한국가축위생학회지 제33권 제2호 (2010)
Korean J Vet Serv 33(2) : 143~149 (2010)

가축에서 테트라사이클린 내성 장구균 조사 및 분자생물학적 특성규명

김철민* · 강수진 · 이병종 · 이성재 · 육대수
전라북도축산위생연구소

(접수 2010. 5. 19, 게재승인 2010. 6. 8)

Prevalence and molecular characterization of tetracycline-resistant *Enterococcus* isolates from livestock

Chul-Min Kim*, Su-Jin Kang, Beyong-Jong Lee, Sung-Jae Lee, Dae-Su Yuk
Institute of Livestock and Veterinary Reserach, Jangsu 597-803, Korea

(Received 19 May 2010, accepted in revised from 8 June 2010)

Abstract

BIn the present study, *Enterococcus* isolates originating from livestock were studied for the phenotypic and genotypic assessment of tetracycline resistance. A total of 74 isolates encompassing the species *Enterococcus faecalis* (n=12) and *E. faecium* (n=62) displayed phenotypic resistance to tetracycline. Tetracycline resistance gene [*tet* (M), 1,886bp] were sequenced by dye terminator cycle sequencing method and compared with *tet* (M) sequences available from the GenBank database. Sequencing analysis of PCR amplicons showed high homology to the reference strains ranging 97.2~100%. The *tet* (M) genes were divided into three major subgroups according to phylogenetic analysis. The genetic information obtained from this study could be useful for the molecular study of enterococci.

Key words : *Enterococcus*, *tet* (M), Tetracycline, Resistance, Phylogenetic analysis

서 론

Terococci는 catalase음성, 그람양성구균으로 사람이나 동물의 장내 정상 세균총으로 존재하며 병원성이 약하거나 감염병과의 연관성이 적은 것으로 알려져 있었으나 최근에는 항생제 내성을 지닌 장구균이 증가하면서 병원감염의 주요 원인균으로 중요한 비중을 차지하게 되었다(Facklam과 Sahm, 1995). 항생제 내성 문제는 국내뿐만 아니라 세계적으로 사람에서 적절한 치료제 부재로 사회적인 문제가 되고 있으며, 축산 분야에서도 지금까지 항생제 오남용으로 가축의 질병 치료에 어려움이 많은 실정이다(하 등, 2003).

*E. faecalis*는 원내감염 장구균 중 85~89%로 가장 흔하게 분리되며, *E. faecium*의 경우 10~15%, 기타 *E. durans, E. gallinarum* 및 *E. casseliflavus* 등이 5% 이하로 분리되고 있다(Ruoff 등, 1990). 이와 같이 *E. faecalis*와 *E. faecium*은 원내 감염의 주 오염원으로 작용하며, 이들 균중 내성균은 특히 공중보건학적으로 문제가 된다. 국내에서도 장구균의 분리율이 증가하여 정 등(1995)의 보고에 따르면 장구균이 전체 분리균 중 13%로 제3위를 차지하였으며, 미국의 경우에도 원내 감염 병원성균 중 두 번째로 많이 분리되었다. 이들 장구균의 경우 많은 종류의 항생제에 높은 내성을 나타내고 있으며 그중에서도 테트라사이클린에 대한 내

*Corresponding author: Chul-Min Kim, Tel. +82-63-290-5374, Fax. +82-63-290-5413, E-mail. vetgene@korea.kr

성이 가장 높은 것으로 알려져 있다(김 등, 2007; 임 등, 2007a, 2007b).

사람과 동물에 분포하는 일부 세균은 숙주 특이성이 높지만, 정상세균총의 균은 사람과 동물에서 매우 밀접한 관계를 가지므로 이러한 균의 내성 유전자는 사람이나 다른 동물에 내성을 전달하는 주요 원인이 된다(Chopra와 Roberts, 2001). 테트라사이클린에 강한 내성을 나타내는 *tet*(M) 유전자는 Tn916/Tn1541 family와 같은 접합성 트랜스포존과 관련하여 발견되었으며(Rice, 1998), *Clostridium difficile*의 경우 Tn5397과 같은 다른 종류의 접합성 트랜스포존에서도 발견되었다(Roberts 등, 2001). *Tet*(M) 유전자는 사람, 돼지와 닭으로부터 분리한 *E. faecalis*와 *E. faecium*의 95%에서 검출되었으며(Aarestrup 등, 2000), 이들 뿐만 아니라 42속의 그람 음성 또는 양성균 내에서도 발견 되었다(Roberts, 2005). Gevers 등(2003)은 마른 소시지에서 분리한 *Lactobacillus tet*(M) 유전자를 제한효소분석과 단편 염기서열분석을 통하여 2가지 형태의 다른 대립유전형이 존재한다고 보고하였으며, Huys 등(2004)은 장구균 *tet*(M) 유전자의 염기서열 및 계통수 분석을 통하여 이들을 4개의 그룹으로 분류하였다. 이와 같이 최근 국외에서 테트라사이클린 내성 *tet*(M) 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만, 국내에서는 식육 및 가축분변에서 장구균 내성에 대한 연구는 vancomycin 내성에 대한 연구가 대부분을 차지하고 있으며, 테트라사이클린 내성 *tet*(M) 유전자에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 식육과 분변에서 테트라사이클린에 내성을 나타내는 *E. faecalis*과 *E. faecium*을 분리하여 테트라사이클린 내성현황을 조사하고 *tet*(M) 유전자의 염기서열을 구명하여 얻어진 결과를 외국 분리주와 비교 분석하여 분자생물학적 기초자료를 획득하기 위한 일련의 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

시료채취

식육에서의 시료채취는 전라북도 내 도축장에서 도축되어 예냉 후 12시간 이상이 경과한 소 · 돼지 도체 표면에서 swab법으로 시료채취 하였다. 채취방법은 멸균 거즈를 10ml Butterfield's phosphate buffered dilution water (BPD) 희석액에 담근 후 멸균장갑을 끼고 $10 \times 10cm^2$용 시료채취틀을 사용하여 도체 중 미생물 오염률이 가장 높은 3개 부위(소: 옆구리, 둔부, 흉부; 돼지: 복부, 둔부, 턱)에서 무균적으로 가로, 세로 10회씩 문지른 다음 BPD 희석액을 가하여 최종용량이 40ml 되게 한 후 냉장상태를 유지하여 12시간 내에 실험실로 운반하였다. 닭의 경우 도계장에서 도계 후 냉각된 도계육을 대상으로 마리당 멸균 생리 식염수 400ml에 침적시킨 다음 식염수액을 채취하여 장구균 분리에 사용하였다. 분변에서의 시료채취는 도축장(도계장)에서 소, 돼지의 경우 도축가축의 결장 내용물을 그리고 닭 분변은 맹장 및 장 내용물을 채취하였다(국립수의과학검역원, 2008; 농림수산식품부와 국립수의과학검역원, 2007).

균 분리

도체 시료는 현탁액 1ml를 azide dextrose broth (Becton Dickinson, France) 9ml에 접종하여 36℃ 48시간 증균 배양한 후 enterococcosel agar(EA, Becton Dickinson)에 37℃에서 18~24시간 배양하였으며, 분변은 증균 배양 없이 직접 EA에서 배양하였다. EA에서 3~5개의 검은색 집락을 선별하고 다시 EA에 도말하여 24시간 배양한 후, 단독 집락을 선발하여 Brain heart infusion (BHI) broth (Becton Dickinson)에 37℃, 18~24시간 순수분리 배양하고, 그람염색에서 양 다및 cat Dase검사에서 음성인 집락은 최종적으로 polymerase chain reaction (PCR)법으로 확인하였다(Dutka-Malen 등, 1995).

테트라사이클린 감수성 검사

테트라사이클린 감수성 검사 방법은 Kirby-Bauer disk diffusion법(Bauer, 1966)으로 검사하였으며 테트라사이클린 disc (30μg/disc)는 Becton Dickinson (BBL Sensi-Disk)에서 구입하여 사용하였다. 최종 확인된 장구균은 1개의 집락을 mueller-hinton (MH) broth (Becton Dickinson)에 접종하여 37℃에서 24시간 배양 후 0.5 McFarland 농도로 조정하였으며 MH agar (Becton Dickinson)에 도말한 후 disc를 37℃에서 16~18시간 배양한 후 판독하였다. 판독은 Criteria Laboratory Standard Institute 기준(NCCLS, 2004)에 의하여 실시하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)

순수분리한 균주는 BHI broth에 접종하여 37℃에서 18시간 배양된 균액을 12,000×g, 5분간 원심침전한 후 증류수로 2회 세척한 다음, 증류수로 재 부유시켜 100℃에서 10분간 가열한 후 상층액을 취하여 4℃로 보관하면서 template DNA로 사용하였다.

균 동정을 위한 PCR은 Dutka-Malen 등(1995)이 보고한 방법에 의해서 실시하였으며, 테트라사이클린 내성 *tet* (M) 유전자염기서열 분석을 위한 primer 설계 및 PCR 반응은 전체 염기서열을 3부분으로 나누어 실시하였다(Table 1). PCR 반응을 위해 Prime Taq Premix (Genet Bio, Korea)를 사용하였다. 반응액은 추출한 template DNA를 1μl, 각 10pmol/μl의 primer 1μl를 첨가하고 최종 부피는 DNase water로 최종부피가 25μl 되게 첨가하였다. PCR 반응조건은 PTC-200(MJ Research, USA) 기기를 사용하여 초기 denaturation은 95℃에서 5분간하였고, 95℃에서 40초, 55℃에서 60초, 72℃에서 1분간의 사이클을 35회 반복한 후, 72℃에서 7분간 더 반응시켰다. PCR을 수행한 후 ethidium bromide (0.5μg/ml)가 함유된 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 자외선을 조사하여 band의 유무를 확인하였으며 size marker로는 100bp ladder (Bionics, Korea)를 사용하였다.

DNA Cloning과 염기서열 분석

테트라사이클린에 내성을 나타내는 분리주 중 돼지에서 분리한 *E. faecalis*와 닭에서 분리한 *E. faecium*을 염기서열 분석의 시료로 사용하였다. 또한, 표준균주 *E. faecium* (ATCC51558)과 *E. faecalis* (ATCC29212)도 분리주와 같이 *tet* (M) 유전자염기서열 분석을 실시하였다. *Tet* (M) PCR 산물의 크로닝은 pGEM® T easy vector system (155mega, USA)를 사용하여 재조사의 술식에 따라 크로닝하였다. 재조합 클론에서 one step plasmid minipreparation방법을 사용하여 플라스미드를 추출하였으며(Qiagen, German), *EcoRI* (10U/μl, Gibco BRL)으로 37℃에서 1시간 반응하고 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 insert의 삽입 유무와 크기를 확인하였다. *tet* (M)의 유전자염기서열 결정은 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)으로 반응한 후 ABI PRISM 3130X1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 수행하였다. 분석한 유전자염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 네트워크 서버의 BLAST 검색을 이용하여 *tet* (M) 유전자염기서열과 유사성 행열을 구하였다. 이 연구에서 비교한 *tet* (M) 유전자들은 총 10주로 다음과 같다. *E. faecium* 18836-s-2 (DQ-223238), *E. faecalis* strain DS16 (M85225), *E. faecalis* 20074-s-1 (DQ223248), *E. faecalis* strain F01 (X92947),

Table 1. Primers for DNA sequencing of *tet* (M) gene

Primer	Sequence (5′-3′)	Product (bp)	Reference
TetM-FW1	TTGAATGGAGGAAAATCAC	735	10
TetM-RV1	ACCTCGATGTGTTGATGAAT		This study
TetM-FW2	TCAGAATTGTTCTCTGTTCCC	721	This study
TetM-RV2	AGATAAACCAATGGAAGCCC		This study
TetM-FW3	GTGCACTGTTGCAAGAAAAG	688	This study
TetM-RV3	TCTATCCGACTATTTGGACG		This study

Table 2. Isolation and identification of *E. faecalis* and *E. faecium* in livestock

Animals	Sources	No. of samples	No. of isolates	
			E. faecium	*E. faecalis*
Cattle	Feces	30	1	1
	Meat	30	1	0
Pigs	Feces	30	8	7
	Meat	30	1	0
Chickens	Feces	70	46	0
	Meat	60	5	4
Total	Feces	130	55	8
	Meat	120	7	4
		250	62	12

E. faecium 9830409-1(DQ223244), *Staphylococcus aureus* strain 2952(AY057894), *Streptococcus pneumoniae* BM4200(AM889142), *Clostridium septicum Kagoshima* 6(AB054984), *C. difficile* cd53(AJ973139). 염기서열분석 및 유사한 염기서열들은 Clustal W 연산을 이용하여 다중정렬 하였으며 MEGA version 4 (Tamura 등, 2007)를 이용하여 계통수를 작성하였다. 유전적 계통도(phylogenetic tree)는 Neighbour-joining algorithm (Saitou와 Nei, 1987)을 이용하여 추론하였고 진화적 거리 행렬은 Tamura 등(2004)의 Maximum Composite Likelihood method를 이용하여 구하였다. 작성한 tree의 위상은 MEGA version 4의 SEQBOOT과 CONSENSE option을 이용하여 neighbour-joining method의 1,000회 resampling을 통한 bootstrap 분석으로 평가하였다(Felsenstein, 1985).

결 과

균 분리 및 테트라사이클린 감수성 검사

식육 및 분변에서 *E. faecium*과 *E. faecalis* 분리 결과는 Table 2와 같다. 소, 돼지, 닭에서 채취한 250개의 시료에서 62주의 *E. faecium*를 분리하였으며 그 중 식육에서 7주(소 1, 돼지 1, 닭 5), 분변에서 55주(소, 1, 돼지 8, 닭 46)를 분리하였다. *E. faecalis*의 경우 12주를 분리하였으며 그 중 식육에서 4주(닭 4), 분변에서 8주(소 1, 돼지 7)를 분리하였다(Table 2). 분리한 74주를 대상으로 테트라사이클린 내성 검사를 실시한 결과 감수성 5주(6.8%), 중간내성 6주(8.1%), 내성 63주(85.1%)로 나타났다(Table 3).

Tet (M) 유전자 염기서열 분석

염기서열 분석을 위하여 설계한 3쌍의 primer를 이용하여 테트라사이클린에 내성을 보인 *E. faecium*과 *E. faecalis* 분리주에 대해 PCR을 실시한 결과, 모든 분리주에서 각각의 증폭밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이 실험에서 분리된 *E. faecium*과 *E. faecalis*의 전체 1920bp의 *tet* (M) 유전자 중 1,886bp의 유전자 단편을 Dye terminator cycle sequencing법에 의해서 염기서열을 결정하여 기존에 검출된 국외 분리주와 비교 분석하였다. *E. faecalis* ATCC29212는 *E. faecalis* 20074-s-1(DQ223248)와 99.9%의 상동성을 나타냈으며, *E.*

Table 3. Antibiotic resistance frequency of *Enterococcus isolates* originating from livestock

Animals	No. of isolates	No. (%) of susceptibility		
		Susceptible	Intermediate	Resistant
Cattle	3	2 (66.7)	0 (0.0)	1 (33.3)
Pigs	16	2 (12.5)	3 (18.8)	11 (68.7)
Chickens	55	1 (1.8)	3 (5.5)	51 (92.7)
Total	74	5 (6.8)	6 (8.1)	63 (85.1)

Table 4. Homology comparison of *E. faecalis* and *E. faecium tet* (M) gene fragment (1886bp) sequences

Sequence	% identity or No. of nucleotide differences												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		97.1	92.2	94.3	94.2	94.2	99.9	94.2	94.3	95.1	99.7	99.7	95.4
2	55		93.3	97.2	95.0	95.0	97.2	95.0	97.2	95.5	97.0	97.1	92.7
3	148	127		93.5	97.8	97.8	92.2	97.8	93.5	96.8	92.2	92.3	92.7
4	107	53	123		95.2	95.2	94.4	95.2	100	95.7	94.5	94.4	97.0
5	109	94	41	90		100	94.2	100	95.2	98.9	94.3	94.3	94.5
6	109	94	41	90	0		94.2	100	95.2	98.9	94.3	94.3	94.5
7	2	53	148	105	109	109		94.2	94.4	95.2	99.8	99.8	95.5
8	109	94	41	90	0	0	109		95.2	98.9	94.3	94.3	94.5
9	107	53	123	0	90	90	105	90		95.7	94.5	94.4	97.0
10	93	84	61	82	20	20	91	20	82		95.2	95.3	95.0
11	5	56	147	104	108	108	3	108	104	90		99.6	95.5
12	6	55	146	105	107	107	4	107	105	89	7		95.3
13	87	79	138	56	104	104	85	104	56	94	84	89	

Percentages of identity between *tet* (M) gene fragment sequences are shown in the upper matrix. The lower matrix shows numbers of nucleotide differences. The following sequences were compared: 1. ATCC29212 (*E. faecalis*), 2. *E. faecalis* (pigs isolate), 3. ATCC51558 (*E. faecium*), 4. *E. faecium* (chickens isolate), 5. DQ223238 (*E. faecalis*), 6. M85225 (*E. faecalis*), 7. DQ223248 (*E. faecalis*), 8. X92947 (*E. faecalis*), 9. DQ223244 (*E. faecium*), 10. AY057894 (*S. aureus*), 11. AM889142 (*S. pneumoniae*), 12. AB054984 (*C. septicum*), 13. AJ973139 (*C. difficile*)

faecium ATCC51558는 *E. faecium* 18836-s-2 (DQ-223238), *E. faecalis* strain DS16 (M85225), *E. faecalis* strain F01(X92947)와 97.8%의 상동성을 나타내었다. 분리주의 경우, 돼지분변에서 분리한 *E. faecalis*는 *E. faecalis* 20074-s-1(DQ223248)과 *E. faecium* 9830409-1 (DQ223244) 염기서열과 97.2% 상동성을 나타냈으며, 닭에서 분리한 *E. faecium*은 *E. faecium* 9830409-1(DQ223244)과 100% 일치성을 나타냈다(Table 4).

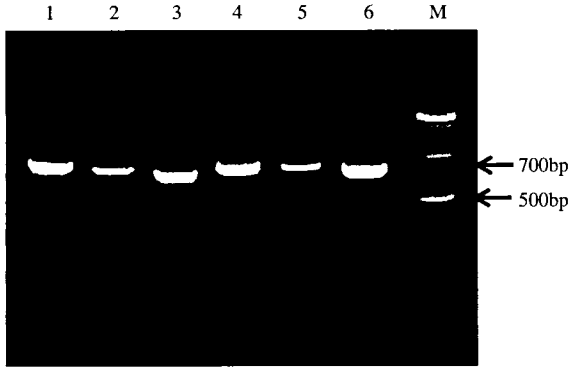

Fig. 1. Amplification of *tet* (M) gene of *E. faecalis* and *E. faecium* for the sequence analysis by PCR using three pairs of primers. Lane 1: *E. faecalis* (TetM-FW1 and TetM-RV1 primers, 735bp), lane 2: *E. faecalis* (TetM-FW2 and TetM-RV2 primers, 721bp), lane 3: *E. faecalis* (TetM-FW3 and TetM-RV3 primers, 685bp), lane 4: *E. faecium* (TetM-FW1 and TetM-RV1 primers, 735bp), lane 5: *E. faecium* (TetM-FW2 and TetM-RV2 primers, 721bp), lane 6: *E. faecium* (TetM-FW3 and TetM-RV3 primers, 685bp), M: 100bp DNA ladder marker.

Phylogenetic tree 분석

본 연구에서 얻어진 *E. faecalis*와 *E. faecium* 테트라사이클린 내성 *tet* (M) 유전자 염기서열과 GenBank에 보고된 여러 균주의 자료를 토대로 계통수를 작성하였다. 작성된 계통수는 3개의 주요한 그룹으로 분류 됐으며, 그룹 1은 *E. faecalis* (ATCC29212), *E. faecalis* (DQ-223248), *S. pneumoniae* (AM889142), *C. septicum* (AB054984), *E. faecalis* (pigs isolate)을 포함하고 있고, *E. faecium* (DQ223244), *E. faecium* (chickens isolate), *C. difficile* (AJ973139)는 그룹 2, *E. faecium* (ATCC-51558), *E. faecalis* (X92947), *E. faecalis* (M85225), *E. faecium* (DQ223238), *S. aureus* (AY05894)는 그룹 3으로 분류되었다(Fig. 2).

고 찰

축산 분야에서 항생제 오남용으로 인하여 가축 질병 치료에 어려움이 증가하면서 내성균 조사의 중요성이

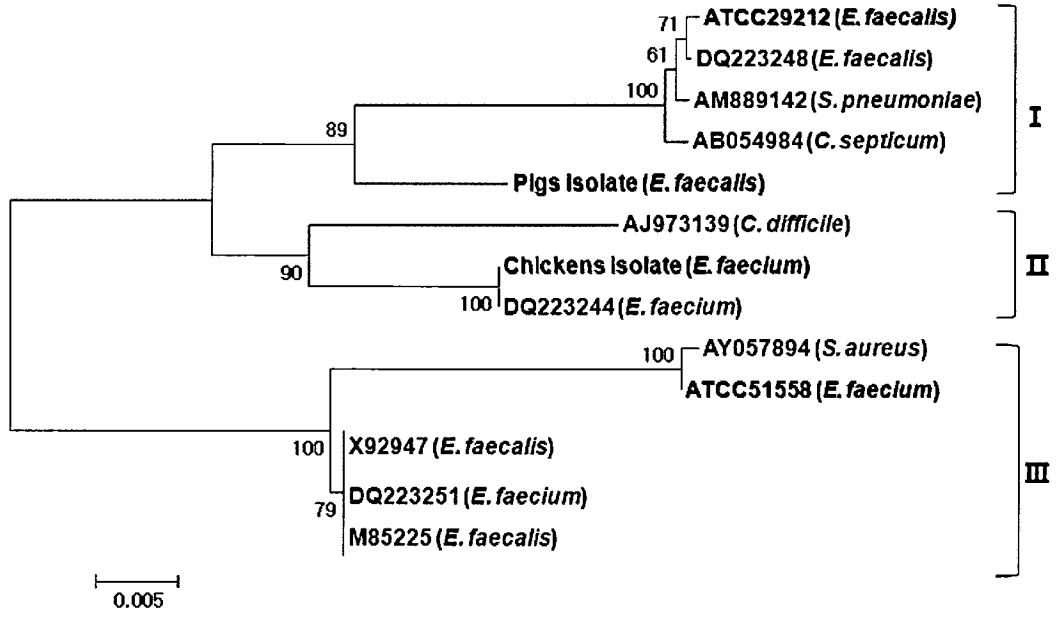

Fig. 2. Phylogenetic tree of *tet* (M) sequences in comparison with *tet* (M) sequences deposited in the GenBank database. The optimal tree with the sum of branch length=0.13335252 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.

커지고 있으며 최근 이러한 내성균의 증가는 공중보건학적인 측면에서 중요하게 부각되고 있다. 본 연구는 가축의 분변 및 도체에서 분리한 장구균의 테트라사이클린에 대한 내성현황을 조사하였으며 테트라사이클린에 내성을 나타내는 유전자인 *tet*(M) 유전자의 분자유전학적 특성 규명을 국내에서 처음으로 시도하였다.

항생제내성균 실태조사에 대한 국내연구 중 조 등(2003)의 연구에서 조사한 동물 내장 및 분변(n=202)으로부터 고농도 vancomycin에 내성을 보이는 균주는 확인되지 않았지만, 테트라사이클린에 78%가 내성을 나타내는 것으로 보고되었고, 다른 연구에서는 분변 유래 *E. faecium*의 테트라사이클린에 대한 내성은 소 45.7%(n=35)(임 등, 2007a), 돼지 57.9%(n=266)(임 등, 2007b), 닭 66.4%(n=122)(김 등, 2007)로 보고되었으며, 분변 유래 *E. faecalis*는 소 62.2%(n=37)(임 등, 2007a), 돼지 98.7%(n=150)(임 등, 2007b), 닭 85.9%(n=92)(김 등, 2007)로 나타났다. 이 연구에서는 가축의 분변 및 도체에서 분리한 74주에서 테트라사이클린 항생제 내성률은 중간내성을 포함하여 93.2%로 매우 높게 나타났으며 종래의 많은 항생제 내성 관련 연구결과와 비슷한 양상을 보였다(김 등, 2007; 임 등, 2007a, 2007b). 이는 하 등(2003)이 보고한 국내 축산 및 수산분야의 항생물질 사용실태 조사 결과를 미뤄보아 이들 계열이 사료첨가제 등으로 국내에서 많이 사용되었기 때문인 것으로 추측된다.

테트라사이클린 내성 *tet* (M) 유전자의 염기서열 분석에 대한 연구는 Aarestrup 등(2000), Agersϕ 등(2006) 및 Gevers 등(2003)에 의해 보고된 바 있다. 본 연구에서는 장구균 표준균주와 분리주를 대상으로 테트라사이클린 내성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 *tet*(M) 유전자의 1886bp염기서열을 국내에서 처음으로 결정하여 비교 분석하였다. 이 연구에서 분석된 2종의 표준균주와 2종의 분리균주는 국외 분리주와 최대 97.2%의 상동성을 나타내었다. 흥미롭게도 *E. faecium* 표준균주의 *tet* (M) 유전자염기서열은 *E. faecalis*와 97.2%의 가장 높은 상동성을 보였다. 이러한 결과는 *tet*(M) 유전자가 여러 경로를 통해 균주 간 이동이 가능하여 많은 그람 음성 및 양성균 사이에 널리 분포되어 있는 것으로 보아 *E. faecalis*와 *E. faecium*간에 *tet*(M) 유전자의 이동이 있었던 것으로 판단된다(Huys 등, 2004). 국내에서는 테트라사이클린 계열의 항생물질이 오랜 기간 다량으로 사용되어 국내 분리주에 대한 내성현황 및 대책수립을 위하여 향후 보다 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

이 연구에서 분리한 국내 분리주와 표준균주에 대한 *tet*(M) 유전자 계통수 분석으로 유전적 근연관계를 분석한 결과 3개의 주요한 그룹으로 분류하였다. *E. faecalis* pigs isolate의 경우 *E. faecalis* 표준균주, *S. pneumoniae, C. septicum*와 함께 그룹 I에 위치하였다. *E. faecium* chickens isolate는 *C. dificile*의 Tn 5397 관련 tet(M)과 같은 그룹에 속해있으며 이 결과는 Agersϕ 등(2006)의 연구에서 분석한 *E. faecium* (DQ223244)과 100% 상동성을 보였다. 그룹 III은 *E. faecium, E. faecalis*와 더불어 *S. aureus*가 같은 그룹을 형성하였다. 위와 같은 3개의 그룹으로의 형성은 *tet*(M) 유전자가 포함되어 있는 conjugative elements에 따른 것으로 알려져 있으며 국내 분리주와 표준균주에 분포하는 *tet*(M) 유전자도 Agersϕ 등(2006)의 연구결과와 유사하게 균주 간 광범위한 유전자 이동의 결과로 국내 분리주만의 동일 클러스터의 형성은 관찰되지 않았다. 본 논문 결과 분석한 각국의 분리주간의 다양한 유전적 상관관계는 국가 간 활발한 교역상황과 밀접한 연관성이 있을 것을 것으로 추정되나 더욱 정밀한 역학적 분석이 필요할 것으로 생각된다.

국내에서 처음으로 시도한 장구균의 *tet*(M) 유전자에 대한 염기서열 분석과 특성규명은 테트라사이클린 내성인자 연구에 기초 자료가 될 것으로 생각되어진다. 추후 *tet*(M) 유전자와 유사한 여러 종류의 테트라사이클린 내성 관련 유전자의 연구도 종합적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

식육 및 분변에서 테트라사이클린에 내성을 나타내는 *E. faecium*과 *E. faecalis*을 분리하여 *tet*(M) 유전자의 염기서열을 분석하였다. 본 연구 결과 도축(도계)장의 소, 돼지, 닭의 식육 또는 분변에서 250개의 시료를 채취하여 74주의 *E. faecium*과 *E. faecalis*를 분리하여 테트라사이클린 내성검사를 실시한 결과 감수성 5주(6.8%), 중간내성 6주(8.1%), 내성 63주(85.1%)로 나타났다. 2종의 국내분리주와 2종의 표준균주 염기서열 분석 6.8%, 설계한 3쌍의 *tet*(M) 유전자 primer를 이용, PCR 검사결과 각각의 특이 증폭밴드를 확인할 수 있었다. *Tet*(M) 유전자 염기서열 결과 *E. faecalis* 표준균주는 *E. faecalis* 20074-s-1 (DQ223248)와 99.9%, *E.*

faecium 표준균주는 *E. faecalis* 18836-s-2 (DQ223238), *E. faecalis* strain DS16 (M85225), *E. faecalis* strain F01 (X92947)와 97.8%의 상동성을 보였다. 돼지분변에서 분리한 *E. faecalis*는 *E. faecalis* 20074-s-1 (DQ223248)와 *E. faecium* 9830409-1 (DQ223244) 염기서열과 97.2%, 닭에서 분리한 *E. faecium*은 *E. faecium* 9830409-1 (DQ223244)과 100% 일치성을 나타냈다. 이 연구에서 분리한 국내 분리주와 표준균주에 대한 *tet* (M) 유전자 계통수 분석으로 유전적 근연관계를 분석한 결과 3개의 주요한 그룹으로 분류됨을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

국립수의과학검역원. 2008. 축산물의 가공기준 및 성분규격. 국립수의과학검역원 고시 제 2008-27호.

김애란, 조영미, 임숙경 허 문, 정우석, 정석찬, 권준헌. 2007. 가축 유래 지표 세균에 대한 항생제 내성 양상 조사. III. 닭 분변에서 분리한 대장균 및 장구균의 항생제 내성 양상 조사. 한국수의공중보건학회지 31(1): 41-49.

농림수산식품부, 국립수의과학원. 2007. 축산 항생제 내성균 감시체계 구축 교육. 국립수의과학원: 67-69.

임숙경, 이희수, 변정열, 박신영, 정석찬. 2007. 가축 유래 지표 세균에 대한 항생제 내성 양상 조사. I. 소 분변에서 분리한 대장균 및 장구균의 항생제 내성 양상 조사. 한국수의공중보건학회지 31(1): 21-29.

임숙경, 이희수, 변정열, 박신영, 정석찬. 2007. 가축 유래 지표 세균에 대한 항생제 내성 양상 조사. II. 돼지 분변에서 분리한 대장균 및 장구균의 항생제 내성 양상 조사. 한국수의공중보건학회지 31(1): 31-39.

정수현, 김세찬, 구석봉, 신종희, 서순팔, 양동욱. 1995. Vancomycin 내성 enterococci 감염 4예. 임상병리학회지 15: S265.

조윤상, 이희수, 김종만, 규판동, 박용호, 유한상, 이문한. 2003. 동물과 사람유래 Vancomycin 내성 장구균의 항균제 감수성 비교. 한국수의공중보건학회지 27(1): 17-29.

하준일, 홍기성, 송시욱, 정석찬, 민영식, 신형철, 이기욱, 임경종. 2003. 축산 및 수의분야의 항생물질 사용실태 조사. 한국수의공중보건학회지 27(4): 205-217.

Aarestrup FM, Agersϕ Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. Diagn Microbiol Infect Dis 37(2): 127-137.

Agersϕ Y, Pedersen AG, Aarestrup FM. 2006. Identification of Tn5397-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene *tet* (M) in enterococci from humans, pigs and poultry. J Antimicrob Chemother 57(5): 832-839.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Pathol 45(4): 493-496.

Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applicatons, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev 65(2): 232-260.

NCCLS. 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fourteenth informational supplement, M100-S14. NCCLS, Wayne, PA.

Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol 33(5): 1434.

Facklam RR, Sahm DF. 1995. *Enterococcus*. In: Murray PR. Manual of clinical microbiology. 6th ed. American Society for Microbiology: 308-314.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39(4): 783-791.

Gevers D, Danielsen M, Huys G, Swings J. 2003. Molecular characterization of *tet* (M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. Appl Environ Microbiol 69(2): 1270-1275.

Huys G, D'Haene K, Collard JM, Swings J. 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. Appl Environ Microbiol 70(3): 1555-1562.

Rice LB. 1998. Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother 42(8): 1871-1877.

Roberts AP, Johanesen PA, Lyras D, Mullany P, Rood JI. 2001. Comparison of Tn 5397 from Clostridium difficile, Tn916 from *Enterococcus faecalis* and the CW 459 *tet* (M) element from *Clostridium perfringens* shows that they have similar conjugation regions but different insertion and excision modules. Microbiology 147: 1243-1251.

Roberts MC. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol Lett 245(2): 195-203.

Ruoff K, Maza LL, Murtagh MJ, Spargo JD, Ferraro MJ. 1990. Species identification of enterococci isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 283(3): 435-437.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4(4): 406-425.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24(8): 1596-1599.

Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. PNAS 101(30): 11030-11035.