J. Fd Hyg. Safety
Vol. 24, No. 4, pp. 373~377 (2009)

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

원유시료에서 분리한 장구균속 세균의 항생제 내성 양상

이혜인[1] · 이상진[1] · 최성숙[2]*
[1]삼육대학교 동물과학부, [2]삼육대학교 약학대학

Antimicrobial Resistance Patterns of *Enterococci* spp. Isolated from Raw Milk Samples

Hyeln Lee[1], SangJin Lee[1], and SungSook Choi[2]*
[1]*Division of Animal Science, Sahmyook University, Seoul 139-742, Republic of Korea,*
[2]*College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Republic of Korea*
(Received November 3, 2009/Revised November 22, 2009/Accepted November 25, 2009)

ABSTRACT - From April 2008 to January 2009, a total 458 raw milk samples were randomly collected from 15 stock raising farms located in northern area of Kyunggi province and cultured for the presence of *Enterococci* spp. A total 170 enterococcal isolates were recovered from the raw milk samples. *Enterococcus faecalis* was predominant species recovered (64.7%), followed by *E. faecium* (18.8%), *E. avium* (5.9%), *E. gallinarum* (5.9%) and *E. durans* (4.7%). Antimicrobial resistance patterns of 170 *Enterococci* spp. against ampicillin, erythromycin, tetracyclin, chloramphenicol, vancomycin, ciprofloxacin and streptomycin were tested. According to the result, they showed high level resistance to erythromycin and streptomycin (82,9% and 93,5% respectively), moderately resistance to ampicillin, chloramphenicol and tetracyclin (50%, 45.9% and 32%, respectively) but fortunately, vancomycin and ciprofloxacin are still effective against this species.

Key words: raw milk sample, *Enterococci* spp., antimicrobial resistance patterns

항생제는 사람과 동물 모두에게 질병을 치료하고 예방하기 위해서 또는 산업 동물의 성장 촉진의 목적으로 사용되고 있다[1,2]. 특히 국내 축산 분야에서 항생제는 성장 촉진의 목적으로 사용되어 생산성 향상 및 사료효율을 높여 사육 농가의 소득 증대등에 기여한 바가 크다. 그러나 항생제의 지속적인 사용은 내성균의 출현을 유도하며 내성의 문제는 사람뿐만 아니라 축산분야에서도 내성 증가로 인한 가축의 질병 치료의 어려움을 겪고 있고 내성균의 사람에게로의 전달가능성이 제기 되고 있어 공중보건학적으로 중요하게 대두되고 있다[3,4]. 이러한 문제를 해결하기 위한 방안의 하나로 2003년부터 국내에서는 축산용 항생제관리 시스템을 구축하고 지속적인 모니터링을 하고 있다[5-9]. 축산분야에서 사용되는 항생제는 주로 질병의 치료, 예방 및 성장 촉진등의 목적으로 사용되고 있으며 연간 약 1,400-1,500톤 정도가 사용되고 있는 것으로 조사되었다. 주로 사용되는 항생제로는 tetracycline 계열이 전체의 40-50% 정도를 차지하며 그 외에 설파제, penicillin, aminoglycoside 계 및 macrolide 계 항생제들이 사용되고 있다[10,11]. 장구균의 경우 여러 계열의 항생제에 내성을 나타냄이 보고되었으며[12-14], 특히 최근에는 식육제품, 유제품 및 take-out 식품등에서 항생제 내성 장구균이 분리되고 있음이 보고되었다[15,16]. 또한 이들 분리 균주 중 몇몇은 2종 이상의 항생제에 저항성인 다제 내성균으로 확인되었다[17,18]. 본 연구자등은 이러한 배경을 바탕으로 축산물 유래 위생 지표 세균인 장구균 속 세균을 원유 시료에서 분리, 동정하고 이 균들의 주요 항생제군에 대한 감수성을 조사하고자 하였다.

*Correspondence to: SungSook Choi, Cheongnyangni P. O. Box 118, Seoul, Korea
Tel: 82-2-3399-1606 Fax: 82-2-3399-1617
E-mail: sschoi@syu.ac.kr

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

본 실험에서는 원유 시료에서 분리한 170종의 장구균속 세균 및 대조균으로 *Enterococcus faecalis* ATCC29212균주를 사용하였으며 균주의 분리를 위해서는 Enterococcosel medium (Difco, Detroit, MI, USA)을 사용하였고 최소억제농도의 측정에는 Muller-Hinton 배지 (Difco, Detroit, MI, USA) 배지를 사용하였다.

원유시료에서 장구균속 세균의 분리 및 동정

본 연구는 2008년 4월부터 2009년 1월에 걸쳐 경기북부지역 젖소 사육 농가 15곳으로부터 485개의 원유 시료를 공급받아 본 실험에 사용하였으며 착유시 알코올 소독을 실시하여 2차 감염의 기회를 최소화 하였다. 수집한 원유는 잘 혼화 후 Enterococcosel medium (Difco, Detroit, MI, USA) 에 0.1 ml을 도말 후 37°C에서 24~48시간 배양하였다. 배양 후 형성된 집락 중 장구균 특유의 노란색 색소를 생성하는 집락을 순수배양 후 임상검사센터인 세강 (서울)에 의뢰하여 균 동정을 실시하였다. 동일한 원유 시료에서는 1개의 집락만을 선택하여 같은 균주의 반복적인 선택을 피하였다.

항생제 감수성검사

분리된 장구균을 대상으로 ampicillin (Sigma Co. St. Louis MO, USA), erythromycin (Sigma Co. St. Louis MO, USA), tetracyclin (Sigma Co. St. Louis MO, USA), chloramphenicol (Sigma Co. St. Louis), vancomycin (Sigma Co. St. Louis MO), ciprofloxacin (Korea united pharm Inc.), streptomycin (Chong Keun Dang Pharm.) 에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 감수성 실험은 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, USA) 의 고체배지 희석법으로 실시하였으며[19] Muller-Hinton 배지 (Difco, Detroit, MI, USA) 배지를 사용하고 표준 장구균으로 *Enterococcus faecalis* ATCC29212를 사용하였다. 본 실험에 사용한 항생물질은 최고 농도를 64 μg/ml로 하고 2배 계열 희석하여 최저 농도가 0.03 μg/ml 되도록 항생물질 희석 계열을 만들었다. 여기에 하룻밤 전 배양한 균액을 10^6CFU/ml 되도록 희석한 후 5 μl씩 항생제 배지에 접종하여 배양하고 균주의 성장을 확인할 수 없는 가장 낮은 항생제의 농도를 최소억제농도 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)로 결정하였다.

결과 및 고찰

원유 시료중에 존재하는 장구균속 세균을 분리하기 위하여 경기 북부지역에 위치한 15개의 축산 농가에서 458개의 원유 시료를 분양받아 Enterococcosel 배지에 도말하여 장구균 속 세균을 분리하였다. 그 결과 Enterococcosel 배지에서 장구균 특유의 노란색 색소를 생성하는 집락중 170개의 집락이 균 동정 결과 *Enterococci* spp.로 확인되었으며 분리된 균의 종별 분포를 보면 Table 1에 나타난 것처럼 *E. faecalis*가 110 (64.7%), *E. faecium*이 32 (18.8%), *E. avium*이 10 (5.9%), *E. gallinarium*이 10 (5.9%), *E. durans*가 8 (4.7%)의 순이었다. 분리된 170종의 장구균에 대한 수종 항생제의 MIC검사를 실시하였고 그 결과 각 항생제별 MIC 농도별 균수, MIC 범위, $MIC_{50,}$ MIC_{90}과 감수성 및 내성 비율을 Table2에 나타내었다. 이때 감수성 및 내성의 판단 기준은 CLSI의[19] 가이드라인에 따라 판단하였다. Ampicillin에 대해서는 감수성 균주와 내성 균주의 비율이 각각 50%였으며 erythromycin에 대해서는 분리 균중 82.9% 의 균주가 내성을 보여 고도 내성을 나타내었다. erythromycin은 대표적인 마크로라이드계 항생제로서 그람 양성세균의 감염증 치료시 페니실린계 항생제를 사용할 수 없는 환자에게 사용하는 약물로 그람 양성세균인 *E. faecalis* 및 *E. faecium* 균주의 높은 내성률은 의미가 있으며 Mannu[20] 등의 연구 결과와도 일치한다. Tetracyclin의 경우 가축에 가장 빈번하게 사용되는 항생제로 분리균주의 약 절반 정도인 45.9%가 내성을 나타냄을 확인하였다. Chloramphenicol에 대해서는 분리 균주의 67.9%는 감수성이었으며 32.9%는 내성균으로 확인되었다. vancomycin에 대해서는 분리균 모두 4 μg/m이하의 농도에서 성장이 억제되어 감수성임을 확인할 수 있었으며 특히 *E. gallinarum*도 4 μg/ml 농도에서 성장이 억제 되었다. 이는 기존의 연구 결과와도[21,22] 일치하며 아직 원유 시료에 vancomcyin 저항성 장구균의 존재는 일반적인 것은 아닌 것으로 사료된다. 플루로퀴놀론계 항생제인 ciprofloxacin에 대해서는 99.4%가 감수성 균으로 확인되었으며 특히 Mac[23] 등의 연구 결과와는 다르게 본 연구에서 분리 사용된 장구균의 경우 대표적인 퀴놀론계 항생제인 ciprofloxacin에 감수성임을 알 수 있었으며 이는 아마도 국내에서 허가된 사료첨가용 항생제 목록에 퀴놀론계 항생제가 포함되지 않은 것과 무관하지 않은 것으로 판단된다[24]. 대표적인 aminoglycoside계 항생제인 streptomycin에 대해서는 중증도 및 내성균의 비율이 약 94% 정도로 비교적 저항성이 강한 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에 사용된 경기 북부지역 축산 농가로부터 공급받은 원유 시료에서 분리된 장구균의 경우 전반적으로 erythromycin 및 streptomycin에 대해 고도의 저항성을 나타내었으며 퀴놀론계 항생제인 ciprofloxacin에 대해서는 감수성을 나타내었다. 또한 분리된 장구균중 vancomycin에 저항성인 Vacnomycin Resistant Enterococci (VRE)의 존재는 확인되지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 연구에 사용된 경기북부 지역의 원유에서 분리된 장구균의 경우 외국의 사례와 비교하여 erythromycin, tetracyclin, chloramphenicol 및 sterptomycin 에 대한 저항

Table1. *Enterococci* spp. identified from 170 isolates of raw milk samples

Microorganisms	No. of isolates (%)
E. faecalis	110 (64.7%)
E. faecium	32 (18.8%)
E. avium	10 (5.9%)
E. gallinarium	10 (5.9%)
E. durans	8 (4.7%)
Total	170 (100%)

Table 2. MIC values distribution of the 170 Enterococcal isolates from raw milk sample

Abs	Number of isolates (%) with MIC (μg/ml)													MIC range			Interpretation (%)		
	≦ 0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64	range	MIC_{50}	MIC_{90}	S	I	R
Amp					4	18	26		37	48	30	7		0.5~64	8	32	85 (50)		85 (50)
Em						11	1	17	10	51	65	8	7	1~>64	16	64		29 (17.1)	141 (82.9)
Tc					15	25		37	15	29	26	23		0.5~64	4	64	77 (45.2)	15 (8.9)	78 (45.9)
Cam	4					4	6	35	65		7	30	19	1~>64	8	64	114 (67.9)		56 (32.1)
Van	3		13	26	115	3		10						≦ 0.03~4	0.5	0.5	170 (100)		
Cip	7	4	8	42	50	58	1							≦ 0.03~2	0.5	1	169 (99.4)	1 (0.6)	
Sm	2				4			5		20	10	12	117	≦ 0.03~>64	>64	>64	11 (6.4%)	20 (11.8)	139 (81.8%)

Amp: ampicillin; Em: erythromycin; Tc: tetracyclin; Cam: chloramphenicol; Van: vancomycin; Cip: ciprofloxacin; Sm: streptomycin.; S: sensitive; I: intermediate; R: resistant

성 균종의 분리 비율은 유사한 것을 알 수 있었다. 또한 vancomycin 및 퀴놀론계 항생제에 대해서는 외국의 사례와 비교시 분리된 장구균들이 이들 항생제에 오히려 감수성 양상을 나타내는 것을 알수 있었으며 이는 본 경기북부지역 농가에서는 동물용 사용 허가 항생제와 사용 금지 항생제의 규칙이 잘 지켜지고 있는 것으로 추정된다. 항생제 내성균의 전파와 축산분야에서의 항생제의 사용과의 인과관계에 대해서는 아직 논쟁의 여지가 남아있다고 하더라도 항생제 내성은 사람과 동물의 건강에 위협을 주는 심각한 공중보건학적 문제를 일으킨다는 사실에는 이론의 여지가 없다. 또한 식품을 통한 항생제 내성의 전파 가능성을 완전히 배제할 수 없기 때문에 동물성 식품 유래 세균의 항생제 내성의 문제는 지속적인 모니터링이 필요되는 분야로 판단되며 그러한 의미에서 본 연구는 가장 최근에 분리된 동물 식품 유래 장구균속 세균의 항생제 내성 분포를 보여준다는 점에서 의미있는 연구 결과로 판단되며 앞으로도 정기적이며 지속적인 모니터링을 실시하고자 한다.

요 약

2008년 4월부터 2009년 1월 사이에 경기도 북부 지역에 위치한 축산 농가 15곳으로부터 458개의 원유 시료를 공급받아 장구균속 세균을 분리 동정하였다. 총 170개의 장구균속 세균이 분리되었으며 그 중 *Enterococcus faecalis*가 가장 우세하게 분리된 균주이며 (64.7%) *E. faecium*이 18.8%, *E. avium*이 5.9%, *E. gallinarium*이 5.9%, *E. durans*가 4.7%의 순으로 분리되었다. 분리된 170종의 장구균을 대상으로 ampicillin, erythromycin, tetracyclin, chloramphenicol, vancomycin, ciprofloxacin 및 streptomycin에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 그 결과 erythromycin (82.9%)과 streptomycin (93.5%)에 대해서는 고도의 저항성을 나타내었으며 ampicillin (50%), chloramphenicol (45.(%) 및 tetracyclin (32%)에 대해서는 중증도의 저항성을 나타내었으나 vanocomycin 및ciprofloxacin에 대해서는 다행이 감수성인 결과를 나타내었으며 앞으로도 지속적인 모니터링이 필요한 것으로 판단된다.

참고문헌

1. DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Program): Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animal, foods and humans in Denmark, pp 1-85 (2003).
2. FAO/OIE/WHO: Joint FAO/OIE/WHO 2nd workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance; management options, executive summary, Olso, Norway (2004).
3. NORM. NORM-VET: Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway, pp.1-72 (2003).
4. OIE. European Scientific Conference. The use of antibiotics in animal ensuring the protection of public health. pp. 8-142 (2001).
5. 국립수의과학검역원 : 축산용항생제 관리시스템 구축. 식약청용역사업보고서 (2007).
6. 국립수의과학검역원: FAO/OIE/WHO 합동 동물용 항균물질 안전사용 및 내성관리 워크샵 자료집 pp. 1-249 (2004).
7. 식약청: 국가 항생제 내성 안전관리 사업 연구 보고서 (2003).
8. NARMS : National antimicrobial resistance monitoring system-enteric bacteria, USA (2003).
9. WHO: Joint FAO/OIE/WHO 2nd Workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance; Scientific assessment, Geneva (2003).
10. 서울대학교 수의과학대학: 항생제·항균제의 사용실태 및 관련규제에 관한 연구. pp. 1-235 (2004).
11. 일본 농림수산성: 가축유래 세균의 항생물질 감수성 실태 조사 (2003).
12. Barbosa, J., Ferreira, V. and Teixeira, P.: Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiol*. **26**, 527-532 (2009).
13. Leclercq, R.: Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin. Infect. DIs*. **24** (suppl1), 580-584 (1997).
14. Murray, B. E.: The Life and times of the Enterococcus. *Clin. Microbiol. Rev*. **3**, 46-65 (1990).
15. Gomes, B. C., Esteves, C. T., Palazzo, I. C., Darini, A. L., Felis, G. E., Sechi, L. A., Franco, B. D. and De Martinis, E. C.: Prevalence and characterization of *enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol*. **25**(5), 668-675 (2008).
16. Koluman, A., Akanb, L. S. and Cakiroglub, F. P.: Occurence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control*. **20**, 281-283 (2009).
17. Hayes, J. R., English, L. L., Carr, L. E., Wagner, D. D. and Joseph, S. W.: Multiple-antibiotic resistance of *enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments. *Appl. Environ. Microbiol*. **70**(10), 6005-6011 (2004).
18. Son, R., Nimita, F., Rusul, G., Nasreldin, E. Samuel, L. and Nishibuchi, M.: Isolation and molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Malaysia. *Lett. Appl. Microbiol*. **29**(2), 118-222 (1999).
19. CLSI.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute (2009).
20. 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).
21. Canzek, M. A., Rogelj, I. and Perko, B.: Enterococci from Tolminc cheese: population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *Int. J. Food Microbiol*. **102**(2), 239-244 (2005).
22. Messi, P., Guerrieri, E. de Niederhäusern, S. Sabia, C. and Bondi, M.: Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat

and environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.* **107**(2), 218-222 (2005).

23. Mac K., Wichmann-Schauer, H., Peters, J. and Ellerbroek, L.: Species identification and detection of vancomycin resistance genes in enterococci of animal origin by multiplex PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 305-309 (2003).
24. 김소현, 박용호. : 항생제 내성과 식품 안전. *Safe Food.* **3**(1), 30-36 (2008).