pISSN 1225-4339 eISSN 2287-4992
Korean J. Food Nutr. Vol. 28. No. 4, 728~736 (2015)
http://dx.doi.org/10.9799/ksfan.2015.28.4.728

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

Cronobacter Species의 검출에 관한 연구동향: 총설

권 희 준 · †김 명 희
영남대학교 식품공학과

Research Trend of *Cronobacter* Species Detection Methods: A Review

Heejun Kwon and †Myunghee Kim
Dept. of Food Science & Technology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract

Cronobacter species (*Cronobacter* spp.), previously known as *Enterobacter sakazakii*, are gram negative food borne pathogenic bacteria. They pose a very high risk of infection to neonates and immuno-compromised individuals and can affect the human central nervous system. Consequently, survivors often suffer from severe neurological impairment including hydrocephalus, quadriplegia, and developmental delays. *Cronobacter* spp. were not only isolated from plant food and products such as cereals, fruits, vegetables, legume products, herbs, and spices but also from animal source foods such as milk, meat, fish, and products made from these foods. Therefore, rapid detection of *Cronobacter* spp. is essential for food safety. Many detection methods have been developed since the *Cronobacter* spp. were first reported. However, the development of more rapid, sensitive, and easy-to-use detection methods for the *Cronobacter* spp. is required. In this review, our aim was to study and compare the available detection methods for *Cronobacter* spp., including culture-based, molecular biology-based, and immunology-based methods. This study will contribute to the development of new and rapid detection method for *Cronobacter* spp.

Key words: *Cronobacter* species, *Enterobacter sakazakii*, culture-based detection method, molecular biology-based detection method, immunology-based detection method

서 론

Cronobacter species (*Cronobacter* spp.)는 2006년 이전까지 *Enterobacter sakazakii*로 불리어 왔으며, 신생아와 면역이 약한 사람들에게는 고위험균으로 알려져 있는 식품매개 병원균이다(Strydom 등 2012). *Cronobacter* spp.는 1958년 영국에서 유아의 뇌수막염을 일으키는 원인균으로 처음 보고되었다. 하지만 이 때 2명의 유아가 균에 의한 감염으로 사망하였음에도 불구하고 연구가 활발히 이루어지지는 못했다(Joker 등 1965). 그 이후 120건 이상의 *Cronobacter* spp. 감염으로 인한 식중독 사고가 보고되었으며, 특히 분유제품과 관련이 깊다. 또한 2002년 영・유아에게 치명적이라고 알려지며, 세계보건기구(WHO) 등을 비롯한 전 세계적으로 큰 관심을 불러일으키기 시작했다(Iversen & Forsythe 2003). 이후 일본에서도 *Cronobacter* spp.에 의한 식중독 사고가 보고되면서 국내에서 더욱 관심을 받게 된 식중독 균이 되었다(Teramoto 등 2010).

Cronobacter spp.는 대장균군에 속하는 그람 음성균으로 운동성을 가지며, 포자를 형성하지 않는 간균의 형태를 띄고 있다(Nazarowec-White & Farber 1997). *Cronobacter* spp.는 *Salmonella*와 함께 조제분유에서 발견되는 미생물 중 위험도가 가장 높은 category A에 속하는 균으로 분류되고 있다(FAO/WHO, 2004). 감염 후 신생아에게서 나타나는 주요 증상은 괴사성 장염, 수막염 패혈증 등을 일으키며, 후유증으로는 시력과 청력 상실 및 신경마비를 나타내기도 한다(Gurtler 등 2005;

† Corresponding author: Myunghee Kim, Dept. of Food Science & Technology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea. Tel: +82-53-810-2958, Fax: +82-53-810-4662, E-mail: foodtech@ynu.ac.kr

Lai KK 2001; Farmer JJ 1999). *Cronobacter* spp.는 한국에서도 2006년에 조제분유에서 검출되어, 이로 인해 영·유아용 조제분유에서는 법적으로 불검출 기준을 적용하였고(Jung & Park 2006; Yoo 등 2005), 유럽연합에서도 엄격한 미생물 기준을 도입하였다(Commission Regulation 2007). 이러한 이유 때문에 *Cronobacter* spp.에 대한 신속하고 정확하며, 재현성을 갖춘 검출방법은 필수적이다. 따라서, 이 총설에서는 현재까지 개발된 *Cronobacter* spp. 검출방법에 대하여 조사하고 분석함으로써, 보다 향상된 *Cronobacter* spp.의 신속하고 효율적이며, 정확한 검출을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

배지배양 검출방법

2002년 미국 식품의약품안전국에서는 분유에서의 *Cronobacter* spp.의 검출방법을 발표하였다(US FDA 2002). 이 방법(Fig. 1)은 처음으로 *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)를 검출한 방법(Muytjens 등 1988)과 비슷한 방법으로 분유를 완충펩톤수에 희석해 최확수(MPN) 방법을 바탕으로, 총 333 g의 분유제품(3×100 g, 3×10 g, 3×1 g)을 사용해 Enterobacteriacae Enrichment(EE) 배지에서 사전배양과 증균배양을 하고, 선택배지인 Violet Red Bile Glucose(VRBG) 배지를 이용해 분리한다고 보고했다. 하지만 VRBG 배지는 Enterobacteriacae에 대한 선택적인 배지로써 *Cronobacter* spp.만을 특이적으로 검출하기는 어렵기 때문에 *Cronobacter* spp.라고 추정되는 5개의 colony를 다시 tryptone soy agar(TSA) 배지에 25℃, 48±72시간 배양 후 노란색을 발하는 colony를 생화학적인 방법과 oxidase test를 이용해 *Cronobacter* spp.를 확인한다고 설명했다. 하지만, 이 방법은 *Cronobacter* spp.의 검출에 7일 이상이 소요되는 등의 문제점이 제기되어, *Cronobacter* spp.의 α-glucosidase 활성을 가지고 있는 특성을 근거로 Druggan-Forsythe Inversen (DFI) 배지가 개발되었다. 하지만 DFI 배지는 α-glucosidase를 생성하는 *Escherichia vulneris*가 녹색의 위양성(false positive)을 보이는 문제점이 있었다. 이를 해결하기 위해 glucose를 첨가함으로써 배지능력을 개선한 결과, *Cronobacter* spp.는 glucose 첨가 여부에 관계없이 모두 진양성(true positive)을 보였으며, *Escherichia vulneris*는 하얀색의 진음성(true negative)의 결과를 나타내, 위양성 문제점을 해결할 수 있었다(Song 등 2008). 이 연구결과를 바탕으로 새로운 상용배지가 개발되어, 2012년 미국 식품의약품안전국의 BAM에 등재되어 있다(US FDA 2012).

현재, 우리나라 식품의약품안전처 식품공전의 *Cronobacter* spp. 검출방법은 우선 검체를 무균적으로 채취하여 멸균증류수에서 가한 후, 35~37℃에서 18~24시간 증균배양을 한 후 그 배양액을 EE 배지에 첨가하여 35~37℃에서 18~24시간 2차

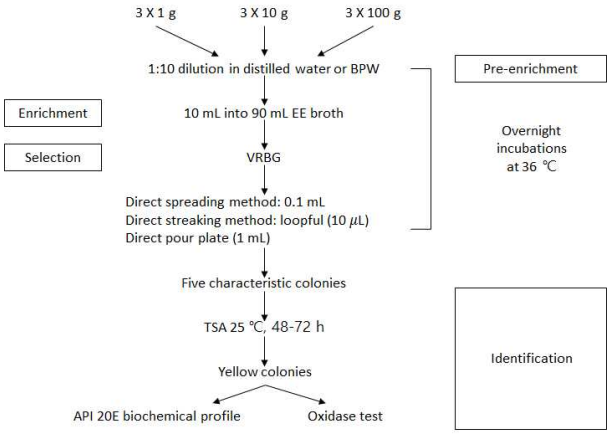

Fig. 1. Quantitative *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) isolation procedure (Yu JH 2009).

증균배양을 한다. 다음으로 균의 분리를 위하여 Chromogenic *Enterobacter sakazakii*(CES) agar, VRBG agar 또는 *Enterobacter sakazakii*(ES) agar에 도말하여 35~37℃에서 24±2시간 배양하여 CES agar에서 청록색, VRBG agar에서 자주색 및 ES agar에서는 장파장의 자외선(366 nm) 조사 하에 형광을 나타내는 전형적인 집락들에 대하여 확인시험을 실시한다. 확인시험은 5개의 전형적인 colony를 취하여 TSA 배지에 옮겨 25℃에서 28~72시간 배양 후, 황색 colony를 선별하여 생화학적 시험을 실시하여 *Cronobacter* spp.에 대하여 양성, 음성을 판단한다(Korean Food Standard Codes 2012).

분자생물학적 검출방법

분자생물학적 방법은 많은 시간이 소요되는 배지배양법의 특성을 보완하고, 신속하게 미생물을 검출하는데 사용되는 방법 중 하나이다. 목적하는 유전자를 증폭시켜 검출하는 방법으로 형광의 발현량을 통해 polymerase chain reaction(PCR)의 증폭산물을 실시간으로 측정하여 목적하는 유전자를 검출하는 real-time PCR 기법은 정성검출 및 정량검출이 가능한 검출 기법이다(Chon 등 2011).

Nair와 Venkitanarayanan(2006)은 *Cronobacter* spp.(*E. sakazakii*)의 outer membrane A(ompA)를 클로닝 및 염기서열을 분석하여 분유 내에서 특이적으로 *Cronobacter* spp.를 검출하는 방법을 보고하였다. 이 방법을 이용하여 *Cronobacter* spp.를 검출하는데 12시간이 걸린다고 기술하였으며, 탈이온수에서는 10^2 CFU/mL 수준의 검출이 가능하였으며, 분유 내에서는 10^3 CFU/mL로 검출이 가능하다고 보고했다.

또한, Liu 등(2006a)은 *Cronobacter* spp.의 검출을 위해 TaqMan과 SYBR green을 이용한 real-time PCR 분석법을 개

발하였는데, TaqMan은 Taq polymerase를 이용해 얻은 PCR 산물을 형광검출하는 원리를 이용하였으며, SYBR green을 이용한 방법은 SYBR green dye를 DNA에 결합하여 *Cronobacter* spp.를 검출한 방법이다. *Cronobacter* spp.와 non-*Cronobacter* spp.와의 교차반응성 실험결과, 35종의 *Cronobacter* spp.를 특이적으로 검출할 수 있었다. 또한 분유 100 g에서 *Cronobacter* spp. 1.1 CFU를 2일 이내로 검출할 수 있다고 기술했다.

Liu 등(2006b)은 특이적 PCR primer와 oligonucleotide probe를 이용하여 *Cronobacter* spp.를 검출하는 방법을 제시했다. 이 방법을 이용했을 때 분석 소요시간은 48시간이었으며, 검출감도는 분유 100 g에서 1.3 CFU를 검출할 수 있었다. 또한, *Cronobacter* spp. 외 다른 균과의 교차반응성 없이 검출할 수 있었다.

Kang 등(2007)은 real-time PCR을 이용해 *Cronobacter* spp.의 검출 분석법을 개발하였는데, TaqMan 검출법을 이용하여 *Cronobacter* spp.를 확인했다고 기술했다. 즉, 16s rRNA 서열을 기반으로 하여 TaqMan real-time PCR 분석법을 개발해 신속하고 고감도이며, 정량적으로 *Cronobacter* spp.를 검출했는데, 100 fg의 특이적 DNA 또는 2.3 CFU/tube의 *Cronobacter* spp.를 검출할 수 있었다고 보고했다. 또한 *Bacillus cereus* (ATCC 49063) 외 22종의 식품매개병원균과의 교차반응성 테스트에서도 *Cronobacter* spp.만 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

Zhou 등(2008)은 *Cronobacter* spp.를 zirconium hydroxide ($Zr(OH)_4$)를 이용하여 고정화시킨 후, PCR 방법을 이용해 검출하는 방법을 제시하였다. 이 방법을 통해서 10 g 분유 내에서 3×10^0 CFU/mL의 검출한계를 얻을 수 있었다고 보고했다.

Stoop 등(2009)은 rpoB gene을 이용해 PCR 방법으로 검출하는 방법은 종 특이적이고 짧은 시간 안에 *Cronobacter* spp.를 검출할 수 있었다고 기술했다.

Ye 등(2011)은 α-glucosidase gene을 이용해 PCR로써 2가지의 *Cronobacter* spp.(ATCC 51329, ATCC 29544)의 검출방법에 대해 기술했다. 이 방법을 이용해 분유 내 10^3 CFU/mL 수준의 *Cronobacter* spp.를 다른 병원균과의 교차반응 없이 특이적으로 검출할 수 있었다.

Wang 등(2012)은 분유뿐만 아니라, 살균우유, 닭고기에 임의로 *Cronobacter* spp.를 증균하여 real-time PCR을 이용해 *Cronobacter* spp.를 검출하는 방법에 대해서 기술했으며, 또한 internal amplification control(IAC) 방법과 비교 분석하였다. 특히, 다른 식품매개병원균과의 교차반응성 결과는 IAC와 비교하였을 때 real-time PCR 분석법이 증균 후 24시간 이내에 매우 특이적으로 *Cronobacter* spp.를 검출할 수 있다고 보고했다(Table 1).

Ye 등(2012)은 real-time PCR을 이용하여 건조수산물 내의 *Cronobacter* spp.에 대한 검출방법에 대해 보고하였다. 건조수산물에 *Cronobacter* spp.를 증균하여 real-time PCR을 이용하여 검출한 결과를 미국 식품의약품안전국에서 권고하는 방법과 DFI 배지검출방법과도 비교하였는데, 이들 방법보다 더욱 특이적으로 건조수산물 내에서 *Cronobacter* spp.의 검출

Table 1. Bacterial strains used for specificity test and results (Wang et al., 2012)

Bacterial strains	Source/ strain ID	Number	Result	
			MMS*	IAC**
Cronobacter sakazakii	ATCC 29544	1	+	+
Cronobacter sakazakii	ATCC 12868	1	+	+
Cronobacter spp.	JSCIQ	2	+	+
Corynebacterium variabilis	NMC	2	−	+
Citrobacter breakii	NMC	1	−	+
Enterobacter aerogenes	ATCC 13048	1	−	+
Enterobacter aerogenes	NMC	3	−	+
Enterobacter cloacae	ATCC 13047	1	−	+
Enterobacter cloacae	NMC	5	−	+
Enterococcus faecalis	ATCC 13433	1	−	+
Enterococcus faecalis	NMC	5	−	+
Enterococcus faecium	ATCC19434	1	−	+
Enterococcus faecium	NMC	4	−	+
Escherichia coli	NMC	7	−	+
Escherichia coli O157	CICC 21530	1	−	+
Klebsiella oxytoca	NMC	1	−	+
Lactobacillus plantarum	NMC	7	−	+
Listeria monocytogenes	ATCC 15313	1	−	+
Listeria monocytogenes	ATCC 19115	1	−	+
Listeria monocytogenes	ATCC 19112	1	−	+
Listeria monocytogenes	ATCC 19117	1	−	+
Listeria monocytogenes	CICC 21583	1	−	+
Pseudomonas sp.	NMC	4	−	+
Salmonella enteritidis	JSCIQ	1	−	+
Salmonella typhimurium	JSCDC 50013	1	−	+
Staphylococcus epidermidis	NMC	2	−	+
Staphylococcus haemolricus	NMC	1	−	+
Staphylococcus saprophyticus	NMC	2	−	+
Staphylococcus sciuri	NMC	1	−	+
Staphylococcus xylosus	NMC	2	−	+
Tetragenococcus halophilus	NMC	2	−	+
Yersinia enterocolitica	CICC 21565	1	−	+
Yersinia enterocolitica	JSCDC	1	−	+

* MMS: micromolecular synthesis
** IAC: internal amplification control

Table 2. Detection of *Cronobacter* in dry aquatic products by FDA, DFI medium, and one-step RT-PCR methods (Ye et al., 2012)

Samples (numbers)	Positive samples		
	One-step RT-PCR	FDA	DFI medium
Dry shrimp (28)	3	2	3
Dry fish (23)	2	2	2
Dry shellfish (19)	1	1	1
Dry fish meal (11)	2	2	2
Total (81)	8	7	8

이 가능하였다(Table 2).

Ruan 등(2013)은 PCR과 capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence(CE-LIF) detector를 이용하여 식품 내에서의 *Cronobacter* spp.를 검출하는 방법을 제시했다. 이 방법은 16S-23S rDNA의 internal transcribed spacer와 *Cronobacter* spp.의 ompA 두 개의 특이적 유전자를 duplex PCR에서 처리하여 PCR 산물을 얻은 후, CE-LIF detector를 이용하여 *Cronobacter* spp.를 검출한 방법이다. 이 방법을 이용하였을 때 검출한계는 1.6×10^{1} CFU/mL라고 보고했다.

Xu 등(2014)은 PCR 분석과 자성분리법을 이용하여 검출하는 방법을 개발해서 보고했다. Probe-magnetic beads를 이용해 타겟으로 하는 균을 beads에 부착하여 여러 반응을 거친 후 PCR 증폭을 하여 균을 검출했다(Fig. 2). 이 방법을 이용하였을 때 4시간 정도의 분석시간이 필요했으며, 10^{3} CFU/mL 수준에서 균을 검출할 수 있었으며, 기존의 PCR 기반으로 검출하는 방법들보다 검출시간을 많이 줄일 수 있었다고 보고했다.

면역학적 검출방법

면역학적 기반의 검출방법은 항원-항체간 상호작용을 이용해 세균, 포자, 바이러스, 독소 등을 검출하는 방법으로 ELISA, flow injection immunoassay, enzyme-linked fluorescent assay, bioluminescent enzyme immunoassay, enzyme-linked immunomagnetic chemiluminescence, immunochromatography strip test, immunomagnetic separation, agglutination test, radio-immunoassays 등의 분석법들이 여러 가지 식품매개병원균의 검출에 이용되고 있다(Song X 2014). 항원-항체 반응의 특이성은 과거 수십년 동안 세균의 동정 및 subtyping에 이용되어 왔으며, 세균의 표면 항원 또는 분비독소를 이용한 신속검출방법들이 다양하게 개발되어 왔다(Kim 등 2003). 항원-항체 간의 상호작용 원리를 이용한 면역학적인 *Cronobacter* spp. 검출방법에 관한 국내 및 국외 연구들은 다음과 같다.

Zhao 등(2010)은 cross-priming amplification(CPA)와 immunoblotting assay를 이용해 *Cronobacter* spp.를 검출하는 방법에 대해 보고했다. CPA는 항온수조와 독성이 없는 시약들만을 필요로 하며, immuno-blotting assay는 BioHelix Express strip을 이용하여 최종 결과를 얻는데 약 5~10분 정도 소요된다고 기술했다. CPA와 immuno-blotting assay를 이용해 *Cronobacter* spp.를 검출했을 때 배양액에서의 검출한계는 88±8.7892 CFU/mL, 분유에서는 분유 100 g에 3.2±2.0569 CFU였다고 기술했다. Blazkova 등(2011)은 *Cronobacter* spp.의 특이적 primer를 증폭시켜 PCR 산물을 얻어낸 후, immunochromatographic strip으로 검출한 방법을 보고했다. Immunochromatographic strip은 nitrocellulose membrane을 사용하였으며, test line은 anti-digoxigenin antibody, control line은 biotin conjugate를 분사하여 immunochromatographic strip을 제조했다. 제조한 immunochromatographic strip을 PCR 산물과 여러 시약들을 혼합한 반응액에 넣어 10분 정도 시간이 지난 이후 육안으로 직접 결과를 확인한다. 이 검출방법을 이용하였을 때 *Cronobacter* spp.의 검출한계는 PCR 산물의 8 ng이었으며, 분유 시료 10 g에서 적어도 10 cells의 균을 검출

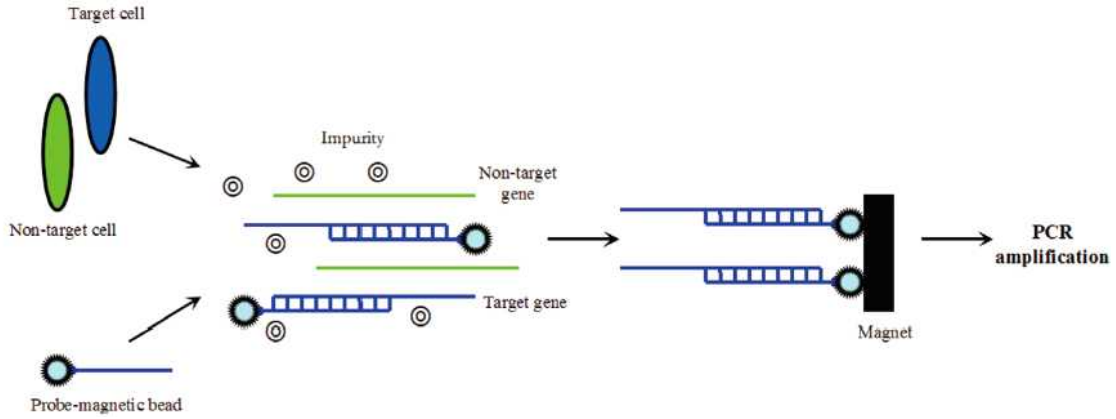

Fig. 2. Schematic diagram of probe-magnetic separation PCR (PMS-PCR) (Xu et al., 2014)

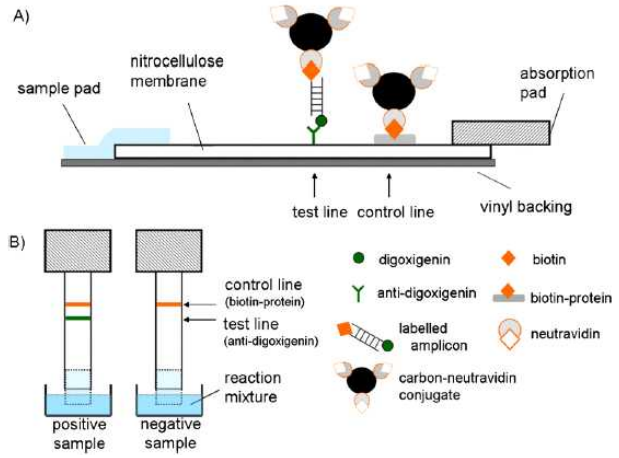

Fig. 3. Schematic diagram of immunochromatographic strip test. Panel A: schematic side view of immunochromatographic strip test and its detection principle. Panel B: schematic front view of immunochromatographic strip test (Blazova et al., 2011).

할 수 있었다고 보고했다(Fig. 3).

Li 등(2013)은 PCR과 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 분석방법을 이용하여 *Cronobacter* spp.에 대한 검출을 보고했다. 우선 DNA를 추출하고 서열을 분석 후 primer를 디자인하였으며, PCR로 ropB gene을 증폭 후 PCR 산물을 얻었다. 다음으로 ELISA 방법에 따라 96 well microplate에 streptavidin을 코팅하고, PCR 산물을 처리하여 반응시켜주었다. 반응이 끝나면 세척 후 antidigixigenin-detecting antibodies를 첨가하여 반응시킨다. 반응시간이 지나면 5.5 mM 2,2'-azino-bis diammonium salts를 처리하여 반응을 중지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 *Cronobacter* spp.를 검출하는 방법을 보고하였다. 이를 통하여 *Cronobacter* spp. 배양액과 분유 내에서 증균과정 없이 각각 1.06×10^2 CFU/mL, 1.06×10^3 CFU/mL의 균을 검출할 수 있다고 보고했다. 기존의 hybridization을 분리하는 단계를 제외하여 조금 더 효율적이고 시간을 절약할 수 있다고 보고했다.

Chen 등(2014)은 immunochromatographic strip을 이용하여 *Cronobacter* spp.를 검출하는 방법에 대해 소개했는데, *Cronobacter* spp.는 silica-coated magnetic nanoparticles separation을 이용하여 검출하고자 하는 균의 nucleic acid를 분리 후, nucleic acid와 probe를 hybirdization하고, immunochromatographic strips을 이용하여 검출했다고 보고했다. Test line는 anti-digoxigenin monoclonal 항체를 사용하였으며, control line은 biotin-BSA conjugate를 코팅해 육안으로 붉은색이 나타나면 양성으로 간주했다. 이 방법을 이용해 *Cronobacter* spp.를 검출했을 때 감도는 순수배양에서 10^5 CFU/mL, 분유시료에서 10^6 CFU/mL

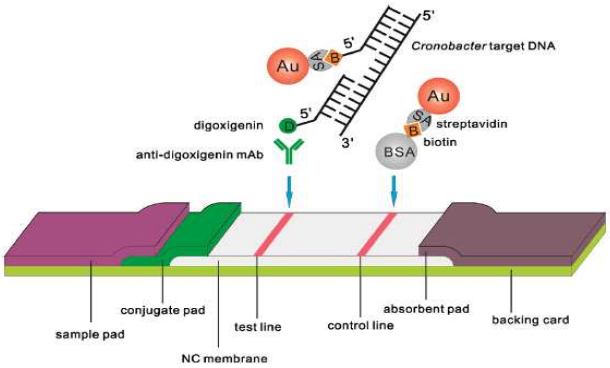

Fig. 4. The schematic illustration of the principle of the immunochromatographics strip (Chen et al., 2014)

라고 보고했다(Fig. 4).

Park 등(2012)은 sandwich ELISA 방법으로 *Cronobacter muytjensii*를 검출하는 방법에 대해 보고했다. 연구는 *C. muytjensii*에 대한 polyclonal 항체를 토끼를 이용해 생산하여 검출분석에 사용하였으며, 검출항체로는 rabbit anti-*C. muytjensii* IgG (1 μg/mL), capture 항체로는 chicken anti-*C. muytjensii* IgY를 사용해 분석했다. Sandwich ELISA 방법을 이용하여 *C. muytjensii*를 검출했을 때 순수배양에서의 검출한계는 2.0×10^4 CFU/mL, 분유 내에서의 검출한계는 6.3×10^4 CFU/mL이었으며 다른 여러 식품매개병원균과의 교차반응성 없이 특이적으로 *C. muytjensii*를 검출할 수 있었다고 보고했다. 또한, Song과 Kim(2013)도 토끼에서 생산한 *C. muytjensii* IgG 항체를 사용해 간접비경합-ELISA 방법으로 *C. muytjensii* 검출에 대해서 보고했는데, 다른 식품매개병원균과의 교차반응성 실험에서도 *C. muytjensii*만을 특이적으로 검출할 수 있었으며, 순수배양에서의 검출한계는 6.5×10^3 CFU/mL, 분유 25 g당 1 cell의 검출한계를 나타내었는데, sandwich ELISA 방법보다 더욱 고감도의 결과를 보여주었다.

Xu 등(2014b)은 두 가지의 ELISA 방법을 이용해 *Cronobacter* spp.의 효율적인 검출방법에 대해 보고했다. 첫 번째 방법으로는 polyclonal 항체기반의 간접-ELISA와 polyclonal 및 monoclonal 항체기반의 sandwich ELISA 방법을 제시했다. 간접-ELISA 방법의 교차반응성 테스트에서는 *Cronobacter* spp. 여러 종을 검출할 수 있었지만, sandwich ELISA 방법은 4가지 종의 *Cronobacter sakazakii*를 검출할 수 있었다고 보고했다. 따라서 간접-ELISA 방법은 *Cronobacter* spp.의 검출에 적합하며, sandwich ELISA 방법은 *Cronobacter* sakazakii의 검출에 적합함을 보고했다. 또한, 간접-ELISA법의 *Cronobacter* spp.의 검출한계는 10^5 CFU/mL이었으며, sandwich ELISA법의 검출한계는 2×10^4 CFU/mL이었다고 기술했다.

Zhao 등(2013)은 nuclear magnetic resonance를 기반으로 *C.*

*sakazakii*를 신속 검출할 수 있는 immunoassay를 개발했다고 보고했다. 연구에서 보고한 방법은 polyclonal rabbit anti-*C. sakazakii* 항체를 superparamagnetic iron oxide nanoparticles에 결합해 NMR biosensor를 이용해 검출하는 방법이라고 설명했다. Zhao 등(2013)의 연구에서는 분말우유와 치즈에 *C. sakazakii*를 접종해 검출결과를 보고하였는데, 분말우유 및 치즈를 1/1,000 이상 희석하여 검출했을 때는 검출이 불가능하였으며, 배양시간이 4시간보다 길어지고, pH 7 이상일 때 검출 감도가 줄어든다고 보고했다. 따라서 이 연구에서 보고한 검출가능 범위는 1.1~11 MPN이라고 기술했다. 따라서, 개발된 방법은 세균의 농도가 높을 경우(>1,100 MPN)에는 적합하지 않은 방법이라고 기술했다.

Song 등(2015)은 형광기반의 리포좀 면역분석법으로 *C. muytjensii*를 검출하는 방법에 대해 보고했다. 리포좀은 인지질이 수용액 상에 분산되어 있을 때 자발적으로 형성되는 1개 이상의 이중 인지질막으로 구성된 구형의 소포이다. 리포좀을 이용한 초기의 연구는 주로 세포막에 관한 것이었으나, 이후 약물 전달 분야와 유전자를 운반하는 기능으로써 화학치료법과 유전자 치료법에 이용되며, 작은 항원 분자에 대한 항체 형성을 향상시키기 위해서 사용되기도 한다. 리포좀은 의약분야에 응용되면서 다양한 리포좀 합성방법과 여러 분자와의 결합방법이 활발하게 개발되었는데, 이렇게 개발된 방법들은 리포좀을 면역화학 분야에서 분석도구로 이용할 수 있도록 했다(Kim 등 2003). 이러한 특징을 바탕으로 Song 등(2015)은 리포좀을 특성을 이용하여 형광물질인 sulforhodamine B(SRB)를 포집한 리포좀에 토끼를 이용해 얻어낸 anti-*C. muytjesii* IgG로 면역리포좀을 합성 후, 이를 이용하여 *C. muytjensii*를 검출했다고 기술했다. 형광기반 리포좀의 면역분석법에 의해 균을 검출하는데 소요되는 시간은 13시간이었으며, 다른 식품매개병원균과의 교차반응성 테스트에서도 *C. muytjensii*만을 특이적으로 검출할 수 있었다. *C. muytjensii*의 검출한계는 순수배양액에서 6.3×10^4 CFU/mL라고 보고했다.

Lee(2015)는 나노자성비드를 이용해 *C. sakazakii*의 신속면역검출법에 대해 보고했다. 이 방법은 rabbit anti-*C. sakazakii* 항체, 형광물질인 SRB를 포집한 리포좀, 30 nm의 면역나노자성비드를 기반으로 *C. sakazakii*를 신속 검출하는 방법을 보고했다. *C. sakazakii*의 순수배양액의 검출한계는 3.3×10^3 CFU/mL이었으며, 분유에서의 검출한계는 3.5×10^3 CFU/mL이었고, 교차반응성 실험에서도 *C. sakazakii*를 특이적으로 3시간 이내에 검출할 수 있는 방법임을 보고했다.

기타 방법을 이용한 검출방법

Almeida 등(2009)은 peptide nucleic acid를 이용하여 fluorescence in situ hybridization(FISH) 방법으로 *Cronobacter* spp.를 검출하는 방법에 대해 보고했다. FISH 방법은 일반적으로 세균의 확인에 사용되는 방법으로 특정 DNA 또는 RNA를 타겟으로 하는 nucleic acid probe를 특이적으로 결합한 것을 기반으로 한다. 검출하고자 하는 시료를 hybridization하고, 암실에서 반응 후 형광현미경을 이용해 관찰했다고 기술했다. 이 방법을 이용했을 때 분유 10 g에서 1 CFU의 검출한계를 얻을 수 있었으며, *Cronobacter* spp.의 정량적인 검출에 필요한 시간은 12시간 정도라고 기술했다. Yu(2009)는 이진희석법을 변형 및 적용하여 균액 및 조제분유에 존재하는 *Cronobacter* spp.의 오염수준을 정량적으로 추정할 수 있는 간이신속법을 개발했다. 이 방법은 *Cronobacter* spp.와 다른 미생물 혼합액을 microtiter에 단계별로 이진희석한 후, 각 well에 개발한 salicin broth를 첨가하여 16~24시간 동안 배양하면, salicin을 분해할 수 있는 *Cronobacter* spp.가 존재하는 well의 색은 미생물의 성장 및 대사로 인해 pH가 감소됨에 따라 bromcresol purple 지시약이 노란색으로 변한다는 원리로 *Cronobacter* spp.의 검출방법에 사용되었으며, 한천평판배양법과도 높은 상관관계를 얻음으로써 한천평판배양법보다 더욱 효율적인 검출방법이라고 보고했다. Zhu 등(2012)은 impedance technology와 rRNA 기반의 lateral flow assay를 결합하여 *Cronobacter* spp.의 신속 검출에 대한 연구를 보고했다. Impedance 측정은 BacTrac 4300 Microbiological Analyzer를 사용하였으며, RioboFlow™ *Cronobacter* kit를 이용하여 최종 검출하였다. 검출에 소요되는 시간은 20시간 이내로 68개의 분유오염샘플에서 *Cronobacter* spp.를 검출한 결과, 85%를 검출할 수 있었으며, 다른 균과의 교차반응성 실험에서도 *Cronobacter* spp.만을 100% 특이적으로 검출할 수 있었다고 보고했다.

요 약

Cronobacter spp.는 *Salmonella* spp.와 함께 조제분유에서 발견되는 미생물 중 위험도가 가장 높은 category A에 속하는 균으로 알려져 있다. 1958년 영국에서 처음으로 유아의 뇌수막염의 원인균으로 보고되었으며, 감염 후 신생아에게서 괴사성 장염, 패혈증 등을 일으켜 후유증으로 시력과 청력 상실 및 신경마비를 일으키기도 한다. 이러한 위험성 때문에 *Cronobacter* spp.의 신속 검출 및 진단은 식중독 예방에 있어서 중요하다. 따라서 2002년 미국 식품의약품안전국에서는 분유에서의 *Cronobacter* spp.를 EE broth, VRBG 배지를 이용해 균을 분리하고, TSA 배지에 순수분리 후 노란색을 발하는 colony를 생화학적 실험을 통해 검출하는 방법을 제시했다. 또한, 우리나라 식품공전에서도 배지를 이용하여 *Cronobacter* spp.를 검출하는 방법에 대해 등재하였다. 하지만 배지배양법을 기반으

로 하는 *Cronobacter* spp.의 검출방법은 검출에 소요되는 시간과 노동력 등이 비효율적이라는 단점이 있다. 따라서 많은 시간이 소요되는 배지배양법을 보완하고자 PCR, real-time PCR 방법 및 최근에는 PCR기법과 ELISA, CE-LIF 등을 결합하여 검출하는 방법이 개발되어 *Cronobacter* spp.의 검출에 사용되기도 하였다. *Cronobacter* spp.의 검출에 사용되고 있는 분자생물학적 기반의 PCR 및 real-time PCR 기법은 민감도와 특이도가 좋으며, 배지배양법에 의한 검출방법에 비해 검출시간을 획기적으로 줄일 수 있다는 장점이 있다. 하지만 까다로운 실험과정과 조작에 있어서 필요한 전문적인 기술이 필요함은 한계점으로 사료된다. 면역학적 방법에 의한 *Cronobacter* spp. 검출에 관한 연구를 통해, 분석에 소요되는 상당시간을 단축할 수 있었으며, 민감하고 특이적인 검출이 가능함을 보여주었다. 특히 일부 연구보고에서 면역학적 검출방법은 고가의 장비가 필요 없으며, 간단한 지침에 따라 모니터링 업무의 수행이 가능하다고 하였다. 면역학적 검출방법에는 ELISA 방법 외에도 immunomagnetic bead, liposome, immunochromatographic strip 등이 개발되고 있다.

우리나라 식품의약품안전처에서는 영 · 유아 대상 식품의 안전관리를 강화하고자 *Cronobacter* spp.에 대해서는 '불검출'로 기준을 설정 · 운영하고 있으며, 지속적으로 이에 관한 규정을 강화하고 있는 실정이다. 따라서, 식품산업체 및 식품의 제조, 가공, 유통 현장에서 쉽게 모니터링이 가능하며, 신속, 민감하고 특이적인 검출방법의 개발은 지속되어야 한다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2014R1A2A1A11053211).

References

Almeida C, Azevedo NF, Iversen C, Fanning S, Keevil CW, Viera MJ. 2009. Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Cronobacter* Genomospecies (*Enterobacter sakazakii*) in powered infant formula. *Appl Environ Microbiol* 75:2925-2930

Blazkova M, Javurkova B, Fukal L, Rauch P. 2011. Immunochromatographic strip test for detection of genus *Cronobacter*. *Biosens Bioelectron* 26:2828-2834

Chen F, Ming X, Chen XX, Gan M, Wang BG, Xu F, Wei H. 2014. Immunochromatographic strip for rapid detection of *Cronobacter* in powdered infant formula in combination with silica-coated magnetic nanoparticles separation and 16S rRNA probe. *Biosens Bioelectron* 61:306-313

Chon JW, Song KY, Kim SY, Hyeon JY, Kim YG, Hwang IG, Kwak HS, Seo KH. 2011. Comparison of real-time PCR and conventional culture method for detection of *Cronobacter* spp. in powered foods. *Kor J Microbiol* 47:87-91

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 322/1229

Farmer JJ. III 1999. Enterobacteriaceae: introduction and identification. Manual of Clinical Microbiology (7th ed), pp. 442-458. In Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH. (eds.) ASM Press Inc., Washington, D.C., USA

FDA. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. Available at http://www.cfsan.fda.gov/~common/mmesakaz.html

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.

Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR. 2005. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol* 104:1-34

Iversen C, Forsythe SJ. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Technol* 11:443-454

Joker RN, Norholm Y, Siboni KE. 1965. A case of neonatal meningitis caused by a yellow *Enterobacter*. *Danish Med Bull* 12:128-130

Jung MK, Park JH. 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

Kang ES, Nam YS Hong KW. 2007. Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* using TaqMan real-time PCR assay. 2007. *J Microbiol Biotechnol* 17:516-519

Kim M, Kim WJ, Shin WS, Shon DH, Cha SK. 2003. Feasibility study on the use of liposomes for detecting food-borne pathogenic bacteria. *Korean J Food Sci Ani Resour* 23:278-283

Korean Food Standards Codes, 2012, 3.21 *Enterobacter sakazakii*

(*Cronobacter* spp.)

Lai KK. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. *Medicine* 80:113-122

Lee G. 2015. Study on liposome based immunomagnetic separation assay for the rapid detection of *Cronobacter* sakazakii. Master's Degree Thesis, Yeungnam Univ. Gyeongsan. Korea

Li Y, Cao L, Zhang C, Chen Q, Lu F, Bie X, Lu Z. 2013. Development and evaluation of a PCR-ELISA assay for the detection and quantification of *Cronobacter* spp. *Int Dairy J* 33:27-33

Liu Y, Cai X, Zhang X, Gao O, Yang X, Zheng Z, Luo M, Huang X. 2006b. Real time PCR using TaqMan and SYBR green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J Microbiol methods* 65:21-31

Liu Y, Gao Q, Zhang X, Hou Y, Yang J, Huang X. 2006. PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakzakii* in infant formula. *Mol Cell Probes* 20:11-17

Muytjens HL, Roelofs-Willemse H, Jaspar GG. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 26:743-746

Nair MKM, Venkitanarayanan JS. 2006. Cloning and sequencing of the ompA gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an ompA-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Appl Environ Microbiol* 72:2539-2546

Nazarowec-White M, Farber JM. 1997. Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J Food Prot* 60:226-230

Park S, Shukla S, Kim Y, Oh S, Kim S, Kim M. 2012. Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cronobacter muytjensii* (formerly called *Enterobacter sakazakii*). *Microbiol Immunol* 56:471-479

Ruan J, Li M, Liu YP, Li YQ, Li YX. 2013. Rapid and sensitive detection of *Cronobacter* spp. (previously *Enterobacter sakazakii*) in food by duplex PCR combined with capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detector. *J Chromatogr B* 921-922:15-20

Song KY, Chon JW, Kim HS, Seo KH. 2012. Current *Cronobacter* spp. researches on prevalence, control and detection. *Kor J Microbiol* 48:229-239

Song KY, Hyeon JY, Shin HC, Park CK, Choi IS, Seo KH. 2008. Evaluation of a chromogenic medium supplemented with glucose for detecting *Enterobacter sakazakii*. *J Microbiol Biotechnol* 18:579-584

Song X, Kim M. 2013. Development of an indirect non-competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cronobacter muytjensii* in infant formula powder. *Korean J Food & Nutr* 26:936-944

Song X, Shukla S, Oh S, Kim Y, Kim M. 2015. Development of fluorescence-based liposome immunoassay for detection of *Cronobacter muytjensii* in pure culture. *Curr Microbiol* 70:246-252

Song X. 2014. Development of antibodies and immunoassay methods for the detection of *Cronobacter* species. Ph. D. Thesis, Yeungnam Univ. Gyeongsan. Korea

Stoop B, Lehner A, Iversen C, Fanning S, Stephan R. 2009. Development and evaluation of rpoB based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. *Int J Food Microbiol* 136:165-168

Strydom A, Cawthorn DM, Cameron M, Witthuhn RC. 2012. Species of *Cronobacter*: a review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. *Int Dairy* J 27:3-12

Teramoto S, Tanabe Y, Okanom E, Nagashima T, Kobayashi M, Etoh Y. 2010. A first fatal neonatal case of *Enterobacter sakazakii* infection in Japan. *Pediart Int* 52:312-313

United States Food and Drug Administration (US FDA). 2002. Isolationand enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. Available at: http://www.cfsan.fda.gov/~dms/inf- ltr3.html

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/Bact eriologicalAnalyticalManualBAM/ucm289378.htm

Wang X, Zhu C, Xu X, Zhou G. 2012. Real-time PCR with internal amplification control for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in food samples. *Food Control* 25:144-149

Xu F, Li P, Ming X, Yang D, Xu H, Wu X, Shah NP, Wei H. 2014a. Detection of *Cronobacter* species in powdered infant formula by probe-magnetic separation PCR. *J Dairy Sci* 97:6067-6075

Xu X, Zhang Y, Shi M, Sheng W, Du X, Yuan M, Wang S. 2014b. Two novel analytical methods based on polyclonal and monoclonal antibodies for the rapid detection of *Crono-*

bacter spp.; development and application in powdered infant formula. *LWT-Food Sci Technol* 56:335-340

Ye Y, Wu Q, Zhang J, Jiang H, Hu W. 2012. Detection of viable *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) by one-step RT-PCR in dry aquatic product. *J Food Sci* 77:M616-M619

Ye Y, Wu Q, Zhang J, Lu J, Lin L. 2011. Detetion of *Cronobacter* in infant formula and phylogenetic analysis on α-glucosidase genes. *J Food Safety* 31:185-189

Yoo MK, Oh S, Kim SS. 2005. Isolation and genotyping of *Enterobacter sakazakii* from powered infant formula manufactured in Korea. *Food Sci Biotechnol* 14:875-877

Yu JH. 2009. Development of a rapid and miniaturize method for estimation of *Cronobacter* spp. in reconstitued infant formula. Master's Degree Thesis, Korea Univ. Seoul. Korea

Zhao Y, Xia Z, Hongwei Z, Wei L, Wenjie Z, Xitai H. 2010. Rapid and sensitive detection of *Enterobacter sakazakii* by cross-priming amplification combined with immuno-blotting analysis. *Mol Cell Probes* 24:396-400

Zhao Y, Yao Y, Xiao M, Chen Y, Charles CC. Lee L, Kelvin X, Yang S, Gu M. 2013. Rapid detection of *Cronobacter sakazakii* in dairy food by biofunctionalized magnetic nanoparticle based on nuclear magnetic resonance. *Food Control* 34:436-443

Zhou Y, Wu Q, Xu X, Yang X, Ye Y, Zhang J, 2008. Development of an immobilization and detection method of *Enterobacter sakazakii* from powdered infant formula. *Food Microbiol* 25:648-652

Zhu S, Schnell S, Fischer M. 2012. Rapid detection of *Cronobacter* spp. with a method combining impedance technology and rRNA based lateral flow assay. *Int J Food Microbiol* 159:54-58

Received 31 July, 2015
Revised 20 August, 2015
Accepted 22 August, 2015