

축산물 및 작업장 유래 *Listeria monocytogenes*의 혈청형, 약제감수성 및 plasmid profile

박상구 · 손원근¹ · 이후장 · 김용환 · 강호조*

경상대학교 수의과대학/동물의학연구소

¹제주대학교 수의학과

(게재승인: 2004년 3월 5일)

Serotype, antimicrobial susceptibility and plasmid profile of *Listeria monocytogenes* isolated from livestock products and product processing plants

Sang-koo Park, Won-geun Son¹, Hu-jang Lee, Young-hwan Kim, and Ho-jo Kang*

College of Veterinary Medicine/Institute of Animal Medicine, Gyeongsang National University,
Jinju 660-701, Korea

¹Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

(Accepted: March 5, 2004)

Abstract : This study was carried out to investigate the serotype, and antimicrobial susceptibility and analyze the plasmid profile for the 145 isolates of *L. monocytogenes* isolated from livestock products and these product processing plants in Gyeongnam, Korea. All of *L. monocytogenes* strains belonged to serotype 1/2b (57.9%), 1/2a (20.0%), 4b (11.4%), 1/2c, 3b, 4c (each 2.9%) and 4d (0.7%). Serotype 1/2b, 1/2a, 4b from each source were found predominantly. Serotype 1/2b was predominantly higher than other serotype, and there was no significant difference between serotypes isolated from livestock products and product processing plants. 4b was major serotype isolated from raw milk and pork, and serotypes isolated from beef, chickens and slaughterhouse were 1/2b and 1/2a. The susceptibility of 145 strains of *L. monocytogenes* to 14 antibiotics commonly used in veterinary and human therapy was determined by disk diffusion method. All of *L. monocytogenes* strains were susceptible to amikacin, ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, gentamicin, kanamycin, neomycin and penicillin. *L. monocytogenes* strains had the highest resistance with colistin (100%), oxytetracycline (44.8%), tetracycline (43.4%) followed by erythromycin (2.8%), spectinomycin (1.4%) and streptomycin (0.7%). Tetracycline resistance, and serotype distribution of the isolates from sample sources were significantly different. Resistance to at least one antibiotic was observed in all of them and 7 different resistant profiles were recorded. The most common resistance pattern were CL-OTC-TC (colistin-oxytetracycline-tetracycline) (42.8%). Among all tested isolates, two different plasmid profiles were observed. Of the 97 examined strains, 14 (14.4%) contained either the 8 and 11 kb plasmid or the 11 kb.

Key words : *Listeria monocytogenes*, serotype, antimicrobial susceptibility, plasmid profile

서 론

*L. monocytogenes*는 1980년대 초부터 캐나다와 미국에서 식품을 매개로 한 테리아증의 몇몇 대형 집단 식

중독사건이 발생하면서부터 식품산업 및 보건당국의 주요 관심사로 되었다 [15, 17, 19, 24, 31]. 이 질병은 *Listeria* 균이 오염된 식품을 섭취함으로써 AIDS, 면역형성결핍, 당뇨병, 알코올중독자, 임신부 및 노약자 등

*Corresponding author: Ho-jo Kang

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
[Tel: 82-55-751-5810, Fax: 82-55-751-5803, E-mail: hjkang@nongae.gsnu.ac.kr]

에서 잘 감염되며, 뇌막염 및 폐혈증 등을 주요 증상으로 하여 30% 이상의 높은 치사율을 나타낸다 [15, 17, 19, 24, 31, 32].

이 균은 혈청학적으로 13종의 subtype 모두 리스테리아증을 일으키는 것으로 알려져 있으나 [14], 감염된 사람과 동물에서 주로 분리되는 serotype은 1/2a, 1/2b 및 4b이다 [25, 28, 39]. 외국에서는 *L. monocytogenes*가 오염된 유제품, 계육제품, 생선 및 야채 등의 식품섭취와 관계하는 것으로 보고되어 있다 [11, 14, 18, 26]. 국내에서는 식품을 매개로 한 리스테리아증의 발생보고는 없지만, 식육, 계육, 원유와 작업장환경에서, 그리고 가축 및 사이레지 등에서 *L. monocytogenes*가 다수 분리되고 있다 [1, 4, 5, 10, 18, 22]. 그러나 대부분의 보고는 일부의 식품이나 작업장 환경재료에 국한되어 있고, serotype은 대부분 type 1과 type 4로 분류되어 있다. 세계적인 serotype의 분포를 보면 serotype 4b는 유럽 각국에서, serotype 1/2a, 1/2b 및 4b는 캐나다와 미국 등지에서 높은 편이나 지역적인 차이가 있는 것으로 보고되어 있으며 [25, 28, 39], 한편, 질병 발생 특성과 serotype 간에는 직접적인 관계는 없지만, serotype 1/2b, 3b 및 4b 간에는 역학적 관계가 있는 것으로 보고되어 있다 [17].

*L. monocytogenes*는 항생물질에 대하여 감수성이 있다고 보는 것이 일반적인 견해이다 [22]. 그러나 근년 chloramphenicol, erythromycin, streptomycin, tetracycline, vancomycin 및 trimethoprim에 대해서 임상적 내성균주가 출현하였다는 보고가 있고 [10], 여러 나라에서 내성을 가진 *L. monocytogenes*가 식품시료에서 분리되고 있다 [8, 13, 16, 36]. 이들 연구보고에 의하면 Gram 양성세균으로부터 transferable plasmid, transposons 및 conjugative transposons에 의해서 *L. monocytogenes*가 내성인자를 획득하여 점차 내성균이 증가하는 것으로 보고하고 있다 [10]. 이와 같은 내성균의 출현은 전염병으로 의심된 사람이나 동물에서 질병예방 및 치료 목적으로 뿐만 아니라 가축의 성장촉진용으로 각종 항생물질을 오·남용한 데 기인된 것으로 알려져 있다 [27, 36]. 또한 임상 유래균주는 다제내성을 획득한 *Listeria* 균이 수적으로 증가하고 있으나 식품 유래 균은 이들 항생물질에 대하여 일반적으로 감수성을 나타내기 때문에 plasmid를 거의 보유하지 않는 것으로 보고되고 있다 [27, 36]. 그러나 식품매개 *Listeria* 균주의 약제내성은 여러 나라에서 다수 보고되어 있다 [8, 13, 16]. Facinelli *et al.* [13]은 임상 및 식품에서 유래한 *L. monocytogenes* 간의 항생물질에 대한 내성균의 분리빈도는 비슷하고, 다제내성균주는 식품유래 *L. monocytogenes*에서만 분리되었다고 하였다. Kolstad *et al.* [23]은 식품유래 *L. monocytogenes* 균의 대부분이 plasmid를 보유하였다고 하

였으나, Barbuti *et al.* [8]은 이태리의 육제품 유래 *L. monocytogenes*에서는 다제내성균주는 분리되어도 plasmid를 보유한 균주는 없었다고 하였다.

이상과 같은 여러 연구를 통하여 볼 때 리스테리아증과 식품 유래 *L. monocytogenes*의 serotype 분포는 지역에 따라 차이가 있고, 국, 내외적으로 다제내성균의 출현이 증가하고 있음을 알 수 있다. 따라서 이러한 사실은 보건당국으로 하여금 지대한 관심사가 되지 않을 수 없다. 이는 식품환경 및 식품산업에서 항생제내성균의 출현빈도 증가에 미치는 또 다른 하나의 사건으로서 의학 및 수의학 분야에서 항생물질 사용에 대한 큰 변화를 요구하고 있다. 따라서 본 연구는 리스테리아증의 역학적 특성을 파악하여 그 대책에 필요한 자료를 얻고자 식육, 계육, 원유 및 작업장 환경재료로부터 분리한 *L. monocytogenes* 균주들의 serotype 분포와 항생물질에 대한 감수성을 조사하고, 이들 균주들의 plasmid profile의 보유상태를 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

경남지방에서 수집한 우유, 돈육, 계육, 원유, 도축장, 도계장 및 우유처리장 재료에서 분리한 145 균주의 *L. monocytogenes*를 사용하였다. 모든 균주는 15% glycerol을 함유한 tryptic soy broth (TSB, Difco)에 부유하여 -70°C deep freezer에서 보존하였고, 실험에 사용하기 전에 tryptic soy agar (TSA, Difco)에 3회 계대 배양하여 사용하였다.

Serotype 분류

공시한 *L. monocytogenes*의 serotype 분류는 FDA 방법 [34]에 따라 Denka Seiken (Tokyo, Japan)에서 제조된 *Listeria* O antisera (I/II, I, IV, V/VI, VI, VII, VIII, IX)와 *Listeria* H antisera (A, AB, C, D)를 사용하였다.

(1) O 항원 결정

Brain heart infusion agar (Difco)에 배양한 피검균을 0.2% 식염수에 약 10 mg/ml 농도가 되게 부유한 후 121°C에서 30분간 고압멸균하고 냉각시킨 다음 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 그 침전물을 0.2% 식염수 50 ml로 재 부유하여 항원으로 사용하였다. 응집반응은 slide glass에 혼합혈청인 I/II, V/VI 혈청과 생리식염수(대조)를 1 drop 씩 떨어트리고 항원 1 백금이를 혼합하여 1분 이내에 응집반응을 나타낸 것을 양성으로 판정하였다. 이 때 I/II antisera에 양성일 때는 I 및 IV antisera를, V/VI antisera에 양성일 때는 VI, VII, VIII, IX antisera를 사용하여 slide 응집반응을 실시하였다.

(2) H 항원 결정

피검균을 brain heart infusion broth (BHI, Difco) 반유동배지 (0.2% agar 첨가)에 4회 계대배양한 후 BHI broth에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 다음 1% formalin 생리식염수를 동량으로 혼합한 H antisera를 U bottom plate에 2 drop 씩 취하고 antigen을 각각 0.5 ml 씩 혼합한 후 50°C 항온수조에 1시간 방치하여 응집여부를 판정하였다.

약제 감수성 시험

약제 감수성 시험은 Barry와 Thomsberry의 방법 [9]에 준하여 disc-diffusion method로 실시하였다. 항생제 디스크 (BBL)는 amikacin (AN), ampicillin (AM), cephalothin (CF), chloramphenicol (C), colistin (CL), erythromycin (EM), gentamicin (GM), kanamycin (KM), neomycin (NM), oxytetracycline (OTC), penicillin (PC), spectinomycin (SP), streptomycin (SM) 및 tetracycline (TE)을 포함한 14종을 사용하였다. TSB에 18시간 배양한 균액을 10⁵ CFU/ml 수준으로 조정하여 Mueller hinton agar (Oxoid) 표면에 골고루 문지른 다음 disc inoculator (Becton Dickinson)를 사용하여 항생제 디스크를 접종하고 37°C에서 24-48시간 배양하였다. 균의 내성도는 zone diameter interpretive standard (BBL sensi-disc antimicrobial susceptibility test disc)에 따라 억제대의 직경을 측정하여 크기가 8 mm (CL), 11 mm (SM), 12 mm (C, GM, NM), 13 mm (EM, KM), 14 mm (AN, CF, SP), 18 mm (OTC, TE), 19 mm (AM, PC) 보다 적거나 같은 것은 내성균으로 판정하였다.

Plasmid 분리

Plasmid 분리는 Sambrook *et al.* [30]의 방법에 따라 실시하였다. 시험 균주를 TSB에 접종하여 35°C에서 15-18시간 배양한 다음 원심분리 (15,000 rpm, 1 min.)하여 얻은 균 액을 1 ml의 solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl; pH 8.0, 10 mM EDTA; pH 8.0)에 부유시키고 다시 원심 분리하여 상층 액을 제거하고 lysozyme (2 mg/ml)이 첨가된 solution I 400 µl를 가하여 재 부유한 후 35°C에서 30분간 정치하였다. 여기에 solution II (10% SDS, 50 mM Tris, 10 mM EDTA) 100 µl를 가하여 35°C에서 30분간 작용시킨 후 high salt 용액 (3M potassium acetate, pH 5.2) 250 µl를 첨가하고 -20°C에 20분간 둔 다음 원심 분리하여 상층 액을 회수하였다. 다음 동량의 phenol : chloroform 용액을 가하여 원심 분리한 후 상층 액에 ice-cold ether 1 ml를 가하고 -20°C에서 30분간 침전시켰다. 이 침사에 70% ethanol을 가하여 세척하고 진공 건조시킨 다음 TE 용액으로 용해한 것을 전기영동하여 plasmid profile을 조사하였다.

결 과

Serotype 분포

식육, 계육, 원유 및 작업장 유래 *L. monocytogenes* 140주에 대한 serotype 분포는 Table 1과 같이 1/2b가 81주(57.9%)로서 가장 높은 빈도를 나타내었고, 1/2a는 20주(20%), 4b는 14주(11.4%), 1/2c, 3b 및 4c는 각 4주(2.9%), 4d는 1주(0.7%) 이었다.

분리 균의 유래별 serotype 분포는 축산물의 경우, 우

Table 1. Serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolates from livestock products and product processing plants

Source	No. of isolates	<i>Listeria monocytogenes</i> serovars							
		1/2a	1/2b	1/2c	3b	4b	4c	4d	UT
Beef	6	1	4						1
Pork	16	1	8			6		1	
Chicken	17		8	3	3	2			1
Raw milk	10		5			5			
Imported beef	2					2			
Slaughterhouse	73	23	48		1	1			
Poultry processing Plant	7	3	4						
Milk plant	9		4	1			4		
Total (%)	140 (100.0)	28 (20.0)	81 (57.9)	4 (2.9)	4 (2.9)	16 (11.4)	4 (2.9)	1 (0.7)	2 (1.4)

UT, untypable.

육 유래균 6주 중 4주는 1/2b, 1주는 1/2a 이었다. 돈육 유래균 16주 중 8주는 1/2b, 4b, 1/2a 및 4d는 각각 1주 (6.3%)이었다. 계육 유래균 17주 중 8주는 1/2b, 1/2c 및 3b가 각각 3주, 4b는 2주이었다. 원유 유래균 10주는 1/2b와 4b가 각 5주이었다. 도축장 유래균 73주에서는 1/2b가 48주, 1/2a 23주, 3b와 4b는 각 1주이었다. 도계장 유래균 7주에서는 1/2b 4주와 1/2a 3주이었다. 우유처리

장 유래균 9주에서는 1/2b와 4c 각 4주, 1/2c는 1주이었다.

약제감수성

*L. monocytogenes*의 14종 항생물질에 대한 감수성시험결과는 Table 2와 같다. CL에서는 100%, OTC에 65주(44.8%), TE 63주(43.4%), EM 4주(2.8%), SP 2주(1.4%) 및 SM 1주(0.7%)가 내성을 나타내었고, AN, AM,

Table 2. Resistance to antimicrobial agents of *L. monocytogenes* isolates

Antibiotics	Disc potency (µg)	Number of isolates (%)		
		Resistant	Intermediate	Susceptible
AN	10	0	0	145(100)
AM	10	0	0	145(100)
CF	30	0	0	145(100)
C	30	0	0	145(100)
CL	10	145(100)	0	0
EM	15	4(2.8)	0	141(97.2)
GM	10	0	0	145(100)
KM	30	0	0	145(100)
NM	30	0	0	145(100)
OTC	30	65(44.8)	0	80(55.2)
PC	10 IU	0	0	145(100)
SP	100	2(1.4)	0	143(98.6)
SM	10	1(0.7)	12(8.3)	132(91.0)
TE	30	63(43.4)	3(2.1)	79(54.5)

Abbreviation; AN; amikacin, AM; ampicillin, CF; cephalothin, C; chloramphenicol, CL; colistin, EM erythromycin, GM; gentamicin, KM; kanamycin, NM; neomycin, OTC; oxytetracycline, PC; penicillin, SP; spectinomycin, SM; streptomycin, TE; tetracycline.

Table 3. Antibiotic resistance of *L. monocytogenes* isolates by sources

Antimicrobial agents	Percentage of resistant isolates							Total (n=145)
	Beef (n=9)	Pork (n=13)	Chicks (n=15)	Milk (n=10)	MPS (n=10)	SH (n=75)	PPP (n=13)	
AN	0	0	0	0	0	0	0	0
AM	0	0	0	0	0	0	0	0
CF	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0
CL	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
EM	0	0	13.3	0	0	2.7	0	2.8
GM	0	0	0	0	0	0	0	0
KM	0	0	0	0	0	0	0	0
NM	0	0	0	0	0	0	0	0
OTC	33.3	15.4	33.3	20.0	50.0	60.0	23.1	44.8
PC	0	0	0	0	0	0	0	0
SP	0	0	6.7	0	0	1.3	0	1.4
SM	0	7.7	0	0	0	0	0	0.7
TE	33.3	15.4	26.7	20.0	50.0	58.7	23.1	43.4

Milk, raw milk; MPS, milk plant sewage; SH, slaughterhouse; PPP, poultry processing plant.

AN, amikacin; AM, ampicillin; CF, cephalothin; C, chloramphenicol; CL, colistin; EM, erythromycin; GM, gentamicin; KM, kanamycin; NM, neomycin; OTC, oxytetracycline; PC, penicillin; SP, spectinomycin; SM, streptomycin; TE, tetracycline.

CF, C, GM, KM, NM 및 PC의 8종에 대해서는 모두 감수성을 나타내었다.

(1) 균 분리유래 별 내성률

L. monocytogenes 145주에 대한 분리 유래 별 내성률을 조사한 성적은 Table 3에서와 같이 CL에서는 각종 유래 균 145주(100%), OTC에 대하여는 도축장유래 균에서는 60%, 우유처리장 유래 균은 50%, 우육 및 계육 유래 균은 각 33.3%, 도계장유래 균 23.1%, 원유유래 균 20% 그리고 돈육유래 균에서는 15.4%의 내성률을 나타내었다. 내성을 나타낸 OTC와 TE에 대한 유래 별 내성률은 도축장 유래 균(58.7%), 우유처리장(50%), 우육(33.3%), 계육(26.7%), 우유처리장(23.1%), 원유(20%) 및 돈육(15.4%)으로 높았고, EM에는 계육 유래 균(13.3%), 도축장(2.7%), 순이었으며, SP에서는 계육(6.7%), 도축장 유래 균(1.3%) 순으로 높았다.

(2) Serotype 별 내성률

Serotype에 따른 내성균의 분리빈도는 Table 4와 같이 OTC 및 TE에서는 다 같이 3b(75.0%), 1/2a(53.8%), 1/2c(50.0%), 1/2b(46.4%), 4b(23.1%) 및 4c(25.0%)의 순이었고, EM에서는 1/2b(4.8%), 그리고 SP와 SM에서는 각 1.2% 이었다.

(3) 약제내성형 분포

약제내성 형은 Table 5에서와 같이 145균주 모두가 1제 이상의 약제에 대하여 내성을 나타내었고, 모두 7종류의 내성형을 나타내었다. 즉 CL 단제내성형은 77주(53.1%), CL-OTC-TE 3제내성형은 62주(42.8%), CL-EM-OTC-TE 4제내성형은 2주(1.4%), 그리고 CL-EM 2제내성형은 1주(0.7%) 이었다. 균 분리유래 별로 보면 CL-OTC-TE 내성형은 도축장 57.3%, 우유처리장 50.0%, 우육 33.3%, 계육 26.7%, 도계장 23.1%, 원유 20.0% 및 돈육 5.4% 이었고, CL 내성형은 원유 80.0%, 돈육 및 도계장 각 76.9%, 우육 66.7%, 계육 53.3%, 우유처리장 50.0% 및 도축장 40% 이었다.

Table 4. Antibiotic resistance of *L. monocytogenes* strains by serotype

Serovar	No. of strains tested	Percentage of antibiotic resistance					
		CL	EM	OTC	SP	SM	TE
1/2a	26	100	0	53.8	0	0	53.8
1/2b	84	100	4.8	46.4	1.2	1.2	46.4
1/2c	4	100	0	50.0	0	0	50.0
3b	4	100	0	75.0	0	0	50.0
4b	13	100	0	23.1	0	0	23.1
4c	4	100	0	25.0	0	0	25.0
Total	131	100	0	47.3	0	0	47.3

CL, colistin; EM, erythromycin; SP, spectinomycin; SM, streptomycin; OTC, oxitetracyclin; TE, tetracycline.

Plasmid profile

Plasmid 보유율은 Table 6과 같이 *L. monocytogenes* 97주 중 14.4%(14주)를 나타내었다. 균 분리 유래별 plasmid 분리률은 계육은 14주 중 57.1%(8주), 우육 13주 중 38.3%(5주), 그리고 도계장 13주 중 7.7%(1주)이었고, 돈육, 원유, 도축장 및 우유처리장에서는 분리되지 않았다.

(1) 내성균주에 대한 plasmid 보유율

CL-OTC-TE 내성형을 나타낸 14균주에 대한 plasmid 보유 상황은 Table 7에서와 같이 도계장 유래균 1주에서 11 Kb와 8 kb 크기의 2종 plasmid가 검출되었고, 13주에서는 11 Kb의 단일 plasmid가 검출되었다.

(2) 균 분리유래별 plasmid 분석

분리유래별 plasmid 보유상황을 조사한 결과는 Fig. 1에서와 같이 도계장 유래균(lane 11) 1주는 11 및 8 kb

Table 5. Comparison of antibiotic resistance patterns of *L. monocytogenes* isolates by sources

Resistance patterns	Total resistant strains	Number of resistant strains (%) ^a						
		Beef (9) ^b	Pork (13)	Chicken (15)	Milk (10)	MPS (10)	SH (75)	PPP (13)
CL	77(53.1)	6(66.7)	10(76.9)	8(53.3)	8(80.0)	5(50.0)	30(40)	10(76.9)
CL-EM	1(0.1)	0	0	1(6.7)	0	0	0	0
CL-SM	1	0	1(7.7)	0	0	0	0	0
CL-OTC	1	0	0	0	0	0	0	0
CL-SP	1	0	0	1	0	0	0	0
CL-OTC-TE	62(42.8)	3(33.3)	215.4)	4(26.7)	2(20.0)	5(50.0)	43(57.3)	3(23.1)
CL-EM-OTC-TE	2(1.4)	0	0	0	0	0	2(2.7)	0

CL, colistin; EM, erythromycin; SM, streptomycin; OTC, oxytetracyclin; SP, spectinomycin; TE, tetracycline.

^aPercentage ratio of resistant strains to total number of test strains from each source.

^bTotal number of test strains from source.

Table 6. Isolation rates of *Listeria monocytogenes* harboring plasmids

Organism	Source	Size of plasmid (kb)	Resistance pattern
<i>L. monocytogenes</i> P5	PPP	11,8	LC-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> C10	Chicken	11	CL-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> C58	Chicken	11	CL-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> C59	Chicken	11	CL-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> C60	Chicken	11	CL-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> C61	Chicken	11	CL-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> C62	Chicken	11	CL-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> C63	Chicken	11	CL-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> C64	Chicken	11	CL-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> B65	Beef	11	CL-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> B66	Beef	11	CL-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> B67	Beef	11	CL-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> B68	Beef	11	CL-OTC-TE
<i>L. monocytogenes</i> B71	Beef	11	CL-OTC-TE

CL, colistin; OTC, oxytetracyclin; TE, tetracyclin; PPP, poultry processing plants.

Table 7. Relationship with plasmid profiles and antibiotic resistant patterns

Source	No. of isolates tested	No. of isolates harbored plasmid	%
Beef	13	5	38.5
Pork	23	0	0.0
Chickens	14	8	57.1
Milk	8	0	0.0
Slaughterhouse	18	0	0.0
Poultry processing plant	13	1	7.7
Milk pant	8	0	0.0
Total	97	14	14.4

크기의 2종 plasmid를, 그리고 우육(2주) 및 계육 유래 주(8주)는 단일분획의 동일한 plasmid가 관찰되었고, 원유 및 도축장 유래균(각 1주)은 plasmid band가 분리되지 않았다.

고 찰

리스테리아증은 *L. monocytogenes*가 오염된 유제품, 식육 및 계육제품, 생선 및 야채 등의 식품을 섭취함으로써 감염 발생하며 [11, 14, 18, 26], 질병발생과 serotype 1/2b, 3b 및 4b 간에 역학적 관계가 있는 것으로 보고

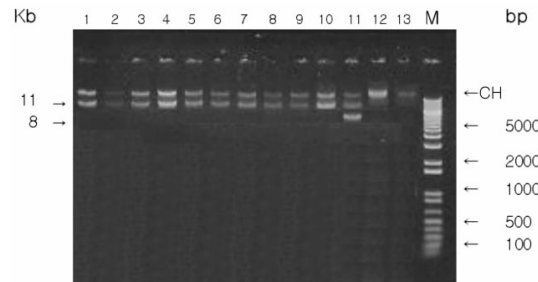


Fig. 1. Plasmid profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from various livestock products. The isolates harbored one or two plasmids (Lane 1, 2, *L. monocytogenes* B65, B66; lane 3 to 10, *L. monocytogenes* C10, C58 to C64; lane 11, *L. monocytogenes* P5) although most isolates did not any plasmid (lane 12, *L. monocytogenes* M3; lane 13, *L. monocytogenes* SH123). CH, chromosomal DNA; M, 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

되어 있다 [17].

본 연구에서 리스테리아증의 감염원을 추적하기 위하여 우육, 돈육, 계육, 원유 및 작업장환경에서 유래한 *L. monocytogenes*에 대한 serotype 분포를 조사한 바 1/2b (57.9%), 1/2a(20%) 및 4b(11.4%)가 90% 이상을 점하였다(Table 1). Inoue *et al.* [21]은 일본의 시판식품 유래 균에서 serotype 1/2a 및 1/2b가 마쇄계육 및 생선 유래 균에서 높은 분포를 나타내었다고 하였고, Simon과 Ferrer [35]는 스페인의 시판식품 유래 균에서 serotype 4b, 1/2a 및 1/2b가 현저히 높은 분포를 나타내었다고 하였다. 국내에서 홍 등 [5]은 돈육가공 작업장 환경에서 분리한 균의 serotype은 4b(36.6%), 1/2a(24.4%), 4a(17.0%)가 대부분이었다고 하였다. 이와 같은 결과는 여러 연구자들의 보고와 비교하여 볼 때 균분리 유래와 serotype 종류에 따라서 다소간의 차이는 있었으나 대체적으로 축산식품 및 작업장환경 유래균의 serotype은 주로 1/2b, 1/2a, 및 4b인 것으로 인정되었다. 균 분리 유래 별 serotype 분포에서 Aureli *et al.* [6]은 이태리의 식품유래 *L. monocytogenes* 148주에 대하여 조사한 결과 smoked salmon 유래 균에서 serotype 1/2a 및 3a(각 44.4%), 우유 및 연치즈 유래 균 1/2b(52.8%), 계육 유래 균 1/2a(59.2%), 식육 유래균 1/2c(40.9%) 및 1/2a(25%)로서 균분리 유래에 따라 serotype 분포가 다른 것으로 보고하였다.

본 시험에서 우육, 계육, 도축장 및 도계장 유래 균은 serotype 1/2b 및 1/2a가 높은 분포를 나타낸 반면에 원유 및 돈육 유래 균에서는 1/2b 및 4b가 유의하게 높은 분포를 나타냄으로서 분리균의 유래와 serotype 간에 역학적인 관계가 있는 것으로 추측된다. 1983년

Massachusetts에서 저온살균유가 원인이 되어 발생하였던 리스테리아 식중독 환자재료에서 분리한 원인 균의 serotype은 4b였고 [15], 1981-1993년에 걸쳐 북미와 유럽에서 식품을 매개로하여 폭발적으로 발생한 식중독 원인 균의 serotype도 4b였다 [19]. 1985년 California에서 mexican-style soft cheese가 원인된 리스테리아 식중독 환자에서 분리된 serotype도 4b로 확인되었다 [24]. 이상의 여러 연구자들의 보고를 통하여 볼 때 식품유래 *L. monocytogenes*의 serotype은 주로 1/2a 및 1/2b 이었고, serotype 4b는 리스테리아증 환자 발생에서 주로 분리됨으로서 [15, 19, 24], 다른 serotype 보다 사람에게 독성이 높은 것으로 추측된다 [7, 33].

리스테리아증에서 유래한 균의 세계적인 serotype 분포에서 지역에 따른 차이는 있지만, serotype 4b는 유럽의 대부분의 나라에서 현저하였고, serotype 1/2a, 1/2b 및 4b는 캐나다 및 미국에서 높은 분포를 나타내고 있다 [14]. Inoue *et al.* [21]은 일본의 시판식품 유래 균에서 serotype 1/2a 및 1/2b가 높은 빈도를 나타내었다고 하였고, Simo's와 Ferrer [35]는 스페인의 시판식품 유래 균에서 serotype 4b, 1/2b 및 1/2a가 대부분이고, 이들 중 1/2b가 가장 높은 분포를 나타내었다고 하였다. 이와 같은 여러 연구자들의 결과와 비교할 때 분리균의 유래와 지역에 따라 다소간의 차이는 있었지만, 본 시험에서 serotype 1/2b, 1/2a 및 4b가 높게 나타난 것과 비슷한 것으로 보인다. 또한 리스테리아증 발생 원인식품에서 분리된 serotype의 분포와 거의 일치하고 있으며, 특히 우유 및 돈육 유래 균에서 serotype 4b가 높은 분포를 나타내고 있다는 점을 감안할 때 국내에서도 이들 오염식품을 섭취함으로써 리스테리아증이 산발적으로 발생할 가능성은 배제할 수 없다. 대부분의 환자발생 사례의 원인식품에서 나타난 정량적 검사결과에서 균수는 $\geq 10^3$ CFU/g의 수준이며 [14, 18], ICMSF [20]에서는 식품의 *L. monocytogenes* 오염에 대한 역학적 조사를 기초로 하여 식품 중의 균수가 g당 100 이하의 수준은 안전한 수준이라고 하였으며, 강 등 [3]은 국내 시판식육 및 계육에 대한 안전성 평가 보고에서 0.3-3.0 MPN/g or cm² 이하라고 보고하고 있어 식품자체의 오염도면에서 볼 때 매우 낮은 수준이라고 볼 수 있다. 그러나 *L. monocytogenes*는 배지 상에서 3-6°C에 보존할 경우 10⁸ cells/ml 까지 증식할 수 있다는 보고 [12]로 미루어 볼 때 식육 및 가공품의 냉장 보존도 안심할 수 없다는 것을 시사하여 주고 있다.

한편, 국내에서 식품을 매개로 한 *L. monocytogenes* 145주의 다수 균주에 대하여 항생물질내성을 조사 보고하는 것은 처음 있는 일이다. 세계도처에서 항생물질에 대한 다제내성주가 축산물 유래균에서 분리되고 있다

는 것은 농장수준에서 발생할 수 있는 항생물질의 오염을 높게 시사하며, 생체내 약제내성인자의 전파 가능성을 증대시키고 있다 [4, 8, 13, 16]. 본 시험결과 축산물 및 작업장 환경에서 분리한 *L. monocytogenes*의 많은 균주가 사람의 리스테리아증 치료에 흔히 사용되는 항생물질인 OTC(44.8%), TE(43.4%), EM(2.8%) 및 SP(1.4%)에 대하여 내성을 나타내었다 (Table 2). 또한 CL에 100%의 내성을 나타낸 반면, AN, AM, PC, CF, C, GM, KM 및 NM에는 높은 감수성을 나타내었다. Facinelli *et al.* [13]은 이태리의 우유 및 육제품에서 분리한 *L. monocytogenes* 98주에 대하여 AM 및 C에 대한 내성균은 없었지만, 4주가 EM, KM, GM, rifampicin, SM, sulfamethoxazole, TE에 대하여 내성을 나타내었다고 하였다. 이와 같은 시기에 Barbuti *et al.* [8]은 이태리 유제품 유래 *L. monocytogenes* 64주와 *L. innocua* 102주에 대한 조사에서 TE 및 EM에 대하여 50% 이하의 내성을 나타낸 반면, 모든 균주가 AM, PC, CF, AN, GM 및 EM에 대한 높은 감수성을 보였다고 하였다. Wong *et al.* [40]은 돈육, 계육, 칠면조육에서 분리한 *L. monocytogenes* 173주는 AM, CF, C, EM, GM, KM, NM, PC 및 SM에 높은 감수성을 나타내었고, 14.5%가 TE에 내성을 나타내었다고 하였다. Franco *et al.* [16]은 스페인의 식품매개 *Listeria spp.*에서 PC, AM, CF, GM 및 EM에 높은 감수성을 보인 반면, C 및 TE에 높은 내성을 나타내었다고 보고하였다.

근년 Sorum과 Labe-Lund [37]은 식품관련 *Listeria spp* 1001주 중 0.5%가 시험한 8종의 항생물질에 대하여 내성을 나타내었다고 하였고, Aureli *et al.* [6]은 식품유래 *L. monocytogenes* 148주에 대한 감수성 시험에서 가축 및 사람의 치료에 흔히 사용되는 항생물질인 AN, GM, KM, tobramycin (NN), amoxicillin (AmC), EM, rifampicin (RA), vancomycin (VM)에 감수성을 나타낸 반면, 계육 유래 균 (각 1.9, 49.1 및 75%)의 많은 균주는 SM, C 및 EM에 대하여, 그리고 훈연연어고기, 우유 및 연치즈 유래 균 (각 50 및 94.5%)이 EM에 대하여 중등도의 감수성을 보이며, fosfomycin(FOS), lincomycin 및 flumequine에 높은 내성을 나타내었다고 하였다. 또한 Vela *et al.* [38]은 면양의 뇌척수뇌막염에서 유래한 *L. monocytogenes* 41주에 대한 감수성 시험에서 PC, AM, CF, EM, VM, RA, GM, KM, trimethoprim, sulfisoxazole, C 및 ciprofloxacin에 감수성을 보인 반면, TE(7.3%)과 doxycycline(4.9%)에 내성을 나타내었다고 하였다. 이상의 여러 연구자들의 보고를 통하여 볼 때 균 분리연도, 분리지역, 분리유래, 균주의 수, 항생물질의 종류, 약제 감수성 시험방법 등 여러 조건에 따라 다소간의 차이는 있겠으나, 약제의 종류에 따른 내성균의 변동추세는 거

의 비슷한 경향이였다. 또한 내성유형을 조사한 결과 모든 균주가 14종류의 항생물질 중 1제 혹은 2제 이상에 내성을 나타내어 모두 7종류가 분리되었다. 이들 가운데 3제내성형(CL-OTC-TE)을 나타낸 균이 42.8%로서 다른 내성유형에 비하여 현저하게 높은 분포를 나타내었다(Table 5). 한편, 3제내성 이상을 나타낸 *L. monocytogenes* 97주에 대하여 plasmid를 분리한 바 plasmid를 보유하고 있는 14주(14.4%) 중 1주가 11 및 8 kb 크기의 2종 plasmid를, 그리고 13주가 11 kb의 단일 plasmid를 보유하고 있었다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 항생물질에 대한 내성을 나타낸 모든 균주가 plasmid를 보유하고 있지 않는다는 것을 시사하는 것이다. 강 등 [2]이 축산식품 및 사료 유래 *L. monocytogenes* 42주 중 21.4%가 plasmid를 보유하여 54 및 58 kb의 단일 plasmid를 보유하고 있다는 성적에 비하여 본 연구에서는 plasmid 보유율이 약간 낮았고, plasmid 크기도 차이가 있었다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 균의 plasmid 보유율은 비교적 낮은 편이나, 다른 종류의 plasmid를 가진 균이 분포하고 있는 것으로 추측된다. 따라서 향후 *L. monocytogenes*의 내성 증가에 따른 plasmid 보유상태를 분석하고, 어떤 항생물질의 내성인자에 기인된 것인지에 대한 연구가 계속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

리스테리아증에 대한 역학적 연구의 일환으로 식육, 계육, 원유 및 작업장환경에서 유래한 *L. monocytogenes*에 대한 serotype 분포, 항생물질에 대한 감수성 및 plasmid profile을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

*L. monocytogenes*의 serotype 분포는 1/2b가 57.9%(81주)로 가장 높은 빈도를 나타내었고, 1/2a는 20주(20%), 4b는 14주(11.4%), 1/2c, 3b 및 4c는 각 4주(2.9%), 4d는 1주(0.7%) 이었다. 이들 중 serotype 1/2b, 1/2a 및 4b는 각 유래균에서 현저하게 높은 분포를 나타내었고, 특히 serotype 1/2b는 모든 유래에서 다른 serotype에 비하여 유의하게 높았고, 축산물과 작업장 유래균의 serotype 간에는 유의한 차이를 보이지 않았다. 원유 및 돈육 유래에서는 serotype 4b가, 그리고 우유, 계육 및 도축장 유래에서는 1/2b 및 1/2a가 현저히 높은 빈도를 나타내었다.

L. monocytogenes 145균주의 14종 항생물질에 대한 감수성은 disk diffusion method에 의해서 측정하였다. 모든 균주는 AN, AM, CF, C, GM, KM, NM 및 PC에 대하여 감수성을 나타내었으나, CL(100%), OTC(44.8%) 및 TE(43.4%)에 높은 내성을 보였다. 유래균의 serotype 분포와 TE 내성간에 유의한 차이를 나타내었다. 항생물

질에 대한 내성형은 모두 7종이 분리되었고, 이들 중 CL-OTC-TE 3제내성형(42.8%)이 가장 높은 분포를 나타내었다. Plasmid는 *L. monocytogenes* 97주 중 14주(14.4%)에서 분리되었고, 도계장 유래균 1주에서 8 Kb와 11 kb 크기의 2종 plasmid가 검출되었고, 13주에서는 11 kb의 단일 plasmid가 분리되었다.

참고문헌

1. 강호조, 손원근, 강광식. 동물유래 생식품, 사료 및 분변중 *Listeria monocytogenes*의 분포와 특성에 관한 연구 1. 원유, 식육, 계육 및 동물분 변에서 *L. monocytogenes*의 분포. 한국수의공중보건학회지. 1991, **15**, 231-237.
2. 강호조, 손원근, 이재용. 동물유래 생식품, 사료 및 분변중 *Listeria monocytogenes*의 분포와 분리균의 특성에 관한 연구 3. 분리균의 약제감 수성 및 plasmid profile. 한국수의공중보건학회지. 1993, **17**, 39-44.
3. 강호조, 김용환, 손원근. 식중독균의 정량시험에 의한 시판식육 및 계육의 오염도 평가. 한국식품위생안전성학회지. 2000, **15**, 204-208.
4. 손원근, 강호조. 도계장유래 닭고기와 부산물 및 환경재료에서 *Listeria spp*의 분리 및 분리균의 특성 II. 분리한 *L. monocytogenes*의 혈청형과 항균제에 대한 감수성. 대한수의학회지. 1991, **32**, 279-284.
5. 홍중해, 안상철. 돈육가공장 작업환경에서 *Listeria monocytogenes*의 분리와 혈청형 분포조사. 한국식품안전성학회. 1998, **13**, 425-429.
6. Aureli, P., Ferrini, A. M., Monnoni, V., Hodzic, S., Wedell-Weergard, C. and Oliva, B. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. Int. J. Food Microbiol. 2003, **83**, 325-330.
7. Baloga, A. and Harlander, S. K. Comparison of methods for discrimination between strains of *Listeria monocytogenes* from epidemiological surveys. Appl. Environ. Microbiol. 1991, **57**, 2324-2331.
8. Barbuti, S., Maggi, A. and Casoli, C. Antibiotic resistance in strains of *Listeria spp* from meat products. Lett. Appl. Microbiol. 1992, **15**, 56-58.
9. Barry, A. I. and Thomsberry, C. Susceptibility testing; diffusion test procedure, p. 436. In Lennette, E. H., Ballows, A., Hausler, W. J. and Truant, J. P. (Eds.), Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington D. C. 1980.
10. Biavasco, F., Giovannetti, E., Miale, A., Vignaroli, C., Facinelli, B. and Valardo, P. E. In vitro conjugative transfer of van A vancomycin resistance between Enterococci and *Listeriae* of different species. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, **15**, 50-59.
11. Brett, M. S. Y., Short, P. and McLauchlin, J. A small

- outbreak of listeriosis associated with msoked mussels. Int. Food Microbiol. 1998, **43**, 223-229.
12. **El-shenawy, M. A. and Marth, M. A.** Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid. J. Food Protect. 1988, **51**, 842-844.
 13. **Facinelli, B., Giovanetti, E., Varaldo, O. E., Casolar, P. and Fabio, U.** Antibiotic resistance in foodborne *Listeria*. Lancet. 1991, **338**, 1272.
 14. **Farber, J. M. and Peterkin, P. I.** *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. 1991, **55**, 476-511.
 15. **Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V. and Reingold, A. S.** Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N. Engl. J. Med. 1985, **312**, 404-407.
 16. **Franco, C. M., Quinto, E. J., Fento, C., Rodriguez, J. L., Dominguez, L. and Cepeda, A.** Susceptibilities of *Listeria* species isolated from food to nine antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 1994, **38**, 1655-1657.
 17. **Gellin, B. G., Broome, C. V., Bibb, W. F., Weaver, R. E., Gaventa, S., Mascala, L. and the listeriosis study group.** The epidemiology of listeriosis in the United States-1986. Am. J. Epidemiol. 1991, **133**, 392-401.
 18. **Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moyse, C., Dehaut, P., Salvat, G. and Veit, P.** Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillets in France in 1993. J. Infect. Dis. 1998, **177**, 155-160.
 19. **Ho, J. L., Shands, K. N., Friedland, G., Eckind, P. and Fraser, D. W.** An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. Arch. Intern. Med. 1986, **146**, 520-524.
 20. **ICMSF.** Choice of sampling plan and criteria for *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 1994, **22**, 89-94.
 21. **Inoue, S., Nakama, A., Arai, Y., Koknko, Y., Maruyama, T., Saito, A., Yoshida, T., Terao, M., Yamato, S. and Kumagai, S.** Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail food in Japan. Int. J. Food Microbiol. 2000, **59**, 73-77.
 22. **Jones, E. M. and MacGowan, A. P.** Antimicrobial chemotherapy of human infection due to *Listeria monocytogenes*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1995, **14**, 165-175.
 23. **Kolstad, J., Rorvik, L. M. and Granum, P. E.** Characterization of plasmids from *Listeria* spp. Int. J. Food Microbiol. 1990, **12**, 123-132.
 24. **Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. L., Gouled, V., May, S., Salminen, C., Hird, D. W., Yonekura, M. L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L., Kleks, K. and Broome, C. V.** Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. N. Engl. J. Med. 1988, **319**, 832-828.
 25. **McLauchlin, J.** Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. Eur. J. Clin. Microbiol. 1990, **9**, 210-213.
 26. **MoLauchlin, J., Greenwood, M. H. and Pini, P. N.** The occurrence of *Listeris monocytogenes* in cheese from a manufacture associated with a case of listeriosis. Int. J. Food Microbiol. 1990, **10**, 255-262.
 27. **Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., Trieu-Cuot, P., Courtieau, A. L. and Courvalin, P.** Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. Lancet. 1990, **335**, 1422-1426.
 28. **Rocourt, J.** Human listeriosis-1989. WHO/HPP/FOS/9.3 World Health Organization, Geneva.
 29. **Rota, C., Yanguela, J., Blanco, D., Juan, J., Arino, C. A. and Herrera, A.** High prevalence of multiple resistance to antibiotics in 144 *Listeria* isolates from spanish dairy and meat products. J. Food Protection. 1996, **59**, 938-943.
 30. **Sambrook, J. Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** Small-scale preparation of plasmid DNA. pp. 125-128. In: Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd. ed. CSH, USA. 1989.
 31. **Schlech, W. F., Lavigene, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S. and Broome, C. V.** Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med. 1983, **308**, 203-206.
 32. **Schwartz, B., Hwxtter, D. Broom, C. V., Hightower, A. W., Hirschhorn, R. B., Porter, J. B., Hayes, P. S., Bibbs, W. F., Larber, B. and Faris, D. G.** Investigation of an outbreak of listeriosis; new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infection. J. Infect. Dis. 1989, **159**, 680-685.
 33. **Schuchat, A., Swaminathan, B. and Broome, C. V.**

- Epidemiology of human listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 1991, **4**, 169-183.
34. **Senette, R. W. and Weaver, R. E.** Serodiagnosis of *Listeria monocytogenes*. FDA Bacteriological Analytical Manual. 8th. ed. chap. **11**, 1995.
35. **Simon, M. and Ferrer, M. D.** Initial numbers, serovars and phagevars of *Listeria monocytogenes* isolated in prepared foods in the city of Barcelona (Spain). Int. J. Food Microbiol. 1998, **44**, 141-144.
36. **Slade, P. J. and Collins-Thompson, D. L.** *Listeria*, plasmids, antibiotic resistance and food. Lancet. 1990, **336**, 1004-1008.
37. **Sorun, H. and Labe-Lund, T. M.** Antibiotic resistance in food related bacteria- a result of genetics. Int. J. Food Microbiol. 2002, **78**, 43-56.
38. **Vela, A. I., Fernandez-Garayzabal, J. F., Latre, M. V., Rodriguez, A. M., Dominguez, L. and Moreno, M. A.** Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from meningoencephalitis in sheep. Int. J. Antimicrobial Agents, 2000, **17**, 215-220.
39. **Varughese, P. V. and Carter, A. W.** Human listeriosis in Canada-1988. Can. Dis. Weekly Rep. 1989, **15**, 213-217.
40. **Wong, H. C., Chao, W. L. and Lee, S. J.** Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan. Appl. Envir. Microbiol. 1990, **56**, 3101-3104.