

Isolasi dan Identifikasi *Enterobacter sakazakii* pada Susu Mentah dan Produk Susu Segar di Daerah Istimewa Yogyakarta

Isolation and Identification of *Enterobacter sakazakii* in Raw Milk and Fresh Dairy Products in the Special Region of Yogyakarta

Tri Yahya Budiarto, Hutri Catur Sad Winarni

Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta
Email: yahya@staff.ukdw.ac.id

Abstract

Enterobacter sakazakii is an opportunistic pathogen that causes infections such as *necrotizing enterocolitis*, *bacteremia*, and *meningitis* which, in many cases, have been associated with the consumption of powdered infant formula. Raw milk has been considered to be a potential source of contamination. The aim of this study was to detect and identify the presence of *E. sakazakii* in raw milk from local farms and fresh dairy products sold by street vendors and cafés in the Special Region of Yogyakarta. A total of 80 milk samples were cultured in *Enterobacteriaceae* Enrichment Broth. The cell cultures were then enumerated on *Tryptone Soya Agar* and *Chromocult Coliform Agar*. For the isolation of suspect colonies, *Chromogenic Druggan-Forsythe-Iversen* (DFI) Agar was used. Presumptive colonies of *E. sakazakii* were characterized biochemically using API 20E and molecularly through the amplification of the 16S rRNA gene using primer pairs 16_SUNI-L/Saka-2b and ESA-1/16_SUNI-R. Based on the α -glucosidase test of DFI Agar, only 9 isolates out of the 80 samples were identified as suspected *E. sakazakii*. Biochemical and molecular identification suggested that 5 isolates resulted positive for *E. sakazakii*, while the other 4 were *Pantoea* spp1.

Keywords : isolation, identification, *E. sakazakii*, raw milk, fresh milk

Abstrak

Enterobacter sakazakii adalah bakteri patogen penyebab infeksi seperti *necrotizing enterocolitis*, *bacteremia*, dan *meningitis* yang banyak ditemukan karena mengonsumsi susu formula bayi. Sumber kontaminasinya diduga kuat berasal dari susu mentah. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi ada tidaknya kontaminasi *E. sakazakii* pada susu mentah yang berasal dari kelompok peternak sebelum disetorkan ke pabrik pengolahan susu dan susu segar yang dijual oleh pedagang kaki lima (PKL) dan café-café yang ada di Daerah Istimewa Yogyakarta. Sampel susu sebanyak 80 ditumbuhkan dalam medium pengkayaan *Enterobacteriaceae* Enrichment Broth, kultur sel kemudian dienumerasi ke dalam medium *Tryptone Soya Agar* dan *Chromocult coliform Agar*. Koloni tersangka yang tumbuh kemudian diseleksi ke medium *Chromogenic Druggan-Forsythe-Iversen* (DFI) Agar. Isolat teridentifikasi *typical E. sakazakii* kemudian dikarakterisasi secara biokimiawi menggunakan API 20E dan molekuler menggunakan primer 16_SUNI-L/Saka-2b dan ESA-1/16_SUNI-R untuk gen 16S rRNA. Hasil penelitian dari 80 sampel susu hanya ditemukan 9 isolat tersangka *E. sakazakii* berdasarkan hasil pengujian positif α -glukosidase pada medium DFI Agar. Hasil identifikasi secara biokimia dan molekuler diperoleh 5 isolat yang positif *E. sakazakii* dari sampel yang berbeda dan 4 isolat lainnya teridentifikasi sebagai *Pantoea* spp1.

Kata kunci: isolasi, identifikasi, *E. sakazakii*, susu mentah, susu segar

Pendahuluan

Kabupaten Sleman Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY) memiliki sentra peternakan sapi perah yang menghasilkan susu mentah untuk disetorkan ke pabrik dan diolah menjadi produk susu segar oleh pedagang kaki lima (PKL) dan *café-café*. Susu segar sangat diminati oleh sebagian besar penduduk Yogyakarta terutama pelajar dan mahasiswa. Susu sapi mengandung nutrisi yang tinggi seperti : lemak, protein (*casein*, *whey*), karbohidrat (laktosa), asam amino, minerals terutama calcium yang sangat dibutuhkan tubuh untuk pertumbuhan. Namun kandungan nutrisi yang tinggi juga sangat baik untuk pertumbuhan mikrobial pembusuk dan patogen (Haug *et al.*, 2007; Lehner *et al.*, 2006). Beberapa bakteri yang sering ditemukan pada susu mentah diantaranya : *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Camphylobacter*, *Salmonella* (Hill *et al.*, 2012).

Enterobacter sakazakii adalah bakteri *opportunistic pathogens* yang dapat menyebabkan infeksi seperti *necrotizing enterocolitis*, *bacteremia*, *meningitis*, dan *septicemia* khususnya pada bayi. Tingkat kematiannya mulai dari 33 - 80% telah dilaporkan untuk pasien yang terinfeksi (Lai *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2012). Kasus kematian bayi dari berbagai negara dari tahun 1958-2004 karena mengkonsumsi susu formula yang terkontaminasi *E. sakazakii* selalu terjadi (Quinn *et al.*, 2009). Selain susu bayi kasus kontaminasi juga ditemukan pada berbagai produk pangan, minuman, produk cereal dan cereal bayi, tepung gandum, rempah-rempah, sayuran dan buah-buahan (Jaradat *et al.*, 2009; Lou *et al.*, 2014).

Susu mentah dan produk susu segar di DIY berasal dari kelompok peternak yang sebagian besar proses pemerahannya bersifat tradisional menggunakan tangan. *Enterobacter sakazakii* sebagai anggota famili *Enterobacteriaceae*

mempunyai habitat alami pada saluran pencernaan sapi perah. Namun demikian beberapa juga ditemukan pada tanah, air, pakan dan kotoran yang berasal dari saluran usus sapi. Produk susu mentah maupun susu segar mudah terkontaminasi *E. sakazakii* selama proses pemerahan susu. Sanitasi kandang dan kebersihan pekerja yang masih buruk, peralatan yang digunakan dan tempat penyimpanan sangat memungkinkan susu mentah dan susu segar di DIY terkontaminasi *E. sakazakii*.

Enterobacter sakazakii adalah bakteri Gram negatif bentuk batang anggota dari famili *Enterobacteriaceae*, genus *Enterobacter*. Pada awalnya bakteri ini dikenal sebagai “*yellow-pigmented cloacae*,” yang telah direklasifikasi menjadi *E. sakazakii* tahun 1980 berdasarkan pada perbedaan reaksi biokimia, produksi pigmen, DNA-DNA hibridisasi dan kerentanannya terhadap antibiotik dibandingkan dengan *Enterobacter cloacae* (Farmer *et al.*, 1980). Selanjutnya diusulkan kembali menjadi genus baru *Cronobacter* berdasarkan hasil analisis profil DNA melalui pengujian *Ribotyping* dan *Amplification fragment length polymorphism* (AFLP) yang mampu membedakan pada tingkat spesies dan subspecies (Iversen, 2007; 2008). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi ada tidaknya cemaran *E. sakazakii* pada susu mentah dan produk susu segar yang dijual oleh PKL dan *café-café* yang ada di DIY melalui isolasi dan identifikasi secara biokimia dan molekuler.

Materi dan Metode

Jumlah total sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 80 terdiri dari 30 sampel susu mentah dari tempat penampungan susu kelompok peternak di Kabupaten Sleman, yang diambil setiap hari selama 30 hari. Sampel produk susu segar sebanyak 50 sampel diperoleh dari pedagang kaki lima dan *café* susu yang ada di kota Yogyakarta

dengan pengambilan 5 sampel dari lima stasiun setiap hari.

Sampel susu mentah diencerkan dalam air pepton 0,1% kemudian ditumbuhkan dalam medium *Tryptone Soya Agar* (TSA) dan *Chromocult Coliform Agar* (CCA) kemudian diinkubasi pada suhu 25°C (suhu kamar) selama 48 jam. Untuk sampel susu segar yang telah mengalami perlakuan panas terlebih dahulu ditumbuhkan dalam medium pengkayaan *Enterobacteriaceae Enrichment Broth* (EEB) selama satu malam. Kultur sel kemudian ditumbuhkan dalam medium TSA dan CCA. Semua koloni tersangka *E.sakazakii* pada medium TSA memberikan kenampakan warna kuning dan koloni *Enterobacter* memberi kenampakan warna merah (FDA, 2002; Manafi, 2003; Rattanabumrung, *et al.*, 2012). Koloni tersangka kemudian diseleksi ke medium *Chromogenic Druggan-Forsythe-Iversen* (DFI) *Agar*. Koloni tersangka *E.sakazakii* akan berwarna biru kehijauan setelah ditumbuhkan selama 24 jam (Iversen and Forsythe, 2004). Koloni kemudian dimurnikan menjadi isolat tunggal untuk kemudian dikonfirmasi dengan pengujian biokimia menggunakan API 20 E (bioMerieux). Pengujian dengan Uji API 20E dilakukan dengan terlebih dahulu memasukkan ± 5 ml aquades steril ke dalam *tray*, kemudian strip API diletakkan di dalam *tray*. Suspensi sel kemudian dinokulasi ke dalam *microtubes*. Pada medium CIT, VP, GEL diisi hingga *microtube* penuh. Untuk *microtube* yang

diberi garis bawah (ADH, ODC, H2S, URE) setelah diinokulasi ditambahkan *mineral oil* agar kondisi pengujian bersifat anaerob. Sedangkan pada medium yang lainnya diisi hingga batas *tubes*. Perangkat API 20E kemudian diinkubasikan pada suhu 35-37°C selama 18-24 jam, kemudian ditambahkan reagen pada beberapa *microtubes* sesuai dengan petunjuk pengujian. Hasil pengujian ditabulasi dan datanya diolah menggunakan software APIWEB untuk mengetahui nama bakteri secara akurat berdasarkan referensi dari Biomerieux.

Isolat hasil pengujian API 20E yang positif *E.sakazakii* kemudian dilanjutkan dengan pengujian molekuler dengan mendeteksi gen 16S rRNA. Deteksi molekuler diawali dengan tahapan isolasi DNA terlebih dahulu. DNA yang berhasil diisolasi dilakukan pengujian dengan menggunakan elektroforesis. Gen 16S rRNA *E.sakazakii* diamplifikasi dengan menggunakan dua tahapan PCR. Dua metode PCR untuk identifikasi *E. sakazakii* dikembangkan berdasarkan perbedaan sekuen pada *hypervariable* region V1, V2, dan V3 antara *E. sakazakii* dan *Enterobacteriaceae* lainnya. Untuk mengamplifikasi segmen pertama yang berukuran 977 bp digunakan primer 16 SUNI-L dan Saka-2b. Untuk amplifikasi segmen berikutnya (408 bp), digunakan primer ESA-1 dan 16SUNI-R (Hassan *et al.*, 2007; Desty *et al.*, 2012). Untuk kontrol positif digunakan *Enterobacter sakazakii* ATCC 51329TM. Pasangan primer yang digunakan disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Primer untuk amplifikasi gen 16S rRNA *E.sakazakii*

Pasangan primer	Sekuen Oligonukleotida	Posisi penempelan primer target amplifikasi
16 SUNI-L Saka-2b	AGAGTTTGATCATGGCTCAG TCCCGCATCTCTGCAGGA	Segmen 1 (977 bp)
ESA-1 16 SUNI-R	AATCCTGCAGAGATGCG GTGTGACGGGCGGTGTGTAC	Segmen 2 (408 bp)

Deteksi molekuler dengan PCR dilakukan menggunakan 50 µl campuran reaktan yang terdiri dari 25 µl PCR *Master Mix* (Fermentas), 1 µl primer forward, 1 µl primer reverse, 1 µl DNA bakteri, dan 22 µl dH₂O. Protokol PCR yang digunakan adalah pre-denaturasi (94°C, 4 menit), denaturasi (94°C, 50 detik), *annealing* (57°C, 1 menit), *extention* (72°C, 50 detik) dan *post-extention* (72°C, 4 menit) dengan siklus sebanyak 30 kali. Sebanyak 5 µl hasil PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1.0% (w/v) dengan menggunakan bufer 1x TBE dengan pewarna SYBR *safe green* pada voltase 80.

Hasil dan Pembahasan

Proses isolasi dan identifikasi cemaran *E.sakazakii* pada sampel susu mentah dari kelompok peternak dan susu segar dari PKL dan café-café mengalami perbedaan perlakuan. Sampel susu mentah langsung ditumbuhkan pada medium TSA dan CCA. Untuk susu segar, sel mengalami *injury* selama perlakuan pemanasan sehingga harus ditumbuhkan dahulu pada medium pengkayaan EEB selama satu malam. Untuk enumerasi koloni tersangka *E. sakazakii* semua sampel ditumbuhkan pada medium TSA dan CCA. Pada medium TSA akan memberikan kenampakan warna kuning. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 177 strain *E.sakazakii* 100% tumbuh baik dan hanya 2% yang tidak memberi kenampakan warna kuning pada medium TSA. Ekspresi warna kuning sangat baik pada suhu inkubasi 37°C dan hanya 1% strain *E.sakazakii* yang mampu tumbuh pada 44°C (Iversen and Forsythe, 2007). Hal ini juga didukung dengan hasil penelitian Chen, *et al.*, (2010) bahwa tidak semua strain *E.sakazakii* menghasilkan pigmen kuning pada medium TSA.

Untuk mendapatkan hasil yang lebih baik pada penelitian ini juga digunakan medium CCA yang dapat menumbuhkan kelompok bakteri yang termasuk

dalam famili *Enterobacteriaceae* dengan baik. Medium CCA mengandung Salmon-GAL dan *X-Glucuronide*. Kelompok bakteri dari famili *Enterobacteriaceae* dapat dibedakan berdasarkan kenampakan koloni yang tumbuh. Bakteri yang memiliki gen pengkode sintesis enzim β-galaktosidase dapat menggunakan substrat Salmon-GAL untuk tumbuh dan berkembang membentuk koloni. Kelompok bakteri tersebut adalah genus *Enterobacter* sp, *Citrobacter* sp dan *Klebsiella* sp. Bakteri dari kelompok positif β-galaktosidase memberikan kenampakan yang berbeda dari genus lainnya yaitu pertumbuhan koloninya merah salmon. Sedangkan genus yang tidak mampu menggunakan substrat Salmon-Gal tetapi mampu mengekspresikan β-glukoronidase dapat menggunakan substrat *X-Glucuronide* akan memberikan kenampakan koloni biru terang. Untuk kelompok yang positif β-galaktosidase dan β-glukoronidase akan memberikan kenampakan koloni biru gelap, yaitu *Escherichia* sp (Manafi, 2003; Rattanabumrung, *et al.*, 2012).

Semua koloni tersangka *E.sakazakii* dari medium TSA dan CCA dari semua sampel sampel susu didapatkan 4.874 koloni. Semua koloni diseleksi dalam medium DFI *Agar* untuk membedakan *E. sakazakii* dari koloni *Enterobacter* lainnya. Medium DFI *Agar* adalah medium *chromogenic* yang memiliki spesifitas yang tinggi untuk menumbuhkan *E. sakazakii*. Media ini mengandung substrat *chromogen* yaitu 4-chloro-indolyl-α-D-glucopyranoside.

Enterobacter sakazakii memiliki karakter yang spesifik yang berbeda dengan spesies lain dalam genus *Enterobacter* sp. Bakteri ini memiliki gen yang mengkode ekspresi enzim α-glukosidase. Enzim ini bersifat khas hanya dimiliki oleh *E.sakazakii* dalam genus *Enterobacter*. Hasil penelitian Muyjens *et al.*, (1984) pada 129 strain *E.sakazakii* menunjukkan 100% positif memiliki aktivitas enzim α-glukosidase dan tidak dimiliki oleh strain *Enterobacter* lainnya. Hasil pemecahan substrat *chromogenic* ini menghasilkan koloni berwarna hijau-biru setelah

diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Iversen and Forsythe, 2007). Seleksi isolat tersangka *E.sakazakii* menggunakan DFI Agar karena medium ini memiliki sensitivitas 100% dan spesifitas 87,2%. Hasil pertumbuhan dari 95 strain *E.sakazakii* pada medium DFI Agar semua menghasilkan warna hijau-biru. Secara umum anggota dari famili *Enterobacteriaceae* memberikan kenampakan warna putih pada medium DFI Agar, kecuali *Serratia spp* (pink-merah), *Escherichia hermannii* (kuning), dan strain *Salmonella enterica*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia*, *Citrobacter*, *Serratia marcescens* memberikan kenampakan warna abu-abu sampai hitam (Iversen *et al.*, 2004).

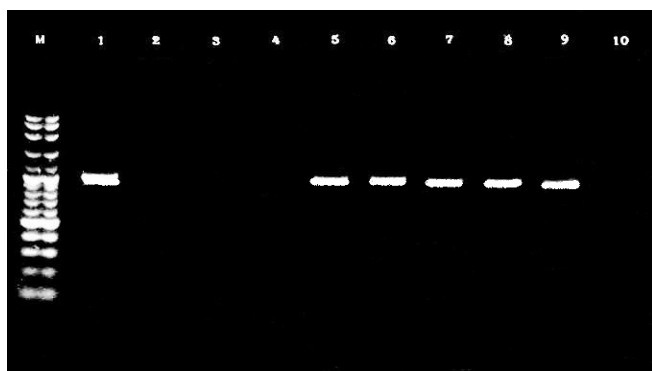
Semua koloni yang diseleksi pada medium DFI Agardari 4.874 koloni hanya ditemukan 9 isolat yang memiliki kenampakan tipikal hijau-biru yang dicurigai sebagai *E.sakazakii*. Isolat *typical E.sakazakii* hasil seleksi dari medium DFI agar kemudian dikonfirmasi dengan uji API 20E untuk memastikan *E.sakazakii* atau bukan. Hasil identifikasi biokimiawi dengan perangkat API 20E menunjukkan bahwa dari sembilan isolat tersangka, lima di antaranya teridentifikasi sebagai *E.sakazakii*. Hasil pengujian menunjukkan kemiripan karakter secara biokimia dengan %ID sebesar 98,4% (Gambar 1).

Isolat yang lainnya teridentifikasi sebagai *Pantthoea spp1* dengan %ID sebesar 95,7%-97,1%. Identifikasi menggunakan API 20E ditentukan oleh besarnya %ID dan T indeks. Pada penelitian ini, semua isolat menunjukkan besarnya %ID ≥ 90 dan T ≥ 0.25 sehingga hasil identifikasi dapat diterima. Hasil positif palsu pada isolat yang teridentifikasi sebagai *Pantthoea spp1* menunjukkan bahwa selain *E.sakazakii* juga ada strain lain yang juga positif α -glukosidase sehingga memberikan kenampakan biru-hijau pada medium DFI Agar. Hasil penelitian lain juga menyimpulkan adanya strain yang memberikan kenampakan biru-hijau seperti : *Escherichia vulneris*, *Pantthoea spp* dan *Citrobacter koseri* (Iversen *et al.*, 2004; Leunshner *et al.*, 2004).

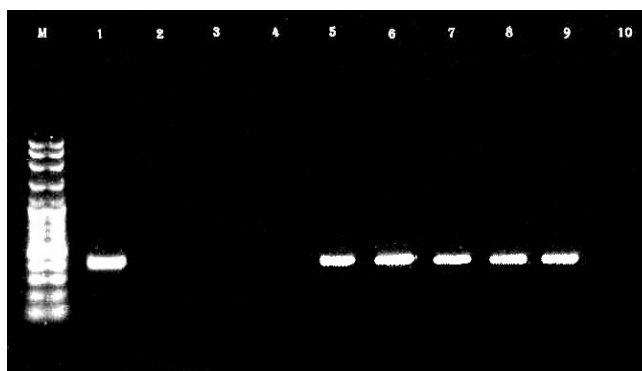
Isolat yang positif *E.sakazakii* dari hasil pengujian API 20E kemudian dilanjutkan identifikasi secara molekuler menggunakan PCR. Pengujian secara molekuler dilaksanakan dengan mendeteksi gen 16S rRNA menggunakan dua pasangan primer, yaitu 16_SUNI-L/Saka-2b dan ESA-1/16_SUNI-R. Pasangan primer 16_SUNI-L/Saka-2b dapat mengamplifikasi fragmen DNA berukuran 977 bp. Sedangkan amplifikasi menggunakan primer ESA-1/16_SUNI-R menghasilkan fragmen DNA berukuran 408 bp (Gambar 2). Dua metode PCR untuk

DOUBTFUL PROFILE							
Strip	API 20 E V4.1						
Profile	3 3 2 7 7 7 3 5 7						
Note	POSSIBILITY OF <i>Enterobacter cloacae</i>						
Significant taxa	% ID	T	Tests against				
<i>Enterobacter sakazakii</i>	98.4	0.17	TDA	0%	GEL	10%	SOR 8%
Next taxon	% ID	T	Tests against				
<i>Enterobacter cloacae</i>	1.2	0.0	TDA	0%	GEL	0%	III 12%
Complementary test(s)	YELLOW	ESC (HYD.)					
<i>Enterobacter cloacae</i>	0%	30%					
<i>Enterobacter sakazakii</i>	98%	100%					

Gambar 1. Hasil pengujian identifikasi isolate *typical E. sakazakii* menggunakan API 20E



Gambar 2(a). Hasil amplifikasi dengan pasangan primer 16_SUNI-L/Saka-2b. Lane M: DNA Marker 977 bp; lane no.1: positif kontrol (*E. sakazakii* ATCC 51329TM); lane no. 5-9 : pengujian isolat positif *E.sakazakii* dan positif *Pantoea* spp1 (lane no. 2, 3,4 dan 10).



Gambar2(b). Hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer ESA-1/16_SUNI-R. Lane M: DNA Marker 408 bp; lane no.1: positif kontrol (*E. sakazakii* ATCC 51329TM); lane no. 5-9 : pengujian isolat positif *E.sakazakii* dan positif *Pantoea* spp1 (lane no. 2, 3,4 dan 10).

identifikasi *E. sakazakii* dikembangkan berdasarkan perbedaan sekuen pada *hypervariable* region V1, V2, dan V3 antara *E. sakazakii* dan *Enterobacteriaceae* lainnya. PCR yang pertama menggunakan sepasang primer yang berlokasi pada V1/V3. Hasil amplifikasi ini akan menghasilkan amplicon DNA sebesar 977 bp yang memberikan hasil 100% positif hanya untuk *E. sakazakii*. Sedangkan PCR yang kedua menggunakan sepasang primer yang berlokasi pada V1/V2, menghasilkan amplicon DNA berukuran 408 bp yang menunjukkan hasil 100 % positif terhadap *E. sakazakii*, dan juga mendeteksi *Citrobacter koseri* dan *Salmonella enterica*.

Berdasarkan hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer 16_SUNI-L/Saka-2b diketahui bahwa kelima isolat tersangka *E. sakazakii* menghasilkan amplicon yang sama dengan kontrol positif yakni dengan ukuran 977 bp. Primer ini merupakan primer yang spesifik untuk membedakan *E. sakazakii* dengan bakteri lainnya dalam satu famili *Enterobacteriaceae*. Demikian juga dengan hasil amplifikasi menggunakan primer ESA-1/16_SUNI-R yang berukuran 408 bp (Hassan *et al.* 2007).

Hasil pengujian secara molecular dengan mendeteksi gen 16S rRNA menunjukkan bahwa 5 isolat yang teridentifikasi sebagai *E. sakazakii* secara

biokimia memiliki amplicon /fragmen DNA yang sama dengan kontrol positif *Enterobacter sakazakii* ATCC 51329TM.

Kesimpulan

Hasil enumerasi 80 sampel susu dari tempat penampungan kelompok peternak, PKL dan café-café di DIY diperoleh 4.874 koloni tersangka *E.sakazakii*. setelah melalui seleksi pada medium DFI *Agar* hanya ditemukan 9 isolat dari 9 sampel yang berbeda positif α -glukosidase. Hasil identifikasi secara biokimia dan molekuler hanya 5 isolat yang positif teridentifikasi sebagai *E.sakazaki* dan 4 isolat lainnya teridentifikasi *Pantoea* spp 1.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan Terima Kasih disampaikan kepada Kemenristek DIKTI yang telah memberikan dana penelitian melalui hibah bersaing tahun anggaran 2015-2016.

Daftar Pustaka

Chen, Y., Song, K.-Y., Brown, E. W., & Lampel, K. A. (2010) Development of an improved protocol for the isolation and detection of *Enterobacter*

sakazakii (*Cronobacter*) from powdered infant formula, *J. of Food Protec.* 73: 1016–1022.

- Desty, G., Dewanti Haryadi, R., Hidayat, S.H. (2012) Genetic relatedness of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolated from dried food products in Indonesia, *Int. Food Research Journal* 19: 1745–1749.
- Drudy, D., Wall, P. G., Mullane, N. R., Quinn, T., Wall, P. G., & Fanning, S. (2006) *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula, *Food Safety CID* 2006: 42996-1002. <http://doi.org/10.1086/501019>.
- Farmer III, J.J., Asbury, M.A., Hickman, F.W. Brenner, D.J. (1980) *Enterobacter sakazakii*: A New Species of “Enterobacteriaceae” Isolated from Clinical Specimens, *Int. J. of Syst. Bact.* 30: 569-584.
- FDA. (2002) Food Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from Dehydrated Powdered Infant Formula, <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114665.htm>.
- Hassan, A. A., Akineden, Ö., Kress, C., Estuningsih, S., Schneider, E., & Usleber, E. (2007) Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method, *I.J. Food. Micro.* 116: 214–220. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.011>.
- Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007) Bovine milk in human nutrition a review. *Lipids in Health and Disease, BMC* 6:25. <http://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>.
- Hill, B., Smythe, B., Lindsay, D., & Shepherd, J. (2012) Microbiology of raw milk in New Zealand, *I.J. Food. Micro.* 157: 305–308. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.031>.
- Iversen, C., Druggan, P., & Forsythe, S. (2004) A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study, *I.J. Food. Micro.* 96: 133–9. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.024>.
- Iversen, C., & Forsythe, S. (2004) Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products, *Food Micro* 21: 771–777. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.009>.
- Iversen, C., & Forsythe, S. J. (2007) Comparison of media for the Isolation of *Enterobacter sakazakii*, *AEM* 73: 48–52. <http://doi.org/10.1128/AEM.01562-06>.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Joosten, H. (2007) The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1, *BMC Evolutionary Biology* 7: 64. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/7/64>.
- Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B. D., Lehner, A., Fanning, S., Joosten, H. (2008) *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov., *I.J. of Syst. and Evolutionary Micro.* 58: 1442–1447. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.65577-0>.
- Jaradat, Z. W., Ababneh, Q. O., Saadoun, I. M., Samara, N. A., & Rashdan, A. M. (2009) Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing, *BMC Micro.* 9:225. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-9-225>.
- Lai, K.K. (2001) *Enterobacter sakazakii* Infections among Neonates, Infants, Children, and Adults

Case Reports and a Review of the Literature,
Medicine 80: 113-122.

- Lehner, A., Nitzsche, S., Breeuwer, P., Diep, B., Thelen, K., & Stephan, R. (2006) Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection, *BMC Micro.* 6: 15. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-6-15>.
- Leuschner, R. G. K., Baird, F., Donald, B., & Cox, L. J. (2004) A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula, *Food Micro.* 21: 527–533. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2003.12.002>.
- Lou, X., Si, G., Yu, H., Qi, J., Liu, T., & Fang, Z. (2014) Possible reservoir and routes of transmission of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) via wheat flour, *Food Control* 43: 258–262. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.029>.
- Manafi, M. (2003) Media for detection and enumeration of “total” *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* from water and foods, *Handbook of Culture Media for Food Microbiology* p:167–193. [http://doi.org/10.1016/S0079-6352\(03\)80015-2](http://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80015-2).
- Muytjens, H. L., J. van Spaceder Ros-van de Repeqq, and H. A. M. van Druten. (1984) Enzymatic Profiles of *Enterobacter sakazakii* and Related Species with Special Reference to the α -Glucosidase Reaction and Reproducibility of the Test System, *J. Clin. Microbiol.* 20:684–686.
- Rattanabumrung, O., Sangadkit, V., Supanivatin, P., & Thipayarat, A. (2012) Kinetics of *E.coli* colony area expansion and color development in Chromocult Coliform Agar (CCA) under different incubation conditions, *Procedia Engineering* 32: 134–140. <http://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1247>.
- Yan, Q. Q., Condell, O., Power, K., Butler, F., Tall, B. D., & Fanning, S. (2012) *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium, *J. of Applied Micro.* 113:1–15. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05281.x>