pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 2, pp. 180~187 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.2.180

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

광주지역 유통·판매 소고기에서 분리된 병원성대장균의 항생제 내성 및 유전적 특성조사

이민규* · 이향희 · 정혜진 · 조선주 · 정소향 · 서유진 · 조배식 · 정재근 · 서정미
광주광역시보건환경연구원

Antimicrobial Resistance and Genetic Characterization of Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Distribution Beef in Gwangju

Min Gyou Lee*, Hyang Hee Lee, Hye Jin Jeong, Sun Ju Cho, So Hyang Jeong, Yu Jin Seo, Bae Sik Cho, Jea Keun Chung, Jung Mi Seo
Health and Environment Research Institute of Gwangju, Gwangju, Korea

(Received March 19, 2021/Revised April 8, 2021/Accetped April 18, 2021)

ABSTRACT - This study aims at investigating occurrence of pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*) associated with high rate of food poisoning in beef samples collected from markets in Gwangju, and the antimicrobial resistance and genetic characterization of the isolated strains. Pathogenic *E. coli* was detected in 82 (24.4%) of 335 beef samples, and 102 strains were isolated. Of 102 strains, 66 were identified as enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and 11 strains harbored both pathogenic genes of EHEC and EPEC. In antimicrobial susceptibility test, 30 strains were resistant to more than 1 antimicrobial. The most frequent antimicrobial resistance observed in the isolated *E. coli* was to tetracycline, followed by ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole, and chloramphenicol. Serotyping of isolated *E. coli* identified serogroups as O26, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O128 and O145. Therefore, we suggest that hygienic management of cooking utensils and sufficient cooking are needed so as not to cause cross-contamination when cooking beef.

Key words: *Escherichia coli*, Beef, Antimicrobial resistance, Genetic characterization

대장균은 사람과 온혈동물의 장내 정상균으로 비타민, 니코틴산의 합성과 단백질, 아미노산을 분해하여 아민, 암모니아 등을 생산하는 정상적인 생리기능 유지 역할을 하고 있고, 위생상태 지표균으로 인식되었다. 하지만 일부 특이한 혈청형은 유아에게 설사를 일으키고, 급성위장염을 일으키는 것으로 알려져 있고, 이를 병원성대장균이라 한다[1-3]. 병원성대장균은 독소, 임상증상 및 항원적 특성에 따라 장출혈성대장균(Enterohemorrhagic *Escherichia coli,* EHEC), 장흡착성대장균(Enteroaggregative *Escherichia coli,* EAEC), 장독소성대장균(Enterotoxigenic *Escherichia coli,* ETEC), 장병원성대장균(Enteropathogenic *Escherichia coli,* EPEC), 장침입성대장균(Enteroinvasive *Escherichia coli,* EIEC) 등이 있다[4,5]. 장출혈성대장균은 verotoxin, intimin (*eae* gene), enterohemolysin (*ehxA* gene), autoagglutinating, adhesin (*saa* gene) 등의 병원성 인자를 만들고 이 중 verotoxin은 대장의 점막세포를 사멸시켜 출혈성 장염을 일으키며, VT1 (Stx1), VT2 (Stx2)가 있다[6,7].

병원성대장균 등 세균에 의한 대부분의 감염질환은 항생제를 이용하여 치료하고 있다[8]. 또한 가축의 질병 치료 및 예방과 사료 효율 증가를 위해 항생제를 사용하고 있다. 하지만 항생제 남용으로 인해 여러 항생제에 내성을 나타내는 다제 내성균이 나타나게 되어 사람 및 동물의 건강에 위협을 주고 있다[9].

2004년부터 2014년까지 미국에서 병원성대장균에 의한 식중독은 매년 21-39건이 발생하였으며, 환자수는 매년 적게는 272명, 많게는 950명까지 발생하였다. 일본에서도 2007년부터 2016년까지 매년 적게는 2,242명, 많게는 3,083

*Correspondence to: Min Gyou Lee, Health and Environment Research Institute of Gwangju, Gwangju 61954, Korea
Tel: +82-62-613-6662, Fax: +82-62-613-7567
E-mail: foodstylish@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

명이 꾸준히 장출혈성대장균에 감염되어 식중독 증상을 나타내었다. 원인식품으로는 충분히 조리되지 않은 소고기, 간 소고기, 시금치, 새싹채소, 절임배추 등 육류와 채소류로 알려져 있다[10-12].

국내의 경우 식품의약품안전처 자료에 따르면, 2003년부터 2018년까지 원인이 밝혀진 식중독중 병원성대장균에 의한 식중독발생환자비율이 31.8%로 가장 높은 비율을 차지하고 있다. 또한, 병원성대장균을 원인으로 하는 식중독 발생환자비율은 매년 22.6-48.8%로 꾸준히 나타나고 있다[13]. 병원성대장균에 의한 식중독의 원인 식품은 채소류 29%, 육류 14%, 그리고 지하수가 8%를 차지하고 있다[14]. 2004년부터 2016년까지 채소류 소비량은 큰 변화가 없는 데 반해, 육류의 소비량은 꾸준하게 증가하고 있고 2016년 소비량은 2004년에 비해 1.7배 증가하였다[15]. 육류소비량이 증가함에 따라 관련 식품의 식중독 발생 또한 증가할 것으로 예상된다.

매년 전국 축산물 유래 세균의 항생제 내성을 조사하기 위한 대장균 오염도를 서울·경기, 충청, 경상, 전라, 강원으로 지역을 구분하여 확인하고 있지만[16], 소고기에서 분리된 대장균의 병원성 및 유전적 특성 등에 대한 조사는 미비한 실정이다. 이에 광주지역 유통·판매 소고기에서 분리된 병원성대장균의 현황을 파악하고, 분리된 균주를 대상으로 식중독 발생 시 임상 증상을 일으키는 대표적인 혈청형의 보유 여부 및 항생제 내성을 시험하여 안전성 확인 및 식중독 발생 예방을 위한 기초자료로 활용하고자 연구를 수행하였다.

Materials and Methods

시료수집

2018년 12월부터 2020년 2월까지 총 30회에 걸쳐 광주광역시에서 유통·판매되고 있는 소고기 335건을 대형마트, 재래시장 및 식육 전문점에서 구입하였다. 검사대상 소고기는 모두 국내산으로 바로 섭취할 수 있는 생식용을 제외한 구이용, 조림용 그리고 분쇄육 등이었고, 구매 후 즉시 냉장상태로 운반하여 4시간 이내에 시험하였다.

병원성대장균 증균 및 분리배양

병원성대장균은 식중독 원인조사 시험법[17]과 식품공전[18]에 따라 시험하였다. 시료 25 g에 증균배지 tryptone soy broth (OXOID, Basingstoke, UK) 225 mL를 가하여 stomacher (ES/Masticator, IUL S.A, Barcelona, Spain)를 이용하여 균질화하고, 36°C에서 18-24시간 배양하였다. 배양 후 EZ1 Virus Mini kit v2.0 (QIAGEN, Helden, Germany)과 EZ1 Advanced (EZ-1 Advanved XL. QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 유전자를 추출하고, PowerChek™ 20 Pathogen Multiplex PCR kit (Kogenebiotech, Seoul, Korea)를 사용해서 Real-time PCR (7500 fast real time PCR system, AB, Marsiling, Singapore)을 수행하였다. PCR 반응 조건은 50°C에서 2분 후, 95°C 10분 반응시키고, 95°C 15초, 60°C 1분을 1 cycle로 40 cycle 반응시켰다. 시험결과 병원성대장균 유전자가 확인된 시료의 배양액을 Brilliance E. Coli/Coliform Medium (OXOID, Basingstoke, UK)에 접종하여 36°C에서 18-24시간 배양 후 전형적인 집락을 선별하여 tryptone soy agar (OXOID, Basingstoke, UK)에 계대 후 36°C에서 18-24시간 배양하였다. 배양한 균은 VITEK 2 (VITEK 2 compact, Biomerieux, NC, USA)를 이용하여 생화학 시험을 수행하였다.

병원성대장균 유전적 특성 분석

증류수 1 mL에 병원성대장균으로 분리된 균 적당량을 부유시켜 100°C에서 10분 처리한 후 14,000 rpm에서 3분간 원심분리하고 상층액을 시험에 사용하였다. E. coli detection kit (GeNet Bio, Seoul, Korea)를 사용해서 PCR (Veriti, AB, Marsiling, Singapore)을 수행하였다. PCR 반응 조건은 분석 kit의 제조사 시험법에 따라 50°C에서 3분 후, 95°C 10분 반응시키고, 95°C 30초, 68°C 45초를 1 cycle로 하여 35 cycle 반응시켰다. 최종 extension은 72°C에서 5분 반응시키고, 증폭된 유전자는 QIAxcel (QIAxcel advanced, QIAGEN, Hilden, Germany)을 사용하여 전기영동하여 병원성대장균 유전자를 확인하였다.

항생제 내성 특성 조사

분리된 병원성대장균을 VITEK 2, AST-N169 card (Biomerieux, NC, USA)를 사용하여 항생제 내성 특성을 조사하였다. 분리한 균주를 분석기기의 매뉴얼에 따라 tryptone soy agar에서 36°C, 18-24시간 배양한 후 0.45% saline 3 mL에 부유시켜 MacFarland 0.6으로 조정하고, 조정한 액 145 μL를 0.45% saline 3 mL에 주입하고 균질화하여 시험하였다. 그리고 액체배지 미량희석법으로 항생제가 농도별로 coating된 sensititre (Thermo scientific, East Grinstead, UK) plate 3종(KRCDC2F, GN2F, CMV1AMAF)을 사용하여 항생제 내성을 교차 검증하였다. 분리한 균주를 제조사의 매뉴얼에 따라 tryptone soy agar에서 36°C, 18-24시간 배양한 후 0.45% saline 3 mL에 부유시켜 MacFarland 0.5로 조정하고, 조정한 액 10 μL를 Mueller-Hinton Broth (Thermo scientific, Denver, CO, USA) 11 mL에 주입하고 균질화하여 sensititre에 50 μL씩 분주하였다. 투명필름으로 sealing 후 34-36°C에서 18-24시간 배양 후 항생제별 MIC (minimum inhibitory concentration)를 판정하였다. 조사한 항생제는 17종이었으며 ampicillin (AM), amoxicillin/clavulanic acid (AMC), ampicillin/sulbactam (SAM), cefalotin (CF), cefazolin (CZ), cefotefan (CTT), cefoxitin (FOX), cefotaxime (CTX), ceftriaxone

(CRO), imipenem (IPM), amikacin (AN), gentamicin (GM), nalidixic acid (NA), ciprofloxacin (CIP), tetracycline (TC), chloramphenicol (C), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)이었다. 실험결과는 clinical and laboratory standards institute (CLSI M100-ED29)에[23] 따라 판정하였다.

혈청형 확인

혈청형은 O항원 응집반응과 PCR법으로 확인하였다. 임상 증상을 나타내어 인체에서 분리빈도가 높은 병원성대장균 항혈청 11종(O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O128, O121, O145, O157)에 대하여 혈청형을 확인하였다. O항원 응집반응은 분리한 균을 0.85% 생리식염수에 균질화한 후 100°C에서 1시간 열처리하여 12,000 rpm에서 3분 원심분리하였다. 상층액은 버리고 원심 침사에 생리식염수 0.5 mL를 넣고 재부유시킨 후 slide glass에 항혈청(Joongkyom, Goyang, Korea) 1방울과 재부유액 20 μL를 떨어뜨려 응집반응을 확인하였다. 1분 이내에 응집반응이 나타나는 검체만 양성으로 판독하였다.

PCR법은 O26, O91, O111, O113, O121, O128, O145, O157의 혈청형에 대해 *rfb* (o-specific polysaccharide), *wzx* (o-unit flippase), *wbsD* (aminotransferase)의 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 사용하였다(Table 1). PCR 반응액은 1 U *Taq* polymerase, 250 μM 각 dNTPs, 10 mM Tris-HCl, 30 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$가 포함된 reaction buffer (AccuPower PCR Premix, Bioneer, Deajeon, Korea)에 10 pmol의 primer와 순수 분리된 단일 colony를 100°C에서 15분 열처리하고 13,000 rpm에서 3분 원심분리한 상등액을 template로 하여 최종 반응액을 20 μL로 하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 5분 후, 94°C 30초, 55°C 75초를 1 cycle로 하여 35 cycle 반응하였고, 최종 extension은 68°C 7분 반응시켰다. 증폭된 DNA는 QIAxcel을 이용하여 전기영동 후 확인하였다.

국가병원체자원은행에서 관련 균주 10종(NCCP15739, NCCP14020, NCCP15956, NCCP13581, NCCP12551, NCCP15954, NCCP15957, NCCP13997, NCCP15955, NCCP12555)을 제공받아 시험법 및 항혈청 검증에 사용하였다.

Result and Discussion

병원성대장균 분리 현황 및 유전적 특성

광주지역에서 유통·판매되고 있는 소고기 335건 중 82건(24.4%)에서 병원성대장균이 검출되었고, 분리된 균주는 102균주였다. 이전 연구인 Cho 등[24]의 분리율인 6.8%에 비해 높은 분리율을 나타내었다. EHEC는 58건(17.3%)의 시료에서 66균주가 분리되어 가장 높은 비중을 차지하였다. Kim 등[25]의 연구에서 EHEC 분리율 5.4%와 Pandal 등[26]의 조사에서 분리율이 4.0%인 것에 비해 높은 분리율을 보였다.

Oh 등[27]의 식육처리 단계별 미생물 오염에 대한 연구에서는 식육의 처리과정 중 세척과정에서 오염원이 완전히 제거되지 못하거나 작업장의 환경, 작업자의 위생상태에 따라 오염가능성이 있고, 특히 운송 및 준비과정에서 2차 오염 가능성이 높다고 하였다. 또한, 도살 후 도체 표면에 존재하는 대부분의 미생물은 각종기구에 의해 오염된다고 하였다. 그리고 Cho 등[28]의 축산물 판매장의 제조환경에 대한 연구결과 HACCP 적용 업체와 비적용 업체 간 식육 및 각종기구들이 위생적으로 차이가 있었다. 이와 같이 각 작업장의 특성 및 환경에 따라 오염이 발생할 수 있고, 가공 단계가 많아질수록 미생물 오염 발생 가능성이 높아진

Table 1. Oligonucleotide primers used for various *E. coli* serogroups

Pathogen	Target gene	Primer (5'-3')	Aplicon size (bp)	Reference
O157	*rfbE*	CGGACATCCATGTGATATGG TTGCCTATGTACAGCTAATCC	259	Valadez et al.[19]
O26	*wzx*	GCGCTGCAATTGCTTATGTA TTTCCCCGCAATTTATTCAG	241	Valadez et al.[19]
O145	*wzx*	TGCTCGACTTTACCATCAAC AACCAACACCATACACCTTGTCTT	374	Paddock et al.[20]
O113	*wzx*	GGGTTAGATGGAGCGCTATTGAGA AGGTCACCCTCTGAATTATGGCAG	771	DebRoy et al.[21]
O91	*wbsD*	GATGAATCAACCTTATCGAG CTGCTTATGTATAGGAATTGG	940	Valadez et al.[19]
O128	*wzx*	TCTTGCTTATAGCCAGAATT AATAAACCGACACCGAAA	1,353	Lee et al.[22]
O111	*rfb*	TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC ATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC	451	Valadez et al.[19]
O121	*wzx*	TCATTAGCGGTAGCGAAAGG TTCTGCATCACCAGTCCAGA	587	Paddock et al.[20]

Table 2. Genetic characterization of pathogenic *E. coli* isolated from beef

Classes of pathogenic *E. coli*	No. of strains	Virulence gene	No. of strains
EHEC	66	VT1	9
		VT2	39
		VT1,VT2	18
ETEC	13	Stp	13
EPEC	12	eaeA	12
EHEC,EPEC	5	VT1,eaeA	1
		VT2,eaeA	4
EHEC,ETEC	4	VT2,Stp	4
EPEC,ETEC	2	eaeA,Stp	2

다[29]. 따라서 식육의 처리 과정이 많은 분쇄육 및 절단육 등 시료의 종류와 미생물 번식이 쉬운 하절기나 유통과정 시 온도관리에 소홀할 수 있는 동절기 등 시료수거 시기, 직접 가공하여 판매하는 판매처와 위탁 가공하여 판매만 하는 판매처 등의 판매 장소에 따라 병원성대장균의 오염도에 차이가 있을 것이다. 기존의 연구들에 비해 검출률이 높은 것은 기존 연구들은 병원성균의 분리를 검체 증균 후 선택배지에 접종하여 전형적인 집락을 선별하여 생화학적 동정 및 병원성 유전자를 확인하였지만, 본 연구에서는 식중독 원인조사 시험법에 따라 검체 증균 후 유전자를 추출하여 real-time PCR kit를 활용하여 병원성균의 유무를 확인하고 병원성균이 확인된 검체만 다수의 선택배지에 접종하여 선별한 다음 전형적인 집락의 균을 모두 분리하여 병원성 유전자를 검사하는 방법으로 분리 방법 차이 등에 따라 검출률이 차이가 나는 것으로 사료된다.

분리된 균주의 독소유전자를 확인한 결과 Table 2와 같았다. 특히 EHEC의 66균주 중 VT2 유전자가 39균주에서 확인되어 가장 높은 비중을 차지하였다. EHEC 외에 ETEC 13균주, EPEC 12균주 그리고 두 가지가 동시에 분리된 균주로는 EHEC와 EPEC 5균주, EHEC와 ETEC 4균주, EPEC와 ETEC 2균주였다. 높은 비율로 검출된 VT 유전자와 관련된 verocytotoxin은 장, 신장의 혈관 내피세포를 손상시켜 병증을 유발하는 것으로 알려져 있어[30] VT 유전자가 높은 비율로 검출된 것은 임상에서 병원성을 나타낼 수 있는 위험성을 가지고 있다고 할 수 있다. 하지만, Jenkins 등[31]은 증상이 없는 병원성대장균에 감염된 환자의 검체에서 Stx (VT) 유전자는 검출되었지만 *eae*와 *saa* 유전자가 검출되지 않았고, 따라서 *eae*와 *saa* 유전자가 병원성 발현에 중요한 역할을 할 가능성이 높다고 하였다. 또한, Paton 등[32]도 병원성 발현여부를 확인할 수 있는 유전인자로 *eae, ehxA,* 그리고 *saa*가 있다고 하였다. 위와 같은 연구자료를 종합하여 볼 때, 조사결과 VT 유전자가 높게 검출되어 식중독발생가능성이 높다고 할 수 있지만, 식중독 임상증상 발현 여부는 추가적인 유전적 검사가 필요하다.

항생제 내성 특성

102균주의 항생제 17종에 대한 항생제 내성 시험 결과는 Table 3과 Table 4에 나타내었다. VITEK 2를 이용해 시험한 결과, 30균주(29.4%)는 17종의 항생제 중 한 개 이상의 항생제에 내성을 가지고 있는 반면, 나머지 72균주는 모든 항생제에 감수성을 나타내었다. 항생제별 내성을 확인한 결과, tetracycline에 내성을 나타내는 균주가 27균주(26.5%)로 가장 많았다. ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole, chloramphenicol에 각각 7균주(6.9%), 7균주(6.9%), 5균주(4.9%)가 내성을 보였다. 이 외에 nalidixic acid, ampicillin/sulbactam, ciprofloxacin 등에 내성이 있는 균주도 확인되었다. 12균주(11.8%)가 2제 이상의 항생제에서 내성을 가진 다제 내성균이었다. Sensititre를 이용하여 시험한 결과, tetracycline에 27균주(26.5%)가 내성을 보였으며, ampicillin, nalidixic acid, trimethoprim/sulfamethoxazole에 각각 9균주(8.8%), 9균주(8.8%), 7균주(6.9%)가 내성을 보였다. 이 외에 chloramphenicol, cefoxitin, ciprofloxacin 등에 내성이 있는 균주도 확인되었다. 16균주(15.6%)가 다제 내성균으로 나타났다. 항생제 내성을 가진 균주 중 한 가지 항생제만 내성을 가진 균주가 가장 많았고, 2제 내성, 3제 내성이 다음으로 많았으며, 7제 내성균도 1균주 확인되었다. VITEK 2와 sensititre를 이용한 시험법 간의 항생제 내성 시험 결과는 유사하였다. 2019년 국가항생제 사용 및 내성 모니터링 자료에 따르면 조사한 소고기에서 분리한 대장균 중 74.2%가 16종의 항생제에 모두 감수성을 나타내어 이번 조사와 비슷하였고,

Table 3. Antimicrobial resistance of *E. coli* strains isolated from beef

Antimicrobials	No. of resistant strains (%)	
	Vitek 2	Sensititre
Ampicillin (AM)	7 (6.9)	9 (8.8)
Amoxicillin/Clavulanic acid (AMC)	0 (0.0)	0 (0.0)
Ampicillin/Sulbactam (SAM)	3 (2.9)	0 (0.0)
Cefalotin (CF)	1 (1.0)	0 (0.0)
Cefazolin (CZ)	1 (1.0)	1 (1.0)
Cefotetan (CTT)	0 (0.0)	0 (0.0)
Cepoxitin (FOX)	1 (1.0)	4 (3.9)
Cefotaxime (CTX)	1 (1.0)	1 (1.0)
Ceftriaxone (CRO)	1 (1.0)	0 (0.0)
Imipenem (IPM)	0 (0.0)	0 (0.0)
Amikacin (AN)	0 (0.0)	0 (0.0)
Gentamicin (GM)	0 (0.0)	0 (0.0)
Nalidixic acid (NA)	3 (2.9)	9 (8.8)
Ciprofloxacin (CIP)	2 (2.0)	3 (2.9)
Tetracycline (TC)	27 (26.5)	27 (26.5)
Chloramphenicol (C)	5 (4.9)	4 (3.9)
Trimethoprim/sulfamethoxazole (STX)	7 (6.9)	7 (6.9)

Table 4. Antimicrobial resistance patterns of pathogenic *E. coli* isolates from beef

No. of antimicorobials	Resistance patterns	No. of strains (%)	
		VITEK 2	Sensititre
0		72 (70.5)	71 (69.6)
1	TC	16 (15.7)	13 (12.6)
	NA	1 (1.0)	1 (1.0)
	AM	1 (1.0)	1 (1.0)
2	TC-C	2 (1.9)	2 (1.9)
	TC-CZ	1 (1.0)	1 (1.0)
	TC-SXT	1 (1.0)	N.D
	TC-NA	N.D	1 (1.0)
	TC-AM	N.D	1 (1.0)
	NA-CIP	N.D	1 (1.0)
3	TC-SXT-AM	2 (1.9)	3 (2.9)
	TC-AM-SAM	1 (1.0)	N.D
	NA-C-CIP	1 (1.0)	N.D
	TC-NA-AM	N.D	1 (1.0)
	TC-NA-FOX	N.D	1 (1.0)
	NA-FOX-CIP	N.D	1 (1.0)
4	TC-AM-SXT-SAM	1 (1.0)	N.D
	TC-AM-C-SXT	1 (1.0)	1 (1.0)
5	TC-SXT-NA-FOX-CTX	N.D	1 (1.0)
	TC-SXT-NA-AM-FOX	N.D	1 (1.0)
6	TC-SXT-CF-CTX-CRO-FOX	1 (1.0)	N.D
	TC-SXT-NA-AM-C-CIP	N.D	1 (1.0)
7	TC-SXT-NA-AM-C-CIP-SAM	1 (1.0)	N.D

N.D: Not Detected.

tetracycline, chloramphenicol, ampicillin, nalidixic acid, trimethoprim/sulfamethoxazole의 순으로 높은 내성률을 나타낸 것도 동일하였다[16]. 하지만 Kim 등[33-35]의 항생제 내성검사 결과 중 일부 항생제는 본 조사의 내성률과 차이가 있었다. 특히 tetracycline 내성률은 Kim 등[33,34]의 유통되는 소고기에서 분리한 대장균의 항생제 내성에 대한 결과에서 각각 85.3%, 70.7%이었고, Chea 등[35]의 소의 분변 및 도체에서 분리된 대장균의 특성 연구에서는 66.0%의 내성률을 보였다. 이는 사료첨가용 항생제 사용 금지(2011년) 및 수의사처방제(2013년)가 도입되기 전의 조사 결과로 내성률에 차이가 발생한 것으로 보인다. Ampicillin, chloramphenicol에 대한 내성률의 차이 또한 사료첨가용 항생제 사용금지와 항생제 사용량 감소와 관련 있는 것으로 사료된다. 이는 2010년 이후부터 관련 항생제의 내성률이 감소하고 있다는 농림축산식품부의 조사 자료와 유사한 결과이다[16].

Aminoglycosides 계열의 항생제 amikacin, gentamicin과 β-lactams 계열의 imipenem, β-lactams/β-lactamse inhibitors 계열의 amoxicillin/clavulanic acid, cephalosporins 계열의 2세대 항생제 cefotetan, 3세대 항생제 cefotaxime은 모든 균주에 감수성이 있었고, cephalosporins 계열의 1세대 항생제 cefalotin, cefazolin와 3세대 항생제 cefotaxime, ceftriaxone은 1균주에서만 내성을 나타내었다.

소고기는 돼지고기, 닭고기에 비해 항생제 내성률이 낮은데, 이는 항생제 사용 방법과 사육환경이 다르기 때문이다. 소는 다른 가축과 다르게 질병 진단을 개별적으로 하고 질병이 발생한 소에게만 주사제와 같은 방법을 통해 직접 투여하는 반면, 돼지나 닭은 집단적으로 질병을 진단하고, 사료나 물에 항생제를 같이 처방하여 치료 및 예방하는 방법을 사용하기 때문이다. 또한 소의 사육밀도가 낮아 돼지나 닭에 비해 스트레스를 적게 받고, 질병의 전염 및 발생도 적기 때문에 항생제 사용빈도 또한 낮아 내성률도 낮은 것으로 사료된다[36,37]. WHO (World health organization)에서는 사람의 질병 치료 사용여부와 치료를 위한 대체 항생제의 유무에 따라서 항생제 관리 우선순위를 분류하고 있다[38]. 그 중 가장 우선 관리하여야 하는 항생제(critically important antimicrobials) 중에는 ceftriaxone, ciprofloxacin 등이 포함되어 있다. 이번 연구에서는 ceftriaxone, ciprofloxacin 항생제에 내성을 가진 균주가 각각 1건, 2건 확인되었다. 소고기는 돼지고기, 닭고기보다 상대적으로 낮은 항생제 내성률을 나타내지만, 질병치료에 중요한 항생제의 관리를 위해 지속적인 항생제 내성

Table 5. O serotyping of pathogenic *E. coli* isolated from beef

O serogroup	Antisera method		PCR method	
	No. of detected	Pathogroup (No.)	No. of detected	Pathogroup (No.)
O26	2	EHEC (1), EPE C(1)	2	EHEC (1), EPEC (1)
O91	1	EHEC (1)	3	EHEC (3)
O111	1	EHEC (1)	N.D	
O113	4	EHEC (3), EPEC (1)	4	EHEC (4)
O121	1	ETEC (1)	1	ETEC (1)
O128	3	EHEC (2), ETEC (1)	2	EHEC (1), ETEC (1)
O145	1	ETEC (1)	N.D	
O157	N.D		N.D	
O103	1	EHEC (1)	Not test	
O104	1	EHEC (1)	Not test	
O45	N.D	-	Not test	

N.D: Not Detected.

모니터링과 오남용 방지를 위한 홍보활동 병행 등 항생제 관리 정책의 지속적인 변화가 필요하다.

혈청형 확인

O항원 응집반응과 PCR법으로 확인한 혈청형은 Table 5에 나타내었다. 병원성대장균 102균주의 혈청형 11종(O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O128, O121, O145, O157)을 확인한 결과 18균주의 혈청형이 확인 되었으며, 84균주는 혈청형이 확인되지 않았다. 확인된 혈청형은 O113 5균주, O128 3균주, O91 3균주, O26 2균주, O103, O104, O111, O121, O145가 각각 1균주씩 확인되었다. 그 외의 O157, O45는 확인되지 않았다. PCR을 이용하여 8종(O26, O91, O111, O113, O121, O128, O145, O157)의 혈청형을 확인한 결과 O항원 응집반응에서 확인되지 않은 3균주가 O91(2균주), O113(1균주)로 확인되었고, 이 외의 혈청형은 O항원 응집반응으로 확인한 결과와 같거나 일부는 확인되지 않았다.

미국, 유럽 그리고 국내의 병원성대장균 식중독 임상증상을 나타낸 인체 분리 병원성대장균의 혈청형 중 식중독 발생 가능성이 높은 혈청형 11종(O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O128, O121, O145, O157)을 확인한 결과 18균주(17.6%)에서 9종의 혈청형이 확인되었다[39-41]. 미국 및 유럽 질병통제예방센터의 자료에 의하면 병원성대장균 식중독발생 원인균의 혈청형은 O157이 가장 많았다. 2000년 이후부터는 O157에 의한 식중독발생률이 비슷하게 유지되고 있는 반면, non-O157은 꾸준히 증가하여 2013년 이후에는 오히려 O157 보다 발생률이 높게 나타나고 있다[39,40]. 이번 조사에서는 임상증상을 가장 많이 일으키는 혈청형인 O157은 확인되지 않았으며[39], O113은 5균주에서 확인되어 가장 높은 비율을 나타내었다. 이는 Pradel 등[26]의 연구에서도 O113이 높은 비율로 확인된 것과 유사한 결과를 나타내었다. 하지만 Kim 등[25]의 경인지역에서 유통되는 분쇄육을 대상으로 하는 연구에서는 O5가 높은 비율로 확인되었고, Cho 등[24]과 Kwak 등[42]의 국내유통 식육을 검사한 결과 O157과 O26이 확인되었다. 본 연구에서 높은 비율로 확인된 O113 병원성대장균 5균주 중 4균주가 검출된 시료의 판매처 및 구매시기가 동일하였다. 이는 가공과정 및 유통과정 중 오염원이 있었을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 광주지역 유통·판매 소고기에서 식중독을 일으킬 수 있는 병원성대장균의 현황 및 특성을 조사하였다. 그 결과 약 24.4%의 소고기에서 병원성대장균이 검출되었고, 분리된 균주를 대상으로 임상증상을 일으킬 가능성이 있는 독소유전자 및 혈청형을 확인하였다. 이와 같은 결과로 잠재적으로 소고기로 인한 식중독이 발생할 가능성이 있다고 볼 수 있지만, 모든 병원성대장균이 사람에게 임상증상을 나타내는 것은 아닌 것으로 알려져 있다. Park 등[43] 연구에서는 광주지역에서 집단 발병한 장출혈성대장균 감염증 양성자 77명 중 3명만 임상증상을 나타냈고, 나머지 양성자는 모두 무증상이었다. 이와 유사하게 2003년 경기도를 중심으로 발생한 식중독사고에서도 무증상 감염자가 많았다. 위의 연구결과와 같이 식중독 발생 가능성이 있는 병원균이 분리되고 독소유전자 및 혈청형이 확인 되었다 하더라도 임상증상 발현 여부는 확신할 수 없다. 따라서 O항원뿐만 아니라 H항원에 대한 확인과 임상증상 발현 유전자에 대한 연구가 추가로 필요하다. 그리고 미국질병통제예방센터의 자료에 따르면 임상증상이 빈번하게 발생하는 만 9세 미만의 아이들에게서 장출혈성대장균으로 인한 감염발생률이 높기 때문에[39] 특히 어린

이집, 유치원 등의 집단식중독 예방을 위해서는 조리 가공 시 교차오염이 발생되지 않도록 조리기구 등에 대한 위생적 관리와 충분히 가열하는 조리법을 활용하는 등의 노력이 필요하다. 또한 식중독 발생 원인식품과 항생제 오남용 방지를 위한 모니터링 사업을 꾸준히 시행하여야 할 것으로 보인다.

국문요약

본 연구는 광주광역시에 유통·판매되고 있는 소고기를 대상으로 식중독 발생 비율이 높은 병원성대장균의 검출 여부와 분리된 균주의 항생제 내성 및 유전적 특성을 조사하였다. 전체 335건의 소고기 중 82건에서 병원성대장균이 검출(24.4%)되었고 102개의 다양한 균주를 분리하였다. 분리균주의 병원성 유전자를 토대로 분류한 결과, EHEC가 66균주로 가장 많았고 EHEC와 EPEC 등 2가지 유전자가 동시에 검출된 균주도 11균주가 있었다. 분리된 균주의 항생제 내성 시험결과, 30균주는 1가지 이상의 항생제에 대하여 내성을 보였다. 그 중 tetracycline에 내성을 보이는 균주가 27균주로 가장 많았고 그 외에 ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole, chloramphenicol 등의 순으로 많았다. 분리된 균주의 혈청형 검사 결과, 혈청형은 O26, O91, O103, O104, ,O111, O113, O121, O128 및 O145로 확인되었다. 따라서 소고기의 조리 가공 시 교차오염이 발생하지 않도록 조리기구 등에 대한 위생적 관리와 충분한 조리 등의 식중독 예방을 위한 주의가 필요할 것으로 생각된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interests.

ORCID

Min Gyou Lee https://orcid.org/0000-0002-4138-4261
Hyang Hee Lee https://orcid.org/0000-0002-4791-7989
Hye Jin Jeong https://orcid.org/0000-0002-0070-0731
Sun Ju Cho https://orcid.org/0000-0002-2712-0753
So Hyang Jeong https://orcid.org/0000-0001-9233-9391
Yu Jin Seo https://orcid.org/0000-0001-9690-2698
Bae Sik Cho https://orcid.org/0000-0002-1903-3254
Jea Keun Chung https://orcid.org/0000-0003-2968-834x
Jung Mi Seo https://orcid.org/0000-0002-6890-8061

References

1. Madigan, M.T., Martinko J.M., Parker, J., 2000. Brock biology of microorganisms. 9th ed, Prentice-hall, NJ, USA, pp. 986-987.
2. Kim, M.S., Kim, O.M., Kim, I.K., Lee, K.I., Lee, S.H., Lee, J.G., Lim, S.M., 2002. Food hygienics, Hoonminsa, Seoul, Korea, pp. 62-107.
3. Ewing, W.H., 1986. Edwards and Ewing's identification of enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier Science Publish, NY, USA, pp. 181-318.
4. Paton, J.C., Paton, A.W., Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 450-479 (1998).
5. Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J., Harel, J., Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J. Clin. Microbiol*., **41**, 2113-2115 (2003).
6. Zweifel, C., Blanco, J.E., Blance, M., Blanco, J., Stephan, R., Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in switzerland. *Int. J. Food Microbiol*., **95**, 19-27 (2004).
7. U.S Food & Drug Administration, (2021, March 15). BAM Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Retrieved from https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4a-diarrheagenic-escherichia-coli
8. Yoo, Y.A., Kim, M.S., Kim, K.S., Park, S.H., Jumg, S.K., Antimicrobial resistance and implicated genes of *E. coli* isolated from commercial and cooked food in Seoul. *J. Food Hyg. Saf.,* **25**, 220-225 (2010).
9. Kim, S.H., Park, Y.H., (2021, April 19). Antimicrobial resistance and food safety. Retrieved from https://www.kores-cience.or.kr/article/JAKO200818259610202.pdf
10. Kim, D.M., Improvement of enrichment for the detection of pathogenic *Escherichia coli*. Master's thesis, Korea University, Seoul, Korea (2016).
11. National institute of infectious diseases (NIID), (2021, January 11). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection, as of April 2017, Japan. Retrieved from https://www.niid.go.jp/niid/en/865-iasr/7282-447te.html
12. Duffy, G., Cummins, E., Nally, P., O' Brien, S., Butler, F., A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *E.coli* O157:H7 on beef. *Meat Sci.*, **74**, 76-88 (2006).
13. Ministry of Food and Drug Safety, (2021, January, 11), Food poisoning statistics. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=3724&menu_grp=MENU_NEW02&menu_no=3724&menu_grp=MENU_NEW02
14. Ministry of Food and Drug Safety, (2021, January 11), Beware of food poisoning with pathogenic *E. coli* in summer. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/board/boardDetail.do?menu_no=2859&bbs_no=bbs082&ntctxt_no=1074833&menu_grp=MENU_NEW05
15. Korea Rural Economic Institute, 2019. 2018 Food balance sheet, Naju, Korea, pp. 24-151.
16. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2020. National antibiotic use and resistance monitoring, Sejong, Korea, pp. 97-106.
17. Ministry of Food and Drug Safety, 2020. Detection method

for foodborne pathogens investigation (2021). Osong, Korea, pp. 11-57.
18. Ministry of Food and Drug Safety, 2020. Korea food code (2020). Osong, Korea, pp. 263-328.
19. Valadez, A.M., Debroy, C., Dudley, E., Cutter, C.N., Multiplex PCR detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O157, O103, O91, O113, O145, O111 and O26 experimentally inoculated in beef carcass swabs, beef trim, and ground beef. *J. Food Prot.*, **74**, 228-239 (2011).
20. Paddock, Z., Shi, X., Bai, J., Nagaraja, T.G., Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145 and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces. *Vet. Microbiol.*, **156**, 381-388 (2012).
21. DebRoy, C., Roverts, E., Kundrat, J., Davis, M.A., Briggs, C.E., Fratamico, P.M., Detection of *Escherichia coli* serogroups O26 and O113 by PCR amplification of the *wzx* and *wzy* genes. *Appl. Environ. Microbiol.,* **70**, 1830-1832 (2004).
22. Lee, D.Y., Lee, J.Y., Wang, H.J., Shin, D.B., Cho, Y.S., Prevalence and classification of *Escherichia coli* isolated from bibimbap in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **47**, 126-131 (2015).
23. Clinical and Laboratory Standards Institute, (2021, March 15). CLSI M100-ED29:2019 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition. Retrieved from http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI M100 ED29:2019&sbssok=CLSI M100 ED29:2019 TABLE 2A
24. Cho, Y.S., Koo, M.S., Jang, H.J., Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from Fresh Beef, Pork, and Chicken Meat in Korean Markets. *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, **48**, 121-128 (2020).
25. Kim, H.Y., Kim, E.J., Park, Y.C., Cho, J.I., Lee, J.O., Prevalence and characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli*(EHEC) isolated from ground beefs distributed in Gyeong-In region. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **38**, 773-778 (2006).
26. Pandal, N., Livrelli, V., Champs, C., Palcoux, J.B., Reyanaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B., Forestier, C., Prevalence and characterization of shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children during a on year prospective study in france. *J. Clin. Microbiol*., **38**, 1023-1031 (2000).
27. Oh, Y.S., Lee, S.H., Hygienic quality of beef and distribution of pathogens during cut-meat processing. *J. Food Hyg. Saf.*, **16**, 96-102 (2001).
28. Cho, S.H., Beak, S.H., Ahn, J.H., Nam, I.S., A study on microbial management level of manufacturing environment, raw meat and products in HACCP implemented meat market. *Korean J. Org. Agric.*, **27**, 193-204 (2019).
29. Kim, S.Y., Quality control study of ground meat. Master's thesis, Inje University, Busan, Korea (2003).
30. Karmali, M.A., Gannon, V., Sargeant, J.M., Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet. Microbiol.*, **140**, 360-370 (2010).
31. Jenkens, C., Perry, N.T., Cheasty, T., Shaw, D.J., Frankel, G., Dougan, G., Gunn, G.J., Smith, H.R., Paton, A.W., Paton, J.C., Distribution of the *saa* gene in strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *J. Clin. Microbiol*., **41**, 1775-1778 (2003).
32. Paton, A.W., Paton, J.C., Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1, stx2, eae, ehxA, and saa*. *J. Clin. Microbiol*., **40**, 271-274 (2002).
33. Kim, H.T., Lee, W.W., Jung, K.T., Lee, S.M., Son, E.J., Lee, G.R., Kim, G.H., Lee, D.S., Lee, K.W., Study on antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from domestic beef on sale. *Korean J. Vet. Serv.*, **31**, 17-29 (2008).
34. Kim, H.T., Jung, K.T., Lee, D.S., Lee, K.W., Study on antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from domestic beef on sale (2). *Korean J. Vet. Serv.*, **32**, 93-102 (2009).
35. Chea, H.S., Kim, N.H., Han, H.J., Son, H.R., Kim, C.K., Kim, S.H., Lee, J.H., Kim, J.T., Characterization and isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from Bovine feces and carcass. *Korean J. Vet. Serv.*, **32**, 241-249 (2009).
36. Asai, T., Kojima, A., Harada, K., Ishihara, K., Takahashi, T., Tamura, Y., Correlation between the usage volume of veterinary therapeutic antimicrobials and resistance in *Escherichia coli* isolated from the feces of food-producing animals in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **58**, 369-372 (2005).
37. Lim, S.K., Nam, H.M., Moon, D.C., Jang, G.C., Jung, S.C., Korean veterinary antimicrobial resistance monitoring group., Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from healthy animals during 2010-2012. *Korean J. Vet. Res*., **54**, 131-137 (2014).
38. World Health Organization, 2011. Report of the 1st meeting of the WHO Advisory group on integrated surveillance of antimicrobial resistance, 2009. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 18-33.
39. Centers for Disease Control and Prevention, 2018 National Shiga toxin-producing *Escherichia* coli (STEC) surveillance annual report, 2016. US Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia, USA.
40. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, The European union one health 2018 zoonoses report, *EFSA J*., **17**, 5926 (2019).
41. Yun, Y.S., Kim, N.O., Hong, S.H., Chun, J.H., Hwang, K.J., The prevalence of pathogenic *Escherichia coli* isolated by the enteric pathogens active surveillance network (EnterNet), 2010-2019. Public Heath Weekly Report, **13**, 2867-2870 (2020).
42. Kwak, H.S., Cha, J., Kwang, K.J., Kim, H., Park, S.H., Kim, C.M., Characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from domestic foods. *J. Food Hyg. Saf.*, **15**, 241-247 (2000).
43. Park, S.H., Kim, S.H., Seo, J.J., Kee, H.Y., Kim, M.J., Seo, K.W., Lee, D.H., Choi, Y.H., Lim, D.J., Hur, Y.J., Cho, S.H., Lee, B.K., An outbreak of inapparent non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Korean J. Med*., **70**, 495-504 (2006).