

## 분말식품에서 *Cronobacter* spp. 검출을 위한 Real-Time PCR과 배지배양법의 비교검증

천정환<sup>1†</sup> · 송광영<sup>1†</sup> · 김선영<sup>1</sup> · 현지연<sup>1</sup> · 김윤경<sup>1</sup> · 황인균<sup>2</sup> · 곽효선<sup>2</sup> · 서건호<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>건국대학교 수의과대학, <sup>2</sup>식품의약품안전청 미생물과

### Comparison of Real-Time PCR and Conventional Culture Method for Detection of *Cronobacter* spp. in Powdered Foods

Jung-Whan Chon<sup>1</sup>, Kwang-Young Song<sup>1</sup>, Sun-Young Kim<sup>1</sup>, Ji-Yeon Hyeon<sup>1</sup>,  
Yun-Gyeong Kim<sup>1</sup>, In-Gyun Hwang<sup>2</sup>, Hyo-Sun Kwak<sup>2</sup>, and Kun-Ho Seo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea

<sup>2</sup>Division of Microbiology, Korea Food and Drug Administration, Cheong-won 363-951, Republic of Korea

(Received March 11, 2011 / Accepted March 21, 2011)

The aim of this study was to compare the performance of conventional culture and real-time PCR for detection of *Cronobacter* spp. in powdered foods. Infant formula, baby food and *Misugaru* inoculated with *Cronobacter* were enriched in distilled water as first enrichment step, followed by incubating in *Enterobacteriaceae* enrichment (EE) broth as second enrichment step. A loopful of enriched sample was streaked onto Druggan-Forsythe-Iversen agar, followed by incubating at 37°C for 24 h. One milliliter of the enriched distilled water and EE broth were used in real-time PCR assay. No statistical differences were observed in the number of positive samples between culture method and real-time PCR ( $p>0.05$ ) in all types of food samples. The number of positives of real-time PCR was higher in the first enrichment media (distilled water) than the second enrichment media (EE broth), though there was no significant difference ( $p>0.05$ ). It appears that some components of the second enrichment broth, EE broth, inhibit the reaction of real-time PCR. These results show that real-time PCR using a single enrichment with distilled water could be useful as an effective screening method for detection of *Cronobacter* while saving much time and labor compared to conventional culture method.

**Keywords:** *Cronobacter* spp., culture method, infant formula, real-time PCR

*Cronobacter* spp. (구 *Enterobacter sakazakii*)는 자연에 널리 분포하고 있는 장내세균의 일종으로서 다양한 식품에 존재하는 것으로 알려져 왔다(9, 10). 그러나 영아용 조제분유를 통해 영유아에게 감염되어 괴사성장염, 뇌수막염, 패혈증 등 심각한 증상을 야기할 수 있다는 사실이 알려지면서 국내외적으로 큰 문제가 되기 시작했다(8, 16). 이러한 점으로 인해 한국을 비롯한 각국의 공인검출규격에서는 유아용 식품에서 엄격한 기준이 정해져 있으며(12) 세계식량농업기구(FAO) 및 세계보건기구(WHO)에서도 살모넬라와 조제분유에서 발견되는 미생물 중 위험도가 가장 높은 category A에 속하는 균으로 지정되어 있다(3).

현재 *Cronobacter* spp.는 국내 모든 식품에서 불검출기준이며 표준검출법인 식품공전 내 배지배양법을 표준으로 하여 검출하고 있다(12). 식품공전에서는 멸균증류수(autoclaved distilled water; DW)에서 1차 증균, *Enterobacteriaceae* enrichment (EE) broth에서 2차 증균 후, Violet red bile glucose (VRBG) agar나 Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) agar 등을 사용하여 *Cronobacter*를 검출하는데, 배지배양법의 특성상 5-7일 가량의 긴 기간이 소요되고 노동력의 소모가 많다(1, 12). 이러한 이유로 인해 배지배양법의 단점을 보완할 수 있는 다양한 신속검출 기법의 개발이 지속적으로 이루어져 왔다(2). 그 중 목적하는 유전자를 증폭시켜 검출하는 PCR법이 현재 널리 사용되고 있는데, 형광의 발현량을 통해 PCR의 증폭산물을 실시간으로 측정하여 목적하는 유전자를 검출하는 real-time PCR 기법은 정성검출은 물론 정량검출까지 가능한 최신검출기법으로서(20)

† These authors contributed equally to this work.

\* For correspondence. E-mail: bracstu3@konkuk.ac.kr; Tel: +82-2-450-4121; Fax: +82-2-450-3037

증균 후 3시간 이내에 목적하는 병원균의 검출이 가능하고 일반 PCR과는 달리 전기영동 과정을 요하지 않아 노동력을 크게 절감시킬 수 있다(1, 2, 6).

Real-time PCR을 통한 *Cronobacter*의 검출은 효율성과 감도가 좋은 우수한 검출기법으로 사료되나 실제 조제분유 혹은 동일한 위험성이 있는 식품에서 표준배양법인 배지배양법에 비해 검출능력과 검출감도가 어느 정도인지에 대해서는 명확한 비교검증이 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 조제분유 및 기타 식품에서 *Cronobacter*를 인위접종한 후 real-time PCR과 배지배양법을 통해 검출함으로써 그 민감도와 그 효율성을 비교·검증하였다.

*Cronobacter*는 미국 FDA (Food and Drug Administration, Washington DC, USA)부터 분양 받아 실험실에서 보유하고 있던 식품분리균주를 사용하였으며 -70°C에 보관하여 필요할 때마다 균주를 해동하여 사용하였다. Nutrient agar (NA; Difco, USA)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하고, 2계대하여 균력을 회복시킨 후, 배양된 집락 중 하나를 tryptic soy broth (TSB; Difco)에서 증균배양하여 접종을 위한 균액으로 사용하였다.

식품 내 인위접종을 위한 모든 식품샘플은 광진구에 위치한 대형마트에서 구매하였다. 접종대상 식품으로는 가장 문제가 되는 영, 유아용 조제분유 이외에, 이유식과 미숫가루를 사용하였다. 미숫가루와 이유식 등 역시 *Cronobacter*가 문제가 될 가능성이 충분하고 성상도 분말로 유사하여 조제분유와 함께 사용하였다. 식품 내 인위접종 시, real-time PCR과 배지배양법 비교검증에 관한 앞선 연구논문의 방법을 참고하여(4, 6, 13), 총 20개의 샘플에 부분적인 양성과 음성이 나와 통계학적으로 유의차를 비교할 수 있도록 하였으며, 각각의 샘플당 1-3회의 실험을 실시하였다. 조제분유의 경우, 중요성을 감안하여 3반복 실시하였으며, 미숫가루와 이유식의 경우 1회씩 실험하여 통계값을 산출하였다. 본 연구의 전반적인 실험과정은 Fig. 1에 도식화 되어있다.

위에서 언급한대로 20개의 샘플에서 통계학적 유의차를 비교할 수 있도록, 총량 500 g에 부분적인 양성과 음성을 일으킬

수 있는 적절한 수의 균을 접종한 후 각 25 g씩 20개의 샘플로 나누는 방법을 사용하였다. 이러한 방법은 앞선 많은 논문에서 사용된 방법이나(1, 2, 4, 6, 13), 균이 균질하게 퍼지지 못했을 경우, 접종량에 비해 적은 수의 양성시료가 검출될 수 있다는 부분적인 한계점도 있다(2). 총 500 g의 bulk 샘플에 10-100 CFU 수준의 *Cronobacter*를 접종한 후, 분말을 흔들어주어 균이 고르게 퍼지도록 하였다. Bulk 샘플 외에 50 g을 추가적으로 준비하여 각각 25 g씩 음성 및 양성 대조균으로 사용하였으며, 음성에는 1 ml의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4; Sigma, USA)를 접종하였고 양성에는 10<sup>7</sup> CFU/g 이상의 균을 접종하였다. 접종이 끝난 샘플은 Han 등(4)과 Lee 등(13)의 연구를 참조하여 낮은 온도에서 18-24시간 동안 보관함으로써 실제 식품에 접종된 것과 유사하도록 균의 안정화 과정을 거쳤다. 식품접종과 동시에 접종량과 동일한 균량을 적절히 희석한 후 NA에 접종하여 실제 식품샘플에 어느 정도의 균량이 접종되었는지 확인하였다. 안정화가 끝난 500 g의 샘플은 20개로 나누어 각각 25 g씩 멸균된 비닐백에 담았으며, 각 비닐백에는 225 ml의 멸균증류수를 넣고 BagMixer stomacher (Interscience, France)을 이용하여 30초간 균질화시켜 주었다. 양성과 음성대조균도 동일한 과정을 거쳤으며 균질화 시킨 샘플은 식품공전의 방법대로 37°C에서 18시간 동안 DW에서 1차 증균배양 하였다. 1차 증균 된 10 ml의 샘플을 90 ml의 EE broth와 섞어준 후 마찬가지로 37°C에서 18시간 동안 2차 증균배양 하였다. 2차 증균배양 후, EE broth의 균액을 DFI agar (Oxoid, UK)에 일회용 루프를 사용하여 획선도말(streaking)하고 37°C에서 24시간 동안 선택배양 하였다. 배양이 끝난 후 2-4 mm의 청록색의 집락이 보이는 경우 양성으로 판정하였다. Chromogenic agar인 DFI 배지의 특성상 추가적인 확인동정은 실시하지 않았으나(11), 집락의 성상 등이 불분명하거나 색이 명확하지 않은 경우 API 20 E (bioMérieux, France)를 사용하여 생화학적으로 확인·동정하였다.

Real-time PCR을 통한 *Cronobacter*의 검출은 1차 증균 후와 2차 증균 후 증균배지에서 채취된 검액에서 이루어졌다. DW 및 EE broth에서 증균배양이 끝난 샘플에서 1 ml을 채취하여 DNA를 추출하였으며 DNA 추출과정은 Seo 등(17)과 Hyeon 등(7)의 연구에서 사용된 방법을 참조하였다. 각 샘플에서 채취한 1 ml의 배지액을 14,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 상층액을 버린 후, 잔여물의 제거를 위해 PBS를 이용하여 고형물(pellet)을 두 번 washing하였다. Washing 후, 다시 14,000 rpm으로 3분간 원심분리하고 상층액을 버린 후에 PrepMan Ultra reagent (Applied Biosystems, USA) 200 µl를 혼합하였다. 남아있는 고형물이 적절히 파쇄될 수 있도록 10초 이상 강력한 vortexing을 실시하고 100°C의 물에서 10분간 가열해준 후, 2분간 상온에서 식히고 14,000 rpm으로 3분간 다시 원심분리 하였다. 원심분리가 끝난 샘플의 상층액은 새로운 튜브에 따로 담아 real-time PCR을 수행할 template DNA로 사용하였다. Real-time PCR 수행을 위한 primers/probe의 서열은 macromolecular synthesis (MMS) operon gene를 타겟으로 개발된 시퀀스를 사용하였다. 해당 유전자 서열은 이전 연

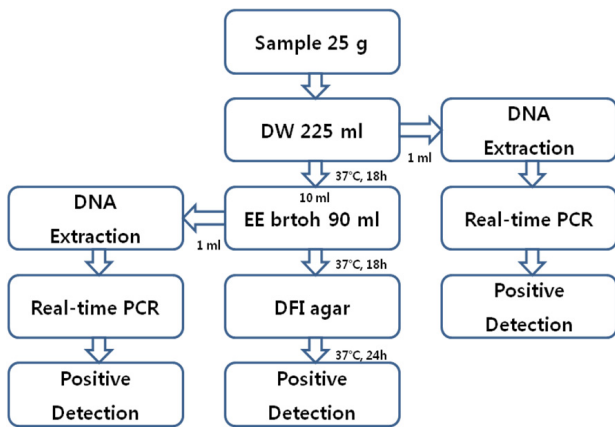


Fig. 1. Flow chart of standard culture method and real-time PCR for detection for *Cronobacter*.

**Table 1.** Primers and fluorogenic probe specific for the amplification of *MMS* gene of *Cronobacter*

Target gene	Primer/probe	Sequence (5'→3')	Reference
<i>MMS</i> gene	Forward	GGG ATA TTG TCC CCT GAA ACA G	Seo <i>et al.</i> (17)
	Reverse	CGA GAA TAA GCC GCG CAT T	
	Probe	FAM-AGA GTA GTA GTT GTA GAG GCC GTG CTT CCG AAA G-TAMRA <sup>a</sup>	

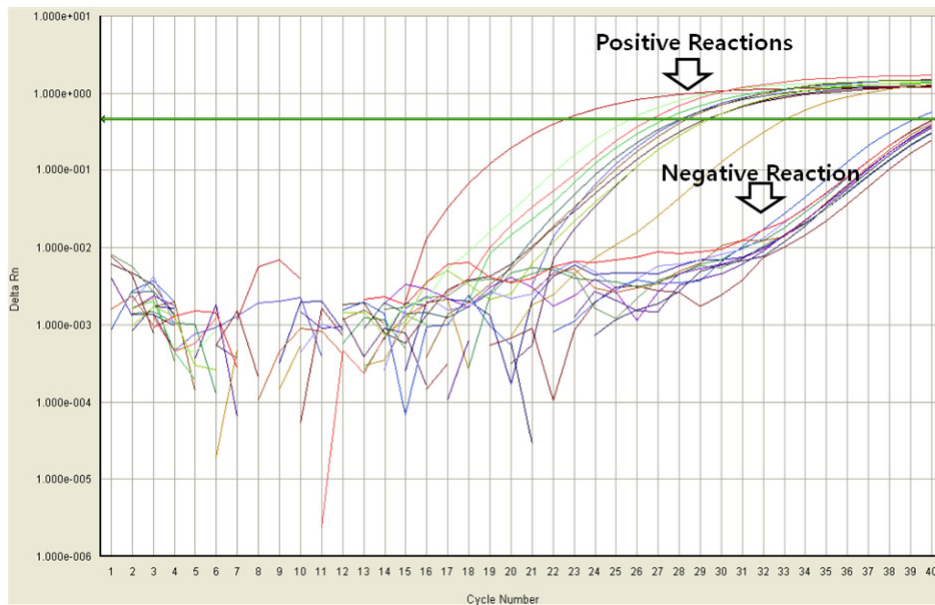
<sup>a</sup> FAM, 6-carboxyfluorescein (the reporter dye); TAMRA, 6-carboxytetramethylrhodamine (the quencher dye)

구에서 개발되어 다양한 균주에서 그 민감도와 특이도가 검증되었으며(17) Table 1에 제시되어 있다. 각 반응액의 조성은 TaqMan<sup>®</sup> 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 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 반응시킨 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분을 1회로 반응조건을 맞추어 40 cycles를 반응시켰다. Real-time PCR의 판정은 Seo 등(17)의 연구를 참조하였으며, Fig. 2에 제시되어 있듯이 Ct값이 38 이하인 경우이면서, 곡선이 S자형(sigmoid)의 증폭양상을 보이는 경우에 양성으로 판정하였다. 배지배양법과 real-time PCR과의 검출을 차이분석은 통계프로그램인 GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc., USA)을 사용하였으며 Fisher's exact test로 양성검출율의 통계학적인 유의차 ( $p < 0.05$ )를 분석하였다. 상호간에 유의차가 있는 값은 각각 다른 알파벳으로 표시하였다.

실험결과, 본 연구에서 사용된 샘플의 음성과 양성대조군은 배지배양법과 real-time PCR에서 결과가 모두 음성과 양성으로 나타나 사용된 샘플 및 실험방법이 적합했음을 보여주었다. 음성대조군이 적절하게 나왔으므로 사용된 식품들은 자연적으로 오염된 샘플이 없었고 위양성의 가능성은 배제되었다. 한편

사용된 샘플의 real-time PCR 반응은 Fig. 2에 제시되어 있듯이 양성과 음성의 차이가 비교적 뚜렷하게 나타나 판정에 어려움은 없었다.

배지배양법과 real-time PCR 검출율의 차이는 Table 2에서 비교되었다. 전체 100개의 샘플에서 배지배양법은 47개의 양성, DW에서의 real-time PCR은 그와 유사한 43개 양성, EE broth에서는 33개의 양성을 보여, 양성검출율에 있어 차이를 보였으나, 각 방법간 통계학적 유의차는 존재하지 않았다 ( $p > 0.05$ , Table 2). 조제분유에서는 해당 검출율의 차이는 총 3 반복에서 비교되었는데 배지배양법은 총 60샘플 중 28개의 양성을, real-time PCR은 DW에서는 26개의 양성, EE broth에서는 20개의 양성을 검출하였다(Table 2). 배지배양법과 DW에서의 real-time PCR은 모든 회차에서 유의적인 차이를 보이지 않았으며( $p > 0.05$ ), 배지배양법과 EE broth에서는 1회차 실험에서는 유의적으로 낮은 검출율을 보였으나( $p < 0.05$ ), 3회차 실험을 다 합산했을 때는 유의차를 보이지 않았다( $p > 0.05$ , Table 2). 미숫가루에서는 배지배양법에서 8개의 양성, DW에서는 6개의 양성, EE broth에서는 4개의 양성을 보였으나 통계학적 유의차는 보이지 않아( $p > 0.05$ ), 조제분유와 유사한 양상을 보였다(Table 2). 이유식에서도 마찬가지로 통계학적 유의차는 보이지 않았으나( $p > 0.05$ ) 배지배양법과 DW에서의 real-time PCR이 11개의 양성을 보이고, EE broth에서의 PCR이 9개의



**Fig. 2.** Amplification plot of genomic DNA extracted from enrichment media (distilled water) in artificially inoculated 20 samples of infant formula in second trial. Arrows indicate positive reactions and negative reactions.

**Table 2.** Comparison of the number of *Cronobacter* positive samples between the standard culture method and the real-time PCR in artificially inoculated foods

Samples	Inoculation level (CFU/500 g)	Culture Method <sup>1),2)</sup>	Real-time PCR <sup>1),2)</sup>	
			DW	EE broth
Infant formula	32	8/20 <sup>a</sup>	6/20 <sup>ab</sup>	1/20 <sup>b</sup>
	28	10/20 <sup>a</sup>	10/20 <sup>a</sup>	10/20 <sup>a</sup>
	30	10/20 <sup>a</sup>	10/20 <sup>a</sup>	9/20 <sup>a</sup>
<i>Misugaru</i>	42	8/20 <sup>a</sup>	6/20 <sup>a</sup>	4/20 <sup>a</sup>
Baby food	80	11/20 <sup>a</sup>	11/20 <sup>a</sup>	9/20 <sup>a</sup>
Total	-	47/100 <sup>a</sup>	43/100 <sup>a</sup>	33/100 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Number of positive samples / number of total samples

<sup>2)</sup> Different letters within a row indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

양성을 보였다(Table 2). 일반적으로 2차 증균은 1차 증균에 비해 균의 수가 선택적으로 더 증가되기 때문에, real-time PCR을 수행하였을 때, 1차 증균배지인 DW에서의 양성검출율이 2차 증균배지인 EE broth보다 높았던 점은 매우 흥미로운 결과였다. 본 연구에서는 DW에서나 EE broth에서나 모두 동일한 DNA 추출법을 사용했는데 사용된 PrepMan 및 Washing step을 사용하여 DNA를 추출하는 방법은 증균배지에서 DNA 추출시 대단히 수율이 높은 방법으로 알려져 있다(5, 7, 17). 따라서 두 증균배지 간 양성검출율의 차이는 증균배지 차이에 의한 것으로 추측된다. 일반적으로 real-time PCR을 비롯한 분자유전학적인 방법은 다양한 inhibitor에 의해서 검출감도가 저해될 수 있다(7, 18). 이러한 inhibitor 물질은 철성분(14), 단백질(14), 혈액(18), 등 그 종류가 매우 다양하다. 이러한 inhibitor는 식품의 성분에서 유래하는 경우가 많으나, 때에 따라서는 증균배지에서 유래하는 경우도 있다. Hyeon 등(7)은 *Salmonella* 증균배지에서 다양한 real-time PCR inhibitor의 존재가능성을 언급하였다. 해당 연구에서는 1차 증균배지인 buffered peptone water에서의 real-time PCR 검출율이, 2차 증균배지인 Mueller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin broth (MKTTn) 보다 훨씬 높아 본 연구와 유사한 양상을 보였다. Hyeon 등(7)은 이러한 원인이 MKTTn 증균배지 내의 구성성분 물질이 real-time PCR 반응을 저해했기 때문으로 분석하였는데 그 원인물질이 무엇인지에 대해서는 밝히지 못했다. 본 연구와 Hyeon 등(7)의 연구에서 서로 유사한 결과를 보인 2차 배지인 MKTTn과 EE broth에는 그람양성 세균을 억제하기 위한 ox bile이나 brilliant green과 같은 저해물질이 공통적으로 함유되는데 이러한 미세물질이 real-time PCR 반응의 inhibitor로 작용했을 가능성이 있을 것으로 추측된다. 특히 1차 증균이 비선택증균이라 1차 증균배지에는 이러한 성분을 함유하고 있지 않은 것을 감안하면 이러한 가능성은 더 높아지나, 실질적으로 어떤 물질이 반응저해에 관여되는지에 관해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

EE broth에 비교하여 DW에서의 real-time PCR은 표준검출법인 배지배양법과 거의 동일한 검출능력을 가진 것으로 판단되어 검출의 효용성이 높음을 확인하였다. 이러한 real-time PCR의 높은 검출효율은 앞선 논문에서 여러 차례 보고된 바 있다. Malrony 등(15)은 다양한 식품 샘플에서 *Salmonella*를

검출하기 위한 real-time PCR법을 평가하였는데 real-time PCR법은 표준 검출법인 배지배양법과 비교했을 때 100%의 민감도와 특이도를 보여 검출의 정확도가 높음을 보여주었다. 또한 Chon 등(1)은 해산식품과 야채에서 *V. parahaemolyticus* 검출시 real-time PCR과 배지배양법을 비교하였을 때, 두 방법간의 유의차가 없어 real-time PCR이 표준검출법을 대체하거나 보완할만한 적합한 방법이라고 보고하였다. 실제 미국 농림부산하 식품검사국(United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service)에서는 PCR 등 분자유전학적인 방법을 screening method로 사용하고 있는데, 4-8시간 가량 균을 증균하고 PCR을 수행하여 양성인 경우에만 배지배양법으로 검출하고 있다(19). 한편 조제분유 등에서 *Cronobacter* 검출에 있어서 real-time PCR의 활용은 앞선 Seo 등(17)의 논문에서 검증된 바가 있는데, 해당 연구 역시 본 연구와 마찬가지로 real-time PCR 방법이 배지배양법에 비해 민감도와 편이성을 갖춘 좋은 방법이라고 보고하였다. 그러나 본 연구는 Seo 등(17)의 연구와 달리 실제 식품에 오염된 경우와 비슷하도록 시뮬레이션 되어 각 방법간 민감도의 차이가 통계학적으로 비교되었으며, real-time PCR 역시 1, 2차 증균배지에서 모두 수행되고 증균배지별 차이도 제시되어 있어 앞선 연구와는 차이점이 있다. 따라서 본 연구결과를 국내 식품공전에 응용하여 real-time PCR을 1차 증균 이후의 screening method로 사용하면 시간과 노동력을 절약하며 높은 감도로 *Cronobacter*를 검출할 수 있는 효과적인 방법으로 사료된다.

## 적용

본 연구에서는 분말 식품에서 real-time PCR과 배지배양법을 사용하여 *Cronobacter* spp.를 검출하는 방법이 비교검증되었다. 조제분유, 이유식, 미숫가루에 *Cronobacter*를 인위적으로 접종시킨 후, 식품공전의 방법에 따라 멸균증류수와 *Enterobacteriaceae* enrichment (EE) broth에서 각각 1, 2차 증균배양 하였으며, Druggan-Forsythe-Iversen에 선택배양하여 *Cronobacter*를 검출하였다. Real-time PCR은 멸균증류수 및 EE broth에서 1 ml을 채취한 후 DNA를 추출하여 시행하였다. 실험결과 모든 식품에서 배지배양법과 real-time PCR간에는 통계학적 유의차가 존재하지 않았다( $p > 0.05$ ). 한편 모든 실험회

차에서 real-time PCR 수행 시, 1차 증균액인 멸균증류수에서의 양성검출율이 2차 증균액인 EE broth에서보다 높았는데, 이는 2차 증균액 내의 구성성분 중 일부가 real-time PCR의 반응을 저해했기 때문으로 사료된다. 연구결과를 종합해 볼 때, 1차 증균 후, real-time PCR을 통해 *Cronobacter*를 검출하는 방법은 정확한 민감도를 보이면서도 시간과 노동력을 절감할 수 있는 효과적인 방법으로 사료된다.

## 감사의 말

본 연구는 2009년도 식약청 용역사업(09072식품안029)의 연구비지원과 Brain Korea 21 (BK21) 사업의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다. 또한 실험에 도움을 아끼지 않은 이재훈, 박준호에게 감사드립니다.

## 참고문헌

- Chon, J.H., J.Y. Hyeon, I.G. Hwang, H.S. Kwak, J.A. Han, Y.H. Chung, K.W. Song, and K.H. Seo. 2010. Comparison of standard culture method and real-time PCR for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods and vegetables. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42, 355-360.
- Chon, J.H., J.Y. Hyeon, I.G. Hwang, H.S. Kwak, J.A. Han, M.S. Kim, J.H. Kim, K.W. Song, and K.H. Seo. 2011. Comparison of real-time PCR and culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* in various foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43, 119-123.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Joint FAO/WHO workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Available from: [http://www.who.int/foodsafety/publications/feb\\_2004/en/print.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/feb_2004/en/print.html). Accessed Dec. 20, 2010.
- Han, S.R., J.Y. Hyeon, H.Y. Kim, J.S. Park, S. Heo, H.C. Shin, and K.H. Seo. 2008. Evaluation of conventional culture methods and validation of immunoassays for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dairy and processed foods. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 28, 616-622.
- Heller, L.C., C.R. Davis, K.K. Peak, D. Wingfield, A.C. Cannons, P.T. Amuso, and J. Cattani. 2003. Comparison of methods for DNA isolation from food samples for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1844-1846.
- Hyeon, J.Y., I.G. Hwang, H.S. Kawk, J.S. Park, S. Heo, I.S. Choi, C.K. Park, and K.H. Seo. 2009. Evaluation of an automated ELISA 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. Ani. Resour.* 29, 506-512.
- Hyeon, J.Y., I.G. Hwang, H.S. Kawk, C. Park, I.S. Choi, and K.H. Seo. 2010. 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, 143-149.
- Iversen, C. and S.J. Forsythe. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 443-454.
- Jung, J.H. and S.Y. Lee. 2010. Microbial growth in dry grain food (Sunsik) beverages prepared with water, milk, soymilk, or honey-water. *J. Food Sci.* 75, 239-242.
- Kim, K.S., S.S. Jang, S.K. Kim, J.H. Park, S.G. Heu, and S.Y. Ryu. 2008. Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 196-203.
- Kim, H.J., M.S. Koo, and S.W. Oh. 2010. Performance comparison of 3 different isolation media of *Cronobacter sakazakii*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39, 764-768.
- Korea Food and Drug Administration. Food code. Available from [http://safefood.kfda.go.kr/RS/food\\_menu.jsp](http://safefood.kfda.go.kr/RS/food_menu.jsp), Accessed Jan. 21, 2011.
- Lee, J.H., K.Y. Song, J.Y. Hyeon, I.G. Hwang, H.S. Kwak, J.A. Han, Y.H. Chung, and K.H. Seo. 2010. Comparison of standard culture method and real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus* in processed and unprocessed foods. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 30, 410-418.
- Makowski, G.S., E.L. Davis, and S.M. Hopfer. 1996. The effect of storage on Guthrie cards: implications for deoxyribonucleic acid amplification. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 26, 458-469.
- Malorny, B., E. Paccassoni, P. Fach, C. Bunge, A. Martin, and R. Helmuth. 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7064-7052.
- Muytjens, H.L., H.C. Zanen, H.J. Sonderkamp, L.A. Kollée, I.K. Wachsmuth, and J.J. Farmer. 1983. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* 18, 115-120.
- Seo, K.H. and R.E. Brackett. 2005. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in Infant formula using a real-time PCR assay. *J. Food Prot.* 68, 59-63.
- Thunberg, R.L., T.T. Tran, and M.O. Walderhaug. 2000. Detection of thermophilic *Campylobacter* spp. in blood-free enriched samples of inoculated foods by the polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 63, 299-303.
- United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service. Microbiology Laboratory Guidebook. Available from [http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological\\_Lab\\_Guidebook/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp). Accessed Jan. 28, 2011.
- Yang, C., Y. Jiang, K. Huang, C. Zhu, and Y. Yin. 2003. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38, 265-271.