pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 29, No. 3, pp. 228~233 (2014)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2014.29.3.228

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

축산물과 수산물에서 분리된 장구균의 항생제 감수성 및 유전형 분석

김윤정 · 오미현 · 김용훈 · 김순한 · 박건상 · 주인선*
식품의약품안전처 미생물과

Monitoring of Antimicrobial Resistance and Genetic Analysis of *Enterococcus* spp. Isolated from Beef, Pork, Chicken and Fish in Korea

Yoon Jeong Kim, Mi Hyun Oh, Yong Hoon Kim, Soon Han Kim, Kun Sang Park, and In Sun Joo*
Food Microbiology Division, Ministry of Food and Drug Safety
(Received October 24, 2013/Revised March 7, 2014/Accepted August 27, 2014)

ABSTRACT - This study was performed to examine antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. strains from retail raw meat and fish products purchased in 2012. 43 *Enterococcus* spp. strains were isolated from a total of 207 samples (beef, pork, chicken, fish) with contamination rate of 20.8%. The isolated strains were identified as *E. faecalis* (22 strains), *E. gallinarum*, *E. hirae* (5 strains), *E. avium* (4 strains), *E. faecium* (3 strains), *E. duram*, *E. casseliflavus* (2 strains). Susceptibility to 10 antibiotics was tested, and the highest resistance was observed to tetracycline. And antimicrobial resistance rates were presented below 20% with most of the other antimicrobial agents. The isolated *Enterococci* from chicken showed higher resistance also to ciprofloxacin and erythromycin, not only to tetracycline, compared to the isolated *Enterococci* from beef, pork and fish. Sixteen isolates (37.2%) were sensitive to all antibiotics. Four isolates (9.3%) were resistant to 3 or more antibiotics. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) was not identified. According to the results of genetic similarity pattern analysis via PFGE and rep-PCR, *Enterococci* strains showed different patterns from these collected in 2011. This indicates that there is no genetic similarity among all the strains.

Key words : Enterococci, antimicrobial resistance, raw meat, fish, VRE

서 론

*Enterococcus*는 인간의 장내에서 서식하는 장내 정상 세균총 중 하나로 흔하게 식품, 식물, 물과 토양에서도 분리가 된다[1]. 전 세계적으로 분리가 되는 *Enterococcus* spp.는 중요한 병원 감염균종의 하나로 알려져 있다[2]. *Enterococcus* spp.는 병원감염을 야기 시키는 주요 임상 미생물로 대부분의 항생제에 자연내성을 지니고 있으며, 획득내성으로 β-lactam항생제와 아미노글리코사이드에 저도내성을 가지는 경우가 많다. *E. faecium*과 *E. faecalis*에서 글리코펩타이드계열 항생제의 대부분이 임상적으로 내성을 일으키며 획득내성 중 아미노글리코사이드에 대한 고도내성과 vancomycin 내성이 문제가 되고 있다[3,4]. 여러 유전자에 의해 내성을 일으키는 vancomycin resistant enterococci (VRE)는 감염치료에 제한을 두게 되어 주요한 문제가 되고 있으며, vancomycin 내성의 메카니즘으로는 acquired type (*vanA, vanB, vanD, vanE, vanG, vanL*) 또는 intrinsic type (*E. gallinarum*과 *E. casseliflavus/flavescens* 종과 관련된 *vanC*) 중 하나로 설명이 된다[5]. 항생제 내성 유전자의 전이는 유행성 균주의 단클론성 전이나 내성유전자의 균주간 수평전이로 가능하다[6]. 이러한 이유로 항생제 내성의 문제는 사람뿐만 아니라 축산분야에서도 내성 증가로 인한 가축의 질병 치료의 어려움을 겪고 있고 내성균의 사람에게로의 전달 가능성이 있어 공중보건학적으로 중요하게 대두되고 있다[7]. 국내에서는 *Enterococci*에 관한 연구로 임상검체에서 VRE 분리 빈도와 분리된 VRE를 대상으로 항균제감수성 양상과 내성 유전자형을 규명하는 연구[8] 및 VRE의 전파에 의한 감염을 막기 위해 감염관리연구[9]등이 진행되고 있고, 식품검체에서는 축산물[10,11], 수산물[12,13], 곡물[14], 원유[7], 샐러드[15] 등에서 분리한 *Enterococcus* spp.에 대하여 분리율 및 항생제내성 양상 및 오염도조사에 관한 연구들이 진행되고 있다.

*Correspondence to: In Sun Joo, Osong Health Technology Administration Complex, 187, Osongsaengmyeong 2-ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, 363-700, Korea
Tel: 82-43-719-4302, E-mail: jis901@korea.kr

본 연구는 시판되는 축산물과 수산물에서 분리한 *Enterococcus* spp.의 항생제 내성 여부 및 다제내성 실태를 모니터링하고, 항생제내성률 변화 추세를 분석하였다. 또한 항생제 내성에서 중요시 되고 있는 VRE 유전자 검출과 PFGE 및 rep-PCR 분석을 통한 유전적 상관성을 확인하여 *Enterococcus* spp.오염관리와 항생제내성 위해평가의 기초자료로 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 수집

실험에 사용된 재료들은 2012년 4월부터 7월 동안 기간 내 7차례에 걸쳐 전국 5권역 (서울/경기권, 충청권, 경상권, 전라권 및 강원권)의 슈퍼마켓, 대형마트, 도매시장, 횟집 등 총 29곳에서 구입을 하여 사용하였다. 구입한 시료들은 각 각 축산물인 소고기 52건, 돼지고기 54건, 닭고기 51건과 수산물인 횟감류 50건 (광어, 우럭, 도미 등), 총 207건을 구입하여 아이스박스에 넣어 4ºC 이하로 하여 실험실로 5시간 이내에 운반한 후 *Enterococcus* spp.의 오염도 분석 및 항생제 검사를 실시하였다.

Enterococcus spp. 분리 및 확인시험

Enterococcus spp.를 분리하기 위하여 멸균백에 채취한 검체 25 g을 6.5% NaCl을 포함한 Azide dextrose broth (Merck, Germany) 225 mL에 가하고 균질기(BagMixer 400W, Interscience™, France)에서 30초간 균질화 한 후 37ºC에서 24시간 동안 증균 배양하였다. 증균 배양액을 Enterococcosel agar (BBL™, USA)에 획선도말하여 37ºC로 24시간 배양 하였다. 배양 후 검은색 콜로니로 자란 집락을 선택하여 5% laked horse blood (Oxoid, UK)가 함유된 blood agar에 옮겨 37ºC에서 24시간 배양하였다. 작은 gray 콜로니를 선택하여 VITEK compact 2 (Biomerieux, Inc., France)로 생화학동정을 하여 최종확인을 하였다.

항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험을 위해 디스크확산법(Disk diffusion method)을 사용하였으며 방법은 아래와 같다. 순수 분리된 *Enterococcus* spp.를 각각 Muller-Hinton agar (Oxoid)에 접종한 후 37ºC에서 18시간 배양하였다. 배양된 콜로니를 선택한 후, 탁도기(Biomerieux)를 사용하여 0.5 McFarland가 되도록 멸균생리식염수에 탁도를 맞추고 멸균면봉으로 균액을 묻혀 미리 조제된 4 mm 두께의 Muller-Hinton agar (Oxoid)의 전 표면에 균액을 고르게 도말하였다. 평판을 3분간 말리고 15분 이내에 disc dispenser (Oxoid)를 이용하여 항생제 디스크(Oxoid)를 놓은 후 37ºC에서 24시간 배양한 후 생육저지환의 직경을 캘리퍼(HANDO, Korea)를 사용하여 측정하였다. 사용한 항생제 디스크로는 ampicillin (AMP, 10 μg, Oxoid), gentamycin (GM, 10 μg, Oxoid), amoxillin/clavulanic acid (AMC, 20/10 μg, Oxoid), ciprofloxacin (CIP, 5 μg, Oxoid), penicillin (P, 10 μg, Oxoid), rifampin (RD, 5 μg, Oxoid), erythromycin (E, 15 μg, Oxoid), vancomycin (VA, 30 μg, Oxoid), chloramphenicol (C, 30 μg, Oxoid), tetracycline (TE, 30 μg, Oxoid), 총 10종을 사용하였다. 저지환 직경에 따른 결과는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2004)에 준하여 감수성 여부를 판독하였다. 디스크확산법을 이용하여 VRE (Vancomycin-resistant enterococci)로 추정되는 항생제 내성균에 대하여 최저생육저해농도(Minimum Inhibition Concentration, MIC)를 VITEK compact 2 (Biomerieux)용 AST-P580 card (Gram positive card, Biomerieux)를 사용하여 측정하였다.

Vancomycin 내성유전자 확인

디스크확산법에 의한 내성검사 결과 주요 항생제 내성균인 VRE로 추정되는 균주에 대해서 vancomycin 내성 균주에 가장 흔히 분포하고 있는 획득내성 유전자인 *van*A gene, *van*B gene, *van*C-1 gene 및 *van*C-2,3 gene을 multiplex PCR을 이용하여 확인하였다(Table 1)[16,17]. DNA추출은 DNA 추출 키트(UltraClean Microbial DNA Isolation kit, MO BIO Laboratories Inc., CA, USA)를 사용하여 유전자를 추출한 후 PCR template로 사용하였다. Template 5 μl를 PCR premix (AccuPower, BIONEER, Korea) 15 μl와 혼합하여 PCR system (PC818 PCR system, ASTEC, JAPAN)으로 94ºC로 30초간 denaturation, 58ºC 로 1분 annealing, 72ºC로 1분간 extension 하는 반응을 35회 반복 시행하였다. 증폭산물 10 μl를 2% agarose gel에 30분간 전기영동하여 증폭산물의 생성여부를 확인하였다[18].

분리균주에 대한 유전자 상동성 확인 Pulsed-Fild Gel Electrophoresis (PFGE)

분리균주를 TSA (Difco)에 접종하여 35ºC에서 18시간 배양하고 cell suspension TE buffer (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 7.5)에 현탁시켜 탁도가 MacFarland 15%가 되

Table 1. Sequence of oligonucleotide primers used for detecting *van* genes

Gene	Size (bp)	Oligonucleotide sequence
*van*A	732	F 5'- GCATGGCAAGTCAGGTG -3' R 5'- GATTCCGTACTGCAGCCT -3'
*van*B	635	F 5'- ATGGGAAGCCGATAGTC -3' R 5'- GATTTCGTTCCTCGACC -3'
*van*C-1	822	F 5'- GGTATCAAGGAAACCTC -3' R 5'- CTTCCGCCATCATAGCT -3'
*van*C-2,3	439	F 5'- CTCCTACGATTCTCTTG -3' R 5'- CGAGCAAGACCTTTAAG -3'

도록 균 농도를 조절하여 균 현탁액 240 μl와 Lysozyme solution 60 μl를 섞은 후, 200 μl만 취해 SSP solution (1.2% Seakem gold agarose, 10% sodium dodecyl sulfate, proteinase K)를 동량 혼합시켜 disposable plug mold (BIO-RAD, USA)에 분주하여 plug를 제작하였다. 제작한 plug는 cell lysis buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% sodium-lauroyl sarcosine) 1.5 mL과 proteinase K 11 μl가 담긴 tube에 넣고 54ºC에서 2시간 정치시키고 반응 종료 후 plug는 TE buffer로 20분씩 5회 세척하였다. plug를 2.5~3 mm 크기로 잘라 새로운 1.5 mL microcentrifuge tube에 옮겨놓고, 20 units의 Sma I이 첨가된 제한효소용액을 200 μl를 가한 후 25ºC 항온수조에서 6시간 반응시켰다. 반응이 종료된 tube는 enzyme buffer를 제거 후 TE buffer로 세척하였고 comb에 순서대로 plug slice를 붙이고 겔을 채워 전기영동을 실시하였다. 전기영동을 위해 사용된 gel은 Seakem gold agarose 1.3 g을 500 mL flask에 넣고 0.5 × TBE buffer 130 mL와 thiourea 325 μl를 가하여 만들어졌으며, Size Marker는 *Salmonella* breanderup ATCC BAA-664를 사용하였다. 전기영동은 CHEF DR-III apparatus (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)으로 initial switch time 1.0s, final switch time 20.0s, run time 18h, voltage 6 V/cm, angle 120º 조건으로 실행하였다.

Repetitive Element Sequence-Based PCR (rep-PCR) 분석

분리주에 대한 유전적 상동성 검사는 DiversiLab™ kit (Biomerieux)를 이용하여 검사하였다. DNA추출은 microbial DNA isolation kit (MOBIO, CA, USA)를 이용하여 추출하였으며 추출된 DNA는 nanodrop® 1000 (Nanodrop Technologies, USA)으로 정량하여 사용하였다. PCR 반응액은 rep-PCR master mix (MM1) 18 μl, 10 × GeneAMP PCR Buffer 2.5 μl, primer mix 2 μl, AmpliTaq® DNA template 2 μl을 섞어 총 25 μl로 하였다. PCR 반응조건은 initial denaturation은 94ºC에서 2분간 반응 후, 94ºC에서 30초 denaturation, 50ºC에서 30초 annealing, 70ºC에서 90초간 extension을 35회 반복한 후, final extension은 70ºC에서 3분간 반응하였다. 증폭산물의 분석을 위해 micro-fluidic chip과 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, France)를 사용하여 전기영동하고 결과는 DiversiLab software (ver. 3.4)로 상동성을 분석하였다.

결과 및 고찰

Enterococcus spp. 분포 및 분리율

분리 결과, 소고기, 돼지고기, 닭고기를 포함하는 축산식품 157건과 수산식품 50건, 총 207건의 축·수산식품에서 장구균 43주를 분리하여 20.8%의 분리율을 나타내었다(Table 2). 이 결과는 Sung 등(2013)[11]과 Cho 등(2013)[20]의 실험과 비교하였을 때 보다 낮은 분리율을 보여 주었고, Kim 등(2013)[10]의 실험과 비교 했을 때는 비슷한 분리율을 보여주었다. 이들 연구마다 다른 분리율을 보여주는 이유는 실험에 사용한 시료의 구입위치, 구입시기와 시험자가 사용한 부위 (내장부위, 근육부위 등)에 의한 차이로 보여진다. 시료 별 분리균주는 축산식품 중 닭고기 51건에서 분리한 균주가 17주(33.3%)로 가장 많았고, 다음으로 소고기 52건에서 분리된 균주가 13주(25.0%), 돼지고기 54건에서 분리한 균주가 7주(13.0%), 횟감 50건에서 분리한 균주가 6주(12.0%)의 순으로 분리되었다. 분리된 균종 중에는 *E. faecalis*가 가장 많이 분리되어 22주(10.6%)가 분리되었고 다음으로 *E. gallinarum*, *E. hirae*이 5주(2.4%), *E. avium*이 4주(1.9%), *E. faecium*이 3주(1.4%), *E. duram*, *E. casseliflavus*가 2주(1.0%)로 축산물과 수산물에서 다양한 종이 분리되었다. Günter 등(1998)[21]은 갈은 소고기(51.7%)와 갈은 돼지고기(48.3%) 시료에서 *E. faecalis*와 *E. faecium*, *E. casseliflavus, E. gallinarum, E. duram, E. hirae, E. avium*를 다양하게 분리 하였고, Naci 등(2013)[22]은 닭고기(13.3%) 시료에서 Enterococci를 분리 하였다. 또한 Oh 등(2008)[23]은 넙치, 조피볼락, 참돔, 농어와 사육용수 등에서 *E. faecalis*(44.1%), *E. faecium*(32.4%), *E. gallinarum*(11.8%), *E. duram*(5.9%), *E. avium*(8.8%)을 분리하였다.

분리균주에 대한 항생제 감수성 시험

축산물과 수산물 시료에서 분리된 43주의 *Enterococcus* spp.에 대해 항생제별 내성률 양상을 알아본 결과는 Table

Table 2. The distribution of *Enterococcus* spp. isolated from raw meats and fish

Samples (No. of samples)	Number of *Enterococcus* spp. Isolate (%)							
	E. faecalis	*E. faecium*	*E. avium*	*E. gallinarum*	*E. hirae*	*E. duram*	*E. casseliflavus*	Total
Beef (n = 52)	5 (9.6)	ND[1)]	1 (1.9)	2 (3.8)	5 (9.6)	ND	ND	13 (25.0)
Pork (n = 54)	5 (9.3)	1 (1.9)	1 (1.9)	ND	ND	ND	ND	7 (13.0)
Chicken (n = 51)	11 (21.6)	ND	2 (3.9)	2 (3.9)	ND	2 (3.9)	ND	17 (33.3)
Fish (n = 50)	1 2.0)	2 (4.0)	ND	1 (2.0)	ND	ND	2 (4.0)	6 (12.0)
Total (n = 207)	22 (10.6)	3 (1.4)	4 (1.9)	5 (2.4)	5 (2.4)	2 (1.0)	2 (1.0)	43 (20.8)

[1)]ND, not detected

Table 3. Antibiotics resistance patterns of *Enterococcus* spp. isolated from raw meats and fish

Antimicrobial agents	Number of antibiotic-resistance *Enterococcus* spp. Isolate (%)				Total (n = 43)
	Beef (n = 13)	Pork (n = 7)	Chicken (n = 17)	Fish (n = 6)	
Ampicillin	1 (7.7)	ND[1)]	ND	ND	1 (2.3)
Gentamicin	1 (7.7)	1 (14.3)	ND	1 (16.7)	3 (7.0)
Amoxicillin/clavulanic acid	1 (7.7)	ND	ND	ND	1 (2.3)
Ciprofloxacin	ND	ND	4 (23.5)	ND	4 (9.3)
Penicillin	1 (7.7)	ND	ND	ND	1 (2.3)
Rifampin	2 (15.4)	1 (14.3)	ND	ND	3 (7.0)
Erythromycin	1 (7.7)	1 (14.3)	6 (35.3)	1 (16.7)	9 (20.9)
Vancomycin	1 (7.7)	ND	ND	ND	1 (2.3)
Chloramphenicol	ND	ND	1 (5.9)	1 (16.7)	2 (4.7)
Tetracycline	3 (23.1)	4 (57.1)	12 (70.6)	ND	19 (44.2)

[1)]ND, not detected

Table 4. Multiple antimicrobial resistance rates of *Enterococcus* spp. isolated from raw meats and fish

Antimicrobials	No. of resistance isolates (%)				Total (n = 43)
	Beef (n = 13)	Pork (n = 7)	Chicken (n = 17)	Fish (n = 6)	
No resistance detected	7 (53.8)	3 (42.9)	2 (11.8)	4 (66.7)	16 (37.2)
Resistance 1 CLSI subclasses	5 (38.5)	3 (42.9)	10 (58.8)	1 (16.7)	19 (44.2)
Resistance 2 CLSI subclasses	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (17.6)	1 (16.7)	4 (9.3)
Resistance 3 CLSI subclasses	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.9)	0 (0.0)	1 (2.3)
Resistance 4 CLSI subclasses	0 (0.0)	1 (14.3)	1 (5.9)	0 (0.0)	2 (4.7)
Resistance 5 CLSI subclasses	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Resistance 6 CLSI subclasses	1 (7.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.3)

3과 같다. 주요 항생제별 내성률은 tetracycline이 44.2%로 제일 높은 내성률을 나타내었고, erythromycin에서 20.9%의 내성률을 나타내었다. 장구균의 축종별 항생제 내성률은 대부분의 항생제에 대해 20% 이하의 내성률을 나타내고 있으나, tetracycline의 내성률은 닭고기 및 돼지고기 유래 장구균에서 내성률이 각 각 70.6%와 57.1%로 높은 결과를 나타내었다. Tetracycline외에도 닭고기 유래 장구균은 ciprofloxacin, erythromycin에 대한 내성이 다른 식품 유래 미생물에 비해 높은 결과를 보여주었다. *E. faecalis*는 tetracycline에서 54.6%의 내성을 보였고, erythromycin에서 22.7%의 내성을 보였으며, *E. faecium*은 tetracycline, erythromycin, rafampin, gentamycin에서 내성을 보인 균주가 1주씩 발견되었다. *E. avium*은 vancomycin에 대해 1주가 내성을 나타내어 VRE로 추정되었다. Hayes 등(2003)[24)]의 연구에서는 축산물에서 분리한 *E. faecalis*와 *E. faecium*가 돼지고기와 소고기보다 칠면조와 닭고기에서 erythromycin, bacitracin, penicillin과 quinupristin/dalfopristin의 항생제에 대해서 더 높은 내성을 나타내었고, tetracycline에서는 닭고기보다 돼지고기에서 더 높은 내성률을 나타내었다. Kim 등(2013)[10)]의 연구에서는 소고기와 돼지고기에서 분리한 *E. faecalis*는 tetracycline에서 55.7%, erythromycin에서 50.0%의 내성률을 나타내었고, *E. faecium*은 erythromycin에서 53.8%, rifampin에서 46.1%의 내성률을 보여준 결과와 비교했을 때 내성률의 수치는 연구마다 다르지만 높은 내성을 보이는 항생제는 유사하였음을 알 수 있다.

분리된 *Enterococcus* spp.의 항생제 다제내성 현황을 알아본 결과(Table 4), 모든 항생제에 감수성이 있는 균주는 16주(37.2%)인 반면 3개 이상의 항생제에 내성을 나타내는 다제내성 균주는 4주(9.3%)로 나타났다. 균종별에 따른 다제내성 양성은 *E. faecalis*에서 E-TE가 2주(4.7%)였으며, CIP-E가 1주(2.3%), CIP-E-TE가 1주(2.3%), CIP-E-C-TE가 1주(2.3%)였다. *E. faecium*에서는 GM-RD-E-TE가 1주(2.3%)였으며, *E. gallinarum*에서는 GM-E가 1주(2.3%), *E. avium*에서는 AMP-AMC-P-RD-E-VA가 1주(2.3%)를 나타내었다. 이번 연구에서는 항생제 다제내성을 나타내는 항생제 중 모두가 erythromycin (E)와 연관된 내성 양상을 보여주었고, 다음으로는 tetracycline (TE)과 연관된 내성양상을 보여주었다. Park 등(2010)[27)]연구에서는 다제내성 양상의 대부분이 tetracycline (TE)과 연관된 내성양상을 보여주었다. *Enterococcus* spp.의 경우 지역에 따라 약간의 차이가 있으나 erythromycin, tetracycline, gentamycin에 내성을 나타내는 균주의 비율이 높은 것으로 보고되고 있다[28)].

디스크확산법에 의한 내성검사 결과 주요 항생제 내성균인 VRE로 추정되는 균주에 대해서 최저생육저해농도(MIC) 검사를 실시하였다. 미량희석법에 의해 VRE의 MIC

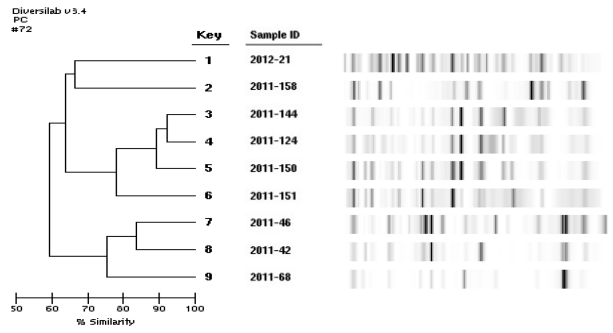
(≥ 32 μg/mL)를 측정한 결과, vancomycin에 내성을 나타내는 *E. avium* 1주(VRE 추정균주, 소고기 유래)는 감수성 균주로 판정되었다. 이에 따른 결과는 실험 시 디스크확산법과 미량희석법의 실험 방법에 의한 차이로 보이며, 재현성이 높은 미량희석법 결과가 더 정확한 것으로 사료된다.

주요 항생제 내성균 유전자 확인

본 연구에서 디스크확산법에 의한 내성검사 결과 주요 항생제 내성균인 VRE로 추정되는 균주에 대해 multiplex PCR을 이용하여 내성유전자를 확인한 결과, Cho 등[20]의 연구에서 분리되었던 장구균 중 VRE 유전자가 검출되었던 균주는 4주(*van*A, *van*B가 검출)였으나 본 연구에서는 *van*A gene, *van*B gene, *van*C-1 gene 및 *van*C-2,3 gene을 보유한 균주는 없는 것으로 확인이 되었다. PCR법에 의한 VRE유전자 검출은 가장 특이도가 높은 검사법이고 저도내성을 갖는 VRE 검출에도 유용하다고 알려져 있어[28], 최종적으로 VRE 추정균주인 *E. avium*은 VRE가 아닌 것으로 판명하였다.

분리균주에 대한 유전자 상동성 확인

VRE로 판정되지는 않았으나 디스크확산법에서 vancomycin에 내성을 나타내는 장구균 분리주 1주와 Cho 등[20]의 연구에서 분리된 장구균 중 VRE로 최종 판정되지는 않았으나 디스크확산법에서 vancomycin에 내성을 보였던 8주와 각각의 유전자 상동성을 PFGE 및 rep-PCR을 수행하여 비교 분석하였다. 그 결과, VRE로 추정되는 Cho 등[20]의 분리균주와 본 연구 분리균주 모두 다른 패턴을 나타내어 유전적 연관성이 없는 것으로 나타났다(Fig 1). PFGE수행 결과, PFGE에서는 9주 모두 < 80%의 상동성을 보여 상관성이 없는 균주로 판정되었다 (자료는 제시하지 않음). rep-PCR수행 결과는 92.2%의 상동성으로 유전적 상동성이 낮았다. 유래 식품이 서로 다른 균주로 연관성이 부족한 것으로 분석되었다. 이를 통해 디스크확산법에서 vancomycin에 내성을 가지는 균주의 유래를 밝히는 데는 아직 어려움이 있으므로 지속적인 유전자 상동성 분석을 통하여 자료의 축적이 필요할 것으로 생각이 된다.



[1]2012-21:isolated from beef, [2]2011-158:isolated from chicken, [3]2011-144:isolated from chicken, [4]2011-124:isolated from fish, [5]2011-150:isolated from chicken, [6]2011-151:isolated from beef, [7]2011-46:isolated from fish, [8]2011-42:isolated from fish, [9]2011-68:isolated from beef

Fig. 1. Dendrogram generated after cluster analysis of rep-PCR fingerprints of *Enterococcus* spp.

결 론

유통 식품 중 항생제 내성균 모니터링의 일환으로 2012년 유통식품의 항생제 내성 실태조사를 실시하였다. 소고기, 돼지고기, 닭고기를 포함하는 축산식품 157건과 횟감인 수산식품 50건, 총 207건의 축·수산식품에서 *Enterococcus* spp. 43주(20.8%)를 분리하였다. 닭고기에서 17주(33.3%), 소고기 13주(25.0%), 돼지고기 7주(13.0%), 수산물에서 6주(12.0%)를 분리하였으며, 분리된 균주 중 *E. faecalis*가 22주(10.6%)로 가장 많이 분리가 되었고 다음으로 *E. gallinarum*, *E. hirae* 5주(2.4%), *E. avium* 4주(1.9%), *E. faecium* 3주(1.4%), *E. duram*, *E. casseliflavus* 2주(1.0%)의 순으로 축산물과 수산물에서 다양한 종이 분리되었다. 분리균주에 대한 항생제 감수성 실험 결과, 주요 항생제별 내성률은 tetracycline이 44.2%로 제일 높은 내성률을 나타내었고 축종별 항생제 내성률은 대부분의 항생제에 대해 20% 이하의 내성률을 나타내었다. Tetracycline외에도 닭고기 유래 장구균은 ciprofloxacin, erythromycin에 대한 내성이 다른 식품 유래 미생물에 비해 높은 결과를 나타내었다. 항생제 다제내성 현황은 모든 항생제에 감수성이 있는 균주는 16주(37.2%)인 반면 3개 이상의 항생제에 내성을 나타내는 다제내성 균주는 4주(9.3%)로 나타났다. 항생제 내성균 유전자 확인 결과, vancomycin 내성 균주는 검출되지 않았다. 항생제 내성분리균주에 대해 PFGE와 rep-PCR을 이용해 유전자 상동성 패턴을 분석 한 결과 VRE로 추정되는 균주 모두 다른 패턴을 나타내어 유전적 연관성이 없는 것으로 나타났다.

감사의 말

이 연구는 2013년 식약처 항생제내성 안전관리 연구(13161 소비자 107)의 연구비지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Giraffa G.: Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*. **26**(2), 163-171 (2002).
2. Kwon O.M., Kim M.N.: Antibiotics resistance and molecular analysis of *Enterococcus* isolated from the Han-river in Korea. *Korean J. Microbiology*. **48**(2), 116-124 (2012).
3. Yoon S.W.: Vancomycin resistant Enterococci (VRE) infection control. *The korean nurse*. **46**(2), 32-37 (2007).

4. Charles M.A.P. Franz, Wilhelm H. Holzapfel, Michael E. Stiles: Enterococci at the crossroads of food safety. *Int. J. Food Microbiol*. **47**, 1-24 (1999).
5. Figen CETINKAYA. Tülay ELAL MUS, Gül Ece SOY-UTEMIZ, Recep CIBIK: Prevalence and antibiotic resistance of vancomycin-resistant enterococci in animal originated foods. *Turk Vet Anim Sci*. **37**, 588-593 (2013).
6. Kwon O.M., Kim M.N.: Antibiotics resistance and molecular analysis of *Enterococcus* isolated from the Han-river in Korea. *Korean J. Microbiology*. **48**(2), 116-124 (2012)
7. Kim J.H., Choi S.S.: Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolated from raw milk samples in Korea. *J. Fd Hyg. Safety*. **27**(1), 63-67 (2012).
8. Lee W.G., Jung M.K., Kwak Y.S.: Vancomycin-resistant Enterococci: Incidence, antimicrobial susceptibility, and resistance genotypes. *Korean J. Clin. Pathol*. **18**(1), 51-56 (1998).
9. Seo J., Kang J.Y.: Effects of infection control education for families of VRE patients. *J. Korean Acad Fundam Nurs*. **19**(2), 212-222 (2012).
10. Kim J.Y., Park M.A., Kim J.E., Chae H.S., Park Y.J., Son J.W., Yang Y.M., Choi T.S., Lee J.H.: Isolation frequency and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* & *Enterococcus* spp. isolated from beef & pork on sale in Seoul, Korea. *Korean J. Vet Serv*. **36**(2), 111-119 (2013).
11. Sung C.H., Chon J.W., Kwak H.S., Kim H.S., Seo K.H.: Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from beef, pork, chicken and sashimi. *Korean J. Food Sci. An*. **33**(1), 133-138 (2013).
12. Ham H.J.: *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated in dried marine products. *J. Fd Hyg. Safety*. **22**(4), 294-299 (2007).
13. Musarrat Jahan, Denis O. Krause, Richard A. Holley: Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species from meat and fermemted meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. *Int. J. Microbiol*. **163**, 89-95 (2013).
14. Kim S.H., Kim J.S., Park J.H.: Antibiotic resistance of *Enterococcus* isolated from the processed grain foods, Saengsik and Sunsik. *Food Sci. Biotechno*l. **16**(3), 470-476 (2007).
15. Kang T.M., Cho S.K., Park J.H.: Antibiotic resistances of *Enterococcus* isolated from salad and sprout. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*. **36**(2), 142-148 (2008).
16. Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P.: Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Speices Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. *J. Clin. microbiol*. **33**(1), 24-27 (1995).
17. 식품의약품안전청: 가축 축산물내 주요 항생제 내성 실태조사 및 평가, 2008년도 식품의약품안전청 연구보고서 (2008).
18. 식품의약품안전청: 식품유래 미생물의 항생제내성 스펙트럼 및 유전형 분석 연구. 2012년도 식품의약품안전청 연구보고서 (2012).
19. 식품의약품안전청: 식품 중 미생물의 항생제내성 실태 조사 연구. 2011년도 식품의약품안전청 연구보고서 (2011).
20. Cho J.I., Joo I.S., Choi J.H., Jung K.H., Choi E.J., Han M.K., Jeong S.J., Son N.R., Lee S.H. Hwang I.G.: Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from meat and fishery production in Korea. *Food Sci. Biotechnol*. **22**(1), 161-165 (2013).
21. GÜNTER KLEIN, ALEXANDER PACK, GERHARD REUTER: Antibiotic resistance patterns of Enterococci and occurrence of vancomycin-resistant Enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol*. **64**(5), 1825-1830 (1998).
22. NACI ERHAN YURDAKUL, ZERRIN ERGINKAYA, EMEL ÜNAL: Antibiotic resistance of Enterococci, coagulase negative Staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat. *Czech J. Food Sci*. **31**, 14-19 (2013).
23. Oh E.G., Son K.T., Yu H.S., Kim J.H., Lee T.S., Lee H.J.: Antimicrobial susceptibility pattern of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from fish farms in the southern coast of Korea. *J. Kor. Fish. Soc*. **41**(6), 435-439 (2008).
24. Hayes J.R., English L.L., Carter P.J., Proescholdt T., Lee K.Y., Wagner D.D., White D.G.: Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl. Environ. Microbiol*. **69**(12), 7153-7160 (2003).
25. Park S.H., Kim K.S., Yoo Y.A., Lee J.K., Jung S.K., Han K.Y., Kim M.S.: Antibiotic resistance patterns of *Enterococcus* spp. isolated from commercial frozen food. *J. Fd Hyg. Safety*. **25**(2), 122-128 (2010).
26. Lee H.I., Jung J.H., Lee S.J., Choi S.S.: Analysis of genotype and phenotype of erythromycin resistance in *Enterococcus* spp. isolated from raw milk samples. *Kor. J. microbiol*. **46**(2), 148-151 (2010).
27. Hong K.S., Kang E.S., Lee M.A.: Investigation of prevalence of vancomycin-resistant Enterococci and genotypes of glycopeptide resistance using polymerase chain reaction. *Korean J. Clin. Pathol*. **18**(3), 372-378 (1998).
28. Kwon P.S.: The effects of photodynamic theraph for vancomycin-resistant Enterococci. *Korean J. clin lab sci*. **43**(3), 124-132 (2011).
29. Rene te Witt, Vikash Kanhai, Willem B. van Leeuwen: Comparison of the DiversiLab™ system, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multi-Locus Sequence typing for the characterization of epidemic reference MRSA strains. *J. Microbiol. Methods*. **77**, 130-133 (2009).
30. Choi J.E., Lee E.Y.: An investigation on the antibiotic resistant condition and label-stated of domestically distributed livestock-environment improving agents. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*. **37**(3), 258-265 (2009).