

Taxonomic Identification of *Bacillus* Species Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

Won Seon Yu, Kyeong Min Lee, Kyu Jam Hwang

Pathogen Resource TF, Center for Infectious Diseases, Korea National Institute of Health,
Korea Centers for Disease Control and Prevention, Cheongju, Korea

Background: In this study, we compared various methods of taxonomic identification of *Bacillus* strains: biochemical methods, 16S rRNA gene sequencing, and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). We also developed a pathogen-isolate resource database, thus increasing the identification rate when using MALDI-TOF MS.

Methods: Thirty *Bacillus* strains were obtained from the NCCP (National Culture Collection for Pathogens) and were identified using the VITEK 2 system (bioMérieux, France), API kit (bioMérieux, France), 16S rRNA gene sequencing, and MALDI-TOF MS. The pathogenicity of *Bacillus cereus* was confirmed through the identification of virulent genes using a multiplex PCR, and both protein extraction for protein profiling in MALDI-TOF MS and repetitive-sequence fingerprinting were performed.

Results: The identification rates at the species level

were 40%, 80%, and 76.3% for the VITEK 2 system (bioMérieux), 16S rRNA gene sequencing, and MALDI-TOF MS, respectively. When the major spectrum-profiling dendrogram was compared with the phylogenetic tree, which was constructed based on the 16S rRNA gene sequences and rep-PCR fingerprinting, the classifications were confirmed to be effective.

Conclusion: Identification of *Bacillus* strains using MALDI-TOF MS was more effective than that using the VITEK 2 system (bioMérieux), but was similar to that using 16S rRNA gene sequencing. Continual addition to a proteome-based database can result in increased identification rates for MALDI-TOF MS. (*Ann Clin Microbiol* 2016;19:110-120)

Key Words: *Bacillus* species, Identification, MALDI-TOF MS

INTRODUCTION

Bacillus 속은 자연계에서 주요 부패 원인균으로서 물, 토양, 공기 중에도 부유하고 자연계에 널리 존재 한다[1]. 이 균속은 포자를 형성하기 때문에 음식을 조리하는 과정 중에 열처리에 의해 사멸되지 않으므로 우유, 인스턴트 식품 그리고 가정에서 조리하는 음식에서도 생존한다[2]. *Bacillus* 속은 카탈레이즈 양성을 나타내는 막대균으로 포자를 형성하는 절대산소성 혹은 조건무산소성균으로 현재 약 318개의 종으로 분류되고 있다. 이 속에는 유전학적특성을 통하여 크게 *B. cereus* group과 *B. subtilis* group으로 분류할 수 있으며 기타 group으로는 *B.*

pumilus, *B. licheniformis* 등이 있다[3]. *B. cereus* group에 속하는 종은 분자유전학적으로 아주 밀접한 7종으로 구성되어있는데 *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*가 포함된다[4]. 대표적인 식중독 병원체인 *B. cereus sensu stricto*는 인체에 감염된 후 크게 두 가지 증상을 유발하게 되는데, 설사 증상을 야기하는 설사형과 구토를 유발하게 하는 구토형이 있다[5]. *B. thuringiensis*는 해충의 생물학적 방제용으로 널리 사용되는 독소를 만들기 때문에 주로 곤충병원체이다[6]. *B. subtilis*와 *B. licheniformis*도 흔하지는 않지만 인체감염 사례가 보고되고 있는 병원체이다 [7-9].

Received 8 November, 2016, Revised 14 December, 2016, Accepted 15 December, 2016

Correspondence: Kyu Jam Hwang, Pathogen Resource TF, Center for Infectious Diseases, Korea National Institute of Health, Korea Centers for Disease Control and Prevention, 187 Osongsaengmyeong 2-ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju 28159, Korea. (Tel) 82-43-719-6870, (Fax) 82-43-719-6680, (E-mail) kjuhwan61@korea.kr

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

세균병원체의 전통적인 동정방법 실험에 소요되는 시간과 실험자의 숙련도에 따라 결과의 판정에 오류가 포함될 수 있고 업무의 효율적인 면에서도 미생물 자동화 동정기기를 활용한 방식이 현 추세이다[10]. 미생물의 기질 분해능을 근거로 하여 동정하는 VITEK 2 system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) 방법은 상대적으로 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 보다 신속하고 간편하게 분석할 수 있다는 장점을 가지고 있으나 기존에 동정된 미생물의 결과를 기초로 구축된 데이터베이스를 이용하기 때문에 분석 가능한 미생물의 범위에 한계가 있어 300여 종에 불과하다. 또한 일부 균종은 2종 이상을 포함하는 병원체 그룹으로 동정이 되기도 한다. 이러한 자동화동정시스템의 동정한계를 보완하기 위한 병원체 동정시스템이 필요하다. 16S rRNA 염기서열분석은 세균의 동정에서 가장 널리 사용되고 있지만 일부 균종에서는 이 부위의 균종 간 유전자 일치도가 높아 변별력이 떨어지기 때문에 16S rRNA 유전자만으로는 병원체의 정확한 분류 및 동정에 한계가 있다. 16S rRNA 염기서열분석의 경우 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline MM18-A에서 동정시 균종별로 표적유전자를 제시하고 있다[11].

Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)는 검체를 이온화하여 진공관에서 검출기에 도달하는 시간을 근거로 구성 물질의 질량을 측정하는 방법이다. 최근 개발된 MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)는 MALDI-TOF MS 기법을 이용하여 얻은 세균의 단백질 정보를 이미 구축된 각 균종의 정보와 비교 분석하여 균종을 동정한다. MALDI-TOF MS는 생체에서의 단백질 발현에 대한 대표 프로파일을 만들 수 있기 때문에 바이오마커 개발 연구에 다방면으로 사용되고 있다. MALDI-TOF MS는 생체에서의 단백질 발현에 대한 대표 프로파일을 만들 수 있기 때문에 바이오마커 개발연구에 널리 사용되고 있다. SARAMIS (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France)나 Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) 같은 분석 소프트웨어는 속 수준의 세균동정에서 매우 뛰어난 기능을 보이지만, 혈청형 또는 종 수준 동정에는 한계가 있다. 이러한 한계를 극복하기 위하여 최근에는 혈청형 또는 종 수준에서의 분류 방법들이 여러 분야에서 연구되고 있다[12-14].

본 연구는 국가병원체자원은행(NCCP)에서 보유 중인 자원 중에서 분양증가가 예상되는 식중독관련 *Bacillus* strain을 대상으로 MALDI-TOF MS를 이용한 동정결과를 VITEK 2 system (bioMérieux), 16S rRNA 염기서열 분석결과와 비교하고 MALDI-TOF MS 동정률을 높이기 위한 단백질 기반 국내임상분리주 데이터베이스를 제작하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. 대상 균주

세균의 동정 및 MALDI-TOF MS 분석을 위해 이 연구에 사용된 균주는 6종 30주 *Bacillus* 균주로 구성되어 있다. 각 균주들은 질병관리본부 국립보건연구원 내에 있는 국가병원체자원은행(NCCP) 수집된 자원들로 국내임상분리주 7주, ATCC (American Type Culture Collection) 및 DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell cultures) 도입균주 23주로 이루어져있다. 각 균주간의 독소형, 혈청형, 유전형 등의 특징은 Table 1과 같다.

2. 세균 배양 및 유전자 추출

Bacillus 균주들이 보존된 동결건조 앰플 또는 동결 튜브의 재생은 국가병원체자원은행(NCCP) 업무지침서의 병원체 재생 절차에 따라 수행하였다. 앰플 재생의 경우 동결 건조 앰플에 멸균된 증류수 100 μ L를 넣고 균체를 현탁 후 그 현탁액을 5% 면양혈액이 포함된 trypticase soy agar (한일코메드, 성남, 대한민국), CHROMagar *B. cereus* (진성메디텍, 서울, 대한민국)에 도말하여 30°C에 24시간 배양하여 단일 집락을 획득하였다. UltraClean Microbial DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 chromosomal DNA를 추출하였다.

3. 형태학적 특성 및 생화학적 특성 확인

Bacillus 균주들은 5% 면양혈액이 포함된 Trypticase soy agar에 접종하고 30°C에서 24시간 2회 계대 배양한 후 그람염색 후 막대균을 확인하였고 *B. cereus*의 경우 단일집락을 CHROMagar *B. cereus*에 계대 배양하여 특유의 흰 테두리를 가지고 있는 *B. cereus* 특유의 푸른색 집락을 확인하여 형태학적 특성을 확인하였다. 동정은 VITEK 2 system (bioMérieux)과 API 50CH/B (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France)를 이용하여 생화학적특성을 확인하였다. 생화학적 동정법의 종 수준 동정 한계치(cut off)는 Jamal 등[10]의 보고를 참고하여 90%로 선택하였다.

4. 16S rRNA 유전자 염기서열분석 및 계통분석

16S rRNA 유전자 염기서열 분석은 CLSI의 MM18A 지침 [11]을 참고하여 수행하였다. UltraClean Microbial DNA isolation kit를 사용하여 chromosomal DNA를 추출한 후 1시발체 (primer) 27F (5'-AGA GTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-TACGGYTACCT TGTTACGACTT-3')를 사용하여 증합효소연쇄반응(PCR)을 수행하였다(DE/Master cycler proS, Eppendorf, Hamburg, Germany). 증합효소연쇄반응 반응조건은 95°C 5분으로 DNA를 변성시키고, 95°C 45초, 55°C 45초, 72°C 1분

Table 1. *Bacillus* strains used in this study. Pathotypes and serotypes were determined by performing agglutination tests and PCR

NCCP no.	Identified Species	Characteristics	Soruce
10084	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	ATCC
10190	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 13061	ATCC
10623	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14893	ATCC
10624	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 19637	ATCC
10634	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 9818	ATCC
10715	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 21928	ATCC
10821	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11950	ATCC
10841	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579 (Type)	DSMZ
10856	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 9139	ATCC
10888	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 27348	ATCC
14043	<i>Bacillus cereus</i>	<i>entFM nheA cytK</i>	Clinical isolate
14796	<i>Bacillus cereus</i>	<i>entFM CER</i>	Clinical isolate
15909	<i>Bacillus cereus</i>	<i>entFM nheA cytK</i>	Clinical isolate
15910	<i>Bacillus cereus</i>	<i>entFM nheA</i>	Clinical isolate
15938	<i>Bacillus infantis</i>	N37281	Clinical isolate
11231	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580 (Type)	ATCC
12389	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 9945A	ATCC
10144	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 14884	ATCC
10192	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 27142	ATCC
10668	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	ATCC 6051 (Type)	ATCC
10736	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 7058	ATCC
10857	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 19659	ATCC
10866	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 11774	ATCC
10908	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 7058	ATCC
11101	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	ATCC 6633	ATCC
11234	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792 (Type)	ATCC
12836	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 39756	ATCC
12837	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 13366	ATCC
14741	<i>Bacillus</i> spp.	77073	Clinical isolate
15922	<i>Bacillus</i> spp.	KBN06P03352	Clinical isolate

1회로 하여 30회 반응한 후, 72°C에서 10분간 반응시켰다. 합성 유전자는 Qiaquick PCR Purification Kit (QIAGEN, GmbH Hilden, Germany)를 사용하여 정제한 후 염기서열 분석업체(제노텍, 대전, 대한민국)에 의뢰하여 염기서열을 해독하였다. CLSI 지침에 따라 PHRED score 20 이상의 염기해독 결과만 선별한 후 EZBIOCLOUD (<https://www.ezbiocloud.net>)를 사용하여 동정결과를 확인하였다[15]. 16S rRNA 유전자 염기서열 데이터의 계통분석은 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Version 6.0 (<https://www.megasoftware.net>)을 이용하여 수행하였다[16,17]. 유전자들의 거리는 Jukes-Cantor model을 사용하였고 Neighbor-Joining 방법으로 계통수를 작성하였다. 작성된 계통수의 신뢰도를 부여하기 위하여 1,000회 bootstrap을 반복하여 수행하였다[18,19].

5. 병원성(Virulence) 유전자의 확인

*B. cereus*의 설사형과 구토형 독소유전자는 PowerChek *Bacillus cereus* Toxin 6-plex Detection Kit (CER, *hblC*, *bceT*,

entFM, *nheA*, *cytK*) (코젠바이오텍, 서울, 대한민국)를 사용하여 확인하였다. PCR 반응조건은 95°C 12분으로 DNA를 변성시키고, 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초를 1회로 하여 35회 반응한 후, 72°C에서 10분간 반응시켰다.

6. MALDI-TOF MS 분석

MALDI-TOF MS 장비를 이용한 균주 동정의 전처리 과정은 이전의 Haigh 등[20]의 보고를 참고하여 수행하였다. 직접 도말법의 경우 MALDI target plate에 배양된 세균의 집락을 얇게 도말하고 1 μ L의 70% formic acid를 넣어준 후 실온에서 건조하였다. 건조된 세균에 50% acetonitrile-2.5% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 완전용해 한 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix를 1 μ L 넣어준 후 실온에서 건조하였다. Ethanol-formic acid 추출 방법의 경우 세균 집락을 300 μ L의 멸균증류수에 900 μ L의 absolute ethanol에 현탁한 후 건조시켰다. 건조한 pellet에 20 μ L의 formic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 1분 이상

vortex하고, 다시 20 μ L의 acetonitrile (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 첨가한 후 원심분리하였다. 상층액 1 μ L를 MALDI target plate에 옮기고 완전히 건조시킨 후 matrix 용액 1 μ L를 첨가하고 완전히 건조시킨 후 MALDI-TOF MS 장비로 분석을 실시하였다. 각 균주에 대하여 2회 반복하여 분석하였다. 동정은 Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)를 사용하여 수행하였다. 분석소프트웨어는 MALDI Biotyper version 3.1 (Bruker Daltonics)로서 5,627 strains 세균 데이터베이스가 포함되어 있다. Bacterial test standard (BTS, Bruker Daltonics, Bremen, Germany)는 제조사의 지침에 따라서 calibration 수행용으로 사용하였다. 각 균주별로 2회 반복하여 집락 또는 균체 단백질을 채취하여 분석하였다. 동정을 위한 Score 값은 Schulthess 등[21]의 보고를 참고하였다. Score 값 2.0 이상일 경우 그 종에 해당하고 Score 값이 1.7 이상 2.0 미만일 경우 속 수준 동정에 해당하는 것으로 해석하였고, Score 값이 1.7 미만일 경우 믿을 수 없는 것으로 간주하였다.

7. Repetitive-sequence-based PCR (REP PCR)을 이용한 DNA fingerprinting 분석

REP PCR을 이용한 DNA fingerprinting 분석의 전체과정은 Healy 등[22] 보고를 참고하여 DiversiLab system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France)을 사용하여 수행하였다. REP PCR용 주형 DNA의 확보는 UltraClean Microbial DNA isolation kit를 사용하였고 각 DNA 농도는 35 ng/ μ L로 표준화하였다. 추출된 DNA는 DiversiLab DNA Fingerprinting kit *Bacillus* (bioMérieux)을 사용하여 rep-PCR을 수행하였다. 전체 35 μ L 기준으로 70 ng의 genomic DNA, 18 μ L의 rep-PCR MM1, 2.5 μ L의 GeneAmp 10X PCR buffer, 2 μ L의 primer mix, 0.5 μ L의 AmpliTaq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 PCR 조성액으로 사용하였다. PCR 반응조건은 94°C 2분으로 DNA를 변성시키고, 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분 30초를 1회로 하여 35회 반응한 후, 72°C에서 3분간 반응시켰다. 유전자 증폭산물은 DiversiLab Chips에 옮긴 후 B 2100 bioanalyser (bioMérieux)장비를 사용하였다. Data는 DiversiLab software version 3.6.14 (bioMérieux)를 이용하여 분석하였다(<https://nccp.diversilab.com>). Dendrogram제작을 위한 알고리즘은 짝짓기 클러스터링(Unweighted pair group method, UPGMA)방법을 사용하였다.

RESULTS

1. VITEK 2 system, 16S rRNA 유전자, MALDI-TOF MS를 이용한 세균의 동정

Bacillus 균주 6종 30주의 동정을 위하여 MALDI-TOF MS

분석, 통상적인 생화학적 동정과, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 수행하였고 동정률을 Table 2와 같이 비교하여 나타내었다. VITEK 2 system (bioMérieux)과 MALDI-TOF MS의 동정결과가 불일치한 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열 기반 계통분석을 수행하여 동정하고 오동정 사유를 Table 2에 나타냈다. VITEK 2 system (bioMérieux)을 이용한 동정결과 데이터베이스에 동정정보가 없어서 미동정된 경우는 *B. subtilis* 2주, 다른종으로 동정된 *B. infantis* 1주였고 동정은 되었으나 90% 미만인 경우는 *B. cereus* 9주였고 다수의 종을 포함하는 그룹으로 동정된 경우는 *B. cereus/thuringiensis* 4주, *B. subtilis/amylo-liquefaciens* 4주로 총 8주였다. 따라서 전체 30주 중 통상적인 생화학적 동정방법인 VITEK 2 system (bioMérieux)의 중 수준 동정확인인 12주(12/30, 40%), 속 수준 동정확인인 27주(27/30, 90%)였다. 반면 MALDI-TOF MS를 이용한 동정결과 미동정된 경우는 없었으며 속 수준 동정 한계치(cut off) Score 값 2.0 미만 1.7 이상인 균주는 *B. cereus* 2주, *B. licheniformis* 1주, *Bacillus* spp. 2주로 총 5주였다. 다른 종으로 동정된 경우는 *B. thuringiensis* 2주였다. 따라서 전체 30주중 MALDI-TOF MS의 중 수준 동정확인인 23주(23/30, 76.7%), 속 수준 동정확인인 30주(30/30, 100%)였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석으로 종동정이 확인된 균주는 24주(24/30, 80.0%)였다. 균주별로 살펴보면 *B. cereus*의 경우 14주 중 VITEK 2 system (bioMérieux)으로는 11주가 종동정률 한계치인 90% 미만 또는 다수 종을 포함하는 그룹으로 동정되었고 MALDI-TOF MS 결과는 2주가 중 수준 동정 한계 Score 값 1.7 이상 2.0 미만이었다. 16S rRNA 계통분석결과 NCCP 14043은 같은 계통군에 속하는 *B. cereus*임을 확인하였고 NCCP 10715는 *B. pseudomyces*와 가장 근연한 종(closed related species)으로 확인하였다. *B. subtilis*의 경우 6주 중 VITEK 2 system (bioMérieux)으로는 2주가 미동정되었고 4주는 다수 종을 포함하는 그룹으로 동정되었다. MALDI-TOF MS와 16S rRNA 유전자 염기서열분석은 6주 모두 *B. subtilis*임을 확인하였다. *B. licheniformis* 2주의 경우 VITEK 2 system (bioMérieux)과 16S rRNA 유전자 염기서열분석으로는 모두 *B. licheniformis*임을 확인하였으나 MALDI-TOF MS는 NCCP 12389 1주가 동정 한계 Score 값 1.7 이상 2.0 미만이었다. *B. infantis* 1주는 VITEK 2 system (bioMérieux)에서는 다른 종인 *B. lentus*로 동정되었으나 MALDI-TOF MS와 16S rRNA 유전자 염기서열분석의 경우 *B. infantis*로 확인되었다. *B. pumilus* 2주는 3가지 동정방법 모두 동일한 동정결과를 나타냈다. *Bacillus* spp. NCCP 14741과 *Bacillus* spp. NCCP 15922의 VITEK 2 system (bioMérieux)의 동정결과와 *B. licheniformis*로 확인되었으나 MALDI-TOF MS의 동정결과는 *B. sonorensis*로 확인되어 불일치 하였다. 다만 MALDI-TOF MS의 Score 값이 1.7 이상 2.0 미만이었다. 16S rRNA 유전자 기반 계통분석 결과로는 *B. sonorensis*와 *B. licheniformis*

Table 2. Comparative identification rates of *Bacillus* strains by conventional method, 16S rRNA gene and MALDI-TOF MS

Organism	No.	No. (%) ID Conventional method			No. (%) MALDI-TOF MS method			No. (%) ID 16S rRNA gene		
		Species	Genus	Cause of No ID or Mis ID (No.)	Species	Genus	Cause of No ID or Mis ID (No.)	Species	Genus	Cause of No ID or Mis ID (No.)
<i>Bacillus cereus</i>	14	3 (10)	14 (46.6)	ID <90% (9) <i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> (2)	12 (40)	14 (46.6)	Score ≥1.7 but <2.0 (2)	13		<i>B. pseudomycoloides</i> (1)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	3	1 (3.3)	3 (10)	<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> (2)	1 (3.3)	3 (10)	<i>B. cereus</i> (2)	0		<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> (3)
<i>Bacillus subtilis</i>	6	2 (6.6)	4 (13.3)	Unidentification (2) <i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloiquefaciens</i> (4)	6 (20)	6 (20)		6		
<i>Bacillus infantis</i>	1	0 (0)	0 (0)	<i>Bacillus lentus</i> (1)	1 (3.3)	1 (3.3)		1		
<i>Bacillus licheniformis</i>	2	2 (6.6)	2 (6.6)		1 (3.3)	2 (6.6)	Score ≥1.7 but <2.0 (1)	2		
<i>Bacillus pumilus</i>	2	2 (6.6)	2 (6.6)		2 (6.6)	2 (6.6)		2		
<i>Bacillus</i> spp. NCCP 14741	1	1 (3.3)	1 (3.3)	<i>B. licheniformis</i>	0 (0)	1 (3.3)	Score ≥1.7 but <2.0 <i>B. sonorensis</i> (1)	0		<i>B. sonorensis</i> / <i>B. licheniformis</i> (1)
<i>Bacillus</i> spp. NCCP 15922	1	1 (3.3)	1 (3.3)	<i>B. licheniformis</i>	0 (0)	1 (3.3)	Score ≥1.7 but <2.0 <i>B. sonorensis</i> (1)	0		<i>B. sonorensis</i> / <i>B. licheniformis</i> (1)
Total	30	12 (40)	27 (90)		23 (76.7)	30 (100)		24 (80)		

Abbreviations: No ID, no identification in spite of its presence in database; Mis ID, misidentification.

와 진화적인 거리가 가깝지만 다른 계통군에 속했다. 각 균주들의 상관관계를 단백질과 DNA 수준에서 상호 비교하기 위한 MALDI-TOF MS를 단백질 기반 데이터베이스를 제작하고자 중합효소 연쇄반응(PCR)방법을 이용하여 식중독 병원성 유전자를 확인하였다. *B. cereus* group의 설사형과 구토형 독소유전자의 분석은 PowerChek *Bacillus cereus* Toxin 6-plex Detection Kit (코젠바이오텍)를 사용하여 특성을 확인하였다.

2. MALDI-TOF MS 분석

MALDI-TOF MS, 16S rRNA 유전자 염기서열, 생화학적 특성, 면역학적 특성 및 병원성확인이 끝난 *Bacillus* 균주의 상관관계를 단백질수준에서 분석하기 위하여 각각의 단백질 프로파일을 추출하였다. 각 균주들은 최소 20개 이상의 mass spectra를 확보한 후 Stanford 등[23]의 보고를 참고하여 processing 과정을 거쳐 단일의 주스펙트럼(major spectrum profile, MSP)를 제작하였다. 균종별로 제작된 MSP의 예시는 Fig. 1와 같이

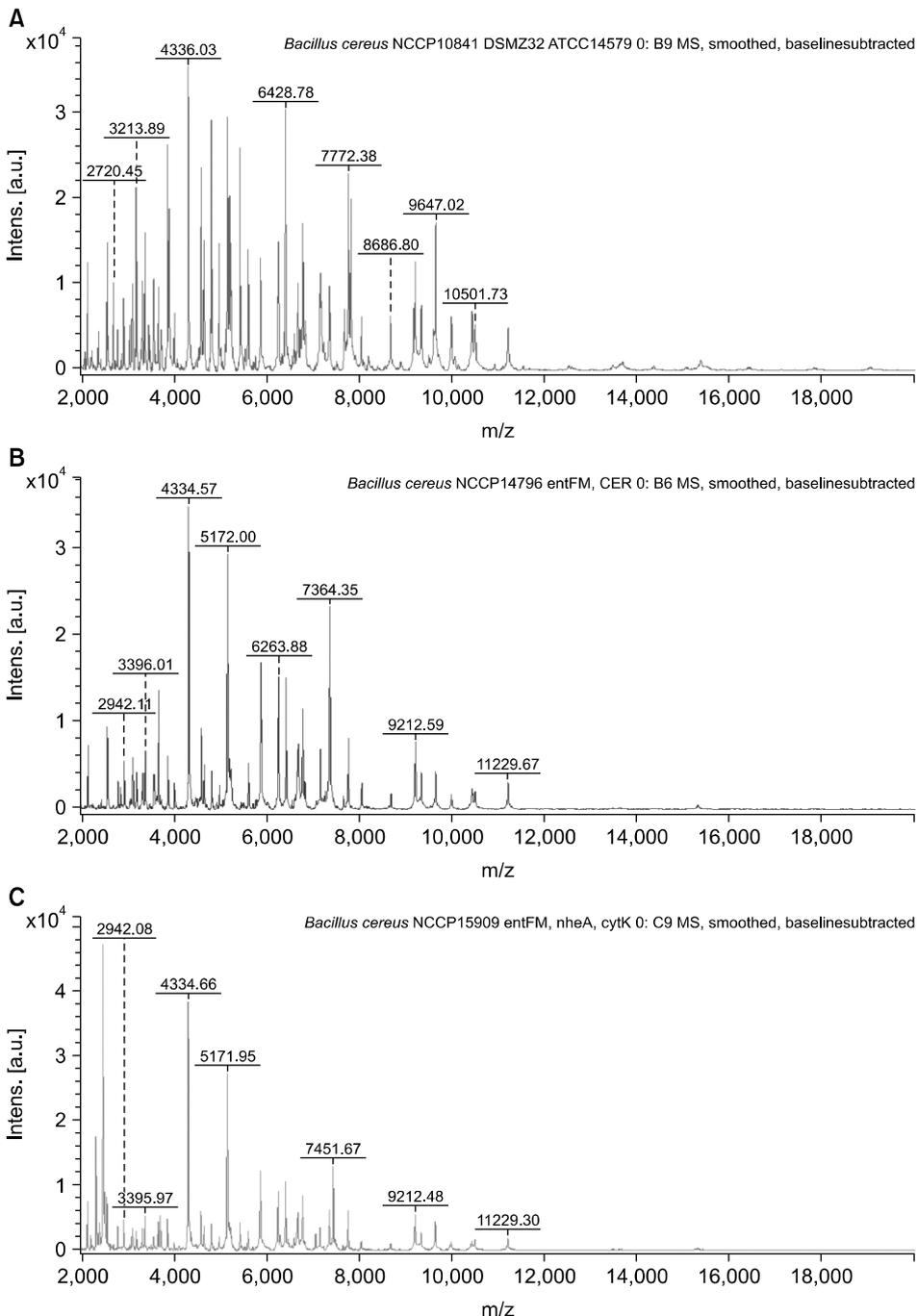


Fig. 1. Representative spectra from *Bacillus* strains supplemented in the database by MALDI-TOF MS. The intensity is shown as a percentage of the total intensity on the y-axis, and the mass to charge ration (m/z) is shown on the x-axis. (A) *Bacillus cereus* NCCP10841 DSMZ32. (B) *B. cereus* NCCP14796 *entFM*, CER. (C) *B. cereus* NCCP15909 *entFM*, *nheA*, *cytK*. (D) *B. thuringiensis* NCCP11234. (E) *B. subtilis* NCCP10908. (F) *B. licheniformis* NCCP11231.

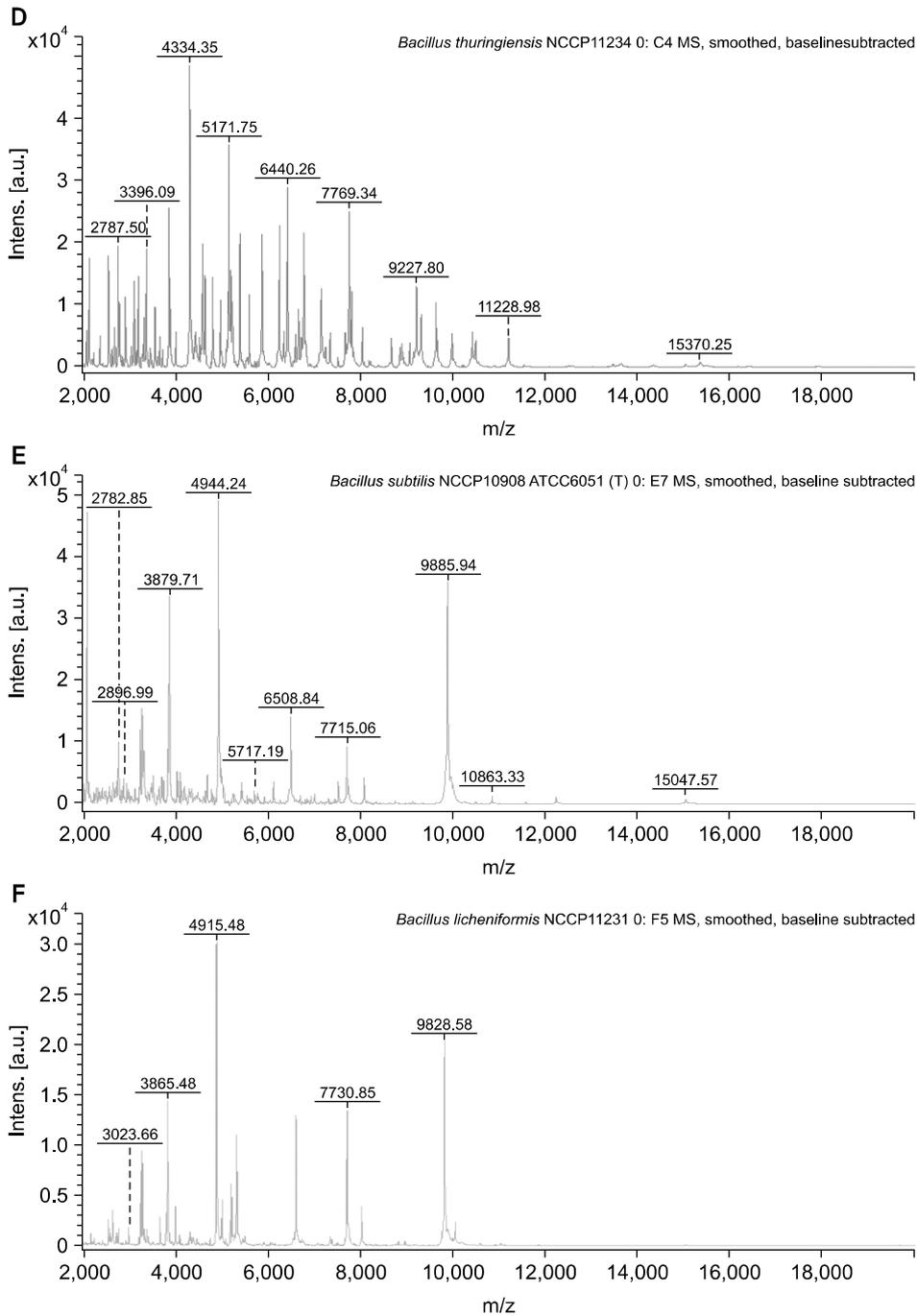


Fig. 1. Continued.

나타내었다. 이를 이용하여 국내임상분리병원체 데이터베이스를 제작하였고 단백질 프로파일기반 MSP dendrogram을 Fig. 2과 같이 제작하였다. *Bacillus* strain 간의 상관관계를 확인결과 각종별로 단일 계통군에 속하는 것을 확인하였다. 제작된 데이터베이스를 단백질, 유전체 수준의 비교를 위하여 DNA fingerprinting 방법과의 비교 실험을 수행하였다.

3. Repetitive-sequence-based PCR을 이용한 DNA fingerprinting 분석

Bacillus strain의 경우 UPGMA 방법으로 제작한 16S rRNA 유전자 기반 계통수(Fig. 3A), 유전자 기반 rep-PCR fingerprinting 계통수(Fig. 3B), 단백질 기반 MALDI-TOF MS dendrogram (Fig. 3C)를 비교하여 Fig. 3과 같이 나타내었다. 16S rRNA 유전자기반 계통수와 MALDI-TOF MS dendrogram의 결과는 rep-PCR fingerprinting 결과에 비하여 전체 종별 구분이

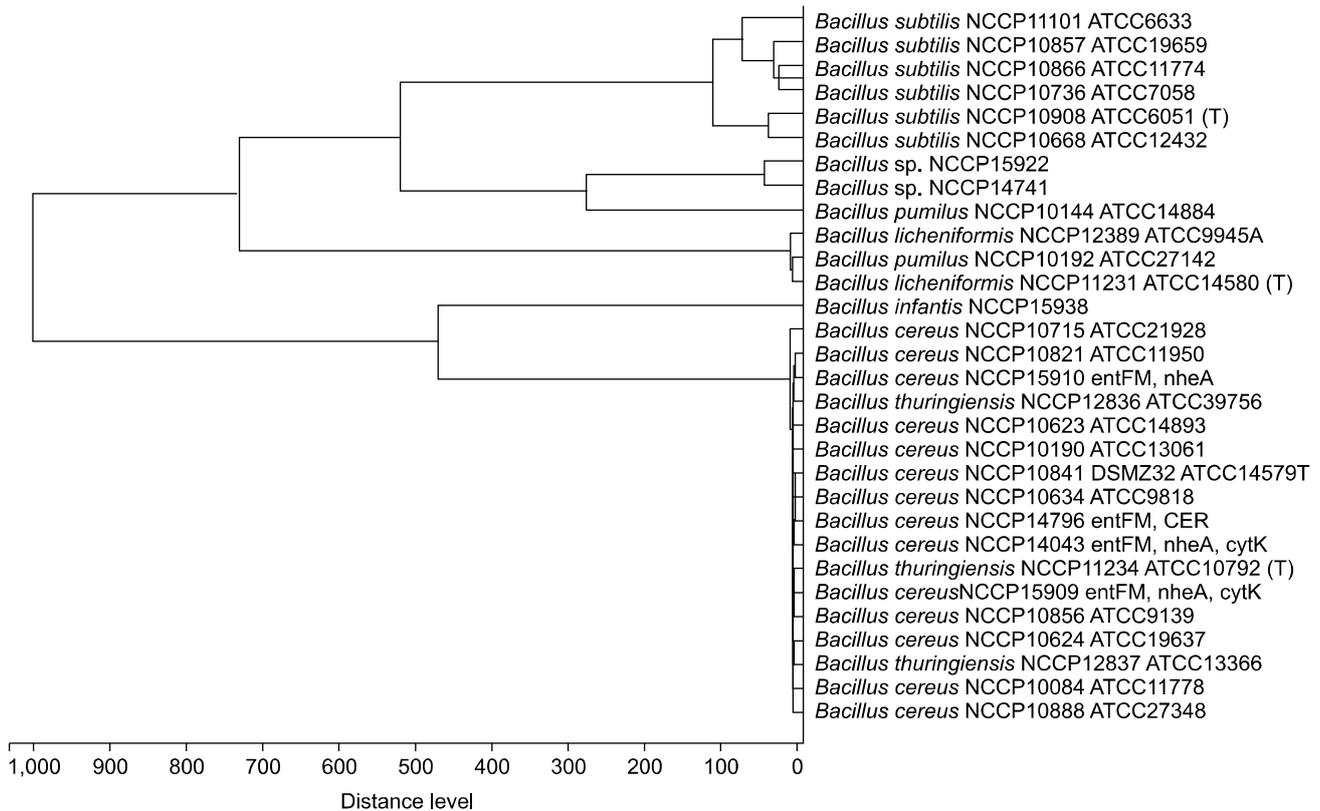


Fig. 2. Major spectrum profile (MSP) dendrogram of *Bacillus* strains supplemented in the database.

가장 효과적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 또한 이결과를 통하여 *Bacillus* spp. NCCP 15922과 *Bacillus* spp. NCCP 14741 2주의 경우 *B. licheniformis*와 *B. pumilus*와 유연관계가 가까운 새로운 계통군일 가능성이 확인되었다.

DISCUSSION

본 연구에서는 국가병원체자원은행(NCCP)에서 보유 중인 그람양성 세균에서 가장 자원수가 분양증가가 예상되는 식중독관련 *Bacillus* 균주를 대상으로 MALDI-TOF MS를 이용한 동정결과를 VITEK 2 system (bioMérieux), 16S rRNA 염기서열 분석결과와 비교하고자 하였다. 또한 MALDI-TOF MS 동정률을 높이기 위한 단백질 기반 국내임상분리주 데이터베이스를 제작하고자 하였다.

MALDI-TOF MS 분석의 가장 큰 장점은 16-20시간 소요되는 VITEK 2 system (bioMérieux)을 포함한 생화학적 동정방법에 비하여 10분 이내 최소시간으로 신속한 동정이 이루어진다는 점이다. Dupont 등[24], Jamal 등[10]의 보고를 참고하면 MALDI-TOF MS의 동정결과가 VITEK 2 (bioMérieux)보다 오동정도 낮고 속 및 중 수준의 동정률도 좋은 것으로 평가되었다. 이들 3가지 방법을 사용하여 얻은 동정결과를 Table 2에 비

교하여 나타내었고 각 동정방법의 총동정률은 40% (VITEK 2 system), 76.7% (MALDI-TOF MS), 80% (16S rRNA 유전자 염기서열분석)의 순서였다. 따라서 *Bacillus* strain의 경우 MALDI-TOF MS의 동정결과가 VITEK 2 system (bioMérieux) 동정결과보다 매우 높은 동정률을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 반면 16S rRNA 유전자 염기서열분석과 비교시 MALDI-TOF MS 동정결과 동정한계 Score 값인 1.7 이상 2.0 미만인 *B. cereus* NCCP 14043과 *B. licheniformis* NCCP 12389의 Score 값은 각각 1.999와 1.980이었다. Schulthess 등[21]은 그람양성 막대균(Gram positive rods)들의 동정결과를 MALDI-TOF MS의 Score 값을 0.1간격으로 비교하여 동정한계 Score 값을 2.0 이상으로 정하였는데 *Bacillus* strain은 포함되어 있지 않다. 따라서 동정한계 Score 값과 인접한 값의 동정결과가 총동정이 이루어지지 않았다고 판단하는 것은 문제가 있다고 생각되었다. 총동정이 되었다고 가정하면 MALDI-TOF MS의 동정률(83.3%)이 16S rRNA 염기서열분석의 총동정률(80%)보다 높다. 이것은 16S rRNA 유전자기반 계통분석결과와 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*가 같은 계통군에 속하여 서로 구별할 수 없기 때문이었다. 이와 같이 16S rRNA 유전자 기반 유전자 일치도가 매우 높은 *B. cereus*와 *B. thuringiensis* 등의 *B. cereus* group, *B. licheniformis* group 등의 분류를 단백질 수준에서 확인해보고자

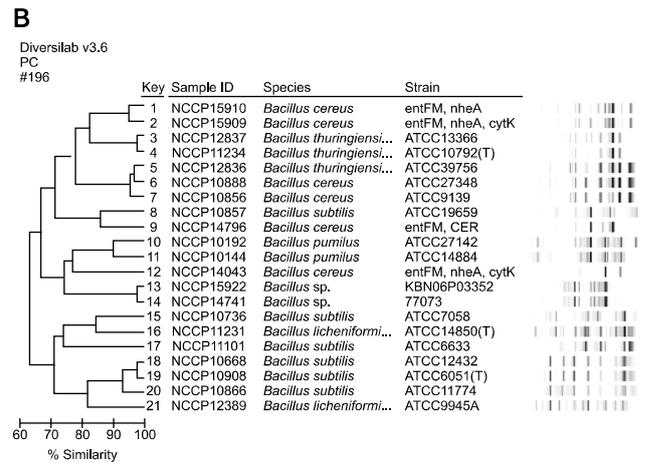
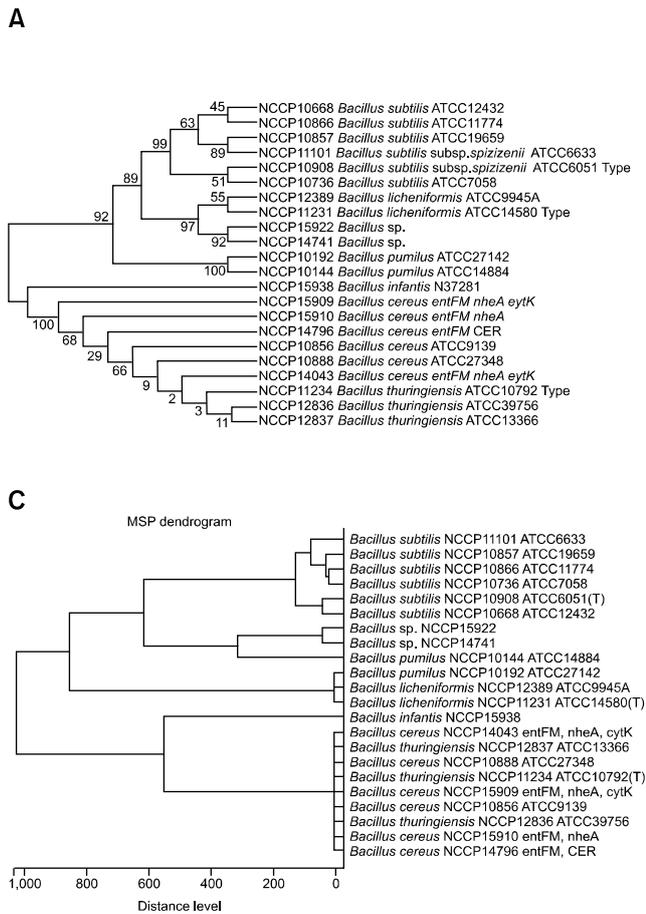


Fig. 3. Comparison of 16S rRNA gene, repetitive-sequence based PCR fingerprinting and MALDI-TOF MS analysis in *Bacillus* strains. Phylogenetic tree based by 16S rRNA gene with UPGMA method (A), rep-PCR fingerprinting (B) and MALDI-TOF MS (C).

하였다. Benagli 등[25]과 Lista 등[26]은 균주 간의 유전자적 관계에 근거하여 균주를 선정하고 신뢰성이 있는 중 수준 동정용 래퍼런스 라이브러리를 만들 수 있다는 것을 보고하였다. 이를 참고하여 *B. cereus*와 *B. licheniformis*의 낮은 Score 값의 결과는 등록되어있는 병원체 데이터베이스의 수가 적기 때문에 생길 수 있다고 가정해보았다. 실제로 *Bacillus* strain의 경우 기존 Burker사의 데이터베이스는 *B. cereus* 3주, *B. thuringiensis* 1주, *B. licheniformis* 3주, *B. pumilus* 6주, *B. infantis* 1주, *B. subtilis* 9주가 등록 되어 있었다. *Bacillus* 균주의 동정방법을 단백질 수준에서 분석하기 위하여 MALDI-TOF MS를 이용한 mass spectrum 추출 및 단백질 기반 데이터베이스 제작을 수행하였다. 제작된 데이터베이스는 Fig. 3과 같이 MSP dendrogram을 제작하여 16S rRNA 유전자 기반 계통수, 유전자 기반 rep-PCR fingerprinting 계통수와 비교하였을 때 종별구분이 가장 효과적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. *B. pseudomycoides*와 가장 근연한종으로 확인된 *B. cereus* NCCP 10715의 경우 16S rRNA 유전자 염기서열분석으로는 동정이 되지 않았는데 MALDI-TOF MS dendrogram의 경우도 분류학적으로 가장 바깥쪽 그룹에 위치하고 있다. Lasch 등[27]은 기존의 *B. cereus*와 계통학적 거리가 있는 *B. cereus* 균주가 있음을 보고하고 있기

때문에 *B. cereus* NCCP 10715 경우 기존의 알려진 *B. cereus*와 다른 특성의 균주일 가능성이 있다. *Bacillus* spp. NCCP 14741과 *Bacillus* spp. NCCP 15922의 MALDI-TOF MS dendrogram 경우도 16S rRNA 유전자 계통수와 마찬가지로 다른 기존의 알려진 *B. licheniformis*와는 다른 계통군에 속하는 것을 알 수 있었고 향후 신종의 가능성을 연구할 필요가 있었다.

이 연구를 통하여 기존에 알려진 MALDI-TOF MS 동정방법의 신속성과 함께 *Bacillus* 균주들의 동정에서 VITEK 2 system (bioMérieux)보다 효과적으로 동정할 수 있다는 것을 확인하였고 단백질 기반 국내임상분리주 데이터베이스를 지속적으로 확보하면 보다 향상된 동정률을 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

ACKNOWLEDGMENTS

이 연구는 질병관리본부 2016년도 감염병표준실험실운영 병원체연구지원관리사업(4800-4837-301) 지원에 의해 수행되었음.

REFERENCES

- Oguntoyinbo FA. Monitoring of marine *Bacillus* diversity among the bacteria community of sea water. *Afr J Biotechnol* 2007;6: 163-6.
- Durak MZ, Fromm HI, Huck JR, Zadoks RN, Boor KJ. Development of molecular typing methods for *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. isolated from fluid milk products. *J Food Sci* 2006;71:M50-6.
- Fritze D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology* 2004;94: 1245-8.
- Bavykin SG, Lysov YP, Zakhariev V, Kelly JJ, Jackman J, Stahl DA, et al. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J Clin Microbiol* 2004;42:3711-30.
- Granum PE. *Bacillus cereus*. In: Doyle MP, ed. *Food Microbiology: Fundamental and Frontiers*. 2nd ed, Washington DC; ASM Press, 2001:373-81.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:775-806.
- Salkinoja-Salonen M, Vuorio R, Andersson M, Kampfer P, Honkanen-Buzalski T. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Appl Environ Microbiol* 1999;65: 4637-45.
- Sorokulova IB, Reva ON, Smirnov VV, Pinchuk IV, Lapa SV, Urdaci MC. Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and rye bread. *Lett Appl Microbiol* 2003;37:169-73.
- Pavic S, Brett M, Petric I, Lastre D, Smoljanovic M, Atkinson M, et al. An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 2005;56:20-2.
- Jamal W, Albert MJ, Rotimi VO. Real-time comparative evaluation of bioMérieux VITEK MS versus Bruker Microflex MS, two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry systems, for identification of clinically significant bacteria. *BMC Microbiol* 2014;14:289.
- CLSI. Interpretative criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing: approved guideline. CLSI document MM18-A. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008:1-71.
- Christner M, Trusch M, Rohde H, Kwiatkowski M, Schlüter H, Wolters M, et al. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One* 2014;9:e101924.
- Josten M, Reif M, Szekat C, Al-Sabti N, Roemer T, Sparbier K, et al. Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. *J Clin Microbiol* 2013;51:1809-17.
- Khot PD and Fisher MA. Novel approach for differentiating *Shigella* species and *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013;51:3711-6.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxone-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;62:716-21.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004;5:150-63.
- Jukes TH and Cantor CR. Evolution of Protein Molecules. In: Munro HN, ed. *Mammalian Protein Metabolism*. New York; Academic Press, 1969:21-132.
- Saitou N and Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4: 406-25.
- Haigh J, Degun A, Eydmann M, Millar M, Wilks M. Improved performance of bacterium and yeast identification by a commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2011;49:3441.
- Schulthess B, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI biotyper for identification of gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2014;52:1089-97.
- Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, et al. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 2005;43:199-207.
- Stanford TE, Bagley CJ, Solomon PJ. Informed baseline subtraction of proteomic mass spectrometry data aided by a novel sliding window algorithm. *Proteome Sci* 2016;14:19.
- Dupont C, Sivadon-Tardy V, Bille E, Dauphin B, Beretti JL, Alvarez AS, et al. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:998-1004.
- Benagli C, Demarta A, Caminada A, Ziegler D, Petrini O, Tonolla M. A rapid MALDI-TOF MS identification database at genus-level for clinical and environmental *Aeromonas* strains. *PLoS One* 2012;7:e48441.
- Lista F, Reusaet FA, De Santis R, Parchen RR, de Jong AL, Kieboom J, et al. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiol* 2011; 11:267.
- Lasch P, Beyer W, Nattermann H, Stämmler M, Siegbrecht E, Grunow R, et al. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:7229-42.

=국문초록=

MALDI-TOF 질량분석기를 이용한 바실러스균의 동정

질병관리본부 국립보건연구원 감염병센터 병원체자원관리TF

유원선, 이경민, 황규잡

배경: 본 연구에서는 그람양성세균 식중독관련 *Bacillus* 균주를 대상으로 MALDI-TOF MS를 이용한 동정결과를 VITEK 2 system (bioMérieux, France), 16S rRNA 염기서열 분석결과와 비교하고 MALDI-TOF MS 동정률을 높이기 위한 단백질 기반 국내임상분리주 데이터베이스를 제작하고자 하였다.

방법: 세균의 동정은 VITEK 2 system (bioMérieux), API kit (bioMérieux, France), 16S rRNA 유전자 염기서열, MALDI-TOF MS 분석을 이용하였다. 병원성확인을 위하여 multiplex PCR 방법을 이용하여 독성 유전자를 확인하였다. 세균의 단백질 프로파일의 추출 및 데이터베이스는 제작은 MALDI BioTyper 3.0 (Bruker Daltonics, Germany)을 이용하여 수행하였고 16S rRNA 유전자 기반 계통수, repetitive-sequence fingerprinting 계통분석결과와 비교분석을 수행하였다.

결과: *Bacillus* 균주 30주에 대한 생화학적 동정법, 16S rRNA 유전자 염기서열분석 및 MALDI-TOF MS 방법에 의한 종 수준 동정률은 40%, 80%, 76.3%였다. 제작된 단백질 기반 MSP dendrogram을 16S rRNA 유전자기반 계통수 및 rep-PCR fingerprinting 계통수와 비교하였을 때 종별 구분이 효과적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

결론: *Bacillus* 균주들의 동정에서 MALDI-TOF MS는 VITEK 2 system (bioMérieux)보다 효과적인 동정방법이었다. MALDI-TOF MS는 16S rRNA 유전자 기반 동정법과도 비슷한 수준의 동정률을 나타냈으며 단백질 기반 국내임상분리주 데이터베이스를 지속적으로 확보한다면 동정률이 훨씬 높아질 것으로 기대되었다. [Ann Clin Microbiol 2016;19:110-120]

교신저자 : 황규잡, 28159, 충북 청주시 오송읍 오송생명2로 187
질병관리본부 국립보건연구원 감염병센터 병원체자원관리TF
Tel: 043-719-6870, Fax: 043-719-6680
E-mail: kyuhwang61@korea.kr