

## *Cronobacter* spp. 의 오염, 제어, 검출에 관한 최신 연구동향

송광영<sup>1†</sup> · 천정환<sup>1†</sup> · 김현숙<sup>2</sup> · 서건호<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>건국대학교 KU 식품안전연구소

<sup>2</sup>캘리포니아 대학교(UC DAVIS) 영양학과

## Current *Cronobacter* spp. Researches on Prevalence, Control, and Detection

Kwang-Young Song<sup>1†</sup>, Jung-Whan Chon<sup>1†</sup>, Hyun-Sook Kim<sup>2</sup>, and Kun-Ho Seo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>KU Center for Food Safety, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Nutrition, University of California, Davis 95616, USA

(Received November 12, 2012 / Accepted November 28, 2012)

*Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*), a Gram-negative bacillus, is a rare cause of meningitis and central nervous system infections. In England, the first case infected by this organism occurred in 1958. By July 2008, approximately 120 documented cases of *Cronobacter* spp. infection and at least 27 deaths have been identified from all around the world in the published literature and in reports submitted by public health sectors. In 2007, it was proposed by European organizations that the original taxonomy of *E. sakazakii* would be revised, to consist of five new species moved to a new genus, and identified as "*Cronobacter*". *E. sakazakii* has thus now been reclassified as 6 separate species in the new genus, *Cronobacter*, gen. nov., within the Enterobacteriaceae family. The new species are presently *Cronobacter sakazakii*, *C. turicensis*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, and *C. dublinensis*; the sixth species is identified simply as genomospecies I, as currently including only two representative strains. The objectives of this review are to provide insight on (1) the classification and taxonomy of *Cronobacter* spp., (2) its clinical etiology and pathogenicity, (3) frequency of *Cronobacter* spp. in different categories of ready-to-eat food other than infant formula, (4) methods for detecting, isolating and typing *Cronobacter* spp., and (5) recent research trends for detecting *Cronobacter* spp.

**Keywords:** *Cronobacter* spp., *Enterobacter sakazakii*, detection method, etiology, taxonomy

*Cronobacter* spp. (구 *Enterobacter sakazakii*)는 1958년 영국에서 처음으로 유아의 뇌막염을 일으키는 원인균으로 보고 되었는데 이 때 감염된 2명의 유아 사망하였음에도 불구하고 연구자들의 큰 관심을 불러일으키지는 못하였다(Joker *et al.*, 1965). 그 이후로 최근까지 120건 이상의 *Cronobacter* spp. 감염으로 인한 식중독 사고가 보고되었고 특히 분유제품과 관련이 깊다는 것과 영·유아에게 치명적이라는 사실이 최근 10년 전부터 알려지면서 WHO 등을 비롯한 세계보건기구의 큰 관심을 불러일으키기 시작했다(Iversen and Forsythe, 2003). 최근에는 일본에서도 처음으로 *Cronobacter* spp.에 의한 식중독 사고가 보고되어 국내에서 더욱 관심을 불러 일으키는 식중독균이 되었다(Teramoto *et al.*, 2010). *Cronobacter* spp.는 장내세균의 일종으로 이 균의 주 위험군은 6개월 미만의 영·유아 중 특히 면역결핍

영아, 28일령 미만의 영아, 2.5 kg 미만의 저체중 영아들을 포함한다(Muytjens *et al.*, 1984). 또한 *Salmonella*와 함께 조제분유에서 발견되는 미생물 중 위험도가 가장 높은 Category A에 속하는 균으로 세계식량농업기구(FAO) 및 세계보건기구(WHO)에서 분류하고 있다(FAO/WHO, 2004).

감염 후 신생아에서 나타나는 주요 증상은 괴사성 장염, 수막염, 패혈증 등이 있으며, 후유증으로 시력과 청력 상실 및 신경마비를 나타내기도 한다(Farmer, 1999; Lai, 2001; Gurtler *et al.*, 2005). 한국에서도 2006년에 조제분유에서 검출되어 사회적인 논란이 야기되었으며 그 결과 영·아용 조제분유에서는 법적으로 불검출 기준을 적용하였고(Yoo *et al.*, 2005; Jung and Park, 2006), European Union에서도 엄격한 미생물 기준을 도입하였다(Commission regulation, 2007). 한국의 유제품공장에서 생산된 조제분유에서 검출된 *Cronobacter* spp.의 역학조사결과 주 오염원으로 제조공장주변의 하천, 농경지 등에서 서식하는 해충(파리, 담배벌레)이 제조 작업장내로 유입되어 제품에 혼입될 가능성이 높다고 발표되었는데(Mutyjens and Kollee, 1990;

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

\*For correspondence. E-mail: bracstu3@konkuk.ac.kr; Tel.: +82-2-450-4121; Fax: +82-2-3436-4128

**Table 1.** Biochemical differentiation of opportunistic *Enterobacter* species<sup>a</sup> (US FDA, 2002)

	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>
Adonitol <sup>c</sup>	(-) <sup>b</sup>	+	-	-	-
D-Arabitol <sup>c</sup>	(-)	+	+	-	-
Dulcitol <sup>c</sup>	(-)	-	-	(-)	-
x-Methyl-D-glucoside <sup>c</sup>	(+)	-	-	-	+
Raffinose <sup>c</sup>	+	+	+	v	+
D-Sorbitol <sup>c</sup>	+	+	-	v	-
Sucrose <sup>c</sup>	+	+	+	(+)	+
Yellow pigment	-	-	-	(+)	+
Arginine dihydrolase	+	-	-	-	+
Lysine decarboxylase	-	+	+	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+	+	-	+
KCN, growth in	+	+	-	v	+

<sup>a</sup> Farmer and Kelly (1992)<sup>b</sup> -, 0–9% positive; (-), 10–24% positive; v, 25–74% positive; (+), 75–89% positive; +, 90–100% positive<sup>c</sup> Carbohydrate fermentation

Kuzina *et al.*, 2001), 이와 같이 이 균은 환경 유래 오염균이라는 것이 지배적인 견해이다(Muytjens and Kollee, 1990; Kuzina *et al.*, 2001).

2006년 이후 기존에 *Enterobacter sakazakii*로 알려진 균의 명칭이 *Cronobacter* spp.로 명명법이 새롭게 바뀌었고 검출법도 다양하게 개발되어 왔다(Iversen *et al.*, 2006a, 2007a, 2008). 그럼에도 불구하고 한국에서는 아직도 *Enterobacter sakazakii*와 새로 개칭된 *Cronobacter* spp. 명칭이 혼동되어 사용되고 농림수산검역검사본부 및 한국 식품의약품안전청(식약청)에서도 최초 제시한 검출법을 재개정 없이 사용하고 있는 실정이다. 국내에서는, 분유 뿐만 아니라 선식에서의 검출 등 *Cronobacter* spp.에 대한 연구가 많이 이루어졌는데 분유 이외 다양한 식품에서 균주를 분리하여 특징을 분석하고 이들의 제어에 대한 관한 연구가 많이 진행되었다(Lee and Park, 2008, 2010; Choi *et al.*, 2009; Chun *et al.*, 2009). 따라서 본 논문에서는 *Cronobacter* spp.의 명칭 변경사와 최근 미국 식품의약품안전청(US Food and Drug Administration, 미국 FDA)를 중심으로 개정된 *Cronobacter* spp. 시험법을 소개하며 지금까지 진행되었던 *Cronobacter* spp. 연구결과를 조사 분석하여 향후 *Cronobacter*와 관련된 영·유아식품안전관리 연구방향을 제시하고자 한다.

### *Cronobacter* spp.의 배경

#### *Cronobacter* spp.의 발견과 역사

Urmenyi와 Franklin (1961)은 1958년 신생아에게 뇌수막염을 일으키는 원인균으로 노란색을 형성하는 대장균군(yellow-pigmented coliform)을 최초로 보고하였고, 그 이후 전세계적으로 이 균에 의한 뇌수막염, 패혈증, 장괴사 등이 보고 되었다(Muytjens *et al.*, 1984; Farmer, 1999). 1965년 Joker 등도 Denmark에서 발병된 뇌수막염의 원인균으로 ‘yellow-pigment production, biotyping,

antibiotic susceptibility 등의 실험을 통해 이 균을 Enterobacteriaceae과의 새로운 종(species)으로 분류하였고 1980년 초까지 노란색을 띠는 *Enterobacter cloacae* (yellow-pigmented cloacae)라고 명명되었다(Muytjens *et al.*, 1984). 1980년대부터 급격하게 발전한 생명공학기술을 토대로 DNA 연관성, 색소생성 그리고 생화학적인 반응결과 *E. cloacae*에서 따로 분리되어 별도의 그룹으로 나누어(Muytjens *et al.*, 1984; Farmer, 1999) 일본의 미생물학자 Riichi sakazakii의 이름을 따서 *Entrobacter sakazakii*라고 새롭게 명명되었다(Farmer, 1999; Gurtler *et al.*, 2005).

#### *Enterobacter sakazakii*에서 *Cronobacter* spp.로 명칭변경

Farmer는 1980년 당시 *E. sakazakii*를 15개의 생화학적 그룹으로 분리하였다(Farmer *et al.*, 1980). 이들 생화학적 그룹 간의 주된 차이는 D-sorbitol의 발효여부와 extracellular deoxyribonuclease의 생산능력이지만(Farmer *et al.*, 1980; Farmer, 1995), 일부의 *E. sakazakii*는 D-sorbitol을 발효하는 능력을 가지기도 하였다(Table 1). 2004년 Lehner 등은 16S rDNA sequence와 heat shock protein 60 (hsp 60) sequencing 등을 이용해서 Farmer의 *E. sakazakii* 생화학적 그룹 간의 계통발생 phylogenetic 관계를 조사한 결과, 분류학적 이질성이 있는 4개의 큰 그룹으로 분리할 수 있음을 발견하였다(Lehner *et al.*, 2004). 그 후 Iversen 등은 기존의 *E. sakazakii*의 biotype 100과 Biolog Phenotype Microarray 자료를 이용하여 이러한 분류학적 이질성을 구분해 주기 위하여 새로운 속명으로 *Cronobacter* gen. nov.를 제안하였으며(Iversen *et al.*, 2007b), 2008년 이 제안에 의해 5개의 종과 3개의 아종으로 이루어진 *Cronobacter* spp.가 공식적으로 국제적인 인정을 받게 되었다. 여기에는 *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter dublinensis*, *C. dublinensis* subsp. *lausannensis*, *C. dublinesis* subsp. *lactaridii*가 속해있다(Table 2). 그 후 여섯

**Table 2.** Biochemical characteristics of *Cronobacter* species (Iversen *et al.*, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2008)

	<i>C.dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	<i>C.dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	<i>C.dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	<i>C.genosp.1</i>	<i>C.malonaticus</i>	<i>C.muytjensii</i>	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.turicensis</i>
cis-Aconitate <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+	+	+	+	v	+	+
trans-Aconitate	+	+	+	+	+	v	-	-
4-Aminobutyrate	+	+	+	V	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	+	-	+	-	+
Indole production	+	+	v	-	-	+	-	-
myo-Inositol	+	+	-	+	v	+	v	+
Lactulose	+	+	-	+	+	+	+	+
Malonate	+	-	-	V	+	+	-	+
Maltitol	+	+	-	+	+	-	+	+
D-Meleszitose	+	-	-	-	-	-	-	+
1-0-Methyl-alpha-D-glucopyranoside	+	+	+	+	+	-	+	+
Palatinose	+	+	+	+	+	v	+	+
Putrescine	+	+	v	V	v	+	+	+
D-Turanose	+	v	-	V	+	v	+	+

<sup>a</sup> -, 0-9% positive; (-), 10-24% positive; v, 25-74% positive; (+), 75-89% positive; +, 90-100% positive

번째 종으로 *Cronobacter* genomospecies I을 발견하였는데 여기에는 단지 두 개의 대표 균주가 있다(Iversen *et al.*, 2008). *Cronobacter*의 어원은 그리스신화에 등장하는 “Cronos”라는 신의 이름에서 유래하였는데 그는 자신의 아버지인 Uranus를 권좌에서 물리치고 권력을 차지하였고 자신도 자식에게 권좌를 빼앗기게 될 것이 두려워서 자식이 태어나자마자 먹어버렸는데

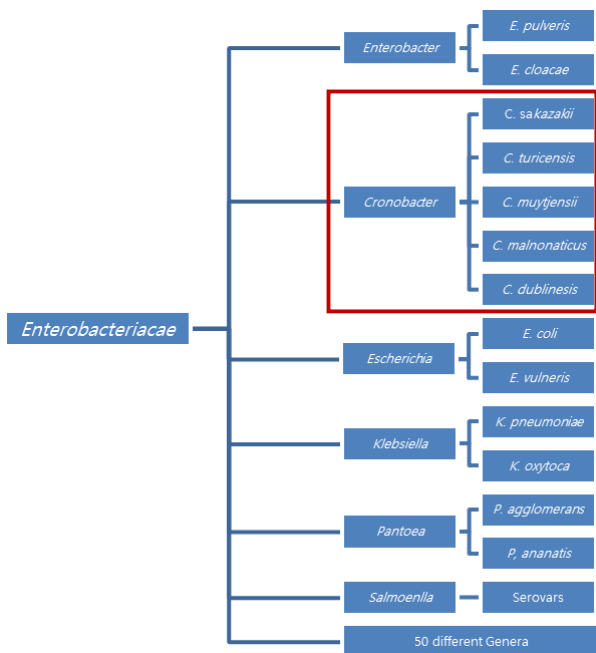
결국은 훗날에 Zeus신에게 쫓겨나고 말았다. 이는 *Cronobacter*가 신생아에 치명적이라는 사실을 내포하고 있다. 최근에 개정된 Enterobacteriaceae 과에 속하는 속들과 종들의 관계는 Fig. 1에 나타나 있다.

***Cronobacter* spp.의 생화학적 특성**

*Cronobacter* spp.는 Enterobacteriaceae 과의 *Cronobacter* 속 (genus)에 속하는 균으로 운동성 편모, 그람 음성, oxidase 음성, catalase 양성, 통성혐기성균이다(Muytjens *et al.*, 1984; Farmer 1999; Gurtler *et al.*, 2005). Nitrate를 환원시키고, citrate를 이용하며, esculin과 arginine을 가수분해하고, D-glucose, D-sucrose, D-raffinose, D-melibiose, D-cellobiose, D-mannitol, D-mannose, L-rhamnose, L-arabinose, D-xylose, D-trehalose, galacturonate and D-maltose로부터 산을 생성한다. *Cronobacter* spp.는 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside 그리고 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside를 분해하며, Voges-Proskauer 검사에서 acetoin을 생성하며 양성반응을 보이지만 methyl red 검사에서는 음성반응을 나타낸다. Hydrogen sulphide 생성, urea 가수분해, lysine decarboxylation,  $\beta$ -D-glucuronidase에서는 음성반응을 나타내는 생화학적 특징이 있다(Farmer *et al.*, 1980; Farmer, 1999; Iversen *et al.*, 2004, 2006b, 2007b)

***Cronobacter* spp.의 발병 및 감염증상**

*Cronobacter* spp.에 의한 감염은 드물게 보고 되며 주로 생후 3일부터 4세까지의 신생아와 유아에서 패혈증, 뇌수막염, 신생아 괴사성장염 등을 유발시키며 치사율은 40-80%로 매우 높다(Lai



**Fig. 1.** Revised taxonomy of Family Enterobacteriaceae (Iversen *et al.*, 2006, 2007, 2008).

**Table 3.** Symptoms of *Cronobacter* spp. (formerly *E. sakazakii*) infection (Gurtler *et al.*, 2005)

<b>Elderly patients' infections</b>
1) Pneumonia
2) Bacteremia
3) Urosepsis
4) Infection in a vascular graft and a thigh wound
<b>Adults' Infections</b>
1) Appendicitis,
2) Biliary sepsis
3) Coinfective agent (amongst three bacteria) isolated from an ulceration in the foot of a diabetic
<b>Infants' infections</b>
1) Conjunctivitis
2) Bacteremia
3) Infections associated with catheters
4) Necrotizing enterocolitis in neonates
5) Brain abscesses and meningitis in neonates
6) Meningitis leading to ventriculitis, brain abscess, infarction and cyst formation
7) Ventriculitis, cerebral infarction, brain cysts, late development of hydrocephalus and brain abscesses
8) Meningitis patients displaying early signs of illness such as grunting, pallor, cyanosis and collapse, bulging fontanelle, convulsions, twitching and hypertonia
9) Bulging fontanelles, destruction of the frontal lobes of the brain, seizures, spastic quadriplegia, hypothermia, fever, Cheyne–Stokes respirations, bradycardia, poor feeding, irritability, jaundice, grunting respirations, instability of body temperature, hemorrhagic cerebral necrosis, meningoencephalitis, necrotic softened brain, cyst formation, liquefaction of cerebral white matter and severe neurologic complications

2001). 흔한 경우는 아니지만 병원의 소아중환자실(Neonatal Intensive Care Unit, NICU)에서 분유를 먹었던 신생아에서 *Cronobacter* spp. 감염이 지속적으로 발견되어, 현재는 병원성균으로 인정되고 있다(Lai, 2001). 최근까지 총 120건 이상의 *Cronobacter* spp. 감염과 27건의 사망사고가 보고되었으며, 덴마크에서는 *Cronobacter* spp.에 감염된 유아들이 치료 후에도 신경후유증(수막염, 사지마비 등)과 신경발달이 지연되는 등 심각한 후유증을 나타내었다고 보고하였다(Mange *et al.*, 2006). 지금까지 대부분 유아에서 발병되었지만 최근에는 성인에 대한 *Cronobacter* spp. 감염도 최소한 9건이 있었으며(Gurtler *et al.*, 2005), 대부분 세균혈증(bacteremia) 및 요로폐혈증이었다(Table 3). 질병유발 감염량은 아직까지 정확히 밝혀지지는 않았지만 *E. coli* O157:H7와 *Listeria monocytogenes*의 경우와 비교해 볼 때 최소한 3 log CFU/ml 이상의 *Cronobacter* spp.가 오염된 조제분유를 섭취하였을 때 발병되는 것으로 추측하고 있다. Raghav와 Aggarwal (2007)은 *Cronobacter* spp.가 enterotoxin을 생산한다고 보고하였지만 이것이 병원성과 직접적인 관련이 있는 것을 규명하기 위해서는 더 많은 관련연구가 필요하다.

### *Cronobacter* spp.의 감염원

*Cronobacter* spp. 균은 분유제조시설환경, 다양한 식품, 가정환경, 지하수, 병원의 우유준비실, 가정의 싱크대 등 대부분의 환경샘플에서 검출이 될 수 있으며(Lai, 2001; Gurtler *et al.*, 2005), 오염의 2차 수단으로 파리와 설치류와 같은 매개체가 있을 것이라고 추측된다(Seo and Brackett, 2005; Song *et al.*, 2008; Lampel and Chen, 2009). 네덜란드에 있는 9개의 식품회사에서 사용하였던 진공 청소기 내의 먼지 포집기를 수거하여 조사한 결과 분말우유공장, 초콜릿공장, 시리얼공장, 감자전분공장 등을 포함한 5개의 공장에서 *Cronobacter* spp.가 검출되었고(Kandhai *et al.*,

2004), 16개의 가정집 진공청소기 내의 먼지 포집기를 수거하여 조사한 결과 5개에서 *Cronobacter* spp.가 검출되었다(Gurtler *et al.*, 2005). 따라서 *Cronobacter* spp.가 자연환경에 광범위하게 존재할 수도 있지만 현재까지는 조제분유나 건조유아식이 직접적인 주요 감염원으로 여겨지고 있다(Lai, 2001; Seo and Brackett, 2005). 최근에는 물을 첨가해서 바로 먹을 수 있는 유아용 제품 뿐만 아니라 선식제품에서도 *Cronobacter* spp.의 오염이 보고된 바 있었고, 치즈, 육류, 곡류, 허브, 향신료, 쌀가루, 쌀전분, 계란 등에서도 검출되었다(Richards *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010).

### *Cronobacter* spp.의 전파경로

현재까지 *Cronobacter* spp.의 감염 전파경로는 정확하게 밝혀지지 않았지만, 감염사고 조사결과 대부분 조제분유(powdered infant formula)를 통한 것이었다. 따라서 분유 생산과정 중 오염원을 찾아 제거하는 것이 가장 좋은 방법이며, 열처리 후 분유제조과정 중 파리와 같은 곤충이나 쥐 등에 의해서 분유가 살균 후 재오염(post-contamination)이 되지 않도록 노력해야 한다(Kandhai *et al.*, 2004; Mange *et al.*, 2006). 또한 병원에서 분유제조에 사용되는 분유병의 세척과 우유 준비과정에서의 *Cronobacter* spp. 균 오염차단 등이 가장 효과적인 예방대책이다(Iversen *et al.*, 2004). 따라서 *Cronobacter* spp. 오염을 최소화 하기 위해서 식품제조 원료와 환경의 지속적인 모니터링 작업이 반드시 필요하다.

### *Cronobacter* spp.의 검출방법 변천과 최신 검출법

2002년 미국 FDA에서는 *Cronobacter* spp.를 배지상에서 분리하는 방법을 비공식적으로 긴급하게 제시하였다(US FDA, 2002)(Table 4). 선택배지로 VRBG (Violet Red Bile Glucose)를 사용한 것이 특징인데 이 후 많은 연구를 통해 문제점이 제기되었다(Song *et al.*, 2008). Song 등(2008)은 기존의 선택배지인

**Table 4.** Comparison of 5 different methods for detecting *Cronobacter* spp.

Old FDA method for detecting <i>Cronobacter</i> spp. (US FDA, 2002)	Sanitary Control of Livestock Product for detecting <i>Cronobacter</i> spp. in Powdered Infant Formula (Korea National Veterinary Research & Quarantine Service)	Korean Food Code (KFDA) for detecting <i>Cronobacter</i> spp. (Korea Food & Drug Administration)	Milk and milk products - Detection of <i>Cronobacter</i> spp. ( <i>Enterobacter sakazakii</i> ). ISO/TS 22964:2006 (IDF/RM 210: 2006)	New FDA method for detecting <i>Cronobacter</i> spp. (Chen <i>et al.</i> , 2009)
<p><b>(Enrichment Step)</b> Sample X g + Sterilized DW 9X ml</p> <p>↓</p> <p>36°C / 18 h Incubation Cultured broth X ml + EE broth 9X ml</p> <p>↓</p> <p>36°C/18 h Incubation <b>(Isolation Step)</b> Streak plates on VRBG (loopful) and spread plates on VRBG (100 µl)</p> <p>↓</p> <p>36°C / overnight Incubation <b>(Confirmation Step)</b> Streak 5 isolates onto Tryptic Soy Agar Plates</p> <p>↓</p> <p>25°C / 48–72 h Incubation Select yellow-color Colonies and confirm with API 20 E</p>	<p><b>(Enrichment Step)</b> Sample 100g + Sterilized DW 900 ml</p> <p>↓</p> <p>36°C / 18 h Incubation Cultured broth 10 ml + EE broth 90 ml</p> <p>↓</p> <p>36°C/18 h Incubation <b>(Isolation Step)</b> <i>E.sakazakii</i> Medium or Chromogenic <i>Enterobacter sakazakii</i> medium</p> <p>↓</p> <p>36°C / 24 ± 2 h Incubation <b>(Confirmation Step)</b> Tryptic Soy Agar</p> <p>↓</p> <p>25°C / 48–72 h Incubation Select yellow-color Colony and then additional biochemical test</p>	<p><b>(Enrichment Step)</b> Sample (x3) 100g + Sterilized DW 900 ml</p> <p>↓</p> <p>36°C/18 h Incubation Cultured broth 10 ml + EE broth 90 ml</p> <p>↓</p> <p>36°C/18 h Incubation <b>(Isolation Step)</b> Chromogenic <i>Enterobacter sakazakii</i> medium or <i>E. sakazakii</i> medium or Violet Red Bile Glucose Agar</p> <p>↓</p> <p>36°C / 24 ± 2 h Incubation <b>(Confirmation Step)</b> Tryptic Soy Agar</p> <p>↓</p> <p>25°C / 48–72 h Incubation <b>(Biochemical-Test Step)</b> Oxidase(-), L-Lysine decarboxylase(-), L-Ornithine decarboxylase(+), L-Arginine dihydrolase(+), sucrose(+), dulcitol(-), adonitol(-), raffinose(+), D-sorbitol(-), x-methyl-D-glucoside(+), D-arabitol(-) (+); Positive, (-); Negative</p>	<p><b>Sample preparation/ pre-enrichment</b> Weigh x g of the test portion in 9 times x ml BPW</p> <p>↓</p> <p>Incubation at 37°C for 18 h ± 2 h Selective enrichment in mLST/vancomycin medium: Transfer 0.1 ml from the cultured BPW into 10 ml mLST/vancomycin medium</p> <p>↓</p> <p>Incubation at 44°C for 24 h ± 2 h <b>Isolation</b> on selective chromogenic agar: Streak from the cultured mLST/vancomycin medium one loopful on the chromogenic agar in Petri dishes (Typical colonies on the chromogenic agar can be considered as presumptive <i>E. sakazakii</i> and reported as such)</p> <p>↓</p> <p>Incubation at 44°C for 24 h ± 2 h <b>Confirmation:</b> Production of yellow pigment Select five typical colonies and streak on TSA plates</p> <p>↓</p> <p>Incubation at 25°C for 48 h ± 4 h <b>Confirmation:</b> Biochemical characterization Select one yellow colony from each TSA plate for biochemical characterization</p> <p>↓</p> <p>Interpretation of results</p>	<p><b>(Enrichment Step)</b> Sample X g + Sterilized DW 9X ml</p> <p>↓</p> <p>36°C / 24 h Incubation <b>(Isolation Step)</b> 4 sample bottle (4 x 10 ml) was centrifuged 3000 x g for 10 min, decant supernatant Resuspend pellet in 200 µl PBSI</p> <p>↓</p> <p>Spread plates (100 µl) onto DFI agar and R&amp;F agar Real-Time PCR <b>(Confirmation Step)</b></p> <p>↓</p> <p>36°C / 18 to 24 h Incubation <b>(Confirmation Step)</b> Two typical colonies form each plate are confirmed with Real-Time PCR and Rapid ID 32 E</p>

Chromogenic *Enterobacter sakazakii* agar DFI (Druggan-Forsythe-Iversen formulation)에서 alpha-glucosidase를 생성하는 *Escherichia vulneris*가 녹색의 위양성(false positive)을 보이는 문제점을 해결하기 위해 glucose를 첨가함으로써 배지능력을 개선하는 연구를 하였다. 이때 *Cronobacter* spp.는 glucose 첨가여부에 관계없이 모두 진양성(true positive)를 보였고, *Escherichia vulneris*는 하얀색의 진음성(true negative)의 결과를 보여주어

위양성 문제점을 해결할 수 있었다. 이 연구결과를 활용하여 새로운 상용배지가 개발되어 최근 개정된 미국 FDA의 BAM에 등재되어 있다(US FDA, 2012).

Kim 등(2010)은 현재 식약청의 식품공전에 등재되어 있는 3종의 *C. sakazakii* 분리배지(VRBG agar, *Enterobacter sakazakii* [ES] agar, Chromogenic *Enterobacter sakazakii* [CES] agar)에 대한 평가실험에서 ES agar와 CES agar가 VRBG agar에 비하

여 뚜렷한 색깔과 모양을 형성하였다고 보고하였다. 실험에 사용한 30종의 *C. sakazakii*는 모든 배지에서 100% 검출되었다. *C. sakazakii*가 아닌 Enterobacteriaceae 균주에 대한 exclusivity 시험에서 ES agar와 CES agar는 100% 검출도를 보였지만 VRBG agar는 0%로 매우 상반된 결과를 나타내었다(Kim et al., 2010). 이것은 2002년 미국 FDA에서 사용되었던 VRBG 배지의 단점을 보여주는 결과이기도 하지만, 인위적으로 접종한 식품에서 회수율은 ES agar, CES agar, VRBG agar 3종 배지 모두 유의차 없이 비슷한 결과를 보였다. 조제분유에는 상재균의 수가 낮아 사용한 배지들 간에 차이점이 관찰되지는 않았으나, 환경시료 등 상재균의 수가 높은 시료를 사용하여 검출배지의 능력을 비교하면 상이한 결과가 나올 수도 있어 이에 대한 추가 연구가 필요한 실정이다. 한국의 국립농림수산검역검사본부에서는 초기 FDA의 비공식방법을 근간으로 축산물의 가공기준 및 성분규격 상의 조제분유에 대한 *Cronobacter* spp. 검출법을 제시하였는데 VRBG대신에 *E. sakazakii* Medium 또는 Chromogenic *Enterobacter sakazakii* medium 등의 선택배지를 추가한 것이 특징이다(Table 4). 또한 한국 식약청에서도 이와 유사한 *Cronobacter* spp. 검출법을 식품공전에 제시하였는데 선택배지로 VRBG 이외에 2종의 선택배지(*E. sakazakii* Medium 또는 Chromogenic *Enterobacter sakazakii* medium)를 추가한 것이 특징이다(Table 4). ISO (International Organization for Standardization)와 IDF (International Dairy Federation)는 공동으로 우유 및 우유 관련 제품에서 *Cronobacter* spp.를 검출하기 위한 공동연구의 기술적인 방법으로서 ISO/TS 22964:2006 (IDF/RM 210:2006) 방법을 발표하였는데 그 특징은 buffered peptone water (BPW)에서 예비 증균한 후 mLST/vancomycin broth에서 선택 증균하고, *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar에서 분리 배양하는 것으로 되어있으며, 양성 집락들은 당의 이용(발효), decarboxylase 활성, 노란색 침전 등에 기초하여 확인한다(Table 4). 최근 미국 FDA에서는 최소 6시간에서 최대 24시간 안에 분유에서 *Cronobacter* spp.를 신속하게 검출하는 방법을 개발하여 AOAC의 인증을 획득하였으며 미국 FDA BAM (FDA's Bacteriological Analytical Manual)의 공식 시험법으로 수록하였다(Chen et al., 2009, 2010; Lampel and Chen, 2009) (Table 4). 새롭게 개선된 이 최신 시험법의 특징은 선택배지로 DFI와 RF (R&F<sup>®</sup> *Enterobacter sakazakii* chromogenic plating medium, R&F Products, Inc. USA) 배지를 사용하였고 확인동정법으로 real-time PCR법과 Rapid ID 32E를 사용한 것이다. 특히 real-time PCR은 신속검사를 위해 추가적으로 포함되었는데 이 방법은 2005년 미국 FDA에서 Seo와 Brackett (2005)에 의해서 개발이 되었으며 유럽 등의 많은 연구에서 *Cronobacter* spp.의 최종 확인 동정에 사용되어 왔다(Iversen et al., 2007b; Mullane et al., 2008; Kim et al., 2008a; Almeida et al., 2009; El-Sharoud et al., 2009; Chen et al., 2010). 이 외에도 *Cronobacter* spp. 검출을 위한 다양한 연구가 진행되어 왔으나 대부분 건조분말 조제분유가 식품매체로 사용되어 환경시료에서 *Cronobacter* spp. 검출을 위한 시험법 개발 연구가 시급한 실정이다. 왜냐하면, 건조분말 조제분유 등은 선택배지에서 *Cronobacter* spp.와

경쟁을 하게 되는 상재균이 비교적 적게 존재하여 검출이 비교적 용이하나 환경시료의 경우 대부분 상재균이 많이 존재하기 때문에 *Cronobacter* spp.의 선택적인 분리가 까다로울 수 있기 때문이다. 한편 분말건조식품에서 신속 정확하게 *Cronobacter* spp.를 검출하기 위해서는 Real-Time PCR 방법이 유용한 것으로 보고되었으며(Chon et al., 2011), 또 다른 연구에서(Chon et al., 2012) 115개의 건조식품에서 18개의 *Cronobacter* spp.를 분리 검출 하였는데 Real-Time PCR 방법을 최종 확인동정 목적으로 효과적으로 사용하였다. 향후에는 상재균의 오염정도가 극심한 환경시료에서 Real-Time PCR 방법 등을 활용한 *Cronobacter* spp. 검출연구가 필요할 것으로 사료된다.

앞서 언급한 바와 같이 *Cronobacter* spp.의 가장 효과적인 제어대책은 식품제조환경 모니터링을 통한 오염방지이기 때문에 지속적으로 신속하고 효율적인 환경시료 검사법 개발연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

### *Cronobacter* spp. 발생현황과 신속검출법

#### 최근 *Cronobacter* spp.의 오염실태와 분리현황

Kim과 Park (2007)은 조제분유 등의 건조 스트레스에 노출되어 살아남은 *Cronobacter* spp.는 열 스트레스에서도 높은 내성을 보였을 뿐만 아니라 건조 내성이 높은 균주가 더 큰 항생제 내성을 보였다고 보고하였다. 이 결과는 건조 조제분유에 살아남아 있는 *Cronobacter* spp.는 추가적인 열처리에도 잘 살아남을 수 있고 항생제를 사용한 감염환자의 치료에도 어려움이 있을 수 있다는 것을 시사해 주고 있다. Lee 등(2009)은 한국에서 식품으로부터 110개의 *Cronobacter* spp.를 분리하였는데 대부분 건조에 강한 내성을 가지고 있어 조제분유 등의 건조식품에서 오랫동안 살아 있을 수 있었지만 습도가 높은 환경에서는 사멸률이 높다고 보고하였다. Kim 등(2009)은 국내 분유 및 영유아 식품에서 분리한 14개의 *Cronobacter* spp.는 polyethylene에서 biofilm 생성 능력을 보였고, 14개 중 7개의 균주(50%)는 pH 4.1에서도 성장할 수 있어 외국의 균주에 비해 비교적 낮은 내산성을 보였고, 분리된 모든 균주에서 용혈성은 관찰되지 않았다고 보고하였다.

2008년 경기도보건환경연구원에서는 영·유아의 분변 및 식품 중 *Cronobacter* spp. 분포 현황을 조사하였는데, 총 640건의 분변 가검물에서는 *Cronobacter* spp. 균주는 불검출되었지만, 중이염 환자 1명의 환부에서 *Cronobacter* spp. 1주가 검출되어서 인체 감염 위험성은 상존한다고 보고하였다. 이 연구결과를 통해 *Cronobacter* spp.의 감염 증상은 장독소에 의한 설사 등이 특징이 아니라 조직 감염이나 폐혈증이라는 것을 간접적으로 알 수 있다(GIHE, 2008). 외국의 경우에도 괴사성장염, 뇌수막염, 폐혈증 등 심각한 증상을 야기할 수 있다는 사실이 알려지면서 각국의 공인검출규격에서는 유아용 식품에서 엄격한 기준을 정해서 관리하고 있다(Chon et al., 2011).

Choi 등(2008)은 총 23종의 선식원료 중에서 다시마 분말, 말치 분말, 현미 분말, 청국장 분말 및 뽕쌀 분말에서 *Cronobacter* spp.를 분리하여 RAPD (random amplified polymorphic DNA)-

genotyping을 실시하여 최종적으로 8개의 분리군 그룹으로 molecular typing하였다. 또한 Kim 등(2008b)은 2006년 3월과 10월 사이 총 1146명의 환자들의 분변에서 4개의 *Cronobacter* spp.를 분리하였으며, *E. sakazakii* ATCC 표준균주와 16S rRNA sequence alignments 방법으로 비교한 결과 상동성이 99% 이상인 균은 3개로 판명되었다. 이들 연구는 *E. sakazakii*가 *Cronobacter* spp.로 명명법이 바뀌기 전에 수행되어서 새로운 분류법에 따른 *Cronobacter* spp.의 종들과의 관계를 조사하지는 않았으나 우리나라에서 *E. sakazakii*로 분리된 균주들도 새로운 분류체계에 따른 *Cronobacter* spp. 종으로 나누어질 수 있다. Kim (2008)은 대구시내 중·소형병원의 영상의학과 촬영실의 촬영테이블, 앞치마, 각종 손잡이, 이동형 촬영장치의 손잡이 및 방사선기사의 손 등에서의 미생물의 분포를 조사하였는데, 그 결과 이동형 촬영장치의 손잡이와 앞치마에서 비교적 많은 세균이 검출되었으며, 방사선기사의 손에서도 1.2%의 분리율로 *Cronobacter* spp. 세균이 분리되었다. 이 연구는 *Cronobacter* spp.가 식품 이외에 다양한 환경에 존재하고 있음을 잘 보여주고 있다.

Hwang 등(2008)은 국내에서 생산, 유통되고 있는 영·유아용 분말 조제분유 99제품을 수집하여 FAO/WHO Category A 세균인 *Salmonella*와 *Cronobacter* spp.의 오염도를 분석하였는데, 모든 제품에서 검출되지 않았다. 하지만 Category B의 장내세균은 99개의 제품 중 25개의 제품에서 높은 검출률(25%)을 보였고 *E. cloacae*, *K. pneumonia*, *Pantoea* spp., *E. vulneris*, *E. hermannii* 등 20종의 다양한 장내세균이 검출되었는데 이들은 병원환자시료에서 분리되는 균들이기 때문에 잠재적인 위험이 있어서 비살균식품인 조제분유의 특성상 잠재적인 위해세균 모니터링이 지속적으로 필요하다고 보고하였다. 이러한 연구를 종합해 보면, *Cronobacter* spp.는 옥수수 뿌리와 줄기, 덩굴식물의 뿌리, 레몬의 뿌리, 포도나무의 줄기, 양상추, 치즈, 식육, 소시지, 쌀 전분, 달걀 등 다양한 식품에서 분리보고가 되었으며 분말우유 공장, 시리얼 공장, 초콜렛 공장, 감자전분 공장 등에서도 발견되어 주의가 요구된다(Richards et al., 2005; Yoo et al., 2005; Jung and Park, 2006; Choi et al., 2007, 2008; Kim and Park, 2007; Kim et al., 2007, 2008a; Hwang et al., 2008; Kim, 2008; Lee and Park, 2008; Moon et al., 2008; Chen et al., 2009; El-Sharoud et al., 2009; Lampel and Chen, 2009; Lee et al., 2009; GIHE, 2008; Chon et al., 2011, 2012; Pearce et al., 2012).

최근에 *Cronobacter* spp.의 항생제 내성에 대한 관심이 높아지고 있다. Farmer 등(1980)은 *Cronobacter* spp. 균주가 gentamicin (100%), kanamycin (100%), chloramphenicol (100%), ampicillin (100%), nalidixic acid (87%), streptomycin (87%), tetracycline (87%), carbenicillin (87%), sulfadiazine (71%), colistin (67%)에 민감하였지만, cephalothin에는 13% 정도의 민감도를 보였다. 모든 균주가 penicillin에 저항성이 있었으며 100개 균주 중 1개 균주만이 복합항생제에 저항성을 보였다(Farmer et al., 1980).

Chon 등(2012)은 115개의 건조식품에서 분리된 18개의 *Cronobacter* spp.의 항생제 내성 검사에서 cephalothin에 내성을

보였지만, ampicillin (83.3%) ciprofloxacin (100%), tetracycline (83.3%), gentamicin (100%), nalidixic acid (100%), chloramphenicol (100%)에는 내성을 보이지 않았다. 하지만 *Cronobacter* spp. 분리군 모두 다재내성(multiple drug resistance)은 나타나지 않았다(Chon et al., 2012).

일반적으로 *Cronobacter* spp.는 항생제에 의한 치료가 되지만, 장기간 사용시 항생제 내성 증가 뿐만 아니라 신경적 후유증을 유발한다고 보고되었다(Lai, 2001). 또한 Lai (2001)는 모든 *Cronobacter* spp.는 ampicillin, cefazolin과 광범위 페니실린(extended spectrum penicillins)에 저항성이 있었지만, aminoglycosides와 trimethoprim-sulfamethoxazole에는 민감하였고, 제 3세대 cephalosporins과 quinolones에 대해서는 다양한 민감성을 보였다. 따라서 Lai (2001)는 아미노글리코사이드가 함유된 제 3세대 cephalosporins, trimethoprim-sulfamethoxazole 또는 carbapenems를 사용할 것을 권장하였다. 따라서 향후 *Cronobacter* spp. 분리군의 항생제 내성에 대한 변화 및 경향에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

### *Cronobacter* spp. 제어 및 예방

2006년 한국원자력연구소 방사선연구원은 방사선 식품 조사(Food Irradiation) 기술을 이용해서 건조 분말유아식에서 *Cronobacter* spp.의 방사선 감수성 평가를 보고하였는데 식품 살균을 위해 조사하는 방사선의 3분의 1 정도 에너지인 3kGy의 감마선을 수 분(min) 정도 조사하면 분유에서 *Cronobacter* spp.균을 완전히 제거할 수 있으며, 최근 단체급식 식중독 사고를 불러온 norovirus와 *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Vibrio cholera* 등 다른 식중독 균도 함께 제거 가능하다고 하였다(Lee et al., 2006, 2007). Jin 등(2008)은 *Cronobacter* spp.균이 *Bacillus cereus* 보다 방사선 조사에 대한 내성(radiation-resistant)을 보였지만 10 kGy 이하의 감마선조사(gamma irradiation)를 하면 분유에 존재하는 주요 병원성세균을 제거할 수 있다고 보고하였다. 한국에서 방사선 조사가 허용되고 있는 식품은 마늘, 된장, 감자, 양파, 고추장, 건조채소류 등 26가지 품목이며(Byun and Lee, 2003), 분유의 경우는 방사선 조사 허용 품목에 포함할 수 있도록 관련 법규 개정이 필요한 실정이다(Raghav and Aggarwal, 2007). 미국 식품의약품안전청(FDA), 세계보건기구(WHO) 등이 50년 이상 연구한 결과 방사선 조사 식품에서 방사능이 검출되지 않을 뿐 아니라 유전독성학적으로 전혀 문제가 없는 것으로 판명되었다(Lee et al., 2006). 현재 전세계 52개국에 250여 식품 품목에 방사선 조사 기술을 이용하고 있으며, 특히 미국은 어린이 식중독사고를 원천 차단할 수 있는 가장 효과적인 방법으로 방사선 식품 조사를 권장하고 있다(Yoon et al., 2010). 따라서 한국에서 방사선 식품조사에 대한 연구와 특히 영·유아제품에 대한 기준이 시급히 확립되어야 할 것으로 사료된다.

Choi 등(2007)은 쌀가루의 건조방법에 따른 *B. cereus*와 *Cronobacter* spp. 생육 억제 특성연구에서 마이크로파 처리가 열풍건조 처리보다 쌀가루의 품질면에서나 미생물학적 안전성 측면에서 더 유용한 결과가 있다고 보고하였다. Chun 등(2009)은 선식과 미숫가루에 UV-C를 조사하여 *Cronobacter* spp.를 유효적으로 감소시켰으나, 품질에는 영향을 주지 않았다고 보고하

였다. 이들 방법의 실용화 여부는 영·유아가 섭취하는 분유의 방사선 조사, 마이크로파 처리, UV-C 처리에 대한 소비자들의 반응에 달려 있을 것으로 사료된다.

Lee와 Park (2010)은 열, 살균소독제, 항생제에 의한 *Cronobacter* spp. 제어의 연구에서 균소독제 중에서 sodium hypochlorite (15–25 ppm)와 benzalkonium chloride (5–15 ppm)는 살균 효과가 있었다고 보고하였는데 기존에 사용되는 살균소독제에 특별한 저항성이 보이지 않아 정기적인 식품환경의 살균소독제를 사용한 소독으로 이 균을 용이하게 제어할 수 있음을 보여주었다.

2008년 경기도보건환경연구원 보고서에 따르면, 선식을 이 음식 대용으로 유아에게 제공할 경우 *Cronobacter* spp. 감염에 특별한 주의가 필요하며, 식품제조공정상 위생 안전성이 확보된 영·유아용 곡류가공품을 제공하여야 한다고 보고하였다(GIHE, 2008). 항생제 내성을 실험한 결과 Ampicillin, Amoxicillin/Clavulanic acid, Cefazolin 항생제에 내성을 나타내어 국내 *Cronobacter* spp. 감염자 발생 시 trimethoprim-sulfamethoxazole 등의 항생제가 유용하며, 조제분유 희석 및 선식 제조 시 최소한 65°C 이상의 열수(hot water)를 사용하는 것이 안전하다고 보고하였다(GIHE, 2008). 한편 미국 FDA는 70°C 이상의 열수를 권고하고 있다(US FDA, 2011).

Kim 등(2008a)은 조제분유와 선식에 열수를 가하였을 때 발생하는 온도 저하와 조제분유 및 선식 등의 분말 식품에서 biofilm을 생산하여 내열성이 증가되는 *Cronobacter* spp.의 특성을 고려하여 70°C 이상의 열수로 조제분유 및 선식 등을 용해하는 것이 좋다고 보고하였다. 전자레인지의 마이크로파를 이용하여 *Cronobacter* spp.균의 살균 효과를 실험한 결과 *Cronobacter* spp.를 제어하기 위하여 100 ml의 경우 90초 이상 가열하거나 온도측정이 곤란한 경우에는 최소 끓는 시점까지 가열한 후 냉각하여 섭취하는 것이 권장된다고 보고하였다.

Park 등(2008)은 소 장관으로부터 분리한 유산균 중에서 *Enterococcus faecium* JH95는 *Cronobacter* spp. 등의 유해미생물의 생육저해활성을 보였고, 항생제인 kanamycin과 streptomycin에 대해서 100 µg/ml까지 매우 높은 내성을 보였다고 보고하였다. 따라서 이러한 유용미생물은 *Cronobacter* spp.을 식품에서 제어할 수 있는 GRAS (Generally recognized as safe)의 개념으로 향후 이용이 증가할 것으로 사료된다.

Lee와 Park (2008)은 청동합금인 우리 전통 식기 놋그릇 유기 소재의 항미생물 특성을 연구하기 위해 *Cronobacter* spp.의 배양액을 유기, 구리, 주석, 스테인리스스틸(stainless steel) 쿠폰에 노출 건조 후 생육정도를 분석하였는데, 이들 금속표면에서의 살균력 측정결과 *Cronobacter* spp.에 대한 항균성은 구리가 가장 높았고 유기, 주석표면, 스테인리스스틸 금속표면 순으로 나타났다. *Cronobacter* spp.의 구리이온(Cu<sup>2+</sup>) 최소생육저해 농도는 25 ppm이었으며, 구리와는 다르게 강한 경도를 갖고 있는 유기 소재를 식품제조 환경에 적용시킬 경우 주요 그람 음성 세균의 교차오염을 효과적으로 저감화할 수 있을 것으로 보인다. 다양한 소독제(disinfectants)를 사용하여 *Cronobacter* spp. 사멸 효과를 평가한 연구에서 stainless steel에 생성된 *Cronobacter* spp. biofilms은 쉽게 제거되지 않은 반면, 살아있는 세포

(planktonic cells)는 효과적으로 제거되었다(Kim et al., 2007). 따라서, 소독제를 사용하여 분유제조 공장에서 *Cronobacter* spp.의 biofilms을 제거할 경우 각별한 주의가 필요하다.

Seo 등(2008)은 Gompertz 방정식을 변형해서 *Cronobacter* spp.의 성장예측모델결과 *Cronobacter* spp.의 성장은 온도(5–40°C), NaCl 농도(0–10%), pH (4–10) 등에 많은 영향을 받는다고 보고하였다. 따라서 이 세가지 요소인 온도, NaCl 농도, pH를 활용하여 *Cronobacter* spp. 성장을 통제할 수 있다고 보고하였다.

Pearce 등(2012)은 turbulent flow 공법의 저온살균조건하에서 우유 매개 식중독세균의 열에 대한 저항성을 조사하였는데 *Cronobacter* spp.는 67.5°C에서 6.7 log 이상 감소하였다고 보고하였다.

이러한 연구결과를 종합해 보면, *Cronobacter* spp. 제거에는 방사선조사, UV-C, 균소독제, 열수, 유산균을 이용한 방법, 온도, NaCl, pH 등의 방법을 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 보인다. 하지만 식품의 성분에 최소한의 영향을 주면서 *Cronobacter* spp.를 제거할 수 있는 “hurdle concept”를 활용한 방법에 대한 연구가 향후 집중적으로 진행되어야 할 것이다.

#### *Cronobacter* spp. 신속 검출방법

Kang 등(2007)은 16S rDNA sequences에 근거해서 새롭게 개발된 TaqMan Real-Time PCR 방법을 이용해서 *Cronobacter* spp. 검출에 관한 연구를 보고하였는데 *E. sakazakii*-specific DNA의 100 fg까지 검출이 가능하였다. Seo와 Brackett (2005)은 기존의 6일 정도 소요되는 *Cronobacter* spp. 검출시간을 2일 이내로 단축할 수 있는 Real-Time PCR법을 개발하였으며 생화학적 분석(Rapid ID 32 E 또는 API 20 E)을 대신해서 진양성(true positive) 동정검사에 효과적으로 사용되었다(US FDA, 2012; Chon et al., 2011, 2012). Hyeon 등(2010)은 IAC (Internal amplification control)을 가진 multiplex Real-Time PCR 방법을 12시간 증균(12 h post-enrichment)하여 조제분유에서 0.1 CFU/g 까지 *Salmonella*와 *Cronobacter* spp.를 동시에 검출가능함을 보여주었다. Wang 등(2012)은 IAC (internal amplification control)을 사용한 Real-Time PCR에서 *Cronobacter* spp.에 대한 높은 특이성(specificity)과 민감도(sensitivity)를 유지하면서 위음성(false negative)을 제거할 수 있는 신속검출방법을 보고하였다.

따라서 이와 같은 신속검출법을 식품제조환경의 상시 모니터링에 적극적으로 활용하는 것이 중요할 것으로 사료된다. Yu (2009)는 조제분유내 *Cronobacter* spp. 신속검출 시 기존에 사용되던 한천평판배양법 대신에 이진희석법을 변형·적용하여 균액 및 조제분유에 존재하는 *Cronobacter* spp.의 오염수준을 정량적으로 추정할 수 있는 간이 신속법을 개발하였다. 이 방법의 원리는 salicin을 분해 할 수 있는 *Cronobacter* spp.가 존재하는 well은 미생물의 성장 및 대사로 인해 pH가 감소됨에 따라 bromocresol purple 지시약의 색이 보라색에서 노란색으로 변하는 것이다(Yu, 2009). Park 등(2012)은 Sandwich ELISA (sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) 기술을 이용하여 다양한 식품에서 *Cronobacter muytjensii*, *C. turicensis*, *C. sakazakii*, *E. aerogenes*, *E. pulveris*, *E. helveticus* 등의 다양한



세균들이 존재하는 가운데 *Cronobacter mytjensii*만을 신속하고 정확하게 검출할 수 있다고 보고하였다.

향후 이와 같이 신속하고 사용이 용이한 검출방법에 대한 연구가 많아져야 영·유아 식품의 미생물학적 안전성 향상에 크게 기여할 것으로 보여진다.

## 결론

1958년 영국에서 처음으로 *Cronobacter* spp.에 의한 식중독사고로 인해 2명의 유아가 사망한 이후 최근까지 120건 이상의 식중독사고가 보고 되었고 최소 27명 이상 사망하였다. *Enterobacter sakazakii*는 Iversen 등(2008)에 의해 *Cronobacter* spp.로 새롭게 명명되었고, *Cronobacter* spp.의 다양한 생화학적 특징 중에서 alpha-glucosidase를 생성하는 특징을 이용해 다양한 형광배지가 개발되었다. *Cronobacter* spp.는 생후 3일부터 4세까지의 신생아에서 뇌수막염 뿐만 아니라 괴사성장염, 패혈증, 장 괴사 등 심각한 증상을 야기할 수 있고, 신생아와 유아, 면역력이 저하된 사람에게 치명적이거나 심각한 장애를 유발할 수 있다. 한국 식약청에서도 생후 6개월 미만의 영·유아용 특수조제식품 중 분말제품에 한하여 *Cronobacter* spp. 음성 기준으로 관리하고 있다. 따라서 영·유아를 대상으로 하는 조제식, 곡류조제식 및 특수의료용 등의 식품에서 *Cronobacter* spp.을 신속하게 분리·검출할 수 있도록 Real-Time PCR과 다양한 Chromogenic agar가 포함된 식품공전 및 축산물규격범의 개정이 요구되고 있다. *Cronobacter* spp.균은 대부분의 환경시료에서 검출이 될 수 있으며, 파리와 설치류와 같은 매개체를 통한 2차 오염이 가능할 것으로 추측하고 있다. 현재까지 *Cronobacter* spp.의 감염 전파 경로는 정확하게 밝혀지지는 않았지만, 감염사고를 역학 조사해 본 결과 대부분 조제분유(powdered infant formula)를 통한 것이었다. 따라서 분유 생산과정 중 오염원을 찾아 제거하는 것이 가장 좋은 방법으로 인식되고 있으며, 열처리 후 분유제조 과정 중 파리와 같은 곤충이나 쥐 등에 의해서 재오염(post-contamination)이 되지 않도록 노력해야 한다. 최근 미국 FDA에서는 최소 6시간에서 최대 24시간 안에 분유에서 *Cronobacter* spp.를 신속하게 검출하는 방법을 개발하여 AOAC의 인증을 획득하였으며 미국 FDA BAM (FDA's Bacteriological Analytical Manual)의 공식 시험법으로 수록하였다. 새롭게 개선된 이 시험법의 특징은 선택배지로 DFI와 RF 선택배지를 사용하였고 확인동정법으로 Real-Time PCR법과 Rapid ID 32E를 사용한 것이다. 한국 식약청은 취약특수집단인 영·유아 대상 식품의 안전관리를 강화하기 위하여 *Cronobacter* spp.의 모니터링 결과를 바탕으로 2006년 10월부터 *Cronobacter* spp.의 권장규격을 '불검출'로 설정·운영하고 있으며 지속적으로 규정을 강화하고 있다. 한국 농림수산검역검사본부도 조제분유 및 기타조제분유에서 *Cronobacter* spp. 불검출 기준 및 검사법을 신설하였다. 최근에는 방사선조사, UV-C, 균소독제, 열수(hot water), 유산균을 이용한 방법, 온도, NaCl, pH 등을 이용하여 *Cronobacter* spp.를 제거할 수 있는 다양한 방법에 대한 연구뿐만 아니라 Multiplex Real-Time PCR과 ELISA 방법을 이용한 신속검출법에 대한 연구가 많이 진행

되고 있다. 결론적으로 *Cronobacter* spp.에 의한 영·유아 감염을 사전에 방지하고 감염 시 효과적인 치료를 위해서는 감염경로에 대한 역학조사 뿐만 아니라 항생제 내성에 대한 연구가 향후 진행되어야 할 것으로 사료된다. 따라서 더 많은 모니터링 연구를 통해서 오염원파악을 토대로 위해요소 중점관리기준 (HACCP) 등 총체적인 영·유아식품 오염방지책이 개발되어야 할 것이며, 또한 미생물위해평가(Microbial Risk Assessment)에 사용할 수 있는 *Cronobacter* spp.의 정량측정 방법의 개발과 정량 데이터 확보에 관한 연구가 매우 필요한 실정이다.

## 감사의 말

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 일반연구자지원사업(2012R1A1A3A2012009237) 및 중견연구자지원사업(2012R1A2A2A01015344)을 통해서 수행된 것입니다.

또 저자인 송광영과 천정환은 BK21의 부분적인 인건비지원을 받았습니다.

## 참고문헌

- Almeida, C., Azevedo, N.F., Iversen, C., Fanning, S., Keevil, C.W., and Vieira, M.J. 2009. Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2925–2930.
- Byun, M.W. and Lee, J.W. 2003. Application of irradiation technology for food safety and security. *Food Sci. Ind.* **36**, 25–41.
- Chen, Y., Hammack, T.S., Song, K.Y., and Lampel, K.A. 2009. 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**, 862–872.
- Chen, Y., Song, K.Y., Brown, E.W., and Lampel, K.A. 2010. Development of an improved protocol for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula. *J. Food Prot.* **73**, 1016–1022.
- Choi, B.K., Park, S.Y., Ha, S.D., Kum, J.S., Lee, H.Y., and Park, J.D. 2007. Effect of drying methods of rice flour on growth properties of *Bacillus cereus* and *Enterobacter sakazakii*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**, 295–298.
- Choi, J.W., Kim, Y.J., Lee, J.K., Kim, Y.H., Kwon, K.S., Hwang, I.G., and Oh, S.W. 2008. Multiple confirmation and RAPD-genotyping of *Enterobacter sakazakii* isolated from Sunsik. *Korean J. Food Sci. Technol.* **40**, 101–105.
- Choi, M.S., Cheigh, C.I., Jeong, E.A., Shin, J.K., Park, J.Y., Song, K.B., Park, J.H., Kwon, K.S., and Chung, M.S. 2009. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* inoculated on formulated infant foods by intense pulsed light treatment. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 1537–1540.
- Chon, J.W., Song, K.Y., Hyeon, J.Y., and Seo, K.H. 2012. Isolation and characterization of *Cronobacter* from desiccated foods in Korea. *J. Food Sci.* **77**, M354–M358.
- Chon, J.W., Song, K.Y., Kim, S.Y., Hyeon, J.Y., Kim, Y.G., Hwang, I.G., Kwak, H.S., and Seo, K.H. 2011. Comparison of real-time PCR and conventional culture method for detection of *Cronobacter* spp. in powdered foods. *Korean J. Microbiol.* **47**, 1–5.

- Chun, H.Y., Kim, J.Y., Kim, H.J., and Song, K.B. 2009. Effects of UV-C irradiation on the quality of Sunsik and Misutkaru during storage. *J. Food Sci. Nutr.* **14**, 226–232.
- Commission Regulation (EC). 2007. No 1441/2007 of 5 December 2007 amending regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. 2007. Official Journal of the European Union. L 322/12–29.
- El-Sharoud, W.M., O'Brien, S., Negrodo, C., Iversen, C., Fanning, S., and Healy, B. 2009. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiol.* **9**, 24.
- Farmer, J.J. III. 1995. Enterobacteriaceae: introduction and identification. Manual of Clinical Microbiology, pp. 438–449. In Murray, P.R., Barron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., and Tenover, R.H. (6<sup>th</sup> ed) ASM Press Inc., Washington, D.C., USA.
- Farmer, J.J. III. 1999. Enterobacteriaceae: introduction and identification. Manual of Clinical Microbiology (7<sup>th</sup> ed), pp. 442–458. In Murray, P.R., Barron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., and Tenover, R.H. (eds.) ASM Press Inc., Washington, D.C., USA.
- Farmer, J.J. III., Asbury, M.A., Hickman, F.W., and Brenner, D.J. 1980. Enterobacteriaceae Study Group (USA): *Enterobacter sakazakii*: a new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 569–584.
- Farmer, J.J. III. and Kelly, M.T. 1992. Enterobacteriaceae. Manual of Clinical Microbiology, pp. 360–383. In Balows, A. (ed.) ASM Press Inc., Washington, D.C., USA.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2004. 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>. Accessed Dec. 20, 2011.
- Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., and Beuchat, L.R. 2005. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.* **104**, 1–34.
- Gyeonggi-do Research Institute of Health & Environment (GIHE). 2008. Isolation and inactivation of *Enterobacter sakazakii* from humans foods and related raw materials. Available from: <http://gihe.gg.go.kr/main.do>. Accessed on Dec. 25, 2010.
- Hwang, J.Y., Lee, J.Y., and Park, J.H. 2008. Microbiological quality and potential pathogen monitoring for powdered infant formulas from the local market. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **28**, 555–561.
- Hyeon, J.Y., Park, C., Choi, I.S., Holt, P.S., and Seo, K.H. 2010. Development of multiplex real-time PCR with Internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula. *Int'l J. Food Microbiol.* **144**, 177–181.
- Iversen, C. and Forsythe, S.J. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Technol.* **11**, 443–454.
- Iversen, C., Lancashire, L., Waddington, M., Forsythe, S., and Ball, G. 2006a. Identification of *Enterobacter sakazakii* from closely related species: The use of artificial neural networks in the analysis of biochemical and 16S rRNA data. *BMC Microbiol.* **6**, 28.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, L., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., and Joosten, H. 2007a. 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 mytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC Evol. Biol.* **7**, 64.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., and Joosten, H. 2007b. Identification of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3814–3816.
- Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B.D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R., and 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 mytjensii* 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. *Int. J. System Evol. Microbiol.* **58**, 1442–1447.
- Iversen, C., Waddington, M., Farmer, J.J. III., and Forsythe, S. 2006b. The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. *BMC Microbiol.* **6**, 94.
- Iversen, C., Waddington, M., On, S.L., and Forsythe, S. 2004. Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5368–5370.
- Jin, Y.Y., Ku, K.J., Park, J.Y., Park, J.H., Chung, M.S., Kwon, K.S., Chung, K.S., Won, M.S., and Song, K.B. 2008. Comparison on inactivation of *Enterobacter sakazakii*, *Salmonella typhimurium* and *Bacillus cereus* inoculated on infant formula during storage by Gamma irradiation. *Food Sci. Biotechnol.* **17**, 861–864.
- Joker, R.N., Norholm, T., and Siboni, K.E. 1965. A case of neonatal meningitis caused by a yellow *Enterobacter*. *Danish Med. Bull.* **12**, 128–130.
- Jung, M.K. and Park, J.H. 2006. Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas. *Food Sci. Biotechnol.* **15**, 152–157.
- Kandhai, M.C., Reij, M.W., van Puyvelde, K., Guillaume-Gentil, O., Beumer, R.R., and van Schothorst, M. 2004. A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. *J. Food Prot.* **67**, 1267–1270.
- Kang, E.S., Nam, Y.S., and Hong, K.W. 2007. Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* using TaqMan Real-Time PCR assay. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 516–519.
- Kim, S.C. 2008. Bacteriological monitoring of radiology room apparatus in the department of radiological technology and contamination on hands of radiological technologists. *J. Radiological Sci. Technol.* **31**, 329–336.
- Kim, J.B., Cho, S.H., Park, Y.B., Lee, J.B., Kim, J.C., Lee, B.K., Lee, H.K., and Chae, H.S. 2008b. Surveillance of stool samples for the presence of *Enterobacter sakazakii* among Korean people. *Yonsei Med. J.* **49**, 1017–1022.
- Kim, H.J., Koo, M., and Oh, S.W. 2010. Performance comparison of 3 different isolation media of *Cronobacter sakazakii*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 764–768.
- Kim, S.A., Lee, Y.M., Oh, S.W., Gwak, H.S., Hwang, I.G., Kang, D.H., Woo, G.J., and Rhee, M.S. 2009. Biofilm formation and low pH viability of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolated from powdered infant formula and infant foods in Korea. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **29**, 702–708.
- Kim, S.H. and Park, J.H. 2007. Thermal resistance and inactivation of *Enterobacter sakazakii* isolates during rehydration of powdered infant formula. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 364–368.
- Kim, J.B., Park, Y.B., Lee, M.J., Kim, K.C., Huh, J.W., Kim, D.H., Lee,

- JB., Kim, J.C., Choi, J.H., and Oh, D.H.** 2008a. Effect of hot water and microwave heating on the inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant formula and Sunsik. *J. Fd. Hyg. Safety* **23**, 157–162.
- Kim, H.K., Ryu, J.H., and Beuchat, L.R.** 2007. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1256–1265.
- Kuzina, L.V., Peloquin, J.J., Vacek, D.C., and Miller, T.A.** 2001. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Curr. Microbiol.* **42**, 290–294.
- 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.
- Lampel, K.A. and Chen, Y.** 2009. Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (Cronobacter) from powdered infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* **136**, 179–184.
- Lee, J.W., Oh, S.H., Byun, E.B., Kim, J.H., Kim, J.H., Woon, J.H., and Byun, M.W.** 2007. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* of dehydrated infant formula by gamma-irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* **76**, 1858–1861.
- Lee, J.W., Oh, S.H., Kim, J.H., Yook, H.S., and Byun, M.W.** 2006. Gamma radiation sensitivity of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* **69**, 1434–1437.
- Lee, E.J. and Park, J.H.** 2008. Inactivation activity of bronze alloy Yugi for reduction of cross-contamination of food-borne pathogen in food processing. *J. Fd. Hyg. Safety* **23**, 309–313.
- Lee, E.J. and Park, J.H.** 2010. Biocontrol of isolated *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) by heat, sanitizer, and antibiotic. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **30**, 479–486.
- Lee, E.J., Ryu, T.H., and Park, J.H.** 2009. Tolerance of Korean *Enterobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolates to desiccation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **41**, 681–686.
- Lehner, A., Tasara, T., and Stephan, R.** 2004. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiol.* **4**, 43.
- Mange, J.P., Stephan, R., Borel, N., Wild, P., Kim, K.S., Pospischil, A., and Lehner, A.** 2006. Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. *BMC Microbiol.* **6**, 58.
- Moon, J.H., Lee, H.O., Shim, J.Y., Kim, I.H., Shin, H.S., Won, S.I., Paik, M.K., Shin, H.S., and Om, A.S.** 2008. Study on the amendment of standard regulations of food additives and contaminants for infant formulas in Korea. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 1214–1221.
- Mullane, N., Healy, B., Meade, J., Whyte, P., Wall, P.G., and Fanning, S.** 2008. Dissemination of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk protein manufacturing facility. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5913–5917.
- Muytjens, H.L. and Kollee, L.A.A.** 1990. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **9**, 372–373.
- Muytjens, H.L., van der Ros-van de Repe, J., and van Druten, H.A.M.** 1984. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha glucosidase reaction and reproducibility of the test system. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 684–686.
- Park, S., Shukla, S., Kim, Y., Oh, S., Hun Kim, S., and Kim, M.** 2012. Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cronobacter muytjensii* (formerly called *Enterobacter sakazakii*). *Microbiol. Immunol.* **56**, 472–479.
- Park, J.H., Yoon, S.S., and Park, Y.S.** 2008. Growth inhibitory activity of *Enterococcus faecium* isolated from bovine intestinal tract against *Enterobacter sakazakii*. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **28**, 99–104.
- Pearce, L.E., Smythe, B.W., Crawford, R.A., Oakley, E., Hathaway, S.C., and Shepherd, J.M.** 2012. Pasteurization of milk: the heat inactivation kinetics of milk-borne dairy pathogens under commercial-type conditions of turbulent flow. *J Dairy Sci.* **95**, 20–35.
- Raghav, M. and Aggarwal, P.K.** 2007. Purification and characterization of *Enterobacter sakazakii* enterotoxin. *Can. J. Microbiol.* **53**, 750–755.
- Richards, G.M., Gurtler, J.B., and Beuchat, L.R.** 2005. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 844–850.
- Seo, K.H. and Brackett, R.E.** 2005. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J. Food Prot.* **68**, 59–63.
- Seo, K.Y., Heo, S.K., Bae, D.H., Oh, D.H., and Ha, S.D.** 2008. Growth characteristics of *Enterobacter sakazakii* used to develop a predictive model. *Food Sci. Biotechnol.* **17**, 642–650.
- Song, K.Y., Hyeon, J.Y., Shin, H.C., Park, C.K., Choi, I.S., and Seo, K.H.** 2008. Evaluation of a chromogenic medium supplemented with glucose for detecting *Enterobacter sakazakii*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 579–584.
- Teramoto, S., Tanabe, Y., Okano, E., Nagashima, T., Kobayashi, M., and Etoh, Y.** 2010. A first fatal neonatal case of *Enterobacter sakazakii* infection in Japan. *Pediatr. Int.* **52**, 312–313.
- United States Food and Drug Administration (US FDA).** 2002. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>. Accessed Dec. 27, 2010.
- United States Food and Drug Administration (US FDA).** 2011. Investigation of Cronobacter Bacteria Illness in Infants. Washington DC, USA Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm285401.htm>. Accessed Mar. 15, 2012.
- United States Food and Drug Administration (US FDA).** 2012. Bacteriological Analytical Manual Chapter 29 Cronobacter. Washington DC, USA Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm289378.htm>. Accessed Jun. 1, 2012.
- Urményi, A.M.C. and Franklin, A.W.** 1961. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet* **1**, 313–315.
- Wang, X., Zhu, C.Q., Xu, X.L., and Zhou, G.H.** 2012. Real-time PCR with internal amplification control for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in food samples. *Food Control.* **25**, 144–149.
- Yoo, M.K., Oh, S., and Kim, S.S.** 2005. Isolation and genotyping of *Enterobacter sakazakii* from powdered infant formula manufactured in Korea. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 875–877.
- Yoon, Y.H., Byun, M.W., Kim, W.J., Kwon, J.H., and Lee, J.W.** 2010. Current status of food irradiation technology on quarantine of agricultural commodities. *Food Sci. Ind.* **42**, 19–26.
- Yu, J.H.** 2009. Development of a rapid and miniaturize method for estimation of *Cronobacter* spp. in reconstituted infant formula. Master's Degree thesis, Korea Univ., Seoul.