao za univerzalnu amplifikaciju. Amplifikacija se odvijala u 50μl smeše koja sadrži:

Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoScientific, Vilnius, Litvanija);

50pM prajmera (Metabion);

50ng DNK.

U Tabeli 4.2.6.3.1. su dati uslovi ERIC i BOX PCR reakcija.

Tabela 4.2.6.3.1. Oligonukleotidne sekvence prajmera i odgovarajući uslovi PCR reakcija

Prajmer	Nukleotidna DNK sekvenca	Denaturacija	Aniling	Izduživanje prajmera	Broj ciklusa
ERIC 1R	5'-ATgTAAgCTCCTggggATTAC-3'	95°C 1min			1
ERIC 2	5'- AAgTAAgTgACTggggTgAgCg-3'	94°C 1min	52°C 1min	65°C 8 min 65°C 16min	35 1
(GTG) ₅	5'gTg gTg gTg gTg gTg-3'	95°C 2min 94°C 1min	53°C 1min	65°C 8min 65°C 16 min	1 30 1

4.2.6.4. RAPD

Korišćeni su RAPD prajmeri AP10 (Selenska-Pobell i sar., 1996), SPH1 (Dolley i sar., 1993) i AP11 (Jošić, neobjavljeni podaci).

Amplifikacione reakcije za RAPD izvedene su u 50µl smeše koja sadrži:

Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoScientific, Vilnius, Litvanija)

50pM prajmera (Metabion);

50ng DNK.

Uslovi amplifikacije za RAPD su dati u Tabeli 4.2.6.4.1.

Tabela 4.2.6.4.1. Oligonukleotidne sekvence prajmera i odgovarajući uslovi amplifikacije za RAPD

Prajmer	Oligonukleotidna sekvenca	Denaturacija	Aniling	Izduživanje prajmera	Broj ciklusa
AP 10	5'-CAGGCCCTTC-3'	95°C 5min			1
AP 11	5'-CAGGCCCTTCA-3'	94°C 1min	36°C 1min	72°C 2min 72°C 5min	45 1
SPH 1	5'-(GTG) ₅ -3'	94°C 3min 94°C 1min	40°C 1min	65°C 3min 65°C 8min	1 40 1

4.2.6.5. Amplifikacija i prečišćavanje 16S rDNK

Amplifikacija 16S rDNK izvršena je univerzalnim prajmerima fD1/rD1 i odgovarajući amplifikovani fragmenti su prečišćeni i sekvencirani (Weisburg i sar., 1991).

Amplifikacija 16S rDNK se odvijala u 50µl smeše koja sadrži:

Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoScientific, Vilnius, Litvanija)

po 50pM prajmera fD1 i rD1 (Metabion);

50ng DNK.

Tabela 4.2.6.5. Univerzalni prajmeri za bakterijsku 16S rDNK (Weisburg i sar., 1991)

Prajmer	Oligonukleotidna sekvenca	Denaturacija	Aniling	Izduživanje prajmera	Broj ciklusa
fD1	5'-ccgaattcgctgacaacAGAAG TTTGATCCTGGCTCAG-3'	95°C 5 min. 94°C 1 min.	36°C 1min.	72°C 2min. 72°C 5min.	1 45 1
rD1	5'-cccgggatccaagcttAAGGA GGTGATCCAGCC-3'				

Produkti PCR reakcija su razdvojeni na 1,5% gelu, uz odgovarajuće boje za uzorak i markere molekularnih masa, obojeni se rastvorom etidijum-bromida (5 µg/ml) i fotografisani.

Produkti PCR reakcija su prečišćeni po uputstvu proizvođača kitovima: GeneJET PCR purification kit i Gel Extraction Kit, Fermentas, Litvanija.

4.2.7. Kompjuterski program korišćen pri obradi dobijenih rezultata

Klaster analiza je izvršena na bazi UPGMA (unweighted pair group arithmetic average-linkage algorithm) primenom STATISTICA 7 programa. Ovaj program omogućava analizu podataka, njihovu obradu, izradu statističkih pokazatelja, izradu filogenetskih stabala...

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je sprovedeno u periodu od 2007. do 2013. godine, sa ciljem da se utvrdi prisustvo *C. sakazakii* u uzorcima formula za odojčad u prahu (360 uzoraka) i uzorcima različitih biljnih čajeva (520 uzoraka). Izolati *Cronobacter* spp. iz biljnih čajeva su dalje korišćeni za ispitivanje termorezistentnosti ove bakterije, kao i promene broja bakterije tokom skladištenja pripremljenog čaja na sobnoj i temperaturi frižidera. U poslednjem delu ovog istraživanja, primenom molekularnih metoda je napravljeno poređenje sojeva izolovanih iz biljnih čajeva u okviru ove studije (20 izolata) sa postojećim referentnim sojevima *C. sakazakii*.

5.1. *C. sakazakii* u formulama za odojčad

Dobijeni rezultati istraživanja pokazuju da, ni iz jednog uzorka od 360 ispitanih uzoraka formule za odojčad u prahu, koje su komercijalno dostupne na tržištu Republike Srbije, nije izolovana bakterija *C. sakazakii*, što se može videti u Tabeli 5.1.1.

Tabela 5.1.1. Rezultati ispitivanja prisustva *C. sakazakii* u uzorcima formula za odojčad u prahu

Godina uzorkovanja	Broj ispitanih uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka
2007	44	0
2008	50	0
2009	45	0
2010	70	0
2011	67	0
2012	84	0
Ukupno	360	0

5.2. Određivanje broja *Enterobacteriaceae* u formulama za odojčad

Od 360 uzoraka formula za odojčad u prahu, u 29 (8%) uzoraka je bilo rasta na ljubičasto-crvenom žučnom agaru sa glukozom. Nađeni broj *Enterobacteriaceae* je u 22 uzorka bio <10 cfu/g, a u ostalih 7 uzoraka je broj karakterističnih *Enterobacteriaceae* bio <100 cfu/g (Tabela 5.2.1). Biohemijskom analizom je utvrđeno da je najzastupljeniji soj bio *Enterobacter aerogenes* (u 18 uzoraka), zatim *Hafnia alvei* (u 5 uzoraka), *Enterobacter amnigenus* (u 4 uzorka) i *Enterobacter cloacae* (u 1 uzorku).

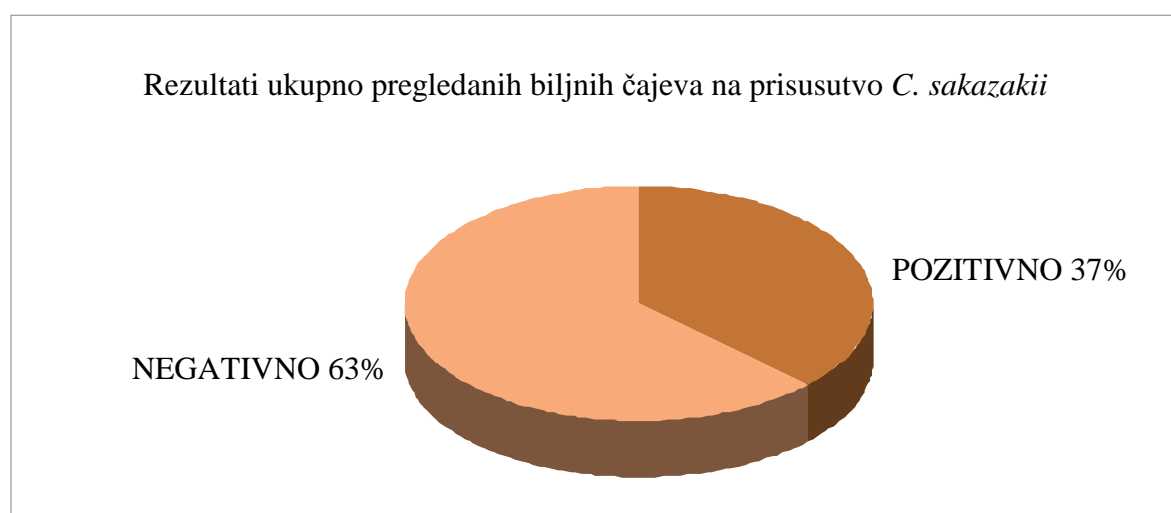
Tabela 5.2.1. Broj *Enterobacteriaceae* u formulama za odojčad

Godina uzorkovanja	Broj ispitinih uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka		Broj <i>Enterobacteriaceae</i> u uzorcima (cfu/g)								
		Pozitivni	Procenat	Uz.1	Uz.2	Uz.3	Uz.4	Uz.5	Uz.6	Uz.7	Uz.8	
2007	44	3	6,8%	<10	50	<10	-	-	-	-	-	-
2008	50	4	8%	<10	<10	<10	<10	-	-	-	-	-
2009	45	2	4,4%	<10	<10	-	-	-	-	-	-	-
2010	70	5	7,1%	<10	30	40	<10	<10	-	-	-	-
2011	67	8	11,9%	<10	<10	<10	<10	50	40	<10	<10	-
2012	84	7	8,3%	<10	<10	20	<10	60	<10	<10	-	-
Ukupno	360	29	8%									

5.3. *C. sakazakii* u biljnim čajevima

5.3.1. Prisustvo *C. sakazakii* u biljnim čajevima

Dobijeni rezultati ukazuju da od ukupno 520 uzoraka biljnih čajeva koji su bili obuhvaćeni ovim istraživanjem, 193 uzorka čaja (38%) je bilo pozitivno na prisustvo *C. sakazakii*, a 327 (62%) negativno (Grafik 5.3.1.1). Među negativnim uzorcima bilo je uzoraka u kojima ima bakterija roda *Enterobacteriaceae*, ali po biohemijskim karakteristikama ne pripadaju rodu *Cronobacter spp.*

Grafik 5.3.1.1. Prisustvo *C. sakazakii* u uzorcima biljnih čajeva

Dobijeni rezultati o broju pozitivnih uzoraka u različitim vrstama ispitanih biljnih čajeva su prikazani u Tabeli 5.3.1.1.

Tabela 5.3.1.1. Rezultati ispitivanja prisustva *C. sakazakii* u biljnim čajevima

Komercijalni naziv uzorka	Latinski naziv, sastav	Broj analiziranih uzoraka	Pozitivni	Negativni
Bebi čaj*		127	56	71
Dečiji čaj*		62	32	30
Mešavine biljne uz dodatke (voćne, sa aromama)*	(voćne, sa aromama)	29	2	27
Mešavine – “lekovite”*	Mešavine biljnih čajeva	81	31	50
Beli slez**	<i>Althaeae radix</i>	30	10	20
Sena**	<i>Sennae folium</i>	16	8	8
Žalfija**	<i>Salviae folium</i>	14	3	11
Kamilica	<i>Chamomilae flos</i>	18	7	11
Uva	<i>Uvae ursi folium</i>	14	5	9
Lipa	<i>Tilia cordata</i>	9	3	6
Kopriva	<i>Urticae folium</i>	7	3	4
Kantarion	<i>Hyperici herba</i>	4	2	2
Matičnjak	<i>Melissae folium</i>	10	5	5
Majčina dušica	<i>Thymi serpylli herba</i>	4	1	3
Rtanjski čaj	<i>Satureja montana</i>	6	2	4
Nana	<i>Menthae piperitae folium</i>	8	2	6
Hibiskus	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	11	2	9
Hajdučka trava	<i>Millefolii herba</i>	8	5	3
Maslačak	<i>Taraxacum officinale</i>	4	1	3
Kora krušine	<i>Frangulae cortex</i>	5	2	3
Komorač	<i>Foeniculum vulgare</i>	3	1	2
List breze	<i>Betulae folium</i>	10	4	6
List borovnice	<i>Myrtilli folium</i>	10	5	5
Crni čaj	<i>Camelia sinensis, fermentisani</i>	15	1	14
Zeleni čaj	<i>Camelia (Thea) sinensis</i>	15	0	15
Ukupno pregledano		520	193	327

*- Mešavine biljaka **- Prelivaju se hladnom vodom

Posle biohemijskih analiza karakterističnih kolonija, 193 izolata je podeljeno na 29 numerička profila koristeći apiWEB program, što je prikazano u Tabeli 5.3.1.2.

Tabela 5.3.1.2. Broj izolata *C. sakazakii* po numeričkim profilima API 20E

API 20E Numerički profil	Broj izolata <i>Cronobacter spp.</i>
3301753	1
3306713	2
3307173	11
3307353	3
3307363	1
3307371	24
3307372	1
3307373	13
3307733	1
3307753	1
3307763	1
3307771	7
3307773	4
3344373	5
3345173	3
3345371	1
3345373	5
3345772	5
3345773	14
3346773	9
3347173	6
3347333	1
3347353	1
3347371	1
3347372	20
3347373	6
3347573	23
3347773	21
3307573	2
UKUPNO	193

Najzastupljeniji numerički profili bili su 3307371 (24 izolata), 3347573 (23 izolata), 3347773 (21 izolat) i 3347372 (20 izolata).

„Bebi čaj“ i „Dečiji čaj“ predstavljaju mešavine različitih biljaka i u Tabeli 5.3.1.3. je prikazano 7 grupa „Bebi čaja“ i 4 grupe dečijih čajeva po sastavu, različitih proizvođača.

Tabela 5.3.1.3. Rezultati prisustva *C. sakazakii* u uzorcima bebi čajeva i dečijih čajeva u zavisnosti od sastava mešavine biljaka

Komercijalni naziv uzorka	Broj uzoraka	Pozitivni	Grupa*	Broj pozitivnih	Biljni sastav grupe
„Bebi čaj“	127	56	B1	17	Kamilica, komorač, anis, sena, hibiskus
			B2	13	Kamilica, hibiskus, cvet narandže
			B3	9	Kamilica, komorač, anis, menta, hibiskus
			B4	6	Sena, komorač, kamilica
			B5	5	Sena, anis, list breze
			B6	4	Kamilica, podbel, komorač, seme vranilove trave
			B7	2	Komorač, kim, plod morača, kora krušine
„Dečiji čaj“	62	32	D1	12	Herba pitome nane, herba hajdučke trave, cvet kamilice, plod korijandera
			D2	10	Herba pitome nane, herba mirođije, kim, komorač
			D3	7	Herba pitome nane, lipa, list breze, zova, kamilica
			D4	3	Sena, šipurak, kim, anis, rastavić

* Grupe B1-B7 i D1-D4: predstavljaju različite proizvođače biljnih čajeva.

Mešavine biljnih čajeva se koriste kao pomoćno lekovito sredstvo za najteže bolesti, u slučaju raznih bolesti kod kojih je ukupno stanje organizma loše, imunitet je oslabljen. U Tabeli 5.3.1.4. je dat pregled nalaza *C. sakazakii* u ovim biljnim mešavinama.

Tabela 5.3.1.4. Rezultati prisustva *C. sakazakii* u uzorcima mešovitih biljnih čajeva koji na deklaraciji imaju preporuku da služe u lečenju, otklanjanju simptoma bolesti i poboljšanju opšteg stanja organizma.

Lekovite mešavine (namena)	Broj uzoraka	Pozitivni		Negativni	
		Broj	Procent	Broj	Procent
xxx 10A (cirkulacija, holesterol, psorijaza, sterilitet, nervni sistem)	11	6	55%	5	45%
xxx 20C (bubrezi, bešika, bakterije, nefritis)	15	9	60%	6	40%
xxx 7B (jetra , hepatitis, žuč, kamenac)	11	5	45%	6	55%
xxx 3-5H (hormoni, sterilitet, ciste, miomi, tumori)	6	2	33%	4	67%
xxx 3 (gastritis, čir, Krenova dijeta, nervni sistem)	8	2	25%	6	75%
xxx bronhi (bronhijalni putevi)	4	2	50%	2	50%
Za decu (respiratorni trakt)	6	1	17%	5	83%
Čaj za mršavljenje I	7	2	29%	5	71%
Čaj za mršavljenje II	5	1	20%	4	80%
Planinski čaj (za poboljšanje imuniteta, bolje varenje, resp.puteve)	8	1	13%	7	88%
Ukupno pregledano	81	31		50	

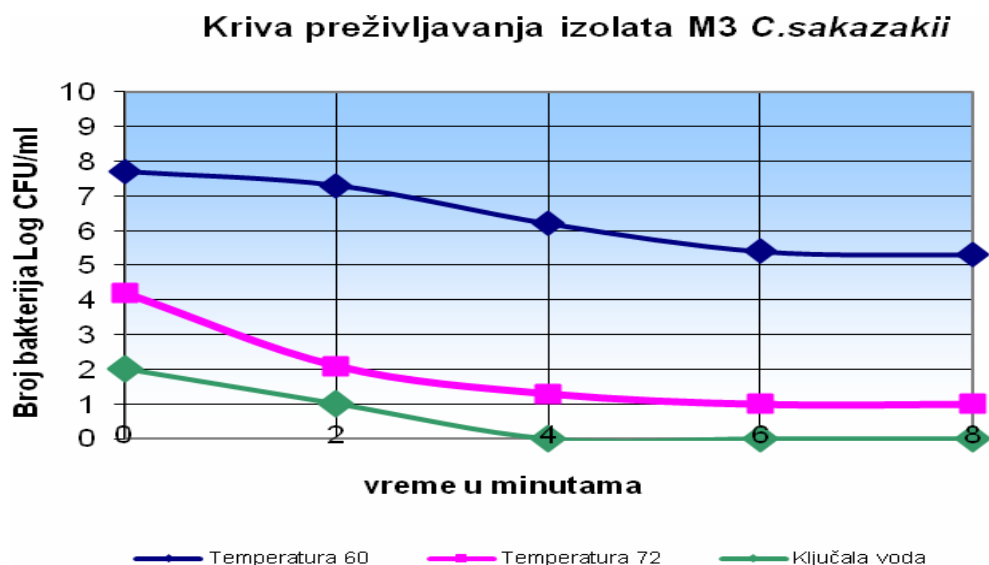
5.3.2. Promena broja *C. sakazakii* u biljnim čajevima tokom pripreme čaja (voda temperature 60°C, 72°C i temperature ključanja)

Za proveru termorezistentnosti *C. sakazakii* korišćena su 4 soja *C. sakazakii* koji su izolovani iz čajeva dostupnih na tržištu Repulike Srbije i to M3 i K2 (izolati iz lista sene), S8 (iz „Bebi čaja“) i S11 (mešavina preporučena za gastrointestinalne probleme). Ispitivanje termorezistentnosti je obuhvatilo tretiranje inokulisanog čaja iste vrste, istog proizvođača, u kome je prethodno potvrđeno da ne sadrži *C. sakazakii*, vodom jednom od tri izabrane temperature (60°C, 72°C i ključala voda) tokom ukupno 8 minuta, a broj *C. sakazakii* je određivan svakih 2 minuta. Promena broja *C. sakazakii* u inokulisanim čajevima, koji su pripremljeni na tri različita načina, prikazana je u Tabeli 5.3.2.1. Treba napomenuti da su ovi prikazani rezultati dobijeni korišćenjem neselektivne podloge za rast *C. sakazakii*– TSA. Grafički prikaz promene broja *C. sakazakii* M3, K2, S8 i S11 na različitim temperaturama pripreme čaja tokom 8 minuta je dat na Grafcima 5.3.2.1, 5.3.2.2, 5.3.2.3 i 5.3.2.4.

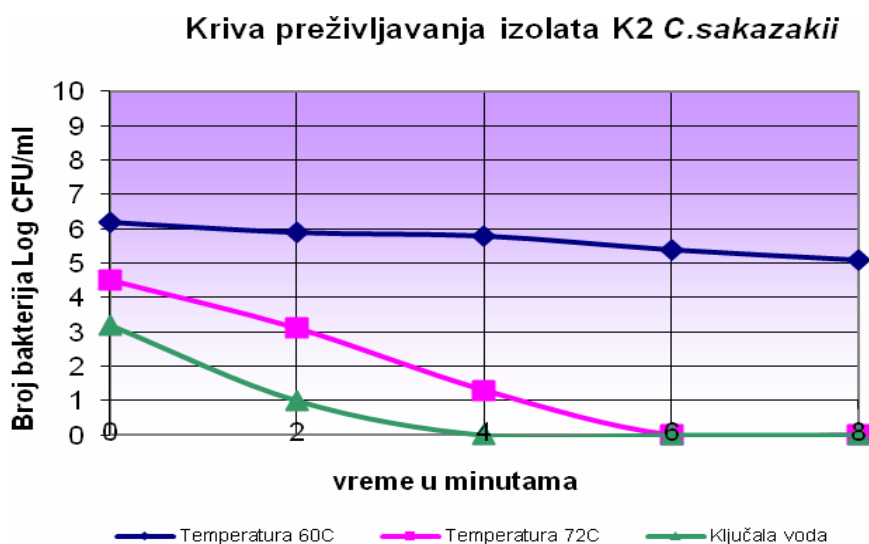
Tabela 5.3.2.1. Promena broja različitih izolata *C. sakazakii* u inokulisanom biljnom čaju kada je za pripremu čaja korišćena temperatura od 60°C, 72°C i na temperaturi ključanja vode posle 2, 4, 6 i 8 minuta

Temperatura pripreme čaja	Vreme delovanja	Broj bakterija log cfu/g			
		M3	K2	S8	S11
60°C	0	7.7	6.2	6.5	7.5
	2	7.3	5.9	6.4	6.4
	4	6.2	5.8	4.2	3.3
	6	5.4	5.4	3.5	3.5
	8	5.3	5.1	1.2	2
72°C	0	4.2	4.5	6.5	4.1
	2	2.1	3.1	2.1	2.5
	4	1.3	1.3	1.3	1.5
	6	1	<1	<1	<1
	8	1	<1	<1	<1
Ključala voda	0	2	3.2	2	2
	2	1	1	2	<1
	4	<1	<1	<1	<1
	6	<1	<1	<1	<1
	8	<1	<1	<1	<1

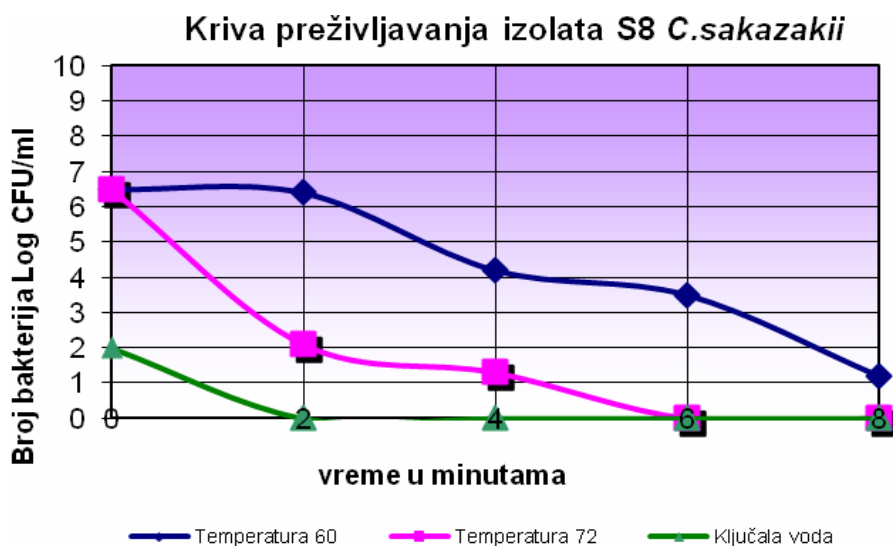
Grafik 5.3.2.1. Promena broja *C. sakazakii* izolata M3 u biljnom čaju koji je pripremljen korišćenjem vode temperature od 60°C, 72°C i temperature ključanja vode, posle 2, 4, 6 i 8 minuta.



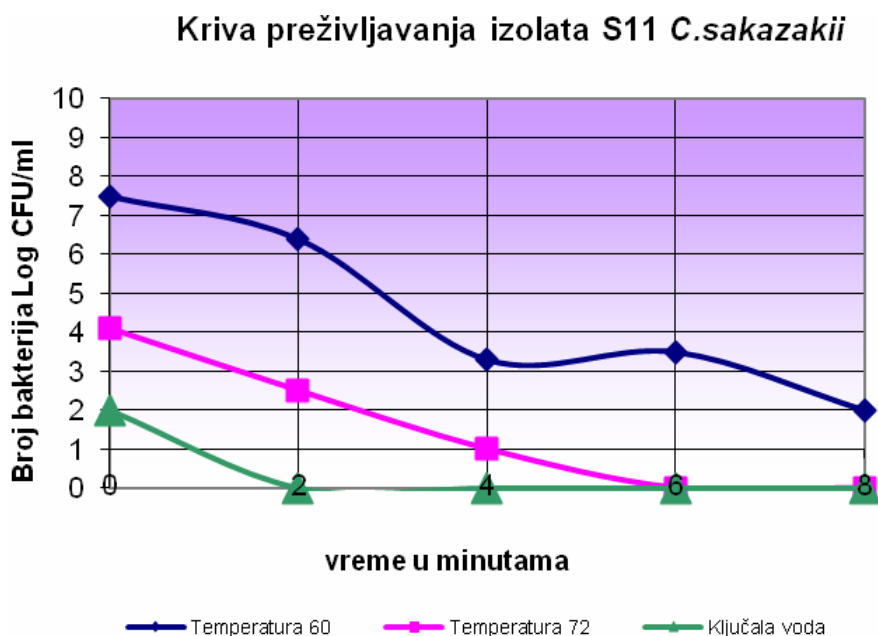
Grafik 5.3.2.2. Promena broja *C. sakazakii* izolata K2 u biljnom čaju koji je pripremljen korišćenjem vode temperature od 60°C, 72°C i temperature ključanja vode, posle 2, 4, 6 i 8 minuta.



Grafik 5.3.2.3. Promena broja *C. sakazakii* izolata S8 u biljnom čaju koji je pripremljen korišćenjem vode temperature od 60°C, 72°C i temperature ključanja vode, posle 2, 4, 6 i 8 minuta.



Grafik 5.3.2.4. Promena broja *C. sakazakii* izolata S11 u biljnom čaju koji je pripremljen korišćenjem vode temperature od 60°C, 72°C i temperature ključanja vode, posle 2, 4, 6 i 8 minuta.



5.3.3. Promena broja *C. sakazakii* u pripremljenim biljnim čajevima tokom čuvanja na sobnoj temperaturi (23±1°C)

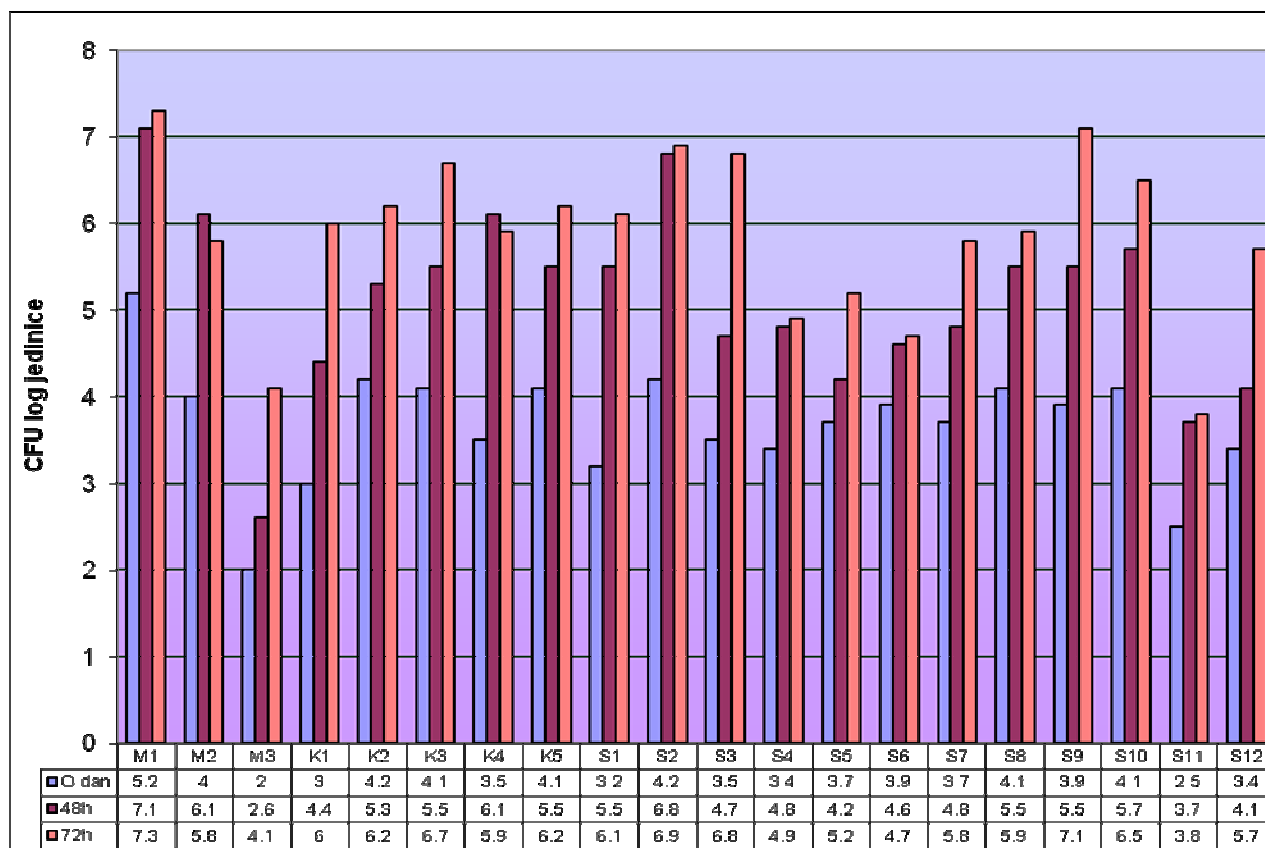
Kako bi se proverila mogućnost preživljavanja *C. sakazakii* u pripremljenom biljnom čaju na sobnoj temperaturi korišćeno je 20 sojeva *C. sakazakii* koji su izolovani iz čajeva dostupnih na tržištu Republike Srbije. Promena broja *C. sakazakii* u inokulisanim čajevima koji su čuvani na sobnoj temperaturi je prikazana u Tabeli 5.3.3.1 i na Grafiku 5.3.3.1. Treba napomenuti da su ovi prikazani rezultati dobijeni korišćenjem neselektivne podloge za rast – TSA.

Tabela 5.3.3.1. Promena broja *C. sakazakii* ispitivanih izolata na sobnoj temperaturi (23±1°C), posle 48 i 72 sata od momenta pripreme čaja.

Izolat	Poreklo izolata (vrsta čaja)	Broj bakterija log cfu/g	Broj bakterija log cfu/g posle 48h	Broj bakterija log cfu/g posle 72h
M1	Bebi čaj (grupa B1*)	5.2	7.1	7.3
M2	List sene	4	6.1	5.8
M3	Beli slez	2	2.6	4.1
K1	Bebi čaj (grupa B3*)	3	4.4	6
K2	Beli slez	4.2	5.3	6.2
K3	Nana	4.1	5.5	6.7
K4	Kamilica	3.5	6.1	5.9
K5	Nana	4.1	5.5	6.2
S1	Kopriva	3.2	5.5	6.1
S2	Bebi čaj (grupa B1*)	4.2	6.8	6.9
S3	Bebi čaj (grupa B2*)	3.5	4.7	6.8
S4	Biljna mešavina – za resp. trakt	3.4	4.8	4.9
S5	Biljna mešavina – za regul. jetre	3.7	4.2	5.2
S6	Biljna mešavina – za regul. jetre	3.9	4.6	4.7
S7	Bebi čaj (grupa B2*)	3.7	4.8	5.8
S8	Bebi čaj (grupa B2*)	4.1	5.5	5.9
S9	Dečiji čaj (grupa D2*)	3.9	5.5	7.1
S10	Dečiji čaj (grupa D1*)	4.1	5.7	6.5
S11	Biljna mešavina – za gastroint.trakt	2.5	3.7	3.8
S12	Biljna mešavina – za resp. Trakt	3.4	4.1	5.7

* grupe bebi i dečijih čajeva iz Tabele 5.3.1.3.

Grafik 5.3.3.1. Promena broja *C. sakazakii* ispitivanih izolata na sobnoj temperaturi (22 do 24°C), posle 48 i 72 sata od momenta pripreme čaja.



5.3.4. Rezultati ispitivanja promene broja *C.sakazakii* na temperature frižidera 4±2°C

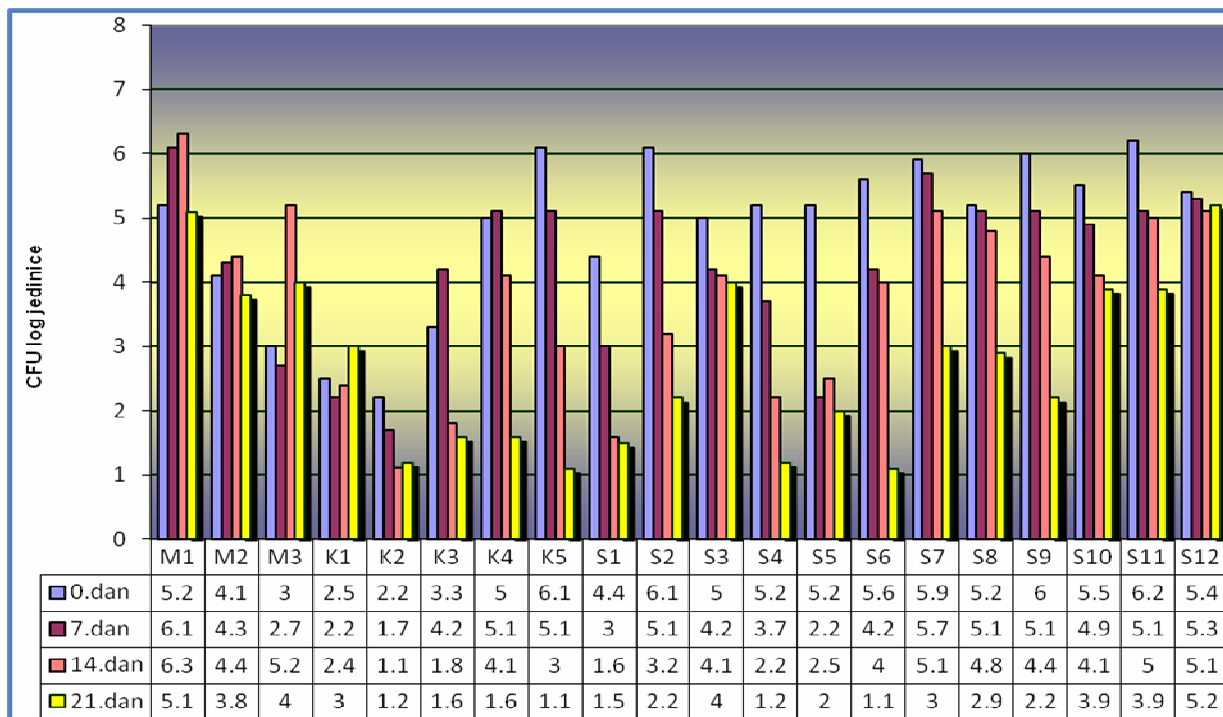
Kako bi se proverila mogućnost preživljavanja *C. sakazakii* u pripremljenom biljnom čaju na temperaturi frižidera korišćeno je 20 izolata *C. sakazakii* koji su izolovani iz čajeva dostupnih na tržištu Repulike Srbije. Promena broja *C. sakazakii* u inokulisanim čajevima je prikazana u Tabeli 5.3.4.1 i na Grafiku 5.3.4.1. Prikazani rezultati su dobijeni korišćenjem neselektivne podloge za rast – TSA.

Tabela 5.3.4.1. Promena broja *C. sakazakii* ispitivanih izolata na temperaturi frižidera od $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, posle 7, 14 i 21 dan od momenta pripreme čaja.

Izolat	Poreklo izolata (vrsta čaja)	Broj bakterija log cfu/g	Broj bakterija log cfu/g posle 7 dana	Broj bakterija log cfu/g posle 14 dana	Broj bakterija log cfu/g posle 21 dana
M1	Bebi čaj (grupa B1*)	5.2	6.1	6.3	5.1
M2	List sene	4.1	4.3	4.4	3.8
M3	Beli slez	3	2.7	5.2	4
K1	Bebi čaj (grupa B3*)	2.5	2.2	2.4	3
K2	Beli slez	2.2	1.7	1.1	1.2
K3	Nana	3.3	4.2	1.8	1.6
K4	Kamilica	5	5.1	4.1	1.6
K5	Nana	6.1	5.1	3	1.1
S1	Kopriva	4.4	3	1.6	1.5
S2	Bebi čaj (grupa B1*)	6.1	5.1	3.2	2.2
S3	Bebi čaj (grupa B2*)	5	4.2	4.1	4
S4	Biljna mešavina – za resp. trakt	5.2	3.7	2.2	1.2
S5	Biljna mešavina – za regul. jetre	5.2	2.2	2.5	2
S6	Biljna mešavina – za regul. jetre	5.6	4.2	4	1.1
S7	Bebi čaj (grupa B2*)	5.9	5.7	5.1	3
S8	Bebi čaj (grupa B2*)	5.2	5.1	4.8	2.9
S9	Dečiji čaj (grupa D2*)	6	5.1	4.4	2.2
S10	Dečiji čaj (grupa D1*)	5.5	4.9	4.1	3.9
S11	Biljna mešavina – za gastroint.trakt	6.2	5.1	5	3.9
S12	Biljna mešavina – za resp. trakt	5.4	5.3	5.1	5.2

* grupe bebi i dečijih čajeva iz Tabele 5.3.1.3.

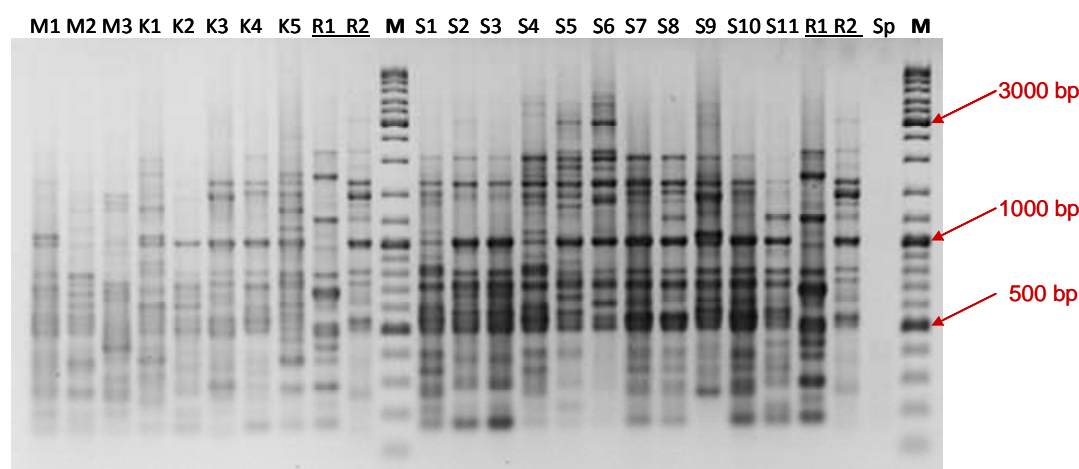
Grafik 5.3.4.1. Promena broja *C. sakazakii* ispitivanih izolata na temperaturi frižidera od 4±2°C, posle 7, 14 i 21 dana od momenta pripreme čaja.



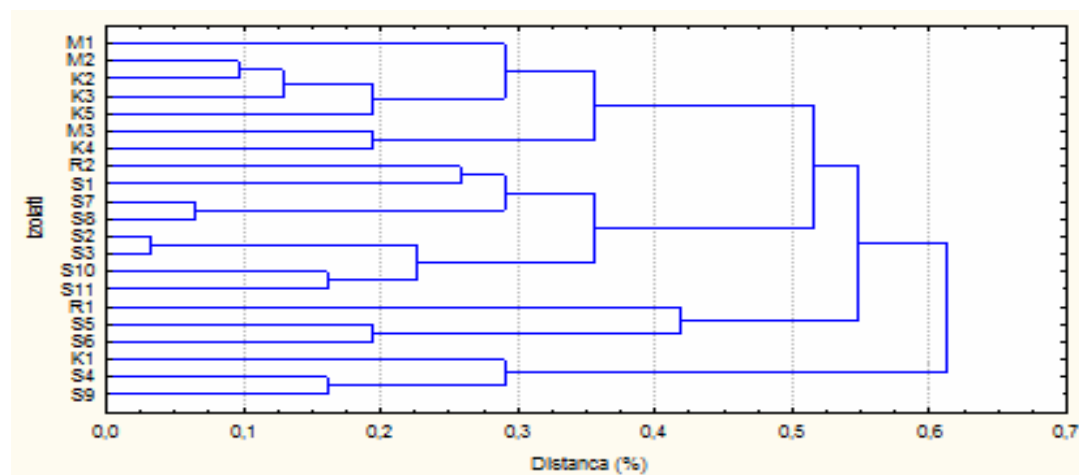
5.4. Identifikacija i genetička karakterizacija izolata *C. sakazakii* poreklom iz čajeva

5.4.1. rep – PCR

rep-PCR je metoda koja omogućava proučavanje diverziteta izolata korišćenjem specifičnih DNK sekvenci - repetitivnih DNK elemenata: REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) i BOX elemenata. Genetička karakterizacija *C. sakazakii* izolata izvedena je upotrebom prajmera (GTG)₅ za BOX-PCR i upotrebom seta prajmera ERIC 1R/ ERIC 2 za ERIC-PCR. Reprezentativni profili su prikazani na slikama 5.4.1.1. i 5.4.1.3.

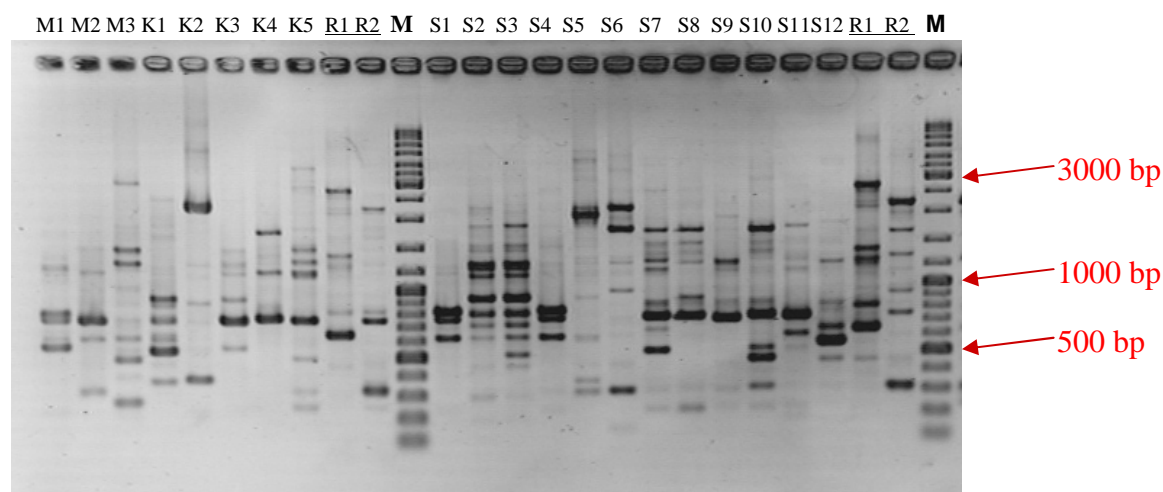


Slika 5.4.1.1. rep-PCR profili izolata *C. sakazakii* na osnovu BOX elemenata korišćenjem (GTG)₅ prajmera. M- GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (Thermo Scientific - Fermentas, Vinius, Litvanija); Linija R1- ATCC 51329- *Enterobacter (Cronobacter) muytjensii*; Linija R2- NCTC 8155 *C. sakazakii*; Linije M1-M3; K1-K5; S1-S11- izolati *C. sakazakii* iz biljnih čajeva; sp-negativna kontrola

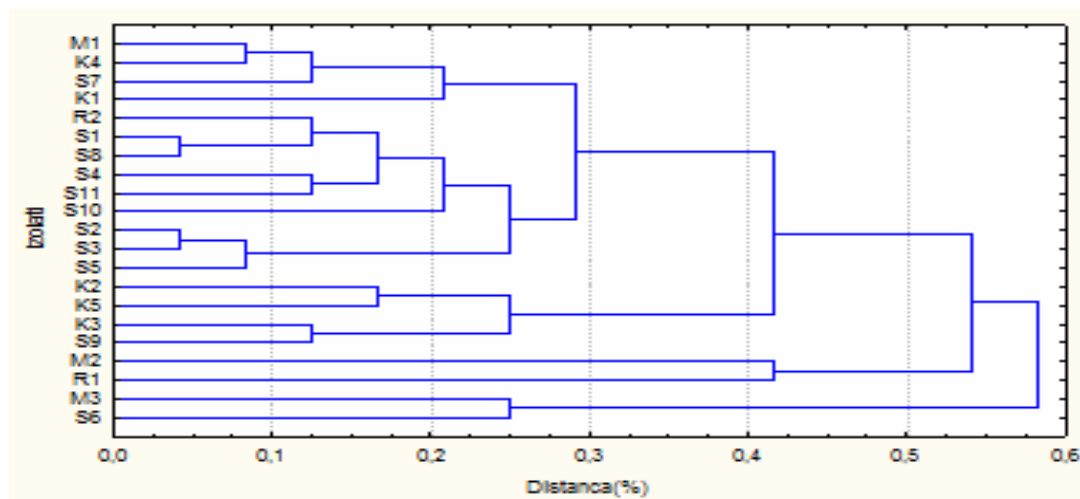


Slika 5.4.1.2. Dendrogram na osnovu razlika izolata *C. sakazakii* dobijenih BOX analizom korišćenjem prajmera (GTG)₅

Na osnovu BOX analize korišćenjem (GTG)₅ prajmera izolati *C. sakazakii* mogu da se grupišu u 3 klastera (slika 5.4.1.2). Prvi klaster se sastoji od 3 izolata, i to: K1 (bebi čaj), S4 (biljna mešavina za respiratorne smetnje) i S9 (dečiji čaj). Izolati S5 i S6 zajedno sa referentnim sojem R1 formiraju drugi klaster. Treći klaster ima dva subklastera koja su međusobno udaljena 54%. Subklaster 1 obuhvata 2 grane međusobno udaljene 36%. U grani 1 se nalaze izolati S2 (iz bebi čaja, grupa B1) i S3 (iz bebi čaja, grupa B2) koji se razlikuju samo 3%. U grani 2 su sojevi S7 i S8 koji se razlikuju manje od 7%. Izolat S1 poreklom iz koprive je najbliži referentnom soju R2. Subklaster 2 obuhvata 2 grane sa svim M i K izolatima, osim K1.

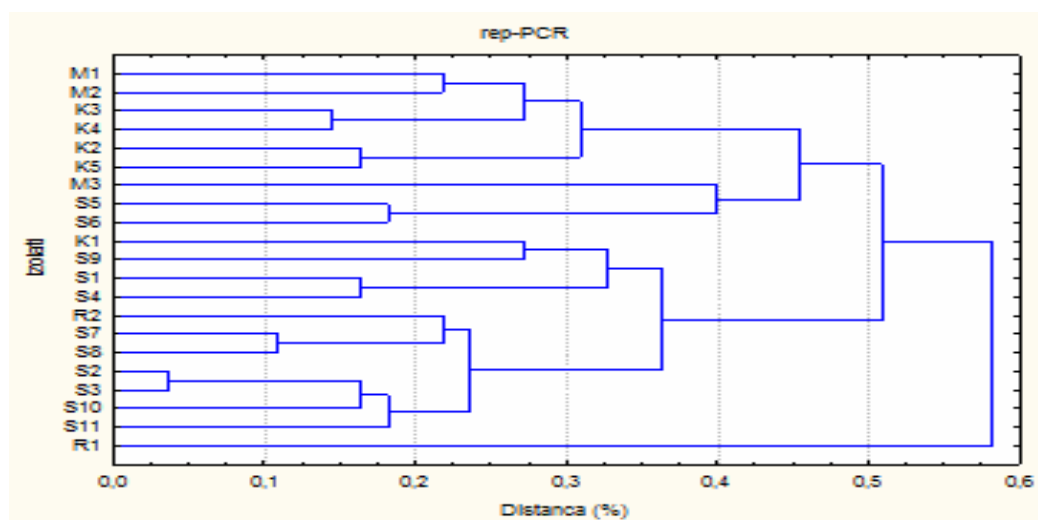


Slika 5.4.1.3. rep-PCR profili izolata *C. sakazakii* dobijeni korišćenjem ERIC seta prajmera. M- GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (ThermoScientific, Vinius, Litvanija); Linija R1- ATCC 51329- *Enterobacter (Cronobacter) mytjensii*; Linija R2- NCTC 8155 *C. sakazakii*; Linije M1-M3; K1-K5; S1-S12- izolati *C. sakazakii* iz biljnih čajeva



Slika 5.4.1.4. Dendrogram na osnovu razlika *C. sakazakii* izolata dobijenih rep-PCR analizom na osnovu ERIC prajmera.

ERIC prajmeri takođe grupišu izolate u 3 klastera (Slika 5.4.1.4). Klaster 1 obuhvata 2 soja M3 i S6. U klasteru 2 izolat M2, koji je izolovan iz lista sene, grupisan je sa referentnim sojem R1. U klasteru 3 je grupisano 17 izolata u 2 subklastera, sa po 2 grane. Subklaster 1 ima 2 grane koje su međusobno udaljene 25%. U prvoj grani subklastera 2 je grupisano 8 izolata iz S grupe (S5, S3, S2, S10, S11, S4, S8, S1) zajedno sa referentnim sojem R2. Ove grane se međusobno razlikuju 29%. Izolati S1 i S8, kao i S2 i S3 pokazuju male međusobne razlike (<4%).



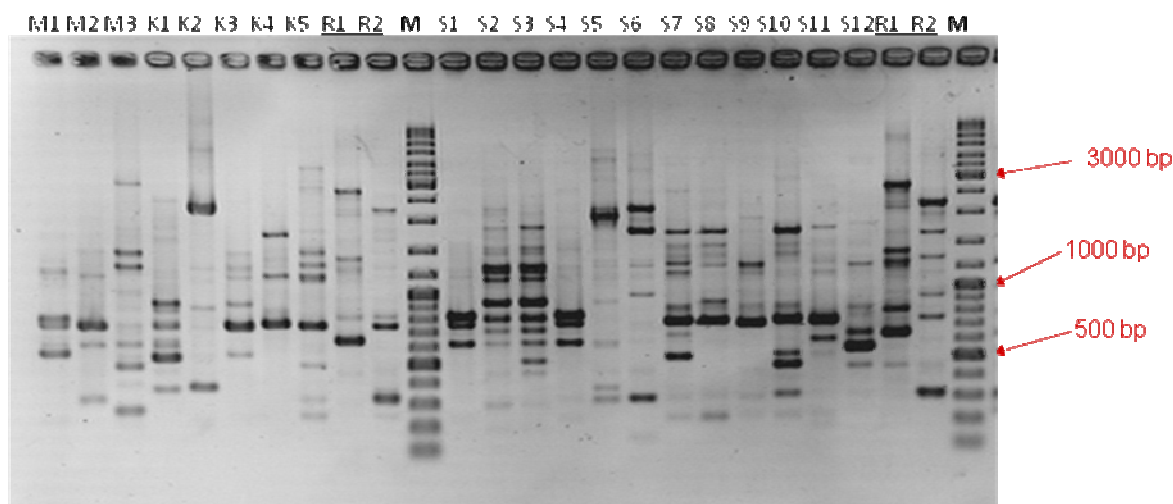
Slika 5.4.1.5. Dendrogram na osnovu razlika izolata *C. sakazakii* dobijenih zbirnom rep-PCR analizom.

Zbirna analiza rep-PCR pokazuje da su svi ispitivani izolati su podeljeni u 2 klastera, a da je referentni soj R1 izdvojen u poseban klaster koji se 58% razlikuje od klastera 2 (slika 5.4.1.5). U klasteru 2 je grupisano 19 izolata i 1 referentni soj R2 u 2 subklastera sa po 2 grane, koje su međusobno slične 64%. U grani 1 subklastera 1 grupisano je 6 izolata zajedno sa referentnim

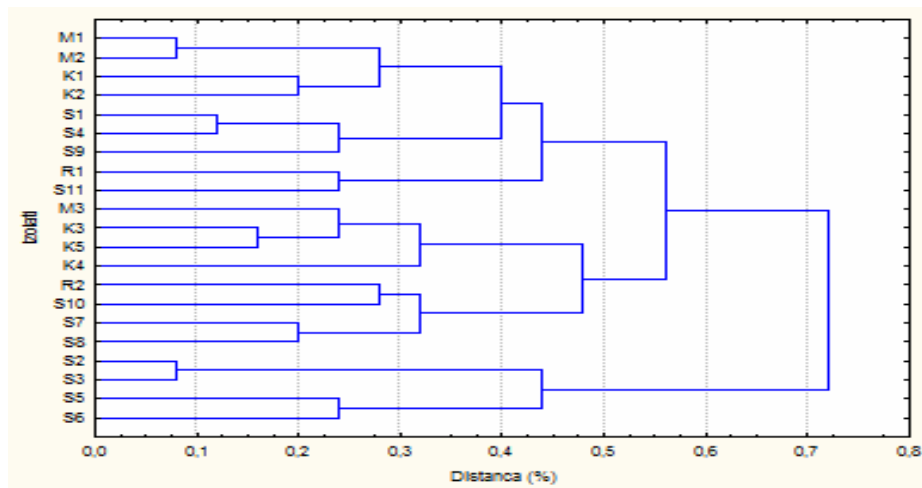
sojem R2, kome su najbližnji S7 i S8 izolati (23%), poreklom od biljnih mešavina koje su preporučene kao pomoćna sredstva za bolesti jetre (S7) i dijabetes (S8). Grana 2 obuhvata 4 izolata: S1 i S4 (razlika 16%), S9 i K1 (razlika 28%).

5.4.2. RAPD

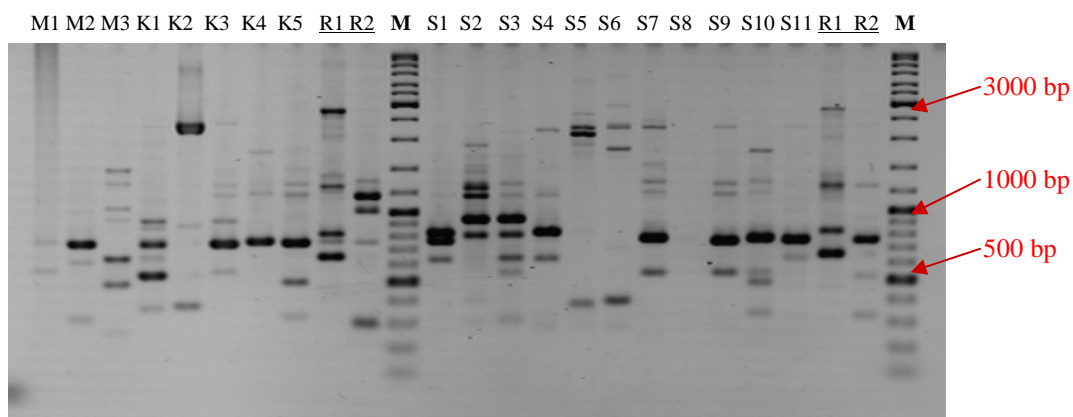
Genetička karakterizacija izolata *C. sakazakii* obuhvatila je i RAPD analizu, kao dodatni metod za potpuniju karakterizaciju izolata i poređenje sa referentnim sojevima. RAPD analiza je obuhvatila amplifikaciju fragmenata DNK *C. sakazakii* na osnovu prajmera različite dužine: 10-mera AP10, 11-mera AP11, koji je adaptiran na osnovu prethodnog i dizajniran za ova istraživanja, i 15-mera SPH1. RAPD profili i dendrogrami dobijeni na osnovu njih prikazani su na slikama 5.4.2.1. do 5.4.2.6, a zbirna analiza na osnovu sva 3 prajmera *C.sakazakii* izolata prikazana je na slici 5.4.2.7.



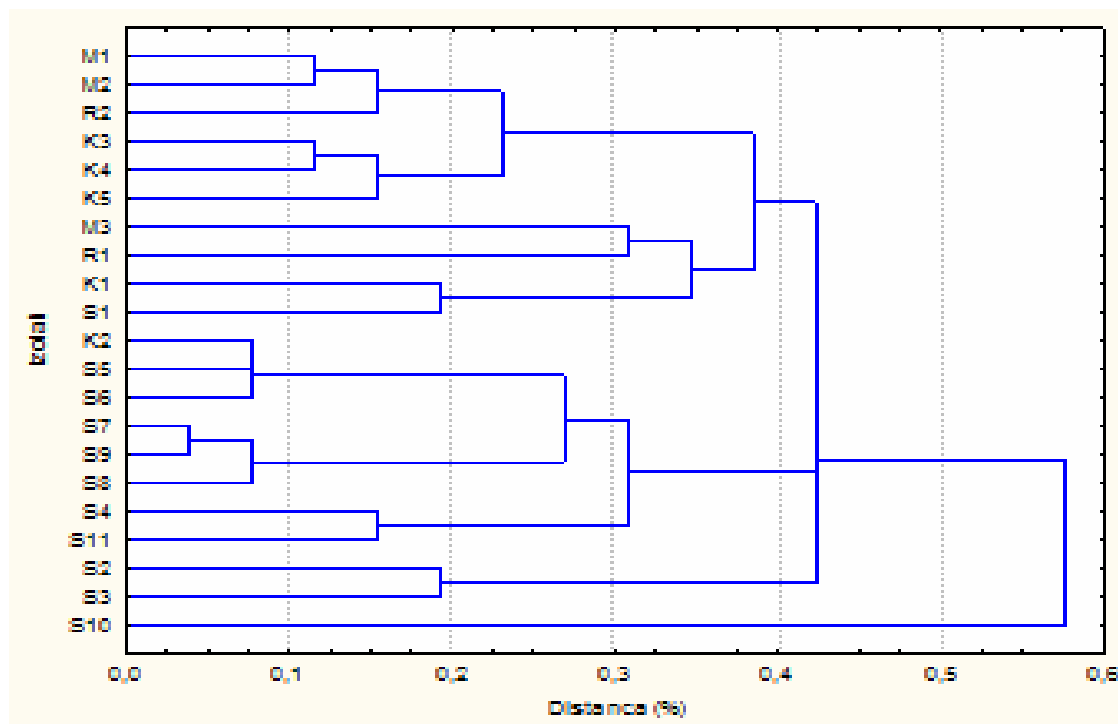
Slika 5.4.2.1. RAPD profili izolata *C. sakazakii* na osnovu AP10 prajmera. M- GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (ThermoScientific, Vinius, Litvanija); Linija R1- ATCC 51329- *Enterobacter (Cronobacter) muytjensii*; Linija R2- NCTC 8155 *C. sakazakii*; Linije M1-M3; K1-K5; S1-S12- izolati *C. sakazakii* iz biljnih čajeva



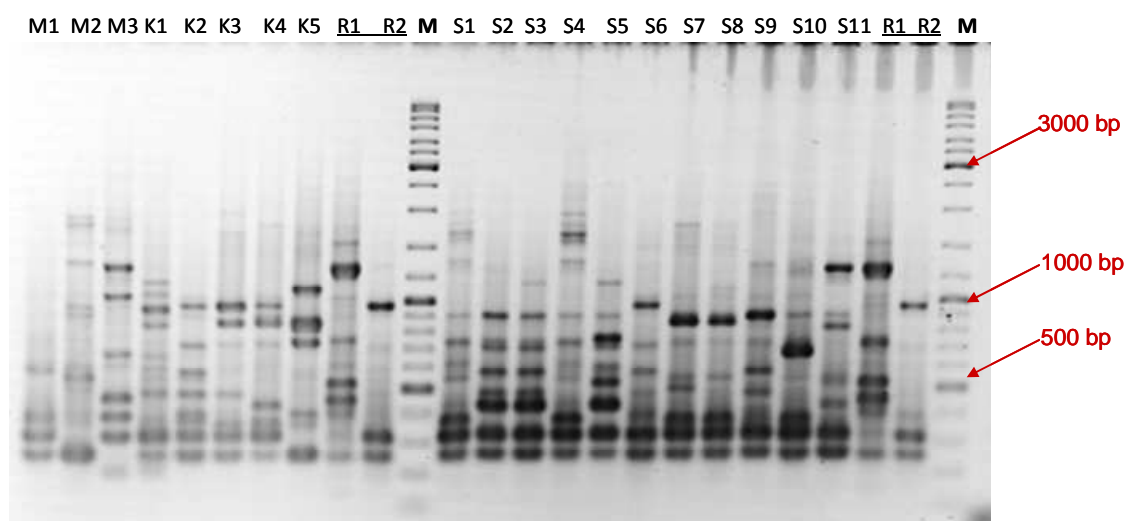
Slika 5.4.2.2. Dendrogram RAPD profila izolata *C. sakazakii* na osnovu AP10 prajmera.



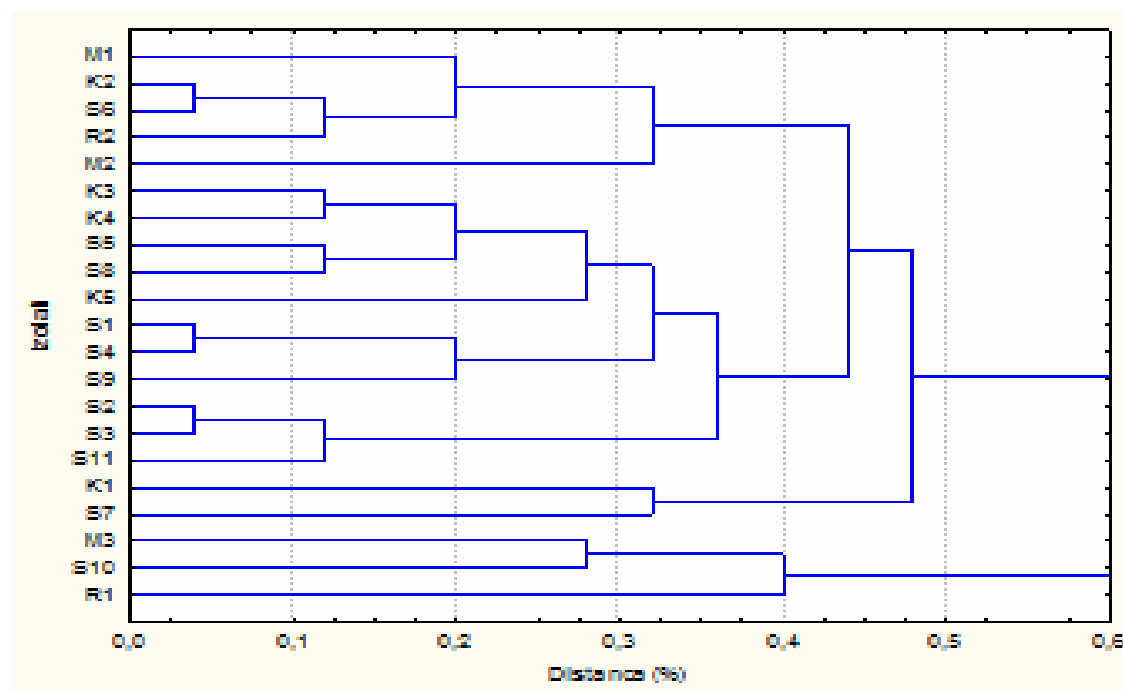
Slika 5.4.2.3. RAPD profili izolata *C. sakazakii* na osnovu AP11 prajmera. M- GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (ThermoScientific, Vinius, Litvanija); Linija R1- ATCC 51329- *Enterobacter (Cronobacter) muytjensii*; Linija R2- NCTC 8155- *C. sakazakii*; Linije M1-M3; K1-K5; S1-S11– izolati *C. sakazakii* iz biljnih čajeva



Slika 5.4.2.4. Dendrogram razlika profila izolata *C. sakazakii* na osnovu RAPD analize pomoću AP11 prajmera

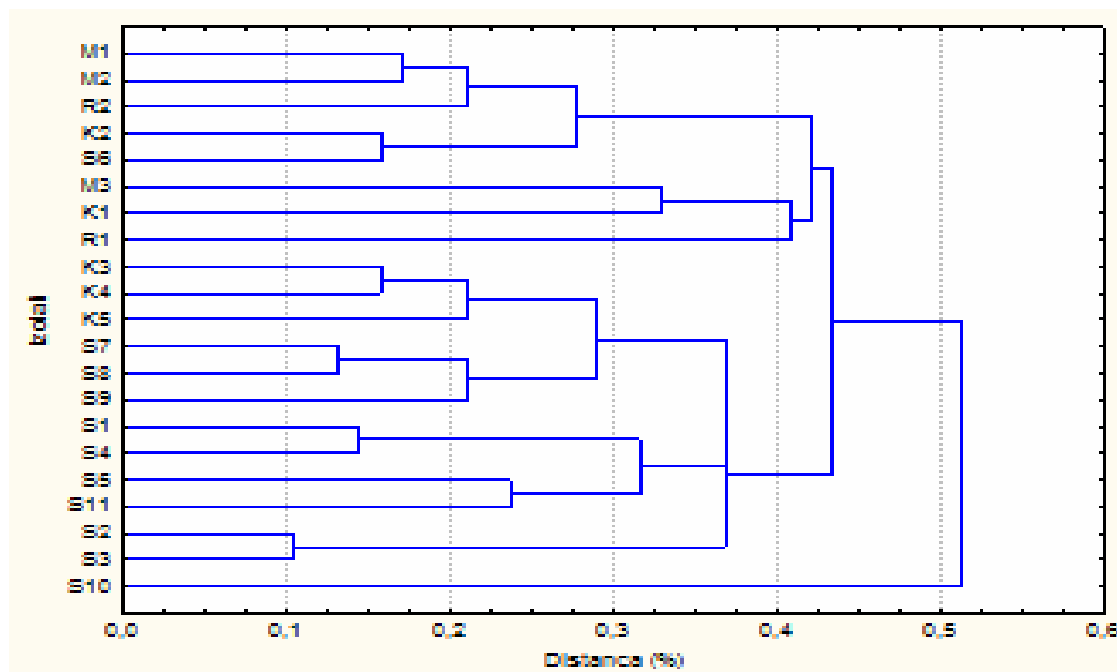


Slika 5.4.2.5. RAPD profili izolata *C. sakazakii* na osnovu SPH1 prajmera. M- GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (ThermoScientific, Vinius, Litvanija); Linija R1- ATCC 51329- *Enterobacter (Cronobacter) mytjensii*; Linija R2- NCTC 8155- *C. sakazakii*; Linije M1-M3; K1-K5; S1-S11 - izolati *C. sakazakii* iz biljnih čajeva



Slika 5.4.2.6. Dendrogram na osnovu razlika profila izolata *C. sakazakii* dobijenih RAPD analizom koristeći SPH1 prajmer

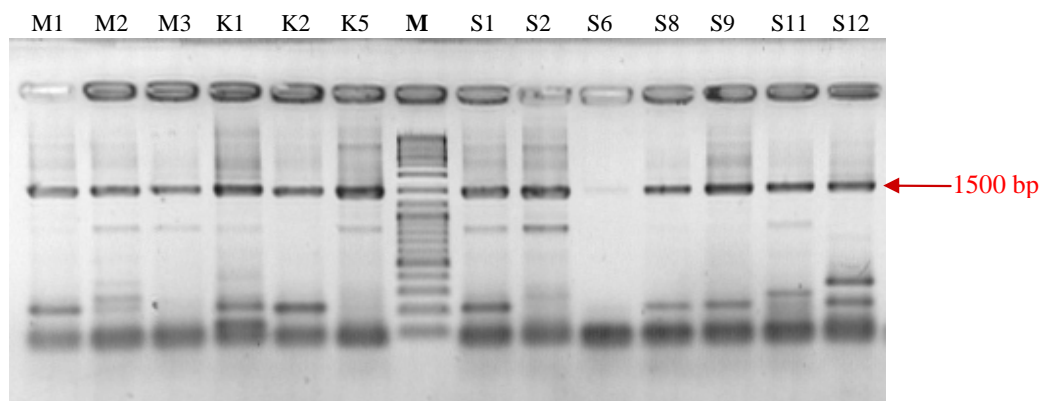
Kombinovana RAPD analiza predstavljena je zbirnim dendrogramom konstruisanim na osnovu profila dobijenih amplifikacijom fragmenata pomoću 3 prajmera (AP10, AP11 i SPH1). Na osnovu zbirne RAPD analize izolati su formirali 2 klastera. U klasteru 1 je samo izolat S10, izolovan iz dečijeg čaja (grupe D1) koji se od svih ostalih razlikuje preko 50%. Klaster 2 ima 2 subklastera koji su međusobno udaljeni 43%. Subklaster 1 ima 3 grane. U prvoj grani su 2 izolata S2 i S3 izolati koji se razlikuju 10%, a potiču iz bebi čaja (S2 -grupa B1 i S3- grupa B2) . U grani 2 su izolati S11 i S5 (međusobno slični 76%) i S1 (iz koprive) i S4 koji se razlikuju 14%. U trećoj grani je grupisano 6 izolata (S9, S8, S7, K5, K4 i K3). Subklaster 2 ima 2 grane. U prvoj grani su grupisani izolati M3 i K1 zajedno sa referentnim sojem R1. U drugoj grani su izolati S6 (biljna mešavina za regulaciju rada jetre) i K2 (iz belog sleza) koji su međusobno udaljeni 15%, kao i izolati M1 (iz bebi čaja grupe B1) i M2 (iz lista sene), koji se razlikuju od R2 izolata 21%.



Slika 5.4.2.7. Dendrogram na osnovu razlika izolata *C. sakazakii* dobijenih zbirnom RAPD analizom

5.4.3. Identifikacija *Cronobacter* spp. na osnovu 16S rDNK

Amplifikacija 16S rDNK i njeno sekvenciranje omogućili su precizniju identifikaciju izolata i poređenje sa velikim brojem deponovanih sekvenci u NCBI (National Center for Biotechnology Information) bazi podataka. 16S rDNK amplikoni izolata *Cronobacter* spp. prikazani su na Slici 5.4.3.1.



Slika 5.4.3.1. 16S rDNK amplikoni izolata *C. sakazakii*. M- GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (ThermoScientific, Vinius, Litvanija); Linije M1-M3; K1; K2; K5; S1; S2; S6; S8; S9; S11; S12 - izolati *C. sakazakii* iz biljnih čajeva

Sekvenciranje na osnovu prečišćene 16S rDNK je urađeno za izolate M1, K2, K5 i S11. Specifičnost i srodnost izolata je analizirana pomoću baze podataka Centra za biotehnoške informacije (NCBI) BLAST analizom sekvenci izolata, a dobijene i njima najrodnije sekvence su prikazane u Tabelama 5.4.3.1. do 5.4.3.4.

Tabela 5.4.3.1. Sekvenca izolata M1 (1501 bp)

Izolat	Sekvenca
M1 (1501bp)	GATTAAGCCGGGGCGGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGGAGCAGCTTG CTGCTCTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGA TAACTACTGAAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG GCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGG CGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACAGGTCCAGAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCG CGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAA TAACCACAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTG TAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAG TCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC CGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA CAGGATTAGATACCCTGGTAGTGCACGCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG GCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACCGG AAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCAGAGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAAC TCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAAC TCAAAGGAGACTGCCGGT GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGGTACAC ACGTGCTACATGGCGCATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGT GCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTG GATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAG TGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTGTGATTCATGA CTGGGGTGAAGTCGTAATAAGGACCACTACGGGGAAGCTCT
Srodna sekvenca u NCBI bazi	LOCUS CP004091 4344092 bp DNA circular BCT 31-JAN-2014 DEFINITION Cronobacter sakazakii SP291, complete genome. ACCESSION CP004091 VERSION CP004091.1 GI:449096568 DBLINK BioProject: PRJNA62201 BioSample: SAMN02604116 SOURCE Cronobacter sakazakii SP291 ORGANISM Cronobacter sakazakii SP291 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Cronobacter. REFERENCE 1 (bases 1 to 4344092) AUTHORS Power,K.A., Yan,Q., Fox,E.M., Cooney,S. and Fanning,S. TITLE Genome sequence of Cronobacter sakazakii SP291, a persistent thermotolerant isolate derived from a factory producing powdered infant formula JOURNAL Genome Announc 1 (2), E0008213 (2013) PUBMED 23516209 REMARK Publication Status: Online-Only

Tabela 5.4.3.2. Sekvenca izolata K2 (1484 bp)

Izolat	Sekvenca
K2 (1484bp)	<p>GAAAAAAAGGTGGGGAGCAGGTGTAAGAGTGTAAGGTAAAGATGCAGGTAGCTGATTGC TGATTGTTGAGACGGGGAGGCGAGAATGGTGGGCACGGCGAGATGGAGAAGGAGAACT ATTGAAAAAGGCGACTAATGCGGGGTTGGATCTACTCCTCAAAGTGGGGGACCTTGGGG CCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCT AGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGAAGTGGAGACACGG TCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGCGAAGCCTGATG CAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGA AGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAAC TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT AAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA CTGCATTTGAAACTGGTCGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGA CTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTCCGGAGCTAACGC GTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACCTCAAATGAATTGACGGG GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG GTCTTGACATCCAGAGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAG GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC GCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGA TAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTAC ACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCA TAAAGTGCGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCCGGAATCTTT AGTAATCGCGGATCAGAATCCCGGCTCGAATACGTTATCGGGCCTTGTTCCACACCGTGTG GTCACATCGTGCAGCGGGCCCGATTGAAGTATGTTTCCTTCTGTTCCGAGGGCCCTTAAC ACTATGTGACTCATGAGCTGGCGCAGCTGTGCCATTTAAACAACCTCGTTGATTTTCT</p>
Srodna sekvenca u NCBI bazi	<p>LOCUS JF330135 1503 bp DNA linear BCT 17-MAY-2011 DEFINITION Cronobacter sakazakii strain fmb 09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. ACCESSION JF330135 VERSION JF330135.1 GI:332688510 SOURCE Cronobacter sakazakii ORGANISM Cronobacter sakazakii Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Cronobacter. REFERENCE 1 (bases 1 to 1503) AUTHORS Li, Y., Lu, Z. and Chen, Q. TITLE Identification, classification and antimicrobial resistance of Cronobacter isolated from infant food JOURNAL Submitted (29-JAN-2011) College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Weigang, Nanjing, Jiangsu 210095, China</p>

Tabela 5.4.3.3. Sekvenca izolata K5 (1503 bp)

Izolat	Sekvenca
K5 (1503 bp)	TTTAAAACGCCTGGCCGGCCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGGAGCA GCTTGCTGCTCTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATG GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGTG GGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGG TAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC GCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTT CAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTTACCCGCAGAAGA AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAACGCGTTAATCG GAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGG GCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGA ATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG CCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGC TTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCA AATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC GAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCAGAGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCG GGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTA AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTTCGGCCGGGAACTCAA GGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCT TACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAG AGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCAT GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCCGGCCT TGTACACACCGCCCGTACACCCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTTAGCTTAACCT TCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAATGTAACC CGAAGAGAAATCTCA
Srodna sekvenca u NCBI bazi	LOCUS CP006731 4377544bp DNA circular BCT 14-FEB-2014 DEFINITION Cronobacter sakazakii CMCC 45402, complete genome. ACCESSION CP006731 VERSION CP006731.1 GI:564116047 DBLINK BioProject: PRJNA217377 BioSample: SAMN02641531 SOURCE Cronobacter sakazakii CMCC 45402 ORGANISM Cronobacter sakazakii CMCC 45402 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Cronobacter. REFERENCE 1 (bases 1 to 4377544) AUTHORS Zhao,Z. TITLE Genome Sequence of Cronobacter sakazakii Strain 45402 JOURNAL Unpublished REFERENCE 2 (bases 1 to 4377544) AUTHORS Zhao,Z. TITLE Direct Submission JOURNAL Submitted (09-SEP-2013) Division of Enteric Bacterial Vaccines, National Institute for Food and Drug Control, Tiantanximen, Beijing, Beijing 100050, China

Tabela 5.4.3.4. Sekvenca izolata S11 (1501 bp)

Izolat	Sekvenca
S11 (1501 bp)	AAAGCAACCCATGGGACAACAGATCTTGACATGGAAGTGC GAACGGTAACAGGGAGCA GCTTGCTGCTCTGCTGACAAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGAT GGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGACCAAAG TGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTG GGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACA CTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA GTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTTACCCG CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGC GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAA ATCCCCGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAACTGGCAGGCTGAGTCTCGTAGAGGG GGTGAAGATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC GAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACA GGATTAGATACCCTGGTAGTACACGCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTT GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGGAGTACGGCCGCA AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA ATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCAGAGAATCCTGCAGAGAT GCGGGAGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTT GTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGT TCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG TCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAAAA GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTTGTAGTCCGGATTGG AGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCAC GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCA AAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCCGGGAGGGCGCTTATCGCTTTGTGAATCATGACTGG GGTAAGTCGAATCCGGGGACACCCAGGGGGTGTCCG
Srodna sekvenca u NCBI bazi	LOCUS EF059825 1472 bp DNA linear BCT 07-NOV-2013 DEFINITION Cronobacter sakazakii strain E292 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. ACCESSION EF059825 VERSION EF059825.1 GI:118498788 SOURCE Cronobacter sakazakii ORGANISM Cronobacter sakazakii Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Cronobacter. REFERENCE 1 (bases 1 to 1472) AUTHORS Iversen,C., Lehner,A., Mullane,N., Bidlas,E., Cleenwerck,I., Marugg,J., Fanning,S., Stephan,R. and Joosten,H. TITLE The taxonomy of Enterobacter sakazakii: proposal of a new genus Cronobacter gen. nov. and descriptions of Cronobacter sakazakii comb. nov. Cronobacter sakazakii subsp. sakazakii, comb. nov., Cronobacter sakazakii subsp. malonaticus subsp. nov., Cronobacter turicensis sp. nov., Cronobacter muytjensii sp. nov., Cronobacter dublinensis sp. nov. and Cronobacter genomospecies 1 JOURNAL BMC Evol. Biol. 7, 64 (2007) PUBMED 17439656 REMARK Publication Status: Online-Only

Korišćeni BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) program dostupan na web adresi <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> poredi nukleotidne sekvence sa svim sekvencama u bazi podataka i računa statističku srodnost. BLAST analiza se koristi da pokaže evolutivnu srodnost i/ili da dokaže pripadanje određenoj grupi, porodici ili rodu. Na osnovu analize 16S rDNK sekvenci, izolati *Cronobacter* spp. su identifikovani kao *C. sakazakii*.

6. DISKUSIJA

Opstanak *C. sakazakii* u formulama za odojčad u prahu i njegov potencijal razmnožavanja u rekonstituisanom mleku u prahu povećavaju rizik oboljevanja kod odojčadi. Jedan od pokazatelja da *C. sakazakii* može da opstane pri niskoj aktivnosti vode je njegova česta izolacija iz formule za odojčad u prahu (Muytjens i sar., 1988). Tome u prilog idu i rezultati Edelson-Mammel i saradnika (2005) koji su utvrdili da se broj *C. sakazakii* bakterije u eksperimentalno kontaminiranim formulama za odojčad u prahu redukovao samo za 3 log jedinice tokom 1,5 godine. U formulama za odojčad u prahu na teritoriji Republike Srbije, koje su bile obuhvaćene ovim istraživanjem, nisu izolovane bakterije iz roda *Cronobacter* spp. U okviru ovog istraživanja je ispitano ukupno 360 formula za odojčad u prahu koje su bile komercijalno dostupne na teritoriji Srbije. Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima Nazarowec-White i saradnici su (1999) prisustvo *C. sakazakii* dokazali u 8 odnosno 6,7% od 120 ispitanih konzervi formula za odojčad u prahu. Formule za odojčad u kojima su dokazali *C. sakazakii* u koncentraciji <1 cfu/100g su proizvedeni u pet različitih objekata za proizvodnju infant formula za odojčad. Nakon povećanja svesti o značaju *Cronobacter* spp. i stepenu rizika o mogućnosti kontaminacije formule za odojčad u prahu, u prethodnih 20-tak godina objavljena su brojna istraživanja. Rezultati tih ispitivanja su pokazali da je učestalost *Cronobacter* spp. u formulama za odojčad između 2 i 14 %.

Postavlja se pitanje porekla *Cronobacter* spp. u početnim formulama za odojčad. Jedan od načina kontaminacije je putem vazduha. U cilju sprečavanja kontaminacije iz vazduha početnih formula za odojčad u objektima za proizvodnju, kako u visoko-rizičnim zonama, tako i u nisko rizičnim zonama, neophodno je da vazduh bude strogo kontrolisan. Klima sistem u visokorizičnim zonama treba da obezbedi odgovarajući kvalitet vazduha i nadpritisk koji sprečava prodiranje spoljašnjeg vazduha u proizvodni prostor. Nesporogeni mikroorganizmi, između ostalih i *C. sakazakii*, se mogu naći, kako u kapljicama vode, tako i u česticama prašine (Drudy i sar. 2006). Prašina se generiše tokom različitih tehnoloških postupaka proizvodnje formula za odojčad, a kapljice vode često nastaju tokom operacija čišćenja i pranja u pogonu. Dosadašnja istraživanja su dokazala rezistentnost *C. sakazakii* na osmotski stres i sušenje što povećava verovatnoću i rizik da se finalni proizvod unakrsno kontaminira u završnim procesima proizvodnje (Arku i sar., 2008; Breeuwer i sar., 2003; Riedel i Lehner, 2007).

C. sakazakii je ubikvitaran mikroorganizam, izolovan iz svih vrsta hrane za životinje i namirnica. Od 2000. godine traju intenzivna istraživanja kojima se pokušava pronaći način i put

kontaminacije ovom bakterijom, da bi se objasnila mogućnost infekcije ovako važne namirnice kao što je hrana za odojčad. Istraživanja su obuhvatala mogućnost kontaminacije u samom proizvodnom pogonu i okolini, ali i preko flašica za bebe kojima se hrane deca u bolnicama. Iversen i Forsythe (2004) su sprovedli istraživanje koje je pokazalo prisutnost ove bakterije u manjem broju u formuli za odojčad, a poreklom od različitih svetskih proizvođača. U čak 25% analiziranih uzoraka je pronađen ovaj mikroorganizam. Da bi se utvrdilo potencijalno poreklo *C. sakazakii* u formulama za odojčad, ova grupa autora je sprovedla istraživanje prisustva ovog mikroorganizma u okolini fabrika i utvrđena je velika zastupljenost *E. sakazakii* na travnatim površinama, na povrću, na pirinču i kukuruzu, raznim začinima, ali i u mleku i mlečnim proizvodima. Ovi rezultati ukazuju na veliku potrebu za kontrolom i preventivnim merama u toku procesa proizvodnje formula za odojčad, kako bi se sprečila kontaminacija gotovog proizvoda. Ekološka niša i poreklo ovog mikroorganizma još uvek nisu jasno utvrđeni, a ukoliko se pronađe u spoljašnjoj okolini, to područje postaje „distrikt zaražen mikroorganizmom *Cronobacter sakazakii*“ i sprovode se stroge mere dekontaminacije, dezinfekcije da bi se uzročnik uništio. Izolovan je iz zemljišta, voda, biljaka i začina. Iako je *E. sakazakii* izolovan iz vode, sedimenata i zemljišta, Muyltjens i Kollee (1990) nisu uspeli da izoluju mikroorganizam iz brojnih izvora životne sredine: sirovog kravljeg mleka, goveda, glodara, žitarica, ptičjeg izmeta, domaćih životinja, površinske vode, zemljišta, blata i trulog drveta. Ovo može biti posledica nedostatka pozitivne selekcije u njihovoj metodi izolacije, što je rezultiralo prekomernim rastom drugih (koje nisu *E. sakazakii*) bakterija iz familije *Enterobacteriaceae*.

Pored provere prisustva *C. sakazakii* u ovom istraživanju, izvršena je provera i broja *Enterobacteriaceae* u formulama za odojčad. Od ukupno 360 analiziranih formula za odojčad u prahu, u 29 (8%) uzoraka je bilo rasta na ljubičasto-crvenom žučnom agaru sa glukozom. U 22 uzoraka, broj *Enterobacteriaceae* je bio <10 cfu/g, a u ostalih 7 uzoraka je broj karakterističnih *Enterobacteriaceae* bio <100 cfu/g. Biohemijskom analizom je utvrđeno da je najzastupljeniji soj bio *Enterobacter aerogenes* (u 18 uzoraka), zatim *Hafnia alvei* (u 5 uzoraka), *Enterobacter amnigenus* (u 5 uzorka) i *Enterobacter cloacae* (u 1 uzorku). Abdullah Sani i sar. (2007) ukazuju da je *E. cloacae* jedan od najčešće nađenih bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* u formulama za odojčad, zajedno sa *Klebsiellom pneumoniae* i *Pantoea agglomerans*, što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. Drugi deo ovog istraživanja obuhvatio je proveru prisustva *C. sakazakii* u različitim uzorcima biljnih čajeva. Prvi izolati *C. sakazakii* su dobijeni iz čajeva sa područja Južne Srbije uzorkovanih u toku 2007. i 2008. godine. Ispitujući prisustvo *Salmonella* spp., na selektivnim podlogama pojavile su se kolonije nekarakteristične morfologije za *Salmonella* spp., koje su zatim biohemijski ispitivane. Test API 20E je u ~51%

pregledanih uzoraka biljnih čajeva uzetih u slučaju epidemije pokazao prisustvo bakterije *Enterobacter sakazakii*. Ova činjenica je zatim izazvala pokretanje dodatnog angažovanja skupljanja i ispitivanja biljnih čajeva, sa posebnim akcentom na čajeve koji su deklarirani kao „Bebi čaj“, „Dečji čaj“ ili mešavine biljaka koje se koriste kao pomoćna lekovita sredstva, a preporučeni su za osobe koje već boluju od različitih bolesti. Prvi podaci su objavljeni posle pregledanih 150 uzoraka, gde je u 42 uzorka (32%) bilo dokazano prisustvo *C. sakazakii* (Stojanović i sar., 2011). Do 2013. godine, broj pregledanih uzoraka biljnih čajeva je povećan na 520, kao i procenat pozitivnih uzoraka (38%).

Analiza bebi i dečjih čajeva ukazuje da je *C. sakazakii* izolovan u 56 (44%) od 127 ispitivanih uzorka „Bebi čaj“ čajeva, a od 62 uzorka dečjih čajeva, 32 uzorka (52%) je bilo pozitivno. Nijedno dosadašnje istraživanje nije se odnosilo na prisustvo *C. sakazakii* u čajevima koji su namenjeni za odojčad i decu, tako da ovi rezultati mogu biti značajni za dalja razmatranja procene rizika korišćenja ovih čajeva. Ovi čajevi, namenjeni da ih konzumira najosetljivija populacija (bebe i deca), na deklaracijama imaju različita uputstva za pripremu, ali uglavnom se pominje da se preliva ključalom ili vreloom vodom. Pojam „vrela voda“ nigde nije definisan, pa može da se dogodi da temperatura bude i ispod 72°C, koja se smatra graničnom za uništavanje bakterije *C. sakazakii* (WHO, 2008).

Pored odojčadi, druga kritična grupa su imunokompromitovane osobe koje već boluju od primarnih bolesti koje su uglavnom ozbiljne, kao što su rak, hormonalne promene, bolesti bubrega i jetre, čir, gastritis, dijabetes, nervne bolesti. U ovu grupu ljudi su ubrajaju posebno osetljive osobe, koje u zavisnosti od opšteg stanja mogu biti manje ili više podložne oboljenju koje bi *C. sakazakii* izazvao, pogoršavajući njihovo opšte stanje. Od ukupno pregledanih 81 uzoraka raznih mešavina biljnih čajeva, iz čak 31 (38%) uzorka čaja je izolovan *C. sakazakii*. Kod lečenja bolesti urinarnog trakta često se preporučuje konzumiranje čajeva u velikim količinama. Na tržištu postoji veliki broj čajeva namenjenih za otklanjanje ovih vrsta tegoba, i rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju da je u 60% analiziranih uzoraka ovih vrsta čajeva (u 9 uzoraka od 16 ispitanih) izolovan *C. sakazakii*. U slučaju pogoršanja zdravstvenog stanja imunokompromitovanih osoba, ne može se dokazati infekcija sa *C. sakazakii*, ukoliko se ovaj mikroorganizam ne traži ciljano, specifičnom metodom izolacije. *C. sakazakii* može izazvati bakterijemiju i meningitis invadirajući epitel creva. Zahvaljujući lipopolisaharidnom omotaču i termostabilnim toksinima, on povećava ukupnu prohodnost epitela creva, što rezultira invazijom i drugih gram negativnih bakterija koje eventualno mogu biti prisutne u crevima (Townsend i sar., 2007).

Posebnu pažnju treba obratiti na čajeve koji se prelivaju hladnom vodom i onda stoje određeno vreme na sobnoj temperaturi posle čega se konzumiraju. Predstavnik te grupe čajeva je beli slez čiji se macerat koristi za ispiranje nosa i grla kod svih vrsta upala disajnih puteva, ili kod kašlja. U Srbiji je ova biljka jedno od osnovnih lekovitih sredstava, često se koristi kod dece, a i kod novorođenčadi, bez ikakvih ograničenja, uputstava ili preskripcija. Od ukupno ispitanih 30 biljnih čajeva, trećina uzoraka korena belog sleza je sadržalo bakteriju *C. sakazakii*. Dva izolata *C. sakazakii* - M3 i K2, izolovana iz belog sleza različitih proizvođača, su korišćena i u delu ispitivanja termorezistentnosti i ponašanja tokom čuvanja na sobnoj i temperaturi frižidera. Oba izolata su 2 minuta posle preliivanja ključalom vodom imali 1 log preživelih bakterija, kao i 6 minuta posle preliivanja vodom temperature 72°C. Na sobnoj temperaturi su izolati povećali svoj broj u posle 72 sata za 2 log jedinice. Na temperaturi frižidera oba izolata su preživela 21 dan, s tim da je izolat M3 uvećao svoj broj za 1 log jedinicu, za razliku od izolata K2 koji se smanjio broj za 1 log jedinicu. Preživljavanje u supstratu belog sleza ina sobnoj temperaturi i dalje uvećanje inicijalnog broja bakterije *C. sakazakii*, ukazuje na mogućnost da beli slez bude potencijalni uzrok infekcije osetljivih kategorija ovim čajem.

Kao macerat (priprema preliivanjem hladnom vodom) pravi se čaj od lista sene, koji služi za regulaciju gastrointestinalnih problema, za bolje varenje, a sastojak je i većine dečijih i čajeva za novorođenčad koji se koriste za otklanjanje grčeva u prvim danima života. Od ukupno pregledanih 16 čajeva od sene, u 50% je utvrđeno prisustvo *C. sakazakii*.

List žalfije se koristi za ispiranje grla, kao pomoćno lekovito sredstvo kod pojave raznih upala, a priprema se na različite načine: a) pravi se i sa hladnom vodom kao macerat, b) preliiva se vrelom ili ključalom vodom. Od ukupno pregledanih 14 uzoraka čaja od lista žalfije, u samo 3 (21%) je pronađen mikroorganizam *C. sakazakii*. Od ostalih pojedinačnih vrsta čajeva, ako se poredi procentualna zastupljenost, između 40 i 65% pozitivnih uzoraka je bilo u hajdučkoj travi (63%), kantarionu, matičnjaku i listu borovnice (50%), koprivi (43%), kori krušine i listu breze (40%). Manju zastupljenost (od 20% do 40%) pronađenih *C. sakazakii* pokazali su uzorci kamilice (39%), uve (36%), lipe, rtanjskog čaja, komorača (33%), maslačka, nane i majčine dušice (25%). U 7% voćnih mešavina (2 od 29) i uzoraka crnog čaja (1 od 15 uzorka) izolovan je *C. sakazakii*, a pozitivni uzorci su bili domaće proizvodnje. Ni iz jednog od 15 ispitanih uzoraka zelenog čaja nije izolovan *C. sakazakii*.

Imajući u vidu ovako veliku prevalenciju ovog patogenog mikroorganizma u različitim vrstama biljnih čajeva koji su namenjeni kako deci i bebama, tako i imunokompromitovanim osobama i širokoj populaciji, postavlja se pitanje pripreme čaja, odnosno da li se pripremom čaja može

smanjiti / eliminisati potencijalno prisutna bakterija. Najveći broj analiziranih čajeva se priprema kao infuz ili dekokt, odnosno čaj se tretira vrelom vodom i onda se ostavlja da odstoji. Pojam „vrela voda“ nigde nije definisan. Prema mišljenju Edelson-Mammel i Buchanan, (2004b) postoji podgrupa izolata *C. sakazakii* većom tolerancijom na toplotu (prosečna D vrednost na 58°C je 9,9 min), a prema rezultatima Williams i saradnika (2005) standardnom pasterizacijom (72°C u trajanju od 15 sekundi) redukuje se više od 8-log jedinica najtermorezistentnijeg soja *C. sakazakii* (*E. sakazakii*). Prema podacima iz literature neophodna je temperatura od najmanje 72°C u trajanju od 15 sekundi da bi se uništile vegetativne bakterije *C. sakazakii*. U većini slučajeva na deklaraciji čaja nije naglašeno šta se podrazumeva pod pojmom „vrela“ voda, kao ni tačno vreme koliko treba da „odstoji“ napitak pre upotrebe. Neke vrste čaja se pripremaju kao macerat, odnosno samo prelivanjem hladnom vodom (npr. beli slez i sena) i nakon toga se koriste. Ispitivanje sposobnosti preživljavanja ove patogene bakterije koristeći različite temperature vode za pripremu je od posebnog značaja.

Za ispitivanje uticaja temperature vode za pripremu čaja na promenu broja *C. sakazakii* korišćeni su sojevi M3 i K2 izolovani iz belog sleza, S8 izolovan iz „Bebi čaja“ i S11 izolovan iz mešavine biljaka koja je preporučena protiv gastrointestinalnih problema. Istraživanje je obuhvatilo tri moguća scenarija, i to temperaturu vode od 60°C, od 72°C i upotrebu ključale vode za pripremu čaja koji je kontaminiran *C. sakazakii*. Promena broja bakterija u biljnoj mešavini od 2, 4, 6 i 8 minuta nakon pripreme je takođe bila deo ovog istraživanja.

Kada se za pripremu čaja koristila inicijalna temperatura od 60°C, posle 8 minuta, u supstratima čaja je i dalje ostao značajan broj vegetativnih oblika svih korišćenih izolata. Osam minuta nakon tretmana vodom temperature of 60°C, broj živih ćelija *C. sakazakii* izolata M3 je smanjen za 2,4 log jedinice, broj živih ćelija izolata K2 bio smanjen za samo 1 log jedinicu, dok je za preostala dva termoosetljivija izolata S8 i S11, broj ćelija smanjen za više od 5 log jedinice. Primenom više temperature, svi korišćeni izolati *C. sakazakii* su pokazali znatno manju otpornost i već nakon 4 minuta od tretmana vodom temperature od 72°C, broj je smanjen na <2 log jedinice. Temperatura od 72°C je izabrana, obzirom da je to preporučena temperatura za rekonstituisanje formula za odojčad u prahu. Dobijeni rezultati ukazuju na varijabilnost sojeva izolovanih iz različitih izvora, što potvrđuje nalaze koji su objavljeni u literaturi (Gurtler & Beuchat, 2007). Pri prelivanju ključalom vodom, broj *C. sakazakii* se drastično smanjio, ali se mogao detektovati određen broj preživelih *C. sakazakii* i posle 2 minuta.

Preživljavanje *C. sakazakii* na visokim temperaturama se može delimično objasniti lučenjem velike količine sluzi koja predstavlja kombinaciju heteropolisaharida i proteina i predstavlja zaštitu od spoljašnjih uticaja. Zaštićeni patent (br. US4806636) heteropolisaharid *C. sakazakii* je prvo pronađen u čaju i prijavljen je kao „čaj-polisaharid”.

Otpornost na toplotu različitih izolata *E. sakazakii* veoma je raznovrsna i postoji podgrupa izolata sa većom tolerancijom na toplotu (prosečna D vrednost na 58°C je 9,9 min) u odnosu na većinu *Enterobacteriaceae* (Edelson-Mammel & Buchanan, 2004). Kada je *C. sakazakii* izložen temperaturi od 68°C tokom 16s, broj ćelija je smanjen za 5 log jedinica (Nazarovec-White i sar., 1999). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju potvrđuju postojanje sojeva sa izuzetnom otpornošću na visoke temperature, posebno kada je reč o izolatima M3 i K2, kod kojih je nivo redukcije bio oko 2 log jedinice nakon 8 minuta posle preliivanja vodom temperature od 60°C. Mnogo efikasniji način eliminacije živih ćelija *C. sakazakii* je primena viših temperatura (npr. 72°C). Ovi rezultati su u saglasnosti sa preporukama koje su donete od strane Svetske zdravstvene organizacije, koje ukazuju na neophodnost korišćenja vode temperatura viših od 70°C, kako bi se smanjio rizik od pojave *E. sakazakii* bakterije u rekonstituisanoj formuli za prehranu odojčadi (Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) i Svetska zdravstvena organizacija (WHO, 2004; 2006). Temperatura preko 60°C će efikasno smanjiti broj bakterija, ali ispitivani izolati su u ovom istraživanju pokazali veću termorezistentnost i mogućnost preživljavanja na visokoj temperaturi. Posle 2 minuta od preliivanja ključalom vodom, izolati M3 i K2 su mogli da se detektuju u malom broju. S obzirom da infektivna doza za *C. sakazakii* još uvek nije tačno određena i kreće se u opsegu 10^1 do 10^8 , podaci dobijeni u ovom istraživanju mogu biti značajni za utvrđivanje jasnih instrukcija o načinu pripreme čajeva, posebno kada je reč o čajevima za bebe i decu.

Iversen i Forsythe (2003) su predložili da se odredi okvirna infektivna doza kao za patogene bakterije *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes 4b* ili *Neisseria meningitidis*, oko 1000 cfu. Posebno su naglasili da će infekcija ovom bakterijom ekstremno narušiti pH gornjeg gastrointestinalnog trakta i da će naglo proći u tanka creva. Njihov zaključak su ozbiljno doveli u sumnju Havelaar i Zwietering (2004), koji su teorijski dokazali da je dovoljno svega 0,36-66 cfu/100g formule za odojčad da se izazove infekcija kod odojčadi. Iako su sve ovo samo teorijski proračuni, prisustvo *E. sakazakii* u formulama za odojčad može u zavisnosti od vrste, soja i stanja pacijenta, da dovede do infekcije (Iversen & Forsythe, 2003). Ova činjenica ukazuje da i veoma mali brojevi prisutnih vegetativnih bakterija *C. sakazakii* mogu predstavljati značajnu opasnost

za imunokompromitovane grupe, prvenstveno nedonošćad, bolesnu novorođenčad u prvim danima života, kao i na starije osobe sa teškim primarnim bolestima.

Pored termičkog načina pripreme čaja, postoje različite vrste čaja koje se pripremaju kao macerati, tj. prelivaju se hladnom vodom i često ostavljaju da odstoje na sobnoj temperaturi. Postavlja se pitanje da li *C. sakazakii* koji inicijalno potiče od kontaminiranog čaja, može tokom pripreme macerata da preživi ili čak i da raste i da se razmnožava. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju da svi izolati bakterije *C. sakazakii* držani na sobnoj temperaturi ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) u supstratima biljnih čajeva pokazuju rast i uvećanje broja posle 24 i 48 sati. Kod analiziranih izolata je ukupni prinos posle 48 sati bio veći za minimum 1 log jedinicu. Ovo pokazuje da sobna temperatura podržava rast *C. sakazakii* i da su svi biljni čajevi adekvatna podloga za rast. Uvećanje broja bakterija nije bilo isto za sve ispitane izolate, a jedno od mogućih objašnjenja je varijabilnost izolata. Uočena razlika može biti posledica različitog inicijalnog broja bakterija u inokulisanim čajevima (npr. sojevi M3, S4, S5, S6 i S11). Ova činjenica je posebno važna za biljne čajeve koji se prave prelivanjem hladnom vodom i drže na sobnoj temperaturi više sati. List sene se koristi za gastrointestinalne probleme, poboljšava varenje i sastojak je većine čajeva za bebe i decu (Tabela 5.3.1.3, grupe B1, B4, B5, D4). Takođe, beli slez se obavezno pravi kao macerat i daje se bebama i deci za sve vrste respiratornih smetnji u prvim danima života (ispiranje gornjih respiratornih puteva, ispiranje grla, itd.). Pored činjenice da ova bakterija može da raste na sobnoj temperaturi, *E. sakazakii* ima sposobnost da na sobnim temperaturama stvara biofilm na plastici, staklu, svim vrstama metala (Kim i sar., 2006). To je dodatna opasnost, jer postoji mogućnost unakrsne kontaminacije sa posuđa, radnih površina i pribora, čime se povećava rizik od infekcije, posebno u bolnicama, kuhinjama u vrtićima (jaslicama) gde se priprema veća količina formula za odojčad u prahu, kao i različitih vrsta čajeva.

Rezultati ovih istraživanja pokazuju da *C. sakazakii* može da raste i da se razmnožava u pripremljenom čaju koji se čuva na sobnoj temperaturi. Postavlja se pitanje mogućnosti preživljavanja / rasta ovog patogenog mikroorganizma na temperaturama frižidera, što je takođe bilo provereno u okviru ovog istraživanja. Eksperimentalno kontaminirani uzorci biljnog čaja su čuvani na temperaturi frižidera ($+4\pm 2^{\circ}\text{C}$), i rezultati ukazuju na smanjenje broja bakterija tokom skladištenja pripremljenog čaja u frižideru. Trend smanjenja broja bakterija tokom ovog perioda skladištenja nije identičan za sve analizirane izolate. Mogući razlog za uočene razlike možda je posledica različitog inicijalnog broja bakterija (od 2,2 do 6,2 log cfu/ml). Takođe, uočene razlike možda potiču i od varijabilnosti sojeva, obzirom da su izolati korišćeni u ovim istraživanjima imaju različite „istorije“, odnosno potiču iz različitih čajeva, a prethodno poreklo ostaje

nepoznato (spoljašnja okolina, fabrika za pripremu čaja, radne površine i mogući biofilmovi u fabrikama za proizvodnju čaja, itd.). Ovo ukazuje na razvijene različite mehanizme preživljavanja u stresnim okruženjima, što može delimično da objasni uočene razlike tokom skladištenja na niskoj temperaturi. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su u saglasnosti sa prethodno objavljenim podacima, iako je često ispitivani supstrat hrane bio drugačiji od onog koji je korišćen u ovom istraživanju. Kim i sar. (2005) su ispitivali opstanak *E. sakazakii* na sveže rezanom voću i povrću na temperaturi frižidera u trajanju od 7 dana. Inicijalni broj *E. sakazakii* bio je između 10^3 i 10^4 . Rezultati ove grupe autora su pokazali da je broj opao za 1-2 log jedinice cfu/ml u svim proizvodima, ali da je *E. sakazakii* ostao i posle 7 dana vitalan, osim u soku od sveže šargerepe gde je broj bio ispod nivoa detekcije.

Svi rezultati dobijeni tokom ovog istraživanja, ukazuju na veliku prevalenciju *C. sakazakii* u čajevima koji su dostupni na tržištu. Povećani rizik od konzumiranja ove patogene bakterije imaju osobe koje su slabog imunog sistema, posebno bebe i deca. Iako infektivna doza još uvek nije utvrđena, smatra se da je broj bakterija koje mogu da dovedu do infekcije veoma mali, tako da i samo prisustvo bakterije u čaju može da predstavlja opasnost za osobe koje konzumiraju čaj. Priprema čaja može u značajnoj meri da smanji broj potencijalno prisutnih vegetativnih ćelija *C. sakazakii*, ukoliko se za pripremu čaja koristi voda temperature od najmanje 72°C ili ključala voda. Ako se pak priprema macerat, bakterije iz čaja ne samo da mogu da ostanu u pripremljenom čaju, već mogu i da rastu i razmnožavaju se ukoliko se pripremljen čaj čuva na sobnoj temperaturi tokom 24 i 48 sati. Iako temperatura frižidera neće za većinu izolata biti adekvatna za rast, bakterije će uspešno moći da prežive na ovoj temperaturi tokom 21 dana. Sve ovo ukazuje da je neophodno sprečiti pojavu ove bakterije u čaju adekvatnom primenom dobre higijenske i proizvođačke prakse u samom proizvodnom pogonu. Takođe, neophodno je adekvatnim informacijama na samom pakovanju čaja obavestiti potrošača o pravilnom načinu pripreme čaja (temperatura i vreme). Posebnu pažnju zahteva proizvodnja čaja koji se pripremaju kao macerati, samo prelivanje hladnom vodom.

Genetička karakterizacija *C. sakazakii* izolata izvršena je u cilju procene diverziteta i njihovog poređenja sa referentnim sojem izolovanim u slučaju oboljenja dece. Korišćene su rep-PCR i RAPD analize koje su obezbedile informativne profile za poređenje različitih *C. sakazakii*.

Analiza rep-PCR obuhvatila je BOX-PCR i ERIC-PCR. Na osnovu zbirne analize rep-PCR i dendrograma koji je reprezentuje, svi ispitivani izolati su podeljeni u 2 klastera. U klasteru 1 je izdvojen referentni soj R1 koji se 58% razlikuje od klastera 2. U klasteru 2 je grupisano 19

izolata sa referentnim sojem R2. Referentnom soju R2 su najbliži S7 i S8 izolati (23%), poreklom od biljnih mešavina koje su preporučene kao pomoćna sredstva za bolesti jetre (S7) i dijabetes (S8). Referentni soj R1 je 2008. godine taksonomski prebačen u novu vrstu *Cronobacter muytjensii* ATCC 51329 (Iversen i sar., 2008). On je manje patogenosti od referentnog soja R2, NCTC 8155- *Enterobacter sakazakii* koji je jedan od najpatogenijih kliničkih sojeva, izolovan iz mozga novorođenčeta, a sa kojim su svi ispitivani izolati iz biljnih čajeva svrstani u isti klaster na osnovu zbirne rep-PCR analize.

Rezultati ovih istraživanja su u saglasnosti sa novijim podacima iz literature. Genodiverzitet i taksonomsku kompleksnost sojeva *E. sakazakii* na osnovu ERIC analize uvrđili su Ye et al. (2008; 2009). ERIC metod sa reproducibilnim profilom *E. sakazakii* ATCC 51329 je iskorišćen za dizajniranje novog prajmera na osnovu glavne - specifične trake iz profila. Prema dobijenom dendrogramu, *E. sakazakii* ATCC 51329 je pripadao posebnoj grani sa >5% divergencije od referentnog soja ATCC BAA-894 i ostalih ispitivanih sojeva (Ye et al., 2008). Koristeći ERIC u nastavku istraživanja, ispitivana 24 soja su grupisana u 2 grupe, a *E. sakazakii* ATCC 51329 formirao je posebnu granu (Ye et al., 2009). Genotipska karakterizacija 22 soja *E. sakazakii*, izolovana iz formule za odojčad, izvršena je korišćenjem RAPD i ERIC metoda, kao dopuna analize rezistencije na antibiotike. Ustanovljeno je prisustvo 16 ERIC i 18 RAPD profila, uz zaključak da obe metode imaju dobar diskriminatorni potencijal i da su pogodne za procenu genodiverziteta *E. sakazakii*. ERIC metoda je ispoljila bolje slaganje sa fenotipskom karakterizacijom ispitivanih izolata *E. sakazakii* (Ye et al., 2010).

RAPD analiza na osnovu korišćenih prajmera AP10, AP11 i SPH1 izdvojila je izolat S10 poreklom iz dečijeg čaja u poseban klaster sa preko 50% razlike od ostalih izolata. Izolati S2 i S3, koji potiču iz bebi čaja, razlikuju se 10%, a S1 (iz koprive) i S4 se razlikuju 14%. Izolati S11 i S5 su međusobno slični 76%. Izolati S4, S5 i S11 su poreklom od biljnih mešavina koji se koriste za bolesti respiratornog trakta (S4), regulaciju rada jetre (S5) i gastrointestinalne probleme (S11). Subklaster 2 u prvoj grani grupisao je izolate M3 i K1 zajedno sa referentnim sojem R1, a u drugoj grani koja sadrži referentni soj R2 (NCTC 8155- jedan od najpatogenijih kliničkih sojeva) su i izolati S6 (biljna mešavina za regulaciju rada jetre) i K2 (iz belog sleza), kao i izolati M1 (iz bebi čaja) i M2 (iz lista sene), koji se razlikuju od R2 izolata 21%.

Nazarowec-White i Farber (1997) su izabrali 2 prajmera 10-mera u cilju obezbeđivanja reproducibilnih RAPD profila prilikom poređenja 18 izolata *E. sakazakii*. Drudy i sar. (2006) su upoređivali RAPD profile 56 izolata *E. sakazakii* i određenog broja sojeva koji su izolovani iz životnog okruženja, hrane i kliničkih izvora. Poredeći rezultate RAPD i ERIC metode sa

fenotipskom karakterizacijom ispitivanih izolata *E. sakazakii*, ustanovljeno je da je genotipizacija ERIC metodom ispoljila bolje slaganje sa fenotipizacijom (Ye et al., 2010), što se razlikuje od podataka dobijenih u ovom istraživanju. Najveće poklapanje API numeričkih profila sa genotipizacijom dobijeno je reakcijom BOX-PCR pomoću (GTG)₅ prajmera. Izolati S5 i S6, S2 i S3 i S7 i S8 pripadaju istim numeričkim profilima, a i pokazuju najmanju razliku <7%.

Sekvencioniranjem nukleotidne sekvence 16S rDNA izolata M1 (iz bebi čaja, grupe B1) dobijena je sekvenca od 1501 nukleotida. Posle BLAST pretraživanja baze podataka, utvrđeno je 99% sličnosti nukleotidne sekvence 16S rDNA sa homologom sekvencom izolata *C. sakazakii* SP 291, koji je izolovan iz formule za odojčad u Irskoj i čiji je genom potpuno poznat i deponovan u GenBank pod brojem CP004091-CP004094. Ovaj izolat je termorezistentan, otporan na promenu pH i na isušivanje (Power i sar., 2013).

Sekvencioniranjem nukleotidne sekvence 16S rDNA izolata K2 (iz korena belog sleza) dobijena je sekvenca od 1484 nukleotida. BLAST analizom je utvrđeno 99% sličnosti sekvenci 16S rDNA izolata K2 i *C. sakazakii* fbm 09, poreklom iz formule za odojčad u Kini (deponovan pod brojem: JF330135, Li i sar., 2011).

Sekvenca od 1503 nukleotida, rezultat sekvencioniranja 16S rDNA izolata K5 (iz lista nane), pokazala je 99% sličnosti sa homologom sekvencom izolata *C. sakazakii* CMCC 45402 deponovanog u NCBI GenBank bazi podataka pod brojem CP006731. *C. sakazakii* CMCC 45402 je izolovan iz mleka u prahu u Kini.

Sekvencioniranjem 16S rDNA regiona koji kodira 16S rRNA gen izolata S11 (iz biljne mešavine koja je preporučena za korišćenje kod osoba sa gastrointestinalnim problemima) dobijena je sekvenca od 1501 nukleotida. BLAST analizom je utvrđena homologija od 99% sa srodnim DNK regionima izolata *C. sakazakii* E292 (EF059825) i *C. sakazakii* SP291 iz Kine (Yan i sar., 2013).

Kombinacijom više metoda obezbeđuje se detaljnija karakterizacija *C. sakazakii*. U ovim istraživanjima su kombinovane 3 metode koje obezbeđuju detaljnu karakterizaciju ispitivanih *C. sakazakii* izolovanih iz biljnih čajeva: RAPD, rep-PCR i sekvencioniranje 16S rDNA regiona koji kodira 16S rRNA gen. Kombinacije neke od ovih metoda sa drugim metodama korišćene su u novijim istraživanjima. Najčešće je neka od metoda korišćena u ovom radu kombinovana sa analizom konzervativnih „housekeeping“ gena. Na osnovu parcijalne sekvence od 550bp 16S rRNA gena različitih sojeva *E. sakazakii*, Iversen i sar. (2004d) su odredili filogenensku

sličnost i grupisali sojeve u 4 različite grupe, pokazujući taksonomsku heterogenost. Dalja izučavanja su pokazala da se sojevi, koji su klasifikovani kao *E. sakazakii* na osnovu sekvence ribozomalnih gena, mogu svrstati u 2 različite grupe sa 2 podgrupe na osnovu jednog od „housekeeping“ gena - *hsp60* (hsp-Heat Shock Protein, odgovoran za transport proteina iz citoplazme u mitohondrije), što se slaže sa podacima dobijenim na osnovu analize ribozomalnih gena. Chen i sar. (2013.) su kombinovali ERIC i analizu sekvence „housekeeping“ gena *gyrB* i preporučili kombinaciju ovih analiza za pouzdanu tipizaciju *Cronobacter* spp. U dupleks PCR kombinovana je amplifikacija intergenskih 16S-23S regiona sa amplifikacijom *ompA* gena, koji kodira spoljnu membranu proteina A i unikatna je za rod *Enterobacter* (Nair & Venkitanarayanan 2006). PCR reakcija sa kombinacijom dodatnog koraka imobilizacije pomoću konjukcije sa cirkonijum hidroksidom, omogućila je osetljiviju detekciju uzročnika u rekonstituisanoj formuli za odojčad u prahu (Zhou i sar., 2008).

Imajući u vidu da su pojedini izolati iz naših ispitivanja bili termorezistentni i da je primenom genotipizacije utvrđen veći stepen srodnosti sa referentnim patogenim sojem izolovanim u slučaju oboljenja odojčadi, postoji rizik od nastanka infekcije osetljivih kategorija ovom bakterijom. Stoga je potrebno da se pri ispitivanju biljnih čajeva namenjenih za osetljive kategorije primenjuje polifazni pristup pri detekciji i karakterizaciji uzročnika. Ova istraživanja su pokazala da se primena kombinacije metoda fenotipizacije i genotipizacije može efikasno koristiti u proceni rizika značaja nalaza *C.sakazakii* u biljnim čajevima.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Ni u jednom od 360 uzoraka mleka u prahu za odojčad, komercijalno dostupnim na teritoriji Srbije, nije dokazano prisustvo *Cronobacter sakazakii*.
2. *Cronobacter sakazakii* je izolovan u 193 (38%) od 520 uzoraka biljnih čajeva. *Cronobacter sakazakii* je dokazan u 44% (u 56 od 132) čajeva za novorođenčad i u 52% (u 32 od 62 uzorka) čajeva za decu.
3. *Cronobacter sakazakii* je dokazan u 38% uzorka raznih lekovitih mešavina namenjenih za upotrebu kod osoba sa oslabljenim imunološkim sistemom.
4. Svi ispitivani izolati *Cronobacter sakazakii* su preživljavali u supstratima čaja pri temperaturi od 60°C, 72°C i temperaturi ključale vode. Najveće smanjenje broja *Cronobacter sakazakii* je postignuto delovanjem temperature ključale vode u vremenu od dva minuta.
5. Svi ispitivani izolati su se umnožavali u supstratima čaja pri sobnoj temperaturi. Broj ćelija *Cronobacter sakazakii* se povećao za 2 logaritamske jedinice. Pri temperaturi (+4°C) svi ispitivani izolati *Cronobacter sakazakii* su preživeli 21 dan.
6. Genetička karakterizacija izolata izvršena je korišćenjem 2 nezavisne metode- rep-PCR i RAPD. Dokazana je velika sličnost ispitivanih izolata sa referentnim sojem R2, *Cronobacter sakazakii* NCTC 8155, koji je jedan od najpatogenijih kliničkih sojeva, izolovan iz mozga novorođenčeta. Referentni soj R1- *Cronobacter muytjensii* ATCC 51329, manje patogenosti od soja R2, izdvojen je od ostalih u posebnu grupu na osnovu rep-PCR.
7. Amplifikacijom 16S rDNK, sekvenciranjem i poređenjem sa deponovanm sekvencama 16S rRNK gena u NCBI bazi podataka, potvrđena je identifikacija reprezentativnih izolata M1, K2, K5 i S11 kao *Cronobacter sakazakii*.

11. Bazzicalupo, M. & Fani, R. 1996. The use of RAPD for generating specific DNA probes for microorganisms. *Methods Mol BioE*, **50**: 155-175.
12. Bell, M. J., Ternberg, J. L., Feigin, R. D., Keating, J. P., Marshall, R., Barton, L. & Brotherton, T. 1978. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann. Surg.*, **187**(1): 1-7.
13. Beuchat, L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* **4**:413–423.
14. Biering, G., Karlsson, S., Clark, N., Karlsson, C., Jonsdottir, K.E., Ludvigsson, P. & Steingrimsson, O. 1989. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**(9): 2054-2056.
15. 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 *Enterobacter sakazakii*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **21**(8): 613-616.
16. Boccia, D., Stolfi, I., Lana, S. & Moro, M.L. 2001. Nosocomial necrotizing enterocolitis outbreaks: epidemiology and control measures. *Eur. J. Pediatr.* **160**:385–391.
17. Borderon, J.C., C. Lionnet, C. Rondeau, A.L. Suc, J. Laugier & F. Gold. 1996. Current aspects of the fecal flora of the newborn without antibiotherapy during the first 7 days of life: *Enterobacteriaceae*, enterococci, staphylococci. *Pathol. Biol.* **44**:416-422.
18. Bowen, A. B. & Braden, C.R. 2006: Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg. Infect Dis*, **12**(8):1185-1189.
19. Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M. & Joosten, H.M. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology*, **95**: 967-973.
20. Brenner, D. J., Richard, C., Steigerwalt, A. G., Asbury, M. A. & Mandel, M. 1980. *Enterobacter gergoviae* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found in clinical specimens and the environment. *Int J Syst Bacteriol* **30**: 1–6.
21. Brenner, D. J. 1984. *Facultatively anaerobic gram-negative rods. Family I.*

- Enterobacteriaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1 :408–420. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
22. Brock, T.D. & Freeze, H. 1969. *Thermus aquaticus*, a Nonsporulating Extreme Thermophile *J. Bact.* **98** (1): 289–97.
 23. Burdette, J.H. & Santos, C. 2000. *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate: The importance of neuroradiologic imaging. *Pediatr. Radiol.* **30**:33-34.
 24. Cai L., Li Y., Tao Y., Guo W., Zhang C. & Wang X. 2013. Identification of Three Genes Encoding for the Late Acyltransferases of Lipid A in *Cronobacter sakazakii*. *Mar. Drugs* **11**: 377-386.
 25. Caubilla-Barron, J. & Forsythe, S. 2007. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae*. *Journal of Food Protection* **70**:2111-7.
 26. Chan, K.L., H. Saing, R.W. Yung, Y.P. Yeung, & N.S. Tsoi. 1994. A study of preantibiotic bacteriology in 125 patients with necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr. Supplement.* **396**:45–48.
 27. Chang, W.N., C.H. Lu, C.R. Huang & Y.C. Chuang. 2000. Mixed infection in adult bacterial meningitis. *Clin. Epidemiol. Studies.* **28**:8-12.
 28. Chen, J., Tao, G. & Wang, X. 2011. Construction of an *Escherichia coli* mutant producing monophosphoryl lipid A. *Biotechnol. Lett.* **33**: 1013–1019.
 29. Christensen, R.D., MacFarlane, J.L., Taylor, N.L., Hill, H.R. & Rothstein. 1982. Blood and marrow neutrophils during experimental group B streptococcal infection: quantification of stem cell, proliferative, storage circulating *Pedia.res* **16**:549-553.
 30. Christensen, R.D., Henry, E., Wiedmeier, S.E., Stoddard, R.A., & Lambert, D.K. 2006. Low blood neutrophil concentrations among extremely low birth weight neonates: data from a multihospital health-care system. *J. Perinatol.* **11**(26): 682-687.
 31. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula – Tennessee, 2001. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **51**: 297-300.

32. Clark, N.C., Hill, B.C., O'Hara, C.M., Steingrimsson, O. & Cooksey, R.C. 1990. Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. *Diagnostic and Microbiological Infectious Diseases*, **13**: 467-472.
33. Dennison, S.K. & Morris, J., 2002. Multi-resistant *Enterobacter sakazakii* wound infection in an adult. *Infections and Medicine* 19:533–535.
34. de Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2180-2187
35. Diep, B. & Breeuwer, P. 2006. Resistance of *Enterobacter sakazakii* to desiccation, abstr. 089. *10th Int.Symp.Genet. Industr. Microorg.*, Prague, Czech Republic, 24-28 June 2006.
36. Dooley, J. J., Harisson, S. P., Mytton, L. R., DYE, M., Cresswell, A., Skot, L. & Beeching, J. R. 1993. Phylogenetic grouping and identification of *Rhizobium* isolates on the basis of random amplified polymorphic DNA profiles. *Can J Microbiol.* 39: 665–673.
37. Drudy, D., O'Rourke, M., Murphy, M., Mullane, N. R., O'Mahony, R., Kelly, L., Fischer, M., Sanjaq, S. & Shannon, P. 2006. Characterization of a collection of *Enterobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources. *Int J Food Microbiol* 110: 127–134.
38. Edelson-Mammel, S.G. & Buchanan, R.L. 2004a. Acid resistance of twelve strains of *Enterobacter sakazakii*, Abstract #P170, Program and Abstract Book, 91st Annu. Mtg., Int. Assn. Food Prot., 8–11 August, Phoenix, AZ (2004), p. 107.
39. Edelson-Mammel, S.G. & Buchanan, R.L. 2004b. Long-term survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula, Abstract#P169, Program and Abstract Book, 91st Annu. Mtg., Int. Assn. Food Prot., 8–11 August, Phoenix, AZ (2004), p. 107.
40. Edelson-Mammel, S.G. & Buchanan, R.L. 2004c. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *Journal of Food Protection*, **67**: 60-63.

41. Edelson-Mammel, S.G., Porteous, M.K. & Buchanan, R.L. 2005: Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula. *J. Food. Prot.*, **68(9)**:1900-1902.
42. Einstein, B.I. 1990. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J. Infect. Dis.* **161**: 595–602.
43. Ehrhardt, A.F. & Sanders, C.C. 1993. β -Lactam resistance amongst *Enterobacter* species. *J. Antimicrob. Chemother.* **32** (Suppl. B):1-11.
44. Evans, N.J. & Rutter, N. 1986. Development of the epidermis in the newborn. *Biol Neonate* **49**: 74–80.
45. Fani, R., Damiani, G., Di Serio, C., Gallori, E, Grifoni, A. & Bazzicalupo, M. 1993. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for microorganisms. *Mol Ecol.* **2(4)**:243–250.
46. Farber, J.M. 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J. Food Prot.* **59**:1091-1101.
47. Farmer, J.J., Asbury, M.A., Hickman, F.W., Brenner, D.J. & the *Enterobacteriaceae* Study Group. 1980. *Enterobacter sakazakii*: A new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **30**: 569-584.
48. Farmer J.J. III. 1999. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In *Manual of Clinical Microbiology*. 7th edition. Edited by Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Washington DC: ASM Press Inc; 442-458.
49. Fanning, S. & Forsythe, S.J. 2007. Isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* In: J.M: Farrber i S.J. Forsythe (editors), *Emerging issues in food safety: Enterobacter sakazakii*, ASM Press, Washington DC, USA.
50. Farber, J. & Forsythe S.J. 2008 *Enterobacter sakazakii*- emerging issues in food safety, ASM Press, Washington DC, USA
51. Food and Drug Administration. 2002a. FDA Alerts public regarding recall of

- powdered infant formula.
52. Food and Drug Administration Talk Paper. April 12, 2002b. FDA warns about possible *Enterobacter sakazakii* infections in hospitalized newborns fed powdered infant formulas.
 53. Food and Drug Administration. C.J. Taylor. Apr. 11, 2002; Revised Oct. 10, 2002c. Health professionals' letter on *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered (dry) infant formulas in neonatal intensive care units.
 54. Food and Drug Administration. 2002d. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula.
 55. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2004. Joint FAO/WHO workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula, Geneva, 2–5 February, 2004.
 56. Food and Agricultural Organization/World Health Organization. 2006. *Enterobacter sakazakii* and Salmonella in powdered infant formula. Meeting Report, Rome, Italy, Jan. 16-20.
 57. Forsythe, S.J. 2008. Other Gram-negative bacterial pathogens. In: Blackburn, C. & McClure, P., (Eds). Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control. Woodhead Publishing.
 58. Fotopoulos, T.N., Greene, J.N., Sandin, R.L. & Vincent, A.L. 1997. Successful therapy of postneurosurgical meningitis caused by a resistant strain of *Enterobacter aerogenes*. *Cancer Control*. **4**:270-273.
 59. Frank, J. F. 2001. Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Adv. Food. Nutr. Res.* **43**:319–370
 60. Frank, J. F., Ehlers, J. & Wicker, L. 2003. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. *Food Prot. Trends* **23**:654–663.
 61. Gakuya, F.M., Kyule, M.N., Gathura, P.B. & Kariuki, S.. 2001. Antimicrobial resistance

- of bacterial organisms isolated from rats. *East Afr. Med. J.* **78**:646-649.
62. Gallagher, P.G. & Ball, W.S. 1991. Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*. *Pediatric Radiol.* **21**:135-136.
63. Gantiottie, B.V. & Beer, S.V. 1982. Plasmid-borne determinants of pigmentation and thiamine prototrophy in *Erwinia herbicola*. *J. Bact.* **151**:1627-1629.
64. Gebremariam, A. 1998. Neonatal meningitis in Addis Ababa: a 10-year review. *Ann. Trop. Paediatr.* **18**:279-28.
65. Gonzalez, S., Flick, G. J., Arritt, F. M., Holliman, D. & Meadows, B. 2006. Effect of high-pressure processing on strains of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Food Protection*, **69**: 935–937.
66. Grant, K.A. & R.G. Kroll. 1993. Molecular biology techniques for the rapid detection and characterization of foodborne bacteria. *Food Sci. Technol. Today* **7**:80-88.
67. Graves R. 1992. The Dethronement of Cronos. In *The Greek Myths. Combined Edition*. London: Penguin Books , 39-44.
68. Grimm, M., Stephan, R., Iversen, C., Manzardo, G.G.G., Rattei, T., Riedel, K., Ruepp, A. & Frishman, D. 2008. Cellulose as an extracellular matrix component present in *Enterobacter sakazakii* biofilms. *J Food Prot* **71**: 13–18.
69. Guillaume-Gentil, O., Sonnard, V., Kandhai, M.C., Marugg, J.D. & Joosten H. T. 2005. Simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *Journal of Food Protection*, **68**: 64-69.
70. Gurtler, J.B. & Beuchat, L.R. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. *J. Food Prot.* **70**:1579.
71. Harris, L. S. & Oriel, P.J. 1989. Heteropolysaccharide produced by *Enterobacter sakazakii*. US Patent: 4.806 636.
72. Heuvelink, A.E., Kodde, F.D., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M. & E. de Boer. 2001.

- Enterobacter sakazakii* in melkpoeder. Keuringsdienst van Waren Oost. Project number OT 0110.
73. Havelaar, A.H. & Zwietering, M. 2004. On the risk of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula. *Trends Food Sci. Technol.* **15**:99-100
 74. Hawkins, R.E., Lissner, C.R. & Sanford, J.P. 1991. *Enterobacter sakazakii* bacteremia in an adult. *South. Med. J.* **84**:793-795.
 75. Hervas, J.A., Ballesteros, F., Alomar, A., Gil, J., Benedi, V.J. & Alberti, S. 2001. Increase of *Enterobacter* in neonatal sepsis: a twenty-two-year study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **20**:134-140.
 76. Himmelright, I., Harris, E., Lorch, V., Anderson, M., Jones, T., Craig, A., Kuehnert, M., Forster, T., Arduino, M., Jensen, B. & Jernigan, D. 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula -- Tennessee. *Morbid. Mortal. Wkly.* **51**: 298-300.
 77. Hoffman, H. & Roggenkamp, A . 2003. Population genetics of the Nomen species *Enterobacter cloacae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5306-5318.
 78. Huang, C.R., C.H. Lu, & W.N. Chang. 2001. Adult Enterobacter meningitis: a high incidence of coinfection with other pathogens and frequent association with neurosurgical procedures. *Clin. Epidemiol. Study* **29**:75-79.
 79. Hunter, C.J., Singasmetty, V.K., Chokshi, N.K., Boyle, P., Camerini, V., Grishin, A.V., Upperman, J.S., Ford, H.R.J.W. Chenu & Cox J.M. 2008. *Enterobacter sakazakii* enhances epithelial cell injury by inducing apoptosis in a rat model of necrotizing enterocolitis. *J Infectious Dis*, **198**: 586-593.
 80. Iversen, C. & Forsythe, S.J. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science and Technology*, **14**: 443-454.
 81. Iversen, C., Lane, M. & Forsythe, S.J. 2004a. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters in Applied Microbiology*, **38**: 378- 382.

82. Iversen, C., Dale, H., Druggan, P., Waddington, M., Crawford, J. & Forsythe, S.J. 2004b. P-037. The Identification of *Enterobacter sakazakii* using Partial 16S Sequencing and Biochemical Techniques. American Society for Microbiology 104th General Meeting. New Orleans, Louisiana.
83. Iversen, C., Lane, M. & Forsythe, S.J. 2004c. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**:378–382.
84. Iversen, C., M. Waddington, S.L.W. On & S. Forsythe. 2004d. Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species, *J. Clin. Microbiol.* **42**:5368–5370.
85. Iversen, C. & Forsythe, S. 2004e. Response to 'On the risk of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula'. *Trends in Food Science & Technology*, **15**: 101-102.
86. Iversen, C. & Forsythe, S. 2004f. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiology*, **21**:771-777.
87. Iversen, C., Waddington, M., Farmer, J.J. & Forsythe, S. 2006a. The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. *BMC Microbiol* **6**:94.
88. Iversen, C., Lancashire, L., Waddington, M., Forsythe, S. & Ball, G. 2006b.: Identification of *Enterobacter sakazakii* from closely related species: The use of Artificial Neural Networks in the analysis of biochemical and 16S rRNA data. *BMC Microbiol* **6**:28.
89. Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R. & Joosten H. 2007. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies 1*. *BMC Evol Biol.* **7**:64.
90. Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B.D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H. 2008: *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups

- of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58(6)**:1442-1447.
91. Jaspar, A.H.J., Mutyjens, H.L. & Klee, L.A.A. 1990. Neonatale meningitis door *Enterobacter sakazakii* : melkpoeder is niet sterile in bacterien lusten ook melk. (Neonatal meningitis caused by *E. sakazakii*: Milk powder is not sterile and bacteria like milk too.) *Tijdschr Kindergeneeskunde*. **58**:151-155.
92. Jimenez, E.B. & Gimenez, C. 1982. Septic shock due to *Enterobacter sakazakii*. *Clin. Microbiol. Newslett.* **4**:30.
93. Joker, R.N., T. Norholm, & K.E. Siboni. 1965. A case of neonatal meningitis caused by a yellow *Enterobacter*. *Danish Med. Bull.* **12**:128–130.
94. Joseph, S., Sonbol, H., Hariri, S., Desai, P., McClelland & Forsythe, S. 2012. Diversity of the *Cronobacter* Genus as Revealed by Multilocus Sequence Typing. *J. Clin. Microbiol.* **5**: 3031-3039.
95. Joosten, H.M. & Lardeau, A. 2004. Enhanced microbiological safety of acidified infant formulas tested in vitro. *S.Afr.J. Clin.Nutr.* **17**:87-92.
96. Kampfer, P., Ruppel, S. & Remus, R. 2005. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of family *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**:213-221.
97. Kandhai, M.C., Reij, M.W. & Gorris, L.G.M. 2004. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *The Lancet*, **363**: 39-40.
98. Kandhai, M.C., Reij, M.W., Gorris, L.G.M. & Zwietering, M. H. 2006. Effects of Preculturing Conditions on Lag Time and Specific Growth Rate of *Enterobacter sakazakii* in Reconstituted Powdered Infant Formula. *Appl Environ Microbiol.* **72(4)**: 2721–2729.

99. Keller, R., Pedroso, M.A., Ritchman, R. & Silva, R.M. 1998. Occurrence of virulence associated properties in *Enterobacter cloacae*. *Infect. Immun.* **66**:645-649.
100. Kien, C.L., Liechty, E.A., Myerberg, D.Z. & Mullett, M.D. 1987. Dietary carbohydrate assimilation in the premature infant: evidence for a nutritionally significant bacterial ecosystem in the colon. *Am J Clin Nutr.* **46**(3):456-460.
101. Kim, H. & Beuchat, L. R. 2005. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* on fresh-cut fruits and vegetables and in unpasteurized juice as affected by storage temperature. *J. Food Prot.* **68**: 2541-2552.
102. Kim, H., Ryu, J-H. & Beuchat, L.R. 2006a. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5846-5856.
103. Kim, K.P., Klumpp, J. & Loessner, M. J. 2007. Enterobacter sakazakii bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. *International Journal of Food Microbiology*, **115**: 195-203.
104. Kim, K.P. & Loessner, M.J. 2008. *Enterobacter 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.
105. Kindle, G., Busse, A., Kampa, D., Meyer-Koenig, U. & Daschner, F.D. 1996. Killing activity of microwaves in milk. *J. Hosp. Infect.* **33**:273-278.
106. Kirjavainen P. V. & Gibson G. R. 1999. Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. *Ann. Med.* **31**: 288-292.
107. Kleiman, M.B., Allen, S.D., Neal, P. & Reynolds, J. 1981. Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* **14**:352-354.
108. Kline, M.W. 1988a. Pathogenesis of brain abscess caused by *Citrobacter diversus* or *Enterobacter sakazakii*. *Pediatric Infect. Dis. J.* **7**:891-892.
109. Kline, M.W. 1988b. *Citrobacter* meningitis and brain abscess in infancy: epidemiology,

- pathogenesis, and treatment. *J. Pediatr.* **113**:430-434.
110. Kosloske, A.M. 1984. Pathogenesis and prevention of necrotizing enterocolitis: a hypothesis based on personal observation and a review of the literature. *Pediatrics.* **74**:1086-1092.
111. 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 aspecies-specific detection method for *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4142–4251.
112. Krieg, N.R. & Holt., J.G. 1984. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, pp. 408-420,466,467. Baltimore: Williams and Wilkins.
113. Kumar, R. & Bhatia, K.L. 1999. Standardization of method for lactoperoxidase assay in milk. *Lait* **79**:269-274.
114. Kumar, C. G. & Anand, S. K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **42**:9–27.
115. 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). *Curr. Microbiol.* **42**:290–294.
116. Lai, K.K. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. *Medicine*, **80**: 113-122.
117. Lambert-Legace, L. 1982. Other milks before and after six months. In *Feeding your Child*. General Publishing Co., Don Mills Ontario, Canada, pp. 70-77.
118. Landry, P.P., W. Kamm, J. Bille, & J.P. Berger. 1991. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated in the laboratory of a small hospital compared with those from a large hospital. *Rev. Med. Suisse Romande.* **111**:151-156.
119. Lehner, A., Riedel, K., Eberl, L., Breeuwer, P., Diep, B. & Stephan, R. 2005. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production and cell-to-cell signalling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental stress

- persistence. *J Food Prot* **68**: 2287–2294.
120. Lehner, A. 2009. Highlighting environmental reservoir aspects for *Cronobacter* spp. Oral presentation at the 1st International Meeting on *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*), O'Reilly Hall, University College Dublin, Ireland, 22nd-23rd January 2009.
121. Leclercq, A., Wanegue, C. & P. Baylac. 2002. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1631–1638.
122. Lee, J. W., Oh, S. H., Kim, J. H., Yook, H. S., & Byun, M. W. 2006. Gamma radiation sensitivity of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. *Journal of Food Protection*, **69**: 1434–1437.
123. Li, Y., Lu, Z. & Chen, Q. 2011. Identification, classification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* isolated from infant food. *Journal of College of Food Science and Technology*, Nanjing Agricultural University, Weigang, Nanjing, Jiangsu 210095, China
124. Lucas, A., & T.J. Cole. 1990. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet* **336**:1519–1523.
125. Malorny, B. & Wagner, M., 2005. Detection of *Enterobacter sakazakii* strains by real-time PCR. *J Food Prot*, **68**:1623–1627.
126. Mange, J.P., Stephan, R., Borel, N., Wild, P., Kim, K.S., Pospischil, A. & Lehner, A. 2006. Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. *BMC Microbiol.* **6**:58.
127. Marshall, K. C. 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *ASM News*, **58**:202–207.
128. Masaki, H., N. Asoh, M. Tao, H. Ikeda, S. Degawa, K. Matsumoto, K. Inokuchi, K. Watanabe, H. Watanabe, K. Oishi & Nagatake, T. 2001. Detection of gram-negative bacteria in patients and hospital environments at a room in geriatric wards under the infections control against MRSA. *J. Jpn. Assoc. Infec. Dis.* **75**:144-150.

129. Messaoudi, A., Gtari, M., Boudabous, A. & Wagenlehner, F. 2009. Identification and susceptibility of *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. isolated from meat products. *African Journal of Microbiology Research*. **3** (7): 362-369.
130. Miller, S.I., Ernst, R.K. & Bader, M.W. 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 36–46.
131. Monroe, P.W. & Tift, W.L. 1979. Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow, pigmented *Enterobacter cloacae*). *J. Clin. Microbiol.* **10**:850-851.
132. Mullane, N.R., Iversen, C., Healy, B., Walsh, C., Whyte, P., Wall, P.G., Quinn, T. & Fanning, S. 2007: *Enterobacter sakazakii* an emerging bacterial pathogen with implications for infant health. *Minerva Pediatr.*, **59(2)**:137-148.
133. Muytjens, H.L. & Kollee, L.A.A. 1990 *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula. *Pediatric Infect. Dis.***9**:372–373.
134. Muytjens, H.L., Roelofs-Willemse, H. & Jasper, G.H.J. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, **26**: 743-746.
135. Muytjens, H.L., van der Ros-van de Repe, J. & van Druten, H.A.M. 1984. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the α -glucosidase reaction and reproducibility of the test system. *Journal of Clinical Microbiology*, **20**: 684-686.
136. Muytjens, H.L., Zanen, H.C., Sonderkamp, H.J., Kolee, L.A., Wachsmuth, I.K. & Farmer, J.J. 1983. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* **18**:115-120.
137. Muytjens, H.L. & van der Ros-van de Repe, J. 1986. Comparative in vitro susceptibilities of eight *Enterobacter* species, with special reference to *Enterobacter sakazakii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**: 367-370.
138. Muytjens H.L., Roelofs-Willemse, H. & Jaspar, G.H. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **26**:743-746.

139. Nair, M.K.M. & Venkitanarayanan, K.S. 2006. Cloning and sequencing of the ompA gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an ompA-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Appl. Environ. Microbiology*. **72**: 2539–2546.
140. Nair, M.K.M., Joy, J. & Venkitanarayanan, K.S. 2004. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by monocaprylin. *J. Food. Prot.* **67**: 2815–2819.
141. Naqvi, S.H., Maxwell, M.A. & Dunkle, L.M. 1984. Cefotaxime therapy of neonatal gramnegative bacillary meningitis. *Pediatr. Infect. Dis.* **4**:499–502.
142. Nazarowec-White, M. & Farber, J.M. 1997a. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Letters in Applied Microbiology*, **24**: 9-13.
143. Nazarowec-White, M. & Farber, J.M. 1997b. Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Food Protection*, **60**: 226-230.
144. Nazarowec-White, M. & Farber, J.M. 1999. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Medical Microbiology*. **48**: 559-567.
145. Noriega, F.R., Kotloff, K.L., Martin, M.A. & Schwalbe, R.S. 1990. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. **9**(6): 447-449.
146. Norwood, D. E. & Gilmour. A. 2000. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J. Appl. Microbiol.* **88**:512–520
147. Oie, S. & Kamiya, A. 2001. Comparison of microbial contamination of enteral feeding solution between repeated use of administration sets after washing with water and after washing followed by disinfection. *J. Hosp.Infect.* **48**:304–307.

148. Osaili, T. M., Shaker, R. R., Abu Al-Hassan, A. S., Ayyash, M. M. & Martin, M. M. 2007a. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula by gamma irradiation: Determination of D-value. *Journal of Food Science*, 72:85–88.
149. Osaili, T. M., Shaker, R. R., Ayyash, M. M. & Holley, R. A. 2007 b. Effect of *Bifidobacterium breve* on the growth of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant milk formula. *Journal of Food Safety* (Accepted)
150. Pagotto, F.J., Nazarowec-White, M., Bidawid, S. & Farber, J.M. 2003. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Food Protection*. **66**: 370-375.
151. Pangalos, G. 1929. Sur un Bacille Chromogene Isole par Hemoculture. *C. R. Soc. Biol.* (Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie). **100**:1097.
152. Pérez, M. C., Aliaga, D., Bernat, C., Enguidanos M. & López, A. 2007. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by pulsed electric field in buffered peptone water and infant formula milk. *International Dairy Journal*. **17**(12):1441-1449.
153. Peter, C.S., M. Feuerhahn, B. Bohnhorst, M. Schalaus, S. Ziesing, H. von der Hardt & C.F.Poets. 1999. Necrotizing enterocolitis: is there a relationship to specific pathogens? *Eur.J. Pediatr*. **158**:67-70.
154. Pitout, J.D., Moland, E.S., Sanders, C.C., Thomson, K.S. & Fitzsimmons, S.R. 1997. Beta-lactamases and detection of beta-lactam resistance in *Enterobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **41**(1): 35-39.
155. Postupa, R. & Aldová, E. 1984. *Enterobacter sakazakii*: a tween 80 esterase-positive representative of the genus *Enterobacter* isolated from powdered milk specimens. *J. Hyg., Epidemiol. Microbiol. Immunol*. **28**:435–440.
156. Power K.A, Yan Q., Fox E.M, Cooney, S. & Fanning S. 2013. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* SP291, a persistent thermotolerant isolate derived from a factory producing powdered infant formula. *Genome Announc*. **1**(2):e00082-13.
157. Pribyl, C., Salzer, R. & Beskin, J. 1985. Aztreonam in the treatment of serious orthopedic infections. *Am J Med*. **78**(2A):51-56.

158. Raetz, C.R., Garrett, T.A., Reynolds, C.M., Shaw, W.A., Moore, J.D., Smith, D.C., Ribeiro, A.A. Murphy, R.C., Ulevitch, R.J. & Fearnly, C. 2006. Kdo2-Lipid A of *Escherichia coli*, a defined endotoxin that activates macrophages via TLR-4. *J. Lipid Res.* **47**: 1097–1111.
159. Rance, C.P., Roy, T.E., Donohue, W.L., Sepp, A., Elder, R. & Finlayson, M. 1962. An epidemic of septicemia with meningitis and hemorrhagic encephalitis in premature infants. *J. Pediatr.* **61**:24-32.
160. Reich, F., König, R., Von Wiese, W. & Klein, G. 2010. Prevalence of *Cronobacter spp.* in a powdered infant formula processing environment. *International Journal of Food Microbiology.* **140**: 214-217.
161. Reidel, K. & Lehner, A. 2007. Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics. *Proteomics*, **7**: 1217-1231.
162. Reina, J., Parras, F., Gil, J., Salva, F. & Alomar, P. 1989. Human infections caused by *Enterobacter sakazakii*. Microbiologic considerations. *Enferm. Enecc. Micro. Clin.* **7**: 147–150.
163. Richards, G.M., Gurtler, J.B. & Beuchat, L.R. 2005. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice *J Appl Microbiol.* **99**(4):844-50.
164. Ries, M., Harms, D. & J. Scharf. 1994. Multiple cerebral infarcts with resulting multicystic encephalomalacia in a premature infant with *Enterobacter sakazakii* meningitis. *Klin. Padiatrie.* **206**:184-186.
165. Ryu, J.H. & Beuchat, L. R. 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:247–254.
166. Sakata, H. & Maruyama, S. 1997. Study of septicemia due to *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. *Kansenshogaku Zasshi.* **71**:318-322.
167. Sanders W.E. & Sanders, C.C. 1997. *Enterobacter spp.*: Pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:220-241.

168. Santos, R., 2006. Determination of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula, reconstituted and utensils used in baby's bottle preparation. Poster P1-38. IAFP (International Association for Food Protection), Calgary, Canada, 13-16 Aug. 2006.
169. Schelonka, R.L., Yoder, B.A., des Jardins, S.E., Hall, R.B. & Butler, J. 1994. Peripheral leukocyte count and leukocyte indexes in healthy newborn term infants. *J Pediatr*, 125, No.4 603-606.
170. Schindler, P.R. & Metz, H. 1990. Coliform bacteria in rinsed beer mugs- identification with the API 20E system and resistance behavior. *Offentliche Gesundheitswesen*. **52**:592-597.
171. Schindler, P.R.G. 1994. Enterobacteria in various kinds of mineral water, spring water and table water. *Gesundheitswesen* **56**: 690–693.
172. Seo, K.H. & Brackett, R.E. 2005. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J Food Prot* **68**: 59–63.
173. Scheepe-Leberkuhne & Wagner, F. 1986. Optimization and preliminary characterization of an exopolysaccharide synthesized by *Enterobacter sakazakii*. *Biotechnol. Lett.* **8**:695-700.
174. Simmons, B.P., Gelfand, M.S., Haas, M., Metts, L., & Ferguson, J. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **10**: 398-401.
175. Singamsetty, V.K., Wang, Y., Shimada, H. & Prasadarao, N.V. 2008. Outermembrane protein A expression in *Enterobacter sakazakii* is required to induce microtubule condensation in human brain microvascular endothelial cells for invasion. *Microb Pathog* **45**: 181–191.
176. Skladal, P., Mascini, M., Salvadori, C. & Zannoni, G. 1993. Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an L-lactate biosensor. *Enzyme Microbiol. Technol.* **15**:508–512.

177. Sneath, P. & Sokal, R. 1973 Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. *W. H. Freeman and co.* San Francisco, USA.
178. Stojanović, M.M., Katić, V. & Kuzmanović, J. 2011. Isolation of *Cronobacter sakazakii* from different herbal teas. *Vojnosanitetski preglad. Military-medical and pharmaceutical review* **68**(10): 837-41.
179. Stoll, B.J., Hansen, N., Fanaroff, A.A. & Lemons, J. 2004. *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *The Journal of Pediatrics*, **144**: 821–823.
180. Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B. & Tauxe, R.V. CDC PulseNet Task Force. 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance. *Emerging Infectious Diseases*. **7**: 382-389.
181. Tamura, K., Sakazaki, R., Kosako, Y. & Yoshizaki, E. 1986. *Leclercia adecarboxylata* gen. nov., comb. nov., formerly known as *Escherichia adecarboxylata*. *Curr. Microbiol* **13**:179–184.
182. Townsend, S., Caubilla-Barron, J., Loc-Carrillo, C. & Forsythe, S. 2007. The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat. *Food Microbiol.* **24**:67-74.
183. Townsend, S. & Forsythe, S. J. 2008. The neonatal intestinal microbial flora, immunity, and infections. In *Enterobacter sakazakii* ed. Farber, J. & Forsythe, S.J. *ASM press*: 61-100.
184. Triantafilou, M. Triantafilou, K. 2005. The dynamics of LPS recognition: Complex orchestration of multiple receptors. *J. Endotoxin Res.* **11**: 5–11.
185. Udall, J. N., Jr .1990. Gastrointestinal host defense and necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr.* **117**:33-43.
186. Urmenyi, A.M.C., & A.W. Franklin. 1961. Neonatal death from pigmented coliform infection. *G Lancet* **1**:313–315.

187. Van Acker, J., de Smet, F., Muyldermans, G., Anne Naessens, A. & Lauwers, S. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**(1): 293-297.
188. Vandamme, P, Pot, B. Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**:407-438.
189. Versalović, J., Koeuth, T. & Lupski, JR. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**:6823-6831.
190. Versalović, J., Schneider M., de Bruijn F.J. & Lupski, J.R. 1994. *Meth. Cell. Mol. Biol.* **5**: 25-40.
191. Vidon, D.J.-M., Delman, C., & Merlin, JC. 1987. Characteristics of the yellow pigment from a strain of *Yersinia enterocolitica* Biovar 1. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **138**:609-615.
192. Wang, X. & Quinn, P.J. 2010. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog. Lipid Res.* **49**: 97–107.
193. Weir, E. 2002. Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*. *Can. Med. Assoc. J.* **166**:1570.
194. WHO (World Health Organization). 2002. *The global strategy for infant and young child feeding*. Accessed 24 March 2004.
195. WHO/ Microbiological risk assessment series, 2008 *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter sakazakii*) in powdered follow-up formulae .WHO/ Meeting Report No.15 Rome. 90pp.
196. Willis, J., & Robinson, J.E., 1988. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr.Infect.Dis. J.* **7**:196-199.
197. Williams TL, Monday SR, Edelson-Mammel S, Buchanan R, Musser SM. 2005. A top-down proteomics approach for differentiating thermal resistant strains of

- Enterobacter sakazakii. *Proteomics*. **5**:4161-4169.
198. Wold, A. E., & I. Adlerberth. 2000. Breast Feeding and the Intestinal Microflora of the Infant — Implications for Protection Against Infectious Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 478: 77-93.
199. Wust, J., R. Auckenthaler, C. Breer, R. Frei, I. Heinzer & W. Kamm. 1994. Sensitivity to antibiotics of gram-negative bacteria in Swiss intensive care units. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **124**:1695-1700.
200. Yan, Q., Power, K.A., Cooney, S., Fox, E., Gopinath, G.R., Grim, C.J., Tall, B.D., McCusker, M.P. & Fanning, S. 2013. Complete genome sequence and phenotype microarray analysis of *Cronobacter sakazakii* SP291: a persistent isolate cultured from a powdered infant formula production facility. *Front Microbiol.* **256**(4) : 1-20.
201. Ye, Y., Wu, Q., Yao, L., Dong, X., Wu, K. & Zhang, J. 2009. Analysis of a consensus fragment in ERIC-PCR fingerprinting of *Enterobacter sakazakii*. *Int. J. Food. Microbiol.* **132**: 172-175.
202. Ye, Y., Wu, Q., Zhou, Y., Dong, X. & Zhang J. 2008. Analysis of major band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and development of a species-specific PCR for detection of *E. sakazakii* in dry food samples. *J. Microbiol. Methods.* **75**(3):392-7.
203. Ye, Y., Wu, Q., Xu, X., Yang, X., Dong, X. & Zhang J. 2010. The phenotypic and genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* strains from infant formula milk. *J. Dairy Sci.* **93**(6):2315-20.
204. Wanyi, C., Lianzhong, A., Jieli, Y., Jing, R., Yunfei, L. & Benheng, G. 2013. Molecular Typing of *Cronobacter* Strains from Food in China by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence PCR (ERIC-PCR) and Sequence Analysis of the *gyrB* Gene. *Journal of Food Safety.* **33** (4):405-412.
205. Zhang, C., Li, Y., Tao, G., Li, Y. & Wang, X. 2010. Characterization of lipid A *Cronobacter sakazakii*. *Eur. J. Mass Spectrom.* **16**: 531-538.
206. Zhou, Y., Wu, Q., Xu, X., Yang, X., Ye, Y. & Zhang, J. 2008. Development of an

immobilization and detection method of *Enterobacter sakazakii* from powdered infant formula. *Food Microbiol* **25**: 648–652.

BIOGRAFIJA AUTORA

Marija M. Stojanović je rođena 9. avgusta 1976. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Zemunsku gimnaziju završila je u Zemunu. Fakultet Veterinarske medicine u Beogradu upisala je 1995. godine i diplomirala 2003. godine sa prosečnom ocenom 8,89. Dobitnik je stipendije Kraljevine Norveške za najbolje studente 2000. godine.

Postdiplomske studije upisala 2004. godine na Fakultetu veterinarske medicine u okviru Tempus projekta Post graduate programme on food quality and safety (Master en qualité et sécurité alimentaire), dobivši zvanje Master of food quality and safety. Magistarsku tezu *Bakteriološka ispravnost belih sireva na beogradskim pijacama* je odbranila 2005. godine.

Od avgusta 2003. radi u Centru za ispitivanje namirnica u kao analitičar u mikrobiološkom odeljenju, a od 2010. godine je na poziciji rukovodioca odeljenja mikrobiologije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а MARIJA STOJANOVIC'

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA CRONOBACTER SAKAZAKII
IZ FORMULA ZA ODOJČAD I IZ BIJELIH ČAJEVA

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 24.06.2014

Marija M. Stojanović

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора MARIJA STOJANOVIC'

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA CROMOBACTER SAKAZAKII IZ FORMULA ZA
ODGOJAO I IZ BIJelih BAJEVA

Ментор PROF. DR. VERA KATIC'

Потписани MARIJA STOJANOVIC'

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 24.06.2014

Marije M. Stojanovic

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ИЗДАЦИЈА I КАРАКТЕРИЗАЦИЈА СТРОМОВАСТЕР ЈАКАЗАКИИ
ИЗ ФОРМУЛА ЗА ОДОЈСАД I ИЗ ВУГНИН БАЈЕВА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 26.04.2014

Марко М. Стојановић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.