pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 6, pp. 439~444 (2016)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.6.439

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

조제분유와 건조호박에서 *Cronobacter* spp. 검출을 위한 두 가지 선택배지와 Real-time PCR의 비교검증

김홍석† · 신민정† · 천정환§ · 임종수 · 김영지 · 김동현 · 장호석 · 김현숙[1] · 엄애선[1] · 오덕환[2] · 송광영 · 서건호*
건국대학교 수의과대학 식품안전건강연구소, [1]한양대학교 생활과학대학 식품영양학과
[2]강원대학교 농업생명과학대학 식품생명공학과

Comparative Evaluation of Real-Time PCR and Conventional Culture Method Using Two Selective Agars for the Detection of *Cronobacter* spp. in Powdered Infant Formula and Dried Pumpkin

Hong-Seok Kim†, Minjung Shin†, Jung-Whan Chon§, Jong-Soo Lim, Young-Ji Kim, Dong-Hyeon Kim, Ho-Seok Chang, Hyunsook Kim[1], Ae-Son Om[1], Deog-Hwan Oh[2], Kwang-Young Song, and Kun-Ho Seo*
Center for One Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 05029, Korea
[1]Department of Food & Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University, Seoul, Korea
[2]Department of Food Science and Biotechnology, School of Bioconvergence Science and Technology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon, Korea
(Received July 22, 2016/Revised August 19, 2016/Accepted October 25, 2016)

ABSTRACT - In the present study, the performance of culture methods using two selective agars and real-time PCR were compared for selective isolation of *Cronobacter* in powdered infant formula and dried pumpkin. Two food samples were spiked with the pathogen and then preenriched in distilled water. A small portion of preenrichment (10 mL) was incubated in *Enterobacteriaceae* enrichment both, followed by inoculation onto Druggan-Forsythe-Iversen agar (DFI agar) and *Cronobacter sakazakii* chromogenic plating agar (R&F agar). The preenrichment and enrichment (1 mL each) was used in real-time PCR assay. In powdered infant formula (PIF), no statistical difference was observed between both culture methods and real-time PCR with preenrichemt ($p > 0.05$). However, the number of positives obtained by R&F agar and real-time PCR was much higher than that of culture method using DFI agar in dried pumpkin ($p < 0.05$). In particular, R&F agar yielded a significantly greater selectivity than DFI agar in dried pumpkin ($p < 0.05$). Real-time PCR and R&F agar, which are currently recommended by US FDA, could be used as an alternative detection tools for the isolation of *Cronobacter* in PIF and ingredient of child foods such as dried pumpkin that has high number of competing natural microflora.

Key words : *Cronobacter*, DFI agar, R&F agar, real-time PCR, detection

Cronobacter spp.(formerly *Enterobacter sakazakii*)는 자연에 널리 분포하고 있는 장내세균의 일종으로서 영유아에게 감염되어 괴사성장염, 뇌수막염, 패혈증 등의 심각한 증상을 야기할 수 있다[1-3]. 또한 *Cronobacter*는 영유아 외에 면역부전환자 및 고령자에게도 기회감염을 통해 질병을 야기할 수 있는 것으로 알려져 있다[4]. 현재 *Cronobacter*가 가장 문제가 되는 식품은 영아용 조제분유이며 각국의 공인검출규격에서는 해당 식품에 대하여 엄격한 *Cronobacter* 불검출 규격을 적용하고 있다[5-7]. 한국의 경우, 식품의약품안전처에 따르면 2006년부터 이유식의 안전관리를 위해 *Cronobacter*균의 불검출 규격이 적용되었으며 지속적인 모니터링을 수행하고 있다[8].

조제분유를 포함한 영유아식품이 오염되는 경로는 다양한데 크게 나누어 외부적 경로(extrinsic routes)와 내부적 경로(intrinsic routes)를 통해 이루어진다. 외부적 경로는

†Both authors contributed equally to this work.
§Current address: Division of Microbiology, National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, Jefferson, AR, USA
*Correspondence to: Kun-Ho Seo, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 05029, Korea
Tel: 82-2-450-4121, Fax: 82-2-3436-4128
E-mail: bracstu3@konkuk.ac.kr

처리장비의 오염을 비롯하여 위생적이지 못한 처리과정이 원인이다. 반면 내부적 경로(intrinsic routes)를 통한 오염은 원료나 첨가제로 들어가는 물질, 예를 들자면 건조된 야채, 곡물, 해산물 등이 가공 전에 이미 오염되어 완제품까지 오염되는 경우이다[5,9]. 영유아식품의 오염 원인이 원료의 오염과 연관되어 있는 경우가 많기 때문에, *Cronobacter*의 모니터링과 관련된 최근의 연구에는 조제분유 외에도 원료로 사용될 수 있는 다양한 식품들도 포함된다[5,10]. 특히 *Cronobacter*는 건조 조건에서 강한 저항력을 보이며 생존하는 경우가 많아, 건조 마늘, 건조 호박, 건조 고추 등의 건조식품 및 분말식품에서의 *Cronobacter* 검출법 및 모니터링 연구가 활발하게 진행되고 있다[10-13]. *Cronobacter*의 검출은 표준검출법인 식품공전 내 배지배양법을 기반으로 하고 있다[7]. 해당 검출법에 따르면 시료는 두 번의 증균과정을 거치는데 시료와 1:9로 희석된 멸균증류수(autoclaved distilled water; DW)에서 1차 증균 후, 증균액 10 mL를 90 mL의 *Enterobacteriaceae* enrichment (EE) Broth에 접종하여 2차 증균하게 된다. 이 후, 증균된 시료를 violet red bile glucose (VRBG) agar나 Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) agar등의 선택배지에 도말하고 확인동정을 수행하여 양성을 검출하고 있다. 그러나 이러한 방법은 배지를 이용한 검출법의 특성상 증균부터 확인동정까지 5-7일 가량의 긴 시간이 걸리며 노동력의 소모가 많은 단점이 있다[14-17].

최근 미국 Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (FDA BAM)에서는 두 종류의 크로모제닉 배지(chromogenic media), 즉 DFI 배지 및 *Cronobacter sakazakii* chromogenic plating agar (R&F) 배지와 real-time PCR을 활용한 *Cronobacter sakazakii* 검출법을 공식적으로 등재하였다[6]. 해당 검출법에서는 Real-time PCR을 screening 방법 외에도 확인동정에서 사용 하기 때문에 검출을 위한 시간과 노동력을 크게 줄일 수 있다. 특히 개선된 검출법에서 DFI 배지와 더불어 새롭게 등재된 R&F 배지는 크로모제닉배지의 일종으로서 chloro-3-indolyl-α,d-glucopyranoside라는 특이적인 크롬기질과 추가적인 항생제를 첨가하여 *Cronobacter*를 선택적으로 검출하는 것으로 알려져 있다[18,19]. 이처럼 국외 공인검출법에서 real-time PCR 같은 신속검출기법과 새로운 크로모제닉 배지 등, 신속하고 선택성 높은 검출기법을 적용하는 만큼 국내 식품공전에서도 이러한 방법을 도입하기 위한 검증이 필요하나 아직까지 그러한 연구는 매우 미비한 실정이다. 또한, 보다 복잡한 성상 및 많은 수의 상재균을 가짐으로써 검출능에 영향을 미칠 수 있는 원료 식품에서도 검증이 필요함에도 불구하고[15,17], 위의 *Cronobacter*를 대상으로 한 검출 방법들은 분유를 대상으로만 검증되었다[20].

본 연구에서는 국내 식품공전 기법에 real-time PCR을 활용하여 해당 기법을 screening method로 활용가능한지 평가하였으며, 동시에 FDA BAM에 새로 등재된 R&F 배지의 민감도와 선택성 등을 현행 식품공전에서 사용하고 있는 크로모제닉배지인 DFI 배지와 비교 검증하였다. 추가로 *Cronobacter*에서 가장 문제가 되는 조제분유와 조제분유 외에 영유아식품의 원료로 사용될 가능성이 있는 비교적 상재균 수가 많은 건조야채들 중 건조 호박을 시료로 선정하여 사용하였다.

Materials and Methods

사용된 균주

본 실험에 사용된 균주 정보는 Table 1에 제시되어 있다. *Cronobacter* 균주로 표준균주인 *C. sakazakii* KCTC 2949를 사용하였으며, 분리균주로 KU 식품안전연구소 보유 건조식품분리주 *Cronobater* 1-15, 2-14, 2-15, 3-21, 3-24, 3-27, 5-14, 5-15, 5-17, 5-20, 5-21, 6-15를 사용하였다. 두 가지 선택배지의 exclusivity test를 위한 non-*Cronobacter* 균주로 *Enteobacter aerogens* ATCC 13048, *Enterobacter aerogens*_5_14E, *Enterobacter clocae*_5_11G, *Enterobacter clocae*_5_14G, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 11775, *Salmonella* A106, *Shigella flexneri* ATCC 12026, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Listeria monocytogenes* ATCC 51776, *Listeria inocua* F120321, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 21768, *Bacillus cereus* ATCC14579균주를 사용하였다. 모든 균주는 −70°C에서 보관하던 균주를 nutrient agar (Oxoid, Hampshire, *UK*) 혹은 혈액배지(bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)에 도말하여 사용하였다.

순수배양액에서의 두 가지 배지의 inclusivity 및 exclusivity 평가

DFI 배지(Oxoid) 및 R&F 배지(R & F Laboratories, Downers Grove, IL, USA)의 inclusivity 및 exclusivity를 검증하기 위해 13개의 *Cronobacter* 균주와 15개의 non-*Cronobacter* 균주를 두 선택배지에 접종하였다. Nutrient agar에서 계대된 균주 1집락을 취하여 tooth-picking 방법으로 선택배지에 계대배양 한 후, 24시간 동안 37도에서 배양하였다. 배양 후 집락이 형성된 것(growth)과 집락이 형성되지 않은 것(no growth)을 구분하였으며, 집락이 형성된 경우 전형적인 양성집락형태(typical growth), 비양성집락형태(growth, but nontypical)로 구분하였다. *Cronobacter* 양성집락의 경우 DFI 배지에서는 청록색의 집락, R&F 배지에서는 blue-black 혹은 blue-gray의 집락색을 보이는 것으로 알려져 있다[6].

인위접종 실험에 사용된 식품 시료와 접종조건

인위적으로 균을 접종한 후 검출하는 방법(spiking)을 사용하여 검출법 간 비교를 수행하였으며, 앞선 본 연구팀의

Table 1. Inclusivity and exclusivity of two selective agars

Bacteria	Strain number	DFI agar[1)]	R&F agar[1)]
Inclusivity			
Cronobacter spp.	*C. sakazakii* KCTC 2949	TG	TG
	*Cronobater*_1_15	TG	TG
	*Cronobater*_2_14	TG	TG
	*Cronobater*_2_15	TG	TG
	*Cronobater*_3_21	TG	TG
	*Cronobater*_3_24	TG	TG
	*Cronobater*_3_27	TG	TG
	*Cronobater*_5_14	TG	TG
	*Cronobater*_5_15	TG	TG
	*Cronobater*_5_17	TG	TG
	*Cronobater*_5_20	TG	TG
	*Cronobater*_5_21	TG	TG
	*Cronobater*_6_15	TG	TG
Exclusivity			
Gram negative bacteria	*Enteobacter aerogens* ATCC 13048	NTG	NTG
	*Enterobacter aerogens*_5_14E	NTG	NTG
	*Enterobacter clocae*_5_11G	NTG	NTG
	*Enterobacter clocae*_5_14G	NTG	NTG
	Citrobacter freundii ATCC 8090	TG	NTG
	E. coli ATCC 25922	NTG	NTG
	E. coli ATCC 11775	NTG	NTG
	Salmonella A106	NTG	NTG
	Shigella flexneri ATCC 12026	NTG	NTG
Gram positive bacteria	*Enterococcus faecalis* ATCC 51299	NG	NG
	Listeria monocytogenes ATCC 51776	NG	NG
	Listeria inocua F120321	NG	NG
	Staphylococcus aureus ATCC 6538	NG	NG
	Bacillus cereus ATCC 21768	NG	NG
	Bacillus cereus ATCC14579	NG	NG

[1)]TG, typical growth; NTG, growth but non-typical shape of colony; NG, no growth

연구를 바탕으로 20개의 시료에 부분 양성 및 부분 음성이 나오게 하여 양성 검출률을 통계적으로 비교하였다[17,21]. 식품시료는 서울 광진구 소재의 대형마트에서 판매되는 조제분유와 건조호박을 구매하였다. 모든 접종실험은 시료당 20개씩 2회 반복하여 수행하였다.

500 g의 bulk 시료에 *C. sakazakii* KCTC 2949 약 10^1-10^2 CFU 접종한 후, 30분간 상온에서 정치하고 25 g씩 20개로 나누었다. 50 g을 따로 준비하여 25 g은 양성 대조군으로 하여 10^7 CFU 이상의 균을 접종하고, 나머지 25 g은 음성 대조군으로 하여 멸균증류수를 접종하였다. 접종과 동시에 동일 균량을 nutrient agar에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후 집락을 계수하여 접종량을 확인하였다.

배지검출법에 의한 *Cronobacter*의 검출

위에서 언급한 20개의 각 시료(각 25 g)에 멸균증류수 225 mL를 넣고 37°C에서 24시간 1차 증균배양하였다. 1차 증균배양액 10 mL를 90 mL의 EE broth (Oxoid)에 접종하고 37°C에서 24시간 재배양하여 2차 증균하였다. 증균액을 DFI 배지와 R&F 배지에 획선도말하였으며 37°C에서 24시간 배양한 후 양성 의심집락을 확인하여 nutrient agar에 계대배양 하였다. 양성 의심집락은 Vitek 2 GN kit를 사용하여 생화학적으로 최종 확인동정하였다. 또한 균이 접종되지 않은 각 음성 대조군의 경우, 증균 전 100 µL를 취해 10배수로 희석한 희석액을 nutrient agar에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하여 식품 내 정상세균총 수를 측정하였다.

Real-time PCR법에 의한 *Cronobacter*의 검출

Real-time PCR 법을 시행하기 위해 1차 증균된 DW 및 2차 증균된 EE broth에서 1 mL 취하여 Seo 등의 앞선 연

구를 참조하여 DNA를 추출하였다[22]. 채취한 1 mL를 3분간 14,000 rpm에서 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 lysis buffer인 PrepMan Ultra (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 200 μL를 넣어주었다. Pellet이 잘 풀리도록 10초 이상 vortexing하고 100ºC에서 10분간 가열해주었다. 시료는 2분간 상온에서 식힌 후, 3분간 14,000 rpm에서 원심분리하고 50 μL의 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 DNA를 분리하였다. 추출된 DNA는 −20ºC에 보관하여 real-time PCR 법을 수행할 때 사용되었다.

Real-time PCR 수행을 위한 primers/probe의 서열 및 세부조건은 미국 FDA BAM에서 사용되는 방법과 동일하게 하였다. 해당 서열은 *macromolecular synthesis* (MMS) operon gene을 표적유전자로 하여 개발된 시퀀스로서 Seo 등[22]에서 제시되어 있다. 각 반응액의 조성은 TaqMan® universal PCR master mix (Applied Biosystems) 12.5 μL, forward and reverse primer (900 nM) 각각 2.5 μL, probe (250 nM) 2.5 μL, 샘플 DNA 5 μL로 총량을 25 μL로 하였다. ABI PRISM 7500HT sequence detection system (Applied Biosystems)을 사용하여 50ºC에서 2분, 95ºC에서 10분간 반응시킨 후 95ºC에서 15초, 60ºC에서 1분을 1회로 반응조건을 맞추어 40 cycles를 반응시켰다. Real-time PCR의 판정은 Ct 값이 38이하인 경우이면서, 곡선이 S자형(sigmoid)의 증폭양상을 보이는 경우에 양성으로 판정하였다.

통계적 분석

순수배양액에서 두 배지간 inclusivity/exclusivity 차이와 식품접종 시 각 기법간 검출률 및 선택성의 차이의 결과분석은 GraphPadInstat (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA) 프로그램을 사용하였으며 Fishers exact test로 양성검출률의 통계학적인 유의차($p < 0.05$)를 분석하였다. 상호간에 유의차가 있는 값은 각각 다른 알파벳으로 표시하였다.

Results and Discussion

순수배양액에서의 두 가지 배지의 inclusivity 및 exclusivity 평가

두 가지 선택배지의 inclusivity 및 exclusivity를 비교한 결과는 Table 1에 제시되어 있다. 두 가지 선택배지는 모든 *Cronobacter*를 양성으로 검출하여 동일한 민감도를 가지고 있는 것으로 확인되었다(13개 시료 중 13개, 100%; Table 1). 한편 그람음성의 non-*Cronobacter*의 경우, 두 배지에서 모두 집락의 성장을 보였으나, *Cronobacter*와는 구분되는 집락 형태를 보였다. 다만 *Citrobacter*의 경우, DFI 배지에서는 *Cronobacter* 형태의 집락형성을 보였으나(typical growth), R&F 배지에서는 *Cronobacter*와 구분되는 집락형태를 보였다(non-typical growth). DFI 배지의 선택성은 α-glucosidase에 의존하는데 대부분의 *Citrobacter*가 해당 효소를 가지고 있다고 보고된 바 있다[23]. 따라서 *Citrobacter* 또는 해당효소를 가지는 세균에 오염된 시료를 검사할 경우, 위양성 결과를 나타낼 가능성이 클 것으로 사료된다. 그람 양성의 경우 두 가지 선택배지 모두 그람음성균은 *Cronobacter* 검출을 위해 최적화된 배지인만큼 실험에 사용된 균을 대부분 억제하는 양상을 보였다.

실제 식품시료에서의 검출법간 비교

실제 식품 시료에서 두 가지 선택배지와 real-time PCR 기법간 양성검출률을 비교한 내용은 Table 2에 제시되어 있다. 분유에서 DFI 배지 65%(40개 시료 중 26개), R&F 배지 60%(40개 시료 중 24개), 1차 증균 후 real-time PCR 53%(40개 시료 중 21개), 2차 증균 후 0%(40개 시료 중 0개)를 보여 DFI 배지를 사용한 배지검출법이 가장 높은 검출률을 보였으며, 2차 증균 후 real-time PCR로 검출하는 경우를 제외하고는 유의적인 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 그러나 건조호박에서는 R&F 배지 60%(40개 시료

Table 2. Comparison of the number of *Cronobacter* positive samples between the standard culture method using two selective agars and the real-time PCR in artificially inoculated infant formula and dried pumpkin

Sample	Trial	Inoculum (CFU / 500 g)	No. of positives/ No. of total samples (%)			
			Culture method		Real time PCR	
			DFI agar	R&F agar	1st enrichment	2nd enrichment
Infant formula [1)]	1	60	7/20 (35)^{A}	6/20 (30)^{A}	4/20 (20)^{AB}	0/20 (0)^{B}
	2	100	19/20 (95)^{A}	18/20 (90)^{A}	17/20 (85)^{A}	0/20 (0)^{B}
Subtotal			26/40 (65)^{A}	24/40 (60)^{A}	21/40 (53)^{A}	0/40 (0)^{B}
Dried pumpkin [1)]	1	145	0/20 (0)^{A}	7/20 (35)^{B}	8/20 (40)^{B}	4/20 (20)^{AB}
	2	175	2/20 (10)^{A}	17/20 (85)^{B}	14/20 (70)^{B}	2/20 (10)^{A}
Subtotal			2/40 (5)^{A}	24/40 (60)^{B}	22/40 (55)^{B}	6/40 (15)^{AB}
Total			28/80 (35)^{A}	48/80 (60)^{B}	43/80 (53.8)^{B}	6/80 (7.5)^{C}

[1)]Values followed by different uppercase letters (A, B) in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

중 24개), 1차 증균 후 real-time PCR 55%(40개 시료 중 22개), 2차 증균후 15%(40개 시료 중 6개) DFI 배지 5%(40개 시료 중 2개)를 보여 R&F 배지를 사용하거나 1차 증균 후 real-time PCR을 사용하는 경우 다른 방법에 비해 유의적으로 높은($p < 0.05$) 검출률을 나타냄을 확인하였다.

일반적으로 2차 증균은 1차 증균에 비해 더 선택적이기 때문에 목적균의 농도가 더 높아 검출률을 향상시키기 위해 필요하다. 그러나 본 실험에서는 2차 증균액을 사용한 real-time PCR 기법이 1차 증균액 사용보다 더 낮은 검출률을 보였다. 이러한 경향은 *Salmonella* 및 *Cronobacter*의 검출과 관련한 앞선 연구들과도 일치하는 결과로서, 2차 증균배지에 들어있는 ox bile 및 brilliant green 등의 그람양성균 억제물질이 PCR 반응의 inhibitor로 작용하기 때문인 것으로 보인다[14,24]. 실험결과 1차 증균 후 real-time PCR을 수행할 경우 DFI 및 R&F 배지를 사용한 검출법에 비해 유의차 없는 양성검출률을 보였다($p > 0.05$). 그러나 유의차가 없더라도 검출률 자체는 R&F를 사용한 배지검출법이 더 높았으므로, real-time PCR은 배지검출법을 보완하는 screening 방법의 형태로 적용하는 것이 좋을 것으로 보이며 특히 건조호박과 같은 비교적 성상이 복잡하고 상재균 수가 많은 원료에서 해당 균을 검출 시 활용도가 높을 것으로 보인다. 본 연구에서는 식품공전 내의 증균방법과 동일하게 1차 DW로 증균 후 2차 EE broth로 증균하였으나, 1차 증균 후 real-time PCR로 검출할 때 높은 양성검출률을 얻기 위해서는 현재 미국 FDA에서 사용중인 BPW를 비롯한 PCR inhibitor가 없는 다른 증균배지의 사용할 필요가 있다.

두 가지 선택배지는 분유에서는 유사한 수준의 검출능력을 보였으나, 건조호박에서는 R&F 배지가 유의적으로 높은 검출률을 보였다($p < 0.05$, Table 2). 이러한 검출률의 차이는 두 가지 배지의 선택성 차이인 것으로 보인다. 배지간 선택성의 차이는 앞선 연구를 참고하여[25], *Cronobacter* 외에 다른 경쟁집락이 오염된 배지(plate)의 수를 세어 비교하였으며 해당 결과는 Table 3에 제시되어 있다. 분유에서는 두 배지 모두 경쟁집락에 의한 오염이 없었으나, 건조호박에서는 DFI가 R&F 배지에 비해 유의적으로 오염된 배지가 더 많이 발견되었다(DFI, 40개의 시료 중 31개; R&F, 40개의 시료 중 11개; $p < 0.05$). 이러한 차이는 R&F 배지는 기존 DFI 선택배지에 비해 vancomycin 및 cefosulodin 등의 항생물질이 첨가되었기 때문으로 보인다[19]. 특히 호박 등의 야채시료는 살균과정을 거친 조제분유에 비해 더 높은 수준의 정상세균총을 가지기 때문에[15,17], 선택성의 차이가 더 두드러졌던 것으로 판단된다. 본 실험에서도 조제분유 및 건조호박의 정상세균총은 각각 < 10 CFU/g, 10^3 CFU/g 수준으로 위 선행연구와 동일한 경향을 보였다. 결국 경쟁집락을 적절하게 억제하지 못한 DFI 배지에서는 실제 *Cronobacter*의 선택적인 검출이 어려워 양성검출률이 크게 떨어진 것으로 판단되며, 이는 경쟁집락이 많은 시료일수록 선택성이 낮은 배지의 양성검출률이 크게 떨어진다는 Chon 등[25]의 연구와 일치한다. 특히 앞선 Gurtler 등[18]의 연구에 따르면 R&F 배지는 VRBG, DFI 배지에 비해 열/냉동/산/알칼리 등의 다양한 스트레스에 의해 영향을 받은 *Cronobacter*에서 유의적으로 더 높은 수준의 균 회복률을 보였다고 보고했으며, Restino 등[19] 역시 R&F 배지가 기존 다른 *Cronobacter* 선택배지에 비해 우수한 민감도와 특이도를 보인다고 보고하였다.

본 실험결과 real-time PCR과 R&F 배지는 건조호박에서 DFI 배지에 비해 우수한 검출능력을 보였다. 결론적으로 조제분유를 비롯한 다양한 영유아식품 원료에서 *Cronobacter* 검출률을 극대화하기 위해서는 R&F 배지 및 real-time PCR 기법 등을 상호 보완적으로 사용해야 할 것으로 판단된다. DFI 배지를 사용한 검출법은 유의차는 보이지 않았으나 분유에서 가장 높은 양성검출률을 보여 조제분유 검사시에 한하여 사용이 가능할 것으로 보인다.

Table 3. Comparison of the standard culture methods using two selective agars for non-*Cronobacter* in artificially inoculated infant formula and dried pumpkin

Sample (Level of background flora)	Trial	No. of plates positive for non *Cronobacter* / No. of total samples (%)	
		DFI agar	R&F agar
Infant formula[1)] (< 10 CFU/g)	1	0/20 (0)	0/20 (0)
	2	0/20 (0)	0/20 (0)
Subtotal		0/40 (0)	0/40 (0)
Dried pumpkin[2)] (10^3 CFU/g)	1	14/20 (70)^A	5/20 (25)^B
	2	17/20 (85)^A	6/20 (30)^B
Subtotal		31/40 (77.5)^A	11/40 (27.5)^B
Total		31/80 (38.8)^A	11/80 (13.8)^B

[1)]Statistical analysis is impossible in infant formula. At least one of these values must be positive.
[2)]Values followed by different uppercase letters (A, B) in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

Acknowledgement

이 논문은 2016년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단(No. 2015R1A2A2A05001288)의 지원을 받아 수행된 연구임.

국문요약

두 종류의 *Cronobacter* 선택배지(DFI agar, R&F agar)의 분유 및 건조호박 내 *Cronobacter*의 선택 분리능을 real-time PCR법과 함께 비교하였다. 분유에서의 *Cronobacter* 검출률은 세 가지 방법에서 유의적인 차이를 나타내지 않

았으나($p < 0.05$), 건조호박의 경우 R&F배지와 real-time PCR법이 DFI에서보다 유의적으로 높은 검출률을 보였다($p < 0.05$). 배지 간 선택성에 있어서도, R&F 선택배지는 건조호박에서 DFI에 비해 유의적으로 높은 선택성을 나타냈다($p < 0.05$). Real-time PCR 및 R&F배지의 사용은 분유뿐만 아니라, 건조 호박 등의 높은 경쟁세균총을 갖는 영유아식의 원료로 사용될 수 있는 식품군에서도 *Cronobacter*를 효과적으로 검출할 수 있는 방법으로 사료된다.

References

1. Burdette JH, Santos C.: *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging. *Pediatr. Radiol.,* **30**(1), 33-34 (2000).
2. Gallagher PG, Ball WS.: Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*. *Pediatr. Radiol.,* **21**(2), 135-136 (1991).
3. Liu Y, Cai X, Zhang X, Gao Q, Yang X, Zheng Z, Luo M, Huang X.: Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Microbiol. Meth.,* **65**(1), 21-31 (2006).
4. Lai KK.: *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. *Medicine*, **80**(2), 113-122 (2001).
5. Kim K, Jang SS, Kim SK, Park JH, Heu S, Ryu S.: Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. *Int. J. Food Microbiol.,* **122**(1), 196-203 (2008).
6. US Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 29, *Cronobacter* (2012) http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2-89378.htm (accessed December 13, 2016)
7. Korea Food and Drug Administration. Korea Food Code, Chapter 5-29, Ready-to-Eat and Convenience Foods (2013).
8. Korea Food and Drug Administration (2007). http://www.mfds.go.kr/index.do?seq=1151&mid=675 (accessed December 13, 2016).
9. Lee EJ, Kim SG, Yoo SR, Oh SS, Hwang IG, Kwon GS, Park JH.: Microbial Contamination by *Bacillus cereus, Clostridium perfringens*, and *Enterobacter sakazakii* in Sunsik. *Food Sci. Biotechnol.,* **16**(6), 948-953 (2007).
10. Chon JW, Song KY, Kim SY, Hyeon JY, Seo KH.: Isolation and Characterization of *Cronobacter* from Desiccated Foods in Korea. *J. Food Sci.,* **77**(7), 354-358 (2012).
11. Kandhai MC, Heuvelink, AE, Reij MW, Beumer, RR, Dijk R, van Tilburg JC, van Schothorst M, Gorris LG.: A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in The Netherlands between 2001 and 2005. *Food Cont.,* **21**(8), 1127-1136 (2010).
12. Lee EJ, Ryu TH, Park JH.: Tolerance of Korean *Cronobacter* spp. isolates to desiccation. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **41**(6), 681-686 (2009).
13. Song KY, Chon JW, Kim HS, Seo KH.: Current *Cronobacter* spp. Researches on Prevalence, Control, and Detection. *Korean J. Microbiol.,* **48**(4), 229-239 (2012).
14. Chon JW, Song KY, Kim SY, Hyeon JY, KimYG, Seo KH.: Comparison of Real-Time PCR and Conventional Culture Method for Detection of *Cronobacter* spp. in Powdered Foods. *Korean J. Microbiol.,* **47**(1), 87-91 (2011).
15. Chon JW, Hyeon JY, Hwang IG, Kwak HS, Han JA, Seo KH.: Comparison of Real-Time PCR and Culture Methods for Detection of *Campylobacter jejuni* in Various Foods. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **43**(1), 119-123 (2011).
16. Kim YK, Chon JW, Lee JH, Kwak HS, Hwang IG, Seo KH.: Comparison of Conventional Culture Method and Real-time PCR for Detection of *Yersinia enterocolitica* in Sausage and Vegetable Salad. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **45**(1), 133-136 (2013).
17. Hyeon JY, Hwang IG, Kwak HS, Park JS, Heo S, Seo KH.: Evaluation of an Automated ELISA (VIDAS®) and Real-time PCR by Comparing with a Conventional Culture Method for the Detection of *Salmonella* spp. in Steamed Pork and Raw Broccoli Sprouts. *Korean J. Food. Sci. Anim. Resour.,* **29**(4), 506-512 (2009).
18. Gurtler JB, Beuchat LR.: Performance of Media for Recovering Stressed Cells of *Enterobacter sakazakii* as Determined Using Spiral Plating and Ecometric Techniques. *Appl. Environ. Microbiol.,* **71**(12), 7661-7669 (2005).
19. Restino L, Frampton EW, Lionberg WC, Becker RJ.: A Chromogenic Plating Medium for the Isolation and Identification of *Enterobacter sakazakii* from Foods, Food Ingredients, and Environmental Sources. *J. Food Prot.,* **69**(2), 315-322 (2006).
20. Chen YI, Hammack TS, Song KY, Lampel KA.: Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration method for the detection and isolation of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula: precollaborative study. *J AOAC Int.,* **92**(3), 862-872 (2009).
21. Lee JH, Song KY, Hyeon JY, Hwang IG, Kwak HS, Seo KH.: Comparison of Standard Culture Method and Real-time PCR Assay for Detection of *Staphylococcus aureus* in Processed and Unprocessed Foods. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.,* **30**(3), 410-418 (2010).
22. Seo KH, Brackett RE.: Rapid, Specific Detection of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula Using a Real-Time PCR Assay. *J. Food Prot.,* **68**(1), 59-63 (2005).
23. Dominique C, Laurence M, Virginie P, Jose-Carlos F, Chantal B, Sylvain B.: Multilocus sequence analysis of the genus *Citrobacter* and description of *Citrobacter pasteurii* sp. nov. *Int. J. Syst, Evol. Microbiol*., **65**(5), 1486-1490 (2015).
24. Hyeon JY, Hwang IG, Kwak HS, Park C, Choi IS, Seo KH.: Evaluation of PCR inhibitory effect of enrichment broths and comparison of DNA extraction methods for detection of *Salmonella* Enteritidis using real-time PCR assay. *J. Vet. Sci.,* **11**(2), 143-149 (2010).
25. Chon JW, Hyeon JY, Yim JH, Kim JH, Song KY, Seo KH.: Improvement of Modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar by Supplementation with a High Concentration of Polymyxin B for Detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in Chicken Carcass Rinses. *Appl. Environ. Microbiol.,* **78**(5), 1624-1626 (2012).