



Propidium Monoazide(PMA)와 Real-Time qPCR을 이용한 살아있는 *Cronobacter sakazakii*의 신속검출

†황대근¹ · †천정환^{1,2} · †김현숙³ · 김홍석¹ · 김동현¹ · 송광영^{1*} · †임진혁¹ ·
김영지¹ · 강일병¹ · †서건호¹

¹건국대학교 수의과대학 및 KU 식품안전연구소, ²미국 식품의약품안전청 국립독성연구센터,
³한양대학교 생활과학대학 식품영양학과

Rapid Detection of Viable *Cronobacter sakazakii* using Propidium Monoazide (PMA) in Combination with Real-Time qPCR

†Dae-Geun Hwang¹, †Jung-Whan Chon^{1,2}, †Hyun-Sook Kim³, Hong-Seok Kim¹, Dong-Hyeon Kim¹, Kwang-Young Song^{1*}, †Jin-Hyuk Yim¹, Young-Ji Kim¹, Il-Byung Kang¹ and †Kun-Ho Seo¹

¹KU Center for Food Safety and College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

²National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, Jefferson, AR 72079, USA

³Dept. of Food & Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Abstract

While various foodborne pathogenic bacteria can be detected more rapidly via polymerase chain reaction than via conventional plating methods, it is impossible to distinguish between viable and dead cells in DNA-based assays. Hence, propidium monoazide (PMA) treatment has been introduced to detect living cells. The purpose of this study is to evaluate the applicability of the PMA treatment and real-time qPCR method for the detection of *Cronobacter sakazakii* and to compare it to that of plate counting. Based on our positive results, we suggest the use of PMA treatment and real-time qPCR for the detection of viable *Cronobacter sakazakii* in various food sources and an update of the Korean Food Code.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*, propidium monoazide, real-time qPCR, heat shock

서론

지금까지 전통적인 세균의 검출은 표준평판법을 비롯한 다른 배지에 근거한 방법을 통해서 이루어졌다. 그러나 이런 방법들은 시간적인 면에서 매우 소모적이고, 또한 배지의 선택이나 대사 활성도, 실험자들의 경험에 따라서 다양한 오차가

생길 수 있는 가능성이 항상 존재하고 있다. 반면에 polymerase chain reaction(PCR) 방법에 따른 검출은 배양 가능한 세균과 배양 불가능한 세균을 모두 빠르게 동시에 검출할 수 있는 장점이 있다(Williams *et al.*, 2006). 하지만 PCR 방법은 살아 있는 세균과 죽은 세균을 구분하지 못하기 때문에, 검출된 세균이 현재 살아있는 세균인지, 아니면 살아 있다가 후에 죽은 세균인지 구분하는 것이 불가능하다. 세포가 죽은 후에도 세균의 DNA는 장기간 동안 존재할 수 있기 때문에, 죽은 세균의 DNA가 일부분이 남아서 PCR에 의해 검출되고 증폭될 수 있다(Young *et al.*, 2007). 따라서 DNA에 기초한 세균 수의 측정은 위양성(false positive) 반응 또는 과측정(overestimation)

* These authors contributed equally to this study.

* Corresponding author: Kwang-Young Song, KU Center for Food Safety and College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: +82-2-450-4121, Fax: +82-2-3436-4128, E-mail: drkysong@gmail.com

되는 결과가 나타날 수도 있다.

최근에 Nocker 등(2006, 2007)은 DNA 추출 전에 propidium monoazide(PMA)를 세균 표본에 처리하면 살아있는 세균만 선택적으로 검출할 수 있다고 주장하였는데, 이 방법의 원리는 세균 세포막의 완전함에 있는데, PMA는 손상된 세포막만 통과하여 들어갈 수 있는 염료이기 때문이다. 그 후 PMA의 azide group은 빛 노출 하에서 죽은 세포의 DNA와 공유 결합을 하게 된다(Nocker *et al.*, 2006, 2007). 따라서 PMA 방법은 빠르고 간단하게 완전한 세포막을 가진 세균의 DNA만 한정적으로 분석할 수 있다.

유아의 뇌막염을 일으키는 원인균으로 알려진 *Cronobacter* spp.는 1958년 영국에서 처음으로 보고되었는데, 이 때 감염된 2명의 유아가 모두 사망하였음에도 불구하고, 연구자들의 큰 관심을 불러일으키지는 못하였다(Joker *et al.*, 1965). 그 이후로 현재까지 120건 이상의 *Cronobacter* spp. 감염으로 인한 식중독 사고가 보고되었고, 특히 분유제품과 관련이 깊다는 것과 영·유아에게 치명적이라는 사실이 지난 10년 전부터 알려지면서 세계보건기구(WHO)에서도 큰 관심을 갖게 되었다(Iversen and Forsythe, 2003). 또한 일본에서도 *Cronobacter* spp.에 의한 식중독 사고가 보고되었다(Teramoto *et al.*, 2010). *Cronobacter* spp.는 장내세균의 일종으로, 이 균의 주 위험군은 6개월 미만의 영·유아 중 특히 면역결핍영아, 28일령 미만의 영아, 2.5 kg 미만의 저체중 영아들을 포함한다(Muytjens *et al.*, 1984). 또한 *Cronobacter* spp.는 *Salmonella*와 함께 조제분유에서 발견되는 미생물 중 위험도가 가장 높은 Category A에 속하는 균으로 세계보건기구(WHO) 및 세계식량농업기구(FAO)에서 분류하고 있다(FAO/WHO, 2004). 감염 후 신생아에서 나타나는 주요 증상은 패혈증, 수막염, 괴사성 장염 등이 있으며, 후유증으로 청력 및 시력 상실 그리고 신경마비를 나타내기도 한다(Gurtler *et al.*, 2005). 한국에서는 2006년 조제분유에서 검출되어 사회적인 큰 논란이 야기되었으며, 그 결과 영·아용 조제분유에서는 법적으로 불검출 기준을 적용하였고(Jung and Park, 2006), European Union에서도 엄격한 미생물 기준을 도입하게 되었다(Commission Regulation, 2007). 한국의 유제품공장에서 생산된 조제분유에서 검출된 *Cronobacter* spp.의 역학조사결과, 주 오염원으로 제조공장 주변의 하천, 농경지 등에서 서식하는 해충(파리, 담배벌레)이 제조 작업장 내로 유입되어 제품에 혼입될 가능성이 높다고 발표되었는데, 이와 같이 이 균은 환경 유래 오염균이라는 것이 지배적인 견해이다(Kuzina *et al.*, 2001). 2006년 이후 기준에 *Enterobacter sakazakii*로 알려진 균의 명칭이 *Cronobacter* spp.로 명명법이 새롭게 바뀌었고, 검출법도 다양하게 개발되어 왔다(Iversen *et al.*, 2008).

Nocker 등(2006, 2007)의 연구에 따르면 PMA와 quantitative

PCR을 동시에 함께 사용하였을 때, 살아있는 세균만 선택적으로 검출되는 데 성공적인 결과들을 보고하였다. 또한 최근에는 *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* 0157:H7, *Mycobacterium avium*, *E. faecalis* 등에 대한 연구가 진행되었거나 진행 중에 있다(Kim *et al.*, 2008; Liu and Mustapha, 2014). 하지만 *Cronobacter sakazakii* 세균에 대한 연구는 현재까지 매우 부족하기에 따라서 *Cronobacter sakazakii* 세균에서도 PMA와 죽은 세균이 반응하여, 살아있는 *Cronobacter sakazakii* 세균만 선택적으로 검출되는지를 확인하여 이 방법이 실제로 이용되는 연구가 절실히 요구되고 있는 것이 사실이다.

본 연구 목적은 *Cronobacter* spp. 세균 수의 측정에 있어서, PMA 처리와 real-time qPCR 방법의 적용 가능성을 기존의 plate counting 방법과 비교하여 알아보는 것이다. 또한 열처리한 *Cronobacter* spp.를 PMA 처리 후 real-time qPCR 방법을 사용하여 알아보는 것이다. 향후 *Cronobacter*와 관련된 영영·유아식품안전관리 연구방향을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 세균 표본의 준비

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

세균의 대조군과 처리군들은 아래와 같은 방법으로 하였다. Nutrient agar plate에서 one colony를 선별하여 10 mL Nutrient broth에 접종한 후 37°C 에서 3시간 동안 배양한 것을 대조군으로 하였으며, 첫 번째 처리군은 동일한 방법으로 한 후 75°C 에서 15분간 불활성화 것이며, 그리고 두 번째 처리군은 대조군과 첫 번째 처리군을 1:1로 혼합한 것이다. 준비된 대조군과 처리군 샘플에서 500 μL 에 1.25 μL 의 PMA를 처리한 후, PMA 처리와 DNA extraction을 한 후에 real-time PCR로 분석하였다.

2. PMA 처리

PMA 처리는 Kim 등(2008) 및 Liu와 Mustapha(2014)의 방법을 참고하여 다음과 같이 진행하였다. Propidium monoazide (PMA, Biotium Inc., USA)는 20%의 dimethyl sulfoxide(DMSO, Aldrich, USA)에 녹여서 20 mM로 몰농도를 맞춘 후, -20°C

에서 보관하였다. 각 표본을 500 μ L씩 1.5 mL Eppendorf tube에 옮겼다. 1.25 μ L의 PMA를 처리하여 최종 물농도를 약 50 μ M이 되게 하였다. 그리고 eppendorf tube를 은박지에 싼 후 5분 동안 흔들어주면서 배양하였다. 650W halogen light (General Electric Co., USA)를 이용하여 표본에 2분 동안 빛을 노출시켰으며, 표본의 과도한 열을 피하기 위하여 얼음 위에 수평으로 놓고, halogen 빛으로부터 20 cm의 거리를 유지하게 하였다. 빛에 의한 crosslinking이 일어난 후에, 표본은 14,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상부의 액을 제거한 후 PBS로 처리하였다.

3. DNA 추출

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 가 열해준 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.

4. Real-time qPCR 분석

Real-time qPCR 수행을 위한 primers/probe의 서열은 macro-molecular synthesis(MMS) operon gene를 타겟으로 개발된 시퀀스를 사용하였다. 해당 유전자 서열은 이전 연구에서 개발되어(Seo and Brackett, 2005) 다양한 균주에서 그 민감도와 특이도가 검증되었으며, Table 1에 제시되어 있다. 각 반응액의 조성은 TaqMan® universal PCR master mix(Applied Biosystems) 12.5 μ L, forward and reverse primer(900 nM) 각각 2.5 μ L, probe(250 nM) 2.5 μ L, 샘플 DNA 5 μ L로 총량을 25 μ L로 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(2005)의 연구를 참조하여, Ct 값이 38 이하인 경우이면서, 곡선이 S자형(sigmoid)의 증폭양상을 보이는 경우에 양성으로 판정하였다.

5. 통계분석

배지배양법과 real-time PCR과의 검출을 차이분석은 통계 프로그램인 GraphPad Instat(GraphPad Software, Inc., USA)을 사용하였으며, Fisher's exact test로 양성검출율의 통계학적인 유의차($p < 0.05$)를 분석하였다.

결과 및 고찰

1. Real-time qPCR의 효과 검증

*Cronobacter sakazakii*를 37°C에서 3시간 동안 배양하여 단계적으로 10배의 연속희석을 시행하여 각 표본을 DNA extraction 시행한 후에 real-time qPCR을 시행하였다. *Cronobacter sakazakii*의 양이 단계적으로 증가할수록 Ct value는 단계적으로 감소하였다(Fig. 1). 즉, Ct 값과 희석배수와는 반비례의 관계를 보였다(Fig. 1, 2). 다음으로 *Cronobacter sakazakii*를 37°C에서 3시간 동안 배양한 후 즉시 75°C에서 15분간 불활성화시킨 후 단계적으로 10배의 연속희석을 시행하여 각 표본을 DNA extraction 시행한 후에 real-time PCR을 시행하였다. *Cronobacter sakazakii*

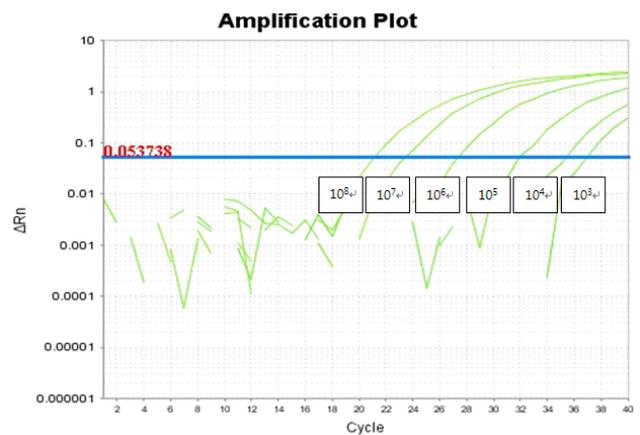


Fig. 1. Amplification plot of genomic DNA extracted from *Cronobacter sakazakii* using real-time qPCR. Arrows indicate positive reactions (over) and negative reactions (under).

Table 1. The primers and fluorogenic probe specific for the amplification of MMS gene of *Cronobacter* spp.

Target gene	Primer/probe	Sequence (5'→3')	Reference
MMS	Forward	GGG ATA TTG TCC CCT GAA ACA G	Seo and Brackett (2005)
	Reverse	CGA GAA TAA GCC GCG CAT T	
	Probe	FAM-AGA GTA GTA GTT GTA GAG GCC GTG CTT CCG AAA G-TAMRA*	

*FAM, 6-carboxyfluorescein (the reporter dye); TAMRA, 6-carboxytetramethylrhodamine (the quencher dye)

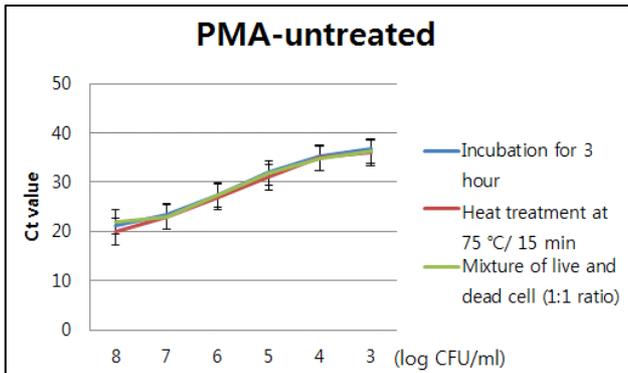


Fig. 2. Detection range of *Cronobacter sakazakii* cells without PMA using real-time qPCR.

의 양이 단계적으로 증가할수록 Ct value는 단계적으로 감소하였다(Fig. 2). 또한 살아있는 *Cronobacter sakazakii* 세균과 75°C에서 15분간 불활성화시킨 *Cronobacter sakazakii* 세균을 1:1로 희석하여 단계적으로 10배의 연속희석을 시행하여 각 표본을 DNA extraction 시행한 후에 real-time PCR을 시행하였다. 여기에서도 동일하게 *Cronobacter sakazakii*의 양이 단계적으로 증가할수록 Ct 값은 단계적으로 감소를 보였다(Fig. 2).

반면, 표준평판법에 의한 실험에서는 *Cronobacter sakazakii*를 37°C에서 3시간 동안 배양한 표본에서는 1.9×10^8 CFU/mL를 보였으며, *Cronobacter sakazakii*를 37°C에서 3시간 동안 배양한 후 즉시 75°C에서 15분간 불활성화시킨 표본에서는 0 CFU/mL를 보였으며, 살아있는 *Cronobacter sakazakii* 세균과 75°C에서 15분간 불활성화시킨 *Cronobacter sakazakii* 세균을 1:1로 희석한 표본에서는 6.2×10^8 CFU/mL를 보였다.

따라서 본 실험의 결과에서 *Cronobacter sakazakii*가 살아있는 경우와 죽은 경우에도 모두 real-time qPCR을 시행한 후 분석결과, Ct 값과 희석배수와의 반비례의 관계를 보였다. 즉, *Cronobacter sakazakii* 세균의 검출은 기존의 표준평판법의 대체 방법으로써 real-time qPCR 방법을 이용하는 것이 가능하며, 본 실험의 결과에서도 *Cronobacter sakazakii* 세균에 대한 real-time qPCR 조건은 매우 적합한 것으로 나타났다. 하지만, real-time qPCR 방법만으로는 죽은 세균까지 모두 검출이 되는 한계를 가지고 있는데, 본 실험의 결과에서도 살아있는 세균과 죽은 세균의 구분이 되지 않음을 보였다.

2. PMA의 효과 검증

*Cronobacter sakazakii*를 37°C에서 3시간 동안 배양하여 PMA 처리한 후 단계적으로 10배의 연속희석을 시행하여 각 표본을 DNA extraction 시행한 후에 real-time qPCR을 시행하였다. *Cronobacter sakazakii*의 양이 단계적으로 증가할수록 Ct value는 단계적으로 감소하였다. 즉, Ct 값과 희석배수와의

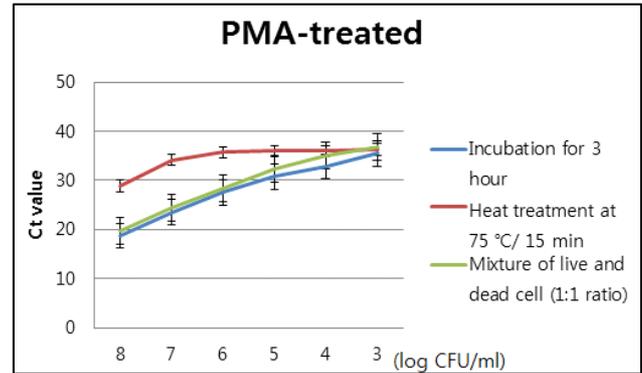


Fig. 3. Detection range of *Cronobacter sakazakii* cells with PMA using real-time qPCR.

반비례의 관계를 보였다(Fig. 3). 반면에 *Cronobacter sakazakii*를 37°C에서 3시간 동안 배양한 후, 즉시 75°C에서 15분간 불활성화시킨 후 PMA 처리하였다. 그 후 단계적으로 10배의 연속희석을 시행하여 각 표본을 DNA extraction 시행한 후에 real-time PCR을 시행하였다. 여기에서는 *Cronobacter sakazakii*의 Ct 값이 35를 넘어서 40에 가까운 값을 보였다(Fig. 3). 이것은 PMA 처리에 의해서 살아있는 적은 세균만이 증폭하여 높은 Ct 값을 보인 것으로 사료된다. 또한 살아있는 *Cronobacter sakazakii* 세균과 75°C에서 15분간 불활성화시킨 후 *Cronobacter sakazakii* 세균을 1:1로 희석하여 PMA 처리한 후 단계적으로 10배의 연속희석을 시행하여 각 표본을 DNA extraction 시행한 후에 real-time PCR을 시행하였다. 여기에서는 *Cronobacter sakazakii*의 양이 단계적으로 증가할수록 Ct value는 단계적으로 감소를 보였지만, *Cronobacter sakazakii*를 37°C에서 3시간 동안 배양하여 PMA 처리한 것보다는 전반적으로 Ct 값이 높게 나타났다(Fig. 3).

그리고 표준평판법에 의한 실험에서는 *Cronobacter sakazakii*를 37°C에서 3시간 동안 배양한 후 PMA 처리한 표본에서는 2.0×10^8 CFU/mL를 보였으며, *Cronobacter sakazakii*를 37°C에서 3시간 동안 배양한 후 즉시 75°C에서 15분간 불활성화시킨 후 PMA 처리한 표본에서는 0 CFU/mL를 보였으며, 살아있는 *Cronobacter sakazakii* 세균과 75°C에서 15분간 불활성화시킨 *Cronobacter sakazakii* 세균을 1:1로 희석한 후 PMA 처리한 표본에서는 7.2×10^8 CFU/mL를 보였다.

본 실험의 결과에서 *Cronobacter sakazakii*가 살아있는 경우와 죽은 경우에도 PMA 처리한 후 real-time PCR을 시행한 후 결과, 살아있는 *Cronobacter sakazakii* 세균과 죽은 *Cronobacter sakazakii* 세균과의 구별이 가능함을 보였다.

일반적으로 살아있는 세균이 양이 10배 정도의 차이가 나면 Ct 값은 약 3 정도의 차이를 보인다고 보고하였다(Kim *et al.*, 2008). 본 실험의 결과에서 살아있는 세균의 양이 증가할

수록 Ct 값이 감소하는 것이 관찰되었다. PMA 처리 여부에 따라서 Ct 값의 차이가 나타나는 것은 다음과 같은 이유인데, 즉 PMA가 빛 노출 하에서 죽은 세균의 DNA와 crosslinking을 하며(Liu and Mustapha, 2014), real-time qPCR을 시행하였을 때에는 살아있는 *Cronobacter sakazakii* 세균만 선택적으로 검출되었기 때문이다. 따라서 살아있는 *Cronobacter sakazakii* 세균의 검출이 요구될 때에는 PMA 처리와 real-time qPCR 방법 그리고 표준평판법을 동시에 이용하는 것이 가장 바람직한 것으로 사료된다.

하지만 PMA 처리와 real-time qPCR 방법 그리고 표준평판법을 이용할 때 향후 해결되어야 할 몇 가지 문제점도 있는 것이 사실이다. 현재까지 살아있는 세균만을 정확하게 검출할 수 있는 방법들이 다양하게 개발되고 있지만, 배양배지방법에서도 살아있는 세균이 배양이 되지 않는 현상(VBNC)이 있다는 것이다(De Vos *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). 그러므로 살아있는 세균과 죽은 세균을 구분하는 것이 여전히 단정적으로 확정할 수 없는 것이 또한 현실이다. 왜냐하면 살아있는 세균은 세포막의 온전함(membrane integrity), 생식증식(reproductive growth), 대사활성도(metabolic activity) 등 다양한 요인들에 의해서도 직접적 또는 간접적으로 많은 영향을 받을 수 있기 때문이다(Nocker *et al.*, 2006, 2007; Kim *et al.*, 2008; Liu and Mustapha, 2014).

그리고 PMA 처리 시에는 죽은 세균으로 판단되었던 것이 실제 배양을 해보면 배양이 될 수도 있다는 가능성도 존재할 수가 있을 것이다. 왜냐하면 이것은 세균 세포막에 미세한 손상만 받아도 PMA가 세포막을 통과하여 real-time PCR로 분석할 때에는 증폭되지 않을지라도, 표준평판 배양 시에는 세포막의 일부가 비록 손상을 입었을지라도 Nutrient agar를 통해서 영양분이 공급되면 세포막이 재생되어 세균이 성장할 수도 있는 가능성이 존재하기 때문이다(Kim *et al.*, 2008). 하지만 본 실험의 표준배양법에서는 이런 현상을 전혀 나타내지는 않았다. 비록 현재까지 여기에 관련된 연구보고가 전혀 없었을지라도 지속적인 향후 연구가 집중적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결론적으로 PMA 처리와 real-time qPCR 방법은 빠르고 간단한 방법이며, 앞으로 DNA-based assay를 기반으로 하여 더욱더 활발하게 사용될 것으로 사료된다. 특히 기존의 PCR 방법이 살아있는 세균과 죽은 세균을 구분하지 못하고 함께 증폭시키는 단점이 있는 반면에, PMA를 이용한 연구 방법은 완전한 세포막을 가진 세균만 선택적으로 검출하여 증폭시킨다는 점에서 더욱더 큰 의미가 있다고 사료된다. 또한 PMA 처리와 real-time qPCR 방법으로 *Cronobacter sakazakii*를 표본으로 사용하여 성공적으로 적용됨을 본 실험을 통해서 확인할 수 있었다. 더 나아가서 다양한 환경 중에서 75°C에서

15분간 노출된 후 *Cronobacter sakazakii* 세포막의 온전함을 평가하는 데에 있어서도 PMA 처리방법이 빠르고 재현 가능한 방법임을 본 실험에서 보여주었다. 따라서 향후 PMA 처리와 real-time qPCR 방법으로 다양한 식품에서 *Cronobacter sakazakii*를 검출하는 방법으로 확립되기 위해서는 validation 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 극한 조건에서 생존한 *Cronobacter sakazakii*의 검출에 PMA 처리와 real-time qPCR 방법의 이용가능성도 고려되어야 할 것이다.

감사의 글

This research was supported by the Bio-industry Technology Development Program of iPET (No. 112137-3) funded by the Ministry for Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries.

Disclaimer: The views expressed herein do not necessarily reflect those of the US Food and Drug Administration or the US Department of Health and Human Services.

참고문헌

1. 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.
2. De Vos, M. M. and Nelis, H. J. 2006. An improved method for the selective detection of fungi in hospital waters by solid phase cytometry. *J. Microbiol. Methods* 67:557-565.
3. 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 September 17, 2015.
4. 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.
5. 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.
6. 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* genom-species 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausamensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. Int. J. System Evol. Microbiol. 58: 1442-1447.
7. 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.
 8. 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.
 9. Kim, S. Y., Lee, S. J., Kim, E. S., Seo, E. G., Song, Y. J., Jung, I. Y. 2008. Selective detection of viable *Enterococcus faecalis* using propidium monoazide in combination with real-time PCR. J. Korean Academy of Conservative Dentistry 33:537-544.
 10. 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.
 11. Liu, Y. and Mustapha, A. 2014. Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef by propidium monoazide real-time PCR. International J. Food Micro. 170:48-54.
 12. 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.
 13. Nocker, A. and Camper, A. K. 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1997-2004.
 14. Nocker, A., Cheung, C. Y. and Camper, A. K. 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. J. Microbiol. Methods 67:310-320.
 15. Nocker, A., Sossa, K. E. and Camper, A. K. 2007. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. J. Microbiol. Methods 70:252-260.
 16. Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M. D. and Camper, A. K. 2007. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 73:5111-1117.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Williams, J. M., Trope, M., Caplan, D. J. and Shugars, D. C. 2006. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. J. Endod. 32: 715-721.
 20. Young, G., Turner, S., Davies, J. K., Sundqvist, G. and Figdor, D. 2007. Bacterial DNA persists for extended periods after cell death. J. Endod. 33:1417-1420.

Received 3 August, 2015
Revised 10 September, 2015
Accepted 15 September, 2015