면역학적 방법을 이용한 식중독 세균 신속 검출방법 및 Liposome Immunoassay를 이용한 검출법의 개발

김 명 희

(한국식품개발연구원 안전성 연구팀)

면역학적 방법을 이용한 식중독 세균 신속 검출방법 및 liposome immunoassay를 이용한 검출법의 개발

김 명 희
한국식품개발연구원 안전성 연구팀

식품으로 인한 질병은 개인의 생명을 위협할 뿐 아니라 건전한 노동력의 상실로 생산성을 감소시키고 의료비를 증가시켜 개인의 행복 및 국가 경제에 부담을 준다 (Buzby et al. 1996, Mead et al. 2000). HACCP와 여러 식품안전에 관한 규제의 시행 등의 많은 노력에도 불구하고 *Salmonella* serotypes, *Staphylococcus aureus, Camplobacter jejuni, Campylobacter coli*, enterotoxigenic and enteroinvasive *Escherichia coli, Clostridium perfringens, Bacillus cereus*와 같은 식품기원 병원성 세균으로 인한 질병은 줄어들고 있지 않다. 오히려 외식 위주로 변해가는 생활습관은 식품을 통한 이들 병원성 세균의 전파 가능성을 증가시키고 있다. 게다가 새로운 병원성균 (*Yersinia enterocolitica, Listeria monocytogenes, E. coli* O157:H7, *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp.) 의 출현 또는 특정 식품과 연관되어 나타나는 특정 subtype (*Salmonella* serotype Enteritidis) 의 출현은 이제까지 통용되어왔던 식품기원 세균을 위한 제어 프로그램과는 다른 각도로 재원을 활용해야 할 동기를 부여하고 있다.

CONVENTIONAL METHODS

식품의 품질과 안전성을 확보하기 위해서 식품에 존재하는 세균을 검사하는 것은 기본적 과정이다. 식품안에 살아있는 세균을 분리 증식시키기 위해서 전통적인 세균 검사 방법은 선택적 배지에 의존해 오고 있다. 그러나, 특정 병원성 세균의 검사는 상당히 어려운 일이며 복잡하고 정교한 배양과정을 요구한다 (그림 1).

식품은 단백질, 탄수화물, 지질 등 다양하면서 동시에 비정형의 구성 성분들로 이루어져 있다. 어떤 구성 성분들은 목적 세균의 생육에 나쁜 영향을 끼쳐 검출을 방해할 수 있다. 식품의 물리적 조성 또한 액체, 고체, 반고체 등 다양하다. 점도의 차이 혹은 지질의 존재는 재현성 있는 실험 결과를 얻기 위해서는 필수적인 동일 수준의 세균분리 및 균일한 식품 균질액을 획득하는데 방해 요소가 될 수 있다. 이러한 다양한 matrices 문제외에 식품에 본래 내재하는 미생물 (indigenous microflora) 이 높은 수준으로 존재할 때 문제가 될 수 있다. Normal flora bacteria는 일반적으로 심각한 health risk를 갖지 않으나 이들의 물리적 존재는 특정 미생물의 선택적 분리 동정을 방해할 수 있다. 이러한 방해 요인은 매우 낮은

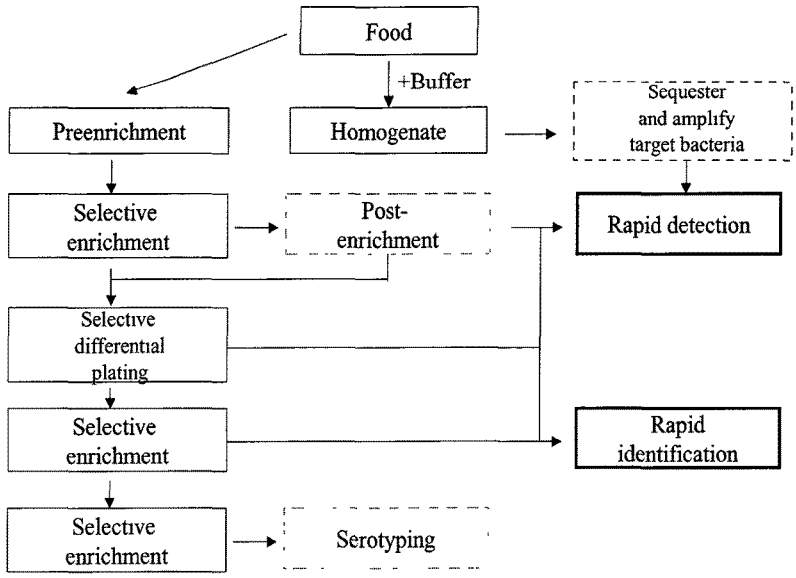

Fig. 1. Flow chart showing an algorithm for the isolation and identification of pathogenic bacteria from foods. (*Solid boxes*) Conventional culture method; (*dashed boxes*) optional step; (*dashed-dotted box*) future method (Swaminathan & Feng 1994).

infective dose를 가져 아주 적은 수로 존재하면서 병을 일으키는 *Shigella, Salmonella,* enterohemorrhagic *E. coli*를 분석할 때 문제가 된다. 또한 분석하고자하는 세균이 손상을 입었다면 normal flora에 의한 interference 문제가 가중될 수 있다. 식품가공공정 중에 사용되는 열, 냉각, 건조, 동결, 삼투압, 화학첨가제, 방부제 등의 다양한 처리는 cell을 손상시킬 수 있다. 이렇게 손상되거나 스트레스를 받은 cell은 선택배지 구성성분에 대해 매우 높은 감수성을 보이므로 표준미생물학적 방법을 사용하여 검출할 때 이러한 균들을 쉽게 놓치는 결과를 초래하게 된다.

이러한 문제점들을 극복하기 위해 전통적 미생물학적 방법 그리고 이에 사용되는 배지를 특정 세균 또는 특정 식품의 특성에 적합하도록 변형시켜왔다. 이 가운데 식품 분석을 위해 적용된 효과적인 방법은 식품 시료를 단계별로 강화배양하는 것이다. 일반적으로 이 과정은 preenrichment로 시작하며 이 과정동안 식품 시료는 영양분이 풍부한 비선택적 배지 (nonselective media) 로 배양된다. 이때 손상받거나 stress를 받은 균들의 회복이 이루어진다. Preenriched 시료는 다시 선택적 강화배양을 위해 특별히 조성을 맞춘 배지로 옮겨진다. 이때 목적균은 성장하는 반면 normal microflora는 억제된다. 필요한 경우 postenrichment 단계가 수반되기도 하는데, 이는 선택적으로 강화배양된 목적 세균을 검출 용이한 수준으로 더 증폭하는데 목적이 있다. 이렇게 강화배양된 시료는 선택차별배지에 (selective and differential media) 도말되고 이때 자라난 colony의 특성을 기초로 세균의 정체가 추정적 (presumptively)으로 밝혀진다. 이들 isolates의 identity는 일련의 biochemical test를 거쳐 확인 (confirmed) 된다. 어떤 균에 따라서는 serologic typing에 의한 추가 확인이 필요하다.

이상의 전통적 방법은 효과적이어서 오랫동안 식품에서 병원성 세균을 분리, 동정하는데 이용되어

왔지만 그 과정은 매우 노동 집약적이다. 장시간이 소요되는 여러 강화배양 단계와 생화학적 특성을 밝혀야 하는 점은 수일에 걸친 분석시간을 요구한다. 그 결과 전통적인 방법은 식품에서 미생물학적 안전성을 시기적절하게 평가하는데 제한적이다.

RAPID METHODS

식품을 대상으로 미생물 분석이 일상적으로 이루어진 이래 좀더 단순하고 빠른 방법을 만들고자 하는 노력이 이루어져 왔다. 이러한 노력의 대부분은 배지나 실험과정을 변화시키는 시도여서 분석시간의 미미한 단축만 있었을 뿐 분석시간을 현격히 줄이는데는 기여하지 못했다. 그러나 최근 생명공학 기술의 발달로 미생물 분석과정이 단순화되었고 분석 시간이 상당히 단축되는 발전이 이루어졌다. 더욱 중요한 것은 이러한 발전으로 말미암아 더 이상 고체배지에 의존하지 않는 진단법의 새로운 세대가 펼쳐졌다는 것이다. 이러한 진단법을 rapid methods라고 하는데 이 범위 안에는 miniaturized biochemical assays, physicochemical tests, DNA-based method, antibody-based method, 그리고 자동화된 진단법들이 포함된다. Antibody-based method를 중심으로 간략히 소개하면 다음과 같다.

Antibody-Based Assays

Antigen-antibody 반응의 특이성은 과거 수십년 동안 세균의 동정 및 subtyping에 이용되어 왔다. 세균의 cell 표면 antigen 또는 분비 독소를 이용하여 다양한 rapid detection 방법들이 개발되고 있다.

Immunofluorescent assays

Antibodies가 쉽게 fluorescent reporter molecule [fluorescein isothiocyanate (FITC)]에 의해 labeling 될 수 있고 이러한 fluorescent antibody가 시료에서 세균을 직접 검출하는데 쓰일 수 있다는 보고 (Coons et al. 1942) 이후, immunofluorescence 기술은 식품에서 세균의 신속 검출 (특히 *Salmonella* serotype의 검출) 에 이용되어 왔다 (Haglund et al. 1964, Swaminathan et al. 1978, Thomason 1981). Fluorescent antibody와 DEFT를 이용하여 우유와 사과 쥬스에서 *E. coli* O157:H7을 직접 계수하는 방법이 개발되었고 민감도는 $\sim 10^3$cells/mL이었다 (Tortorello & Gendel 1993). Immunofluorescent assays의 제한요인은 고가의 flow cytometer 또는 fluorescent microscopy가 필요하며 이 분석기계 작동을 위해 숙련된 인력이 요구된다는 점과 식품 중에 autofluorescence를 나타내는 성분들이 test를 방해할 수 있다는 것이다.

Enzyme-linked immunosorbent assay

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)는 immunoassays 가운데 가장 널리 이용되는 방법이다 (Clark & Engvall 1980). ELISA 방법은 radioimmunoassays에서 antibody나 antigen을 radioisotopes로 labeling 하여 사용하던 종래 방법의 대체방법을 찾는 과정 중에 개발되었다 (Pierson & Stern 1986). 일반적으로 sandwich ELISA라고 알려지는 two-site ELISA는 식품내 세균 분석에 적합한 방법이다. 이 방법에서 solid-phase에 고정화된 antibody (즉 capture antibody)는 antigen인 세균을 포획/결합 (capturing) 한다. 결합되지 않은 antigen은 몇 번의 수세과정에서 제거된다. 이후 두 번째 antibody (second antibody)

를 첨가하는데, 이 antibody는 capture antibody와는 다른 epitope을 인식하여 capture antibody-antigen complex와 반응하게 된다. 비결합 second antibody를 수세과정으로 제거한 후, 만약 second antibody가 enzyme으로 label되어 있으면 이 enzyme에 대한 substrate를 가한다. 반응이 종료되면 나타나는 색깔의 형성 정도를 육안으로 관찰하거나 spectrophotometer를 이용해 정량화한다 (direct two-site ELISA, 그림 a 참조). 세 번째 labeled antibody를 이용하여 detection하는 경우도 있는데, 이때 세 번째 labeled antibody는 second antibody 상의 epitope를 인식하게 된다 (indirect two-site ELISA, 그림 b 참조). Indirect ELISA에서 enzyme-labeled antibody는 antigen 상의 어떠한 epitope도 인식하지 못한다. 따라서, 이러한 enzyme-labeled antibody는 여타 antigens의 검출에 generic reagent로서 활용될 수 있다.

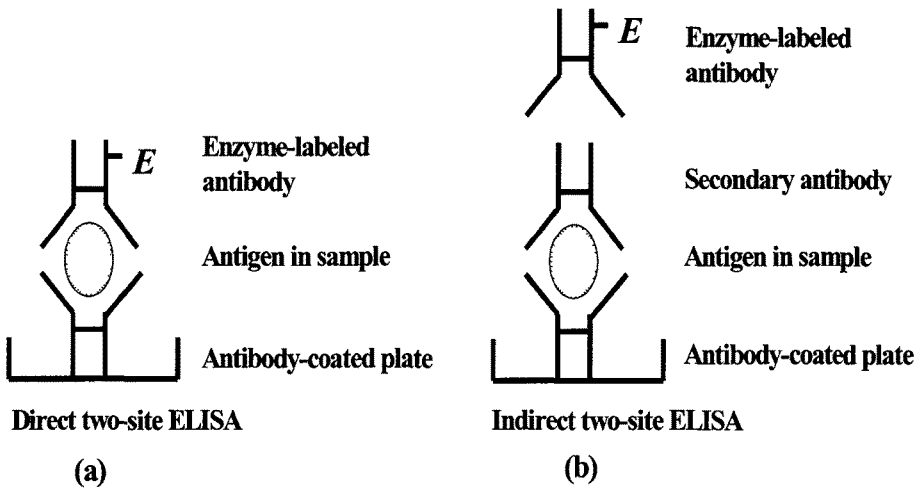

Fig. 2. Enzyme-linked immunosorbent assay; examples of assay formats for detecting food pathogens.

Other immunoassays & Liposome immunoassay

ELISA이외의 immunoassay format에는 latex agglutination, immunodiffusion, dipstick assays 등이 있다. 이들 assays는 plate washers, ELISA readers와 같은 장비를 요구하지 않으므로 최소한의 장비를 가진 실험실에서도 수행할 수 있다. Latex agglutination assay kits는 target analyte로 sensitized된 latex 입자를 이용한다. Dipstick-based assays는 target cell을 포획하기위해 target cell에 대한 antibody가 coating된 dipstick을 이용한다.

Liposomes은 cell membranes의 성질을 연구하는 동안 발견되었으며 phospholipids가 물 속에 분산되어 있을 때 자발적으로 형성된다 (Bangham et al. 1965). 따라서 liposomes은 aqueous cavity를 싸고 있는 1개 또는 1개 이상의 phospholipid bilayer로 구성된 구형의 vesicles이라고 볼 수 있다 (그림 3). 수상계에 녹아있는 fluorophores, enzymes, drugs과 같은 분자들은 liposomes을 만드는 과정동안 liposomes 내부로 포집될 수 있다. Liposomes을 이용한 초기의 연구는 주로 cell membranes에 관한 것이었으나 최근에는 drug delivery 분야와 genes을 운반하는 운반체로서 gene therapy에 응용되고 있다. Liposomes은 작은 antigen의 immunogenicity를 향상시키기 위한 adjuvant로써도 이용되며 화장품 회사에서는 skin cream의 구성분으로써 생산된다.

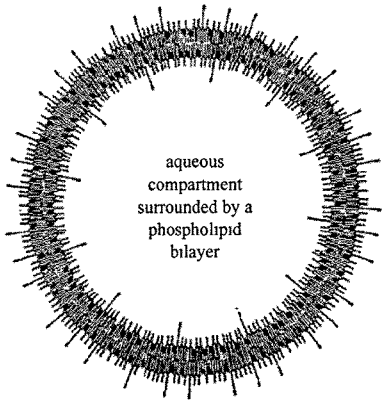

Fig. 3. A. liposome. Cross-section of a unilamella vesicle with an aqueous interior surrounded by a bilayer membrane (Rongen et al. 1997).

Drug delivery에서 liposomes의 내부 수상계는 많은 분자의 drug 분자를 포집하는 역할을 한다. Tumor cell의 membrane protein을 인식하는 antibodies가 liposomes 표면에 conjugation된다. 이렇게 만들어진 immunoliposomes은 tumor cell 표면에 특이적으로 결합해서 내부에 있는 drug을 방출하게 된다. Liposomes을 의약 분야에 응용하는 동안 다양한 liposomes의 제조 방법과 다른 분자와의 conjugation 방법이 활발하게 개발되었다. 이렇게 개발된 방법들은 liposomes을immunochemistry에서 analytical tool로 이용 가능하게 하였다. 이하 liposomes을 이용한 식중독 세균 검출법의 예는 발표에서 다루기로 한다.

식품 기원의 세균을 검출하기 위해 새롭게 개발된 모든 방법들은 식품 분석에 일상적으로 사용되기 전에 standard methods와 비교 평가되어야 하며 collaborative study를 통해 validation을 받아야 한다. 현재 개발되고 있는 신속 검출법들은 단순성 (simplicity), 특이성 (specificity), 민감도 (sensitivity), 신속성 (speed) 면에서 standard culture methods보다 큰 장점을 보여왔다. 이러한 장점들과 빠른 성장에 비해서 식품 분석 실험실 및 관련 기관에서의 신속 검출법의 수용도 및 활용도는 다소 느린 편인데 그 이유는 다음과 같다.

첫째, standard culture methods는 지난 100 여년 동안 미생물 분석에 있어서 탄탄한 기본을 이루어 왔다. Culture methods가 노동 집약적이고 시간 소모적 과정이지만 여전히 신뢰성 있는 결과를 보이고 있으므로 이러한 방법으로부터 새로운 방법으로의 전환은 즉각적이라기 보다는 점진적이 될 것이다.

둘째, 신속 검출법을 실험실에 적용하기 위해서 초기에 투입되어야 할 재원의 문제다. 대부분의 신속 검출법들이 culture methods에 비해서는 다소 비싼 분석 장치와 새로운 기술을 필요로 한다. 따라서 연구 인력들에게 새로운 기술을 인지하도록 교육, 훈련시키는 비용 또한 상당할 것이다. 상업용 검출 kit 운용시 소요되는 작동 경비와 넓지 않은 판매망도 그 사용을 제한하는 요인이다.

셋째, 범람하고 있는 수많은 새로운 방법의 문제이다. 광대한 선택권은 최종 사용자를 혼란시킬 수 있다. Assay 마다 다양한 기술과 format을 이용하므로 food matrices에 따라 서로 다른 performance를 보일 수 있다. 또한, 검출의 목표가 무엇이냐에 따라 신속 검출법의 용도가 제한된다. 예를 들어, 식중독

세균이 분비하는 독소가 문제시 될 때 PCR 분석을 한다는 것은 그 독소에 대한 genetic potential에 관한 정보만 얻을 뿐 실제로 독소가 expression되어서 식품 내에서 독소의 기능을 발휘했는지에 관한 어떤 정보도 주지 못한다.

넷째, collaborative study나 AOAC에 의해 공인된 검사법이 매우 제한적이라는 점과 positive라고 추정되는 시료는 standard methods로 확증되어야 한다는 점이다. 현재 승인된 신속 검출법들은 negative result가 단정적인 경우에 screening 목적으로 사용될 수 있다. Positive result는 오직 추정적 (presumptive) 이라고만 말할 수 있고 이러한 추정적 결과는 standard methods로 다시 확증 (confirmation) 되어야 한다. 또한, 대부분의 신속 검출법은 viable cell과 dead cell을 동시에 검출하므로 실제로 시료내 viable cell의 존재 유무를 확인하기 위해서는 standard culture를 반복해야 한다.

식품 내에서 병원성 세균을 분석하는 것은 기존의 진단 미생물학에서 직면하지 않던 새로운 문제점을 제기한다. 식품의 물리적 특징과 화학적 구성성분, 식품의 가공 정도, 식품 내 존재하는 다양한 미생물들, 그리고 이러한 식품 환경에서 미생물들이 손상받은 정도 등은 식품에 따라 매우 다양하다. *Salmonella* serotypes, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7과 같은 병원성 세균의 zero tolerance 때문에 이 균들에 대한 검출도는 특히 민감해야 한다. 결론적으로, 식품 내 병원성 세균을 검출 방해 성분으로부터 효율적으로 분리하고 viable cell을 dead cell과 구별하면서 다중 오염원을 동시에 신속히 검출할 수 있는 소형화된 자동화 방법의 개발이 미래 신속 검출법이 추구하는 연구 방향일 것이다.

참고문헌

Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkis, J. C. 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J. Mol. Biol. 13: 238-252.

Buzby, J. C., Roberts, T., Lin, C. T. J. and MacDonald, J. M. 1996. Bacterial foodborne disease: medical costs and productivity losses. Agricultural Economics Report No. 741: 100. Washington, D. C., USDA Economic Research Service.

Clark, B. R. and Engvall, E. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): theoretical and practical aspects. In Enzyme Immunoassay. ed. E. T. Maggio, pp. 167-180. Boca Raton, FL: CRC.

Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N. and Berliner, E. 1942. The demonstration of pneumococcal antigen in tissue by the use of fluorescent antibody. J. Immunol. 45: 159-170.

Haglund, J. R., Ayres, J. C., Paton, A. M., Kraft, A. A. and Quinn, L. Y. 1964. Detection of salmonellae in eggs and egg products with fluorescent antibody. Appl. Microbiol. 12: 447-450.

Mead, P. S., Slusker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresce, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. and Tauxe, R. V. 2000. Food-related illness and death in the United States, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.

Pierson, M. D. and Stern, N. J. eds. 1986. Food-borne Pathogens and Their Toxins: Developing Methodology. New York: Marcel Dekker.

Rongen, H. A. H., Bult, A. and van Bennekom, W. P. 1997. Liposomes and immunoassays. J. Immunol. Methods 204: 105-133.

Swaminathan, B., Ayres, J. C. and Williams, J. E. 1978. Control of non-specific staining in the fluorescent antibody technique for the detection of salmonellae in foods. Appl. Environ. Microbiol. 35: 911-919.

Swaminathan, B. and Feng, P. 1994. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 48: 401-426.

Thomason, B. M. 1981. Current status of immunofluorescent methodology for salmonellae. J. Food Prot. 44: 381-384.

Tortorello, M. L. and Gendel, S. M. 1993. Fluorescent antibodies applied to direct epifluorescent filter technique for microscopic enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 in milk and juice. J. Food Prot. 56: 672-677.