

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

천정환^{1†} · 송광영^{1†} · 김선영¹ · 현지연¹ · 김윤경¹ · 황인균² · 곽효선² · 서건호^{1*}

¹건국대학교 수의과대학, ²식품의약품안전청 미생물과

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

Jung-Whan Chon¹, Kwang-Young Song¹, Sun-Young Kim¹, Ji-Yeon Hyeon¹,
Yun-Gyeong Kim¹, In-Gyun Hwang², Hyo-Sun Kwak², and Kun-Ho Seo^{1*}

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

²Division 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: bractu3@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 도달하여 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 성장도 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 통계학적 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

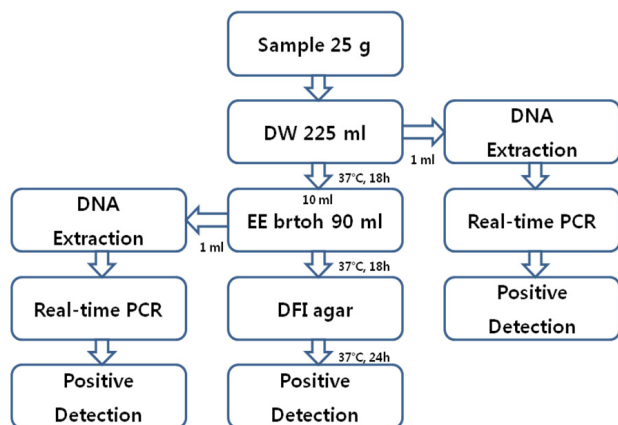


Fig. 1. Flow chart of standard culture method and real-time PCR for detection for *Cronobacter*.

수 있는 적정한 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 흔들어서 균이 고르게 퍼지도록 하였다. Bulk 샘플 외에 50 g을 추가적으로 준비하여 각각 25 g씩 음성 및 양성 대조군으로 사용하였으며, 음성에는 1 ml의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4; Sigma, USA)를 접종하였고 양성에는 10^7 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 음성대조군도 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 성장 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 μ l를 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

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 ^a	

^a 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[®] 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 *Ct*값이 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 양성을, 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

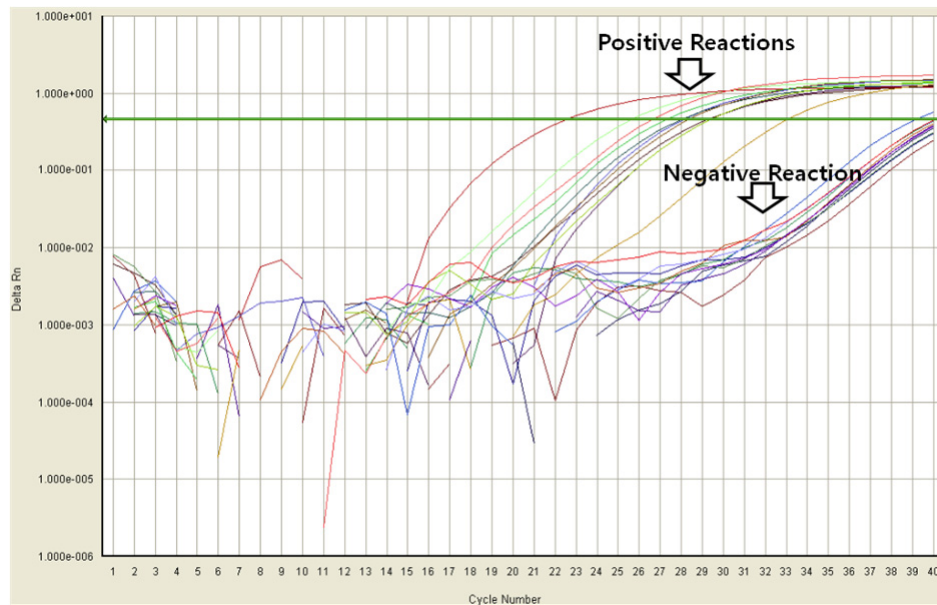


Fig. 2. Amplification plot of genomic DNA extracted from enrichment media (distilled water) in artificially inoculated 20 samples of infant formula in second trial. Arrows indicate positive reactions and negative reactions.

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 ^{1),2)}	Real-time PCR ^{1),2)}	
			DW	EE broth
Infant formula	32	8/20 ^a	6/20 ^{ab}	1/20 ^b
	28	10/20 ^a	10/20 ^a	10/20 ^a
	30	10/20 ^a	10/20 ^a	9/20 ^a
Misugaru	42	8/20 ^a	6/20 ^a	4/20 ^a
Baby food	80	11/20 ^a	11/20 ^a	9/20 ^a
Total	-	47/100 ^a	43/100 ^a	33/100 ^a

¹⁾ Number of positive samples / number of total samples

²⁾ 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 미세 물질이 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 농림부 산하 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.

적요

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 일부분이 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(09072식품안전029)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>. 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, 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. 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.