عزل بكتريا *Enterobacter sakazakii* وانواع من بكتريا المعوية من حليب الاطفال المجفف المعروض في الاسواق المحلية لمدينة تكريت

اغاريد علي حسين
قسم علوم الاغذية-كلية الزراعة -جامعة تكريت.

الكلمات الدالة :
بكتريا ، حليب اطفال ، تكريت

للمراسلة :
اغاريد علي حسين
قسم علوم الاغذية-كلية الزراعة -جامعة تكريت

الاستلام:
2012-4-3
القبول :
5-8-2012

الخلاصة

تم جمع18عينة حليب الاطفال المجفف دون ستة اشهر المعروض في السوق المحلية لمدينة تكريت والتي تعود لستة علامات تجارية وهي بيوميل ;Biomil نوفالاك Novalac ; ديالاك Dielac ;كيكوزGeguiz ; سيلياCelia ;سني بيبيSunny baby وقد اجريت عليها الفحوصات البكتريولوجية لعزل بكتريا *Ent.sakazakii* وعد البكتريا المعوية. وكانت اعدادها كالاتي (6) للعلامة بيوميل Biomil (23) نوفالاك Novalac و(42) لديالاك Dielac و (82)لكيكوزGeguiz و(94) لسني بيبيSunny baby و(97) سيليا Celia وحدة تكوين مستعمرة/غم على التوالي واثبتت الفحوصات الكيموحيوية وجود الانواع التالية: *Enterobacter sakazakii ,Ent.aerogens ,Ent.cloaca* , *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli ,Pantoea agglomerance Escherichia coli* ,Hafinia spp, Klebsiella spp واخيرا Salmonella spp وعزلت بكتريا *Ent.sakazakii* من العلامات التجارية التالية نوفالاك وكيكوز والسني بيبي وتم حساب النسبة المئوية للبكتريا *Ent.sakazakii* لأربع عينات من مجموع 18 عينة وبنسبة 22.2%.وبهذا تكون العلامات التي عزلت منها هذه البكتريا غير صالحة كغذاء للطفل الرضيع فحسب المواصفات العالمية يجب عدم احتواء حليب الاطفال المجفف على بكتريا *Ent.sakazakii* لخطورتها على صحة الطفل الرضيع .

Isolation of *Enterobacter sakazakii* bacteria and some species of Enterobacteriacea from powder milk Infant Formula in local markets of Tikrit City.

Aghareed.Ali.Hussain
Food Science Dept-College of Agriculture-Tikrit University.

KeyWords:
Enterobacter sakazakii

Correspondence:
Aghareed.Ali.Hussain

Food Science Dept-College of Agriculture-Tikrit University

Received:
2012-4-3
Accepted:
5-8-2012

Abstract

18 samples of powder infant formula milk (PIFM) under six monthes were collected from the local markets of Tikrit city which belongs to six trade markes ;Biomil ,Novalac ,Dielac ,Geguiz ,Cellia and Sunny baby .Bacteriological tests has done to isolate *Enterobacter sakazakii* and numbers of Enterobacteriacea The total count of Enterobacteriacea were as below: 6 for Biomil , 23 for Novalc , 42 for Dielac , 82 for Geguize , 94 for Sunny baby ,and 97 CFU/g from Celia. Biochemical tests were carried out to identify the isolates and they are: *Ent.sakazakii* ,*Ent .aerogenes* , *Ent.cloaca* ,*Pantoea agglomerans, Escherichia coli* ,*Escherichia coli :O157:H7* , Klesiella spp ,Hafinia spp ,and Salmonella spp. *Ent.sakazakii* was isolate frome trademarks: Novalac , Geguiz, and Sunny baby, the percentage of presentation of *Ent.sakazakii* was measured in four out of (18) samples with percentage as 22.2%.So the trade marks which this bacteria isolated from was unfit to consumption as milk for confirm to the absence of this bacteria from PIFM under six months for it is dangerous to infants health.

المقدمة:

تعتبر بكتريا *Enterobacter sakazakii*(يطلق عليها احيانا بال *Cronobacter sakazakii* FAO/WHO) 2008))من الممرضات الخطيرة للأطفال حديثي الولادة والتي تنتقل عن طريق الحليب المجفف(Kango واخرون 2008) وهي بكتريا انتهازية تنتج سموم معويه, عندما يتناول الطفل الحليب الملوث بهذه البكتريا تحرر وتصل مجرى الدم عن طريق اختراقها جدار امعاء فتسبب له التهاب السحايا الدماغي للطفل الرضيع وتجرثم الدم وايضا تسبب التهاب المجاري البولية مسببة حالات وفاة للأطفال تصل%(40-80) خصوصا لاطفال الرضع التي تكون اعمارهم دون 28 يوم (Corti واخرون2007). بكتريا *Enterobacter sakazakii* سالبة لصبغة كرام متحركة بأسواط محيطية غير مكونة للأبواغ عصوية مستقيمة تنمو بظروف هوائية واختيارية لاهوائية تعود للعائلة المعوية *Enterobacteriacea* كانت تعود الى جنس*Enterobacter cloaca* ذات الصبغة الصفراء حتى عام 1980 حيث تم اعادة تصنيفها وتسميتها باسم *Enterobacter sakazakii* اعتماد على تهجين-DNA DNA والتفاعلات الكيموحيوية وإنتاج الصبغة الصفراء واختبار الحساسية للمضادات الحيوية (Farmer واخرون 1980). تمتاز هذه البكتريا بعدم قابليتها اعلى تخمير سكر السوربيتول وانتاج المستعمرات للصبغة الصفراء على وسط Tryptic soy agarوقدرتها على انتاج انزيم α-glycosidase (Lehner واخرون 2006). ان %(70- 90) من سلالات هذه البكتريا تكون ضمن مجموعة بكتريا القولون لقابليتها على انتاج الغاز من تخميرها لسكر اللاكتوز على درجة37م° اضافة الى ان قسم من هذه السلالات تكون ضمن بكتريا القولون البرازية لقابليتها في النمو في وسطBroth Enterobacteriaceae Enrichment على درجة44.5 م°.(Gurtler واخرون 2005) تعزل بكتريا *Ent.sakazakii* من عمليات الغسل في معامل تصنيع الاغذية و ارضيات المعامل المنتجة لغذاء الطفل ومن حليب الاطفال ومن الهواء ومن ارضية لمستشفيات ومن القوارض والتربة (Shakerواخرون 2006) ونظرا لأهمية بكتريا *Ent.sakazakii* والاحتمالات الكبيرة حول تواجدها في حليب الاطفال المجفف وخصوصا للأطفال حديثي الولادة ونتيجة لقابليتها على تحمل درجات حرارة مختلفة اثناء عمليات التصنيع هدفت الدراسة للتعرف على مدى تلوث حليب الاطفال الرضع دون الستة اشهر من مناشيء مختلفة بالبكتريا *Ent.sakazakii* وبعض الانواع الاخرى من بكتريا المعوية المسببة لحالات مرضية مختلفة للأطفال

المواد وطرائق البحث

النماذج: تم اخذ ثلاثة مكررات من ستة انواع من العلامات التجارية التالية ذات المناشئ المختلفة هي سيليا Celia(فرنسا); نوفالاك Novalac (فرنسا) ; بيوميل Biomil (بلجيكا) ; كيكوز Geguiz (فلبين) ; سني بيبي Sunny baby (فرنسا) ;ديالاك Dielac (فيتنام) لحليب الأطفال الحديثي الولادة دون الستة اشهر وكان العدد النهائي للعبوات المفحوصة 18عبوة وقد جمعت العينات لفترة استغرقت من 12/2010 الى12/2012 مع التأكد من سلامة العبوة من العيوب الخارجية والظاهرة والتأكد من مدة صلاحيتها و تاريخ انتاجها كما يجب مسح العلبة بالكحول وفتحها بالقرب من لهب مصباح بنزن .بالنسبة للاوساط المستخدمة في هذه الدراسة فكانت من شركة Himedia الهندية.

عد بكتريا المعوية :تم اخذ 50غم بمكررين لكل عبوة من العلامات التجارية المذكورة واذابتها في450 مل من المحلول الفسيولوجي والقيام بسلسلة من التخافيف الى التخفيف10^2و10^3 واخذ امل من كل تخفيف واضافة وسط الماكونكي اكارMacConkey agar بعد تعقيمه وتبريده الى درجة 55 وحضنه بدرجة 37 لمدة 24–48 ساعة ويتم بعدها عد البكتريا المعوية وحدة تكوين مستعمرة لكل غرام من الحليب المجفف(CFU/g (Colony Form Unit (Imran واخرون2009).

العزل والتشخيص: تم اخذ 100غم بثلاثة مكررات لكل عبوة من العلامات التجارية المذكورة واذابتها في900 مل Peptone waterومزجه جيدا وحضنه بدرجة37م° لمدة 18-24 ساعة وبعدها اخذ10مل واضافته الى 90مل من وسط Lauryl sulphate brothوحضنه بدرجة 37 م° لمدة 18–24 ساعة ثم القيام بسلسلة من التخافيف باستخدام المحلول الفسيولوجي وبعدها تم النشر بحجم 0.1 مل من التخفيف الرابع والخامس على وسط الماكونكي MacConkey والحضن لمدة 24-48ساعة بدرجة 37 م°للتاكد من قابلية *Ent. sakazakii* على انتاجها للصبغة الصفراء بتنميتهاعلى وسط (TSagar)Tryptic soyوحضن لمدة (24- 72)ساعة ودرجة25م°(FDA 2002) وتم بعدها القيام بالفحوصات الكيموحيوية التالية: Indol, MR, VP ,Oxidase ,TSI (Triple Iron Sugar Agar), Simmoncitrate, Urea وفحص تخمر السكريات التالية Sorbitol (Sor), Arabinose (Ar), Galactose (Gal),Sucrose (Suc), Raffinose (Raf) ,Lactose (La) (Girmont واخرون2007) واخيرا تم حساب نسبة المئوية تواجد *Ent. sakazakii*لنماذج الحليب عددها (18) عينة.

النتائج والمناقشة:

كان هناك اختلاف باعداد البكتريا المعوية على وسط الماكونكي لكل علامة تجارية كما هو مبين بالجدول–1 نجد ان الاعداد للعلامة بايوميل Biomil كان 6 وحدة تكوين مستعمرة لكل غرام (Colony Forming Unit)(CFU/ g) بينما كان97 (CFU/ g) للعلامة سيليا Celia ان هذا الاختلاف يعود الى سلامة ونظافة المصنع المنتج للحليب وايضا يعود الى الاختلاف بزمن المسح واخذ النماذج ونوع الوسط المستخدم في ملائمته في العد وفترة

الحضن ومهارة الشخص القائم بعملية التنمية ان الحد المسموح به للبكتريا المعوية في حليب الاطفال المجفف يكون من1 الى 10 (CFU/g) (FAO/WHO 2008) لهذا نجد ان العلامة التجارية البايوميل اقلهم عددا وهذا يدل على مدى صلاحية هذه العلامه لاستهلاك مقارنة بالعلامات الاخرى مثل السيليا Celia والسني بيبي Sunny baby.تم تشخيص البكتريا النامية على وسط الماكونكي بالفحوصات الكيموحيوية فقد عزلت 9 انواع كما هو مبين بالجدول رقم–2– ويظهر الجدول رقم-3- انواع البكتريا المعزولة لكل علامة من علامات الحليب المفحوصة وكانت , *Enter.sakazakii* *Enter.aerogens* ,*Enter.cloaca* ,*Pantoea agglomerance* *Escherichia coli* O157:H7 *Escherichia* Salmonella واخيرا *Hafinia spp* , *Klebsiella spp* , *coli*, spp.

الجدول رقم عدد البكتريا المعوية لكل غم من حليب الاطفال المجفف

عدد البكتريا CFU/ g *	نوع العلامة التجارية لحليب الاطفال المجفف**
6	بيوميل Biomil
23	نوفالاك Novalac
42	ديالاك Dielac
82	كيكوزGeguiz
94	سني بيبيSunny baby
97	سيليCelia

***CFU/ g وحدة تكوين مستعمرة لكل غرام من حليب**
**** تم اخذ معدل ثلاث مكررات لكل علامة تجارية**

قد تم التأكد من قابلية بكتريا *Ent.sakazakii* على افراز الصبغة الصفراء على وسط TS agar كما هو مبين بالشكل -1– وأيضا يمكن ملاحظة مظهر مستعمرات *Ent.sakazakii* على وسط الماكونكي كماهو مبين بالشكل رقم -2-.هناك اختلافا في انواع البكتريا المعزولة للعلامات التجارية المفحوصة بهذه الدراسة فالعلامة التجارية سني بيبي اظهرت احتوائها على 6 انواع بينما حليب الديالاك وحليب نوفالاك عزل3 انواع فقط, تم عزل بكتريا *Ent.sakazakii* العلامات التالية سني بيبي وكيكوز ونوفالاك وتم حساب نسبتها المئوية لل18عينة فكانت22.2% كماهو مبين بالجدول رقم–3–وهي نسبة مقاربة لما توصل اليه الباحث Kandhai واخرون (2004) التي كانت 20.6% في حين اختلفت مع النسبة التي حصل عليهاKenji وآخرون (2010) التي كانت 6%. عزلت بكتريا الSalmonella من العلامة سني بيبي والديالاك ان وجود*Ent.skaazakii* وبكتريا Salmonella في عينات الحليب المفحوصة بهذه الدراسة يعتبر مؤشرا خطرا لتلوث غير مسموح به في حليب الاطفال المجفف للرضع فحسب توصيات منظمة الاغية والزراعة للامم المتحدة FAO ومنظمة الصحة العالمية WHO تعتبران من الممرضات الخطرة الرئيسية التي تسبب امراض جهازية systematic infection وتقرحات معوية necrotizing enterocolitis وايضا تسبب اسهال حاد sever diarrheae للأطفال الرضع حديثي الولادة (FAO/WHO) 2006.اما *E.coli* :O157:H7 فعزلت من العلامة نوفالاك وكيكوز وسني بيبي وبالإضافة الى العلامة سيلي ولهذه البكتريا خطورة على حياة الطفل الرضيع فهي تعزل من حليب الغير مبستر ومن الحليب الخام مسببة تسمما غذائي(LeJeuneوآخرون 2001) اما بقية الانواع المعزولة حسب توصيات منظمة FAO ومنظمة WHO تعتبر من الخطرة لكنها اقل وطأة من بكتريا *Ent.skazakii* وبكتريا *Salmonella* (FAO/WHO 2006).

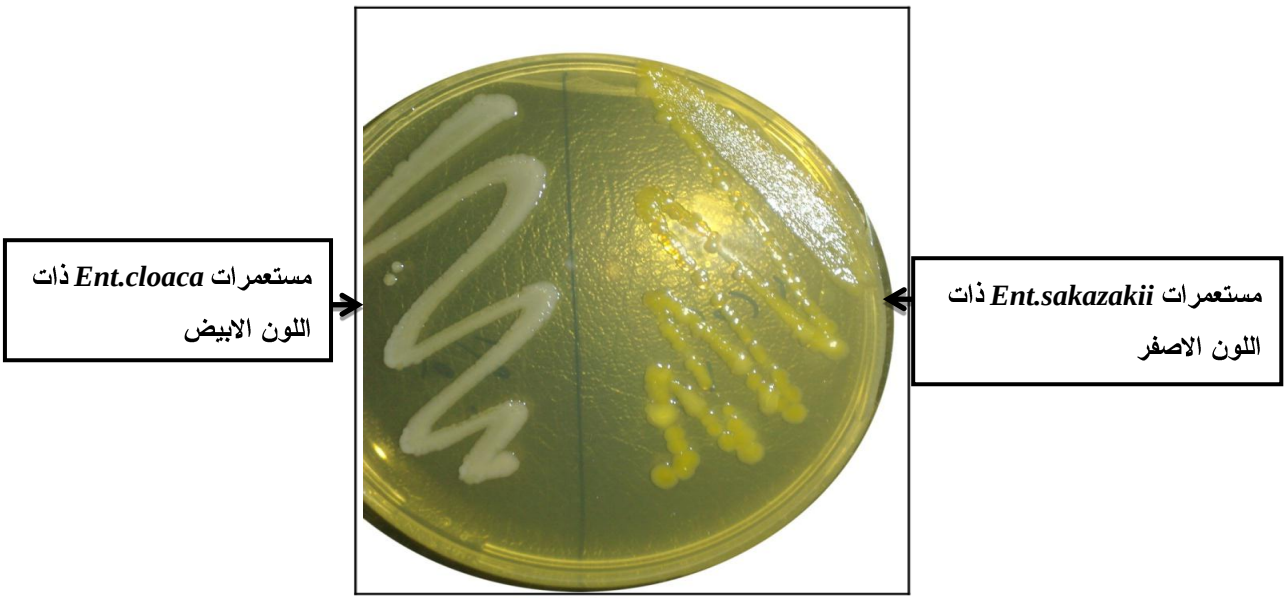
الجدول رقم –2 –الفحوصات الكيموحيوية للعزلات المأخوذة من للعلامات الثالثة لحليب الاطفال المجفف.

Oxi	La	Gal	Suc	Raf	Ar	So	TSI/H2S	Sim	Ure	Ind	VP	MR	الفحوصات الكيموحيوية
–	+	+	+	+	+	–	A/A g -	+	–	–	+	–	*Ent. sakazakii*
-	–	+	+	+	+	+	A/A g -	+	v	–	+	v	*Ent. cloacae*
–	-	+	–	–	+	+	A/A - -	+	–	+	–	–	*Ent. aerogenes*
–	+	–	+	–	+	+	A/A g -	-/+	-	–	+	–	*Pant. agglomerans*
–	+	+	+	+	+	+	A/A g -	–	–	+	–	+	*E. coli*
-	+	+	+	+	+	-	A/A g -	-	+	+	-	+	*E.coli:*O157:H7
–	+	+	+	+	+	+	A/A g -	+	+	–	+	-	Klebasiella *spp*
–	–	+	–	–	+	–	K/A - -	+	–	–	+	–	Hafnia spp
–	–	+	–	+	+	+	K/A +	–	–	–	+	–	Salmonella *spp*

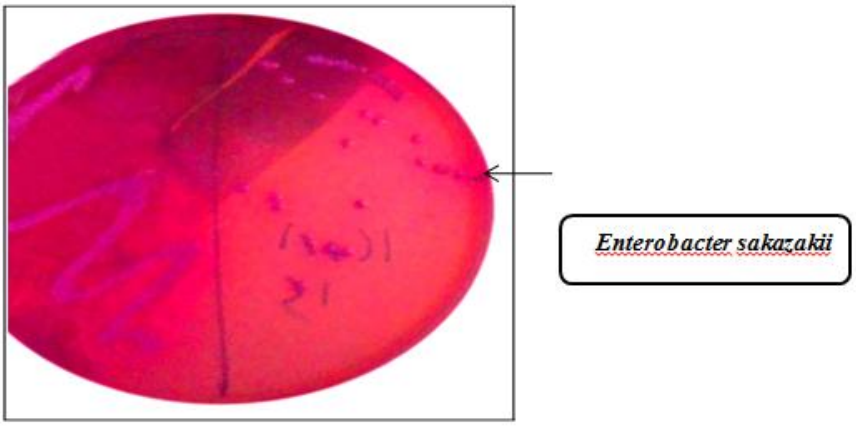
Indol = Ind Urea,= Ure , Simmoncitrate =Sim Acide= A , alkalin= K *Yellow pigement produced at Tryptic soy agar at 25C for 72 hr (Girmont *et al* .,2007)

الجدول رقم -3- انواع البكتريا المعوية المعزولة من حليب الاطفال المجفف للعلامات التجارية مختلفة

سيليا Celia	سني بيبي Sunny baby	كيكوز Geguiz	ديالاك Dielac	نوفالاك Novalac	بيوميل Biomil	انواع العلامات التجارية
Pantoea agglomerans	*Ent . sakazakii*	*Ent. sakazakii*	*Pantoea agglomerans*	*Ent . sakazakii*	*Ent . aerogenes*	انواع البكتريا المعوية المعزولة
E.coli	*E. coli*	*E.coli*	*E. coli*	*E.coli:*O157:H77	*E.coli*	
Klebsiella *spp,*	*E.coli: O157:H7*	Pantoea agglomerans	Salmonella spp	Klebsiella spp,	Hafnia spp,	
E.coli: O157:H7	Klebsiella *spp,*	E. coli: O157:H7				
Ent . aerogens	Salmonella spp,	Hafnia spp,				
	Ent. cloacae					



الشكل رقم– 1–مستعمرات *Enterobacter sakazakii* على وسط Tryptic soy agar(TS agar) بعد الحضن لمدة 24–72 ساعة وبدرجة 25 م° تظهر المستعمرات ملساء, smooth ومخاطيةmucoid منتجة لصبغة صفراء غير منتشرة.



الشكل رقم– 2– مستعمرات بكتريا *Enterobacter sakazakii* على وسط MacConky agar بعد الحضن لمدة24–48 ساعة على درجة 37 م° تظهر المستعمرات وردية مخمرة للاكتوز.

الجدول رقم –3- العينات (18) من عينات الحليب الاطفال التي عزلت منها بكتريا *Ent.sakazakii*

Biomil بايوميل			Celia سيليا			Dielac ديالاك			Novalac نوفالاك			Geguiz كيكوز			Sunny سني بيبي baby		
B3	B	B1	C3	C2	C1	D3	D2	D1	N3	N2	N1	G3	G2	G1	S3	S2	S1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+

+تواجد بكتريا *Ent.sakazakii* و – عدم تواجده.(S)Sunny baby ,Geguiz(G) , Novalac(N) ,Dielac(D), Celia(C) Biomil(B),

ان التنوع في البكتريا المعزولة للعلامات التجارية المفحوصة بهذه الدراسة وخصوصا بكتريا *Ent.sakazakii* يعود الى (1) حساسية الوسط المستخدم في التنمية والاغناء هو Lauryl sulphate broth يمتاز هذا الوسط بحساسيته في تنمية وعزل البكتريا المعوية مقارنة بالأوساط الاخرى(Mukadderat وآخرون 2010). (2) مراحل انتاج الحليب المجفف فقد اجريت العديد من الدراسات حول ظروف تلوث حليب الاطفال المجفف اثناء انتاجه وحددت المراحل التي تسمح بحدوث التلوث البكتيري وتشمل مرحلة المزج الرطب Wet Blnding والتجفيف الرذاذي Spray drying والتبريد cooling وأخيرا المزج الجاف Dry Blending (Kandhi وآخرون2010).(3) ان منشأ الانتاج للعلامات التجارية المفحوصة بهذه الدراسة هي ليست من المناشئ الاصلية يعتقد انها علامات تجارية مقلدة والدليل على ذلك انخفاض اسعارها مقارنة بأسعار العلامات التجارية العالمية حيث ان عملية انتاجها لم تكن بالظروف المثالية وعدم اتباع الخطوات التصنيعية الحديثة. آن الشخص الذي يقوم بتحضير الحليب بالرضاعة وخصوصا الام له دور في التقليل من حالات التلوث اعتمادا على مهارة واهتمام الام بصحة وسلامة الطفل الرضيع فترك الحليب بالرضاعة لفترة طويلة مع حرارة بدرجة حرارة الغرفة يعطي المجال للبكتريا باستعادة نشاطها وزيادة عددها باعتبار لكون الحليب بيئة ملائمة لنمو انواع كثيرة من البكتريا (Jenny و Peter 2007) لقد حصل اهتمام كبير بالجنسPantoaeوخصوصا *Pantoae agglomerans* التي كانت تسمى سابقا *Enterobacter agglomerans* نتيجة لعزلها من حليب الاطفال المجفف ودورها في امراض الاطفال الحديثي الولادة (Cruz واخرون 2007) وقد تم عزل هذه البكتريا من العلامة التجارية الكيكوز والديالاك وسيليا ولهذه بكتريا اهمية مشابهة لأهمية *Ent.sakazakii* *فيجب* الاهتمام بدراسة طرق عزلها وتشخيصها من عذاء الطفل الرضيع (Kenji واخرون 2010) .

الاستنتاجات والتوصيات:

هناك الحاجة الى العديد من الدراسات حول بكتريا *Enterobacter skazakii* لتحديد الظروف الخاصة بمقاومتها ونموها في اغذية الاطفال المجففة وعلى وجه الخصوص دراسة الظروف المساعدة لهذه البكتريا في تكوينها للأغشية الحيوية Biofilm في المعمل في المعدات وانابيب نقل الحليب التي بطبيعتها تقاوم عمليات التنظيف لخطوط الانتاج في المعمل بتوعية الامهات حول اهمية الرضاعة الطبيعية لضمان سلامة وصحة الاطفال الرضع دون الست اشهر من الاصابة بالأمراض مثل الاسهال والتهاب السحايا الدماغي .

المصادر

Corti, G., Panunzi, I., Losco, M.,Buzzi, R. (2007). Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man.J. hemotherapy.19:94-96.

Cruz.A,T., Cazacu.A.C.,and Allen,C,H. (2007):*Pantoea agglomerans*,a plant pathogen causing human disease J.Clin.Microbiol 45 :1989-1992.

FAO/WHO.(2006)*Enterobacter sakazakii* and Salmonella in powdered infant formula:meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No10 Rome,Italy.

FAO / WHO. (2008) *Enterobacter sakazaki* (Coronobacter spp.) in powdered follow up formula Microbiological Risk Aassessment Series No15 Rom ,Italy.

Farmer,J,J., Asbury,M,A., Hickman.F,W., Brenner.D,J.,&The Enterobacteriaceae .Study Group. (1980) *Enterobacter sakazakii*: A new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. Int.J.ystematic Bacteriology.30:569-584.

FDA/CFSAN.(2002).Isolation and enumeration of *Enterobacter* sakazakii from dehydrated powdered infant formula(on line) http://www.cfsan .fda.gov/~lrd/tpinf.html accessed on 18 July 2008.

Imran, R,R., Khaskheli ,M., Rao, S., Faziani, A ,S., Shah, A,Q., and Khaskhall ,B .,G (2009) Microbial Qualty of Formulated Infant Milk Powders Pak.J. Of Nutrition 8(10):1665-1670.

Gurtler, J, B., Kornacki, J ,L., Beuchat, R , L .,(2005). *Enterobacter sakazakii* Coliform of increased concern to infant health .Int J.Food Microbial. 04:1-34.

Jenny ,B .,and Peter, K, BE., (2007).WHO initiatives for the control of *Enterobacter sakazakii* FSA Meeting on the Microbiological safety of powdered infant

Eschericha coli :O157:H7 App.Environ.Microbiol.67(7):3053-7.

Muytjens, H,L.,Roelos-Willemse, H.,and Jaspar,G,H.(1988):Quality of Powdered substitutes for milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae .J.Clin.Microbiol.26:743-746.

Mullane,N.,Iversen,C.B., Healy,B., Walsh,C., Whyte,P., Wall,G,P., Quinn,T.,and Fanning ,S. (2007). *Enterobacter sakazakii*: an emerging bacterial pathogen with implications for infant health. Minerva Pediatr. 59:137-148.

Mukadderat,G., Kemal,K,T., Umit,G.,(2010)Persence of Enterobacter sakazakii in Milk Powder, Whey Powder andWhite Cheese Produced in Konya.Kafkas UnivVet FakDerg 16(Suppl-A): S163-S166.

Shaker,R., Osali, T., Al-Omary,W., Jaradat,Z., Al-Zuby,M. (2006).Isolation of a *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacter sp. from food and food production environments.Food. Control. 18: 1241 – 1245.

formula *Enterobacter sakazakii* London ,UK, January 18th .

Kandhai, M, C., (2010) .Detection, occurrence, growth and inactivation of Cronobacter (Enterobacter sakazakii),Ph.D Thesis,Wageningen University,Wageningen.

Kandhai,M,C., Reij,W,M., VanPuyvelde,K., GuillaumeGentil,O., Beumer,R,R.,and VanSchothorst, M. , (2004).A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples.J. Food Prot. 67: 1267-1270.

Kinji,O**.,** Katsunori., Motonobu,H.andMasafuni,F,.(2010)Powder Infant Formula Milk Contaminated with *Enterobacter sakazakii* .Jpn.J.Infect.Dis.,63,103-107.

Lehner,A,S., Riedel ,K., Rattei,T., Ruepp,A., Frishman,D., Breeuwer,P., Diep,B .,Eberl, L., Stephan ,R.(2006). Molecular characterization of the α-glucosidase activity in *Enterobacter sakazakii* reveals the presence of a putative gene cluster for palatinose metabolism. Systematic and Applied Microbil. 29: 609 – 625.

LeJeune, J,T., Besser, T, E.,and Hancok ,D ,D ., (2001) Cattle water troughs as reservoirs of