



## 축산물과 수산물에서 분리된 장구균의 항생제 감수성 및 유전형 분석

김윤정 · 오미현 · 김용훈 · 김순한 · 박건상 · 주인선\*

식품의약품안전처 미생물과

### Monitoring of Antimicrobial Resistance and Genetic Analysis of *Enterococcus* spp. Isolated from Beef, Pork, Chicken and Fish in Korea

Yoon Jeong Kim, Mi Hyun Oh, Yong Hoon Kim, Soon Han Kim, Kun Sang Park, and In Sun Joo\*

Food Microbiology Division, Ministry of Food and Drug Safety

(Received October 24, 2013/Revised March 7, 2014/Accepted August 27, 2014)

**ABSTRACT** - This study was performed to examine antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. strains from retail raw meat and fish products purchased in 2012. 43 *Enterococcus* spp. strains were isolated from a total of 207 samples (beef, pork, chicken, fish) with contamination rate of 20.8%. The isolated strains were identified as *E. faecalis* (22 strains), *E. gallinarum*, *E. hirae* (5 strains), *E. avium* (4 strains), *E. faecium* (3 strains), *E. duram*, *E. casseliflavus* (2 strains). Susceptibility to 10 antibiotics was tested, and the highest resistance was observed to tetracycline. And antimicrobial resistance rates were presented below 20% with most of the other antimicrobial agents. The isolated *Enterococci* from chicken showed higher resistance also to ciprofloxacin and erythromycin, not only to tetracycline, compared to the isolated *Enterococci* from beef, pork and fish. Sixteen isolates (37.2%) were sensitive to all antibiotics. Four isolates (9.3%) were resistant to 3 or more antibiotics. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) was not identified. According to the results of genetic similarity pattern analysis via PFGE and rep-PCR, *Enterococci* strains showed different patterns from these collected in 2011. This indicates that there is no genetic similarity among all the strains.

**Key words** : Enterococci, antimicrobial resistance, raw meat, fish, VRE

## 서 론

*Enterococcus*는 인간의 장내에서 서식하는 장내 정상 세균총 중 하나로 흔하게 식품, 식물, 물과 토양에서도 분리가 된다<sup>1)</sup>. 전 세계적으로 분리가 되는 *Enterococcus* spp.는 중요한 병원 감염균종의 하나로 알려져 있다<sup>2)</sup>. *Enterococcus* spp.는 병원감염을 야기 시키는 주요 임상 미생물로 대부분의 항생제에 자연내성을 지니고 있으며, 획득내성으로  $\beta$ -lactam 항생제와 아미노글리코사이드에 저도내성을 가지는 경우가 많다. *E. faecium*과 *E. faecalis*에서 글리코펩타이드계열 항생제의 대부분이 임상적으로 내성을 일으키며 획득내성 중 아미노글리코사이드에 대한 고도내성과 vancomycin 내성이 문제가 되고 있다<sup>3,4)</sup>. 여러 유전자에 의해 내성을 일으키는 vancomycin resistant enterococci (VRE)

는 감염치료에 제한을 두게 되어 주요한 문제가 되고 있으며, vancomycin 내성의 메카니즘으로는 acquired type (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*) 또는 intrinsic type (*E. gallinarum*과 *E. casseliflavus/flavescens* 종과 관련된 *vanC*) 중 하나로 설명이 된다<sup>5)</sup>. 항생제 내성 유전자의 전이는 유행성 균주의 단클론성 전이나 내성유전자의 균주 간 수평전이로 가능하다<sup>6)</sup>. 이러한 이유로 항생제 내성의 문제는 사람뿐만 아니라 축산분야에서도 내성 증가로 인한 가축의 질병 치료의 어려움을 겪고 있고 내성균의 사람에게로의 전달 가능성이 있어 공중보건학적으로 중요하게 대두되고 있다<sup>7)</sup>. 국내에서는 *Enterococci*에 관한 연구로 임상감체에서 VRE 분리 빈도와 분리된 VRE를 대상으로 항균제감수성 양상과 내성 유전자형을 규명하는 연구<sup>8)</sup> 및 VRE의 전파에 의한 감염을 막기 위해 감염관리연구<sup>9)</sup>등이 진행되고 있고, 식품검체에서는 축산물<sup>10,11)</sup>, 수산물<sup>12,13)</sup>, 곡물<sup>14)</sup>, 원유<sup>7)</sup>, 샐러드<sup>15)</sup> 등에서 분리한 *Enterococcus* spp.에 대하여 분리를 및 항생제내성 양상 및 오염도조사에 관한 연구들이 진행되고 있다.

\*Correspondence to: In Sun Joo, Osong Health Technology Administration Complex, 187, Osongsaengmyeong 2-ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, 363-700, Korea  
Tel: 82-43-719-4302, E-mail: jis901@korea.kr

본 연구는 시판되는 축산물과 수산물에서 분리한 *Enterococcus* spp.의 항생제 내성 여부 및 다제내성 실태를 모니터링하고, 항생제내성을 변화 추세를 분석하였다. 또한 항생제 내성에서 중요시 되고 있는 VRE 유전자 검출과 PFGE 및 rep-PCR 분석을 통한 유전적 상관성을 확인하여 *Enterococcus* spp.오염관리와 항생제내성 위해평가의 기초자료로 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 수집

실험에 사용된 재료들은 2012년 4월부터 7월 동안 기간 내 7차례에 걸쳐 전국 5권역 (서울/경기권, 충청권, 경상권, 전라권 및 강원권)의 슈퍼마켓, 대형마트, 도매시장, 횃집 등 총 29곳에서 구입을 하여 사용하였다. 구입한 시료들은 각 각 축산물인 소고기 52건, 돼지고기 54건, 닭고기 51건과 수산물인 횃감류 50건 (광어, 우럭, 도미 등), 총 207건을 구입하여 아이스박스에 넣어 4°C 이하로 하여 실험실로 5시간 이내에 운반한 후 *Enterococcus* spp.의 오염도 분석 및 항생제 검사를 실시하였다.

### *Enterococcus* spp. 분리 및 확인시험

*Enterococcus* spp.를 분리하기 위하여 멸균백에 채취한 검체 25 g을 6.5% NaCl을 포함한 Azide dextrose broth (Merck, Germany) 225 mL에 가하고 균질기(BagMixer 400W, Interscience™, France)에서 30초간 균질화 한 후 37°C에서 24시간 동안 증균 배양하였다. 증균 배양액을 Enterococcosel agar (BBL™, USA)에 희석도말하여 37°C로 24시간 배양 하였다. 배양 후 검은색 콜로니로 자란 집락을 선택하여 5% laked horse blood (Oxoid, UK)가 함유된 blood agar에 옮겨 37°C에서 24시간 배양하였다. 작은 gray 콜로니를 선택하여 VITEK compact 2 (Biomerieux, Inc., France)로 생화학동정을 하여 최종확인을 하였다.

### 항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험을 위해 디스크확산법(Disk diffusion method)을 사용하였으며 방법은 아래와 같다. 순수 분리된 *Enterococcus* spp.를 각각 Muller-Hinton agar (Oxoid)에 접종한 후 37°C에서 18시간 배양하였다. 배양된 콜로니를 선택한 후, 탁도기(Biomerieux)를 사용하여 0.5 McFarland 가 되도록 멸균생리식염수에 탁도를 맞추고 멸균면봉으로 균액을 묻혀 미리 조제된 4 mm 두께의 Muller-Hinton agar (Oxoid)의 전 표면에 균액을 고르게 도말하였다. 평판을 3 분간 말리고 15분 이내에 disc dispenser (Oxoid)를 이용하여 항생제 디스크(Oxoid)를 놓은 후 37°C에서 24시간 배양한 후 생육저지환의 직경을 캘리퍼(HANDO, Korea)를 사용하여 측정하였다. 사용한 항생제 디스크로는 ampicillin

(AMP, 10 µg, Oxoid), gentamycin (GM, 10 µg, Oxoid), amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 20/10 µg, Oxoid), ciprofloxacin (CIP, 5 µg, Oxoid), penicillin (P, 10 µg, Oxoid), rifampin (RD, 5 µg, Oxoid), erythromycin (E, 15 µg, Oxoid), vancomycin (VA, 30 µg, Oxoid), chloramphenicol (C, 30 µg, Oxoid), tetracycline (TE, 30 µg, Oxoid), 총 10종을 사용하였다. 저지환 직경에 따른 결과는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2004)에 준하여 감수성 여부를 판독하였다. 디스크확산법을 이용하여 VRE (Vancomycin-resistant enterococci)로 추정되는 항생제 내성 균에 대하여 최저생육저해농도(Minimum Inhibition Concentration, MIC)를 VITEK compact 2 (Biomerieux)용 AST-P580 card (Gram positive card, Biomerieux)를 사용하여 측정하였다.

### Vancomycin 내성유전자 확인

디스크확산법에 의한 내성검사 결과 주요 항생제 내성 균인 VRE로 추정되는 균주에 대해서 vancomycin 내성 균주에 가장 흔히 분포하고 있는 획득내성 유전자인 *vanA* gene, *vanB* gene, *vanC-1* gene 및 *vanC-2,3* gene을 multiplex PCR을 이용하여 확인하였다(Table 1)<sup>16,17</sup>. DNA추출은 DNA 추출 키트(UltraClean Microbial DNA Isolation kit, MO BIO Laboratories Inc., CA, USA)를 사용하여 유전자를 추출한 후 PCR template로 사용하였다. Template 5 µl를 PCR premix (AccuPower, BIONEER, Korea) 15 µl와 혼합하여 PCR system (PC818 PCR system, ASTEC, JAPAN)으로 94°C로 30초간 denaturation, 58°C로 1분 annealing, 72°C로 1분간 extension 하는 반응을 35회 반복 시행하였다. 증폭산물 10 µl를 2% agarose gel에 30분간 전기영동하여 증폭산물의 생성여부를 확인하였다<sup>18</sup>.

### 분리균주에 대한 유전자 상동성 확인 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

분리균주를 TSA (Difco)에 접종하여 35°C에서 18시간 배양하고 cell suspension TE buffer (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 7.5)에 현탁시켜 탁도가 MacFarland 15%가 되

**Table 1.** Sequence of oligonucleotide primers used for detecting *van* genes

Gene	Size (bp)	Oligonucleotide sequence
<i>vanA</i>	732	F 5'- GCATGGCAAGTCAGGTG -3'
		R 5'- GATTCCGTAICTGCAGCCT -3'
<i>vanB</i>	635	F 5'- ATGGGAAGCCGATAGTC -3'
		R 5'- GATTTCGTTCTCAGACC -3'
<i>vanC-1</i>	822	F 5'- GGTATCAAGGAAACCTC -3'
		R 5'- CTTCCGCCATCATAGCT -3'
<i>vanC-2,3</i>	439	F 5'- CTCCTACGATTCTCTTG -3'
		R 5'- CGAGCAAGACCTTAAAG -3'

도록 균 농도를 조절하여 균 현탁액 240  $\mu$ l와 Lysozyme solution 60  $\mu$ l를 섞은 후, 200  $\mu$ l만 취해 SSP solution (1.2% Seakem gold agarose, 10% sodium dodecyl sulfate, proteinase K)를 동량 혼합시켜 disposable plug mold (BIORAD, USA)에 분주하여 plug를 제작하였다. 제작한 plug는 cell lysis buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% sodium-lauroyl sarcosine) 1.5 mL과 proteinase K 11  $\mu$ l가 담긴 tube에 넣고 54°C에서 2시간 정치시키고 반응 종료 후 plug는 TE buffer로 20분씩 5회 세척하였다. plug를 2.5~3 mm 크기로 잘라 새로운 1.5 mL microcentrifuge tube에 옮겨놓고, 20 units의 Sma I이 첨가된 제한효소용액을 200  $\mu$ l를 가한 후 25°C 항온수조에서 6시간 반응시켰다. 반응이 종료된 tube는 enzyme buffer를 제거 후 TE buffer로 세척하였고 comb에 순서대로 plug slice를 붙이고 겔을 채워 전기영동을 실시하였다. 전기영동을 위해 사용된 gel은 Seakem gold agarose 1.3 g을 500 mL flask에 넣고 0.5  $\times$  TBE buffer 130 mL와 thiourea 325  $\mu$ l를 가하여 만들어졌으며, Size Marker는 *Salmonella breanderup* ATCC BAA-664를 사용하였다. 전기영동은 CHEF DR-III apparatus (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)으로 initial switch time 1.0s, final switch time 20.0s, run time 18h, voltage 6 V/cm, angle 120° 조건으로 실행하였다.

#### Repetitive Element Sequence-Based PCR (rep-PCR) 분석

분리주에 대한 유전적 상동성 검사는 DiversiLab™ kit (Biomerieux)를 이용하여 검사하였다. DNA추출은 microbial DNA isolation kit (MOBIO, CA, USA)를 이용하여 추출하였으며 추출된 DNA는 nanodrop® 1000 (Nanodrop Technologies, USA)으로 정량하여 사용하였다. PCR 반응액은 rep-PCR master mix (MM1) 18  $\mu$ l, 10  $\times$  GeneAMP PCR Buffer 2.5  $\mu$ l, primer mix 2  $\mu$ l, AmpliTaq® DNA template 2  $\mu$ l을 섞어 총 25  $\mu$ l로 하였다. PCR 반응조건은 initial denaturation은 94°C에서 2분간 반응 후, 94°C에서 30초 denaturation, 50°C에서 30초 annealing, 70°C에서 90초간 extension을 35회 반복한 후, final extension은 70°C에서 3분간 반응하였다. 증폭산물의 분석을 위해 micro-fluidic chip과 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, France)

를 사용하여 전기영동하고 결과는 DiversiLab software (ver. 3.4)로 상동성을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### *Enterococcus* spp. 분포 및 분리율

분리 결과, 소고기, 돼지고기, 닭고기를 포함하는 축산식품 157건과 수산식품 50건, 총 207건의 축·수산식품에서 장구균 43주를 분리하여 20.8%의 분리율을 나타내었다(Table 2). 이 결과는 Sung 등(2013)<sup>11)</sup>과 Cho 등(2013)<sup>20)</sup>의 실험과 비교하였을 때 보다 낮은 분리율을 보여 주었고, Kim 등(2013)<sup>10)</sup>의 실험과 비교했을 때는 비슷한 분리율을 보여주었다. 이들 연구마다 다른 분리율을 보여주는 이유는 실험에 사용한 시료의 구입위치, 구입시기와 시험자가 사용한 부위 (내장부위, 근육부위 등)에 의한 차이로 보여진다. 시료 별 분리균주는 축산식품 중 닭고기 51건에서 분리한 균주가 17주(33.3%)로 가장 많았고, 다음으로 소고기 52건에서 분리된 균주가 13주(25.0%), 돼지고기 54건에서 분리한 균주가 7주(13.0%), 횡감 50건에서 분리한 균주가 6주(12.0%)의 순으로 분리되었다. 분리된 균종 중에는 *E. faecalis*가 가장 많이 분리되어 22주(10.6%)가 분리되었고 다음으로 *E. gallinarum*, *E. hirae*이 5주(2.4%), *E. avium*이 4주(1.9%), *E. faecium*이 3주(1.4%), *E. duram*, *E. casseliflavus*가 2주(1.0%)로 축산물과 수산물에서 다양한 종이 분리되었다. Günter 등(1998)<sup>21)</sup>은 같은 소고기(51.7%)와 같은 돼지고기(48.3%) 시료에서 *E. faecalis*와 *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. duram*, *E. hirae*, *E. avium*를 다양하게 분리 하였고, Naci 등(2013)<sup>22)</sup>은 닭고기(13.3%) 시료에서 Enterococci를 분리 하였다. 또한 Oh 등(2008)<sup>23)</sup>은 넙치, 조피볼락, 참돔, 농어와 사육용수 등에서 *E. faecalis*(44.1%), *E. faecium*(32.4%), *E. gallinarum*(11.8%), *E. duram*(5.9%), *E. avium*(8.8%)을 분리하였다.

### 분리균주에 대한 항생제 감수성 시험

축산물과 수산물 시료에서 분리된 43주의 *Enterococcus* spp.에 대해 항생제별 내성률 양상을 알아본 결과는 Table

**Table 2.** The distribution of *Enterococcus* spp. isolated from raw meats and fish

Samples (No. of samples)	Number of <i>Enterococcus</i> spp. Isolate (%)							Total
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. duram</i>	<i>E. casseliflavus</i>	
Beef (n = 52)	5 (9.6)	ND <sup>1)</sup>	1 (1.9)	2 (3.8)	5 (9.6)	ND	ND	13 (25.0)
Pork (n = 54)	5 (9.3)	1 (1.9)	1 (1.9)	ND	ND	ND	ND	7 (13.0)
Chicken (n = 51)	11 (21.6)	ND	2 (3.9)	2 (3.9)	ND	2 (3.9)	ND	17 (33.3)
Fish (n = 50)	1 (2.0)	2 (4.0)	ND	1 (2.0)	ND	ND	2 (4.0)	6 (12.0)
Total (n = 207)	22 (10.6)	3 (1.4)	4 (1.9)	5 (2.4)	5 (2.4)	2 (1.0)	2 (1.0)	43 (20.8)

<sup>1)</sup>ND, not detected

**Table 3.** Antibiotics resistance patterns of *Enterococcus* spp. isolated from raw meats and fish

Antimicrobial agents	Number of antibiotic-resistance <i>Enterococcus</i> spp. Isolate (%)				Total (n = 43)
	Beef (n = 13)	Pork (n = 7)	Chicken (n = 17)	Fish (n = 6)	
Ampicillin	1 (7.7)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND	1 (2.3)
Gentamicin	1 (7.7)	1 (14.3)	ND	1 (16.7)	3 (7.0)
Amoxicillin/clavulanic acid	1 (7.7)	ND	ND	ND	1 (2.3)
Ciprofloxacin	ND	ND	4 (23.5)	ND	4 (9.3)
Penicillin	1 (7.7)	ND	ND	ND	1 (2.3)
Rifampin	2 (15.4)	1 (14.3)	ND	ND	3 (7.0)
Erythromycin	1 (7.7)	1 (14.3)	6 (35.3)	1 (16.7)	9 (20.9)
Vancomycin	1 (7.7)	ND	ND	ND	1 (2.3)
Chloramphenicol	ND	ND	1 (5.9)	1 (16.7)	2 (4.7)
Tetracycline	3 (23.1)	4 (57.1)	12 (70.6)	ND	19 (44.2)

<sup>1)</sup>ND, not detected

**Table 4.** Multiple antimicrobial resistance rates of *Enterococcus* spp. isolated from raw meats and fish

Antimicrobials	No. of resistance isolates (%)				Total (n = 43)
	Beef (n = 13)	Pork (n = 7)	Chicken (n = 17)	Fish (n = 6)	
No resistance detected	7 (53.8)	3 (42.9)	2 (11.8)	4 (66.7)	16 (37.2)
Resistance 1 CLSI subclasses	5 (38.5)	3 (42.9)	10 (58.8)	1 (16.7)	19 (44.2)
Resistance 2 CLSI subclasses	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (17.6)	1 (16.7)	4 (9.3)
Resistance 3 CLSI subclasses	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.9)	0 (0.0)	1 (2.3)
Resistance 4 CLSI subclasses	0 (0.0)	1 (14.3)	1 (5.9)	0 (0.0)	2 (4.7)
Resistance 5 CLSI subclasses	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Resistance 6 CLSI subclasses	1 (7.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.3)

3과 같다. 주요 항생제별 내성률은 tetracycline이 44.2%로 제일 높은 내성률을 나타내었고, erythromycin에서 20.9%의 내성률을 나타내었다. 장구균의 축종별 항생제 내성률은 대부분의 항생제에 대해 20% 이하의 내성률을 나타내고 있으나, tetracycline의 내성률은 닭고기 및 돼지고기 유래 장구균에서 내성률이 각각 70.6%와 57.1%로 높은 결과를 나타내었다. Tetracycline외에도 닭고기 유래 장구균은 ciprofloxacin, erythromycin에 대한 내성이 다른 식품 유래 미생물에 비해 높은 결과를 보여주었다. *E. faecalis*는 tetracycline에서 54.6%의 내성을 보였고, erythromycin에서 22.7%의 내성을 보였으며, *E. faecium*은 tetracycline, erythromycin, rifampin, gentamicin에서 내성을 보인 균주가 1주씩 발견되었다. *E. avium*은 vancomycin에 대해 1주가 내성을 나타내어 VRE로 추정되었다. Hayes 등(2003)<sup>24)</sup>의 연구에서는 축산물에서 분리한 *E. faecalis*와 *E. faecium*가 돼지고기와 소고기보다 칠면조와 닭고기에서 erythromycin, bacitracin, penicillin과 quinupristin/dalfopristin의 항생제에 대해서 더 높은 내성을 나타내었고, tetracycline에서는 닭고기보다 돼지고기에서 더 높은 내성률을 나타내었다. Kim 등(2013)<sup>10)</sup>의 연구에서는 소고기와 돼지고기에서 분리한 *E. faecalis*는 tetracycline에서 55.7%, erythromycin에서 50.0%의 내성률을 나타내었고, *E. faecium*은 erythromycin에서 53.8%, rifampin에서 46.1%의 내성률을

보여준 결과와 비교했을 때 내성률의 수치는 연구마다 다르지만 높은 내성을 보이는 항생제는 유사하였음을 알 수 있다.

분리된 *Enterococcus* spp.의 항생제 다제내성 현황을 알아본 결과(Table 4), 모든 항생제에 감수성이 있는 균주는 16주(37.2%)인 반면 3개 이상의 항생제에 내성을 나타내는 다제내성 균주는 4주(9.3%)로 나타났다. 균종별에 따른 다제내성 양성은 *E. faecalis*에서 E-TE가 2주(4.7%)였으며, CIP-E가 1주(2.3%), CIP-E-TE가 1주(2.3%), CIP-E-C-TE가 1주(2.3%)였다. *E. faecium*에서는 GM-RD-E-TE가 1주(2.3%)였으며, *E. gallinarum*에서는 GM-E가 1주(2.3%), *E. avium*에서는 AMP-AMC-P-RD-E-VA가 1주(2.3%)를 나타내었다. 이번 연구에서는 항생제 다제내성을 나타내는 항생제 중 모두가 erythromycin (E)와 연관된 내성 양상을 보여주었고, 다음으로는 tetracycline (TE)과 연관된 내성 양상을 보여주었다. Park 등(2010)<sup>27)</sup>연구에서는 다제내성 양상의 대부분이 tetracycline (TE)과 연관된 내성 양상을 보여주었다. *Enterococcus* spp.의 경우 지역에 따라 약간의 차이가 있으나 erythromycin, tetracycline, gentamicin에 내성을 나타내는 균주의 비율이 높은 것으로 보고되고 있다<sup>28)</sup>.

디스크확산법에 의한 내성검사 결과 주요 항생제 내성 균인 VRE로 추정되는 균주에 대해서 최저생육저해농도 (MIC) 검사를 실시하였다. 미량희석법에 의해 VRE의 MIC

(≥ 32 µg/mL)를 측정 한 결과, vancomycin에 내성을 나타내는 *E. avium* 1주(VRE 추정균주, 소고기 유래)는 감수성 균주로 판정되었다. 이에 따른 결과는 실험 시 디스크확산법과 미량희석법의 실험 방법에 의한 차이로 보이며, 재현성이 높은 미량희석법 결과가 더 정확한 것으로 사료된다.

**주요 항생제 내성균 유전자 확인**

본 연구에서 디스크확산법에 의한 내성검사 결과 주요 항생제 내성균인 VRE로 추정되는 균주에 대해 multiplex PCR을 이용하여 내성유전자를 확인한 결과, Cho 등<sup>20)</sup>의 연구에서 분리되었던 장구균 중 VRE 유전자가 검출되었던 균주는 4주(*vanA*, *vanB*가 검출)였으나 본 연구에서는 *vanA* gene, *vanB* gene, *vanC-1* gene 및 *vanC-2,3* gene을 보유한 균주는 없는 것으로 확인이 되었다. PCR법에 의한 VRE유전자 검출은 가장 특이도가 높은 검사법이고 저도내성을 갖는 VRE 검출에도 유용하다고 알려져 있어<sup>28)</sup>, 최종적으로 VRE 추정균주인 *E. avium*은 VRE가 아닌 것으로 판명하였다.

**분리균주에 대한 유전자 상동성 확인**

VRE로 판정되지는 않았으나 디스크확산법에서 vancomycin에 내성을 나타내는 장구균 분리주 1주와 Cho 등<sup>20)</sup>의 연구에서 분리된 장구균 중 VRE로 최종 판정되지는 않았으나 디스크확산법에서 vancomycin에 내성을 보였던 8주와 각각의 유전자 상동성을 PFGE 및 rep-PCR을 수행하여 비교 분석하였다. 그 결과, VRE로 추정되는 Cho 등<sup>20)</sup>의 분리균주와 본 연구 분리균주 모두 다른 패턴을 나타내어 유전적 연관성이 없는 것으로 나타났다(Fig 1). PFGE수행 결과, PFGE에서는 9주 모두 < 80%의 상동성을 보여 상관성이 없는 균주로 판정되었다 (자료는 제시하지 않음). rep-PCR수행 결과는 92.2%의 상동성으로 유전적 상동성이 낮았다. 유래 식품이 서로 다른 균주로 연관성이 부족

한 것으로 분석되었다. 이를 통해 디스크확산법에서 vancomycin에 내성을 가지는 균주의 유래를 밝히는 데는 아직 어려움이 있으므로 지속적인 유전자 상동성 분석을 통하여 자료의 축적이 필요할 것으로 생각이 된다.

**결 론**

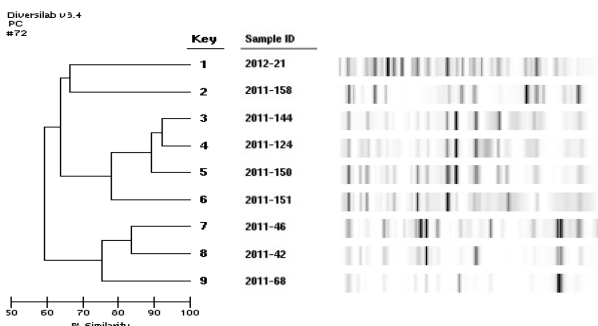
유통 식품 중 항생제 내성균 모니터링의 일환으로 2012년 유통식품의 항생제 내성 실태조사를 실시하였다. 소고기, 돼지고기, 닭고기를 포함하는 축산식품 157건과 횡감인 수산식품 50건, 총 207건의 축·수산식품에서 *Enterococcus* spp. 43주(20.8%)를 분리하였다. 닭고기에서 17주(33.3%), 소고기 13주(25.0%), 돼지고기 7주(13.0%), 수산물에서 6주(12.0%)를 분리하였으며, 분리된 균주 중 *E. faecalis*가 22주(10.6%)로 가장 많이 분리가 되었고 다음으로 *E. gallinarum*, *E. hirae* 5주(2.4%), *E. avium* 4주(1.9%), *E. faecium* 3주(1.4%), *E. duram*, *E. casseliflavus* 2주(1.0%)의 순으로 축산물과 수산물에서 다양한 종이 분리되었다. 분리균주에 대한 항생제 감수성 실험 결과, 주요 항생제별 내성률은 tetracycline이 44.2%로 제일 높은 내성률을 나타내었고 축종별 항생제 내성률은 대부분의 항생제에 대해 20% 이하의 내성률을 나타내었다. Tetracycline외에도 닭고기 유래 장구균은 ciprofloxacin, erythromycin에 대한 내성이 다른 식품 유래 미생물에 비해 높은 결과를 나타내었다. 항생제 다제내성 현황은 모든 항생제에 감수성이 있는 균주는 16주(37.2%)인 반면 3개 이상의 항생제에 내성을 나타내는 다제내성 균주는 4주(9.3%)로 나타났다. 항생제 내성균 유전자 확인 결과, vancomycin 내성 균주는 검출되지 않았다. 항생제 내성분리균주에 대해 PFGE와 rep-PCR을 이용해 유전자 상동성 패턴을 분석 한 결과 VRE로 추정되는 균주 모두 다른 패턴을 나타내어 유전적 연관성이 없는 것으로 나타났다.

**감사의 말**

이 연구는 2013년 식약처 항생제내성 안전관리 연구(13161 소비자 107)의 연구비지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**참고문헌**

1. Giraffa G.: Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*. **26**(2), 163-171 (2002).
2. Kwon O.M., Kim M.N.: Antibiotics resistance and molecular analysis of *Enterococcus* isolated from the Han-river in Korea. *Korean J. Microbiology*. **48**(2), 116-124 (2012).
3. Yoon S.W.: Vancomycin resistant Enterococci (VRE) infection control. *The Korean nurse*. **46**(2), 32-37 (2007).



<sup>1)</sup>2012-21:isolated from beef, <sup>2)</sup>2011-158:isolated from chicken, <sup>3)</sup>2011-144:isolated from chicken, <sup>4)</sup>2011-124:isolated from fish, <sup>5)</sup>2011-150:isolated from chicken, <sup>6)</sup>2011-151:isolated from beef, <sup>7)</sup>2011-46:isolated from fish, <sup>8)</sup>2011-42:isolated from fish, <sup>9)</sup>2011-68:isolated from beef

**Fig. 1.** Dendrogram generated after cluster analysis of rep-PCR fingerprints of *Enterococcus* spp.

4. Charles M.A.P. Franz, Wilhelm H. Holzapfel, Michael E. Stiles: Enterococci at the crossroads of food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **47**, 1-24 (1999).
5. Figen CETINKAYA, Tülay ELAL MUS, Gül Ece SOY-UTEMIZ, Recep CIBIK: Prevalence and antibiotic resistance of vancomycin-resistant enterococci in animal originated foods. *Turk Vet Anim Sci.* **37**, 588-593 (2013).
6. Kwon O.M., Kim M.N.: Antibiotics resistance and molecular analysis of *Enterococcus* isolated from the Han-river in Korea. *Korean J. Microbiology.* **48**(2), 116-124 (2012)
7. Kim J.H., Choi S.S.: Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolated from raw milk samples in Korea. *J. Fd Hyg. Safety.* **27**(1), 63-67 (2012).
8. Lee W.G., Jung M.K., Kwak Y.S.: Vancomycin-resistant Enterococci: Incidence, antimicrobial susceptibility, and resistance genotypes. *Korean J. Clin. Pathol.* **18**(1), 51-56 (1998).
9. Seo J., Kang J.Y.: Effects of infection control education for families of VRE patients. *J. Korean Acad Fundam Nurs.* **19**(2), 212-222 (2012).
10. Kim J.Y., Park M.A., Kim J.E., Chae H.S., Park Y.J., Son J.W., Yang Y.M., Choi T.S., Lee J.H.: Isolation frequency and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* & *Enterococcus* spp. isolated from beef & pork on sale in Seoul, Korea. *Korean J. Vet Serv.* **36**(2), 111-119 (2013).
11. Sung C.H., Chon J.W., Kwak H.S., Kim H.S., Seo K.H.: Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from beef, pork, chicken and sashimi. *Korean J. Food Sci. An.* **33**(1), 133-138 (2013).
12. Ham H.J.: *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated in dried marine products. *J. Fd Hyg. Safety.* **22**(4), 294-299 (2007).
13. Musarrat Jahan, Denis O. Krause, Richard A. Holley: Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. *Int. J. Microbiol.* **163**, 89-95 (2013).
14. Kim S.H., Kim J.S., Park J.H.: Antibiotic resistance of *Enterococcus* isolated from the processed grain foods, Saengsik and Sunsik. *Food Sci. Biotechnol.* **16**(3), 470-476 (2007).
15. Kang T.M., Cho S.K., Park J.H.: Antibiotic resistances of *Enterococcus* isolated from salad and sprout. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**(2), 142-148 (2008).
16. Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P.: Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Speices Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. *J. Clin. microbiol.* **33**(1), 24-27 (1995).
17. 식품의약품안전청: 가축 축산물내 주요 항생제 내성 실태조사 및 평가, 2008년도 식품의약품안전청 연구보고서 (2008).
18. 식품의약품안전청: 식품유래 미생물의 항생제내성 스펙트럼 및 유전형 분석 연구. 2012년도 식품의약품안전청 연구보고서 (2012).
19. 식품의약품안전청: 식품 중 미생물의 항생제내성 실태 조사 연구. 2011년도 식품의약품안전청 연구보고서 (2011).
20. Cho J.I., Joo I.S., Choi J.H., Jung K.H., Choi E.J., Han M.K., Jeong S.J., Son N.R., Lee S.H. Hwang I.G.: Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from meat and fishery production in Korea. *Food Sci. Biotechnol.* **22**(1), 161-165 (2013).
21. GÜNTER KLEIN, ALEXANDER PACK, GERHARD REUTER: Antibiotic resistance patterns of Enterococci and occurrence of vancomycin-resistant Enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(5), 1825-1830 (1998).
22. NACI ERHAN YURDAKUL, ZERRIN ERGINKAYA, EMEL ÜNAL: Antibiotic resistance of Enterococci, coagulase negative Staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat. *Czech J. Food Sci.* **31**, 14-19 (2013).
23. Oh E.G., Son K.T., Yu H.S., Kim J.H., Lee T.S., Lee H.J.: Antimicrobial susceptibility pattern of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from fish farms in the southern coast of Korea. *J. Kor. Fish. Soc.* **41**(6), 435-439 (2008).
24. Hayes J.R., English L.L., Carter P.J., Proescholdt T., Lee K.Y., Wagner D.D., White D.G.: Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(12), 7153-7160 (2003).
25. Park S.H., Kim K.S., Yoo Y.A., Lee J.K., Jung S.K., Han K.Y., Kim M.S.: Antibiotic resistance patterns of *Enterococcus* spp. isolated from commercial frozen food. *J. Fd Hyg. Safety.* **25**(2), 122-128 (2010).
26. Lee H.I., Jung J.H., Lee S.J., Choi S.S.: Analysis of genotype and phenotype of erythromycin resistance in *Enterococcus* spp. isolated from raw milk samples. *Kor. J. microbiol.* **46**(2), 148-151 (2010).
27. Hong K.S., Kang E.S., Lee M.A.: Investigation of prevalence of vancomycin-resistant Enterococci and genotypes of glycopeptide resistance using polymerase chain reaction. *Korean J. Clin. Pathol.* **18**(3), 372-378 (1998).
28. Kwon P.S.: The effects of photodynamic theraph for vancomycin-resistant Enterococci. *Korean J. clin lab sci.* **43**(3), 124-132 (2011).
29. Rene te Witt, Vikash Kanhai, Willem B. van Leeuwen: Comparison of the DiversiLab™ system, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multi-Locus Sequence typing for the characterization of epidemic reference MRSA strains. *J. Microbiol. Methods.* **77**, 130-133 (2009).
30. Choi J.E., Lee E.Y.: An investigation on the antibiotic resistant condition and label-stated of domestically distributed livestock-environment improving agents. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**(3), 258-265 (2009).