pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 1, pp. 63~67 (2012)

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

원유시료에서 분리한 장구균 속 세균의 tetracycline 내성 유전자형 분석

김지훈[1] · 최성숙[2]*
[1]삼육대학교 동물과학부, [2]삼육대학교 약학대학

Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* Isolates from Raw Milk Samples in Korea

JiHoon Kim[1] and SungSook Choi[2]*
[1]*Division of Animal Science, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea,*
[2]*College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea*
(Received November 21, 2011/Revised January 6, 2012/Accepted March 16, 2012)

ABSTRACT - Antibiotic resistance in animal isolates of enterococci is a public health concern, because of the risk of transmission of antibiotic-resistant strains or resistance genes to humans through the food chain. This study investigated phenotypic and genotypic resistances profile of tetracycline in 245 *Enterococcus* isolates from bovine milk. A total of 245 enterococci were isolated from 950 milk samples. The predominant strain was *E. faecalis* (n = 199, 81.2%) and *E. faecium* (n = 25, 10.2%). *E. avium* (n = 7, 2.9%), *E. durans* (n = 6, 2.5%), *E. gallinarum* (n = 4, 1.6%), and *E. raffinosus* (n = 4, 1.6%) were also isolated. Of the 245 enterococcal isolates 76.3% (n = 187) displayed tetracycline resistance (≥ 16 μg/ml). Of the 187 tetracycline-resistant isolates, 83.4% (n = 156), 16.1% (n = 30), and 26.7% (n = 50) possessed the genes *tet*(M), *tet*(L), *tet*(S) respectively. While 3.2% (n = 6) of the tetracycline-resistant isolates possessed all three genes *tet*(M) + *tet*(L) + *tet*(S), 8.6% (n = 16), 16.0% (n = 30), and 2.7% (n = 5) of them possessed two genes *tet*(M) + *tet*(L), *tet*(M) + *tet*(S), and *tet*(L) + *tet*(S) respectively. The tetracycline resistance pattern investigated in this study was attributable mainly to the presence of *tet*(M).

Key words: antibiotic resistance, enterococci, bovine milk, tetracycline

장구균속 세균은 사람과 동물에 정상적으로 상재하는 세균의 일종으로 보통 사람과 동물의 소화관, 야채류 및 유제품 등에서 쉽게 검출되는 균이다[1,2]. 건강한 사람에게는 질병의 위험이 없으나 최근 들어 면역성이 약한 만성 질환자등을 대상으로 원내 감염을 일으켜 수술 후 감염, 비뇨기 감염 및 균혈증의 주요 원인균으로 알려지기 시작하였다[3]. 장구균 감염치료를 어렵게 하는 원인 중 하나는 대다수 장구균이 여러 항생제에 저항성을 나타내는 것과 무관하지 않다[4]. 즉 장구균이 여러 항생제에 저항성을 나타내다 보니 환자에게 사용할 경우 적절한 항생제를 선택하는데 제약이 된다. 한편 항생제 내성의 문제는 사람뿐만 아니라 축산분야에서도 내성 증가로 인한 가축의 질병 치료의 어려움을 겪고 있고 내성균의 사람에게로의 전달 가능성이 제기 되고 있어 공중보건학적으로 중요하게 대두되고 있다[5,6]. 전세계적으로 항생제의 전체 사용량 중 1/2이 동물의 치료, 예방 및 성장촉진제로 사용되고 있는 실정임을 감안할 때 동물성 식품 유래 세균의 항생제 내성균의 증가 경향을 연구하는 것은 항생제 사용을 관리하는데 있어 중요한 단서가 될 것이다[7,8]. 식품위생상 동물 및 축산물 유래 오염의 지표 세균 중 하나인 장구균속 세균의 경우 지역에 따라 약간의 차이는 있으나 다양한 종류의 항생제 및 살균제에 높은 내성을 나타내고 있으며 특히 우리나라의 경우 tetracycline 에 대한 내성이 가장 높은 것으로 알려져 있다[9,10]. 단백질 생합성 과정을 방해하므로 항균력을 나타내는 tetracycline에 대한 세균의 내성발현의 기전으로는 1) active efflux system에 의한 약물의 유출과 2) ribosomal protection 에 의한 target site에 약물이 결합하지 못하도록 하여 내성을 나타내는 두 가지 기전이 대표적이다[11]. 장구균에서 발현되는 tetracycline 내성 기전중 active efflux system 에 의한 내성의 발현은 *tet*(K) 과 *tet*(L) 두 유전자에 기인하며, *tet*(M), *tet*(O) 및 *tet*(S) 유전자는 ribosomal protection 에 의한 내성 발현 유전자로 알려졌

*Correspondence to: SungSook Choi, College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea
Tel: 82-2-3399-1606, Fax 82-2-3399-1617
E-mail: sschoi@syu.ac.kr

다[11-13]. 장구균에 존재하는 tetracycline 내성 연구는 축산식품 유래 균주를 중심으로 꾸준히 연구되어 왔으며[14-16] 최근 우리나라 유방염 소의 원유시료에서 분리된 장구균을 중심으로한 항생제 내성 유형에 대한 연구도 보고되었다[17]. 하지만 남등의[17] 연구 결과의 경우 각 항생제에 대한 내성 비율에 대한 보고는 있지만 원인 유전자에 대한 분석은 미흡한 것으로 사료되었다. 따라서 본 연구자 등은 축산물 유래 장구균이 가장 높은 내성율을 나타내는 항생제인 tetracycline에 대한 내성의 원인 유전자형을 분석하고자 본 연구를 수행하였다. 경기북부지역 축산농가에서 수집한 원유시료로부터 축산물 오염의 지표 세균의 하나인 장구균속 세균을 분리 동정하여 원유시료에서 장구균의 종별 분리빈도를 확인하고 tetracycline 내성율 및 내성관련 유전자형의 분포를 장구균 종별 비교 분석하였다.

재료 및 방법

원유시료의 수집 및 장구균 분리

2008년부터 2010년 5월까지 경기 북부에 위치한 15개 젖소 사육 농가로부터 총 950개의 원유시료를 공급받아 실험에 사용하였으며 착유시 알코올 소독을 실시하여 2차 감염의 기회를 최소화 하였다. 수집한 원유는 잘 혼화 후 SF medium (Difco, Sparks, MD, USA) 에 0.1 ml을 도말 후 37°C에서 24~48시간 배양하였다. 배양 후 형성된 집락 중 장구균 특유의 집락을 순수배양 후 임상검사센터인 세강 (서울)에 의뢰하여 Vitek2 system을 이용한 균 동정을 실시하였다. 동일한 원유 시료에서는 1개의 집락만을 선택하여 같은 균주의 반복적인 선택을 피하였다.

최소저지농도(minimum inhibitory concentration, MIC)의 측정

분리된 장구균을 대상으로 tetracycline (Sigma Co. St. Louis MO, USA)에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 감수성 실험은 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, USA)의 고체배지 희석법으로[18] 실시하였으며 배지는 Mueller-Hinton 배지(Difco, MD, USA)를 사용하였다. 항생물질은 최고 농도 64 μg/ml 농도가 되도록 하여 이 농도에서 2배 계열 희석하여 최종 농도가 0.03 μg/ml 되도록 항생물질 희석 계열을 만들었다. 여기에 전 배양한 균액을 희석하여 10^6 CFU/ml되도록 희석한 후 5 μl씩 항생제 배지에 접종하여 37°C에서 16~20시간 배양하고 균주의 성장을 확인할 수 없는 가장 낮은 tetracycline 의 농도를 최소저지농도(MIC)로 결정하였다. 표준 균주로는 *E. faecalis* ATCC29212를 사용하였다.

중합효소연쇄반응에 의한 tetracycline 내성 유전자의 검색

장구균의 genomic DNA는 GeneAll Cell SV kit(진올바이오테크놀로지, 서울)을 이용하여 분리하였으며 장구균의 세포벽의 분해를 용이하게 하기 위하여 lysozyme(30 mg/ml, Sigma Co. MO. USA)을 첨가하였다. 내성 관련 유전자로는 *tet*(K), *tet*(L), *tet*(M), *tet*(O), *tet*(S) 를 후보 유전자로 PCR반응을 하였으며 이때 사용한 primer는 Genotech (대전)에서 제작하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 primer의 염기서열과 반응조건은 Table 1에 나타내었다. PCR반응은 Bioneer 사의 AccuPower™ premix(대전)를 사용하여 95°C에서 5분간 denaturation 실시 후 95°C, 30초, Table 1에 표시된 annealing 조건에서 30초, 72°C 1분간 extension 반응을 30회 반복 후 마지막 72°C 10분간 elongation 하였다.

내성 유전자의 염기서열 분석

증폭된 tetracycline 내성 유전자는 Genotech(대전) 사에 의뢰하여 염기서열을 결정하고 GeneBank의 염기서열과 비교하였다.

Table 1. Sequences of primers used in this study

Gene		Sequences(5'-3')	Tm	length	Amplicon size	references
tet(K)	F	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC	57.1	20	718	14
	R	GCAAACTCATTCCAGAAGCA	53.6	20		
tet(L)	F	CACGATAGCTAAGGTTATAACGAAGATAGTAGCC	67.1	34	508	This study
	R	AATGGAAAAGGTTAACATAAAGGCTGTGTTCACCC	67.1	35		
tet(M)	F	CAACGTCTTGCATATATACGCC	58.4	22	354	This study
	R	AATCCACGTAATATCGTAGAAGCG	59.3	24		
tet(O)	F	GATGGCATACAGGCACAGAC	56.9	20	614	14
	R	CAATATCACCAGAGCAGGCT	88.3	20		
tet(S)	F	AACAATGGGAGACAGTAATTGTGG	59.3	24	694	This study
	R	TTGAATCAGAGTACAAGTTACCTCC	59.4	25		

Table 2. Identification of Enterococci spp and susceptibility against tetracycline

Strains	No. of isolates (%)	Phenotypic characterisic			
		Range	MIC_{50} (μg/ml)	MIC_{90}	Resistance rate (%)
E. faecasli	199 (81.2)	0.5 ~ > 64	> 64	> 64	149 (74.9)
E. faecium	25 (10.2)	0.25 ~ > 64	> 64	> 64	18 (72.0)
E. avium	7 (2.9)	64 ~ > 64	64	> 64	7 (100)
E. durans	6 (2.5)	16 ~ > 64	> 64	> 64	6 (100)
E. gallinarum	4 (1.6)	> 64	> 64	> 64	4 (100)
E. raffinosus	4 (1.6)	1 ~ > 64	64	> 64	3 (75.0)
Total	245 (100)	0.25 ~ > 64	> 64	> 64	187 (76.3)

	Genotypic characteristic						
	tet(L)	*tet*(M)	*tet*(S)	*tet*(L) + *tet*(M) + *tet*(S)	*tet*(L) + *tet*(M)	*tet*(M) + *tet*(S)	*tet*(L) + *tet*(S)
E. faecasli	24	124	31	4	14	16	3
E. faecium	4	15	8	1	2	6	1
E. avium	0	7	6	0	0	6	0
E. durans	1	4	1	0	0	0	1
E. gallinarum	1	4	2	1	0	1	0
E. raffinosus	0	2	2	0	0	1	0
Total	30	156	50	6	16	30	5

결과 및 고찰

원유 시료중에 존재하는 장구균속 세균을 분리하기 위하여 경기 북부지역에 위치한 15개의 축산 농가에서 950개의 원유 시료를 분양 받아 Difco SF medium (Difco, MD, USA) 배지에 도말하여 장구균 속 세균을 분리하였다. SF 배지에서 장구균 특유의 노란색 색소를 생성하는 집락중 245개의 집락이 균 동정 결과 장구균속 균주로 확인되었으며 분리된 균의 종별 분포를 보면 Table 2에 나타난 것처럼 *E. faecalis* 가 199(81.2%) 균주로 대부분을 이루고 있으며 그 외에 *E. faecium* 이 25(10.2%)균주, *E. avium* 이 7(2.9%)균주, *E. durans*가 6(2.5%)균주, *E. gallinarum* 이 4(1.6%) 균주, 및 *E. raffinosus* 가 4(1.6%) 균주의 비율로 분리되었다. 총 245개의 장구균 속 세균의 tetracycline 에 대한 내성을 보면 Table 2에 나타난 것처럼 MIC_{50}과 MIC_{90}은 모두 > 64 μg/ml이었으며 CLSI의 판단 기준에 따른 (≥ 16 μg/ml) 내성 균주의 분포 비율은 76.3%(n = 187) 였다. 최근 tetracycline 내성 장구균에 대한 국내 자료를 살펴보면 식육에서 분리된 장구균의 경우 85.1%[19] 돼지 분변에서 분리된 장구균의 경우 80.7%[20]의 내성을 나타낸 보고와 비교할 때 돼지에서 분리된 균 보다는 약간 낮지만 여전히 tetracycline에 높은 내성 비율을 나타내고 있는 것을 알 수 있었다. 내성에 관련된 유전자 종류를 분석한 결과 *tet*(L), *tet*(M) 및 *tet*(S) 유전자가 확인되었으며 이 유전자의 염기서열은 GeneBank의 reference 유전자인 *tet*(L) (AY081910.1), *tet*(M) (DQ223244.1) 및 *tet*(S) (DQ295784.1)와 그 염기서열을 비교한 결과 일치도가 98% 이상임을 확인할 수 있었다. 내성 균주 187주 중 156주가 ribosomal protection에 관여하는 *tet*(M)을 보유한 것으로 확인되었으며 종별 분포를 보면 분리된 6종의 장구균종 모두에 *tet*(M) 유전자가 분포함을 알 수 있었다. 그외 *tet*(S)를 보유한 경우도 50주로 분리된 6종의 장구균속 세균 모두에서 관찰되었다. Active efflux에 관여하는 *tet*(L)의 경우 30주에서 관찰되었으며 분리된 6종의 장구균중 *E. avium*과 *E. raffinosus*에서는 관찰되지 않았다. 그 외 ribosomal protection에 의한 내성에 관련된 *tet*(O)와 efflux system 에 관련된 *tet*(K) 유전자는 본 실험에서는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 벨기에 연구팀의 치즈유래 장구균을 재료로 실험한 결과[13]와도 일치하는 것으로 식품유래 장구균의 tetracycline 내성중 ribosomal protection에 기인한 내성은 주로 *tet*(M) 및 *tet*(S) 유전자에, active efflux system 에 기인한 내성은 *tet*(L) 유전자에 기인한 것으로 판단된다. 한편 총 6균주가 3개의 유전자 [*tet*(L) + *tet*(M) + *tet*(S)]를 동시에 보유하고 있었으며 30개의 균주가 *tet*(M) + *tet*(S), 16균주가 *tet*(L) + *tet*(M), 5개의 균주가 *tet*(L) + *tet*(S)두개의 유전자를 동시에 보유하고 있는 것으로 확인되어 내성에 관련된 유전자를 두개 이상 보유하고 있는 균주의 분포가 높은 것을 알 수 있었다. 본 실험 결과 원유시료에서 분리된 장구균의 경우 *E. faecalis*가 전체 분리 장구균의 81%로 다빈도로 분리되었으며 tetracycline에 대한 내성은 70%가 넘어 아직도 tetracycline에 대한 내성이 높은 것을 알 수 있었다. tetracycline에 대한 내성유전자 분석 결과는 전

체 내성 균주중 83% 가 *tet*(M)유전자를 보유한 것을 확인할 수 있었으며 이는 원유 시료 유래 장구균의 tetracycline 내성에 *tet*(M) 유전자가 가장 크게 기여함을 알 수 있었다. 본 연구는 우리나라 동물성 식품 유래 장구균의 tetracycline 내성 기전을 표현형 및 유전형 분석을 통해 분석하였다는 점에서 의미 있는 연구 결과로 판단된다. 특히 2011년 7월 이후 우리나라에서는 배합사료제조용 성장촉진용 항생제 사용을 전면금지 하였기에[21] 앞으로 내성균주의 비율 및 내성 유전자형의 분포에도 변화가 있을 것으로 판단되어 지속적인 모니터링 작업이 이루어 져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 삼육대학교 교비 연구비 지원에 의해 진행되었으며 이에 감사드립니다

요 약

동물성 식품 유래 장구균의 항생제 내성은 내성균주 또는 내성 유전자가 먹이사슬을 통해 인체로 전달될 수 있다는 가능성 때문에 공중보건학적으로 중요하게 대두되고 있다. 본 연구는 원유 시료에서 분리된 장구균의 tetracycline에 대한 내성을 표현형 및 유전형 수준에서 분석하였다. 원유 시료에서 총 245주의 장구균을 분리하였으며 그 중 *E. faecalis* 가 199주로 전체의 81.2%를 차지 하였으며 그 외에 *E. faecium* 이 25주(10.2%), *E. avium* 이 7주(2.9%), *E. durans* 이 6주(2.5%), *E. gallinarum* 이 4주(1.6%), *E. raffinosus* 이 4주(1.6%)의 비율로 분리되었다. 분리 균주중 76.3%에 해당하는 187주가 tetracycline에 내성을 나타내었으며 내성균주의 83.4%에 해당하는 156주가 *tet*(M)을 26.7%에 해당하는 50주가 *tet*(S)를 16.1%에 해당하는 30주가 *tet*(L)을 3.2%에 해당하는 6주가 *tet*(M) + *tet*(L) + *tet*(S)의 3개의 유전자를 동시에 소유하고 있는 것으로 분석되었다.

참고문헌

1. Devriese, L.A., Collins, M.D. and Wirt, R.: The genus Enterococcus. In: Ballows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H., (Eds.) The Prokaryotes, 2nded., vol. 2, pp. 1465-1478 (1992), Springer-Verlag. New York.
2. Flahaut, S., Boutibonnes, P. and Auffray, Y.: Les enterocoques dans I'environnement proche de I'homme. Canad. J. Microbio. **43**, 699-708 (1997).
3. Malani, P.N., Kauffman, C.A. and Zervos, M.J: Enterococcal disease, epidemiology and treatment. In: Gilmore, M. S. (Ed.) The Enterococci: pathogenesis, molecular biology and antimicrobiotic resistance. PP. 385-408 (2002). Amercan Society for Mcirobiology. Washington, DC
4. Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè, I. and Sechi L.A.: Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 291-304 (2003).
5. NORM. NORM-VET: Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway, pp. 1-72 (2003).
6. OIE. European Scientific Conference: The use of antibiotics in animal ensuring the protection of public health. pp. 8-142 (2001).
7. Sørensen, T.L., Blom, M., Monnet, D.L., Frimodt-Møller, N., Poulsen, R.L. and Espersen, F.: Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. *N. Engl. J. Med*. **345**, 1161-1166 (2001).
8. Witte, W., Klare, I. and Werner, G.: Selective pressure by antibiotics as feed additives. *Infection*. **29**, suppl2, S35-38 (1999).
9. Lim, S.K., Lee, H.S., Byun, J.R., Park, S.Y. and Jung, S.C.: Antimicrobial resistance of commensal bacteria isolated from food-producing animals 1. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and Enterococcus spp. isolated from cattle fecal samples. *Kor. J. Vet. Pub. Health*. **31(1)**, 21-29 (2007).
10. Kim, A.R., Cho, Y.M., Lim, S.K., Her, M., Jeong, W.S., Jung, S.C. and Kwon, J.H.: Antimicrobial resistance of commensal bacteria isolated from food-producing animals 3. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and Enterococcus spp. isolated from chicken fecal samples. *Kor. J. Vet. Pub. Health*. **31(1)**, 41-49 (2007).
11. Roberts, M.C.: Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol*. *Rev.* **19(1)**, 1-24 (1996).
12. Chopra, I. and Roberts, M.C.: Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65(2)**, 232-260 (2001).
13. Huys, G., D'Haene, K., Collard, J.M. and Swings, J.: Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in Enterococcus isolates from food. *Appl. Environ. Microbiol*. **70**, 1555-1562 (2004).
14. Aarestrup, F.M., Hasman, H., Jensen, L.B., Moreno, M., Herrero, I.A., Domínguez, L., Finn, M. and Franklin, A.: Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Appl. Environ. Microbiol*. **68**, 4127-4129 (2002).
15. Barbosa, J., Ferreira, P. and Teixeira, P.: Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food. Micorbiol*. **26**, 527-532 (2009).
16. Hershberger, E., Oprea, S.F., Donabedian, S.M., Perri, M., Bozigar, P., Bartlett, P. and Zervos, M.J.: Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *J. Antimicrob. Chemother*. **55**, 127-130 (2005).
17. Nam, H.M., Lim, S.K., Moon, J.S., Kang, H.M., Kim, J.M., Jang, K. C., Kim, J.M., Kang, M.I., Joo, Y.S. and Jung, S.C.:

Antimicrobial resistance of enterococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. *Zoonoses Public Health.* **57**(7-8):e59-64 (2010)

18. CLSI.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. ASM press, Washington DC, USA. (2007)
19. Kim, C.M., Kang, S.J., Lee, B.J., Lee, S.J. and Yuk, D.S.: Prevalence and molecular characterization of tetracycline-resistant *Enterococcus* isolates from live stock. *Kor. J. Vet. Serv.* **33**(2) 143-149 (2010).
20. Jeong, K.O., Heo, J.H., Lee, J.M., Yun, I.R., Choi Y.J. and Kim, J.S.: Surveillance of antimicrobial resistance ratio of *E. coli* and *Enterococcus* spp. isolated from fecal and carcasses of pigs in slaughterhouse. *Kor. J. Vet. Serv.* **33(3)**, 241-248 (2010).
21. Korea Animal Health Products Association, http://www.kahpa.or.kr/