

NEBEZPEČNÝ PATOGEN *Enterobacter sakazakii* A JEHO DETEKCE

MARTINA BLAŽKOVÁ, LADISLAV FUKAL
a PAVEL RAUCH

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Došlo 3.8.09, přijato 15.10.09.

Klíčová slova: *Enterobacter sakazakii*, dětská výživa, polymerázová řetězová reakce, chromogenní a fluorogenní média, *Cronobacter* spp.

Obsah

1. Úvod
2. Legislativa
3. Metody detekce *Enterobacter sakazakii*
 - 3.1. Kultivační metody
 - 3.2. Chromogenní a fluorogenní média
 - 3.3. Biochemické soupravy
 - 3.4. Molekulární metody
 - 3.5. Porovnání metod detekce
4. Závěr

1. Úvod

„Žlutě pigmentovaný *Enterobacter cloacae*“ byl v roce 1980 rozpoznán jako nový druh mikroorganismu¹ a přejmenován na *Enterobacter sakazakii*. Od té doby se tento patogen stal předmětem mnoha studií. Pojem *Enterobacter sakazakii* zahrnuje skupinu bakterií, gramnegativních, mobilních, tyčinkového tvaru, které jsou velice přizpůsobivým patogenem. *Enterobacter sakazakii* způsobuje infekční onemocnění zvláště u předčasně narozených dětí a dětí v prvních týdnech života, která velmi často končí úmrtím. Mikrobiologický přehled této problematiky přehledně zpracovaly Demnerová a Pazlarová². V roce 2007 bylo zjištěno, že *Enterobacter sakazakii* se skládá z více druhů s rozličným genotypem a fenotypem³. Zmatek v taxonomii se stal výzvou pro velký kolektiv autorů, který hlubokou analýzou izolovaných 210 kmenů *E. sakazakii* s využitím molekulárně-biologických technik (např. analýzy genu pro malou ribosomální podjednotku 16S rRNA a DNA-DNA hybridizace) navrhl reklasifikaci tohoto organismu do nového rodu *Cronobacter*, jenž podle autorů⁴ obsahuje nejméně šest různých druhů a řadí se mezi *Enterobacteriaceae*. Rod *Cronobacter* zahrnuje, podle této

práce, *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonicus*, *Cronobacter mytjensi*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter dublinensis* (*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*, *C. dublinensis* subsp. *lausannensis*, *C. dublinensis* subsp. *lactardi*) a *Cronobacter genomspecies 1*.

Současná platná potravinářská legislativa vycházející z nařízení Evropské komise však dosud používá název *Enterobacter sakazakii*, místo *Cronobacter* spp. V literatuře se však zatím používají nejednotně oba názvy, *Enterobacter sakazakii* a *Cronobacter* spp., jako synonyma, mimo jiné proto, že zatím nejsou propracovány metody detekce *Cronobacter* spp. a rovněž není prozkoumána patogenita jednotlivých druhů tohoto nového rodu. Podařilo se však izolovat několik virulentních faktorů⁵. Jedná se o látky podobné enterotoxinům, které byly také purifikovány⁶. Kromě toho byl izolován protein⁷, který byl identifikován jako metaloproteasa obsahující Zn²⁺. Podařilo se rovněž získat proteiny z povrchu⁸ *Enterobacter sakazakii*. Některé z nich byly identifikovány^{9–11}. Jsou to: enzym α -glukosidasa, proteiny, které mohou vázat aminokyseliny a sacharidy a proteiny vnější membrány (OmpA, OmpC, Protein A). Tyto poznatky slouží také jako základ pro vývoj nových metod detekce *Enterobacter sakazakii*.

Vzhledem k nebezpečnosti *Enterobacter sakazakii* je nezbytné mít k dispozici vhodné metody jeho detekce. Vedle klasických kultivačních technik se postupně prosazují rychlé metody založené na biochemických a molekulárně-biologických principech. V tomto přehledu je podán jejich výčet a stručná charakteristika.

2. Legislativa

Bezpečností potravin se v rámci EU zabývá Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority, EFSA), vlastními biologickými riziky pak vědecká skupina pro sledování biologického rizika (BIOHAZ Panel). Do mikrobiologického rizika dětské výživy byl v roce 2004 zahrnut také *Enterobacter sakazakii*. Bylo konstatováno, že možný výskyt tohoto patogenu v dětské výživě představuje pro konzumenty velké zdravotní riziko. Rod *Enterobacteriaceae*, který se všeobecně vyskytuje v potravinách, může sloužit jako indikátor rizika. Proto EFSA doporučila sledování přítomnosti patogeních mikroorganismů jak při výrobě potravin, tak v potravinářských výrobcích¹².

V listopadu 2005 přijala Evropská komise regulační opatření č. 2073/2005, kterým se stanovují mikrobiologická kritéria pro potraviny. Cílem tohoto nařízení bylo snížit množství určitých mikroorganismů a zavést pravidla, která musí výrobci potravin dodržovat. Toto regulační opatření Evropské komise vyžaduje nepřítomnost *Enterobacter sakazakii* v 10 g vzorku sušené počáteční kojenecké výži-

vy a v sušených dietních potravinách pro zvláštní léčebné účely určené pro kojence do šesti měsíců věku. Zmíněné nařízení bylo upraveno novým regulačním opatřením č. 1441/2007 vydaným v prosinci 2007, avšak limity pro *Enterobacter sakazakii* zůstaly stejné. Jako referenční analytická metoda¹³ se používá klasická kultivační mikrobiologická metoda ISO/TS 22964 (2006).

3. Metody detekce *Enterobacter sakazakii*

V posledních letech byla věnována intenzivní výzkumná činnost vývoji metod detekce *Enterobacter sakazakii*. Hlavní obtíž při detekci *Enterobacter sakazakii*, a také jiných patogenů, je potřeba splnit legislativní nároky (viz kap. 2) a prokázat jednu mikrobiální buňku v několikogramovém vzorku potravin, resp. naopak dokázat, že se v tomto vzorku žádný patogen nevyskytuje. Proto se osvědčují zvláště klasické kultivační techniky, které umožní po několikadenní kultivaci namnožit a izolovat mikrobiální patogen, jehož identita je následně určena na základě morfologických a biochemických vlastností. Takový postup trvá obvykle 5 až 7 dní. Z hlediska hygienických opatření (HACCP) je však potřebné vědět co nejrychleji, zda je potravina kontaminována, nikoliv až v horizontu více dnů.

Proto jsou vyvíjeny tzv. rychlé metody, využívající různé principy detekce. Cílem je získat výsledek detekce patogenních mikroorganismů¹⁴ co nejdříve, nejpozději za 24 až 48 h. Tyto metody by navíc měly být i uživatelsky snadno a lehce použitelné (friendly use).

Avšak ani použitím rychlých metod se nevyhneme kultivačnímu kroku, který musí umožnit pomnožení třeba jediné buňky mikroorganismu v analyzovaném vzorku o několik řádů. Mnohdy je třeba ještě mikrobiální buňky revitalizovat kultivací ve vhodném kultivačním médiu^{15,16}. Obvykle takové kultivace trvají 24 h. Po tomto kroku často následují izolační postupy, které vedou k dalšímu zvýšení množství mikroorganismů v analyzovaném vzorku. Využívá se např. imunomagnetické separace nebo adsorbce mikroorganismů na vhodný nosič, např. hydroxidy zirkonia¹⁷. Takto se získají vzorky, ve kterých lze dále uvedenými metodami již prokázat *Enterobacter sakazakii* v 10 g vzorku.

3.1. Kultivační metody

Mikrobiologické kultivační metody používané pro detekci *Enterobacter sakazakii* jsou založeny na selektivní kultivaci mikroorganismu po jeho kultivačním nabohacení.

Jako standardní ISO metoda akceptovaná také Mezinárodní mlékařskou federací (IDF) byl nedávno přijat postup (ISO/TS 22964:2006) definující metodu detekce *E. sakazakii* v mléce a mléčných výrobcích. Podstatou zkoušky je pomnožení nejprve v neselektivní (pufovaná peptonová voda) a posléze v selektivní (tryptózová půda s laurylsulfátem) půdě. Následuje izolace na chromogenním agaru pro *Enterobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii* isolation agar, ESIA) a na sojovém agaru (*Trypton*

soya agar, TSA). Podezřelé kolonie (žluté kolonie na TSA, modré kolonie na ESIA) z obou agarů jsou identifikovány biochemickými testy.

Vyhledávání vhodných kultivačních médií však stále pokračuje. Cílem je získat vyšší obohacení kultivovaných vzorků, lepší specifitu detekce a snížit počet používaných kultivačních médií. Nedávno byly popsány postupy využívající pouze jedno kultivační médium^{18,19}. Dokonce byl popsán postup umožňující rozlišení živých buněk *Enterobacter sakazakii* od mrtvých²⁰.

3.2. Chromogenní a fluorescenční média

Tato média jsou používána zvláště po kultivačním obohacení vzorku jako první kritérium výskytu *Enterobacter sakazakii*. Jedním z nejvýznamnějších znaků *Enterobacter sakazakii* je přítomnost enzymu α -glukosidasy. Tento enzym ostatní zástupci enterobakterů nemají²¹. Přítomnost α -glukosidasy byla využita pro vývoj selektivních chromogenních/fluorogenních substrátů pro detekci *Enterobacter sakazakii*. Mezi chromogenní substráty patří např. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glukopyranosid, který je přeměňován α -glukosidasou na pigment, který obarví kolonie *Enterobacter sakazakii* na charakteristické modrozelené zbarvení²². Substrát není selektivní a poskytuje falešně pozitivní výsledky také s *Escherichia vulneris*, *Pantoea sp.* a *Citrobacter koseri*. Jiným chromogenním substrátem, který může být použit pro detekci *Enterobacter sakazakii*, je využití trypsinových štěpů sojového agaru a α -D-glukopyranosidu. Působením přítomné α -glukosidasy vznikají přeměnou přidaného substrátu žluté zóny p -nitrofenylového hydrolyzátu²³.

Nejspolehlivější výsledky, ověřené v rozsáhlé studii²⁰, byly získány při použití selektivních chromogenních médií podle Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) agaru²⁴ a Chromocult® *E. sakazakii* (CES) agaru fy Merck. Případně falešně pozitivní výsledky poskytují vzorky obsahující mikroorganismy, které mají α -glukosidasu. Hledání nových médií pro skrínigové metody pokračuje²⁵.

Nejnámějším fluorogenním substrátem pro detekci *Enterobacter sakazakii* je methylumbelliferyl- α -D-glukosid²⁶. Přítomná α -glukosidasa přeměňuje substrát za vzniku třpytivých fluoreskujících kolonií *Enterobacter sakazakii*.

Fluorescenčně značené vybrané sekvence genů pro ribosomální RNA *Enterobacter sakazakii* lze detegovat soupravou VIT-E.sakazakii, fy Vermicon Identification Technology. Fluoreskující buňky *Enterobacter sakazakii* jsou viditelné pod fluorescenčním mikroskopem. Velkou výhodou tohoto postupu je, že jsou viditelné pouze vitální buňky s vysokým obsahem ribosomů a že celá detekce trvá méně než tři hodiny. Detekční limit je 10³ kolonie tvořících jednotek²⁷ (KTJ)/ml. Fluorescenční techniky však zatím nedosáhly většího rozšíření.

3.3. Biochemické soupravy

Mikroorganismy, které mají být identifikovány, se musí napřed izolovat ve vhodném kultivačním médiu

podle standardních mikrobiologických technik. K detekci *Enterobacter sakazakii* jsou používány biochemické soupravy, založené na průkazu přítomnosti určitých enzymů, charakteristických pro tento mikroorganismus. Příkladem takové soupravy je API 20 E panel²⁸. Prokázalo se však, že tato souprava poskytuje jak falešně pozitivní, tak i falešně negativní výsledky, a proto byl test modifikován²⁹ a počet identifikačních reakcí rozšířen na 32. Souprava je komerčně dostupná pod názvem API Rapid ID 32 E, výrobce firma bioMérieux SA. Tento test je standardizovaný identifikační systém pro *Enterobacteriaceae* a další gramnegativní tyčinky, který využívá 32 miniaturizovaných biochemických testů a specifickou databázi. Úplný přehled mikroorganismů, které je možné pomocí tohoto systému identifikovat, je uveden v identifikační tabulce přiložené k testu. Proužek ID 32 E sestává z 32 jamek, které obsahují dehydratované testovací substráty. Po 24 hodinách inkubace se reakce v jednotlivých jamkách vyhodnocují buď pomocí přístrojů ATB Expression, nebo *mini API*. Výsledky je možné získat i vizuálně. Jednou z nejvýraznějších biochemických charakteristik *Enterobacter sakazakii* je

přítomnost α -glukosidasy. Jako substrát se používají syntetické sloučeniny D-glukosy s *p*-nitrofenylovými deriváty. Produkce žlutého *p*-nitrofenylu odlišuje *Enterobacter sakazakii* od dalších druhů rodu *Enterobacter*.

Pro aplikaci biochemických testů je základním požadavkem mít k dispozici čistou bakteriální kulturu a zručného a zkušeného pracovníka vyšetřujícího daný vzorek.

3.4. Molekulární metody

Velké naděje jsou v posledních letech vkládány do tzv. molekulárních metod, tedy postupů, které v našem případě využívají molekulárně-genetických technik, které jsou rychlejší, spolehlivější a hlavně specifitější než klasické metody kultivační³⁰.

První (a zatím jediný) sekvenovaný genom *Enterobacter sakazakii* byl zveřejněn v druhé polovině roku 2007. Jednalo se o sbírkový kmen *Enterobacter sakazakii* ATCC BAA-894, který pocházel z infikované kojenecké výživy. Jeho genom je tvořen cirkulární DNA délkou 4,4 Mbp, kódující 4277 proteinů a dvěma plazmidy².

Tabulka I
Seznam primerů používaných k detekci *Enterobacter sakazakii*

| Název primeru | Sekvence primeru 5'-sekvence-3' | Cílový úsek | Velikost produktu | Metoda ^a | Lit. |
|---------------|---------------------------------|--|-------------------|---------------------|------|
| Esakf | GCTYTGCTGACGAGTGGCGG | <i>16S rDNA</i> | 929 pb | PCR | 31 |
| Esakr | ATCTCTGCAGGATTCTCTGG | | | | |
| Esak2 | CCCGCATCTCTGCAGGATTCTC | <i>16S rDNA</i> | 900 pb | PCR | 54 |
| Esak3 | CTAATACCGCATAACGTCTACG | | | | |
| Saka1 | ACAGGGAGCAGCTTGCTGC | <i>16S rDNA</i> | 952 pb | PCR | 32 |
| Saka2b | TCCCGCATCTCTGCAGGA | | | | |
| EsAgf | TGAAAGCAATCGACAAGAAG | gen zodpovědný za α -glukosidasovou aktivitu | 1680 pb | PCR | 27 |
| EsAgr | ACTCATTACCCCTCTGATG | | | | |
| SG-F | GGGTTGTCTGCGAAAGCGAA | úsek mezi <i>16S a 23S rDNA</i> | 282 pb | PCR | 55 |
| SG-R | GTCTTCGTGCTGCGAGTTTG | | | | |
| SI-F | CAGGAGTTGAAGAGGTTTAACT | úsek mezi <i>16S a 23S rDNA</i> | 251 pb | PCR | 55 |
| SI-R | GTGCTGCGAGTTTGAGAGACTC | | | | |
| Es-ProF | GAAAGCGTATAAGCGCGATTTC | gen zodpovědný za Zn^{2+} metaloproteasu | 350 pb | PCR | 7 |
| Es-ProR | GTTCCAGAAGGCGTTTCTGGT | | | | |
| E1 | CCCAGACGAAACTCGCCGAG | ** | 634 pb | PCR | 42 |
| E2 | GGGATAAGCAGATAATGCGATAAA | | | | |
| SF1 | TAACAGGGAGCAGCTTGCTGCTCTG | <i>16S rDNA</i> | 426 pb | PCR, RT-PCR | 36 |
| SR3 | CGGGTAACGTC AATTGCTGCGGT | | | | |
| ** | ** | úsek mezi <i>rpsU</i> (gen kódující ribosomálníprotein S21) a <i>dnaG</i> (gen kódující primasu) | | RT-PCR | 56 |

^a RT-PCR (real time PCR), ** data nejsou publikována

Většina nových detekčních postupů využívá k průkazu *Enterobacter sakazakii* polymerázové řetězové reakce (PCR). Vhodný výběr primerů na základě známého genu α -glukosidasy (*glu A*) umožnil specifickou detekci²⁷ *Enterobacter sakazakii*. Obvykle se však používají primery z oblasti 16S rRNA (viz tab. I). Vyvinutá PCR 16S rRNA umožňuje velmi citlivou detekci³¹ *Enterobacter sakazakii* (10 pg čisté DNA templátu). Zatímco někteří autoři³² popisují 100% úspěšnost detekce *Enterobacter sakazakii*, jiní uvádějí nižší procento správné detekce³³. S využitím inhibitorů se podařilo sestavit detekční PCR rozlišující živé a mrtvé buňky³⁴ *Enterobacter sakazakii*. Během psaní tohoto přehledu se objevil první úspěšný pokus³⁵ o rozlišení jednotlivých druhů rodu *Cronobacter* pomocí PCR.

Poslední dobou nacházejí stále častěji uplatnění modifikované metody PCR. Real-time PCR, která umožňuje rychlou a specifickou detekci a kvantifikaci specifického úseku nukleové kyseliny, se stala oblíbenou detekční metodou mikroorganismů. Hned několik autorů popisuje více než 90% úspěšnost detekce *Enterobacter sakazakii* touto technikou^{36–38}. PCR, která využívá primery založené na repetitivně-extragenně-palindromních (Rep-PCR) sekvencích, umožnila získat lepší výsledky^{39–41} v porovnání s 16S rRNA. Osvědčila se také podobná metoda využívající enterobakteriálně-repetitivně-integrálně-souhlasných (Eric-PCR) sekvencí⁴².

Druhově specifickou DNA je možné detegovat metodou LAMP (loop-mediated isothermal amplification). Je to jednoduchá, rychlá, specifická a nenákladná metoda, zahrnující obohacovací kultivační krok. Je založená na isothermální amplifikaci, při které se využívá 4 primerů specificky navržených tak, aby rozpoznaly 6 odlišných oblastí cílového genu. Autoři uvádějí citlivost detekce 1,2 KTJ (kolonie tvořící jednotky) ve 100 g kojenecké výživy⁴³.

Úspěšně byla použita rovněž technika založená na selektivním pomnožení restričních fragmentů³ (AFLP, amplified fragment length polymorphism) z celé molekuly DNA pomocí PCR.

Jinou možností je použití metody detekce fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH, fluorescence *in situ* hybridization). Tato metoda umožňuje detekci specifických míst na DNA nebo mRNA. Použitím nové sondy (PNA) byla detegována, po kultivačním pomnožení, 1 KTJ *Enterobacter sakazakii* v 10 g kojenecké výživy⁴⁴.

Stále jsou vyvíjeny další vysoce sofistikované metody umožňující studovat genetickou příbuznost jednotlivých kmenů⁴⁵. Používají se zejména pro identifikační studie *Enterobacter sakazakii*, resp. *Cronobacter* spp., v laboratořích a pro svoji náročnost na přístrojové vybavení již méně v běžné diagnostice. Významnou roli hraje pulsní gelová elektroforéza (PFGE, pulsed field gel electrophoresis), která umožňuje analýzu velkého množství DNA fragmentů z celého bakteriálního genomu. PFGE analýza je poněkud zdoluhavá, trvá 2–3 dny, ale je považována za vysoký standard v subtypizaci bakterií^{46–50}.

Podobný význam má multilokusová sekvenční typizace (MLSA, multilocus sequence analysis). Genetické roz-

díly bakteriálních kmenů jsou studovány na základě sekvenování nukleotidů chromosomálních genů pro enzymy nebo některé proteiny. Touto metodou autoři⁵¹ dokázali rozlišit jednotlivé druhy *Cronobacter* spp.

Pro detekci *Enterobacter sakazakii* byla rovněž popsána technika využívající oligonukleotidových čipů⁵² (oligonucleotide array).

Intenzivní práce řady laboratoří vyústila ve výrobu a komerční dostupnost souprav sloužících k detekci *Enterobacter sakazakii*. Jsou to např.: BAX® System PCR Assay for Screening *Enterobacter sakazakii*, výrobce DuPont; TaqMan® *Enterobacter sakazakii* Detection Kit, výrobce Applied Biosystems a Real Time PCR Assays fy Merck KGaA. Vlastní použití těchto souprav je však v každém případě podmíněno dostatečně dlouhou kultivací, která musí obsahovat jak revitalizaci mikroorganismu, tak i jeho dostatečné pomnožení před detekčním krokem.

3.5. Porovnání metod detekce

Výsledky detekce *Enterobacter sakazakii* získané různými metodami jsou velmi často nejednoznačné. Např. spolehlivost a přesnost metod založených na PCR je vázána na výběr primerů a zvolený teplotní cyklus analytického postupu. Může se proto stát, že některé postupy PCR jsou nedostatečně specifické³¹.

To vedlo přední světové laboratoře, které se zabývají touto problematikou, k uskutečnění rozsáhlých studií, při kterých byly za standardních podmínek porovnávány různé metody detekce *Enterobacter sakazakii*. Byly uskutečněny dvě velké studie, porovnávající osm různých párů primerů^{20,53}. Cílem těchto autorů bylo vyhodnotit a porovnat primery navržené různými autory pro detekci a identifikaci *Enterobacter sakazakii* při analýze reálných vzorků pocházejících převážně z dětské mléčné výživy a ze životního prostředí. Navíc autoři těchto studií porovnávali výsledky získané PCR s metodou hybridizace DNA-DNA, s metodou používající selektivní média (DFI agar, CES agar, ESIA agar, DFIA agar a ESPM agar), s detekcí α -glukosidasy a biochemickými soupřevami (API20E a ID32E v3.0). Takový přístup je nesmírně cenný a bohužel v literatuře málo častý. Studie těchto autorů představují zásadní průlom v detekci *Enterobacter sakazakii*.

Autoři první z těchto studií získali velmi uspokojivé výsledky⁵³. Zjistili, že všechny detegované izoláty *Enterobacter sakazakii* měly α -glukosidasovou aktivitu, chromogenní média pozitivně detegovala více než 95 % vzorků a biochemický test ID 32 E v3.0 byl úspěšný v 99,5 %. Nejúspěšnější byla detekce využívající průkazu genů *dnaG* a *gluA*, která 100 % vzorků úspěšně prokázala.

Výsledky druhé, velmi rozsáhlé studie, již tak pozitivní nejsou²⁰. Předně se ukázalo, že nejpřesnější identifikační metodou (98 %) je použití selektivních médií využívajících kultivace na DFI nebo CES agaru. U postupů založených na PCR se jen u tří dvojic primerů přesnost detekce blíží předchozí metodě a dosahuje max 92 %. U ostatních testovaných primerů kolísá mezi 29–86 %. Obdobné výsledky autoři získali hodnocením specifity detekce. Porov-

náním získaných pozitivně a negativně určených vzorků s DNA-DNA hybridizačním standardem má opět nejlepší hodnocení technika selektivních médií a jen dva z testovaných primerů. Autoři tak získali podklady pro tvrzení, že z mnoha publikovaných postupů pouze selektivní agarová média (DFI a CES) a z používaných primerů (Esakf/Esakr) umožňují získat výsledky s vyšší než 90% přesností detekce. Proto navrhuji použití agarových médií pro výběr pozitivních vzorků po první obohacovací kultivaci analyzovaných vzorků a v následujícím detekčním kroku pak použití vybraných primerů za přesně dodržěného protokolu PCR. Takovým postupem je možné docílit až 92% přesnosti detekce *Enterobacter sakazakii*.

Je tedy zřejmé, že problematika detekce *Enterobacter sakazaki*, alias *Cronobacter* spp. ještě není zdaleka uzavřenou kapitolou, jak by se snad mohlo na první pohled zdát. V současnosti však probíhá v této oblasti intenzivní výzkum.

4. Závěr

Velké zdravotní riziko, které přináší *Enterobacter sakazakii*, alias *Cronobacter* spp., zvláště pro kojence a batolata, vyvolalo zvýšený zájem o vhodné metody detekce tohoto patogenního mikroorganismu. Zejména v posledních čtyřech letech bylo vyvinuto několik principiálně odlišných detekčních postupů. Mezi získanými výsledky však existuje dosud značný nesoulad.

Klasické metody detekce *E. sakazakii*, kterými lze prokázat nepřítomnost tohoto patogenu v potravíně až za několik dní, nejsou pro výrobce potravin dostatečně rychlé. Je proto nezbytné vyvíjet rychlejší metody detekce, které by dovolily získat informace o možném výskytu tohoto patogenu zejména v dětské výživě a umožnily kontrolu výrobní technologie a monitorování hygienických podmínek výroby.

V posledních letech byl učiněn velký pokrok ve vývoji rychlých metod detekce patogenů. Významnou roli hrají metody založené na využití molekulárně-biologických technik. Pro detekci *E. sakazakii* bylo zatím popsáno, vedle klasických kultivačních technik a biochemických testů, několik hybridizačních technik. Tyto molekulárně genetické postupy využívají nejčastěji polymerázovou řetězovou reakci. Z technického hlediska mají publikované detekční postupy řadu variant. Nejvíce se zatím osvědčila kombinace kultivace patogenů na agarových (DFI a CES) půdách s následnou detekcí pomocí PCR (cit^{20,53}). Vývoj metod detekce *Enterobacter sakazakii*, alias *Cronobacter* spp. není však zdaleka ukončen a přinese zájemcům o tuto problematiku, velmi pravděpodobně, ještě řadu nečekaných problémů.

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře ČR projekt 525/09/1075, Národnímu výzkumnému centru 2B06048 a Výzkumnému záměru MSM 6046137305.

LITERATURA

- Farmer J. J. III, Asbury M. A., Hickman F. W., Brenner D. J.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 569 (1980).
- Demnerová K., Pazlarová J.: *Chem. Listy* 103, 641 (2009).
- Iversen C., Lehner A., Mullane N., Bidlas E., Cleenwerck I., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: *BMC Evol. Biol.* 7, 64 (2007).
- Iversen C., Mullane N., McCardell B., Tall B. D., Lehner A., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1442 (2008).
- Pagotto F. J., Nazarowec-White M., Bidawid S., Farber J. M.: *J. Food Prot.* 66, 370 (2003).
- Raghav M., Aggarwal P. K. P.: *Can. J. Microbiol.* 53, 750 (2007).
- Kothary M. H., McCardell B. A., Frazar C. D., Deer D., Tall B. D.: *Appl. Environ. Microb.* 73, 4142 (2007).
- Nilsson I., Utt M., Nilsson H. O., Ljung A., Wadstrom T.: *Electrophoresis* 21, 2670 (2000).
- Riedel K., Lehner A.: *Proteomics* 7, 1217 (2007).
- Nair M. K. M., Venkitanarayanan K.: *Pediatr. Res.* 62, 664 (2007).
- Singamsetty V. K., Wang Y., Shimada H., Prasadarao N. V.: *Microb. Pathog.* 45, 181 (2008).
- Hochel I.: *Chem. Listy* 103, 814 (2009).
- ČSN P ISO/TS 22964: Mléko a mléčné výrobky - Průkaz *Enterobacter sakazakii* (říjen 2006).
- Blažková M., Karamonová L., Fukal L., Rauch P.: *Chem. Listy* 99, 467 (2005).
- Al-Holy M. A., Lin M., Al-Qadin H. M., Rasco B. A.: *Food Microbiol.* 25, 22 (2008).
- Shaker R. R., Osaili T. M., Abu Al-Hasan A. S., Ayayash M. M., Forsythe S. J.: *J. Food Sci.* 73, M354 (2008).
- Zhou Y., Qingping W., Xiaoke X., Xiaojuan Y., Yingwang Y., Zhang J.: *Food Microbiol.* 25, 648 (2008).
- Fox E. M., Jordan K. N.: *J. Appl. Microbiol.* 105, 1091 (2008).
- O'Brien S., Healy B., Negroredo C., Fanning S., Iversen C.: *J. Food Prot.* 72, 1472 (2009).
- Cawthorn D.-M., Botha S., Witthuhn R. C.: *Int. J. Food Microbiol.* 127, 129 (2008).
- Muytjens H. L., van der Ros-van de Repe J., van Druuten H. A. M.: *J. Clin. Microbiol.* 20, 684 (1984).
- Iversen C., Druggan P., Forsythe S.: *Int. J. Food Microbiol.* 96, 133 (2004).
- Kandhai M. C., Reij M. W., van Puyvelde K., Guillaume-Gentil O., Beumer R. R., van Schothorst M.: *J. Food Prot.* 67, 1207 (2004).
- Iversen C., Waddington M., On S. L., Forsythe S.: *J. Clin. Microbiol.* 42, 5368 (2004).
- Iversen C., Druggan P., Schumacher S., Lehner A., Feer C., Dschwend K., Joosten H., Stephan R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2550 (2008).
- Oh S. W., Kang D. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5692 (2004).

27. Lehner A., Nitzsche S., Breeuwer P., Diep B., Thelen K., Stephan R.: *BMC Microbiol.* 6, 15 (2006).
28. Washington J. A., Yu P. K. W., Jeffery M. W.: *Appl. Microbiol.* 22, 267 (1971).
29. Iversen C., Forsythe S.: *Food Microbiol.* 21, 771 (2004).
30. Blažková M., Koets M., Rauch P., van Amerongen A.: *Eur. Food Res. Technol.* 229, 867 (2009).
31. Lehner A., Stephan R.: *J. Food Prot.* 67, 2850 (2004).
32. Hassan A. A., Akineden O., Kress C., Estuningsih S., Schneider E., Usleber E.: *Int. J. Food Microbiol.* 116, 214 (2007).
33. Gutierrez-Rojo R., Torres-Chavolla E.: *J. Rapid Meth. Automat. Microbiol.* 15, 345 (2007).
34. Cawthorn D.-M., Witthuhn R. C.: *J. Appl. Microbiol.* 105, 1178 (2008).
35. Stoop B., Lehner A., Iversen C., Fanning S., Stephan R.: *Int. J. Food Microbiol.*, v tisku (2009).
36. Kang S. E., Nam Y. S., Hong K. W.: *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 516 (2007).
37. Lehmacher A., Fiegen M., Hansen B.: *J. Consumer Protect. Food Safety* 2, 218 (2007).
38. Krasccsenicsova K., Trncikova T., Kaclikova E.: *Food Anal. Meth.* 1, 85 (2008).
39. Choi S. H., Choi J. W., Lee S. B.: *Food Sci. Biotechnol.* 17, 1171 (2008).
40. Proudly I., Bougle D., Coton E., Coton M., Leclercq R., Vergnaud M.: *J. Appl. Microbiol.* 104, 26 (2008).
41. Proudly I., Bougle D., Leclercq R., Vergnaud M.: *J. Appl. Microbiol.* 105, 550 (2008).
42. Ye Y. W., Wu P. Q., Zhou Y. H., Dong X. H., Zhang J. M.: *J. Microbiol. Meth.* 75, 392 (2008).
43. Liu C., Zheng W. J., Zhang W. H., Hou Y. M., Liu Y.: *J. Food Safety* 29, 83 (2009).
44. Almeida C., Azevedo N. F., Iversen C., Fanning S., Keevil C. W., Vieira M. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2925 (2009).
45. Michalska A., Gospodarek E.: *Postepy Mikrobiologii* 46, 39 (2007).
46. Mullane N. R., Whyte P., Wall P. G., Quinn T., Fanning S.: *J. Food Microb.* 116, 73 (2007).
47. Healy B., Mullane N., Collin V., Mailler S., Iversen C., Chatellier S., Storrs M., Fanning S.: *J. Food Prot.* 71, 1372 (2008).
48. Molloy C., Cagney C., O'Brien S., Iversen C., Fanning S., Duffy G.: *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.007, v tisku (2009).
49. Baumgartner A., Grand M., Liniger M., Iversen C.: *Int. J. Food Microbiol.*, v tisku (2009).
50. El-Sharoud W. M., O'Brien S., Negredo C., Iversen C., Fanning S., Healy B.: *BMC Microbiol.* 9, 24 (2009).
51. Kuhnert P., Korczak B. M., Stephan R., Joosten H., Iversen C.: *Int. J. Food Microbiol.*, v tisku (2009).
52. Liu Y., Gao Q. L., Zhang X., Hou Y. M., Yang J. L., Huang XT.: *Molecular Cellular Probes* 20, 11 (2006).
53. Iversen C., Lehner A., Mullane N., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: *J. Clin. Microbiol.* 45, 3814 (2007).
54. Keyser M., Witthuhn R. C., Ronquest L.-C., Britz T. J.: *Biotechnol. Lett.* 25, 1893 (2003).
55. Liu Y., Cai X., Zhang X., Gao Q., Yang X., Zheng Z., Luo M., Huang X.: *J. Microbiol. Methods* 65, 21 (2006).
56. Seo K. H., Brackett R. E.: *J. Food Prot.* 68, 59 (2005).

M. Blažková, L. Fukal, and P. Rauch (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Dangerous Pathogen *Enterobacter sakazakii* and Its Detection**

The aim of the review is to characterize *Enterobacter sakazakii* alias *Cronobacter* sp. as one of most dangerous microbial contaminants in foods. The microbe is a pathogen causing a serious disease in premature and newborn infants, rarely in adults. Despite a low occurrence of the infections, a high mortality (up to 80 %) has been reported. A survey of methods of its detection is given. Cultivation, chromogenic/fluorogenic media, biochemical kits and molecular genetic methods are promising in *Enterobacter sakazakii* screening in foods.