

선식에서 분리한 *Enterobacter sakazakii*의 복합동정 및 RAPD를 이용한 genotyping

최재원 · 김윤지 · 이종경 · 김영호 · 권기성¹ · 황인균¹ · 오세욱*

한국식품연구원 안전성연구단, ¹식품의약품안전청 식품평가부

Multiple Confirmation and RAPD-genotyping of *Enterobacter sakazakii* Isolated from *Sunsik*

Jae-Won Choi, Yun-Ji Kim, Jong-Kyung Lee, Young-Ho Kim, Ki-Sung Kwon¹, In-Gyun Hwang¹, and Se-Wook Oh*

Food Safety Research Division, Korea Food Research Institute

¹Center for Food Evaluation, Korea Food and Drug Administration

Abstract *Enterobacter sakazakii* is implicated in severe forms of neonatal infections such as meningitis and sepsis. This organism has been isolated from a wide range of foods, including cheese, vegetables, grains, herbs, and spices, but its primary environment is still unknown. Generally, dried infant milk formula has been epidemiologically identified as the source of *E. sakazakii*. *Sunsik* (a powdered mixture of roasted grains and other foodstuffs) is widely consumed in Korea as a side dish or energy supplement. *Sunsik* is consumed without heat treatment; thus, lacking an additional opportunity to inactivate foodborne pathogens. Therefore, its microbiological safety should be guaranteed. In this study, the prevalence of *E. sakazakii* was monitored in 23 different *sunsik* component flours, using FDA recommended methods; but *E. sakazakii* medium (Neogen) and Chromogenic *E. sakazakii* medium (Oxoid) were used as the selective media. In total, presumptive *E. sakazakii* strains were isolated from 8 different *sunsik* powders. Subsequently, an API 20E test was conducted, and 15 strains from 5 different *sunsik* flours (sea tangle, brown rice, non-glutinous rice, *cheonggukjang*, dried anchovy) were confirmed as *E. sakazakii*. Fifteen strains were again confirmed by PCR amplification, using three different primer sets (tDNA sequence, ITS sequence, 16S rRNA sequence), and compared to ATCC strains (12868, 29004, 29544, 51329). They were once again confirmed by their enzyme production profiles using an API ZYM kit. Finally, RAPD (random amplified polymorphic DNA)-genotyping was carried out as a monitoring tool to determine the contamination route of *E. sakazakii* during processing.

Key words: *Enterobacter sakazakii*, isolation, confirmation, PCR, genotyping

서 론

*Enterobacter sakazakii*는 Enterobacteriaceae family에 속하는 균으로서 노란색 색소를 생산하는 *E. cloacae*로 알려져 왔으나 DNA 특성, 생화학적 특성 및 항체 감수성에서 서로간의 차이가 인정되어 1980년대에 들어 새로운 속으로 분류되었으며 일본인 미생물학자인 Riichi sakazakii의 이름을 따서 *E. sakazakii*로 명명되었다(1).

*E. sakazakii*는 운동성이 있고 포자를 형성하지 않는 통성 혐기성 균이며, 그람 음성의 간균으로 주로 저체중 신생아를 대상으로 괴사성 장염, 패혈증 및 뇌수막염을 유발하는 균으로 최근 주목을 받고 있는 위해 미생물이라고 할 수 있다. *E. sakazakii* 감염은 주로 생후 3일부터 4년까지의 신생아와 어린이에게 병을 유발하

며 2003년까지 전 세계적으로 적어도 76건의 감염 사례와 19건의 사망이 보고되고 있다(2). 또한 어른을 대상으로도 9건 이상의 감염이 보고되고 있다(3-8).

아직까지 *E. sakazakii*와 관련된 감염원 및 경로는 정확히 밝혀져 있지 않지만, 역학적 조사 결과에 따르면 조제분유, 분유를 탄 장소의 환경조건, 사용한 기구 등이 가장 유력한 오염경로라고 알려져 있다(9-16).

따라서, 신생아를 대상으로 질병을 유발할 수 있는 *E. sakazakii*는 주로 분유를 매개체로 감염되는 것이라 할 수 있다. 신생아는 분유 이외의 식품에 대한 선택의 폭이 극히 제한되어 있기 때문이며 또한 분유에서 실제로 *E. sakazakii*가 검출되었다는 많은 보고가 있기 때문이다. Muyltjens 등(17)은 35개국의 조제분유를 수집하여 분석한 결과 조사된 141캔 중 14%에 달하는 조제분유가 *E. sakazakii*에 오염되어 있었다고 보고하였으며 또한 다른 보고에 의하면 캐나다 조제분유의 경우 120개 시료 중 8개 시료에서 *E. sakazakii*가 분리되어 오염도가 6.7%에 달한다고 하였다(18).

*E. sakazakii*에 오염되어 있을 것으로 추정되는 조제분유에 대하여 2002년 미국 Wyeth Nutrition사에서 자발적인 리콜(19)이 진행되었으며 2005년 1월 네덜란드에서도 Pregetimil에 대한 전 세계적인 리콜(20)이 진행된 바 있다. 따라서 그 어느 때보다도

*Corresponding author: Se-Wook Oh, Food Safety Research Division, Korea Food Research Institute, San 56-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9299
Fax: 82-31-709-9876
E-mail: swoh@kfri.re.kr
Received January 17, 2007; accepted November 26, 2007

조제분유에 대한 미생물 안전성 및 위생 관리에 대한 관심이 고조되고 있는 상황이다.

그러나 *E. sakazakii*는 분유에만 존재하는 균은 아니며 치즈, 고기, 야채, 곡류 및 향신료 등 많은 식품에서 분리되고 있으며(21) 또한 식품제조 공장, 일반 가정집에서도 분리되는 환경에 널리 존재하는 균으로 알려져 있다(22). 또한 분유에 첨가되는 성분에 대한 검출시험 결과, 전분에서 가장 높은 비율로 검출되었다는 보고도 있다(23).

선식은 예로부터 곡물을 볶아 가루로 만든 미숫가루가 대표적이며 주식 대용이나 저장식 혹은 구황식으로 널리 사용하여 왔다. 최근 들어 현대화된 제조 방법에 힘입어 대용식이나 이유식으로 널리 이용되고 있다. 선식은 영양학적으로 우수하며 균형 잡힌 식생활을 구성할 수 있는 좋은 식품이라고 할 수 있지만 선식은 별도의 열처리를 하지 않고 직접 섭취하기 때문에 식품위생학적으로 안전해야 할 당위성이 있다. 또한 선식은 면역력이 약한 어린이나 다이어트로 체력이 떨어진 사람이 섭취할 수 있기 때문에 그 어떤 식품보다 더 높은 수준의 미생물학적 안전성이 요구되고 있다. 그러나 시판 선식에 대한 미생물 분석 결과, 총균수가 4.8-7.0 log CFU/g으로 측정되었으며 대장균군도 검출되었다는 보고(24)가 있어 선식의 미생물학적 안전성에 대한 체계적인 고찰이 필요하다고 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 시판 선식을 대상으로 *E. sakazakii*에 대한 모니터링을 실시하였으며 그 결과 분리된 균주에 대하여 생화학적인 동정, PCR을 이용한 동정 및 효소활성을 이용한 복합 동정을 실시하였다. 또한 선식류 및 분유류에서 *E. sakazakii*의 오염경로를 파악하기 위한 기술로서 RAPD(random amplified polymorphic DNA)-PCR을 이용한 genotyping 방법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

선식은 다양한 식품 소재를 가공 처리하여 분말화한 후 혼합하여 제조되므로 선식에 대한 원형을 설정하기가 매우 어렵다. 따라서 혼합되어 있는 상태의 선식은 수거하지 않았으며 원료 분말상태의 선식 소재를 수거하여 실험하였다. 경기도 성남시 분당구 근처의 소매상을 대상으로 총 23종의 선식 소재를 수거하였다.

균주의 분리 및 동정

선식에서 *E. sakazakii* 균의 분리는 미국 FDA에서 권고하고 있는 방법(25)을 이용하여 실시하였다. 선식 시료를 100 g 3개, 10 g 3개, 1 g 3개씩 각각 계량하여 각각 3개의 시험관을 이용하는 최확수법(3 tube most probable number, MPN)을 이용하였다. 즉, 1개의 시료 당 총 333 g의 시료를 이용하여 분리실험을 실시하였다. 시료에 증류수를 첨가하여 37°C에서 하룻밤 배양하여 비선택적 전배양을 실시하였으며 이후 EE 배지를 이용하여 37°C에서 선택적 전배양을 실시하였다. 이후 균주 분리를 위한 선택배지는 VRBG 배지, Chromogenic *E. sakazakii* agar(26) 및 *E. sakazakii* medium(27)의 3종을 이용하여 특징적인 콜로니를 분리하였다. 그러나 VRBG의 경우, 담즙산염(bile salt)이 침전되어 생성되는 보라색 환 및 보라색 콜로니가 명확하게 나타나지 않았으며 또한 *E. sakazakii*에 대한 선택성도 낮은 것으로 판단되어서 Chromogenic *E. sakazakii* agar 및 *E. sakazakii* medium을 주로 실험에 이용하였다. Chromogenic *E. sakazakii* agar에서 나타난 녹색 콜로니와 *E. sakazakii* medium(360 nm)에서 형광색을 띠는 콜

로니를 추정콜로니로 분리하였다. 이 후 API 20E biochemical kit(BioMerieux, Marcy l'Etoile France)를 이용하여 동정하였으며 양성으로 판정된 시료는 최확수법으로 계수하였다. 최확수 계산은 미국 FDA에서 제시한 엑셀 시트를 사용하여 계산하였다(28).

Genomic DNA의 분리

균주를 Tryptic Soy Broth(Difco, Sparks, MD, USA)를 이용하여 37°C에서 하루 밤 동안 정치 배양하여 증식시킨 후 이를 수거하여 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 PCR에 사용될 template DNA를 분리하였다.

PCR primer

유전자 수준에서의 정확한 동정을 위하여 3종의 PCR primer를 이용하여 실험하였다. 목적 염기서열로는 tDNA, ITS 및 16S rRNA를 선정하였다. tDNA-PCR에 사용된 primer는 Clementino 등(29)이 사용한 5'-AGT CCG GTG CTC TAA CCA ACT GAG-3'와 5'-AGG TCG CGG GTT CGA ATC C-3'를 사용하였으며 ITS-PCR에는 5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3'과 5'-GAA GTC GTA ACA AGG-3'를 primer로 사용하였으며 16S rRNA-PCR 분석은 Keyser 등(30), Lehner 등(31)의 논문에 기술된 primer로 5'-CCC GCA TCT CTG CAG GAT TCT C-3'과 5'-CTA ATA CCG CAT AAC GTC TAC G-3'를 사용하였다.

PCR 실험 조건

PCR은 다음의 조건에서 수행하였다. 즉, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 각각 200 M의 dNTP; 각각 0.5 M의 primer; 1 unit Taq polymerase와 준비된 template DNA 5 μl를 넣어 각 시료 당 25 μl로 하여 PCR을 수행하였다. PCR 수행 조건은 Master cycler(Eppendorf, Westbury, NY, USA)를 사용하여 denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 50°C에서 30초, extension은 72°C에서 1분씩 총 30회를 반복 실시하였다.

Agarose gel electrophoresis

전기영동은 10 μl의 PCR 산물을 2%(w/v) agarose 젤에 loading 하여 0.5 × TAE 완충용액에서 100 V로 1시간 전기영동 하였다. Size marker로는 100 bp DNA ladder를 사용하였다. 전기영동이 끝난 후 젤은 ethidium bromide로 10분간 염색하였으며 증폭된 DNA는 자외선을 이용하여 관찰하였다.

분리균주의 효소 생산 특성

분리균주의 효소 생산 특성은 API ZYM kit(BioMerieux, 1: control, 2: alkaline phosphatase, 3: esterase, 4: esterase lipase, 5: lipase, 6: leucine arylamidase, 7: valine arylamidase, 8: cystine arylamidase, 9: trypsin, 10: α-chymotrypsin, 11: acid phosphatase, 12: naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, 13: α-galactosidase, 14: β-glucuronidase, 15: β-glucosidase, 16: α-glucosidase, 17: β-galacto, 18: N-acetyl-β-glucosaminidase, 19: α-mannosidase, 20: α-fucosidase)를 이용하여 조사하였으며 제조사의 매뉴얼에 따라 실험하였다.

RAPD-PCR

분리된 균주의 genotyping을 위하여 RAPD-PCR을 수행하였다. 총 83종의 임의적인 10-mer primer를 이용하여 genomic DNA에 대한 증폭을 실시하여 이중 typing에 적합한 primer를 선발하였다.

결과 및 고찰

*E. sakazakii*의 분리

소매점에서 수거한 총 23종의 선식 원료를 대상으로 *E. sakazakii* 분리 실험을 실시하였다. Chromogenic *E. sakazakii* agar와 *E. sakazakii* medium의 선택배지를 이용하여 분리한 결과 총 8종의 시료에서 *E. sakazakii*로 추정되는 콜로니를 분리하였다(Table 1). 청국장 분말, 찹쌀 분말, 옥수수 분말, 멸치 분말, 울무 분말, 멥쌀 분말, 현미 분말 및 다시마 분말에서 분리되었다.

추정 콜로니의 동정

미국 FDA에서 권고하고 있는 실험 방법에 따라 선택배지에서 분리된 추정 콜로니를 API 20E biochemical kit로 동정하였다. 그 결과 청국장 분말, 찹쌀 분말, 멸치 분말, 울무 분말 및 다시마 분말에서 분리된 균주만 *E. sakazakii*로 확인되었으며 분포 수준은 5가지 종류의 선식 모두 2.86 CFU/100 g 수준이었다. 선식에 존재하고 있는 *E. sakazakii*의 수준은 100 g을 기준으로 하는 3 tube 최확수법 실험시 즉, 100 g 3개, 10 g 3개, 1 g 3개의 실험처리구 중 100 g 3개 시료에서만 *E. sakazakii*가 양성으로 추정되었음을 의미하였다. *E. sakazakii*로 동정되지 않은 3종의 선식 부재료 중 찹쌀 분말에서 분리된 균주는 *Pantoea* spp. 4로 확인되었으며 옥수수 가루에서 분리된 2종의 녹색 콜로니는 모두 *E. amnigenus*로, 울무 가루에서 분리된 균주도 *E. amnigenus*로 확인되었다.

Table 1. Isolation of *E. sakazakii* from Sunsik ingredients

Sunsik ingredients	<i>Enterobacter sakazakii</i> (MPN/100 g) ¹⁾	
	Presumptive ²⁾	Confirmed ³⁾
Brown rice eye flour	- ⁴⁾	-
Black bean flour	-	-
Sea tangle flour	2.86	2.86
Mung bean flour	-	-
Anchovy flour	2.86	2.86
Glutinous rice flour	0.36	-
Corn flour	0.95	-
Safflower seed flour	-	-
Spinach flour	-	-
Adlay flour	0.36	-
Non-glutinous rice flour	2.86	2.86
Banana flour	-	-
Buchwheat flour	-	-
Cheonggukjang flour	2.86	2.86
Mushroom flour	-	-
Pine leaf flour	-	-
Brown rice flour	2.86	2.86
Carrot flour	-	-
Shrimp flour	-	-
Unroasted bean flour	-	-
Chestnut flour	-	-
Mugwort flour	-	-
Red bean flour	-	-

¹⁾Most probable number was measured by using 3 tube method according to USA FDA recommended method.

²⁾Presumptive isolates calculated by selective media.

³⁾Confirmed isolates identified by API 20E biochemical kit.

⁴⁾Not detected.

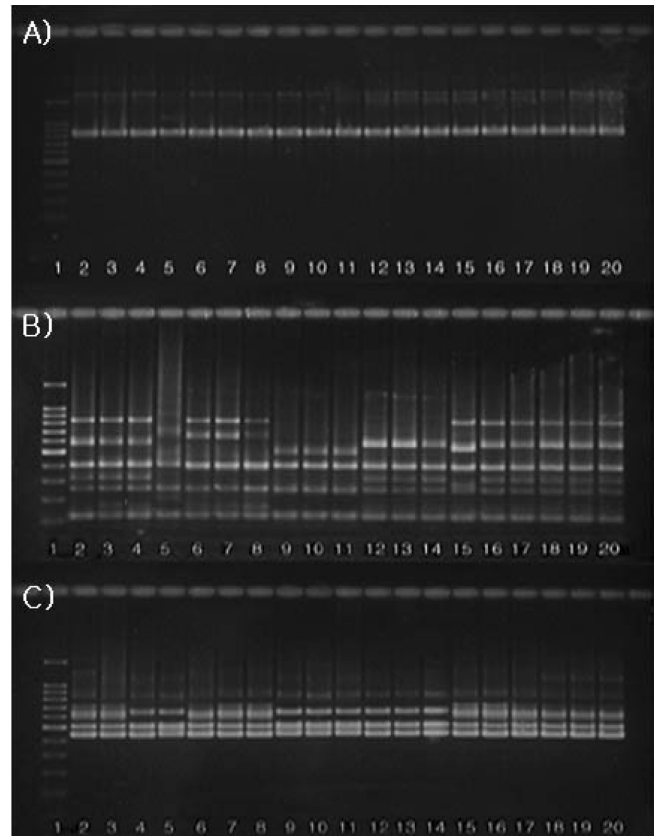


Fig. 1. PCR confirmation of the isolated *E. sakazakii* by 16S rRNA (A), ITS, 16S-23S rRNA internal spacer region (B) and tDNA (C). 1: size marker, 2: ATCC 12868, 3: ATCC 29004, 4: ATCC 29544, 5: ATCC 51329, 6-8: isolates from sea tangle flour, 9-11: isolates from anchovy flour, 12-14: isolates from brown rice flour, 15-17: isolates from cheonggukjang flour, 18-20: isolates from non-glutinous rice flour.

PCR을 이용한 2차 동정

미국 FDA에서 권고하고 있는 *E. sakazakii*의 동정 방법이 API 20E kit로 되어 있어 실험자에 따라 주관적인 결과가 발생할 수 있으므로 보다 정확한 동정을 위하여 PCR을 실시하였다. 증폭되는 목적염기서열로 16S rRNA(31), ITS(29), tDNA(30)로 설정하였다. API 20E kit를 이용하여 *E. sakazakii*로 동정된 균주에 대하여 3종의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였으며 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. A)에 나타난 밴드 패턴은 16S rRNA가 목적 염기서열이었을 때의 결과로서 2-5 lane은 ATCC 표준균주로 대조구로 사용되었다(ATCC 12868, 29004, 29544, 51329). 균주의 분리가 3 tube 최확수법에 의해서 수행되었으며 또한 100 g 3개의 시료에서 *E. sakazakii*가 양성으로 추정되었기 때문에 한 개의 시료 당 3개의 균주를 실험 대상으로 하여 총 5개의 시료에서 15개의 균주를 실험대상으로 하였다. PCR 결과 실험에 공시된 모든 균주는 1.0 kb 정도의 크기를 가지는 증폭 산물을 나타내었으며 전체적으로 동일한 패턴을 나타내었다. 따라서 표준균주와 분리균주가 모두 동일한 밴드 패턴을 나타내므로 *E. sakazakii*의 동정에 효율적으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 16S와 23S rRNA의 internal spacer region인 ITS에 대한 PCR 결과를 B)에 나타내었다. 먼저 대조구로 사용된 ATCC 12868, ATCC 29004, ATCC 29544는 모두 동일한 밴드 패턴을 나타내었지만 ATCC 51329와는 서로 다른 경향을 나타내었다. 다시마 분말에서 분리

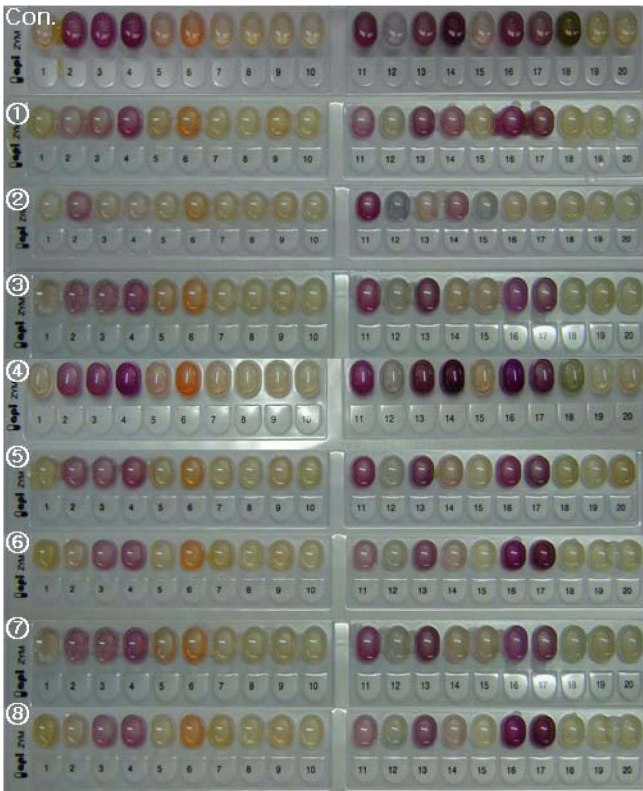


Fig. 2. Enzyme production profiles of isolated *E. sakazakii* tested by API ZYM kit. ①: isolate from sea tangle flour, ②: isolate from anchovy flour, ③ ④: two different isolates from brown rice flour, ⑤ ⑥ ⑦: three different isolates from *cheonggukjang* flour, ⑧: isolate from non-glutinous rice flour.

한 3개의 균주인 6-8번 lane은 대조구로 사용된 균주 중 ATCC 12868, ATCC 29004, ATCC 29544와 동일한 밴드 패턴을 나타내었으며 청국장 분말에서 분리된 균주인 15-17번 lane과 맷쌀 분말에서 분리된 18-20번 lane도 역시 동일한 밴드 패턴을 나타내었다. 그러나 9-11번 lane인 멸치 분말에서 분리된 3개의 균주와 현미에서 분리된 12-14 lane은 대조구로 사용된 균주와 서로 상이한 밴드 패턴을 나타내었다. ITS-PCR의 경우, 대조구로 사용된 표준균주에서도 서로 다른 밴드 패턴을 나타내며 또한 선식에서 분리된 균주 사이에서도 서로 상이한 밴드 패턴을 나타내므로 *E. sakazakii*의 동정에 효율적으로 활용되기에는 무리가 있었다. C)에는 tDNA-PCR 패턴을 나타내었다. 대조구로 사용된 표준균주 중 ATCC 12868, ATCC 29004가 동일한 패턴을 나타내었으며 ATCC 29544와 ATCC 51329가 동일한 밴드 패턴을 나타내었다. 선식에서 분리된 모든 균주는 대조구가 나타내는 2가지 종류의 밴드 패턴과 같은 경향을 나타내어 다시마 분말, 청국장 분말, 맷쌀 분말에서 분리된 균주가 ATCC 12868, ATCC 29004와 동일한 밴드 패턴을 나타내었으며 멸치 분말과 현미 분말에서 분리된 균주가 ATCC 29544와 ATCC 51329와 동일한 패턴을 나타내었다. tDNA를 목적 염기서열로 하는 PCR의 경우, 대조구에서 2종류의 서로 상이한 밴드 패턴이 나타났지만 선식에서 분리된 균이 모두 대조구와 동일한 밴드 패턴을 나타내므로 *E. sakazakii*의 동정에 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

효소 생산 특성에 의한 3차 동정

PADP-PCR에 의해 8개의 분리균주로 확인된 *E. sakazakii*에 대

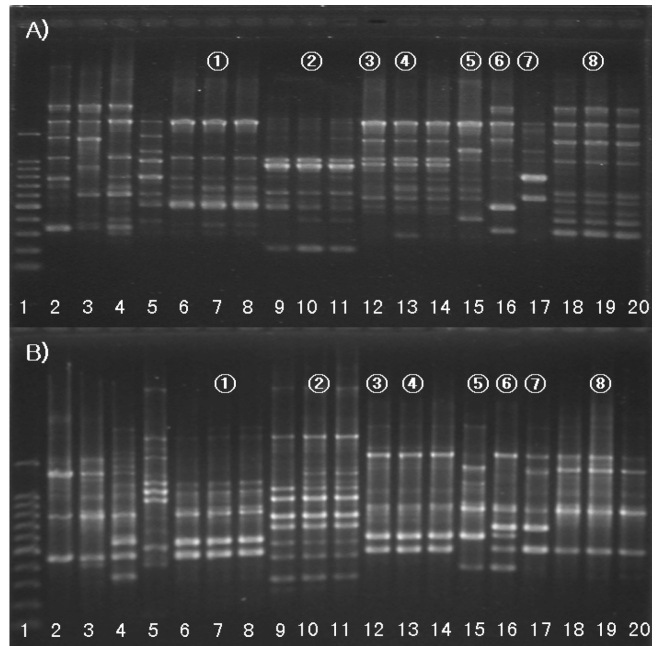


Fig. 3. RAPD patterns of the isolated *E. sakazakii* by random primer, CTG AGA CGG A (A) and AAT CGG GCT G (B). 1: size marker, 2: ATCC 12868, 3: ATCC 29004, 4: ATCC 29544, 5: ATCC 51329, 6-8: isolates from sea tangle flour, 9-11: isolates from anchovy flour, 12-14: isolates from brown rice flour, 15-17: isolates from *cheonggukjang* flour, 18-20: isolates from non-glutinous rice flour.

하여 API ZYM kit를 이용하여 효소 생산 특성을 조사하였다. 대조구로는 ATCC 12868을 사용하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 모두 특징적인 효소의 생산 패턴을 나타내었다. α-Glucosidase는 멸치 분말에서 분리된 2번 분리균주에서 매우 미약하게 나타났지만 이외의 균주에서는 매우 선명하게 나타남을 알 수 있었다. α-Glucosidase는 동일한 속에서 *E. sakazakii* 만이 특이적으로 이 효소를 생성하는 것으로 알려져 있으며 *E. sakazakii* 종에서는 90% 이상이 이 효소를 생성하는 것으로 알려져 있어 현재 사용되고 있는 선택배지의 선택마커(selective marker)로 이용되고 있는 효소이다(25,26).

RAPD-PCR에 의한 genotyping

83종의 임의적인 10-mer nucleotide를 합성하여 RAPD-PCR에 의한 균주간의 molecular typing을 하고자 하였다. 우선적으로 typing에 적합한 primer를 선발하는 실험을 실시하여 최종적으로 두 종류의 primer(CTG AGA CGG A, AAT CGG GCT G)를 선발하였다. 선발된 primer를 이용하여 RAPD-PCR을 수행하였으며 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 첫 번째 primer인 CTG AGA CGG A의 경우, 대조구로 사용된 표준균주에서 모두 상이한 밴드 패턴을 나타내어 molecular typing에 효율적으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 다시마 분말에서 분리된 균주인 6-8번 lane은 서로 동일한 밴드 패턴을 나타내었으므로 1번 분리균주로 설정하였다. 멸치 분말에서 분리된 균주인 9-11번 lane도 서로 동일한 밴드 패턴을 나타내었으므로 2번 분리균주로 설정하였다. 현미 분말에서 분리된 균주인 12-14번 lane은 12번, 14번 lane이 동일한 밴드 패턴을 나타내었으며 13번은 다소 다른 밴드 패턴을 나타내었으므로 각각 3번, 4번 분리균주로 설정하였다. 특히 청국장 분말에서 분리된 균주인 15-17번 lane은 모두 서로 상이한

밴드 패턴을 나타내었으므로 5번, 6번, 7번 분리균주로 설정하였다. 멍쌀 가루에서 분리한 균주인 18-20번 lane은 모두 동일한 밴드 패턴을 나타내었으므로 8번 분리균주로 설정하였다. 두 번째 primer(AAT CGG GCT G)를 이용하여 RAPD-PCR을 실시하였을 경우에도 표준균주가 모두 상이한 밴드 패턴을 나타내어 typing에 효과적임을 알 수 있었다. 다시마 분말, 멸치 분말에서 분리된 균주는 서로 각 시료별로 동일한 밴드 패턴을 나타내었으며 또한 A)의 밴드 패턴과도 상이한 패턴을 나타내었다. 특히, 청국장 분말에서 분리한 균주인 15-17번 lane은 첫 번째 primer를 사용하였을 때 모두 상이한 결과를 나타내었지만 역시 마찬가지로 두 번째 primer를 사용하였을 때도 모두 상이한 밴드 패턴을 나타내었다. 따라서 최종적으로 RAPD-PCR을 molecular typing에 사용하였을 경우, 최소한 8개의 서로 다른 분리균으로 구분할 수 있었다.

요 약

시판되고 있는 선식 원료를 수거하여 최근 새로운 식중독균으로 보고되고 있는 *Enterobacter sakazakii* 분리 실험을 실시하였다. 그 결과 총 23종의 선식 원료 중 8개의 선식 원료에서 *E. sakazakii*로 추정되는 콜로니를 분리할 수 있었으며 API 20E kit를 이용하여 1차적으로 동정한 결과, 다시마 분말, 멸치 분말, 현미 분말, 청국장 분말 및 멍쌀 분말에서 *E. sakazakii*를 분리할 수 있었다. 이후 3종의 primer를 이용한 PCR을 실시하여 2차적으로 동정하였다. 또한, 분리된 균주에 대한 RAPD-PCR을 실시하여 최종적으로 8종의 분리균으로 molecular typing을 할 수 있었다.

문 헌

1. Farmer JJ, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ. The Enterobacteriaceae study group (USA). *Enterobacter sakazakii*: A new species of 'Enterobacteriaceae' isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 569-584 (1980)
2. Iverson C, Forsythe SJ. Risk profiles of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Tech.* 14: 443-454 (2003)
3. Dennison SK, Morris J. Multiresistant *Enterobacter sakazakii* wound infection in an adult. *Infect. Med.* 19: 533-535 (2002)
4. Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2061-2067 (1997)
5. Hawkins RE, Lissner CR, Sanford JP. *Enterobacter sakazakii* bacteremia in an adult. *South. Med. J.* 84: 793-795 (1991)
6. Jimenez E, Gimenez C. Septic shock due to *Enterobacter sakazakii*. *Clin. Microbiol. Newslett.* 4: 30 (1982)
7. Pribyl C, Salzer R, Beskin J, Haddad RJ, Pollock B, Beville R, Holmes B, Mogabgab WJ. Aztreonam in the treatment of serious orthopedic infections. *Am. J. Med.* 78: 51-56 (1985)
8. Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. *Medicine* 80: 113-122 (2001)
9. Bar-Oz B, Preminger A, Peleg O, Block C, Arad I. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediatr.* 90: 356-358 (2001)
10. Biering G, Karlsson S, Clark NC, Jonsdottir KE, Ludvigsson P, Steingrimsson O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2054-2056 (1989)
11. Clark NC, Hill BC, O'Hara CM, Steingrimsson O, Cooksey RC. Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* 13: 467-72 (1990)
12. Muyltjens HL, Kollee LA. *Enterobacter sakazakii* meningitis in

- neonates: Causative role of formula? *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9: 372-373 (1990)
13. Muyltjens HL, Zanen HC, Sonderkamp HJ, Kollee LA, Wachsmuth IK, Farmer JJ. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* 18: 115-120 (1983)
14. Noriega FR, Kotloff KL, Martin MA, Schwalbe RS. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter Sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9: 447-449 (1990)
15. Simmons BP, Gelfand MS, Haas M, Metts L, Ferguson F. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect. Cont. Hosp. Ep.* 10: 398-401 (1989)
16. Van Acker J, De Smet F, Muyltjens G, Bougateg A, Naessens A, Lauwers S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.* 39: 293-297 (2001)
17. Muyltjens HL, Roelofs-Willemsse H, Jaspar GH. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 26: 743-746 (1988)
18. Nazarowec-White M, Farber JM. Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Food Protect.* 60: 226-230 (1997)
19. Wyeth Nutrition. Wyeth Nutrition initiates voluntary recall of selected store brand infant formula from U.S. marketplace. http://www.wyeth.com/news?nav=display&navTo=/wyeth_html/home/news/pressreleases/2002/1146452500787.html. Accessed Nov. 1, 2002.
20. The Food Safety Authority of Ireland. Pregestimil infant formula recall. <http://www.fsai.ie/alerts/archive/fa20050120.asp>. Accessed Jan. 20, 2005.
21. Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 1-34 (2005)
22. Kandhai MC, Reij MW, Gorris LG, Guillaume-Gentil O, van Schothorst M. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet* 363: 39-40 (2004)
23. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report, MRA Series 6. Microbiological Risk Assessment Series, No. 6 ISBN: 92 4 156262 5 (WHO) <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/es.pdf>. Accessed Dec. 30, 2006.
24. Chung SS, Han YS. Consumer's recognition, nutrient composition, and safety evaluation of commercial *sunsik* and *saengsik*. *Korean J. Food Culture* 18: 235-243 (2003)
25. FDA. Food and Drug Administration, Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>. Accessed Sep. 19, 2003.
26. Iverson C, Druggan P, Forsythe S. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 133-139 (2004)
27. Oh SW, Kang DH. Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microb.* 70: 5692-5694 (2004)
28. FDA. <http://www.cfsan.fda.gov/~bam/bam-a2.html#excl>. Accessed Dec. 29, 2006
29. Clementino MM, Filippis ID, Nascimento CR, Branquinho R, Rocha CL, Martins OB. PCR analyses of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and randomly amplified polymorphic DNA reveal inter- and intraspecific relationship of *Enterobacter cloacae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3865-3870 (2001)
30. Keyser M, Withuhn RC, Ronquest LC, Britz T. Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB)-granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii*. *Biotechnol. Lett.* 25: 1893-1898 (2003)
31. Lehner A, Tasara T, Stephan R. 16S rRNA genes based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiol.* 4: 43-50 (2004)