MALDI Biotyper를 이용한 식품 미생물 동정법

서론

최근 들어, 식품안전과 위생에 대한 심각성이 대두됨에 따라 국내외로 식품군에 대한 미생물 분석과 주변 환경 모니터링에 대한 중요도가 증가하고 있습니다. 이에 따라, 기존의 식중독 세균을 포함한 다양한 미생물군에 대한 분석과 대량의 미생물 동정이 필요하게 됩니다. 현재 미생물 동정을 위해 다양한 기술이 사용되고 있으나, 동정법의 경우에는 미생물 배양 이후 분석준비부터 전처리, 최종 동정결과를 얻기까지 걸리는 시간이 매우 길며, 많은 노동력과 비용이 발생하게 됩니다.

반면, MALDI Biotyper(이하 MBT) 미생물 동정법은 Bruker MALDI-TOF 질량분석기(이하 MS) 기술을 기반으로 하며, 최소한의 노동력과 비용으로 수 분 이내 미생물 종(Species) 수준까지 정확한 결과를 얻게 합니다. 본문에서는 기 동정법 대한 전반적인 설명과 응용을 소개 하고자 합니다.

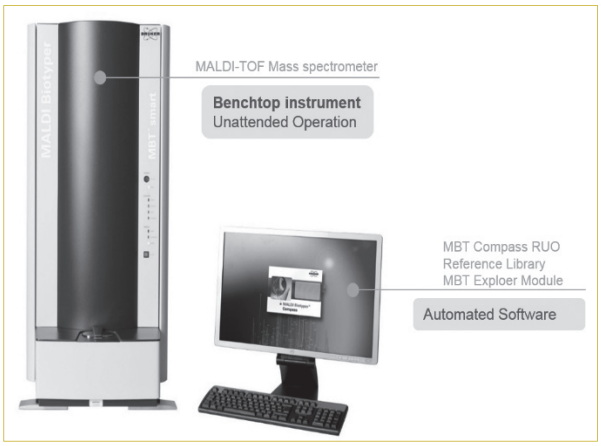

Figure 1. MBT 장비구성

1) MALDI-TOF MS란?

MALDI-TOF MS는 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight 의 줄임말로, 매트릭스 보조제 도움에 의해 샘플 내 존재하는 성분들이 이온화 한 후, 진공관에서 각 성분이 날아가서 검출기에 도달하는 시간을 바탕으로 질량을 측정하는 기술입니다. 준비된 샘플이 장비 내에서 레이저에 의해 탈착되는 과정에서 이온화가 발생하고, 이온화된 각 성분들이 TOF 진공관을 비행하여 검출기에 도달하는 시간을 측정합니다. 이 과정에서 질량값이 가벼운 물질이 검출기에 먼저 도착하며, 질량값이 무거운 물질은 상대적으로 천천히 도착합니다. 이러한 과정은 nano sec (10-9)의 매우 짧은 순간에 이루어지며, 각 성분들이 검출기에 도달한 시간을 질량값으로 변환하여 질량 스펙트럼으로 제공합니다.

2) MBT 동정법이란?

MBT 동정법은 MALDI-TOF MS 기술을 이용하여 다양한 미생물 내 존재하는 고유한 리보솜 단백질 (ribosome protein)을 측정한 뒤 수집합니다. 이 후, 얻어진 리보솜 단백질 패턴을 데이터베이스와 실시간

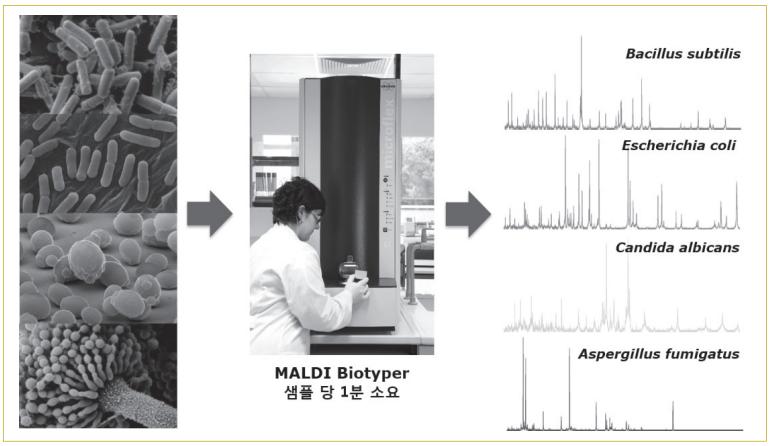

Figure 2. MBT 동정원리

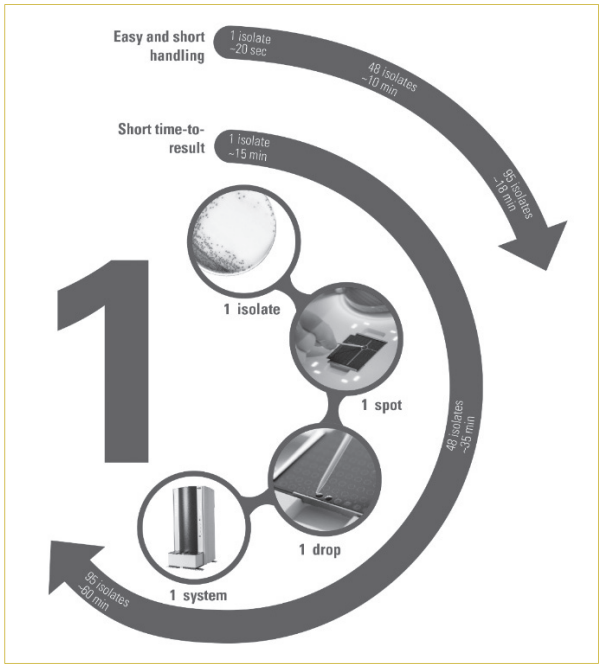

Figure 3. MBT 미생물 동정법 워크플로

으로 매칭하여 최종적으로 종(Species) 수준까지 동정하여 결과를 보여줍니다 (Figure2).

(1) 빠른 분석 속도

MBT 장비를 이용하여 1회 동정에 최대 96개 미생물 샘플을 실시간으로 분석할 수 있습니다. 특히, 위급한 상황(비상업무) 또는 환경 모니터링과 같이 단시간 내 대량의 샘플분석이 필요한 경우에 최적화된 장비입니다. 또한, 기존 동정법과 비교하여, 1) 시간당 많은 샘플을 분석 할 수 있으며, 2) 샘플준비 시간이 짧고 3) 장비 분석과 동시에 여분의 MALDI 타겟플레이트로 샘플준비가 가능하므로 당일에 발생한 모든 샘플처리에 유용합니다.

(2) 쉬운 사용법

24 시간 내로 배양된 미생물 배지에서 신선한 콜로니를 채취하여 MALDI 타겟플레이트 위에 점적 합니다. 그 후, 매트릭스 보조제 1 μl를 올려 건조시킨 후 장비에 장착합니다. MALDI 타겟플레이트 장착 후, 소프트웨어 내 샘플이름 및 배치정보를 기재한 뒤 장비를 시작합니다(Figure 3). 장비 내에서는 고유한 단백질 패턴을 얻고, 이 결과는 전용 소프트웨어에서 처리되어 미생물 종(species)수준까지 표기해줍니다. 특히, 여러 사람이 실험을 하는 경우에도 항상 동일한 동정결과를 얻을 수 있으며, 전문가뿐만 아니라 비-전문가도 쉽고

편리하게 사용 할 수 있는 이점이 있습니다.

(3) 방대한 데이터베이스

최신 데이터베이스로 7854 Strains (2748 species)의 미생물이 포함된 기본 라이브러리가 있으며, 이 라이브러리에는 Bacteria와 Yeast가 포함되어 있습니다.

식품공전 내 식중독 세균으로 분류되어 있는 살모넬라균(*Salmonella spp.*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*Escherichia coli*), 장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*), 캠필로박터 제주니/콜리(*Campylobacter jejuni/ coli*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*)등이 데이터베이스에 포함되어 있어 쉽게 동정이 가능합니다 (Figure 4).

No.	Genus	Species #
1	Bacillus	107
2	Campylobacter	19
3	Clostridium	83
4	Cronobacter	1
5	Escherica coli	5
6	Listeria	15
7	Salmonella	1
8	Staphylococcus	44
9	Vibrio	54
10	Yersinia	10

Figure 4. 데이터베이스 내 식중독 균 종수

또한, 식중독 세균 외 식품 내 발생할 수 있는 다양한 미생물군 동정에도 폭넓게 적용 가능하며, 식품제조/안전을 위한 환경 모니터링에서 발견될 수 있는 곰팡이균(mold, 152 species)에 대해서도 빠르게 동정이 가능합니다. 이러한 데이터베이스는 일회성 개발이 아닌 지속적으로 업데이트함으로써 확장해나가고 있습니다.

(4) 정확한 Listeria 종(species) 분석

*Listeria monocytogenes*는 리스테리아증(Listeriosis)을 일으키는 고위험성 식중독 세균으로 알려져 있습니다. 세계적으로 식중독 세균들 중에서도 우위를 차지하고 있습니다. 특히, 임산부, 신생아와 노인같이 면역력이 약화된 경우에 심각한 감염으로 전파되므로, *Listeria monocytogenes* 세균을 빠르고 정확하게 동정하고 추적하는 것이 매우 중요합니다.

그러나, *Listeria species group*에 속하는 미생물균들은 대개 단백질 특성이 매우 유사하여 장비를 통한 완전한 종(Species) 구별이 어렵습니다. Bruker에서는 이러한 점을 보완하고자 기존의 MBT 장비에 subtyping module기술을 접목하여 *Listeria monocytogenes* 세균을 신속하고 정확하게 구별하도록 하였습니다. 전처리 과정은 Figure 3과 같이 매우 간단하며, 결과적으로는 *Listeria species group* 내에서 *Listeria monocytogenes* 세균을 정확하게 구별합니다. 특히, subtyping 기술은 *Listeria monocytogenes* 세균의 정확한 구별이 필수인 식품분석, 가공 또는 QC 분석에 유용합니다.

Sample Name	Sample ID	Sample Confirmation
F4 (+++) (A)	18141708 (Standard)	Listeria spp. confirmation L. welshimeri identification
F3 (+++) (A)	18141707 (Standard)	Listeria spp. confirmation L. welshimeri identification
E3 (+++) (A)	18141706 (Standard)	L. monocytogenes confirmation
E2 (+++) (A)	18141705 (Standard)	L. monocytogenes confirmation
E1 (+++) (A)	18141704 (Standard)	L. monocytogenes confirmation

Figure 5. MBT Subtyping module 결과

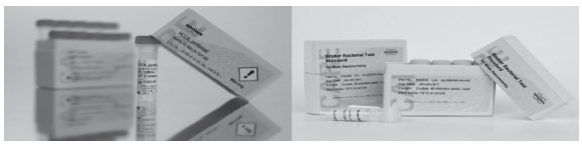

Figure 6. MBT 미생물 동정법 소모품 (매트릭스와 표준물질)

(5) 경제적인 소모품 비용

MBT 미생물 동정법은 장비 구입 비용을 제외한 추가 소모품 비용이 거의 없어 경제적 입니다. 기존 미생물 동정법은 여러 종류의 시약/용매 등이 구비 되어야 하며, 실험과정에 부가적인 소모품이 지속적으로 필요하게 됩니다. 그러나, MBT 미생물 동정법에서는 MALDI 타겟플레이트(반영구)가 제공 되므로, 실험자는 표준물질과 매트릭스만 준비하면 됩니다.

(6) 국내/외로 검증된 장비

MBT 미생물 동정장비는 국내 식품의약품안전청(Ministry of Food and Drugs Safety, MFDS) 허가를 기본으로 하여, FDA Clearance와 ISO Standard에 따른 Validation 수행을 통해 검증이 된 장비입니다.

FDA의 경우, 2013년 최초 510(k) Clearance를 받았으며 이후 2015년, 2017년 두 차례 갱신하였습니다. 주요한 점으로는 Sequencing method와 비교할 때, Bacteria의 경우 98%(Species level)이상의 일치도를, Yeast의 경우 96%(Species level)이상의 일치도를 확인하였습니다. 또한, 데이터베이스 내 FDA를 통해 승인된 종(Species)수는 424종으로 MALDI-TOF MS 미생물 동정장비 중 가장 많은 종 수를 인정받았으며, 단계적으로 늘려나가고 있습니다.

(7) AOAC & ISO 16140 공인

MALDI Biotyper 미생물 동정법은 미국인증기관 Q lab을 통해 AOAC OMA(Official Methods of Analysis)인증을 받았습니다. MALDI-TOF MS를 이용한 첫 번째 미생물 동정법으로 중요한 의미를 가집니다. 이러한 OMA 인증은 "Collaborative Study"로 여러 실험실에서 장비, 전처리법, 데이터베이스 등을 충분한 검증을 통해 분석법을 면밀히 검토하여 제정되며, 최종적으로 FDA와 USDA에서 인정하는 공식적인 분석법으로 확인되었습니다.

Performance BACTERIA

MBT-CA RESULT	REFERENCE ALGORITHM			
	high resolution species	low resolution species / genus	Negative	Total
Organism ID ≥ 2.0 (High Confidence)	1827	130	21	1978
Organism ID (≥1.7; <2.0) (Low Confidence)	21	5	4	30
- INCORRECT MBT-CA ID (≥1.7) - NO ID (<1.7)	2	1	n/a	3
Total	1850	136	25	2011

Positive		Negative
high resolution	high & low resolution	
98.54%	99.85%	n/a

Figure 7. FDA Clearance Results – Bacteria

Performance YEAST

MBT-CA RESULT	REFERENCE ALGORITHM			
	high resolution species	low resolution species / genus	Negative	Total
Organism ID ≥ 2.0 (High Confidence)	77	0	0	77
Organism ID (≥1.7; <2.0) (Low Confidence)	2	0	0	2
- INCORRECT MBT-CA ID (≥1.7) - NO ID (<1.7)	1	0	n/a	1
Total	80	0	0	80

Positive		Negative
high resolution	high & low resolution	
96.25%	98.75%	n/a

Figure 8. FDA Clearance Results – Yeast

이와 함께, 유럽인증기관인 Microval을 통해 ISO 16140-part6 Standards에 따라 Validation 되었습니다. Validation이 된 항목으로는 살모넬라균(*Salmonella spp.*), 크로노박터균(*Cronobacter spp.*), 리스테리아균(*Listeria spp.*)와 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*)가 이루어졌으며, 이를 통해, MALDI Biotyper 미생물 동정법이 세균 detection, enumeration를 위한 분석과 동시에 최종 confirmation 분석법으로도 사용될 수 있음을 확인하였습니다.

결론

Bruker MALDI Biotyper 미생물 동정법은 매우 간단한 전처리를 통해 빠르고 정확한 미생물 동정을 지원합니다. 1) 식품안전, 특히 식중독 세균 동정시간을 절감합니다. 현재, 식중독 세균을 동정하는 과정에서 최소 1일 이내 시간이 발생합니다. 그러나, MALDI Biotyper 미생물 동정법은 96개 기준 최대 1시간 이내 모든 미생물 동정 결과를 얻음으로써 동정에 발생하는 시간을 줄일 수 있습니다. 2) 실험과정에서 발생하는 편차를 줄일 수 있습니다. 즉, 여러 사람이 실험을 하는 경우에도 항상 동일한 동정결과를 얻을 수 있어 재분석을 최소화 할 수 있습니다. 3) 미생물 비-전문가도 쉽게 종(Species) 수준까지 동정결과를 얻습니다. 샘플 전처리 과정상, 모두 동일한 방법이 적용되므로 사전에 균분류

와 같은 과정이 필요하지 않습니다. 따라서, 미생물 비전문가도 간단한 교육을 통해 미생물을 동정 할 수 있습니다. 4) FDA, AOAC와 ISO 같은 국제기관에 공인된 장비입니다. 각 나라의 인증기관을 통해 Clearance, Validation에 따라 분석법이 제정 및 확립되었으며, 이에 따라 분석적으로 신뢰할 수 있는 동정결과를 얻을 수 있습니다. 5) 식품제조, 안전 및 사후관리에 적극적으로 임할 수 있습니다. 특히, 식중독 사고와 같은 대내외적인 이슈에 대해 빠르게 대처할 수 있으며, 식품 제조과정 및 지속적인 환경 모니터링을 통해 관련사고에 대해 사전예방을 가능하게 합니다.

이처럼, Bruker MALDI Biotyper 미생물 동정법은 기존의 미생물 동정법과 비교하여 업무효율 증가와 높은 생산성에 기여하며, 실험실 노동력 및 비용절감에 효과적일 것으로 판단됩니다. 함께, 전반적인 식품안전의 이슈에 대해 적극적으로 응용될 것으로 기대됩니다.

Reference

1. Bastin et al., Confirmation and Identification of Listeria monocytogenes, Listeria spp. and Other Gram-Positive Organisms by the Bruker MALDI Biotyper Method: Collaborative Study, First Action 2017.10., Journal of AOAC International Vol. 101, No. 5, 2018

2. Bastin et al., Confirmation and Identification of Salmonella spp., Cronobacter spp., and Other Gram-Negative Organisms by the Bruker MALDI Biotyper Method: Collaborative Study, First Action 2017.09., Journal of AOAC International Vol. 101, No. 5, 2018

3. DA Wilson et al., Multicenter Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper CA System for the Identification of Clinically Important Bacteria and Yeasts, American *Journal of Clinical Pathology*, Volume 147, Issue 6, Pages 623–631, 2017