

소와 돼지에서 장구균의 분리 및 약제감수성

이우원[†] · 이승미 · 박민식 · 이강록 · 김금향
축산물위생검사소

Isolation and Antimicrobial Susceptibility of Enterococci from Cattle and Pigs

Woo-Won Lee[†], Seung-Mi Lee, Min-Sik Park, Gang-Rok Lee and Geum-Hyang Kim
Veterinary Service Laboratory

Abstracts

This study was carried out to investigate isolation, antimicrobial susceptibility and detection of vancomycin gene of *E. faecium* and *E. faecalis* isolates from 186 samples of cattle (feces 54, carcasses 31) and pigs (feces 55, carcasses 46) in Busan province from January 2010 to June 2011. Isolation ratio of *E. faecium* and *E. faecalis* from feces and carcasses were 43 (39.4%), 8 (10.4%) and 45 (41.3%), 24 (31.2%), respectively. In antimicrobial susceptibility test, all the isolates were demonstrated susceptibility to ampicillin, ciprofloxacin, daptomycin, gentamicin, linezolid, tigecycline, vancomycin and salinomycin. But the isolates were showed resistance other antibiotics in order of tetracycline (70.6%), tylosin (51.0%), erythromycin (49.0%), streptomycin (47.1%) and kanamycin (33.3%). *E. faecium* and *E. faecalis* isolates could be, detected for *ddl_{E,faecium}*, *ddl_{E,faecalis}* and *vanA* by PCR. This PCR could detect *E. faecium* and *E. faecalis*, simultaneously. But the isolates not detected *vanA* by PCR.

Key words : *E. faecium*, *E. faecalis*, antimicrobial susceptibility test

서 론

Enterococci는 catalase 음성, 그람 양성 구균으로 사람이나 동물의 장내 정상 세균총으로 존재하며 병원성이 약하거나 감염병과의 연관성이 적은 것으로 알려져 있었으나 최근에는 항생제 내성을 지닌 장구균이 증가하면서 병원감염의 주요 원인균으로 대두되었다¹⁾. 항생제는 각종 세균성 감염증의 치료에 유용하게 사용될 뿐만 아니라 가축에서 발육촉진을 목적으로 사료에 첨가함으로써 항생제 오·남용에 의한 약제내성균이 선택적으로 증가하여 세균성 감염증의 치료 및 예방에 많은 문제점을 일으키고 있다²⁾. 약제내성기전은 염색체 유전자의 변이에 의한 경우도 있지만, 주로 R plasmid에 기인한다고 알려져 있다. R plasmid는 항균제에 대한 내성을 발현시키는데 관여하

는 유전자로서 장내세균뿐만 아니라 많은 종류의 그람 음성 간균에서 높은 빈도로 분리되고 있으며, 이는 장내에서 접합을 통하여 동종 또는 이종 세균간에 전달되어 내성균의 증가에 중요한 역할을 한다³⁾.

이러한 항생제 내성 안전관리를 위해서는 과학적이고 체계적인 조사에 근거한 전체적인 실태 파악이 선행되어야 하며, 제도적이고 광범위한 항생제 내성균 감시 시스템을 확립할 필요성이 있다. 이러한 이유로 미국은 1996년에 National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) 구축을 통한 사람과 동물의 장내 세균에 대하여 17종 항생제 감수성의 변화를 조사하였으며⁴⁾, 일본은 1999년부터 동물 유래 식품매개성 병원세균 및 지표세균에 대해 전국적인 약제 내성 조사를 위해서 Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance

[†] Corresponding author. E-mail : leewoow@korea.kr

Tel : +82-51-331-0095, Fax : +82-51-338-8266

Monitoring System (JAVARMS)을 구축하여 항생제 내성 모니터링을 실시하고 있다⁵⁾. 국내에서도 2003년부터 국가 항생제 내성 안전관리 사업을 실시하여 사람, 가축, 어류 및 환경 등으로부터 항생제 내성균 모니터링을 실시하고 있다⁶⁾.

*E. faecalis*는 장구균 중 85~89%로 가장 흔하게 분리되며, *E. faecium*의 경우 10~15%, 기타 *E. durans*, *E. gallinarum* 및 *E. casselglavus* 등이 5% 이하로 분리되고 있다⁷⁾. 이와 같이 *E. faecalis*와 *E. faecium*은 감염의 주요 원인균으로 작용하며, 이들 균 중 내성균은 특히 공중보건학적으로 문제시 된다^{8~10)}. 이러한 장내 세균층에 대한 항생제 내성율은 항생제 사용과 관련이 있고 병원성 세균이나 식중독 세균의 내성을 예측할 수 있기 때문에 매우 중요시 되고 있다.

따라서 본 조사는 2008년부터 농림수산물검역검사본부와 전국 축산물위생검역검사기관이 참여하는 “축산 항생제 내성균 감시체계 구축” 사업과 병행하여 관내 사육되고 있는 소와 돼지 및 도축장에 출하되는 소와 돼지의 분변과 도체에서 장구균을 분리하여 항생제 내성을 조사하였고 반코마이신 내성 유전자 검출을 조사하였다.

재료 및 방법

공시재료

시험에 사용한 균 분리재료는 2010년 1월부터 2011년 6월까지 부산지역 도축장에 출하된 소와 돼지의 분변, 도체표면 및 농장에서 사육 중인 소와 돼지의 분변에서 186건의 시료를 채취하여 시험에 사용하였다. 시료채취는 항생제내성균검사요령 따라 채취하여 냉장상태를 유지하여 실험실로 운반하였으며 균 분리는 시료채취 후 24시간 이내에 실시하였다.

장구균(*E. faecium* 및 *E. faecalis*)의 분리 및 동정

도체표면 시료는 도체 현탁액 1ml를 Azide dextrose broth 9ml에 접종하여 36°C 48시간 증균 배양하였고, 분변 시료는 Brain heart infusion (BHI) broth에서 증균 배양하였다. 배양액을 Enterococcosel agar (EA)에 도달하여 접종 후 37°C에서 24~48시간 배양하였다. EA에서 검은색 집락을 선택하여 Tryptic soy agar (TSA)에 37°C, 18~24시간 순수분리 배양한 다음 polymerase chain reaction (PCR)법을 이용하여 *E. faecium* 및 *E.*

*faecalis*를 동정하였다.

항생제 감수성 검사

항생제 감수성 검사는 Minimum inhibition concentration (MIC) 방법을 이용하여 농림수산물검역검사본부에서 실시한 결과를 정리하였다. 사용한 항생제 종류는 gentamicin (GM), streptomycin (S), kanamycin (KM), ampicillin (AM), ciprofloxacin (CIP), vancomycin (VA), tigecycline (TGC), erythromycin (E), tylosin (TYL), linezolid (LNZ), chloramphenicol (C), florfenicol (FFN), quinupristin/dalfopristin (SYN), tetracycline (TE), daptomycin (DAP), salinomycin (SAL) 등 16종을 사용하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)

DNA 추출

공시된 균주로부터 genomic DNA 추출은 이 등³⁾의 방법에 따라 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 사용하였다.

Oligonucleotide primer의 합성

PCR에 사용된 oligonucleotide primer의 염기서열, 증폭산물의 크기 및 온도는 Table 1에서와 같이 *ddlE*, *faecium* 등 3종을 Bioneer (Korea)에 합성 의뢰하여 사용하였다.

PCR에 의한 장구균 및 반코마이신 내성 유전자 검출 시험

PCR 반응은 template DNA 1 μ l, 10 \times PCR buffer 1.5 μ l, 10 mM dNTP 1.2 μ l, 20 pM primer 각 1 μ l, Taq polymerase (Enzymomics, Korea) 0.2 μ l를 포함하여 최종량이 15 μ l가 되게 하였다. PCR은 94°C에서 5분간 denaturation시킨 후, 94°C에서 1분, 54°C에서 1분, 72°C에서 1분 조건으로 총 35 cycle을 수행한 다음 72°C에서 10분간 extension시켰다¹¹⁾.

증폭산물의 확인

PCR에 의해서 증폭된 산물은 이 등³⁾의 방법에 준하여 loading buffer (30% glycerol, 50 mM EDTA, 0.025% bromophenol blue in 50 mM Tris-HCl, pH 8.5)와 2:1로 혼합하여 2.0% agarose (Sigma, USA)

Table 1. Synthetic oligonucleotides used as primers for PCR

Target gene	Sequence (5' - 3')	Size (bp)	Tm (°C)
<i>ddl_{E, faecium}</i>	GCA AGG CTT CTT AGA GA	650	54
	CAT CGT GTA AGC TAA CTT C		
<i>ddl_{E, faecalis}</i>	ATC AAG TAC AGT TAG TCT T	941	54
	ACG ATT CAA AGC TAA CTG		
<i>vanA</i>	GCA TGG CAA GTC AGG TG	427	54
	GAT TCC GTA CTG CAG CCT		

gel상에 loading하고 TBE buffer (40 mM Tris, 20 mM boric acid, 1 mM EDTA; Invitrogen) 하에서 120 ~ 140 volt로 약 1시간 동안 전기영동을 실시하였다. Agarose (Sigma, USA) gel을 0.5 µg/ml의 ethidium bromide (Gibco, USA) 용액으로 염색시킨 후 UV transilluminator (Hoefer, USA)를 사용하여 DNA 산물을 확인하였다. Marker로는 100 bp DNA Ladder (Promega, USA)를 사용하였다.

결 과

장구균(*E. faecium* 및 *E. faecalis*)의 분리율

도축장에 출하된 소와 돼지의 분변, 도체표면 및 농장에서 사육 중인 소와 돼지의 분변에서 186건의 시료로부터 분리한 *E. faecium* 및 *E. faecalis*의 분리율은 Table 2와 같이 51주(27.4%)의 *E. faecium*을 분리하였으며, 그 중 도체표면에서 8주(돼지 6, 소 2), 분변에서 43주(돼지 30, 소 13)를 분리하였다. *E. faecalis*의 경우 69주(37.1%)를 분리하였으며, 그 중 도체표면에서 24주(돼지 14, 소 10), 분변에서 45주(돼지 24, 소 21)를 분

리하였다.

항균제 감수성

분리된 *E. faecium* 51주에 대한 감수성시험 결과는 Table 3과 같이 ampicillin, ciprofloxacin, daptomycin, gentamicin, linezolid, tigecycline, vancomycin, salinomycin에 대하여 100%의 감수성을 나타내었고, 내성율은 tetracycline (70.6%), tylosin (51.0%), erythromycin (49.0%), streptomycin (47.1%), kanamycin (33.3%) 순이었다. 돼지 유래 균주의 내성율은 tetracycline (63.9%), tylosin (52.8%), erythromycin (50.0%), streptomycin (47.2%), kanamycin (41.7%) 순이었으며, 소 유래 균주의 내성율은 tetracycline (86.7%), erythromycin (46.7%), streptomycin (46.7%), tylosin (46.7%) 순이었다.

E. faecalis 69주에 대한 감수성시험 결과는 Table 4와 같이 ampicillin, ciprofloxacin, daptomycin, linezolid, tigecycline, vancomycin, salinomycin에 대하여 100%의 감수성을 나타내었고, 내성율은 quinupristin/dalfopristin (94.2%), tetracycline (72.5%), tylosin (55.1%), erythromycin (50.7%),

Table 2. Isolation rates of *E. faecium* and *E. faecalis* from pigs and cattle

Animal	Sources	No. of samples	No. of isolates (%)	
			<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Pigs	Feces	55	30 (54.5)	24 (43.6)
	Carcasses	46	6 (13.0)	14 (30.4)
Cattle	Feces	54	13 (20.1)	21 (38.9)
	Carcasses	31	2 (6.5)	10 (32.3)
Total	Feces	109	43 (39.4)	45 (41.3)
	Carcasses	77	8 (10.4)	24 (31.2)

kanamycin (37.7%), streptomycin (36.2%) 순이었다. 돼지 유래 균주의 내성율은 quinupristin/dalfopristin (97.4%), tetracycline (84.2%), tylosin (76.3%) 순이

었으며, 소 유래 균주의 내성율은 quinupristin / dalfopristin (90.3%), tetracycline (58.1%), tylosin (29.0%) 순이었다.

Table 3. Antimicrobial resistance of 51 *E. faecium* isolates from pigs and cattle

Antimicrobial agent	Break point ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. (%) of isolates with indicated resistance		
		Pig (n=36)	Cattle (n=15)	Total (n=51)
Ampicillin	≥ 16	0	0	0
Chloramphenicol	≥ 32	9 (25.0)	2 (13.3)	11 (21.6)
Ciprofloxacin	≥ 4	0	0	0
Daptomycin	≥ 8	0	0	0
Erythromycin	≥ 8	18 (50.0)	7 (46.7)	25 (49.0)
Florfenicol	≥ 32	12 (33.3)	2 (13.3)	14 (27.5)
Gentamicin	$\geq 2,048$	0	0	0
Kanamycin	$\geq 2,048$	15 (41.7)	2 (13.3)	17 (33.3)
Linezolid	≥ 8	0	0	0
Quinupristin/Dalfopristin	≥ 4	9 (25.0)	2 (13.3)	11 (21.6)
Streptomycin	$\geq 1,024$	17 (47.2)	7 (46.7)	24 (47.1)
Tetracycline	≥ 16	23 (63.9)	13 (86.7)	36 (70.6)
Tigecycline	≥ 0.5	0	0	0
Tylosin	≥ 8	19 (52.8)	7 (46.7)	26 (51.0)
Vancomycin	≥ 32	0	0	0
Salinomycin	16	0	0	0

Table 4. Antimicrobial resistance of 69 *E. faecalis* isolates from pigs and cattle

Antimicrobial agent	Break point ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. (%) of isolates with indicated resistance		
		Pig (n=38)	Cattle (n=31)	Total (n=69)
Ampicillin	≥ 16	0	0	0
Chloramphenicol	≥ 32	15 (39.5)	6 (19.4)	21 (30.4)
Ciprofloxacin	≥ 4	0	0	0
Daptomycin	≥ 8	0	0	0
Erythromycin	≥ 8	29 (76.3)	6 (19.4)	35 (50.7)
Florfenicol	≥ 32	5 (13.2)	0	5 (7.2)
Gentamicin	$\geq 2,048$	6 (15.8)	6 (19.4)	12 (17.4)
Kanamycin	$\geq 2,048$	20 (52.6)	6 (19.4)	26 (37.7)
Linezolid	≥ 8	0	0	0
Quinupristin/Dalfopristin	≥ 4	37 (97.4)	28 (90.3)	65 (94.2)
Streptomycin	$\geq 1,024$	19 (50.0)	6 (19.4)	25 (36.2)
Tetracycline	≥ 16	32 (84.2)	18 (58.1)	50 (72.5)
Tigecycline	≥ 0.5	0	0	0
Tylosin	≥ 8	29 (76.3)	9 (29.0)	38 (55.1)
Vancomycin	≥ 32	0	0	0
Salinomycin	16	0	0	0

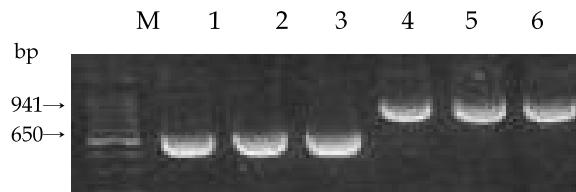


Figure 1. PCR products amplified from *E. faecium* and *E. faecalis* isolates using *ddl_{E. faecium}* and *ddl_{E. faecalis}* primers. M; 100 bp DNA Ladder (Promega), lane 1~3; *E. faecium*, lane 4~6; *E. faecalis*.

PCR에 의한 특이성 및 반코마이신 내성 유전자 검출

분리된 *E. faecium* 51주 및 *E. faecalis* 69주로부터 genomic DNA를 추출한 다음 *E. faecium* 및 *E. faecalis* 임을 확인하기 위하여 PCR을 수행한 결과 *E. faecium* 650 bp 및 *E. faecalis* 941 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났다(Fig 1).

장구균 분리주로부터 반코마이신 내성 유전자의 검출을 위하여 *vanA*를 이용하여 PCR을 수행한 결과 반코마이신 내성과 관련된 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다.

고 찰

축산 분야에서 항생제 오남용으로 인하여 가축 질병 치료에 어려움이 증가하면서 내성균 조사의 중요성이 커지고 있으며 최근 이러한 내성균의 증가는 공중보건학적으로 매우 중요시 되고 있다. 본 조사는 “축산 항생제 내성균 감시체계 구축” 사업과 병행하여 관내 사육되고 있는 소와 돼지 및 도축장에 출하되는 소와 돼지의 분변과 도체에서 장구균을 분리하여 항생제 내성을 조사하였으며 반코마이신 내성 유전자 검출을 시도하였다.

E. faecium 및 *E. faecalis*에 대한 내성을 조사한 결과 각각 tetracycline 70.6%, tylosin 51.0%, erythromycin 49.0%, streptomycin 47.1% 및 quinupristin / dalfopristin (94.2%), tetracycline (72.5%), tylosin (55.1%), erythromycin (50.7%) 순으로 높은 내성율을 보였는데, 이는 2010년 정 등¹²⁾이 돼지 분변 및 도체에서 분리한 *E. faecium* 및 *E. faecalis*의 내성율이 각각 RA 53.1%, E 25.0%, TE 25.0% 및 TE 80.8%, SYN 78%, E 56.1%, S 43.8%라고 보고한 성적과 다소 유사하였고, *E. faecalis*에 대한 항생제 내성율은 임 등¹³⁾이 도축장 돼지에서 조사한 결과 TE 98.7%, SYN 100%, E 66.0%, S 57.3%, C 29.3%(임 등, 2007)와 유사하였으며, 2009

년 식품의약품안전청이 돼지농장 조사 결과 TE 99.0%, E 85.1%, S 69.3%, C 60.4%라고 보고한 것¹⁴⁾과는 다소 차이가 있었다. 이러한 차이는 항생제의 종류 및 검사방법의 차이에서 기인된 것이라고 생각된다. 이 등¹⁵⁾은 닭 분변 유래 *E. faecium* 및 *E. faecalis*에 특이적으로 E 및 TE에 높은 내성율을 보였다고 하였고, 조 등¹⁶⁾은 조사한 동물 내장 및 분변(n=202)으로부터 고농도 반코마이신에 내성을 보이는 균주는 확인되지 않았지만, TE에 78%가 내성을 나타내는 것으로 보고하였다. 또한 Yoshimura 등¹⁷⁾은 일본의 산란계 및 육계 분변유래 장구균에 대한 약제내성율이 E와 TE에 대하여 높은 내성을 나타내었다고 하였다. 이는 본 제제들이 일본에서 성장촉진 등의 목적으로 사료 첨가용으로 많이 사용되기 때문으로 보고하였다. 특히 TE의 경우는 사용이 금지된 이후에도 내성균주가 오랫동안 농장내 유지되는 특성이 있어 국내에도 TE의 내성균주의 출현은 당분간 지속될 것으로 사료된다.

장구균의 균종 동정과 반코마이신 내성 유전자를 신속하게 검출하기 위하여 PCR기법을 이용하여 *E. faecium* 51주 및 *E. faecalis* 69주로부터 PCR을 수행한 결과 *E. faecium*은 650 bp, *E. faecalis*는 941 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 반코마이신 내성 관련 유전자는 검출되지 않았다. 따라서 장구균을 동정하는데 있어 고전적인 미생물학적 방법 뿐 아니라, PCR을 이용한 유전자 분석방법도 병행하면 신속하게 장구균 동정 및 반코마이신 내성 장구균을 확인할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 본 조사에서는 반코마이신 내성 장구균이 검출되지 않았으나 향후 다양한 동물과 더 많은 시료로부터 반코마이신 내성 장구균 검출에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

결 론

“축산 항생제 내성균 감시체계 구축” 사업과 병행하여 관내 사육되고 있는 소와 돼지 및 도축장에 출하되는 소와 돼지의 분변과 도체에서 장구균을 분리하여 항생제 내성을 조사하였으며 반코마이신 내성 유전자 검출을 시도하였다.

도축장에 출하된 소와 돼지의 분변, 도체표면 및 농장에서 사육 중인 소와 돼지의 분변에서 186건의 시료로부터 분리한 *E. faecium* 및 *E. faecalis*의 분리율은 각각 27.4%와 37.1% 이었다.

E. faecium 및 *E. faecalis*에 대한 내성을 조사한 결과 각각 tetracycline 70.6%, tylosin 51.0%, erythromycin 49.0%, streptomycin 47.1% 및 quinupristin / dalfopristin (94.2%), tetracycline (72.5%), tylosin (55.1%), erythromycin (50.7%) 순으로 높은 내성율을 보였다.

E. faecium 51주 및 *E. faecalis* 69주로부터 PCR을 수행한 결과 *E. faecium*은 650 bp, *E. faecalis*는 941 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 반코마이신 내성 관련 유전자는 검출되지 않았다. 따라서 PCR 유전자 분석방법을 이용하면 신속한 장구균 동정 및 반코마이신 내성 장구균을 확인할 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Facklam RR, Sham DF. *Enterococcus*. In: Murray PR. Manual of clinical microbiology. 6th ed. Am Soci Microbiol: pp.308~314(1995).
2. 이우원, 정병열, 이강록, 이동수, 김용환. 소와 돼지유래 *Salmonella*속 균의 혈청형 및 약제감수성. 한국가축위생학회지 32(1): pp.49~59(2009).
3. 이우원, 정병열, 이강록, 이동수, 김용환. 소와 돼지유래 살모넬라속균의 약제내성유전자의 특성에 관한 연구. 한국가축위생학회지 32(3): pp.227~239(2009).
4. NARMS. National Antimicrobial Resistance Monitoring System, Enteric Bacteria, USA(2003).
5. 일본농림수산성. 가축유래세균의 항균물질감수성 실태조사(2003).
6. 식품의약품안전청. 국내항생제내성안전관리사업 연구보고서: pp.1~600(2003).
7. Ruoff K, Maza LL, Murtagh MJ, Spargo JD, Ferraro MJ. Species identification of enterococci isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 283(3): pp.435~437(1990).
8. Klein G. Toxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. Int J Food Microbiol. 88: pp.123~131(2003).
9. 김진경, 김철홍, 한승용, 변형우, 박정, 우홍정, 현인규, 이재정, 이규만. 한 민간종합 병원에서 최근 5년간 반코마이신 내성 장구균의 장내 군집 및 감염의 임상적 특징. 대한중환자의학회지 20: pp.54~62.(2005).
10. 김철민, 강수진, 이병중, 이성재, 육대수. 가축에서 테트라사이클린 내성 장구균 조사 및 분자생물학적 특성규명. 한국가축위생학회지 33(2): pp.143~149 (2010).
11. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. Am Soci Microbiol 33(1): pp.24~27(1995).
12. 정귀옥, 허정호, 이종민, 윤이란, 최유정, 김종수. 돼지 분변 및 도체에서 분리한 대장균, 장구균의 항생제 내성을 조사. 한국가축위생학회지 33(3): pp.241~248 (2010).
13. 임숙경, 이희수, 변정열, 박신영, 정석찬. 가축 유래 지표세균에 대한 항생제 내성 양상 조사. II. 돼지 분변에서 분리한 대장균 및 장구균의 항생제 내성 양상 조사. 한국수의공중보건학회지 31(1): pp.31~39 (2007).
14. 식품의약품안전청. 가축 및 축산물내 주요항생제내성 실태조사 및 평가: pp.1~92(2009).
15. 이영주, 김애란, 정석찬, 송시욱, 김재홍. 닭 분변유래 *Enterococcus* spp. 및 *Staphylococcus aureus*의 항생제 내성패턴. 대한수의학회지 45(2): pp.163~168 (2005).
16. 조운상, 이희수, 김종만, 안종삼, 류판동, 박용호, 유한상, 이문한. 장구균의 vancomycin 내성 유전자와 중 특이유전자의 검출을 위한 Multiplex polymerase chain reaction 개발. 대한수의학회지 43(1): pp. 103~112(2003).
17. Yoshimura H, Ishimaru M, Endoh YS, Kojima A. Antimicrobial susceptibilities of enterococci isolated from feces of broiler and layer chickens. FEMS Microbiol Lett 31: pp.427~432 (2000).