

CRONOBACTER SPP. – POWAŻNE ZAGROŻENIE W ŻYWNOSCI DLA NIEMOWLĄT

Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak*, Danuta Kołożyn-Krajewska

Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w listopadzie 2019 r., zaakceptowano w kwietniu 2020 r.

Streszczenie: *Cronobacter* spp. uznawane są za oportunistyczne patogeny we wszystkich grupach wiekowych, szczególnie u wcześniaków, niemowląt z niską masą urodzeniową, osób w wieku podeszłym i osób z obniżoną odpornością. Obecnie rodzaj *Cronobacter* obejmuje siedem gatunków: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimentii*. Trzy pierwsze gatunki *Cronobacter* zostały skojarzone z infekcjami klinicznymi noworodków i wcześniaków. Zakażenia bakteriami *Cronobacter* mogą powodować zapalenie komórek nerwowych, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, tworzyć ropnie i torbiele mózgu prowadzące do wodogłowia oraz martwicze zapalenie jelit. Chociaż zakażenia wywołane przez *Cronobacter* spp. są rzadkie to współczynnik śmiertelności jest bardzo wysoki, jak również koszty związane z długoterminowym leczeniem powikłań po infekcji. *Cronobacter* spp. dzięki produkcji otoczek i biofilmu, termotoleracyjności jest odporny na wysuszenie i wykazuje przeżywalność w mieszankach mlekozastępczych i innych produktach o niskiej aktywności wody. *Cronobacter* spp. izolowano z warzyw, zbóż, płatków, ziemniaków, przypraw, mięsa, ryb, sera, tofu, ryżu, makaronu, czekolady, herbaty oraz z powierzchni abiotycznych w środowisku szpitalnym, z przedmiotów i sprzętu medycznego. Na podstawie Rozporządzenia (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005, z późniejszymi zmianami, *Cronobacter* spp. powinien być nieobecny w trzydziestu 10 g próbkach preparatów w proszku do początkowego żywienia niemowląt i żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego, przeznaczonego dla niemowląt w wieku do 6 miesięcy. W pracy podjęto temat oceny występowania zagrożenia powodowanego przez bakterie *Cronobacter* w żywności w świetle obowiązujących wymagań.

1. Wprowadzenie. 2. Objawy i chorobotwórczość *Cronobacter* spp. 3. Wymagania przepisów prawa. 4. Mechanizmy wirulencji *Cronobacter* spp. 5. Taksonomia *Cronobacter* spp. 6. Występowanie *Cronobacter* spp. w żywności. 7. Oporność *Cronobacter* spp. na warunki stresowe. 8. Tworzenie biofilmu przez bakterie z rodzaju *Cronobacter*. 9. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Cronobacter* spp. 10. Antybiotykooporność *Cronobacter* spp. 11. Podsumowanie

CRONOBACTER SPP. – THE SERIOUS RISK IN A BABY FOOD

Abstract: *Cronobacter* spp. are considered opportunistic pathogens in all age groups, especially in premature babies, children with low birth weight, the elderly and immunocompromised people. Currently, the genus *Cronobacter* includes seven species: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* and *C. condimentii*. The first three species of *Cronobacter* have been associated with clinical infections of newborns and premature babies. *Cronobacter* bacterial infections can cause neuritis, encephalomyelitis, the formation of abscesses and cysts of the brain leading to hydrocephalus and necrotizing enterocolitis. Often infected with *Cronobacter* spp. are rare, the mortality rate is very high, as well as the costs associated with temporarily treating post-infection complications. *Cronobacter* spp. due to the production of capsule and biofilm, high thermotolerance is resistant to drying and survival loads in milk replacers and other products with water activity. *Cronobacter* spp. isolated from milk replacers used for the initial feeding of infants, with vegetables, cereals, potatoes, spices, meat, fish, cheese, tofu, rice, pasta, chocolate, tea and abiotic surfaces in a hospital, with medical products and equipment. Under the Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005, *Cronobacter* spp. should be absent in thirty 10 g samples of infant formulas and infant dietetic powders intended for infants up to 6 months old. The subject of the study is the assessment of the occurrence the hazard caused by *Cronobacter* in food in the light of applicable requirements.

1. Introduction. 2. Symptoms and pathogenicity *Cronobacter* spp. 3. Legal requirements. 4. Virulence mechanism *Cronobacter* spp. 5. Taxonomy *Cronobacter* spp. 6. Occurrence *Cronobacter* spp. in food. 7. Resistance *Cronobacter* spp. to stress conditions. 8. Biofilm formation by bacteria genus *Cronobacter*. 9. Detection and determination of numbers *Cronobacter* spp. 10. Antibiotic resistance *Cronobacter* spp. 11. Summary

Słowa kluczowe: biofilm, chorobotwórczość, *Cronobacter* spp., wirulencja, wykrywanie

Key words: biofilm, pathogenicity, *Cronobacter* spp., virulence, detection

1. Wprowadzenie

Bakterie *Cronobacter* spp. to Gram-ujemne, względnie beztlenowe, ruchliwe, nieprzetrwalnikujące pałeczki, należące do rodziny *Enterobacteriaceae* [38, 56, 85].

Uznawane są za oportunistyczne patogeny we wszystkich grupach wiekowych, szczególnie u wcześniaków, niemowląt z niską masą urodzeniową, osób w wieku podeszłym i osób z obniżoną odpornością [2, 43, 97]. Nazwa rodzaju *Cronobacter* pochodzi od imienia

* Autor korespondencyjny: Elżbieta Rosiak, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Żywności Człowieka, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa; tel. 22 59 37 070; e-mail: elzbieta_rosiak@sggw.edu.pl

jednego z greckich tytanów Kronosa, który połykał wszystkie swoje dzieci po urodzeniu. Obecnie rodzaj *Cronobacter* obejmuje siedem gatunków: *C. sakazakii*, *C. malonicus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimenti*. Trzy pierwsze gatunki *Cronobacter* zostały skojarzone z infekcjami klinicznymi noworodków i wcześniaków. *C. dublinensis*, *C. muytjesii* i *C. condimenti* mają prawdopodobnie małe lub znikome znaczenie kliniczne [2, 97].

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. zalicza się do patogenów odpowiedzialnych za występowanie na całym świecie rzadkich, ale zagrażających życiu chorób: zapalenia opon mózgowych, bakteriemii, kilku form martwiczego zapalenia jelit [2]. W roku 2002 International Commission for Microbiological Specifications for Food nadała *C. sakazakii* „status zagrożenia, w przypadku wybranych populacji, zagrażającego życiu lub powodującego znaczące przewlekłe, długoterminowe konsekwencje” zaliczając do tej samej kategorii patogenów żywnościowych co *Clostridium botulinum* (typ A i B), *Cryptosporidium parvum* i *Listeria monocytogenes* [2, 3, 38].

W roku 2005 weszło w życie Rozporządzenie Komisji (WE) 2073/2005 (zmienione w 2010 roku Rozporządzeniem (EU) 365/2010) w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych na mocy, którego istnieje obowiązek badania preparatów w proszku dla niemowląt (PIF-powdered infant formula) oraz żywności dietetycznej w proszku specjalnego medycznego przeznaczenia, stosowanej w żywieniu niemowląt do 6 miesiąca życia na obecność *Cronobacter* spp. Według tego Rozporządzenia bakterie *Cronobacter* spp. muszą być nieobecne w trzydziestu 10-gramowych porcjach produktu. Pozytywne na obecność *Cronobacter* spp. partie mieszanek mlekozastępczych powinny zostać wycofane z rynku bez konieczności wykonywania analiz przynależności do gatunku [2, 7, 38].

W pracy podjęto temat oceny występowania zagrożenia powodowanego przez bakterie *Cronobacter* spp. w żywności w świetle obowiązujących wymagań.

2. Objawy i chorobotwórczość *Cronobacter* spp.

Najbardziej narażone na zakażenia wywołane przez bakterie z rodzaju *Cronobacter* są noworodki poniżej 28 dnia życia, noworodki urodzone przedwcześnie, niemowlęta o niskiej masie urodzeniowej (poniżej 2,5 kg) i niemowlęta z upośledzeniem odporności [24, 43,74]. W USA zgłaszana zapadalność (częstość występowania infekcji wywołanych przez *Cronobacter* na 100 tysięcy niemowląt) wynosi 1, natomiast w przypadku niemowląt z niską masą urodzeniową ryzyko zakażenia wzrasta do 9,4 na 100 tysięcy niemowląt [33].

Po przekroczeniu bariery krew-mózg niektóre gatunki *Cronobacter*, m.in. *C. sakazakii* mogą wywołać

zapalenie komórek nerwowych, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych oraz tworzyć ropnie i torbiele mózgu prowadzące do wodogłowia. Pierwsze przypadki zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych związanych ze spożyciem zakażonych bakterią *C. sakazakii* mieszanek mleko zastępczych opisano w 1961 r. [93]. Wskaźnik śmiertelności niemowląt związany z noworodkowym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych szacuje się na około 40–80% [18, 38]. W 94% przypadków u niemowląt, które przeżyły ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, wywołane zakażeniem *C. sakazakii*, choroba ta pozostawiała nieodwracalne powikłania neurologiczne m.in. wodogłowia, zaburzenia słuchu i wzroku oraz niedowład kończyn [18].

Pierwsze przypadki zakażeń bakterią *C. sakazakii* stwierdzono w Holandii w latach 1977–1981. Doszło wówczas do zakażenia ośmiorga niemowląt bakterią *C. sakazakii*, z których przeżyło dwoje [65]. W Islandii w latach 1986–1987 odnotowano trzy przypadki zakażenia *C. sakazakii*. Jedno z niemowląt nie przeżyło. U drugiego dziecka doszło do znaczącego upośledzenia rozwoju psychicznego i fizycznego. U trzeciego niemowlęcia stwierdzono powikłania w postaci zespołu napadów padaczkowych i opóźnień w rozwoju [9]. W latach 1993–1998 odnotowano 4 przypadki zakażeń niemowląt w Izraelu. Bakterie z gatunku *C. sakazakii* wyizolowano m.in. z miksera używanego do przygotowania mieszanki mlekozastępczej [10]. W okresie od czerwca do lipca 1998 roku doszło do zakażenia dwunastu noworodków w Belgii. Dzieci miały masę urodzeniową < 2000 g i karmione były mieszanką mlekozastępczą. Dwoje noworodków zmarło [94].

Pozostałe, wybrane przypadki infekcji wywołane bakteriami z rodzaju *Cronobacter* spp. przedstawiono w tabeli I. Mimo rosnącej świadomości zagrożenia zachorowania wciąż się zdarzają, potwierdza to m.in. przypadek z 2015 roku z Australii, gdzie w wyniku zakażenia *C. sakazakii* zmarło niemowlę. Bakterię wyizolowano z mleka matki, które było odciągane ręcznym laktatorem. Izolaty bakterii obecne we krwi niemowlaka i w mleku matki były identyczne, co potwierdza, że noworodek był narażony na patogen, poprzez konsumpcję mleka kobiecego (Tab. I) [61]. W 2016 roku w USA zdiagnozowano u noworodka sepsę. Niemowlę karmione było mlekiem kobiecym uzyskanym od dawczyni. Próby pobrane z płynu mózgowo-rdzeniowego i krwi wykazały obecność *C. sakazakii*. Bakterię wyizolowano również z laktatora używanego do odciągania pokarmu kobiecego (Tab. I) [11]. W 2017 roku w Brazylii w wyniku zakażenia *Cronobacter* spp. zmarł noworodek (urodził się w 35 tygodniu ciąży, karmiony był mlekiem matki oraz mieszanką mleko zastępczą). Wyizolowany z krwi *Cronobacter* spp. zidentyfikowano jako *C. sakazakii* ST494 [14]. Zeng i wsp. [101] opisali przypadek zakażenia chłopca bakterią *Cronobacter* spp.

Tabela I
Wybrane infekcje noworodków wywołane przez bakterie *Cronobacter* spp.

Rok	Kraj	Liczba chorych	Objawy/choroba	Skutek infekcji	Piśmien- nictwo
1979	USA	1	Posocznica	Brak danych	[64]
1988	USA	4	Bakteriemia – 2 przypadki, zakażenie dróg moczowych – 1 przypadek, krwawa biegunka – 1 przypadek	Brak danych	[84]
1992	Indie	1	Zapalenie opon mózgowych	Śmierć	[80]
1994	Francja	13	Zapalenie opon mózgowych – 1 przypadek, posocznica – 1 przypadek, martwicze zapalenie jelit – 7 przypadków, brak objawów klinicznych – 4 przypadki	Śmierć – 4 przypadki	[6, 13]
1998	Belgia	12	Martwicze zapalenie jelit	Śmierć – 2 przypadki	[94]
1998	Brazylia	4	Bakteriemia	Brak danych	[22]
1998	Filipiny	12	Zakażenia dróg moczowych, bakteriemia	Brak danych	[22]
1999	USA	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Neurologiczne powikłania	[12]
2000	Izrael	2	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 1 przypadek Posocznica – 1 przypadek	Brak danych	[4]
2001	USA	4	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 3 przypadki Zakażenia dróg moczowych – 1	Śmierć – 1 przypadek	[22, 31, 86]
2002	Belgia	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Śmierć	[77]
2002	Brazylia	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Śmierć	[5]
2002	Indie	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Śmierć	[80]
2002	USA	5	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 3 przypadki Bakteriemia – 2 przypadki	Śmierć – 1 przypadek Powikłania neurologiczne – 2 przypadki	[22]
2003	USA	4	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 2 przypadki, Bakteriemia – 2 przypadki	Śmierć – 1 przypadek	[22]
2004	Nowa Zelandia	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 1 przypadek	Śmierć – 1 przypadek	[44]
2004	Francja	4	Zapalenie opon mózgowych- 2 przypadki, krwotoczne zapalenie okrężnicy – 1 przypadek, zapalenie spojówek – 1 przypadek	Śmierć – 2 przypadki	[15, 78]
2004	USA	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne	[22]
2004	Holandia	1	Bakteriemia	Brak danych	[89]
2005	Słowenia	1	Posocznica	Brak danych	[73]
2005	USA	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne	[22]
2006	Hiszpania	1	Bakteriemia	Brak danych	[1]
2006	Szwajcaria	2	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 2 przypadki	Śmierć – 2 przypadki	[60]
2006	USA	2	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 2 przypadki	Powikłania neurologiczne	[11, 22]
2007	USA	7	Zapalenie opon mózgowych- 3 przypadki, bakteriemia – 3 przypadki, martwicze zapalenie jelit – 1 przypadek	Śmierć – 1 przypadek Powikłania neurologiczne – 10 przypadków	[22]
2007	Hiszpania	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Brak danych	[79]
2008	Japonia	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne	[22]
2008	USA	2	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne – 1 przypadek	[22]
2008	Kanada	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Brak danych	[22]
2008	Korea	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Brak danych	[48]
2010	Meksyk	2	Krwawa biegunka	Brak danych	[41]
2015	Australia	1	Bakteriemia	Śmierć	[61]
2015	Chiny	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne	[101]
2016	USA	1	Bakteriemia	Brak danych	[11]
2017	Brazylia	1	Ropień mózgu	Śmierć	[14]
2018	USA	1	Bakteriemia	Brak danych	[90]

Źródło: opracowanie własne.

w Chinach. W płynie mózgowo-rdzeniowym wykryto liczne leukocyty, a w mózgu ropnie. Podawano dożylnie antybiotyki: cetrydym, a następnie meropenem. Objawy kliniczne ustąpiły, jednak po 3 tygodniach stwierdzono upośledzony rozwój umysłowy i fizyczny dziecka. Z płynu mózgowo-rdzeniowego wyizolowano *C. sakazakii* ST256 serotyp O1 [101].

3. Wymagania przepisów prawa

Komunikację ryzyka, związanego z występowaniem bakterii *Cronobacter* spp. w żywności dla niemowląt, w Rozporządzeniu (WE) 2073 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych z 15 listopada 2005 poprzedziły spotkania Komitetów Kodeksu Żywnościowego ds. Higieny Żywności (35 sesja w 2003) oraz Żywnienia i Żywności Specjalnego Dietetycznego Przeznaczenia (24 sesja w 2003). Zdecydowano o rewizji obowiązującego Kodu Praktyk Higienicznych Żywności dla Niemowląt i Dzieci i zwrócono się do FAO i WHO o jak najszybsze zwołanie spotkania ekspertów w sprawie występowania *E. sakazakii* w mieszankach mlekozastępczych (PIF). Spotkanie ekspertów FAO/WHO odbyło się w lutym 2004 roku w Genewie. Poświęcone zostało bezpieczeństwu żywności dla nie-

mowląt i małych dzieci oraz zapobieganiu potencjalnie ciężkim zakażeniom u niemowląt. Patogeny związane z mieszankami mlekozastępczymi, w wyniku przeprowadzonej oceny ryzyka, podzielono na trzy grupy wg ryzyka wystąpienia i skutków zdrowotnych. Pierwsza grupa to kategoria A – wysoki związek przyczynowo skutkowy zakażeń niemowląt w wyniku spożycia mieszanki mlekozastępczych. Do tej kategorii zaliczono *Salmonella* i *Cronobacter* spp. Do kategorii B – związek przyczynowo-skutkowy jest prawdopodobny, ale nie potwierdzony, zaliczono: *Escherichia coli*, *Escherichia vulneris*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter* spp. Kategoria C – związek przyczynowo-skutkowy mniej prawdopodobny lub jeszcze nie wykazany, to: *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Bacillus cereus*. Opracowano model oceny ryzyka w celu opisanie czynników prowadzących do zakażenia *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) u niemowląt oraz zidentyfikowania potencjalnych strategii ograniczania ryzyka. Opracowany model oceny ryzyka ułatwia także porównanie poziomu zanieczyszczenia produktu w zależności od sposobu przygotowania produktu, obrotu i karmienia. Ponadto zapewnia środki do oceny kryteriów mikrobiologicznych i planu pobierania próbek pod względem

Tabela II
Wybrane geny *Cronobacter* spp.

Gen	Działanie	Piśmien- nictwo
Chorobotwórczość		
cpa	Aktywuje plazminogeny	[16]
sip	Wchodzi w interakcje siderforów	
hly	Wykazuje działanie hemolizujące	
ibeA	Aktywowanie śródbłonka naczyń mózgowych	[51]
ibeB		
yijP		
Wykorzystanie kwasu sjałowego		
nanAKT	Koduje wykorzystanie egzogenego kwasu sjałowego	[47]
Odporność na stres środowiskowy		
curliGR55	Zapewnia odporność komórek bakterii na niską aktywność wody	[26]
Tworzenie biofilmu		
flhE	Synteza rzęski	[27]
mgtB	Koduje czynniki wirulencji	
fliD	Synteza rzęski	
alsS	Koduje podstawowe procesy komórkowe	
flgJ	Synteza rzęski	
cyoD	Koduje podstawowe procesy komórkowe	
ftsK	Odgrywa kluczową rolę w podziałach komórkowych	
bcsC, bcs B, bcs A	Synteza celulozy	

Źródło: opracowanie własne.

redukcji ryzyka i odsetka odrzuconych partii produktów. Model oceny ryzyka szacuje względne ryzyko choroby wywołane przez *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) dla niemowląt z wewnętrznie skażonego PIF, nie bierze pod uwagę zanieczyszczenia i rekontaminacji ze środowiska lub innych źródeł po wytworzeniu. Ponadto opracowano szereg rekomendacji dla krajów członkowskich i organizacji pozarządowych (NGOs) uwzględniających m.in. ustalenie odpowiednich specyfikacji mikrobiologicznych dla *E. sakazakii* w mieszankach mlekozastępczych oraz wskazanie *Enterobacteriaceae* zamiast *E. coli*, jako kryterium oceny higieny środowiska produkcyjnego [22].

Podczas kolejnego spotkania technicznego grupy ekspertów w 2006 roku dokonano oceny opracowanego modelu oceny ryzyka [21]. Wynik tej pracy dostarczył porad i wytycznych zmniejszających ryzyko zakażenia niemowląt w wyniku konsumpcji mleka modyfikowanego w proszku (PIF). Spotkanie ekspertów FAO/WHO w 2008 dotyczyło podjęcia decyzji w sprawie ustanowienia kryterium bezpieczeństwa mikrobiologicznego dla *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) w przypadku mieszanek do żywienia niemowląt powyżej 12 miesiąca życia (FUF – follow-up formula).

Pracę ekspertów FAO/WHO wspierała Komisja Kodeksu Żywnościowego (Codex Alimentarius Commission – (CAC), Komitet ds. Higieny Żywności (Committee on Food Hygiene – CCFH), który jest odpowiedzialny za opracowanie wytycznych zarządzania ryzykiem w obszarze bezpieczeństwa żywności na poziomie międzynarodowym. Ustalenia ze spotkania technicznego z 2006 r. stanowiły wkład w finalizację Kodeksu Praktyk Higienicznych dla Preparatów w Proszku dla Niemowląt i Małych Dzieci (wraz z Aneksami I i III4) (Codex Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children).

4. Mechanizmy wirulencji *Cronobacter* spp.

W literaturze opisano dwa podstawowe mechanizmy wirulencji *Cronobacter* spp.: adhezja do komórek nabłonka jelitowego oraz adhezja do komórek śródbłonka naczyń mózgowych [51].

Adhezja bakterii *Cronobacter* spp. do nabłonka jelitowego powoduje zwiększoną apoptozę komórek nabłonka i utratę integralności bariery nabłonkowej [58]. Bakterie *Cronobacter* spp. wykorzystują białka powierzchniowe komórek gospodarza np. fibronektynę, aby przyłączyć się do komórek nabłonkowych jelita oraz mikrofilamenty i mikrotubule do atakowania komórek gospodarza [43]. Przyleganie *Cronobacter* spp. do nabłonka jelitowego wywołuje stan zapalny. Po przekroczeniu bariery jelitowej bakteria może przedostać się do krwiobiegu, powodując sepsę, posocz-

nicę, kilka postaci martwiczego zapalenia jelit, zapalenia migdałków, zapalenia szpiku i kości oraz infekcje dróg moczowych [2, 57, 74].

W warunkach *in vitro* stwierdzono, że białko błony zewnętrznej A komórek (OmpA) odgrywa kluczową rolę w inwazji na komórki nabłonka jelitowego oraz śródbłonka naczyń mózgowych [50]. Przypuszcza się, że *Cronobacter* spp. wnika do komórek nerwowych na zasadzie fagocytozy i zakłóca dojrzewanie komórek dendrytycznych [43]. Uważa się, że geny *ibeA*, *ibeB* i *yijP* *C. sakazakii* odpowiedzialne są za atakowanie śródbłonka naczyń mózgowych [51]. Kim i wsp. [51] wykryli w szczepie *C. sakazakii* ATCC 29544^T gen kodujący OmpA oraz gen *ibeB*.

Chorobotwórczość *Cronobacter* spp. może być związana także z produkcją enterotoksyny, która może wzmacniać wirulencję i translokację przez barierę krew-mózg i jelita [71]. Raghav i Aggarwal [76] określili, masę cząsteczkową toksyny, która wynosi 66 kDa i jest stabilna w 90°C przez 30 min. Oprócz enterotoksyn *Cronobacter* spp. produkuje enzymy proteolityczne, które powodują rozkład komórki gospodarza np. metaloproteaza cynkowa deformuje komórki, prowadząc do ich uszkodzenia [71], *Cronobacter* spp. posiada mechanizm obronny przed układem immunologicznym gospodarza, dzięki tolerancji środowiska makrofagów [43, 91, 92]. Przeżywalność bakterii w makrofagach jest różna w przypadku różnych gatunków *Cronobacter*. Według Townsend i wsp. *Cronobacter* spp. może przetrwać w makrofagach od 48 do 96 godzin [91, 92].

Zidentyfikowano trzy przypuszczalne geny wirulencji *Cronobacter* spp.: *cpa* (aktywator plazminogenu), *sip* (białko wchodzące w interakcje siderforów, czyli nośników jonów żelaza) i *hly* (hemolizyna typu III) [16].

Infekcje wywołane przez *Cronobacter sakazakii* dotyczą określonych typów sekwencji (ST ang. Sequence Type – sekwencje nukleotydowe dla każdego z fragmentów genu są traktowane jako allele, tworząc profil alleliczny, czy typ sekwencji ST dla badanego szczepu) i złożonych kompleksów klonalnych. *C. sakazakii* ST12 powiązany jest z wywołaniem martwiczego zapalenia jelit u noworodków. *C. sakazakii* ST4 i CC4 skojarzono z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków, CC7 *C. malonaticus* z infekcjami dorosłych [17, 97]. Analiza typowania sekwencji multilocus (MLST – Multilocus sequence typing) bakterii *C. sakazakii* pochodzących z 7 krajów w 41 próbkach klinicznych wykazała obecność tego samego szczepu *C. sakazakii* ST4 w 20 próbkach zebranych w latach 1977–2008 pochodzących z 6 krajów (Holandia, Francja, USA, Nowa Zelandia, Republika Czeska i Kanada) [46]. Akineden i wsp. [2] donosi o wykryciu wysoce zjadliwego szczepu ST4, w dwóch próbkach mieszanki dla niemowląt w proszku.

5. Taksonomia *Cronobacter* spp.

Bakterie *Cronobacter* spp. są oksydazo ujemną, katalazo dodatnią, względnie beztlenową, Gram-ujemną, ruchliwą pałeczką. Redukują azotany, wykorzystują cytrynian, hydrolizują eskulinę i argininę oraz wytwarzają kwas z D-glukozy, D-sacharozy, D-rafinozy, D-melibiozy, D-celobiozy, D-mannitolu, D-mannozy, L-ramnozy, L-arabinozy, D-ksylozy, D-trehalozy, galakturonianu i D-maltozy. Bakterie rodzaju *Cronobacter* metabolizują substraty: 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- α -D-glukopiranozyd, 4-metylumbelliferylo- α -D-glukopiranozyd, 4-nitofenylo- α -D-glukopiranozyd, 4-nitofenylo- β -D-glukopiranozyd, 4-nitofenylo- α -D-galaktopiranozyd i 4-nitofenylo- β -D-galaktopiranozyd. Bakterie *Cronobacter* spp. dają pozytywny wynik w produkcji acetoiny (test Vogesa-Proskauera) i negatywny w przypadku testu czerwieni metylowej. Produkują siarkowodor i hydrolizują mocznik. Rodzaj *Cronobacter* obejmuje siedem gatunków: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimentii* [39].

Nazwa gatunkowa *C. malonaticus* odnosi się do wykorzystania przez bakterię *C. malonaticus* malonianu. *C. malonaticus* pierwotnie wyizolowany był z ropnia piersi i jest dostępny pod numerem LMG 23826^T w BCCM/ LMG Bacteria Collection w Ghent (Belgia) oraz jako DSMZ 18702^T w Instytucie Leibniza DSMZ w Braunschweig (Niemcy) [39].

Gatunek *C. muytjensii* nazwany jest na cześć holenderskiego mikrobiologa Harry'ego Muytjensa. *C. muytjensii* ATCC 51329^T zdeponowano w Mannassas (USA) oraz jako CIP 103581^T dostępny jest w Instytucie Pasteura w Paryżu (Francja) [39].

Nazwa gatunkowa *C. dublinensis* odnosi się do miasta Dublin, w którym został wyizolowany po raz pierwszy w zakładzie produkcji mleka w proszku i dostępny jest pod numerem LMG 23823^T w BCCM/ LMG Bacteria Collection w Ghent (Belgia) oraz pod numerem DSMZ 18705^T w Instytucie Leibniza DSMZ w Braunschweig (Niemcy) [39]. Bakteria z gatunku *C. turicensis* pierwotnie wyizolowana została ze śmiertelnego przypadku noworodkowego zapalenia opon mózgoworzeniowych w Zurychu w 2005 r. Szczep ten dostępny jest pod numerem LMG 23827^T BCCM/ LMG Bacteria Collection w Ghent (Belgia) oraz pod numerem DSMZ 18703^T w Instytucie Leibniza DSMZ w Braunschweig (Niemcy). Nazwa gatunkowa *C. turicensis* odnosi się do łacińskiej nazwy Zurychu-Turicum [39].

Początkowo *C. sakazakii* określano jako *Enterobacter cloacae*. W 1980 r. Farmer i wsp. przeklasyfikował *Enterobacter cloacae* jako nowy gatunek i nazwał na cześć japońskiego mikrobiologa Riichi Sakazakii – *Enterobacter sakazakii* [23]. Nazwę Rodzaju *Cronobacter* zaproponowano po analizie sekwencji genu 16S rRNA

różnych szczepów należących do gatunku *Enterobacter sakazakii* w wyniku której wyodrębniono sześć grup genomowych [85]. Gatunek *C. sakazakii* został wyodrębniony z gatunku *Enterobacter cloacae* w wyniku różnic w sekwencji DNA. DNA *C. sakazakii* jest w 53–54% homologiczne z DNA bakterii *Enterobacter* i *Citrobacter*. Na podstawie bliższego pokrewieństwa *C. sakazakii* do *E. cloacae*, (sekwencja genotypowa *C. sakazakii* jest w 51% identyczna z *E. cloacae* oraz w 41% z *Citrobacter freundii*) [38]. Pierwotny szczep *C. sakazakii* wyizolowano z gardła dziecka i dostępny jest pod numerem ATCC 29544^T w Mannassas w USA i pod numerem NCTC 11467^T w Londynie [38, 39].

Bakteria *C. sakazakii* jest jedynym gatunkiem *Cronobacter* spp., który posiada klaster genu *nanAKT*, kodujący wykorzystanie egzogenego kwasu sjałowego jako źródła węgla do wzrostu [47]. Grim i wsp. [26] stwierdzili, że szczepy *C. sakazakii* wykorzystują kwas sjałowy lub jego pochodną kwas N-acetyloneuraminowy, podczas gdy inne gatunki *Cronobacter* spp. nie wykorzystują tego kwasu. Stwierdzono również obecność dwóch regionów genomowych (GR127 i GR 129) u szczepu *C. sakazakii* BAA-894, które biorą udział w wykorzystywaniu kwasu sjałowego [26]. Kwas sjałowy występuje w mleku kobylicym, mieszankach mleko zastępczych, mleku modyfikowanym, muczynie wyścielającej jelita i jest składnikiem gangliozydów, które występują w komórce nerwowej i biorą udział w funkcjonowaniu tkanek nerwowych [47].

6. Występowanie *Cronobacter* spp. w żywności i środowisku szpitalnym

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. izolowano z preparatów mlekozastępczych wykorzystywanych w początkowym żywieniu niemowląt oraz z szerokiej gamy innych produktów spożywczych: warzyw, zbóż, płatków, ziemniaków, przypraw, mięsa, ryb, sera, tofu, ryżu, makaronu, czekolady, herbaty [8, 11, 24, 25, 33, 38, 56, 59, 85, 87]. W badaniu Berthold-Pluta i wsp. [8] wyizolowano 21 szczepów *Cronobacter* spp. (13 szczepów *C. sakazakii*, 4 szczepy *C. muytjensii*, 2 szczepy *C. turicensis*, 1 szczep *C. malonaticus* i 1 szczep *C. condimentii*) z warzyw liściastych i kielków. Li i wsp. [56] stwierdzili obecność *Cronobacter* spp. w produktach zbożowych i przyprawach. Lee i wsp. [54] wykazali, że *Cronobacter* spp. występuje także w zbożach i produktach zbożowych. Garbowska i wsp. [25] stwierdziły obecność *Cronobacter* spp. w ziołach (bazylija, oregano, pietruszka) oraz w mieszance przyprawowej (zioła prowansalskie). W badaniu Gurtler i wsp. [28] *Cronobacter* spp. stwierdzono w ryżu, owsie, mące, okruchach chleba. Obecność *Cronobacter* spp. w zbożach i produktach zbożowych może wynikać z obecności tej bak-

terii w środowisku naturalnym oraz z zanieczyszczeń zakładów produkcyjnych [56]. Bakterie *Cronobacter* spp. izolowano również z próbek pobranych z gospodarstw rolnych, zwierząt hodowlanych [63], a także ze środowiska: kurzu, wody, ścieków, gleby [33]. W Afryce Południowej wyizolowano *Cronobacter* spp. z 28 różnych prób żywności i środowiska, *C. sakazakii* stanowił 92,8% wyizolowanych szczepów [88].

Reich i wsp. w swojej pracy z roku 2010 [81] stwierdzili, że zanieczyszczenia mieszanek mlekozastępczych skorelowane były z zanieczyszczeniem środowiska produkcyjnego. Uwzględnia się dwie drogi zanieczyszczenia mieszanek mlekozastępczych: wewnętrzną i zewnętrzną. Wewnętrzna droga zanieczyszczenia dotyczy środowiska produkcyjnego. Podczas procesu produkcyjnego mleka modyfikowanego nieświadomie wykorzystuje się skażone surowce lub dochodzi do zanieczyszczenia krzyżowego. Zanieczyszczenie zewnętrzne spowodowane jest nieprawidłową higieną przygotowania mleka z mieszanek mlekozastępczych [2, 49]. Do nieprawidłowych praktyk higienicznych przygotowania mleka modyfikowanego należą: długie przechowywanie przygotowanej mieszanki, przechowywanie przygotowanej mieszanki w termosach oraz nieprawidłowy sposób mycia butelek i sprzętu służącego do przygotowania mleka. Alternatywą podgrzewania przygotowanej mieszanki w termosie jest możliwość podgrzewania samej wody służącej do przygotowania mleka. Mieszanek powinno dodawać się do wody bezpośrednio przed karmieniem. Pozostałości po karmieniu nie powinny być przechowywane, tylko natychmiast wylwane. Woda służąca do przygotowania mleka z mieszanki mlekozastępczej powinna mieć minimum 70°C [41].

Obecność *Cronobacter* spp. stwierdzono na powierzchniach, przedmiotach i sprzęcie medycznym w środowisku szpitalnym. Bakterie izolowano m.in. ze stetoskopu lekarskiego, szczotek używanych do mycia butelek oraz sprzętu używanego do przygotowania pokarmu dla niemowląt [33, 102].

7. Oporność *Cronobacter* spp. na warunki stresowe

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. mogą przeżyć w szerokim zakresie temperatur (od 5 do 44–47°C) oraz w produktach o niskiej aktywności wody [33], w temperaturze 4°C oraz przy aktywności wody od 0,30 do 0,83 może przetrwać nawet do 12 miesięcy [30].

Szczepy *Cronobacter* spp. w porównaniu z innymi bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* wykazują wysoką tolerancję na stres środowiskowy (niskie pH, i a_w , wysoką temperaturę, stres osmotyczny, wysychanie) [18, 57]. Optymalna temperatura wzrostu wynosi 37–39°C, za maksymalną temperaturę wzrostu przyjęto 44–47°C. Należy jednak zauważyć, że *C. sakaza-*

kii ATCC 29544^T nie wykazuje wzrostu w temperaturze powyżej 42°C [67] jednakże temperatura ta wg ISO/TS 22964 z 2006 roku była temperaturą inkubacji bakterii. W temperaturze pokojowej (21°C) czas podwojenia bakterii *Cronobacter* spp. w rekonstruowanej mieszance mlecznej wynosił 75 min., natomiast w temperaturze 10°C około 10 h co oznacza, że jest zdolny do powolnego wzrostu w temperaturach chłodniczych. Wartości $D_{52} = 54,8$ min. i $D_{60} = 2,5$ min. ekstrapolowane do temperatury 72°C wskazują na wysoką termotolerancję bakterii *Cronobacter* spp. (wartość $z = 5,82^\circ\text{C}$). Wyjaśnia to ich przeżywalność podczas procesu produkcji odwodnionych mieszanek mlekozastępczych [38].

Oporność na wysuszenie szczepów *Conobacter* spp. jest prawdopodobnie spowodowana nagromadzeniem trehalozy wewnątrz komórek. Trehaloza działa jako środek ochronny [43]. Barron i Forsythe [6] stwierdzili także, że pozakomórkowe polisacharydy chronią komórki bakterii przed wysuszeniem. *C. sakazakii* produkuje beta-karoten, który chroni komórki bakterii przed rodnikami tlenowymi [45]. Wszystkie szczepy *Cronobacter* spp. mają geny kodujące trimetyloglicynę i trehalozę [45]. Umożliwia to przetrwanie bakteriom w środowisku i w produktach o niskiej aktywności wody [43]. Dodatkowo zidentyfikowano geny operonu biosyntezy celulozy, operon biosyntetyczny otoczki, gen *curli GR55*, których ekspresja może zapewnić odporność bakterii na niską aktywność wody [26].

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. są odporne na niskie pH, dlatego może przetrwać w kwaśnym środowisku żołądka. Niemowlęta nie mają w pełni rozwiniętej kwasowości żołądka, co może tłumaczyć zwiększone ryzyko infekcji powodowanych przez *Cronobacter*. W pH 4,5 w czasie 24 godzin bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. są zdolne do wzrostu do poziomu około 10^9 jtk/ml. Obecność genu *sodA* prawdopodobnie zapewnia oporność bakterii *Cronobacter* spp. na wewnątrzkomórkową oksydazę makrofagową i warunki kwasowe [43, 57].

8. Tworzenie biofilmu przez bakterie z rodzaju *Cronobacter*

Bakterie *Cronobacter* spp. tworzą biofilm, który może stanowić fizyczną barierę przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Tym samym bakterie stają się odporne na brak wody, dezynfekcję, temperaturę i antybiotyki. Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. mają zdolność adhezji do szkła, stali nierdzewnej, silikonu, lateksu, poliwęglanu i plastiku. *C. sakazakii* wykazuje najsilniejszą adhezję do polichlorku winylu, następnie silikonu i stali nierdzewnej [27].

Noworodki urodzone przedwcześnie są często karmione za pomocą rurek nosowo-żołądkowych.

Wykazano, iż na rurkach istnieje znaczna ilość biofilmu, który składa się z grzybów i bakterii [34]. Szczep *Cronobacter* spp. i inne bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* wyizolowano z rurek nosowo-żołądkowych w ilości 10^7 jtk/cm [34]. Kinetyka wzrostu i tworzenia się biofilmu *C. sakazakii* na rurkach enteralnych, wykazała, że *C. sakazakii* może szybko przyłączyć się do powierzchni i namnażać się na materiale, z którego wykonana jest rurka już po 4 godzinach [34].

Komórki bakterii szybciej przyłączają się do materiałów hydrofobowych (teflon i tworzywa sztuczne), wolniej do powierzchni hydrofilowych (szkoło, metale) [43]. Temperatura i dostępność składników odżywczych wpływają na zdolność adhezji bakterii do powierzchni [27]. Bakterie w środowisku o ograniczonej zawartości substancji odżywczych, chętniej tworzą biofilm. Tworzenie biofilmu jest również procesem regulowanym na poziomie genetycznym [27, 51]. Wykazano, że gen *flhE* przyczynia się do tworzenia biofilmu przez bakterie *C. sakazakii* [100]. Gupta i wsp. [127] wykonali badanie przesiewowe genów odpowiedzialnych za powstawanie biofilmu (*mgt B*, *fli D*, *als S*, *flg J*, *cyo D*, *fts K*, *bcs C*, *flh E*). Wykazano, że geny *fli D*, *flg J* (biorące udział w syntezie rzęski) były obecne we wszystkich badanych szczepach *C. sakazakii* (27 szczepów). Gen *bcs C* (odpowiedzialny za syntezę celulozy) był nieobecny w sześciu izolatach *C. sakazakii*. Przypuszcza się, że białka PPlase, Flge, Dsbc są ważnymi czynnikami biorącymi udział w tworzeniu biofilmu. Białko PPlase bierze udział w fałdowaniu integralnych białek błony zewnętrznej (*Omp*) i patogenności. Białko FlgE jest niezbędne do kolonizacji i rozwoju biofilmu, natomiast białko DsbC, pod wpływem stresu oksydacyjnego, wykazuje aktywność izomerazy dwusiarczkowej, która odgrywa istotną rolę w procesie fałdowania białka. Uważa się również, że białka ESA_00281 i ESA00_00282 przyczyniają się do tworzenia biofilmu [43, 100].

9. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Cronobacter* spp.

Na podstawie Rozporządzenia Komisji UE (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 z późniejszymi zmianami, *Cronobacter* spp. powinien być nieobecny w trzydziestu 10 g próbkach preparatów w proszku do początkowego żywienia niemowląt i żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego, przeznaczonego dla niemowląt w wieku do 6 miesięcy.

W 2017 roku wprowadzono normę EN ISO 22964:2017 – Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania *Cronobacter* spp., która zastępuje ISO/TS 22964:2006. Zmodyfikowany bulion laurylosiarczanowy (mLST) zastąpiono CSB (*Cronobacter* Selective Broth), a agar ESIA (*Enterobacter*

sakazakii Isolation Agar) zastąpiono CCI (*Chromogenic Cronobacter* Isolation Agar). Temperatura inkubacji powinna wynosić $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$. Bulion CSB nie zawiera laurylosiarczanu sodu, co może pozytywnie wpływać na odzysk wrażliwych szczepów *Cronobacter*. Agar CCI zawiera tiosiarczan sodu i cytrynian żelaza (III) amonu, w celu różnicowania *Cronobacter* spp. od innych *Enterobacteriaceae*. Dodatkowo agar CCI nie zawiera fioletu krystalicznego, natomiast ilość deoksycholenu sodu została zmniejszona. W normie EN ISO 22964:2017 zmieniono także metodę potwierdzania uzyskanych izolatów bakterii. Wytwarzanie na agarze TSA (*Tryptone Soy Agar*) żółtego, nie dyfundującego do podłoża barwnika, zastąpiono testami biochemicznymi, ponieważ produkcja żółtego barwnika nie jest niezawodnym kryterium identyfikacji. Iversen i wsp. (2007) wykazali że 8% szczepów *Cronobacter* spp. nie produkowało barwnika, natomiast produkowało go 34% innych przedstawicieli rodzaju *Enterobacteriaceae* [7, 35, 36].

Wprowadzony w 2017 roku standard EN ISO 22964 wymienia 7 biochemicznych testów do potwierdzania wyników uzyskanych metodą hodowlaną. Sześć z tych testów zawiera zestaw ID 32E dlatego tradycyjne testy biochemiczne mogą zostać zastąpione gotowym zestawem. Jednak dostępne komercyjne zestawy testów biochemicznych ID32E i API 20E nie pozwalają na wiarygodną identyfikację izolatów *Cronobacter* na poziomie rodzaju. Poleganie na tej metodzie dostarcza fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wyników. Około 80% szczepów *Cronobacter* zostało poprawnie zidentyfikowanych na poziomie rodzaju z wykorzystaniem bieżących wersji baz danych ID 32E i API 20E odpowiednio v. 4.0 i v. 5.0. Identyfikacja na poziomie gatunku z wykorzystaniem zestawu ID 32E dała poprawne wyniki w 50%. W przypadku kart Vitek GN wszystkie gatunki *Cronobacter* zostały zidentyfikowane jako *C. sakazakii*, do grupy tej zaliczono także przedstawicieli *Franconibacter* [42, 97].

Technika typowania molekularnego MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) początkowo wykorzystywana była do rozróżniania dwóch blisko spokrewnionych genetycznie *C. sakazakii* i *C. malonicus*. Obecnie schemat MLST *Cronobacter* wykorzystuje sekwencję 7 alleli metabolizmu podstawowego: *atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB*, *infB* i *ppsA* dając połączoną sekwencję 3036 pz do analizy filogenetycznej i genomiki porównawczej. Schemat MLST dla *Cronobacter* został opracowany przez Adama Baldwin'a we współpracy ze Stephanem Forsythe, opublikowany w 2009 roku [3]. Pod adresem <http://www.pubMLST.org/cronobacter>) dostępna jest bezpłatna baza MLST zawierająca >2400 szczepów i 350 genomów. Dzięki temu rozwiązaniu rozpoznano kompleksy klonalne (CC) rodzaju *Cronobacter* spp. co umożliwia prawidłową identyfikację *Cronobacter* spp., a tym samym zmniejsza możliwość uzyskania

wyników fałszywie ujemnych. Ponadto MLST została również wykorzystana do formalnego uznania dwóch nowych gatunków *C. universalis* i *C. condimenti* oraz ujawniła silny związek pomiędzy sekwencją typu 4 (ST4) i przypadkami noworodkowego zapalenia opon mózgowych [69, 72]

Techniki identyfikacji oparte o DNA bakterii są uznane za bardziej niezawodne niż techniki oparte o cechy fenotypowe [43, 97]. W ciągu ostatnich kilku lat opracowano różne protokoły reakcji PCR i RT-PCR do identyfikacji bakterii *Cronobacter* spp. [96]. Wygenerowano kilka starterów PCR do identyfikacji bakterii rodzaju *Cronobacter* przez amplifikację specyficznych sekwencji i konserwatywnych regionów 16S rRNA bakterii [29, 55]. Jednak identyfikacja *Cronobacter* spp. z wykorzystaniem genu 16S rRNA jest problematyczna, ponieważ jest on obecny w wielu kopiach, w obrębie jednego genomu, cechujących się mikroheterogennością [3, 41]. Blisko spokrewnione, mające znaczenie kliniczne, gatunki *C. sakazakii* i *C. malonaticus* są nierozróżnialne w oparciu o sekwencje 16S rRNA [37]. Chociaż nie ma prawnego obowiązku identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Cronobacter* spp. [82] to wciąż poszukiwana jest metoda i sekwencja pozwalająca na taką identyfikację. Zróżnicowanie gatunkowe ma kluczowe znaczenie w badaniach epidemiologicznych, ocenie wrażliwości na antybiotyki i środki dezynfekujące. Ponadto producenci mieszanek mlekozastępczych ponoszą koszty związane z odrzuceniem partii produkcyjnej w wyniku fałszywie-dodatniej identyfikacji lub uwolnienia partii jako fałszywie bezpiecznej, co naraża noworodki na infekcję i jej skutki [42]. Sekwencje genów wykorzystywane dotychczas w identyfikacji gatunków *Cronobacter* spp. to: *cycA*, *gyrB*, *ompA*, *rpoB*, *gluA*, *fusA*, *dnaG*, *zpx*, 16S rRNA oraz geny odpowiedzialne za pozyskanie żelaza. Połączenie metod hodowlanych z metodami amplifikacji fragmentów genów pozwalających na wykrycie różnic tak małych jak pojedyncza para zasad wykorzystano do identyfikacji na poziomie gatunku. Vlach i wsp. [95] opracowali protokół PCR-RFLP do różnicowania siedmiu gatunków *Cronobacter* (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimenti*). Protokół ten oparty jest na genie *rpoB* i zastosowaniu trzech endonukleaz restrykcyjnych (*Csp 6I*, *Hin P1I*, *Mbo I*). PCR-RFLP jest prostą, powtarzalną i szybką metodą, którą można wykorzystać do identyfikacji gatunków *Cronobacter* [95].

Do identyfikacji bakterii *Cronobacter* spp. można wykorzystać również system spektrofotometrii masowej (MS – Mass Spektrometry) MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), którego zasada polega na identyfikacji widm masowych komórek i składników komórkowych [52, 53]. Metoda wykorzystywana jest do identyfi-

kacji drobnoustrojów i analizy pokrewieństwa izolatów tego samego gatunku. W przypadku zastosowania systemu MALDI TOF MS do identyfikacji izolatów *Cronobacter* spp. najważniejszym czynnikiem gwarantującym wiarygodność i dokładność wyników identyfikacji na poziomie gatunkowym jest referencyjna baza danych zawierająca spektra profili białkowych szczepów *C. sakazakii* [97].

10. Antybiotykooporność *Cronobacter* spp.

Przed 1985 r. zakażenia powodowane przez *Cronobacter* leczono chloramfenikolem, gentamycyną i/lub ampicyliną [43]. W 1988 roku Willis i Robinson zaproponowali łączenie ampicyliny i gentamycyny w leczeniu zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, wywołanego przez *Cronobacter*. Li i wsp. [56] wykazali, że wyizolowane szczepy *Cronobacter* spp. były wrażliwe na gentamycynę, tetracyklinę, trimetoprim i kwas nalidyksowy. Jeden z 13 wyizolowanych szczepów był oporny na ampicylinę [56].

W badaniu Berthold-Pluta i wsp. [8] wykazano, że 21 wyizolowanych z warzyw liściastych i kielków szczepów *Cronobacter* spp. było wrażliwych na ampicylinę, cefepim, chloramfenikol, gentamycynę, streptomycynę, tetracyklinę, cyprofloksacynę i cotrimoksazol.

Dwa szczepy *Cronobacter* spp. badane przez Shadli-Matung i wsp. [83] były odporne na penicylinę i cefalosporynę, a wrażliwe na gentamycynę, tetracyklinę i streptomycynę. W badaniu Oonaka i wsp. [70] dziewięć spośród 36 wyizolowanych szczepów było wrażliwych na cefalosporyny.

Nazarowiec – White i Farber [67] wykazali, że dwa z osiemnastu zbadanych szczepów było opornych na chloramfenikol i tetracykliny. Podobne wyniki uzyskali Lee i wsp. [54] przedstawili badanie, gdzie dwa spośród 66 szczepów *Cronobacter* spp. wyizolowanych z żywności na terenie Korei były odporne na chloramfenikol a siedem na streptomycynę.

Kim i wsp. [48] wykazali, że dwa szczepy *Cronobacter* spp. wyizolowane od niemowląt poniżej pierwszego roku życia były wrażliwe na kanamycynę, kwas nalidyksowy, gentamycynę, chloramfenikol, tetracyklinę i cyprofloksacynę oraz odporne na ampicylinę i cefalotyne.

El-Sharoud i wsp [19] badali oporność na antybiotyki 16 izolatów *Cronobacter* spp. z mleka w proszku. Wszystkie izolaty wrażliwe były na streptomycynę, ampicylinę i gentamycynę. Dwa izolaty odporne były na neomycynę, a jeden na neomycynę i trimetoprim. Xu i wsp. [99] badając 71 szczepów wyizolowanych z żywności typu ready-to-eat na terenie południowo-wschodnich Chin, wykazali, że wszystkie szczepy *Cronobacter* spp. wrażliwe były na tetracyklinę, kwas nalidyksowy, cyprofloksacynę i cefatoksym. Oporność na

penicylinę stwierdzono u 84% a na cefalotynę u 46,5% badanych szczepów.

Antybiotyki β -laktamowe (penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, monobaktamy) są największą grupą antybiotyków, używaną do leczenia większości rodzajów zakażeń. Oporność bakterii na β -laktamy jest warunkowana różnorodnymi mechanizmami. Jednym z nich jest wytwarzanie β -laktamaz (enzymów hydrolizujących cząsteczki β -laktamów) [68].

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. mogą wytwarzać enzym β -laktamazę. Pitout i wsp. [75] wykazali, że niektóre szczepy *Cronobacter* produkują β -laktamazę, ale na niskim poziomie. Caubilla-Barron i wsp. [13] zidentyfikowali dwa izolaty, które produkowały β -laktamazę o rozszerzonym spektrum działania. Zhou i wsp. [102] opisali jeden izolat *Cronobacter* otrzymany z mieszanek mlekozastępczych, który wytwarzał β -laktamazę o rozszerzonym spektrum działania.

Prowadzone są badania nad mechanizmem antybiotykoodporności *Cronobacter* spp. W wyniku nadużywania antybiotyków istnieje potencjał uzyskania wysokiej oporności na antybiotyki przez różne szczepy bakterii [49].

11. Podsumowanie

Bakterie *Cronobacter* powszechnie występują w środowisku naturalnym i mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. Najbardziej narażone na zakażenia wywołane przez bakterie *Cronobacter* spp. są noworodki poniżej 28 dnia życia, noworodki urodzone przedwcześnie, niemowlęta o niskiej masie urodzeniowej (poniżej 2,5 kg) i niemowlęta z upośledzeniem odporności. Choć zakażenia wywołane przez *Cronobacter* spp. występują rzadko to współczynnik śmiertelności zakażonych pacjentów wynosi 40–80% przypadków. Oszacowane koszty leczenia pojedynczej infekcji wywołanej przez *C. sakazakii* oraz koszty długoterminowego leczenia powikłań po infekcji przekroczyły 5 milionów dolarów [62]. Szczep *C. sakazakii* wśród 7 gatunków bakterii zaliczanych do tego rodzaju jest uznawany za najbardziej oportunistyczny patogen odpowiedzialny za bakteremię, zapalenie opon mózgowych i martwicze zapalenie jelit. Dzięki produkcji otoczek i biofilmu, wysokiej termotoleracyjności jest odporny na wysuszenie i wykazuje przeżywalność w mieszkankach mlekozastępczych i innych produktach o niskiej aktywności wody. Po wnikięciu do organizmu może atakować komórki nabłonkowe jelit, a nawet komórki śródbłonki mikronaczyniowego mózgu wykazując potencjał do wywoływania zapalenia opon mózgowych. Dlatego kontrola oraz regulacje prawne w przypadku *C. sakazakii* są niezbędne [51]. W ramach zarządzania ryzykiem mikrobiologicznym związanym z występowaniem bakterii *Cronobacter* spp. w mieszkankach mlekozastępczych (PIF i FUF) odbyły się trzy spotkania grupy ekspertów FAO-WHO wspierane przez Komisję Kodeksu Żywnościowego, w wyniku których opracowano model oceny ryzyka, który dostarczył informacji o ryzyku oraz porad i wytycznych zmniejszających ryzyko zakażenia niemowląt w wyniku konsumpcji mleka modyfikowanego w proszku [20, 21, 22]. Wypracowane w 2006 roku na spotkaniach technicznych FAO-WHO rozwiązania zostały sfinalizowane w przyjętym na 31 sesji Komisji Kodeksu Żywnościowego (04.06–04.07.2008) Kodeksie Praktyk Higienicznych dla Preparatów w Proszku dla Niemowląt i Małych Dzieci (CAC 2008a). W roku 2005 na mocy Rozporządzenia Komisji (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych wprowadzono kryteria dotyczące bezpieczeństwa mikrobiologicznego preparatów w proszku dla niemowląt i żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego przeznaczona dla niemowląt w wieku do 6 miesięcy. Bakterie należące do rodzaju *Cronobacter* muszą być nieobecne w 30 dziesięcio-gramowych próbkach mieszanki mlekozastępczej. Analiza wykonywana jest metodą hodowlaną z potwierdzeniem biochemicznym według zmodyfikowanego protokołu opisanego w standardzie EN ISO 22964:2017 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania *Cronobacter* spp. Mimo to w dalszym ciągu obserwuje się przypadki zakażeń, co może być spowodowane nieskuteczną diagnostyką. Tradycyjne hodowlane metody mikrobiologiczne są czasochłonne i obarczone błędem. Metody biochemiczne dostarczają fałszywie ujemnych lub fałszywie dodatnich wyników w przeciwieństwie do analiz PCR, których wyniki są bardziej niezawodne, jednak są droższe i pracochłonne przez co nie są wykonywane przez producentów mieszanek mlekozastępczych. Do bardziej wiarygodnych i skutecznych metod zaliczana jest metoda MALDI TOF i PCR-RFLP. Najskuteczniejszym narzędziem wykrywania *Cronobacter* spp. jest kombinacja stosowanych metod, w celu uzyskania wiarygodnych i powtarzalnych wyników. FDA Bacteriological Analytical Manual włącza PCR jako metodę skринingową, jednak wyniki należy potwierdzić metodą hodowlaną. Jako metodę biochemicznej identyfikacji zalecane jest użycie ID32E lub Vitek 2 GN.

Piśmiennictwo

1. Aguirre-Conde A., Pérez-Legorburu A., Echániz-Urcelay I., Hernando-Zaráte Z., Arrate-Zugabeitia J.K.: Sepsis neonatal por. *Enterobacter sakazakii*. *An. Pediatr. (Barc)*. **66**, 196–197 (2007)
2. Akineden O., Heinrich V., Grossb M., Usleber E.: Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food. *Food Microbiol.* **65**, 44–50 (2017)
3. Baldwin A., Loughlin M., Caubilla-Barron J., Kucerova E., Manning G., Dowson C., Forsythe S.: Multilocus sequence typing

- of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. *BMC Microbiol.* **9**, 1–9 (2009)
4. Bar-Oz B., Preminger A., Peleg O., Block C., Arad I.: *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta. Paediatr.* **90**, 356–358 (2001)
 5. Barreira E.R., Costa de Souza D., de Freitas Góis P., Fernandes J.C.: Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. *Pediatria (São Paulo)*, **25**, 65–70 (2003)
 6. Barron J.C., Forsythe S.J.: Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* **70**, 2111–2117 (2007)
 7. Benito de A., Bessebe N.G., Desforges I., Gertend B., Ruiz B., Tomáse D.: Validation of standard method EN ISO 22964: 2017 – Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. *Int. J. Food Microbiol.* **288**, 47–52 (2019)
 8. Berthold-Pluta A., Garbowska M., Stefańska I., Pluta A.: Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol.* **65**, 221–230 (2017)
 9. Biering G., Karlsson S., Clark N.C., Jónsdóttir K.E., Ludvigsson P., Steingrímsson O.: Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2054–2056 (1989)
 10. Block C., Peleg O., Minster N., Bar-Oz B., Simhon A., Arad I., Shapiro M.: Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**, 613–616 (2002)
 11. Bowen A., Wiesenfeld H.C., Kloesz J.L., Pasculle A.W., Nowalk A.J., Brink L., Elliot E., Martin H., Tarr C.L.: Notes from the Field: *Cronobacter sakazakii* infection associated with feeding extrinsically contaminated expressed human milk to a premature infant-Pennsylvania, 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **66**, 761–762 (2017)
 12. Burdette J. H., Santos C.: *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging. *Pediatr. Radiol.* **30**, 33–34 (2000)
 13. Caubilla-Barron J., Hurrell E., Townsend S., Cheetham P., Loc-Carrillo C., Fayet O., Pre're M.F., Forsythe S.J.: Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3979–3985 (2007)
 14. Chaves C.E.V., Brandão M.L.L., Lacerda M.L.G.G., Rocha C.A.B.C., Leone de Oliveira S.M.D.V., Parpinelli T.C., Vasconcelos L., Forsythe S.J., Paniago A.M.M.: Fatal *Cronobacter sakazakii* sequence type 494 meningitis in a newborn, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 1948–1950 (2018)
 15. Coignard B., Desenclos J.C. i wsp.: Infections sévères à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé une préparation en poudre pour nourissons, France, octobre-décembre 2004. *Bull. Epidemiol. Hebd.* **2**, 10–13 (2006)
 16. Cruz A., Xicohtencatl-Cortes J., Gonzalez-Pedrajo B., Bobadilla M., Eslava C., Rosas I.: Virulence traits in *Cronobacter* species isolated from different sources. *Can J. Microbiol.* **57**, 735–744 (2011)
 17. Cui J.H., Yu B., Xiang Y., Zhang Z., Zhang T., Zeng Y.C., Cui Z.G., Huo X.X.: Two cases of multi-antibiotic resistant *Cronobacter* spp. infections of infants in China. *Biomed. Environ. Sci.* **30**, 601–605 (2017)
 18. Dancer G.I., Mah J.H., Rhee M.S., Hwang I.G., Kang D.H.: Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1606–1614 (2009)
 19. El-Sharoud W.M., O'Brien S., Negredo C., Iversen C., Fanning S., Healy B.: Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products, *BMC Microbiol.* **9**, 1–9 (2009)
 20. FAO-WHO Food Agricultural Organization-World Health Organization: *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula, Meeting Report Microbiological Risk Assessment 6, Geneva, Switzerland (2004) <http://www.who.int/foodsafety/publications/mra6-enterobacter-sakazakii/en/> (03.12.2019)
 21. FAO-WHO Food Agricultural Organization-World Health Organization: *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula, Meeting Report Microbiological Risk Assessment 10, Geneva, Switzerland (2006) <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/index.html> (03.12.2019)
 22. FAO-WHO Food Agricultural Organization-World Health Organization: *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula, Meeting Report Microbiological Risk Assessment 15, Geneva, Switzerland (2008) http://www.who.int/foodsafety/publications/mra_followup/en/ (03.12.2019)
 23. Farmer J., Asbury M., Hickman F., Brenner D.: *Enterobacter sakazakii*, new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **86**, 221–225 (1980)
 24. Friedemann M.: Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 1297–1304 (2009)
 25. Garbowska M., Berthold-Pluta A., Stasiak-Różańska L.: Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol.* **49**, 1–5 (2015)
 26. Grim C.J., Tall B.D. i wsp.: Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation. *BMC Genomics*, **14**, 1–16 (2013)
 27. Gupta T.B., Mowat E., Brightwell G., Flint S.H.: Biofilm formation and genetic characterization of New Zealand *Cronobacter* isolates. *J. Food Safety.* 1–13 (2017)
 28. Gurtler J.B., Kornacki J.L., Beuchat L.R.: *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.* **104**, 1–34 (2005)
 29. Hassan A., Akineden A., Kress C., Estuningsih S., Schneider E., Usleber E.: Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species specific PCR method. *Int. J. Food Microbiol.* **116**, 214–220 (2007)
 30. Henry M., Fouladkhan A.: Outbreak history, biofilm formation and preventive measures for control of *Cronobacter sakazakii* in infant formula and infant care settings. *Microorganisms*, **7**, 1–22 (2019)
 31. Himelright I., Jernigan D. i wsp.: *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2001. *J. Am. Med. Assoc.* **287**, 2204–2205 (2002)
 32. Holý O., Forsythe S.: *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *J. Hosp. Infect.* **86**, 169–177 (2014)
 33. Hu L., Grim C.J., Franco A.A., Jarvis K.G., Sathyamoorthy V., Kothary M.H., Tall B.D.: Analysis of the cellulose synthase operon genes, *bcsA*, *bcsB*, and *bcsC* in *Cronobacter* species: Prevalence among species and their roles in biofilm formation and cell-cell aggregation. *Food Microbiol.* **52**, 97–105 (2015)
 34. Hurrell E., Kucerova, E., Loughlin M., Caubilla-Barron J., Forsythe, S.J.: Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella serovars* and other *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Food Microbiol.* **136**, 227–231 (2009)

35. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. <https://www.iso.org/standard/64708.html> (04.11.2019)
36. ISO/TS 22964:2006 (IDF/RM 210: 2006) Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*, <https://www.iso.org/standard/41258.html> (04.11.2019)
37. Iversen C., Druggan P., Schumacher S., Lehner A., Feer C., Gschwend K., Joosten H., Stephan R.: Development of a Novel Screening Method for the Isolation of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Appl. Environ. Microb.* **74**, 2550–2553 (2008)
38. Iversen C., Forsythe S.: Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Tech.* **14**, 443–454 (2003)
39. Iversen C., Lehner A., Mullane N., Bidlas E., Cleenwerck I., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: 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. *BMC Evol. Biol.* **7**, 1–11 (2007)
40. Iversen C., Lehner A., Mullane N., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J. Clin. Microbiol.* **45**, 11, (2007)
41. Jackson E.E., Flores J.P., Fernández-Escartín E., Forsythe S.J.: Reevaluation of a suspected *Cronobacter sakazakii* outbreak in Mexico. *J. Food Protect.* **78**, 1191–1196 (2015)
42. Jackson E.E., Forsythe S.J., Comparative study of *Cronobacter* identification according the phenotyping methods. *BMC Microbiol.* **16**, 146, (2016)
43. Jaradat Z.W., Mousa W.A., Elbetieha A., Nabulsi Al. A., Tall B.D.: *Cronobacter* spp. – opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. *J. Med. Microbiol.* **63**, 1023–1037 (2014)
44. Jarvis C.: Fatal *Enterobacter sakazakii* infection associated with powdered infant formula in a neonatal intensive care unit in New Zealand. *Am. J. Infect. Control.* **33**, 19– 54 (2005)
45. Joseph S., Forsythe S.J. i wsp.: Comparative analysis of genome sequences covering the seven *Cronobacter* species. *Plos ONE*, **7**, 1–13 (2012)
46. Joseph S., Forsythe S.J.: Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1713–1715 (2011)
47. Joseph S., Hariri S., Masood N., Forsythe S.J.: Sialic acid utilization by *Cronobacter sakazakii*. *Microb. Inform. Exp.* **3**, 1–11 (2013)
48. Kim J.B., Cho S.H., Park Y.B., Lee J.B., Kim J.C., Lee B.K., Lee H.K., Chae H.S.: Surveillance of stool samples for the presence of *Enterobacter sakazakii* among Korean people. *Yonsei Med. J.* **49**, 1017–1022 (2008)
49. Kim K., Jang S.S., Kim S.K., Park J.H., Heu S., Ryu S.: Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. *Int. J. Food Microbiol.* **122**, 196–203 (2008)
50. Kim K., Kim K.P., Choi J., Lim J.A., Lee J., Hwang S., Ryu S.: Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5188–5198 (2010)
51. Kim S., Kim Y.T., Yoon H., Lee J.H., Ryu S.: The complete genome sequence of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 T, a goodborne pathogen, isolated from a child’s throat. *Gut Pathog.* **9**, 1–7 (2017)
52. Kosikowska U., Stępień-Pyśniak D., Pietras-Ożga D., Andrzejczuk S., Juda M., Malm A.: Zastosowanie spektrofotometrii masowej MALDI-TOF MS w identyfikacji bakterii izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi i zwierząt. *Diagn. Lab.* **51**, 23–30 (2015)
53. Lai K.K.: *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults a case reports and a review of the literature. *Medicine*, **80**, 113–122 (2001)
54. Lee Y.D., Park J.H., Chang H.: Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. *Food Control.* **24**, 225–230 (2012)
55. Lehner A., Tasara T., Stephan R.: 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiol.* **4**, 1–7 (2004)
56. Li Y., Chen Q., Zhao J., Jiang H., Lu F., Bie X., Lu Z.: Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. *Food Control.* **37**, 109–114 (2014)
57. Ling N., Zhang J., Li C., Zeng H., He W., Ye Y., Wu Q.: The Glutaredoxin Gene, *grxB*, Affects acid tolerance, Surface hydrophobicity, auto-aggregation and biofilm formation in *Cronobacter sakazakii*. *Front. Microbiol.* **9**, 1–12 (2018)
58. Liu Q., Mittal R., Emami C.N., Iversen C., Ford H.R., Prasadarao N.V.: Human isolates of *Cronobacter sakazakii* bind efficiently to intestinal epithelial cells in vitro to induce monolayer permeability and apoptosis. *J. Surg. Res.* **176**, 437–447 (2012)
59. Maćkiw E., Rzewuska K., Tomczuk K., Izak D., Stoś K.: Występowanie *Cronobacter* sp. w wybranych produktach spożywczych. *Żywn. Nauk. Technol. Jakość.* **4**, 172–178 (2011)
60. Mange J.P., Stephan R., Borel N., Wild P., Kim K.S., Pospischil A., Lehner A.: Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. *BMC Microbiol.* **6**, 1–10 (2006)
61. McMullan R., Menon V., Beukers A.G., Jensen S.O., van Hal S.J., Davis R.: *Cronobacter sakazakii* infection from expressed breast milk, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 393–394 (2018)
62. Minor T., Lasher A., Brown B., Nordinelli Z., Zorn D.: The per case and total annual costs of foodborne illness in the United States. *Risk Anal.* **35**, 1125–1139 (2015)
63. Molloy C., Cagney C., O’Brien S., Iversen C., Fanning S., Duffy G.: Surveillance and characterisation by pulsed-field gel electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. *Int. J. Food Microbiol.* **136**, 198–203 (2009)
64. Monroe P.W., Tift W.L.: Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow, pigmented *Enterobacter cloacae*). *J. Clin. Microbiol.* **10**, 850–851 (1979)
65. Muytjens H.L., Zanen H.C., Sonderkamp H.J., Kollée L.A., Wachsmuth I.K., Farmer J.J.: Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 115–120 (1983)
66. Nair M.K.M., Venkitanarayanan K.S.: 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. Microbiol.* **72**, 2539–2546 (2006)
67. Nazarowec-White M., Farber J.M.: Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Food Protect.* **60**, 226–230 (1999)
68. Nikonorow E., Baraniak A., Gniadkowski M.: Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β-laktamowe wynikająca z wytwarzania β-laktamaz. *Post. Mikrobiol.* **3**, 261–271 (2013)
69. Ogrodzki P., Forsythe S.J.: DNA-sequence based typing of the *Cronobacter* genus using MLST, CRISPR-cas array and capsular profiling. *Front. Microbiol.* **8**, 1–15 (2017)

70. Oonaka K., Furuhashi K., Hara M., Fukuyama M.: Powder infant formula milk contaminated with *Enterobacter sakazakii*. *J. Infect. Dis.* **63**, 103–107 (2010)
71. Pagotto F.J., Nazarowec-White M., Bidawid S., Farber J.M.: *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. *J. Food. Prot.* **66**, 370–375 (2003)
72. Parra-Flores J., Cerda-Leal F., Contreras A., Valenzuela-Riffo N., Alejandra Rodriguez A., Aguirre J.: *Cronobacter sakazakii* and microbiological parameters in dairy formulas associated with a food alert in Chile. *Front. Microbiol.* **9**, 1–9 (2018)
73. Pavcnik-Arnol M., Hojker S., Derganc M.: Lipopolysaccharide – binding protein, lipopolysaccharide, and soluble CD14 in sepsis of critically ill neonates and children. *Intens. Care. Med.* **33**, 1025–1032 (2007)
74. Pei X., Li Y., Zhang H., Zhan L., Yu X., Lan G., Jia H., Li N., Yang D., Mei L.: Surveillance and characterization of *Cronobacter* in powdered infant formula processing factories. *Food Control.* **96**, 318–323 (2019)
75. Pitout J.D., Moland E.S., Sanders C.C., Thomson K.S., Fitzsimmons S.R.: Beta-lactamases and detection of betalactam resistance in *Enterobacter* spp. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **41**, 35–39 (1997)
76. Raghav M., Aggarwal P.K.: Purification and characterization of *Enterobacter sakazakii* enterotoxin. *Can. J. Microbiol.* **53**, 750–755 (2007)
77. RASFF Alert notification 2002/190: *Enterobacter sakazakii* in infant formula from Germany(2002), https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2002.190 (02.06.2019)
78. RASFF Alert notification 2004/658: *Enterobacter sakazakii* in infant formula (2004) https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2004.658 (02.06.2019)
79. RASFF Alert notification 2007/452: *Enterobacter sakazakii* (present/10 g) in infant formula from Switzerland via Germany (2007) https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2007.452 (02.06.2019)
80. Ray P., Das A., Gautam V., Jain N., Narang A., Sharma M.: *Enterobacter sakazakii* in infants: novel phenomenon in India. *Indian J. Med. Microbiol.* **25**, 408–410 (2007)
81. Reich F., König R., Wiese W., Klein G.: Prevalence of *Cronobacter* spp. in a powdered infant formula processing environment. *Int. J. Food Microbiol.* **140**, 214–217 (2010)
82. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych, <https://eurlex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20111201&from=EN> (04.09.2019)
83. Shadliya-Matung M., Aidoo K.E., Candlish A.A., Elgebri A.M.: Evaluation of some antibiotics against pathogenic bacteria isolated from infant foods in North Africa. *Open Food Sci. J.* **2**, 95–101 (2008)
84. Simmons B.P., Gelfand M.S., Haas M., Metts L., Ferguson J.: *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **10**, 398–401 (1989)
85. Sosnowski M., Czubkowska A., Korpysa-Dzirba W., Ostrowska M., Rola J., Osek J.: *Cronobacter sakazakii* – charakterystyka i znaczenie w mikrobiologii żywności. *Med. Weter.* **70**, 669–672 (2010)
86. Stoll B.J., Hansen N., Fanaroff A.A., Lemons J.A.: *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *J. Pediatr.* **144**, 821–823 (2004)
87. Stasiak-Różańska L., Garbowska M., Bertold A., Molska I., Ciepielewska-Janaj J.: Jakość mikrobiologiczna preparatów do żywienia niemowląt i małych dzieci ze szczególnym uwzględnieniem *Enterobacteriaceae* i *E. sakazakii*. *Med. Weter.* **66**, 622–625 (2010)
88. Strydom A., Cameron M., Witthuhn R.C.: PCR-RFLP analysis of the *rpoB* gene to distinguish the five species of *Cronobacter*. *Food Microbiol.* **28**, 1472–1477 (2011)
89. Suijkerbuijk A.W.M. Gesignaleerd. *Infectieziekten Bulletin*, **16**, 1–3 (2005)
90. Sundararajan M., Cope J. i wsp.: Notes from the Field: *Cronobacter sakazakii* meningitis in a full-term neonate fed exclusively with breast milk — Indiana, 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **67**, 1248–1249 (2018)
91. Townsend S.M., Hurrell E., Gonzalez-Gomez I., Lowe J., Frye J.G., Forsythe S., Badger J.L.: *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. *Microbiology*, **153**, 3538–3547 (2007)
92. Townsend S., Hurrell E., Forsythe S.: Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. *BMC Microbiol.* **8**, 1–9 (2008)
93. Urmenyi A.M., Franklin A.W.: Neonatal death from pigmented coli form infection. *Lancet*, **12**, 313–315 (1961)
94. van Acker J., de Smet F., Muyllderms G., Bougateg A., Naesens A., Lauwers S.: Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 293–297 (2001)
95. Vlach J., Javůrková B., Karamonová L., Blažková M., Fukal L.: Novel PCR-RFLP system based on *rpoB* gene for differentiation of *Cronobacter* species. *Food Microbiol.* **62**, 1–8 (2017)
96. Wang L., Hu X., Tao G., Wang X.: Outer membrane defect and stronger biofilm formation caused by inactivation of a gene encoding for heptosyltransferase I in *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894. *J. App. Microbiol.* **112**, 985–997 (2012)
97. Wang Q., Forsythe S.J., Zhao X.J., Wang Z.W., Li D., Ma D., Cao J.Y., Zeng J.: Species identification and molecular characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food imported over nine years into Beijing, China. *Food Microbiol.* **82**, 11–19 (2019)
98. Willis J., Robinson, J.E.: *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**, 196–199 (1988)
99. Xu X, Li C., Wu Q., Zhang J., Huang J., Yang G.: Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods. *Int. J. Food Microbiol.* **204**, 17–23 (2015)
100. Ye Y., Jiao R., Gao J., Li H., Ling N., Wu Q., Zhang J., Xu X.: Proteins involved in responses to biofilm and planktonic modes in *Cronobacter sakazakii*. *LWT – Food Sci. Technol.* **65**, 1093–1099 (2016)
101. Zeng H., Wu Q. i wsp.: Novel multidrug-resistant *Cronobacter sakazakii* causing meningitis in neonate, China, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 2121–2124 (2018)
102. Zhou X., Gao J., Huang Y., Fu S., Chen H.: Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. *Afr. J. Microbiol. Res.* **5**, 3073–3077 (2011)