

## 원유 시료에서 분리한 장알균속 세균의 다중약물 유출 펌프 (Multidrug Efflux Pump) 유전자의 분포도와 항생제 내성 패턴

강소원<sup>1</sup> · 이상진<sup>1</sup> · 최성숙<sup>2\*</sup>

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

### Distribution of Multidrug Efflux Pump Genes in *Enterococci* spp. Isolated from Bovine Milk Samples and Their Antibiotic Resistance Patterns

SoWon Kang<sup>1</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 March 26, 2013 / Accepted June 9, 2013)

The major aim of this study was to investigate the distribution of genes that encode multidrug efflux pumps in *Enterococci* spp. isolates from bovine milk samples and antibiotic resistance patterns of these strains. Of the 245 isolates, 44.1% showed ampicillin resistance, 79.2% showed erythromycin resistance, 76.3% showed tetracycline resistance and 36.3% showed chloramphenicol resistance. In case of vancomycin and ciprofloxacin, all of the isolates were susceptible to these antibiotics. Of the 245 enterococcal isolates, 82.1% have MFS type *eme(A)* gene, 72.7% have ABC type *efr(A)* gene, 77.1% have ABC type *efr(B)* gene, and 71.8% have ABC type *lsa* gene. In case of *Enterococcus faecalis*, the original strain for these genes, 92.5% have *eme(A)*, 87.4% have *efr(A)*, 88.4% have *efr(B)*, and 88.4% have *lsa*. Interestingly, in case of different species of *Enterococci*, *eme(A)* was also detected in four strains of *E. faecium*, seven strains of *E. avium*, four strains of *E. durans* and two strains of *E. raffinosus*. *efr(A)* was also detected in two strains of *E. faecium* and two strains of *E. durans* and *efr(B)* was also detected in four strains of *E. faecium*, five strains of *E. avium* and four strains of *E. durans*. This means the possibility of co-transfer of resistance genes between *Enterococci* species in natural environment. These results are the first report describing the presence of same multidrug efflux pumps in different species of *Enterococci* in Korea.

**Keywords:** *Enterococci*, antibiotic resistance, bovine milk sample, multidrug efflux pump

장알균속 세균은 그람 양성균으로 사람과 동물에 정상적으로 상재하는 세균의 일종으로 보통 사람과 동물의 소화관, 야채류 및 유제품 등에서 쉽게 검출되는 균이다(Devriese *et al.*, 1992; Flahaut *et al.*, 1997). 건강한 사람에게는 질병의 위험이 없으나 면역성이 약한 만성 질환자들을 대상으로 원내 감염을 일으켜 수술 후 감염, 비뇨기 감염 및 균혈증의 주요 원인 균으로 알려지기 시작하였다(Klein *et al.*, 1998). 하지만 장알균이 본태성 내성을 나타내는 항생제가 많을 뿐 아니라 감수성이던 항생제에 대해 내성을 획득하는 경우가 많아 항생제를 이용한 장알균 감염 치료를 어렵게 하고 있다(Malani *et al.*, 2002). 항생제 내성의 문제는 사람뿐만 아니라 축산분야에서도 내성 증가로 인한 가축의 질병 치료의 어려움을 겪고 있고 내성균 또는 내성에 관여하는

유전자가 사람에게로의 전달 가능성이 제기 되고 있어 공중보건학적으로 중요하게 대두되고 있다(OIE, 2001; NORM, 2003). 세균이 항생제에 내성을 나타내는 기전은 1) 항생제의 불활성화 2) 약물의 표적 부위의 변화 3) 세포내 투과도 변화에 의한 약물의 세포내 농도 감소 4) 약물의 능동적 유출 등으로 구분할 수 있다(Putman *et al.*, 2000). 특히 다제내성균의 문제가 심각한 현실에서 약물의 능동적 유출에 관여하는 펌프의 중요성은 점점 증가하고 있다. 약물 유출을 담당하는 펌프는 항생제의 종류에 구애 받지 않고 다양한 항생제, 살균 소독제 및 각종 독성 물질들도 동시에 유출시키며 특이성이 크지 않기 때문에 한번도 노출된 적이 없는 서로 다른 계열의 항생제도 유출할 수 있어 동시에 여러 항생제에 내성을 나타내도록 한다(Levy, 1992; Saier *et al.*, 1994). 세균에서 알려진 다중약물 유출 펌프는 에너지원과 염기서열의 유사성에 따라 크게 다섯가지로 구분할 수 있다: 1) ATP binding cassette (ABC) superfamily (Lubelski *et al.*, 2007), 2)

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

major facilitator superfamily (MFS) (Pao *et al.*, 1998), 3) small multidrug resistance (SMR) superfamily (Jack *et al.*, 2001), 4) multidrug and toxic compound extrusion (MATE) superfamily (Kuroda and Tsuchiya, 2009), 5) resistance-nodulation-cell division (RND) superfamily (Tseng *et al.*, 1999; Seeger *et al.*, 2008). 이중 그람양성 세균은 ABC, MFS 및 SMR 타입의 유출 펌프를 갖고 있는 것으로 보고되었다(Depardieu *et al.*, 2007). 다중약물 유출 펌프는 염색체 또는 plasmid 상에 그 유전자가 존재하며 특히 염색체상에 존재한다는 것은 기질인 항생제 등에 의해 필요에 따라 유전자 발현을 조절할 수 있다는 장점이 된다 (Grkovic *et al.*, 2002; Hollenbeck and Rice, 2012). 대표적인 장알균속 세균인 *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)에서 잘 알려진 다중약물 유출 펌프로는 MFS 타입에 속하는 EmeA와 ABC 타입에 속하는 EfrAB와 Lsa가 있다. EmeA는 *Staphylococcus aureus*의 NorA와 염기서열의 유사성이 있는 펌프로 quinolone 계 항생제, 엥화벤잘코니움 등의 살균 소독제의 내성에 관여하고 있음이 알려져 있다(Jonas *et al.*, 2001). Lsa는 지금까지 장알균속 세균 중 *E. faecalis*에서만 존재하는 것으로 알려진 다중약물 유출 펌프로 lincosamide 및 streptogramin계, quinolon계 항생제 및 살균제의 유출에 관여하는 것으로 보고되었다(Singh *et al.*, 2002). 최근 Lee 등(2003)의 연구에 따르면 전형적인 ABC 타입의 약물 유출 펌프에 해당하는 EfrAB가 *E. faecalis*에서 발견되었으며 관련 유전자로 *efr(A)*와 *efr(B)*가 있음을 보고하였다. EfrAB는 tetracycline, quinolone계 항생제 및 각종 살균, 소독제에 대한 내성에 관여하는 다중약물 유출 펌프이다(Lubelski *et al.*, 2007). 그 외에도 macrolide계 항생제에 특이적인 *mef(A)*, tetracycline에 특이적인 *tet(K)*, *tet(L)*은 drug-specific efflux pump로 알려진 장알균에 존재하는 MFS 타입의 펌프이다. 최근 Sánchez 등(2013)은 스페인의 전통 발효 식품에서 분리한 *E. faecalis*의 96%가 ABC 타입의 유출 펌프인 EfrAB을 갖고 있으며 *E. faecium*의 16%가 이 유전자를 갖고 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 우리나라 원유 시료에서 분리한 장알균을 대상으로 각종 항생제에 대한 내성 패턴을 연구하고 장알균에 존재한다고 보고된 다중약물 유출 펌프인 EmeA, EfrAB 및 Lsa의 분포도를 조사, 비교하고자 하였다. 특히 *E. faecalis* 이외의 다른 종에 속한 장알균속에서 *eme(A)*, *efr(A)*, *efr(B)* 및 *lsa* 유전자 분포율과 유전자의 염기서열의 유사성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 본 실험실에서 분리, 동정하여 보관하고 있던 장알균 속 세균 245균주(Kim *et al.*, 2012)를 대상으로 실험을 하였으며 균주의 배양은 Brain Heart Infusion (Difco, USA) 배지를 사용하였다.

### 항생제 감수성 검사

245균주의 장알균을 대상으로 ampicillin (Sigma Co., USA), erythromycin (Sigma Co.), tetracycline (Sigma Co.), chloramphenicol

(Sigma Co.), vancomycin (Sigma Co.) 및 ciprofloxacin (Korea united pharm Inc.)에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 감수성 검사는 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, USA)의 고체 배지 희석법으로 실시하였으며(CLSI, 2007) Muller-Hinton (Difco) 배지를 사용하고 표준 장알균으로 *E. faecalis* ATCC29212를 사용하였다. 본 실험에 사용한 항생물질은 최고 농도를 64 µg/ml로 하고 2배 계열 희석하여 최저 농도가 0.03 µg/ml 되도록 항생물질 희석 계열을 만들었다. 여기에 하룻밤 전 배양한 균액을 10<sup>6</sup> CFU/ml 되도록 희석한 후 5 µl씩 항생제 배지에 접종하여 배양하고 균주의 성장을 확인할 수 없는 가장 낮은 항생제의 농도를 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)로 결정하였다

### 약물 유출 펌프 관련 유전자의 검출

다중약물 유출 펌프 유전자 후보군으로는 *eme(A)*, *efr(A)*, *efr(B)* 및 *lsa*를 대상으로 하였으며 drug specific 한 *msr(A)*, *msr(C)*, *mef(A)*, *tet(L)* 및 *tet(K)*에 대한 분포도 함께 확인하였다. 장알균의 genomic DNA는 GeneAll Cell SV kit (GeneAll Biotechnology Co. Ltd., Seoul, Korea)을 이용하여 분리하였으며 장알균의 세포벽의 분해를 용이하게 하기 위하여 lysozyme (30 mg/ml, Sigma)을 첨가하였다. 유전자의 검출은 gene specific PCR 반응을 실시하였으며 primer는 Genotech (Daejeon, Korea)에서 제작하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 primer의 염기서열과 반응조건을 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 AccuPower™ premix (Bioneer, Korea)를 사용하여 95°C, 5분간 denaturation 후 95°C, 30초, Table 1에 표시된 annealing 조건에서 30초, 72°C 1분간 extension 반응을 30회 반복 후 마지막 72°C 10분간 elongation하였다.

### 다중약물 유출 펌프의 DNA염기서열 분석

PCR 반응으로 증폭한 DNA 절편이 해당 약물 유출 펌프 유전자인지 확인하기 위하여 DNA 염기서열을 확인하였다. 각 유전자의 PCR 반응 후 전기영동을 실시하여 해당 크기의 DNA 절편을 agarose gel에서 잘라낸 후 GeneAll PCR purification kit (GeneAll Biotechnology Co. Ltd.)을 이용해 agarose gel에서 DNA를 추출, 정제 후 Genotech에 의뢰하여 염기서열을 결정 후 미국국립의학도서관(PubMed)에서 제공하는 염기서열분석(nucleotide blast)을 하여 염기서열의 동질성을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 장알균의 항생제 감수성 유형

원유시료에서 분리한 245 장알균속 균주의 항생제 내성을 조사한 결과 ampicillin에 대한 내성률은 44.1% (MIC<sub>50</sub> 8 µg/ml, MIC<sub>90</sub> 32 µg/ml), erythromycin에 대한 내성률은 79.2% (MIC<sub>50</sub> > 64 µg/ml, MIC<sub>90</sub> > 64 µg/ml), tetracycline에 대한 내성률은 76.3% (MIC<sub>50</sub> > 64 µg/ml, MIC<sub>90</sub> > 64 µg/ml), chloramphenicol에 대한 내성률은 36.3% (MIC<sub>50</sub> 8 µg/ml, MIC<sub>90</sub> > 64 µg/ml), vancomycin에 대한 내성률은 0% (MIC<sub>50</sub> 0.5 µg/ml, MIC<sub>90</sub> 1 µg/ml)

**Table 1.** Primers used for this study

Gene	Sequences (5→3)	Amplicon (bp)	Annealing Temp. (°C)
<i>eme(A)</i>	AGCCAAGCGAAAAGCGGTTT	123	55
	CCATCGCTTTCGGACGTTCA		
<i>erf(A)</i>	GTCTGTTTCGTTTAATGGCAGCAGCC	258	57
	CGAATAGCTGGTTCATGTCTAAGGC		
<i>erf(B)</i>	ATGTTCTTAATCAATCCGCTGATGGC	345	57
	CATAGTAAC TACCAAGGACAGCTACCC		
<i>lsa</i>	GTGACTTCTTTGAACAGTGGGA	232	55
	TTCAGCCACTTGTGTCTGCC		
<i>mef(A)</i>	ATTGCAGCTGGTTTACAGGC	425	55
	CATGATAACAATGCACACGCA		
<i>msr(A)</i>	GCA AATGGTGTAGGTAAGACAAC	278	55
	ATCATGTGATGTAACAAAAT		
<i>msr(C)</i>	ATAACAAACCTGCAAGTTC	324	55
	CTTCAATTAGTCGATCCATA		
<i>tet(K)</i>	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC	718	53
	GCAAAC TCAATCCAGAAGCA		
<i>tet(L)</i>	CACGATAGCTAAGTTATAACGAAGATAGTAGCC	508	58
	AATGGAAAAGGTTAACATAAAGGCTGTGTTACCC		

**Table 2.** Distribution of MIC values against the 245 Enterococcal isolates from raw milk sample

Abs	Number of isolates with MIC (µg/ml)													MIC range (µg/ml)			Interpretation (%)		
	≤0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64	range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	S	I	R
Amp		2	4	2	4	18	26	24	57	56	37	10	5	0.06 ~ >64	8	32	137 (55.9)	0	108 (44.1)
Em			4	5		9	10	20	9	13	15	0	160	0.13 ~ >64	>64	>64	9 (3.7)	42 (17.1)	194 (79.2)
Tc				2	3	9	5	38	1	4	8	29	146	0.25 ~ >64	>64	>64	57 (23.3)	1 (0.4)	187 (76.3)
Cam	3		3	5		8	6	42	54	35	20	41	28	≤0.03 ~ >64	8	>64	121 (49.4)	35 (14.3)	89 (36.3)
Van	13		27	32	145	14		10	3	1				≤0.03 ~ 16	0.5	1	244 (99.6)	1 (0.4)	0
Cip	17	14	17	42	76	68	11							≤0.03 ~ 2	0.5	1	234 (95.5)	11 (4.5)	0

Amp, ampicillin; Em, erythromycin; Tc, tetracycline; Cam, chloramphenicol; Van, vancomycin; Cip, ciprofloxacin. S, sensitive; I, intermediate; R, resistant.

및 ciprofloxacin에 대한 내성률은 0% (MIC<sub>50</sub> 0.5 µg/ml, MIC<sub>90</sub> 1 µg/ml)로 관찰되었다. 본 연구 결과 장알균의 erythromycin과 tetracycline에 대한 내성균의 비율이 79.2%와 76.3%로 높게 나타났다으며 이러한 결과는 다른 국내, 외 다른 연구 결과와도 유사한 경향을 보이고 있음을 알 수 있으며(Mannu et al., 2003; Kwon et al., 2007; Jeong et al., 2008; Nam et al., 2009) 우리나라 축산물 유래 장알균의 erythromycin과 tetracycline에 대한 내성비율이 높음을 알 수 있었다(Table 2).

#### 약물 유출 펌프 유전자의 분포 비율

장알균에 존재하는 multidrug efflux pump를 coding 하는 *eme(A)*, *erf(A)*, *erf(B)* 및 *lsa* 유전자의 분포를 PCR법으로 확인하였다. 그 결과 총 245균주 중 201균주(82.1%)가 *eme(A)*를 보유하고 있었으며, 178균주(72.7%)가 *erf(A)* 유전자를, 189균주(77.1%)가 *erf(B)* 유전자를 보유하고 있었으며 176균주(71.8%)가 *lsa* 유전자를 보유하고 있었다. 한편 내성 비율이 높은 erythromycin

과 tetracycline에 특이적인 efflux pump인 *mef(A)*, *msr(A)*, *msr(C)*, *tet(K)* 및 *tet(L)*의 분포도 함께 조사한 결과 143 균주(58.4%)가 erythromycin specific pump인 *mef(A)*를 30균주(12.2%)가 tetracycline specific pump인 *tet(L)*을 갖고 있음을 확인하였다 (Table 3). 장알균속에서 알려진 대표적인 다중약물 유출 펌프인 EmeA는 MFS 계열에 속하는 펌프로 *S. aureus*의 NorA와 염기서열 유사성이 32%인 펌프이다(Jonas et al., 2001). EmeA는 각종 항생제와 염화벤잘코니움 등의 살균 소독제 내성에 관여하고 있음이 알려져 있는 대표적인 multidrug efflux pump로 본 실험에 사용한 전체 장알균중 82.1% (201/245)에 분포하고 있었다. *E. faecalis*의 경우 199균주 중 184균주에서(92.5%) *eme(A)* 유전자가 분포함을 확인하였으며 그 외에도 *E. faecium* 균주에서 25 균주 중 4개 균주에서(16%), *E. avium*의 경우 7개 균주 모두에서(100%), *E. durans*의 경우 6균주중 4개 균주에서, *E. raffinosus*의 경우 4개 균주 중 2개 균주에서 *eme(A)*가 존재함을 알 수 있었으며 각 유전자의 염기서열의 동질성은 *E. faecalis* V583 유전

**Table 3.** Distribution of multidrug drug efflux pump genes in *Enterococci* spp. isolated from bovine milk samples in Korea

Strains	No. of isolates (%)	Phenotypes								Genotypes					
		Erythromycin				Tetracycline				Multidrug efflux pumps (%)				Drug-specific efflux pumps (%)	
		Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Resistance rate (%)	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Resistance rate (%)	<i>eme(A)</i>	<i>efr(A)</i>	<i>efr(B)</i>	<i>lsa</i>	<i>mef(A)</i>	<i>tet(L)</i>
		MIC (μg/ml)				MIC (μg/ml)									
<i>E. faecalis</i>	199(81.2)	0.13~>64	>64	>64	170(85.4)	0.5~>64	>64	>64	149(74.9)	184 (92.5)	174 (87.4)	176 (88.4)	176 (88.4)	135 (67.8)	24 (12.1)
<i>E. faecium</i>	25(10.2)	3.13~>64	>64	>64	15(60.6)	0.25~25	>64	>64	18(72.0)	4 (16)	2 (8)	4 (16)	0	5 (20)	4 (16)
<i>E. avium</i>	7(2.9)	4~>64	4	>64	3(42.9)	64~>64	64	>64	7(100)	7 (100)	0	5 (71.4)	0	3 (42.9)	0
<i>E. durans</i>	6(2.5)	2~>64	4	>64	2(33.3)	16~>64	>64	>64	6(100)	4 (66.7)	2 (33.3)	4 (66.7)	0	0	1 (16.7)
<i>E. gallinarum</i>	4(1.6)	0.25~>64	>64	>64	3(75)	>64	>64	>64	4(100)	0	0	0	0	0	1 (25)
<i>E. raffinosus</i>	4(1.6)	0.13~>64	0.25	32	1(25)	1~>64	>64	>64	3(75.0)	2 (50)	0	0	0	0	0
Total	245(100)	0.13~>64	>64	>64	194(79.2)	0.25~>64	>64	>64	187(76.3)	201 (82.1)	178 (72.7)	189 (77.1)	176 (71.8)	143 (58.4)	30 (12.2)

자와 98% 이상 동질성이 있음을 알 수 있었다. *EmeA*는 원래 *E. faecalis*에 존재하는 MFS 타입의 약물 유출 펌프이나 본 연구 결과에 따르면 *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans* 및 *E. raffinosus*에서도 염기서열이 거의 동일한 *eme(A)* 유전자가 존재함을 확인할 수 있었으며 이는 같은 속에 속한 균 사이의 유전자의 수평 이동에 대한 가능성을 말해 주고 있다. 한편 ABC 타입의 다중약물 유출 펌프인 *lsa*, *efr(A)* 및 *efr(B)* 유전자의 분포는 *lsa*의 경우 245균주 중 176균주에서(71.8%) 관찰되었으며 *efr(A)*는 245균주 중 178균주에서(72.7%), *efr(B)*는 189균주에서(77.1%) 관찰되었다. Singh 등(2002)의 보고에 따르면 환자에서 분리된 장알균을 대상으로 한 연구 결과 *E. faecalis*균은 100%가 *lsa* 유전자를 보유하고 그 외의 다른 종의 장알균에서는 *lsa* 유전자의 존재를 확인하지 못하였다고 하였고 *lsa* 유전자를 인위적으로 *E. faecium*에 도입하였을 때 정상적으로 발현되어 quinupristin/dalfopristine에 대한 내성을 획득함을 보고하였다. 하지만 본 연구에 따르면 88.4%의 *E. faecalis*가 *lsa* 유전자를 소유하고 있었으며 그 외 다른 종에선 *lsa* 유전자가 존재하지 않았다. 한편 가장 최근에 알려진 새로운 ABC 타입의 유출 펌프인 EfrAB 펌프 유전자는 *E. faecalis* 외에도 *efr(A)*는 *E. faecium* 2균주, *E. durans* 2균주에 존재함을 확인하였으며 *efr(B)*는 *E. faecium* 4균주, *E. avium* 5균주, *E. durans* 4균주에 존재하는 것을 확인하였다. 장알균속에 존재하는 *efr(A)*와 *efr(B)* 유전자 분포를 보고한 Sanchez 등(2013)의 연구에 따르면 *E. faecalis*에서는 96%, *E. faecium*에서는 13%의 균에 본 유전자가 분포한다고 보고하고 있다. 하지만 본 연구에서 확인된 것으로는 *E. faecalis* 중 87.4%에서 *efr(A)*가, 88.4%에서 *efr(B)*가 분포하였으며 *E. faecium* 중 8%에서 *efr(A)*가, 16%에서 *efr(B)*가 분포하고 있었다. 한편 그 외 다른 장알균인 *E. avium*, *E. durans* 및 *E. raffinosus*에서도 *efr(A)*, *efr(B)* 유전자가 존재함을 확인하였다. 특히 본 연구에서 확인된 각 유전자의 염기서열의 동질성은 *E. faecalis* V583과 비교하였

을 때 98% 이상 동질성이 있음을 알 수 있었으며 *E. faecalis* 및 *E. faecium*이외 장알균 속에서 *efr(A)*, *efr(B)*가 존재함을 보고한 최초의 보고로 사료되어 더욱 가치가 있는 자료로 판단된다. 한편 원유시료에서 분리된 장알균이 erythromycin과 tetracycline에 대해 높은 내성률을 나타내어 두 약물에 특이적인 efflux pump의 존재를 조사한 결과 erythromycin에 대한 efflux pump 중에는 *mef(A)*만이 존재하는 것을 확인하였으며(143/245, 58.4%) tetracycline에 특이적인 efflux pump는 *tet(L)*만이 존재하는 것을(30/245, 12.2%) 확인하였다. 특히 tetracycline에 대한 높은 내성률에 비해 *tet(L)*의 분포율은 상대적으로 낮으나 이는 이미 본 연구자 등이 보고한 대로(Kim and Choi, 2012) 63.7%의 균이 표적부위를 변화시키는 *tet(M)*을 갖고 있기 때문인 것으로 사료된다. 본 연구는 우리나라의 축산물 유래 장알균에서 다중약물 유출 펌프 유전자인 *eme(A)*, *efr(A)*, *efr(B)*, 및 *lsa* 유전자의 분포비율을 연구한 첫 보고라 사료되며 또한 *E. faecalis*이외 다른 종의 장알균에서 *E. faecalis*에 존재한다고 알려진 다중약물 유출 펌프 유전자인 *eme(A)*, *efr(A)* 및 *efr(B)*가 존재함을 규명한 연구로서 동일속에 속한 다른 종의 균주간의 내성 유전자의 수평이동에 대한 가능성을 시사하는 결과로 추후에도 지속적인 모니터링이 필요하다.

**적 요**

원유시료에서 분리한 장알균속 세균 245균주의 항생제 내성에 관여하는 다중약물 유출 펌프 유전자 분포도와 항생제 내성 패턴을 연구하였다. 그 결과 245 장알균속 균주의 ampicillin에 대한 내성률은 44.1%, erythromycin에 대한 내성률은 79.2%, tetracycline에 대한 내성률은 76.3%, chloramphenicol에 대한 내성률은 36.3%였으며 vancomycin과 ciprofloxacin에 대해서는 모두 감수성임을 알 수 있었다. 내성 관련 유전자 중 MFS타

입의 *eme(A)*는 82.1%의 장알균에 분포하였으며, ABC 타입의 유전자인 *efr(A)*는 72.7%, *efr(B)*는 77.1%, *lsa*는 71.8%의 장알균에 분포하였다. 특히 이러한 유전자의 기원 세균인 *Enterococcus faecalis*의 경우 *eme(A)*는 92.5%, *efr(A)*는 87.4%, *efr(B)*는 88.4%, *lsa*는 88.4%의 분포도를 나타내었다. 한편 동일한 장알균속이지만 종이 다른 장알균에서 *eme(A)*는 *E. faecium* 4균주, *E. avium* 7균주, *E. durans* 4균주 및 *E. raffinosus* 2균주에 분포하고 있었다. *efr(A)*는 *E. faecium* 2균주와 *E. durans* 2균주에 분포하였으며, *efr(B)*는 *E. faecium* 4균주, *E. avium* 5균주 및 *E. durans* 4균주에 분포하였다. 본 연구는 우리나라 원유시료에서 분리한 장알균속의 여러 종의 세균에서 동일한 다중약물 유출 펌프(multidrug efflux pump)의 분포에 대한 첫 번째 보고라 사료되며 *E. faecalis* 이외의 장알균속에서 이러한 유전자의 분포는 서로 다른 종간의 유전자의 수평적인 이동의 가능성을 시사한다.

### 감사의 말

본 연구는 2012학년도 삼육대학교 교내연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- CLSI. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. ASM press, Washington, D.C., USA.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., and Courvalin, P. 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 79-114.
- Devriese, L.A., Collins, M.D., and Wirth, R. 1992. The genus *Enterococcus*. In Ballows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H. (eds.) *The Prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> edn., vol. 2, pp. 1465-1478, Springer-Verlag, New York, N.Y., USA.
- Flahaut, S., Boutibonnes, P., and Auffray, Y. 1997. Les enterocoques dans l'environnement proche de l'homme. *Canad. J. Microbiol.* **43**, 699-708.
- Grkovic, S., Brown, M.H., and Skurray, R.A. 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 671-701.
- Hollenbeck, B.L. and Rice, L.B. 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* **3**, 421-433.
- Jack, D.L., Yang, N.M., and Saier, M.H.Jr. 2001. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3620-3639.
- Jeong, S.H., Lim, S.K., Lee, H.S., Jeong, B.Y., Lee, J.Y., Yang, C.B., and Shin, H.C. 2008. The present situation of antibiotics used in animal and resistant bacteria. *Infect. Chemother.* **40**, Suppl.2 144-149.
- Jonas, B.M., Murray, B.E., and Weinstock, G.M. 2001. Characterization of *emeA*, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3574-3579.
- Kim, J.H. and Choi, S.S. 2012. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from raw milk samples in Korea. *J. Fd. Hyg. Safety* **27**, 63-67.
- Kim, J.H., Lee, S.J., and Choi, S.S. 2012. Copper resistance and its relationship with erythromycin resistance in *Enterococcus* isolates from bovine milk samples in Korea. *J. Microbiol.* **50**, 540-543.
- Klein, G., Pack, A., and Reuter, G. 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.
- Kuroda, T. and Tsuchiya, T. 2009. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794**, 763-768.
- Kwon, Y.L., Kim, T.W., Kim, H.Y., Chang, Y.H., Kwak, H.S., Woo, G.I., and Chung, Y.H. 2007. Monitoring of antimicrobial resistant bacteria from animal farm environments in Korea. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 17-25.
- Lee, E.W., Huda, M.N., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. 2003. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3733-3738.
- Levy, S.B. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 695-703.
- Lubelski, J., Konings, W.N., and Driessen, A.J. 2007. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 463-476.
- Malani, P.N., Kauffman, C.A., and Zervos, M.J. 2002. Enterococcal disease, epidemiology and treatment. In Gilmore, M.S. (ed.) *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology and antimicrobiotic resistance*. pp. 385-408. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA.
- Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè, L., and Sechi, L.A. 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., Lim, S.K., Moon, J.S., Kang, H.M., Kim, J.M., Jang, K.C., Kim, J.M., Kang, M.I., Joo, Y.S., and Jung, S.C. 2009. Antimicrobial resistance of enterococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. *Zoonoses Public Health.* **57**, 59-64.
- 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.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., and Saier, M.H.Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1-34.
- Putman, M., van Veen, H.W., and Konings, W.N. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 672-693.
- Saier, M.H.Jr., Tam, R., Reizer, A., and Reizer, J. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* **11**, 841-847.
- Sánchez, V.A., Lavilla, L.L., Benomar, N., Gálvez, A., Pérez, P.R., and Abriouel, H. 2013. Phenotypic and molecular antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from different traditional fermented foods. *Foodborne Pathog. Dis.* **10**, 143-149.
- Seeger, M.A., Diederichs, K., and Eicher, T. 2008. The AcrB efflux pump: conformational cycling and peristalsis lead to multidrug resistance. *Curr. Drug Targets.* **9**, 729-749.
- Singh, K.V., Weinstock, G.M., and Murray, B.E. 2002. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1845-1850.
- Tseng, T.T., Gratwick, K.S., and Kollman, J. 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 107-125.