

# 서해안 패류양식장 인근 육상오염원에서 분리한 장구균의 Vancomycin 내성 유전자 검출 및 항생제 내성 특성

정연겸 · 박보미 · 황진익 · 김민주<sup>1</sup> · 오은경\*

국립수산과학원 서해수산연구소, <sup>1</sup>한국식품연구원

## Detection of Vancomycin Resistance Genes and Antibiotic Resistance Characteristics of *Enterococcus* spp. Isolated from Inland Pollution Sources Near Shellfish Farms on the West Coast of South Korea

Yeon Gyeom Jeong, Bo Mi Park, Jin Ik Hwang, Min Ju Kim<sup>1</sup> and Eun Gyoung Oh\*

West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Incheon 22383, Republic of Korea

<sup>1</sup>Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Republic of Korea

In this study, 143 strains of *Enterococcus* spp. were isolated from inland pollution sources near shellfish farms on the west coast of South Korea. Not all isolated *Enterococcus* spp. strains possessed vancomycin resistance genes (*VanA* and *VanB*). However, since vancomycin-resistance *Enterococcus* (VRE) have been detected not only in the clinical field but also out in the world, it is possible that the VRE gene may be transferred to other bacterial strains commonly found in coastal waters where seafood is produced. It is important to monitor trends in the appearance of VRE. In addition, antimicrobial resistance patterns of isolates were examined in this study. Overall antimicrobial resistance rates were high: ciprofloxacin (32.2% of isolates resistant), chloramphenicol (30.8%), quinupristin/dalfopristin (19.6%), and tylosin (15.4%). Eight *E. faecium* strains (6.2%), out of the 129 strains assessed, showed multidrug resistance. All multidrug-resistant *E. faecium* showed resistance to erythromycin, quinupristin/dalfopristin, tetracycline, and tylosin, in all 14 strains. All multidrug-resistant *E. faecalis* showed resistance to erythromycin, quinupristin/dalfopristin, tetracycline, and tylosin. Both multidrug-resistant *E. faecium* and multidrug-resistant *E. faecalis* showed common resistance to erythromycin, quinupristin/dalfopristin, tetracycline, and tylosin.

Keywords: Antimicrobial resistance, *Enterococcus* spp., Inland pollution source, Multidrug resistance, VRE

### 서론

장구균(*Enterococcus* spp.)은 사람을 포함한 포유류의 장관 내에 보편적으로 존재하고 있는 통성 혐기성 그람양성구균이다. 장구균은 알칼리, pH, 온도 증가 및 염화나트륨 농도 등 다양한 환경인자에 대하여 내성을 가지고 있어 다른 장내세균과 비교해서 생존성이 매우 높기 때문에 하수와 하천, 연안역 등의 수환경에 있어서 분변지표세균으로서 사용되어지고 있다(Masateru et al., 2015). 이처럼 장구균은 우리의 생활환경 속에서 보편적으로 존재하고 있는 세균으로, 신체가 건강한 사람이 감염된 경우는 통상적으로 무해하거나 증상이 없지만 유아동, 입

원환자 또는 고령자 등 면역력이 저하된 사람에 대해서는 복막염, 패혈증 등의 감염을 일으키는 경우도 있으며, 임상분야에 있어서는 원내감염이 빈번한 병원성세균으로 알려져 있다(Jung et al., 2006; Masateru et al., 2015). 병원성을 나타내는 장구균은 주로 *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans* 등이 있다(Mundy et al., 2000; Seong et al., 2013). 장구균은 원래 각종 항생물질에 자연내성을 가지는 세균이지만, 고도의 aminoglycoside 내성을 발현하는 균주들이 등장하면서 광범위하게 사용되는 항생제로 알려진 vancomycin에도 내성을 나타내게 되었다. 이를 vancomycin 내성 장구균(vancomycin-resistance *Enterococcus*, VRE)이라고 하며 영국에서 1988년 처음 보고된

\*Corresponding author: Tel: +82. 32. 745. 0750 Fax: +82. 32. 745. 0619

E-mail address: ohdagu@korea.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2022.0505>

Korean J Fish Aquat Sci 55(5), 505-513, October 2022

Received 6 August 2022; Revised 2 September 2022; Accepted 18 September 2022

저자 직위: 정연겸(연구사), 박보미(연구원), 황진익(연구사), 김민주(연구원), 오은경(연구관)

이후 우리나라에도 병원감염 등 집단발생이 보고될 뿐만 아니라 세계적으로도 VRE에 의한 감염이 널리 확산되고 있어 문제의 심각성 커지고 있다(Nachamkin et al., 1988; Woo and Ryu, 1997; Cetinkaya et al., 2000).

장구균의 vancomycin 내성을 나타내는 표현형은 VanA, VanB, VanC, VanD, VanE 및 VanG 6가지가 보고되고 있다(Arthur and Courvalin, 1993; Cetinkaya et al., 2000; Park, 2006). 또한 현재까지 vancomycin, teicoplanin 등을 포함하는 Glycopeptide 계열에 저항성을 가지는 유전자는 9종류로 알려져 있는데, 이는 VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN이다(Hammad et al., 2021). 이와 같은 다양한 VRE 유전자형 중에 대표적인 vancomycin 내성 유전자의 형별로 VanA, VanB 및 VanC형이 있으며(Masateru et al., 2017) VanA, VanB의 경우 *E. faecalis*, *E. faecium*가 주요 종인 것으로 보고되고 있다(Rogóz et al., 2019). 또한 VRE는 현존하는 거의 모든 항생제에 내성을 보이며 유효한 항생제가 존재하지 않는 것으로 알려져 있다(Masateru et al., 2017). 이러한 glycopeptide계 항생제인 vancomycin에 대한 내성은 내성 유전자를 지닌 transposon 획득으로 인해 발생하며, 접합을 통해 내성의 전파도 가능하다(Arthur et al., 1993; Park, 2006).

장구균의 vancomycin 내성에 관한 국내 연구는 주로 임상분야에서만 이루어지고 있다(Kim et al., 1998; Lee et al., 2003; Yang et al., 2013; Jeong et al., 2017). 하지만 장구균은 수환경에 광범위하게 분포하고 있기 때문에 VRE가 임상분야에만 한정되지 않고 사람들의 생활과 밀접한 관계가 있는 수환경에서도 존재하고 있을 가능성이 있다. 수환경을 대상으로 한 VRE의 연구 사례가 일부 보고되고 있지만(Kwon and Kim, 2012; Seong et al., 2013; Masateru et al., 2015, 2017), 수산 분야에 영향을 줄 수 있는 VRE의 수환경에 대한 연구는 매우 부족하다.

본 연구에서는 서해안의 패류양식장 인근의 육상오염원을 대상으로 장구균을 분리하고, 분리된 균주에 대해 VRE 유전자를 확인하여 수산 분야로의 영향 가능성을 확인하고자 하였다. 더불어, 수환경에서 VRE를 포함한 항생제 내성 장구균에 대한 정보를 축적하는 것도 중요하기 때문에 vancomycin뿐만 아니라 여러 항생물질에 대한 항생제 내성 및 다제 내성 양상을 파악하여 장구균에 대한 항생제 내성 연구의 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시험 시료

시험에 사용된 시료는 2021년 11월부터 2022년 4월까지 서해안의 패류양식장 중 패류 생산량이 많은 태안군, 서산시를 면하고 있는 가로림만과 태안군 이원면에 위치한 패류양식장과 인근하고 있는 육상오염원 배출수 중 해역의 위생상태에 직접적

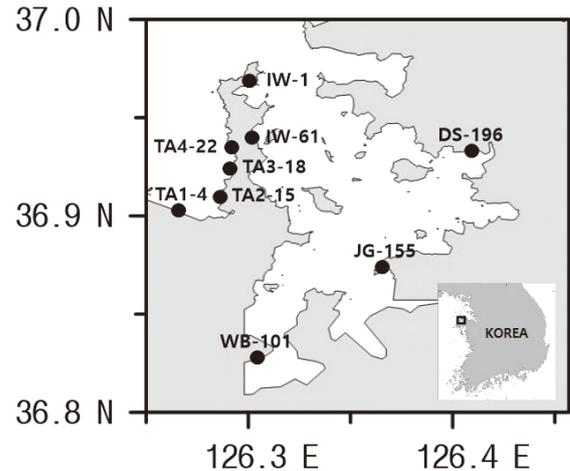


Fig. 1. Sampling station of inland pollution sources (●) in Garorim Bay and Iwon-myeon of Taean-gun and Seosan-city Area in South Korea

영향을 줄 수 있는 것으로 파악되는 조사 지점 9개소를 선정하였다(Fig. 1). 시료는 멸균된 채수병에 1 L 이상 채취하여 10°C 이하로 유지하면서 실험실로 운반하여 24시간 이내에 실험을 실시하였다.

### 장구균 시험 및 분리 동정

장구균을 분리하기 위하여 시료 25 mL을 6.5% NaCl을 포함한 Azide dextrose broth (Merck, Darmstadt, Germany) 225 mL에 가하여 37°C에서 48시간 동안 증균 배양하였다. 증균 배양액을 Enterococcosel agar (BD Difco, Sparks, NV, USA) 평판에 희석도말 하여 37°C로 48시간 분리배양 하였다. 배양 후 검은색의 전형적인 독립 콜로니를 선택하여 Tryptone soya agar (Oxoid, Basingstoke, UK) 평판에 희석도말하여 37°C에서 18–24시간 순수배양한 후 VITEK2 System (BioMerieux, Marcy, France)으로 생화학동정하여 최종 확인하였다.

### DNA 추출

순수분리된 143개 균주의 DNA를 자동핵산추출기인 EMAG (Biomerieux, Marcy, France)로 추출하였다. 시료를 용해액(lysis buffer)에 첨가 후 분해하여 시료 내에 존재하는 핵산을 유리시키는 것과 동시에 핵산분해효소를 비활성화시켰다. 유리된 핵산에 마그네틱 실리카 입자(magnetic silica particle)를 첨가한 후 반응시켜 핵산만 마그네틱 실리카 입자에 부착시킨 후 EMAG 완충용액 1, 2 (extraction buffer)로 세척하고 마그네틱 실리카 - 핵산은 elution buffer로 용해하여 핵산만을 용출시켜 최종 핵산추출물만 분리하였다.

### 장구균의 vancomycin 내성유전자 조사

VRE 특이 유전자인 Van A gene, Van B gene을 동시 검출하

기 위하여 시판되는 PowerChek™ VRE *VanA* & *VanB* Real-time PCR Kit (Kogenebiotech, Seoul, Korea)를 사용하였다. VRE *VanA* & *VanB* Real-time PCR premix 15 µL에 추출한 DNA를 5 µL씩 넣고, 음성대조군은 멸균증류수를, 양성대조군은 Kit 구성품인 control DNA를 5 µL 넣었다. Real-time PCR은 QuantStudio5 (ThermoFisherScientific, Marsiling, Singapore)를 이용하여 50°C 2분, 95°C 1분간 반응한 후 95°C 15초, 60°C 1분간 반응을 35회 반복하였고, fluorophore는 FAM, VIC, Cy5로 각각 *VanA*, *VanB*, internal control를 target gene으로 하였다.

**최소억제농도법(Minimum Inhibitory Concentrations, MIC)을 이용한 항생제 내성 시험**

최소억제농도법(minimum inhibitory concentrations, MIC)을 이용한 항생제 내성 시험은 식품의약품안전처에서 제공하는 국가 항생제 사용 및 내성 모니터링(MFDS, 2020)에 준하여 실시하였으며, 내성 판정의 기준은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020)를 근거로 하였다(Table 1). VITEK2 System으로 동정 및 최종 확인한 분리 균주를 mueller-hinton Agar (Oxoid, Basingstoke, UK) 평판에 희석도말 하여 37±1°C에서 18–20시간 배양한 후 평판배지의 집락을 loop로 취한 후 5 mL 멸균된 증류수에 현탁하여 0.5 McFarland로 탁도를 조정하였다. 탁도를 조정한 현탁액을 cation adjusted mueller-hinton broth 11 mL tube에 10 µL 분주하여 잘 vortexing 한 후 검사 항생제가 농도별로 coating된 MIC Panel

(SENSITITRE, KRVP2F, USA)에 자동 분주 접종기(Auto Inoculator; Sensititre, East Grinstead, UK)를 이용하여 50 µL씩 분주하고 37±0.5°C에서 18–24시간 배양하였다. 이 때 사용하는 MIC panel은 MFDS (2020)에 따라 동일하게 주문제작하여 사용하였다. 배양이 완료된 MIC panel을 MIC 검사용 자동형광 판별기(AutoReader; Sensititre)로 판독하여 균 증식이 완전히 억제되는 가장 낮은 농도를 최소억제농도(MIC)로 판정하였다. 판정된 MIC를 항생제 내성기준(breakpoints)과 비교하여 내성과 감수성을 판정하였다. 분리균주의 항생제 다제 내성 정도는 MAR (multiple antimicrobial resistance) index로 나타내었으며, MAR index는 항생제 내성 시험에 사용된 총 항생제 종류의 수(16종)에 대한 내성을 나타내는 항생제 종류의 수의 비율(내성을 나타내는 항생제 종류의 수/시험에 사용된 총 항생제 종류의 수)로 계산하였다(Krumperman, 1983; Titilawo et al., 2015).

**결과 및 고찰**

**가로림만, 태안군 이원면 인근 육상오염원 중 장구균의 검출 및 분리 현황**

가로림만, 태안군 이원면 해역 인근 육상오염원 배출수 9개소에서 분리한 *Enterococcus* spp. 균주 현황을 Table 2에 나타내었다. 총 143균주가 분리되었으며, *E. faecium*이 129균주, *E. faecalis*가 14균주 분리되었다. 하천수, 방조제 용수, 농업 용수로 주로 이루어져 있는 DS-196, TA1-4, TA2-15, TA4-22, WB-

Table 1. Concentration range and breakpoints of antimicrobial agents used for MIC test against *Enterococcus* spp.

Antimicrobial subclass	Antimicrobial agents (Abbreviation)	Range tested (µg/mL)	Breakpoints (Resistance, µg/mL)	Reference
Aminoglycosides	Gentamicin (GEN)	128-2,048	≥1,024	NARMS (2013)
	Kanamycin (KAN)	128-2,048	≥1,024	NARMS (2013)
	Streptomycin (STR)	128-2,048	≥1,024	NARMS (2021)
Aminopenicillin	Ampicillin (AMP)	1-16	≥16	CLSI (2020)
Fluoroquinolone	Ciprofloxacin (CIP)	0.25-16	≥4	CLSI (2020)
Glycopeptide	Vancomycin (VAN)	2-32	≥32	CLSI (2020)
Glycylcyclines	Tigecycline (TGC)	0.12-2	≥0.5	DANMAP (2013)
Lipopeptides	Daptomycin (DAP)	0.5-32	≥8	CLSI (2020)
	Erythromycin (ERY)	1-64	≥8	CLSI (2020)
Macrolides	Tylosin (TYL)	1-64	≥32	NARMS (2013)
	Linezolid (LNZ)	0.5-16	≥8	CLSI (2020)
Phenicols	Chloramphenicol (CHL)	2-32	≥32	CLSI (2020)
	Florfenicol (FFC)	2-32	≥16	DANMAP (2016)
Streptogramins	Quinupristin/Dalfopristin (SYN)	1-32	≥4	CLSI (2020)
Tetracyclines	Tetracycline (TET)	2-128	≥16	CLSI (2020)
Others	Salinomycin (SAL)	2-32	≥8	DANMAP (2007)

MIC, Minimum inhibitory concentration.

101 조사 지점의 경우 모두 *E. faecium*만 분리되었고, 생활하수로 주로 이루어진 IW-1, IW-61, JG-155, TA3-18의 4지점 중 2 곳인 IW-1, JG-155에서는 *E. faecium*뿐만 아니라 *E. faecalis*도 분리되었다. IW-1 지점은 태안군 이원면 내리에 위치하고 있는 만대항 인근 횃집과 펜션 및 가정집으로부터 유입되는 생활하수가 해역으로 유입되는 지역이며 JG-155 지점은 서산시 지곡면 중왕리 인근 펜션, 어촌마을에서 방출되는 생활하수가 해역으로 유입되는 지역이다. 이 두 지점의 공통점은 관광객 등 유동인구가 증가하는 시기가 아닌 평상시에도 꾸준한 배출량이 있다는 점이다. IW-61, TA3-18 지점의 경우 해수욕장, 펜션 인근의 생활하수가 주요육상오염원 배출수이기 때문에 관광객이 집중되는 때에만 방출량이 많다는 점에서 차이가 있으며, 본 조사 시기에는 생활하수가 많이 배출되고 있지 않았다. Gilmore and Ferretti (2003)은 사람의 장에는 *E. faecalis*가 약 90%, *E. faecium*이 약 10% 분포하고 있다고 보고하였고, Masateru et al. (2017)은 하수에서 분리된 장구균의 우점종은 *E. faecalis*였으며, 하천수에서 분리한 총 59균주의 장구균 중 *E. faecalis*가 11주(19%), *E. faecium*이 26주(44%)라고 보고하고 있어 환경 유래 오염원에서는 *E. faecalis*보다는 *E. faecium*이 우점하고 있고 인간 유래 오염원이 많아지면 *E. faecalis*가 분리되는 빈도가 많아진다는 본 연구 결과와 일치하였다. 이와 같은 이유로 IW-61, TA3-18 지점이 IW-1, JG-155 지점과 달리 *E. faecalis*가 분리되지 않은 것으로 사료된다.

본 연구에서의 장구균 분리 비율을 보면 *E. faecium*의 분리 비율이 월등히 높았는데, Seong et al. (2013)에서 보고한 낙동강 인근 방류수에서 분리한 장구균 분리 비율(검출된 32개 균주 모두 *E. faecium*)과 비교했을 때, *E. faecium*의 분리 비율이 가장 높다는 점에서 비슷한 경향을 나타냈고, Sung et al. (2013)에서 보고한 시판 축산물 및 수산물에서 분리한 *E. faecalis* (104균

주), *E. faecium* (13균주)의 분리 비율과 Kim et al. (2019)에서 보고한 광주지역 내 바닥분수 재이용수에서 분리한 장구균 분리 비율(*E. faecalis* 97%, *E. faecium* 2%)과 반대의 경향이 나타났다. Oh et al. (2008)에서 보고한 양식 어류 및 사육 용수에 분리한 *E. faecalis* (15균주), *E. faecium* (11균주)의 분리 비율과는 차이가 있었다. 이는 시료의 종류마다 사람을 포함하는 포유동물의 오염 가능성 및 오염원의 유래에서 차이가 있기 때문인 것으로 보인다.

### 장구균의 vancomycin 내성유전자 조사 결과

가로림만, 태안군 이원면 인근 육상오염원 배출수 9개소의 육상오염원으로부터 분리된 총 143개 장구균의 vancomycin 내성 유전자 확인을 위한 Real-time PCR 결과 모든 균주에서 *VanA*와 *VanB*가 검출되지 않았다(Table 3).

VRE에 대한 연구가 주로 이루어지는 임상 분야에서 수행한 VRE 검출에 관한 연구를 살펴보면, Kim et al. (2015)는 임상검체에서 분리된 전체 장구균 중 VRE가 13.1% 검출(VRE 분리 건수 중 *E. faecium*이 92.5%, *E. faecalis*가 2.2%)되었다고 보고하였고, Lee et al. (2003)는 임상 검체로부터 분리된 *E. faecium* 202균주 중 VRE가 39균주(19%) 검출되었다고 보고하였다.

임상 외 분야에서 수행한 연구 결과를 살펴보면, Kim et al. (2014)는 축산물과 수산물에서 분리한 장구균에서는 VRE 유전자가 검출되지 않았다고 보고하였고, Kim et al. (2019)도 바닥분수 재이용수로부터 분리된 장구균의 VRE 확인 결과 또한 *VanA*, *VanB* 모두 검출되지 않았다고 보고하였다. 그러나 Kwon and Kim (2012)는 한강유역의 표층수에서 분리한 장구

Table 2. Number of *Enterococcus* spp. strains isolated from inland pollution sources in Garorim Bay and Iwon-myeon of Taean-gun and Seosan-city Area in South Korea

Samples	Sample information	No. of isolates	
		<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Inland pollution source	DS-196 Stream water	18	0
	IW-1 Domestic sewage	14	7
	IW-61 Domestic sewage	16	0
	JG-155 Domestic sewage	12	7
	TA1-4 Tide embankment	20	0
	TA2-15 Agricultural water	2	0
	TA3-18 Domestic sewage	13	0
	TA4-22 Agricultural water	19	0
	WB-101 Agricultural water	15	0
	<b>Total</b>		<b>129</b>

Table 3. Genotype analysis of *VanA* and *VanB* of *Enterococcus* spp. strains isolated from inland pollution sources in Garorim Bay and Iwon-myeon of Taean-gun and Seosan-city Area in South Korea by using Real-time PCR

Species	Samples	Total isolates	No. of isolates (%) (n=143)		
			<i>VanA</i>	<i>VanB</i>	Negative
<i>E. faecium</i>	DS-196	18	0(0.0)	0(0.0)	18(100.0)
	IW-1	14	0(0.0)	0(0.0)	14(100.0)
	IW-61	16	0(0.0)	0(0.0)	16(100.0)
	JG-155	12	0(0.0)	0(0.0)	12(100.0)
	TA1-4	20	0(0.0)	0(0.0)	20(100.0)
	TA2-15	2	0(0.0)	0(0.0)	2(100.0)
	TA3-18	13	0(0.0)	0(0.0)	13(100.0)
	TA4-22	19	0(0.0)	0(0.0)	19(100.0)
	WB-101	15	0(0.0)	0(0.0)	15(100.0)
	<i>E. faecalis</i>	IW-1	7	0(0.0)	0(0.0)
JG-155		7	0(0.0)	0(0.0)	7(100.0)

PCR, Polymerase chain reaction.

균 76개 균주 중 15개 균주(19.7%)가 VRE로 확인되었다고 보고하였고, Sung et al. (2013)는 낙동강 인근 방류수에서 분리한 장구균 117개 분리 균주(*E. faecalis* 104균주, *E. faecium* 13균주) 중 *Van A gene*을 보유한 균주는 없었고, *Van B gene*을 보유한 균주가 9개로 나타났다고 보고하고 있어, 임상 외 분야에서도 VRE 유전자가 검출되고 있음을 확인하였다.

이와 같이 한강, 낙동강 등 수환경에서도 VRE가 확인되었다고 보고하고 있으므로 수산 분야에서도 VRE 유전자가 전이될 수 있는 경로가 있고 그 위험성이 존재하고 있는 만큼, 지속적인 관심과 경향 파악이 중요하다고 판단된다.

**장구균의 항생제 종류별 내성**

가로림만, 태안군 이원면 인근 육상오염원 배출수 9개소로부터 분리된 장구균 143개 균주의 16종 항생제에 대한 내성을 Table 4, Fig. 2에 나타내었다. 항생제 내성률은 ciprofloxacin (32.2%), chloramphenicol (30.8%), quinupristin/dalfopristin (19.6%), tylosin (15.4%) 순으로 높았다. Kwon and Kim (2012)는 한강유역의 표층수에서 분리한 장구균의 항생제 내성을 조사한 결과, streptomycin (93.4%), tetracycline (52.6%), quinupristin/dalfopristin (40.8%), ciprofloxacin (36.8%) 순으로 높았다고 보고하고 있어, quinupristin/dalfopristin, ciprofloxacin의 항생제 내성률이 높게 나온 것은 본 연구 결과와 같았지만, 이외 결과는 본 연구 결과와는 차이가 있었다. Oh et al. (2008)은 양식 어류의 사육 용수에서 분리한 *E. faecalis*, *E.*

*faecium*의 항생제 내성을 조사한 결과, *E. faecalis*에서는 rifampin (92.0%), tetracycline (80.0%), quinupristin/dalfopristin (56.0%), chloramphenicol (32.0%), *E. faecium*에서는 tetracycline (88.5%), erythromycin (73.1%), rifampin (55.8%), quinupristin/dalfopristin (53.8%), chloramphenicol (50.0%) 순으로 높았다고 보고하고 있어, quinupristin/dalfopristin, chloramphenicol의 항생제 내성률이 높게 나온 것은 본 연구 결과와 같았지만, 이외 결과는 *E. faecalis*, *E. faecium* 모두 본 연구 결과와는 차이가 있었다. 이와 같은 차이는 같은 수환경에서의 시료이지만 시료의 종류가 다르고, 육상에서 유래되는 오염원의 종류 및 인근의 환경 차이 등에 의한 것으로 사료된다.

항생제 내성이 가장 문제 시 되는 임상 분야에서의 결과와도 비교해 보면, Lim et al. (2004)은 임상검체에서 분리한 장구균의 항생제 내성을 조사한 결과, ciprofloxacin은 본 연구와 같이 내성률이 높게 나왔지만, gentamycin, streptomycin, tetracycline은 감수성이 높게 나온 본 연구와 달리 내성률이 높게 나와 차이가 있었다. 따라서 임상 분야에서의 항생제 내성 경향과 본 연구에서 조사한 육상오염원과의 직접적인 연관은 없는 것으로 판단된다.

한편, MIC을 이용한 항생제 내성 시험 결과 *E. faecium* 1균주에서 vancomycin 내성을 나타내었는데, 본 연구에서는 *Van A gene*, *Van B gene*에 대한 장구균의 vancomycin 내성유전자만을 확인하였고, 검출되지 않았음을 확인하였다. 따라서 향후 *Van A gene*, *Van B gene* 외에 추가적인 vancomycin 내성유전

Table 4. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. strains isolated from inland pollution sources in Garorim Bay and Iwon-myeon of Taean-gun and Seosan-city Area in South Korea

Antimicrobial subclass	Antimicrobial agents	No. of resistance isolates (%)		
		<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	Total
Aminoglycosides	Gentamicin	1 (0.8)	0 (0.0)	1 (0.7)
	Kanamycin	1 (0.8)	0 (0.0)	1 (0.7)
	Streptomycin	6 (4.7)	0 (0.0)	6 (4.2)
Aminopenicillin	Ampicillin	8 (6.2)	0 (0.0)	8 (5.6)
Fluoroquinolone	Ciprofloxacin	32 (24.8)	14 (100.0)	46 (32.2)
Glycopeptide	Vancomycin	1 (0.8)	0 (0.0)	1 (0.7)
Glycylcyclines	Tigecycline	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Lipopeptides	Daptomycin	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Macrolides	Erythromycin	1 (0.8)	0 (0.0)	1 (0.7)
	Tylosin	8 (6.2)	14 (100.0)	22 (15.4)
Oxazolidinones	Linezolid	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Phenicols	Chloramphenicol	30 (23.3)	14 (100.0)	44 (30.8)
	Florfenicol	1 (0.8)	0 (0.0)	1 (0.7)
Streptogramins	Quinupristin/Dalfopristin	14 (10.9)	14 (100.0)	28 (19.6)
Tetracyclines	Tetracycline	1 (0.8)	0 (0.0)	1 (0.7)
Others	Salinomycin	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

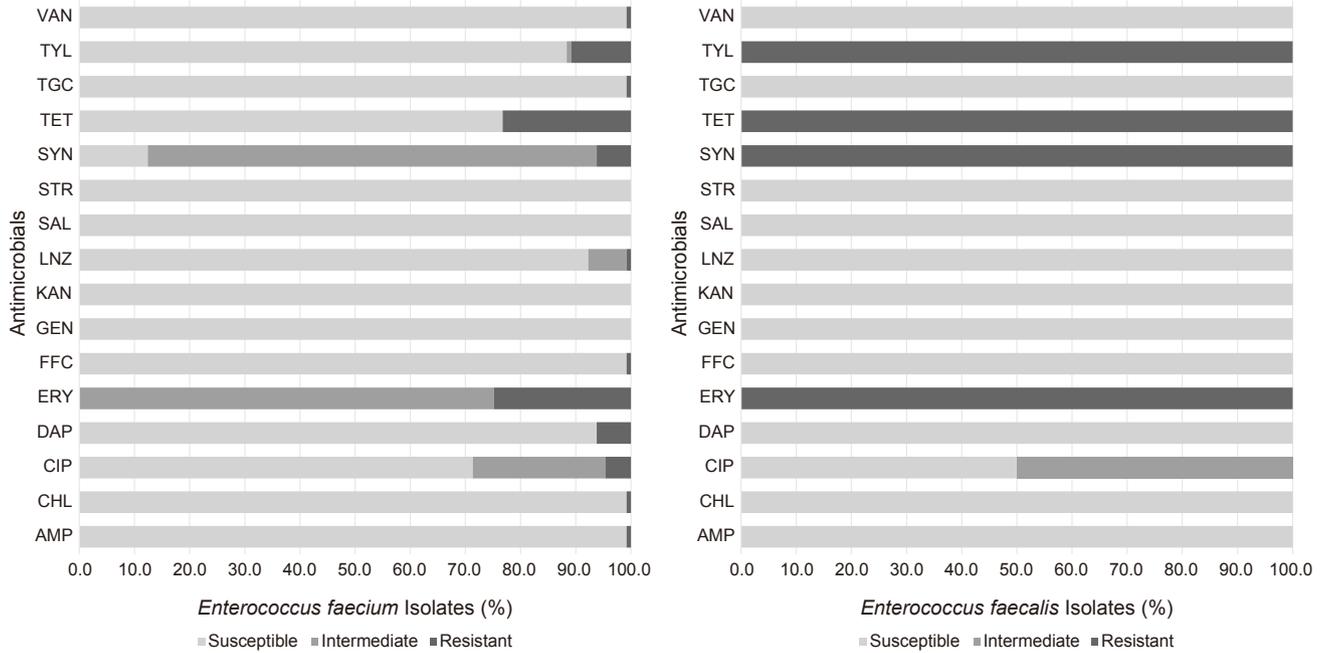


Fig. 2. Antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* strains isolated from inland pollution sources in Garorim Bay and Iwon-myeon of Taean-gun and Seosan-city Area in South Korea. AMP, Ampicillin; CHL, Chloramphenicol; CIP, Ciprofloxacin; DAP, Daptomycin; ERY, Erythromycin; FFC, Florfenicol; GEN, Gentamicin; KAN, Kanamycin; LNZ, Linezolid; SAL, Salinomycin; STR, Streptomycin; SYN, Quinupristin/dalfopristin; TET, Tetracycline; TGC, Tigecycline; TYL, Tylosin (Tartrate/Base); VAN, Vancomycin.

자 확인이 이어져야 할 것으로 판단된다.

장구균의 항생제 내성 패턴 및 다제 내성

가로림만, 태안군 이월면 인근 육상오염원 배출수 9개소의 육상오염원으로부터 분리된 장구균 143개 균주의 항생제 내성 패

턴 및 다제 내성을 MAR index와 함께 Table 5, Table 6에 나타내었다. *E. faecium* 129균주 중 8개의 균주(6.2%)는 MAR index가 0.2 이상, 즉 4종 이상 항생제에 대해 내성을 나타냈고, 이 중 erythromycin, quinupristin/dalfopristin, tetracycline, tylosin은 다제 내성균 8개 균주 모두 내성을 나타냈다. *E. faecalis*

Table 5. Multiple antimicrobial resistance (MAR) of *Enterococcus faecium* isolated from inland pollution sources in Garorim Bay and Iwon-myeon of Taean-gun and Seosan-city Area in South Korea

No. of antimicrobials	Resistance patterns	No. of isolates	Total (%)	MAR index
0		75	58.1	0.00
1	DAP	7	5.4	0.06
	TET	11	8.5	
	CIP	3	2.3	
2	ERY	13	10.1	0.13
	ERY, TET	5	3.9	
3	CIP, DAP	1	0.8	0.19
	ERY, TET, TYL	6	4.7	
4	ERY, SYN, TET, TYL	6	4.7	0.25
	CIP, ERY, SYN, TET, TYL	1	0.8	
5	CIP, ERY, SYN, TET, TYL	1	0.8	0.31
11	AMP, CHL, CIP, ERY, FFC, LNZ, SYN, TET, TGC, TYL, VAN	1	0.8	0.69
<b>Total</b>		<b>129</b>	<b>100.0</b>	

AMP, Ampicillin; CHL, Chloramphenicol; CIP, Ciprofloxacin; ERY, Erythromycin; FFC, Florfenicol; LNZ, Linezolid; SYN, Quinupristin/dalfopristin; TET, Tetracycline; TGC, Tigecycline; TYL, Tylosin (Tartrate/ Base); VAN, Vancomycin.

Table 6. Multiple antimicrobial resistance (MAR) of *Enterococcus faecalis* isolated from inland pollution sources in Garorim Bay and Iwon-myeon of Taean-gun and Seosan-city Area in South Korea

No. of antimicrobials	Resistance patterns	No. of isolates	Total (%)	MAR index
4	ERY, SYN, TET, TYL	14	100.0	0.25
<b>Total</b>		<b>14</b>	<b>100.0</b>	

ERY, Erythromycin; SYN, Quinupristin/dalfopristin; TET, Tetracycline; TYL, Tylosin (Tartrate/ Base).

는 14균주(IW-1 7균주, JG-155 7균주) 모두 다제 내성을 나타냈다. 14균주 모두 항생제 4종에 대해 내성을 나타냈는데, 모두 erythromycin, quinupristin/dalfopristin, tetracycline, tylosin에 내성을 보여 *E. faecium*과 다제내성 경향이 같았다. 이와 같은 장구균의 항생제 다제 내성 패턴이 서로 다른 종의 균주(*E. faecalis*와 *E. faecium*), 여러 종류의 시료(DS-196, IW-1, JG-155, TA3-18, WB-101)에서 동일하게 나타났기 때문에 위 4가지 항생제가 가로림만, 태안군 이원면에 위치한 패류양식장 인근 육상오염원 배출수에서 대표적으로 내성을 나타내는 항생제로 판단된다. 또한 1개 균주에서 MAR index가 0.69로 상당히 높은 다제 내성을 가지고 있는 점은 적절한 관리 여부에 따라 크게 문제가 될 수도 있음을 보여주고 있기 때문에 지속적인 관리와 모니터링이 필요할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 서해안 패류양식장 인근 해안으로 배출되는 육상오염원을 대상으로 장구균을 분리하고, 분리된 균주에 대해 VRE 유전자를 확인하여 수산 분야로의 영향 가능성을 확인하고자 하였다. 육상오염원 배출수 9개소의 육상오염원으로부터 분리된 총 143개 장구균의 vancomycin 내성 유전자 확인을 위한 Real-time PCR 결과 *Van A*와 *Van B*가 모두 검출되지 않았다. 하지만 VRE가 가장 문제시되는 임상 분야뿐만 아니라 임상 외 분야에서도 VRE 유전자가 검출되고 있다고 보고되기 때문에 수산 분야에서도 VRE 유전자가 전이될 수 있는 경로가 있고, 그 위험성이 존재하고 있는 만큼, 지속적인 관심과 경향 파악이 중요하다고 판단된다.

더불어, 수환경에서 VRE를 포함한 항생제 내성 장구균에 대한 정보를 축적하는 것도 중요하기 때문에 vancomycin뿐만 아니라 여러 항생물질에 대한 항생제 내성 및 다제 내성 양상을 파악하고자 하였다. 9개소의 육상오염원 배출수로부터 분리된 장구균 143개 균주의 16종 항생제에 대한 내성을 확인한 결과 항생제 내성률은 ciprofloxacin (32.2%), chloramphenicol (30.8%), quinupristin/dalfopristin (19.6%), tylosin (15.4%) 순으로 높았으며, 임상 분야에서의 항생제 내성 경향과 본 연구에서 조사한 육상오염원에서의 항생제 내성 경향과의 직접적인 연관은 없는 것으로 판단된다. 또한, 항생제 내성 패턴 및 다제 내성에 대해서도 확인해 보았는데, *E. faecium* 129균주 중 8개의 균주(6.2%), *E. faecalis*는 14개 균주 모두 다제 내성을 나타내었는데, 이 중 erythromycin, quinupristin/dalfopristin, tetra-

cycline, tylosin은 다제 내성균 22개 균주 모두 내성을 나타내고 있어, 위 4가지 항생제가 가로림만, 태안군 이원면에 위치한 패류양식장 인근 육상오염원 배출수에서 대표적으로 내성을 나타내는 항생제로 판단된다. 장구균의 항생제 내성 및 다제 내성 양상을 파악해 본 결과 아직은 전체적으로 큰 문제는 없으나, 적절한 관리 여부에 따라 크게 문제가 될 수도 있음을 보여주고 있기 때문에 적절한 항생제 사용, 사용량 저감 등 지속적인 관리와 모니터링이 필요할 것으로 판단된다.

## 사 사

이 논문은 2022년 국립수산물품질관리원 수산물안전연구사업 수출패류 생산해역 및 수산물 위생조사(R2022065)의 지원으로 수행된 연구이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## References

Arthur M and Courvalin P. 1993. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1563-1571. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.8.1563>.

Arthur M, Molinas C, Depardieu F and Courvalin P. 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* 175, 117-127. <https://doi.org/10.1128/jb.175.1.117-127.1993>.

Cetinkaya Y, Falk P and Mayhall G. 2000. Vancomycin resistant *enterococci*. *Clin Microbiol Rev* 13, 686-707. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.686>.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2020. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 5th edition. In: VET01. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, U.S.A.

DANMAP (The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme). 2007. Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Foods and Humans in Denmark. National Food Institute, National Veterinary Institute, Danish Veterinary and Food Administration, Statens Serum Institut, Danish Medicines Agency, Mørkhøj, Denmark, 1-108.

DANMAP (The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme). 2013. Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Foods and Humans in Denmark. National Food Institute, Statens Serum Institut, Mørkhøj, Denmark, 1-108.

DANMAP (The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme). 2016. Use of An-

- timicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Foods and Humans in Denmark. National Food Institute, National Veterinary Institute, Statens Serum Institut. Mørkhøj, Denmark, 1-132.
- Gilmore MS and Ferretti JJ. 2003. The thin line between gut commensal and pathogen. *Science* 299, 1999-2002. <https://doi.org/10.1126/science.1083534>.
- Hammad AM, Aly SS, Hassan HA, Abbas NH, Eltahan A, Khalifa E and Shimamoto T. 2021. Occurrence, phenotypic and molecular characteristics of vancomycin-resistant enterococci isolated from retail raw milk in Egypt. *Foodborne Pathog Dis* 19, 192-198. <https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0054>.
- Jeong MK, Yu YB, Kim SH, Kim SH and Kim YK. 2017. Detection of vancomycin-resistant *Enterococci* and related genes using VITEK 2 system and multiplex real-time PCR assay. *Korean J Clin Lab Sci* 49, 401-406. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2017.49.4.401>.
- Jung WK, Lim JY, Kwon NH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, Kim SH and Park YH. 2006. Vancomycin-resistant *enterococci* from animal sources in Korea. *Int J Food Microbiol* 113, 102-107. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.023>.
- Kim J, Choi KH, Kim YS and Lee WG. 2015. Epidemiology and molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Ann Clin Microbiol* 18, 76-81. <https://doi.org/10.5145/ACM.2015.18.3.76>.
- Kim SJ, Lee NY, Song JH, Kim SM, Peck KR, Choi MS, Kim EC, Lee WG, Lee KW and Pai CH. 1998. A study on molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci isolated from hospitals in Korea. *Korean J Infect Dis* 30, 1-9.
- Kim YH, Song HM, Choi YS, Lee YK, Park JH, Kim SJ, Kim HR, Kang YM, Bae SJ and Cho YG. 2019. A study of antibiotic resistance of Enterococci isolated from recycling water of floor fountains in Gwangju Area. *J Environ Health Sci* 45, 222-230. <https://doi.org/10.5668/JEHS.2019.45.3.222>.
- Kim YJ, Oh MH, Kim YH, Kim SH, Park KS and Joo IS. 2014. Monitoring of antimicrobial resistance and genetic analysis of *Enterococcus* spp. isolated from beef, pork, chicken and fish in Korea. *J Food Hyg Saf* 29, 228-233. <http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2014.29.3.228>.
- Krumperman PH. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol* 46, 165-170.
- Kwon OM and Kim MN. 2012. Antibiotics resistance and molecular analysis of *Enterococcus* isolated from the Han-river in Korea. *Korean J Microbiol* 48, 116-124. <https://doi.org/10.7845/kjm.2012.48.2.116>.
- Lee WG, Kim YS and Huh JY. 2003. Glycopeptide and aminoglycoside resistance of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Korea. *Korean J Clin Microbiol* 6, 18-22.
- Lim CW, Kim HL and Kim YH. 2004. Antibiotic susceptibility and genetic diversity of *Enterococci* isolated from clinical specimens. *Korean J Clin Lab Sci* 36, 76-88.
- Masateru N, Yoshitoshi O, Tetsuya H and Yoshihiro S. 2017. Antibiotic resistance profiling and genotyping of vancomycin-resistant *Enterococci* collected from an Urban river basin in the Provincial City of Miyazaki, Japan. *Water* 9, 79. <https://doi.org/10.3390/w9020079>.
- Masateru N, Yusaku T and Yoshihiro S. 2015. Investigation and comparison of antibiotic-resistant enterococci isolated from sewage and river water. *J Jap Soc Wat Environ* 38, 57-65. <https://doi.org/10.2965/jswe.38.57>.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2020. Report of the National Antimicrobial Use and Resistance Monitoring - Animals and Livestock Products 2020. MFDS, Osong, Korea, 1-163.
- Mundy LM, Sahn DF and Gilmore M. 2000. Relationships between *Enterococcal* virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 13, 513-522. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.513>.
- Nachamkin I, Axelrod P, Talbot GH, Fischer SH, Wennersten CB, Moellering RC and Macgregor RR. 1988. Multiply high-level-aminoglycoside-resistant Enterococci isolated from patients in a university hospital. *J Clin Microbiol* 26, 1287-1291. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.7.1287-1291.1988>.
- NARMS (The National Antimicrobial Resistance Monitoring System). 2013, 2021. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System. Retrieved from <https://www.fda.gov/animal-veterinary/antimicrobial-resistance/national-antimicrobial-resistance-monitoring-system> on Aug 6, 2022.
- Oh EG, Son KT, Yu HS and Kim JH. 2008. Antimicrobial susceptibility pattern of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from fish farms in the Southern Coast of Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 41, 435-439. <https://doi.org/10.5657/kfas.2008.41.6.435>.
- Oh JY, Her SH, Seol SY, Lee YC, Lee JC, Kim JM and Cho DT. 2008. Antimicrobial resistance and multilocus sequence typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens. *J Bacteriol Virol* 38, 19-27. <https://doi.org/10.4167/jbv.2008.38.1.19>.
- Park IJ. 2006. Molecular Mechanism of VanB Phenotype-*VanA* VRE. Ph.D. Dissertation, Ajou University, Suwon, Korea.
- Rogó W, Sypniewski D and Bednarek I. 2019. Analysis of selected genetic traits, phenotypes, and The epidemiological threat of *Enterococcus* bacteria resistant to vancomycin. *Adv Microbiol Postępy Mikrobiologii* 58, 35-48. <https://doi.org/10.21307/PM-2019.58.1.035>.
- Seong JU, Cha SB, Ryu KH, Choi KS and Park JC. 2013. Distribution characteristics and antibiotics resistance of *Enterococcus* spp. in Nakdong River. *Korean J Ecol Environ* 46, 360-366. <http://dx.doi.org/10.11614/KSL.2013.46.3.360>.
- Sung CH, Chon JW, Kwak HS, Kim HS and Seo KH. 2013. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from beef, pork, chicken and sashimi. *Korean J Food Sci An Res* 33, 133-

138. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2013.33.1.133>.

Titilawo Y, Sibanda T, Obi L and Okoh A. 2015. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of water. *Environ Sci Pollut Res* 22, 10969-10980. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3887-3>.

Woo JH and Ryu JS. 1997. Vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE). *Korean J Intern Med* 53, 617-624.

Yang BS, Park JY and Choi SG. 2013. Rapid detection of vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) in clinical samples from university hospital. *Korean J Clin Lab Sci* 45, 16-20.