

# 원유시료에서 분리한 장구균의 에리스로마이신 내성 유전자형 및 표현형 분석

이혜인<sup>1</sup> · 정재혁<sup>2</sup> · 이상진<sup>1</sup> · 최성숙<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>삼육대학교 동물과학부, <sup>2</sup>삼육대학교 약학대학

## Analysis of Genotype and Phenotype of Erythromycin Resistance in *Enterococci* spp. Isolated from Raw Milk Samples

HyeIn Lee<sup>1</sup>, JaeHyuk Jung<sup>2</sup>, SangJin Lee<sup>1</sup>, and SungSook Choi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Animal Science, Sahmyook University, Seoul 139-742, Republic of Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Republic of Korea

(Received April 20, 2010/Accepted June 4, 2010)

The aim of this study was to investigate the erythromycin resistance patterns of *Enterococci* sp. present in cow milk. A total 110 erythromycin resistant *Enterococci* were isolated from milk samples; *E. faecalis* (n=101), *E. avium* (n=7), and *E. durans* (n=2). The minimum inhibitory concentration of erythromycin against 110 *Enterococci* were determined. The 66.3% of *Enterococci* (n=73) showed high level resistance ( $\geq 64$  mg/ml). Among 110 isolates, 86.3% (n=95) showed cMLS<sub>B</sub> phenotype and 13.6% (n=15) showed iMLS<sub>B</sub> phenotype. All of isolates have *erm*(B) determinant, 75.45% (n=83) have *mef*(A) an efflux system determinant. The majority of *Enterococci* isolated from raw milk samples in northern area of Gyeonggi-Do showed high level of resistance to erythromycin.

**Keywords:** enterococci, erythromycin resistance, genotype, phenotype.

장구균속 세균은 사람과 동물에 정상적으로 상재하는 세균의 일종으로 보통 사람과 동물의 소화관, 야채류 및 유제품 등에서 쉽게 검출되는 균이다(6, 8). 건강한 사람에게에는 질병의 위험이 없으나 최근 들어 면역성이 약한 만성 질환자 등을 대상으로 원내 감염을 일으켜 수술 후 감염, 비뇨기 감염 및 균혈증의 주요 원인균으로 알려지기 시작하였다(11). 장구균 감염 치료를 어렵게 하는 원인 중 하나는 대다수 장구균이 여러 항생제에 저항성을 나타내는 것과 무관하지 않다(15). 즉 장구균이 여러 항생제에 저항성을 나타내다 보니 환자에게 사용할 경우 적절한 항생제를 선택하는데 제약이 된다. 한편 항생제 내성의 문제는 사람뿐만 아니라 축산분야에서도 내성 증가로 인한 가축의 질병 치료의 어려움을 겪고 있고 내성균의 사람에게로의 전달 가능성이 제기 되고 있어 공중보건학적으로 중요하게 대두되고 있다(18, 19). 전세계적으로 항생제의 전체 사용량 중 1/2이 동물의 치료, 예방 및 성장촉진제로 사용되고 있는 실정임을 감안할 때 동물성 식품 유래 세균의 항생제 내성균의 증가 경향을 연구하는 것은 항생제 사용을 관리하는데 있어 중요한 단서가 될 것이다(1, 2). 식품위생상 동물 및 축산물

유래 오염의 지표 세균 중 하나인 *Enterococcus* sp.의 경우 지역에 따라 약간의 차이는 있으나 erythromycin, tetracyclin 및 gentamicin에 내성을 나타내는 균주의 분리 비율이 높은 것으로 보고되고 있다(10, 12, 17). Erythromycin을 포함한 macrolide, lincosamide 및 streptograminB계 항생제(MLS<sub>B</sub>계)는 그람양성 세균에 의한 감염증 치료에 널리 이용되는 항생제이다(7, 22). Erythromycin을 포함한 MLS<sub>B</sub>계 항생제에 대한 세균의 내성기전은 디스크법을 이용하여 확인하며 나타내는 디스크 주변의 저지원의 모양과 크기에 따라 항생제 유출형, 유도내성형(iMLS<sub>B</sub>) 및 지속성내성형(cMLS<sub>B</sub>)으로 분류한다(9). 장구균의 경우 항생제 유출형 내성은 *msr* 및 *mef* 유전자에 의해 항생제가 세포막 밖으로 유출되어 내성을 나타내게 된다(1, 9). 유도내성 및 지속성 내성은 모두 *erm* 유전자에 의해 일어난다. 유도내성(iMLS<sub>B</sub>)의 경우 erythromycin을 포함한 MLS계 항생제의 일부가 다른 MLS계에 대한 내성을 유도하여 디스크실험을 할 경우 유도제가 있는 쪽의 디스크가 찌그러지는 D형을 나타낸다. 지속성 내성(cMLS<sub>B</sub>)의 경우에는 유도과정 없이 MLS계 항생제 전반에 내성을 나타냄으로 디스크 주변에 저지원이 생기지 않는다. 따라서 내성의 표현형에 따라 동일 계열의 항생제 사용을 피하여야 하는 단서가 된다. 장구균의 경우

\* For correspondence. E-mail: ssochoi@syu.ac.kr; Tel: +82-2-3399-1606; Fax: +82-2-3399-1617

유도내성 및 지속성 내성은 *erm(B)* 유전자가 주로 관여하며 일부에서 *erm(A)*가 존재함이 확인되었다(14, 20). 우리나라의 경우 이러한 내성의 메커니즘을 연구한 연구결과는 주로 환자로 부터 분리된 임상균주를 중심으로 이루어 졌으며 축산물 및 동물 식품 유래 장구균을 대상으로 한 결과는 최근 남 등(17)에 의한 유전자형 분석을 한 보고 이외는 최근 자료는 없는 것으로 조사되었다. 따라서 본 연구진은 경기북부지역 축산농가에서 수집한 원유시료로부터 축산물 오염의 지표 세균의 하나인 장구균속 세균의 마크로라이드계 항생제인 erythromycin에 내성인 균주를 분리하고 각 균주의 내성의 기전을 표현형 및 유전자 형을 관찰하여 규명하고자 하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 장구균속 세균의 분리 및 동정

2008년 4월부터 2009년 1월에 걸쳐 경기북부지역 젖소 사육 농가 15곳으로부터 378개의 원유 시료를 공급받아 본 실험에 사용하였으며 착유시 알코올 소독을 실시하여 2차 감염의 기회를 최소화 하였다. 수집한 원유는 잘 혼합 후 erythromycin을 1 µg/ml 농도로 함유한 Enterococcosel medium (Difco, USA)에 0.1 ml을 도말 후 37°C에서 24-48시간 배양하였다. 배양 후 형성된 집락 중 장구균 특유의 노란색 색소를 형성하는 집락을 순수배양 후 임상검사센터인 세강(서울)에 의뢰하여 API kit을 이용한 균 동정을 실시하였다. 동일한 원유 시료에서는 1개의 집락만을 선택하여 같은 균주의 반복적인 선택을 피하였다.

### 항생제 감수성검사

분리된 장구균을 대상으로 erythromycin (Sigma Co., USA)에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 감수성 실험은 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, USA)의 고체배지 희석

법으로(3) 실시하였으며 배지는 Muller-Hinton 배지(Difco)를 사용하였다. 항생물질은 최고 농도 64 µg/ml 농도가 되도록 하여 이 농도에서 2배 계열 희석하여 최종 농도가 0.03 µg/ml이 되도록 항생물질 희석 계열을 만들었다. 여기에 전 배양한 균액을 희석하여 10<sup>6</sup> CFU/ml이 되도록 희석한 후 5 µl씩 항생제 배지에 접종하여 배양하고 균주의 성장을 확인할 수 없는 가장 낮은 erythromycin의 농도를 최소억제농도(MIC)로 결정하였다. 표준 균주로는 *E. faecalis* ATCC 29212를 사용하였다.

### 장구균의 내성 표현형의 관찰

내성 표현형은 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (3)의 디스크 법에 의하여 실시하였다. 하룻밤 진탕 배양한 균액을 Muller-Hinton 배지에 멸균한 면봉으로 도말한 후 erythromycin 15 µg과 josamycin 15 µg이 각각 함유된 종이 디스크를 10 mm 간격으로 올려놓고 37°C에서 18시간 배양하였다. 배양 후 디스크 주변에 생기는 저지원의 모양과 크기로 내성 표현형을 판단하였다.

### 내성 유전자의 검색

장구균의 genomic DNA는 GeneAll Cell SV kit(진올바이오테크놀로지, Korea)을 이용하여 분리하였으며 장구균의 세포벽의 분해를 용이하게 하기 위하여 lysozyme (30 mg/ml, Sigma Co.)을 첨가하였다. 내성 관련 유전자로는 *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *mef(A)*, *mef(E)*, *msr(A)*, *msr(C)* 및 *msr(D)*를 후보 유전자로 PCR 반응을 하였으며 이때 사용한 primer는 Sigma-Proliogo 사(USA)에서 제작하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 primer의 염기서열과 반응조건을 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 Bioneer 사의 AccuPower™ premix (Bioneer, Korea)를 사용하여 95°C에서 5분간 denaturation 실시 후 95°C, 30 sec, Table 1에 표시된 annealing 조건에서 30 sec, 72°C 1분간 extension 반응을 30회 반복 후 마지막 72°C 10분간 elonga-

Table 1. Sequences of primers used in this study

Gene	Sequences (5'→3')	Length	Annealing temperature (°C)
<i>erm(A)</i>	TCAGTTACTGCTATAGAAATTGATGGAG	28	58
	ATACAGAGTCTACACTTGGCTTAGG	25	
<i>erm(B)</i>	TTGGATATTCACCGAACACTAGGG	24	55
	ATAGACAATACTTGCTCATAAGTAACGG	28	
<i>erm(C)</i>	GACAATTATAAGATTAATGAACATGATAATATC	34	58
	AAACAATTTTGCCTATTATATCCGTAC	27	
<i>mef(A)</i>	ATTGCAGCTGGTTTACAGGC	20	55
	CATGATACAATGCACACGCA	20	
<i>mef(E)</i>	GGGAGATGAAAAGAAGGAGT	20	50
	TAAAATGGCACCGAAAG	17	
<i>msr(A)</i>	GCA AATGGTGTAGGTAAGACAAT	24	52
	ATCATGTGATGTAAACAAAAT	21	
<i>msr(C)</i>	ATAACAAACCTGCAAGTTC	20	55
	CTTCAATTAGTCGATCCATA	20	
<i>msr(D)</i>	TTGGACGAAGTAACTCTG	18	50
	GCTTGGCTCTAACGTTT	17	

**Table 2.** *Enterococci* spp. identified from raw milk sample and their susceptibility against erythromycin

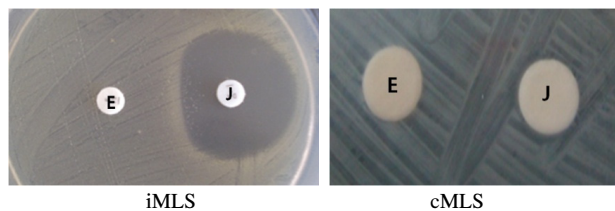
Microorganisms	No. of Isolates (%)	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		range	MIC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	MIC <sub>90</sub> <sup>a</sup>	Resistance rate (%) <sup>a</sup>
<i>E. faecalis</i>	101 (91.8%)	4~>64			
<i>E. avium</i>	7 (6.36%)	2~>64	16	64	65.45
<i>E. durans</i>	2 (1.81%)	32			

<sup>a</sup> The results of MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, and resistance rate(%) represent all of 110 *Enterococci* isolates not each species, because the number of *E. avium* and *E. durans* were too small to calculate MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> and resistance rate.

tion하였다.

## 결과 및 고찰

원유 시료 중에 존재하는 장구균속 세균을 분리하기 위하여 경기 북부지역에 위치한 15개의 축산 농가에서 378개의 원유 시료를 분양 받아 Enterococcosel medium 배지에 도말하여 장구균 속 세균을 분리하였다. Enterococcosel 배지에서 장구균 특유의 노란색 색소를 생성하는 집락 중 110개의 집락이 균 동정 결과 *Enterococci* spp.로 확인되었으며 분리된 균의 중별 분포를 보면 Table 2에 나타난 것처럼 *E. faecalis*가 101 (91.82%), *E. avium*이 7 (6.36%), *E. durans*가 2 (1.82%)의 순이었다. 원유시료에서 흔히 검출되는 *E. faecium*이 검출되지 않은 것은 본 실험 결과의 특이사항으로 사료된다. 총 110개의 장구균 속 세균의 erythromycin에 대한 내성을 보면 MIC<sub>50</sub>은 16  $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>90</sub>은 64  $\mu\text{g/ml}$ 이었으며 CLSI의 판단 기준에 따른(>8  $\mu\text{g/ml}$ ) 내성 균주의 분포 비율은 65.45%였다. erythromycin은 대표적인 마크로라이드계 항생제로 그람양성 세균에 의한 감염증 치료시 페니실린계 항생제를 이용할 수 없는 환자들에게 사용하는 약물이면서 동물성 사료에도 첨가가 허용된 항생제이다. 원유시료에서 분리된 그람양성 세균인 장구균의 erythromycin에 대한 내성 비율이 높게 나타난 것은 임상분리균의 경우와 유사한 정도이며 이는 Mannu 등의 연구 결과와도 일치한다(16). 디스크법에 의한 내성 표현형을 관찰한 결과는 Table 3에 나타내었다. 지속성 내성(cMLS<sub>B</sub>)을 나타내는 균주는 *E. faecalis*의 경우 88균주(87.1%)가 *E. avium*의 경우 5균주(71.4%), *E. durans*가 2균주(100%)였으며 유도내성(iMLS<sub>B</sub>)의 표현형을 나타내는 균주는 *E. faecalis*의 경우 13균주(12.9%),



**Fig. 1.** Phenotype of MLS<sub>B</sub> resistant *Enterococci* spp. isolated from milk sample. The disks labeled with E contain 15  $\mu\text{g}$  of erythromycin and J contain 15  $\mu\text{g}$  of josamycin per disk. The left figure shows the typical form of iMLS phenotypes with D-shaped inhibition zone area of josamycin. Also the right figure shows the typical form of cMLS phenotype.

*E. avium*의 경우 2 (28.5%)였다(Fig. 1). 유도내성에 비해 지속성 내성 균주의 비율이 높게 나타났는데 윤 등(21)의 연구 결과에 따르면 우리나라 환자로부터 분리된 임상분리 장구균의 경우에도 지속성 내성 균주의 비율이 높게 나타났다. 이러한 결과는 우리나라에서 분리되는 장구균에서 현저하게 나타나는 현상으로 판단되며 이러한 현상에 대해서는 지속적인 탐색 및 원인규명이 필요한 것으로 사료된다(5, 13). 한편 erythromycin 내성에 관계된 유전자형을 실험한 결과 분리된 장구균 110종이 모두 macrolide 항생제의 target site인 23S rRNA에 methylation하는 erm(B) 유전자를 소유하고 있음을 확인하였다. 그 외 erm(A) 및 erm(C)를 보유한 균은 확인할 수 없었다(Table 3). 또한 분리균의 75.45%인 83종이 항생제 efflux pump에 관여한 mef(A) 유전자를 갖고 있음을 확인하였으며 그의 mef 유전자 및 msr 계열의 유전자는 없는 것으로 확인되었다. 동물성 식품 유래 장구균의 erythromycin에 대한 내성율은 비교적 높은 것을 알 수 있었으며 특히 외국에 비해 지속성 내성 균주의 분포 비율이 높은 것을 알 수 있었다. 또한 erm(B) 유전자의 보유 비율은 임상 균주의 결과와도 일치하게 높았으나 mef(A) 유전자의 보유 균주의 비율이 높은 것은 임상 균주에서 볼 수 없는 현상으로 사료된다(13). 본 연구는 우리나라 동물성 식품 유래 장구균의 erythromycin 내성 기전을 표현형 및 유전형 분석을 통해 분석하였다는 점에서 의미 있는 연구 결과로 판단되며 앞으로도 지속적인 모니터링을 실시하고자 한다.

## 결론

동물성 식품 유래 장구균의 에리스로마이신 내성 유전자형 및 표현형을 분석하고자 하였다. 경기북부지역의 축산 농가 15 곳으로부터 원유 시료 378개를 분양받아 본 실험에 사용하였으며 에리스로마이신 내성 장구균 분리에 사용하였다. 총 110균주의 장구균이 분리 되었으며 이중 *E. faecalis*가 101균주, *E. avium*이 7균주, *E. durans*가 2균주였다. 에리스로마이신에 대한 내성 비율은 65.45%였으며 MIC<sub>50</sub>은 16  $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>90</sub>은 64  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 분리된 장구균 110균주 모두 erm(B) 유전자를 소유하고 있었으며 75.45%인 83균주가 mef(A)를 소유하고 있음을 확인하였다. 표현형 분석에 따르면 지속성 내성(cMLS<sub>B</sub>)을 나타내는 균주는 95균주(86.36%)였으며 유도내성(iMLS<sub>B</sub>)을 보이는 균주는 15균주(13.34%)였다.

**Table 3.** Genotype and phenotype of erythromycin resistant *Enterococci* spp. isolated from raw milk sample

Strains (n)	Genotypes [n(%)]							Phenotypes [n(%)]		
	<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (B)	<i>erm</i> (C)	<i>msr</i> (A)	<i>msr</i> (C)	<i>mef</i> (A)	<i>mef</i> (E)	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)	iMLS <sub>B</sub>	cMLS <sub>B</sub>
<i>E. faecalis</i> (101)	0	101 (100)	0	0	0	78 (77.2)	0	78 (77.2)	13 (12.9)	88 (87.1)
<i>E. avium</i> (7)	0	7 (100)	0	0	0	3 (42.8)	0	3 (42.8)	2 (28.5)	5 (71.4)
<i>E. durans</i> (2)	0	2 (100)	0	0	0	2 (100)	0	2 (100)	0 (0)	2 (100)

## 감사의 말

본 연구는 2009년도 삼육대학교 교비 연구비 지원에 의해 진행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Clarebout, G., E. Nativelle, B. Bozdogan, C. Villers, and R. Leclercq. 2004. Bactericidal activity of quinupristin-dalfopristin against strains of *Staphylococcus aureus* with the MLS(B) phenotype of resistance according to the *erm* gene type. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 444-449.
- Clarebout, G., E. Nativelle, and R. Leclercq. 2001. Unusual inducible cross resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B by methylase production in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.* 7, 317-322.
- CLSI. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. ASM press, Washington, D.C., USA.
- Daly, M.M., S. Doktor, R. Flamm, and D. Shortridge. 2004. Characterization and prevalence of *mef*(A), *mef*(E), and the associated *msr*(D) gene in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3570-3574.
- Delialioglu, N., G. Aslan, C. Ozturk, V. Baki, S. Sen, and G. Emekdas. 2005. Inducible clindamycin resistance in staphylococci isolated from clinical samples. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58, 104-166.
- Devriese, L.A., M.D. Collins, and R. Wirth. 1992. The genus *Enterococcus*. In A. Ballows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> ed., vol. 2, pp. 1465-1478, Springer-Verlag, New York, N.Y., USA.
- Felmingham, D., R.R. Reinert, Y. Hirakata, and A. Rodloff. 2002. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from PROTEKT surveillance study and comparative *in vitro* activity of the ketolide, telithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 25-37.
- Flahaut, S., P. Boutibonnes, and Y. Auffray. 1997. Les enterocoques dans l'environnement proche de l'homme. *Canad. J. Microbiol.* 43, 699-708.
- Giovanetti, E., M.P. Montanari, M. Mingoia, and P.E. Varaldo. 1999. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in Italy and heterogeneity of inducibly resistant strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1935-1940.
- Jeong, S.H., S.K. Lim, H.S. Lee, B.Y. Jeong, J.Y. Lee, C.B. Yang, and H.C. Shin. 2008. The present situation of antibiotics used in animal and resistant bacteria. *Infect. Chemother.* 40, 144-149.
- Klein, G., A. Pack, and G. Reuter. 1998. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1825-1830.
- Kwon, Y.I., T.W. Kim, H.Y. Kim, Y.H. Chang, H.S. Kwak, G.J. Woo, and Y.H. Chung. 2007. Monitoring of antimicrobial resistant bacteria from animal farm environments in Korea. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 17-25.
- Lim, J.A., A.R. Kwon, S.K. Kim, Y. Chong, K. Lee, and E.C. Choi. 2002. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 489-495.
- Luna, V.A., P. Coates, E.A. Eady, J.H. Cove, T.T. Nguyen, and M.C. Roberts. 1999. A variety of Gram-positive bacteria carry mobile *mef* gene. *J. Antimicrob. Chemother.* 44, 19-25.
- Malani, P.N., C.A. Kauffman, and M.J. Zervos. 2002. Enterococcal disease, epidemiology and treatment. In M.S. Gilmore (ed.), *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology and antimicrobial resistance*, pp. 385-408. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA.
- Mannu, L., A. Paba, E. Daga, R. Comunian, S. Zanetti, I. Duprè, and L.A. Sechi. 2003. 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.
- Nam, H.M., S.K. Lim, J.S. Moon, H.M. Kang, J.M. Kim, K.C. Jang, J.M. Kim, M.I. Kang, Y.S. Joo, and S.C. Jung. 2009. Antimicrobial resistance of enterococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. *Zoonoses Public Health* 2009 Dec 23. [Epub ahead of print]
- NORM. NORM-VET. 2003. Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway, pp. 1-72.
- OIE. European Scientific Conference. 2001. The use of antibiotics in animal ensuring the protection of public health. pp. 8-142.
- Portillo, A., F. Ruiz-Larrea, M. Zarazaga, A. Alonso, J.L. Martinez, and C. Torres. 2000. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 967-971.
- Yoon, E.J., Y.M. Yoon, S.S. Choi, A.E. Kwon, M.J. Shim, and E.C. Choi. 2006. The study of MLS-resistance Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. *Yakhak Hoeji.* 50, 204-207.
- Uh, Y., I.H. Jang, G.Y. Hwang, M.K. Lee, K.J. Yoon, and H.Y. Kim. 2004. Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide resistance genes of beta hemolytic Streptococci in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2716-2718.