

국내 신선 편이식품으로부터 분리한 *Enterococcus*의 항생제 저항성

김현정¹ · 김승민^{2,*}

¹한국식품연구원 소비자안전연구단, ²한국방송통신대학교 생활과학과

Occurrence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. from retail fresh-cut products in Korea

Hyun Jung Kim¹ and Seung Min Kim^{2,*}

¹Research Group of Consumer Safety, Korea Food Research Institute

²Department of Human Ecology, Korea National Open University

Abstract *Enterococcus* spp. have been considered major indicator organisms for antibiotic resistance due to their ability to easily acquire and to harbor antibiotic resistance. In this study, *Enterococcus* spp. were isolated from 174 retail fresh-cut products (fresh vegetable salads, microgreens, and sprouts) in Korea. Among the 20 *Enterococcus* isolates obtained, 18 (90.0%) were *Enterococcus faecalis* and 2 (10.0%) were *Enterococcus faecium*. The patterns of antibiotic resistance against nine antimicrobials were analyzed. Most of the isolates (85.0%) were resistant to quinupristin/dalfopristin, 40.0% and 50.0% of the isolates showed intermediate resistance to two critically important antimicrobials for human medicine, ciprofloxacin and erythromycin, respectively. Vancomycin-resistant enterococci were not detected in this study. Given the importance of antimicrobial resistance of enterococci in food safety as well as in public health, our results regarding the occurrence (level of contamination) and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. could provide useful information that aids the risk analysis of antibiotic resistance.

Keywords: *Enterococcus*, occurrence, antimicrobial resistance, fresh-cut products

서 론

Enterococcus (창자알세균 속)는 그람 양성 of 통성혐기성균으로 사람과 동물의 위장관에 상재하며, 분변에 의한 오염으로 인해 토양, 물, 식물과 같은 환경에서도 흔하게 존재하여 쉽게 분리될 수 있으므로 대장균과 함께 식품의 분변오염 지표세균으로 활용된다(Hanchi 등, 2018; Klein, 2003). 또한 *Enterococcus* 균주 중 일부는 전통 발효 식품 생산에서 스타터 배양으로 사용 될 수 있고, 다른 병원성 세균의 증식을 억제하는 박테리오신(bacteriocin)을 생산하기도 한다(Weiss 등, 2010). 건강한 사람에게 enterococci는 문제가 되지 않지만, 면역이 약화된 사람에게 있어서는 위장염, 요로감염증, 심내막염, 뇌수막염 등의 원인 물질이 될 수 있어(Giraffa, 2002), 미국에서는 병원 내 기회감염의 약 12%를 차지하는 원인 세균으로 보고된 바 있다(de Fatima Silva Lopes 등, 2005).

최근 심각한 문제로 대두되고 있는 것은 *Enterococcus*의 항생제 저항성 유전자 획득 및 전이 능력이다. 이들은 염색체 내에 내재되어 있는 자연내성(intrinsic resistance)뿐만 아니라 플라스미드(plasmids)와 트랜스포존(transposons) 전이, 염색체 교환, 혹은

돌연변이 등을 통해 쉽게 항생제 저항성을 획득할 수 있는 획득내성(acquired resistance) 능력도 있다(Mundy 등, 2000). 또한 이들 세균은 *Enterococcus* spp. 간, 황색포도알세균(*Staphylococcus aureus*)이나 리스테리아(*Listeria*)와 같은 다른 병원균, 비병원성 세균, 사람이나 동물의 장관, 환경, 심지어 식품 등에 항생제 저항성 유전자를 전이시켜 항생제 저항성 전파 및 유지의 원인이 된다(Courvalin, 1994; Noble 등, 1992; Pesavento 등, 2010; Sparo 등, 2011). 이러한 항생제 저항성 유전자 획득 및 전이 능력에 따라 실제로 베타락탐 계열, 아미노글리코사이드 계열, 글리코펩타이드 계열 등의 항생제에 대한 *Enterococcus*의 저항성이 증가하고 있는 추세이다(Woodford와 Levermore, 2009).

축산 농가에서 동물용 의약품의 오용과 남용으로 동물 유래 enterococci의 항생제 저항성을 증가시키고 있으며 이는 사람에게 까지 전이될 수 있다. 동물 유래 항생제 저항성 *Enterococcus*가 존재하는 관개용수나 거름이 농경지에 유입되면 수평적 유전자 전이(horizontal gene transfer)에 의해 토양 세균에 저항성이 전달됨으로써 이곳에서 생산되는 농작물이 오염되고, 농작물을 매개체로 동물이나 사람의 장내미생물 균총에까지 전이가 일어날 수 있다(Nwosu, 2001; Sengeløv 등, 2002). 그동안 축산물에서 분리된 *Enterococcus*의 항생제 저항성 출현 및 전이에 관한 연구는 다수 이루어져 왔다(Koo 등, 2013; Quednau 등, 1998). 하지만 가열처리없이 바로 섭취하는 농산물, 특히 신선 편이식품에서 분리된 *Enterococcus*는 사람 장내균총으로 항생제 저항성을 전달하는 매개체로서의 가능성이 높음에도 불구하고 항생제 저항 패턴에 관한 연구가 국내외적으로 많지 않다. 세계적으로 최소가공, 즉 섭취 가능한 편이식품의 소비가 증가하고 있는 추세이며(Baslice

*Corresponding author: Seung Min Kim, Department of Human Ecology, Korea National Open University, Seoul 03087, Korea
Tel: +82-2-3668-4531
Fax: +82-2-2088-4306
E-mail: kisie@knou.ac.kr
Received October 16, 2018; revised November 22, 2018;
accepted November 26, 2018

등, 2017; Ma 등, 2017), 우리나라에서도 최근 웰빙문화와 개인 건강유지가 사회적 화두로 떠오르면서 열처리나 필요없거나 간단한 열처리만 하는 신선 편이식품을 선호하는 경향이 뚜렷해지고 있으므로(Kim, 2000) 이에 대한 연구가 필요하다.

이에 본 연구에서는 시판 샐러드, 어린잎, 새싹 채소와 같은 신선 편이식품으로부터 enterococci를 분리하여 동정하고, 분리된 엔테로코쿠스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*)와 엔테로코쿠스 파에슘(*Enterococcus faecium*)의 항생제 저항성을 분석하여 위해 가능성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 전처리

본 실험에 사용된 샐러드, 어린잎, 새싹 채소 시료는 2011년 7월부터 2012년 12월까지 서울과 경기도 지역 소매점 및 대형마트에서 구입했다. 샐러드(n=105), 어린잎 및 새싹 채소(n=69)를 포함하여 총 174점의 시료를 분석하였다. 신선 편이식품 시료는 구입 후 보냉박스에 얼음과 함께 보관되었고, 2시간 이내에 실험실로 옮긴 후 바로 4°C로 유지하고 미생물 오염을 분석하였다.

*Enterococcus*속 분리 및 계수

샐러드, 어린잎, 새싹 채소 시료로부터 분리한 *Enterococcus*속은 ISO-7899-1 (ISO, 1998)과 Weiss 등(2005)의 방법을 변형하여 계수되었다. 멸균된 가위로 25 g의 시료를 자르고 225 mL의 멸균된 펩톤수를 넣은 후 Stomacher® 400 Circulator (Seward, Norfolk, England)를 사용하여 230 rpm에서 2분 동안 균질화시켰다. 균질물은 펩톤수에 10배씩 연속 희석하여 각각의 희석물 100 µL를 Bile Aesculin Azide (BAA) agar (Merck, Darmstadt, Germany) plates에 도말했다. 37°C에서 24시간 동안 정치배양한 후 집락 수가 25 내지 250인 플레이트를 골라 *Enterococcus*를 계수했다. BAA agar상의 집락은 Tryptic Soy agar (TSA, Merck)에 접종해 VITEK® 2 compact system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용한 생화학적 분석과 PCR을 이용한 유전적 분석에 활용되었다. 각 균주의 template DNA는 제조사의 설명에 따라 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 분리되었다. PCR 증폭은 1 µL DNA template가 포함된 20 µL reaction volume으로 진행되었다. *E. faecalis* 증폭을 위해서는 5 pmole/µL primer, *E. faecium* 증폭을 위해서는 1.25 pmole/µL primer를 사용했고, 신뢰성을 높이기 위한 internal PCR control은 항존유전자 *rrs* primer 2.5 pmole/µL가 사용되었다(Table 1). 이외에 1 unit의 Taq-polymerase, 2.5 mM의 dNTP mixture, 10 mM의 Tris-HCl (pH 9.0), 30 mM의 염화포타슘, 1.5 mM의 염화마그네슘(AccuPower™ PCR PreMix, Bioneer, Daejeon, Korea)은 동일하게 사용되었다. 모든 PCR 반응은 Mastercycler pro (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하여 다음 조건으로 실행되었다. 94°C에서 5분 initial denaturation; 94°C에서 1분 denaturation, 56°C에서 1분 annealing, 72°C에서 1분 extension을 30회 반복; 72°C에서 10분 final extension. 1.8% 아가로스 젤에서 전기이동한 PCR 산물은 GelDoc™ XR+ imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 문서화했고, 확인된 분리주는 확인실험을 위해 50% 글리세롤에 넣어 -80°C에서 보관했다.

항생제 저항성

분리된 enterococci의 항생제 저항성은 broth dilution test로 분석되었다. Broth dilution test는 AST-P601 test card를 사용하여 제

조사의 설명에 따라 VITEK® 2 compact system (bioMérieux)으로 진행되었으며 시험된 항생제 종류는 다음과 같다. 시프로플록사신(ciprofloxacin), 에리트로마이신(erythromycin), 키누프리스틴/달포프리스틴(quinupristin/dalfopristin), 리네졸리드(linezolid), 테이코플라닌(teicoplanin), 반코마이신(vancomycin), 테트라사이클린(tetracycline), 타이게사이클린(tigecycline), 나이트로푸란도인(nitrofurantoin). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 기준에서 제시된 enterococci의 breakpoints에 기반하여 항생제에 대한 저항성 혹은 감수성에 대한 정성분석이 진행되었다(CLSI, 2010). 항생제 감수성에 대한 데이터 신뢰도는 *E. faecalis* ATCC29212를 사용하여 검증하였으며 모든 수치가 허용 한계치 내에 존재했다.

통계분석

모든 실험 단계는 3반복 실시하였으며 결과의 통계분석은 GraphPad software version 5.02 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA) 프로그램을 통하여 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하여 $p < 0.05$ 유의 수준에서 통계분석하였다.

결과 및 고찰

*Enterococcus*속 분리

*Enterococcus*는 본 실험에 사용된 시료 중 샐러드 3종, 어린잎 및 새싹 채소 9종에 존재하여 총 12시료에서 검출되었다(Table 2). 전체적으로는 총 174점의 시료 중 6.90%에서만 *Enterococcus*가 검출되어 이탈리아 투스카니 지역의 소매점에서 구입한 신선 편이식품 214시료 중 3.74%인 8시료에서 *Enterococcus*가 검출된 Pesavento 등(2014)의 논문, 서울 소재 도매시장에서 구입한 농산물 128시료 중 2.34%인 3시료에서 *Enterococcus*속이 분리된 Ham(2017)의 연구 결과와 유사한 검출율을 나타냈다. 하지만 미국 남서부 지역에서 생산되는 신선식품 5-80%에서 *Enterococcus*를 검출한 Johnston과 Jaykus(2004)의 논문에 비해서는 검출율이 낮았다. 이는 시료의 차이에 의한 것으로 보여지는데, 본 연구에서는 구입 즉시 먹을 수 있는 신선 편이식품을 2시간 이내에 실험실로 옮겨와 시료로 사용한 것에 비해 Johnston과 Jaykus(2004) 연구에서는 비가식부위가 포함된 시료를 농장에서 구입하여 밤새 배로 옮겨와 시료로 사용하였다. 균주에 따라 비교해 보면 *E. faecalis* 분리주는 샐러드와 어린잎 채소에서 각각 4종, 14종이 검출되어 총 18종이 분리되었고, *E. faecium* 분리주는 어린잎에서 두 종이 출현하여 *E. faecalis*의 검출율이 *E. faecium*에 비해 높았다. 시료 종류에 따라 비교 시 어린잎 및 새싹 채소에서 총 16종의 *Enterococcus*가 출현하여 4종이 검출된 샐러드에 비해 높은 분리율을 나타냈다. Kang과 Kim(2007)의 연구결과와 같이 샐러드에 비해 어린잎 및 새싹채소는 조직이 연해 수확 후 상품성과 저장성이 떨어지기 쉬우므로 이에 기인한 것이라 사료된다.

항생제 저항성 양상

*E. faecalis*와 *E. faecium* 분리주 20종의 ciprofloxacin, erythromycin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, teicoplanin, vancomycin, tetracycline, tigecycline, nitrofurantoin에 대한 저항성을 분석했다. WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (WHO AGISAR, 2017)에서는 항생제별로 두 가지 기준에 따라 중요도를 나누었다. Criterion 1은 사람에게 심각한 질병을 치료하는 유일한 치료제 또는 대체 치료제가 거의 없는 경우이고, criterion 2는 사람 이외의 원인체로부터 사람에게 전달될 수 있는 세균이나 사람 이외의 원인체로부터 내성유전자

Table 1. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Size of PCR product (bp)	Oligonucleotide sequence, 5'-3'		Reference
		Forward	Reverse	
<i>E. faecalis</i>	941	ATCAAGTACAGTTAGTCTTATTAG	ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT	Kariyama <i>et al.</i> , 2000
<i>E. faecium</i>	658	TTGAGGCAGACCAGATTGACG	TATGACAGCGACTCCGATTCC	Kariyama <i>et al.</i> , 2000
<i>vanA</i>	732	GGGAAAACGACAATTGC	GTACAATGCGGCCGTTA	Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
<i>vanB</i>	635	ATGGGAAGCCGATAGTC	GATTTTCGTTCTCGACC	Dutka-Malen <i>et al.</i> , 1995
<i>rrs</i> (16S rRNA)	320	GGATTAGATACCCTGGTAGTCC	TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC	Kariyama <i>et al.</i> , 2000

Table 2. Occurrence of *Enterococcus* spp. in fresh-cut products

Food	No. of samples, Positive/Total	No. of isolates		
		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	Total
Fresh vegetable salads	3/105	4	0	4
Microgreens and sprouts	9/69	14	2	16
Total	12/174	18	2	20

Table 3. Classifications of antimicrobials used for susceptibility testing

Antimicrobial class	Antimicrobials (abbreviations)	WHO classifications	Criterion 1 ^a	Criterion 2 ^b
Quinolones	Ciprofloxacin (CIP)	Critically important ^c	Yes	Yes
Macrolides	Erythromycin (E)	Critically important	Yes	Yes
Streptogramins	Quinupristin/Dalfopristin (QDA)	Highly important ^d	No	Yes
Oxazolidinones	Linezolid (LNZ)	Critically important	Yes	Yes
Glycopeptides	Teicoplanin (TEC)	Critically important	Yes	Yes
Glycopeptides	Vancomycin (VA)	Critically important	Yes	Yes
Tetracyclines	Tetracycline (TE)	Highly important	Yes	No
Glycylcyclines	Tigecycline (TGC)	Critically important	Yes	Yes
Nitrofurantoin	Nitrofurantoin (FT)	Important ^e	No	No

^aCriterion 1: An antimicrobial agent which is the sole, or one of limited available therapy, to treat serious human disease

^bCriterion 2: Antimicrobial agent is used to treat diseases caused by either: (1) organisms that may be transmitted to humans from non-human sources, or (2) human diseases caused by organisms that may acquire resistance genes from non-human sources

^cCritically important antimicrobials for human medicine categorized by WHO AGISAR (2011)

^dHighly important antimicrobials for human medicine categorized by WHO AGISAR (2011)

^eImportant antimicrobials for human medicine categorized by WHO AGISAR (2011)

를 획득할 수 있는 세균에 의해서 야기된 질병을 치료하는 데 사용되는 항생제이다. 두 기준 모두 충족하면 critically important 항생제로서 특히 신중하게 사용되어야 함을 의미하며, 하나만 충족하면 highly important, 두 기준 모두 충족하지 않으면 important 항생제이다. 본 연구에서 분석된 퀴놀론(quinolones) 계열의 ciprofloxacin, 마크롤라이드(macrolides) 계열의 erythromycin, 옥졸리다이논(oxazolidinones) 계열의 linezolid, 글리코펩타이드 계열의 teicoplanin과 vancomycin, 글리실사이클린(glycylcyclines) 계열의 tigecycline이 critically important 항생제로 분류되어 있다. 그 중에서도 퀴놀론, 마크롤라이드, 글리코펩타이드 계열은 특히 highest priority로 분류되어 사용 시 가장 주의를 기울여야 한다. 이외에 스트렙토그라민(streptogramins) 계열의 quinupristin/dalfopristin과 테트라사이클린(tetracyclines) 계열의 tetracycline은 highly important 항생제로, 나이트로푸란토인(nitrofurantoin) 계열의 nitrofurantoin은 important 항생제로 분류된다(Table 3).

Table 4에서 보여주는 바와 같이 85.0%에 이르는 17종의 *Enterococcus*속이 quinupristin/dalfopristin에 대해 저항성을 보였고, 17종 모두 *E. faecalis*였다(Table 4, 5). Quinupristin/dalfopristin은 동물용 의약품인 버지니아마이신(virginiamycin)과 유사한 구조를 가진 항생제로서 우리나라에서는 1972년 이후 현재까지도 동물

용 사료 첨가 항생제로 계속 사용되고 있고(Kim 등, 2011), 수의학에서도 치료, 비치료 모두를 위한 항생제로서 광범위하게 사용되고 있다(Lim 등, 2014). 이렇게 주로 동물에 사용되는 quinupristin/dalfopristin에 대하여 셀러트나 어린잇과 같은 신선 편이식품으로부터 분리된 *E. faecalis* 대부분이 저항성을 나타낸다는 것은 *E. faecalis*가 quinupristin/dalfopristin에 대한 자연내성을 가질 수 있음을 시사한다. 50S ribosomal subunit에 붙어 단백질 합성 저해 작용 메커니즘을 가지는 quinupristin/dalfopristin에 대해 실제로 다수의 *E. faecalis*가 저항성을 가진다는 보고가 있고(Agudelo Higuera와 Huycke, 2014), 부차적으로는 ABC transporter와 유사한 시퀀스를 가지는 *Isa*유전자가 *E. faecalis*에 있어 quinupristin/dalfopristin을 세포 밖으로 유출시킬 수도 있다(Singh 등, 2002). 반면에 *E. faecium*은 quinupristin/dalfopristin에 대해 한 종은 중간 정도의 저항성, 다른 한 종은 민감성을 나타냈다(Table 5). *E. faecium*의 경우 종종 23S ribosomal RNA를 변형시키는 메틸기전달효소(methyltransferase)를 암호화하고 있는 *erm* 유전자에 돌연변이가 일어나 저항성이 나타나기도 한다는 연구결과가 있다(Fantin 등, 1997). 내성유전자를 획득할 수 있는 세균에 의해 야기되는 질병을 치료하기 위하여 사용되는 항생제로 분류되어 highly important로 그룹화된 quinupristin/dalfopristin에 대해 높은

Table 4. Antibiotic resistance profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* against 9 antibiotics

Antibiotics	No. of isolates (%) ^a		
	R	I	S
Ciprofloxacin (CIP)	0 (0)	8 (40.0)	12 (60.0)
Erythromycin (E)	0 (0)	10 (50.0)	10 (50.0)
Quinupristin/Dalfopristin (QDA)	17 (85.0)	1 (5.0)	2 (10.0)
Linezolid (LNZ)	0 (0)	4 (20.0)	16 (80.0)
Teicoplanin (TEC)	0 (0)	0 (0)	20 (100)
Vancomycin (VA)	0 (0)	0 (0)	20 (100)
Tetracycline (TE)	0 (0)	0 (0)	20 (100)
Tigecycline (TGC)	0 (0)	0 (0)	20 (100)
Nitrofurantoin (FT)	0 (0)	3 (15.0)	17 (85.0)

^aR, resistant to antibiotics; I, intermediate resistant to antibiotics; S, sensitive to antibiotics
Total number of enterococci isolates subjected to antibiotics resistance test was 20.

내성을 가지고 있다는 점에서 *E. faecalis* 분리주는 앞으로도 내성 유무에 주목할 필요가 있을 것으로 사료된다.

Enterococci 분리주는 critically important 항생제 중 highest priority로 분류되는 ciprofloxacin과 erythromycin에 대해서 각각 40.0%, 50.0%가 중간 정도 저항성을 나타냈다. Ciprofloxacin에 대한 저항성이 꾸준히 증가하는 추세에 있고(Schaberg 등, 1992), erythromycin 저항성 유전자는 Tn1545와 같은 전이 가능한 유전적 요소에 암호화되어 있어(Clewell 등, 1995) 저항성 표현형이 나타날 우려가 크므로 항생제에 대한 저항성이 중간내성을 나타낸다고 하더라도 지속적으로 모니터링할 필요가 있다.

한편 본 연구에서 분리된 *Enterococcus*속은 모두 vancomycin에 대해 민감한 것으로 나타나 vancomycin 내성 균주는 검출되지 않았다. PCR을 통한 유전적 분석에서도 internal PCR control인 320 bp의 *rrs* 유전자에 해당되는 fragment는 젤 상에 나타났으나 *vanA*, *vanB* 유전자 fragment인 732, 635 bp 사이즈의 밴드는 나타나지 않았다(data not shown). 축산 농가에서 항미생물 성장촉진제로 사용되던 당펩타이드 항생제인 avoparcin 사용이 vancomycin 저항성 *Enterococcus* (VRE)를 출현시켰다고 보고되고 있으나 우리나라에서는 1997년 이후로 avoparcin의 사용을 금하고 있으므로(Seo 등, 2005) 이에 따라 최근에 분리된 *Enterococcus*속은 대부분 vancomycin에 대해 민감한 반응을 나타내는 것으로 보인다.

비슷한 시기에 돼지고기로부터 분리된 enterococci의 항생제 저항성 패턴을 보고한 본 연구 그룹의 논문(Koo 등, 2013)과 비교해 보면 돼지고기 분리균 역시 quinupristin/dalfopristin에 대한 저항성이 52.6%로 높은 비율을 차지함을 알 수 있다(Fig. 1). 이는 enterococci가 분리된 식품원료 종류에 상관없이 quinupristin/dalfopristin에 대한 자연내성을 가질 수 있음을 시사한다. 한편 돼지고기 분리균은 신선 편이식품 분리균과는 달리 tetracycline에 대해 가장 높은 저항성을 나타냈다(58.3%). Tetracycline은 우리나라에서 2017년 255톤이 판매되어 281톤이 판매된 페니실린(penicillins) 계열 항생제와 더불어 축산용, 수산용 항생제로서 가장 많이 판매되고 있는 항생제 중 하나이다(MAFRA, 2018). 따라서 tetracycline에 대해 돼지고기 분리균에서 높은 저항성을 나타낸 것으로 사료된다. 신선 편이식품에서는 tetracycline 저항성 enterococci가 검출된 바 없으나 관개용수 및 거름을 통해 전이될 가능성이 높으므로 신선 편이식품 분리 enterococci의 tetracycline 저항성 역시 지속적으로 모니터링할 필요가 있다. 전반적으로는 신선 편이식품 유래 분리균이 돼지고기 유래 분리균에 비해 항생제 저항

Table 5. Drug resistance patterns of *Enterococcus* spp. isolated form fresh-cut products

Food sources	<i>Enterococcus</i> spp.	Antimicrobials ^a								
		CIP	E	QDA	LNZ	TEC	VA	TE	TGC	FT
Fresh vegetable salads	<i>E. faecalis</i>	I ^b	S	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	I	S	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	I	S	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	S	I	R	S	S	S	S	S	S
Microgreens	<i>E. faecalis</i>	I	I	R	I	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	S	I	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	S	I	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	S	S	R	I	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	S	I	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	S	I	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	I	S	R	I	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	I	S	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	I
	<i>E. faecium</i>	S	I	I	S	S	S	S	S	I
Sprouts	<i>E. faecalis</i>	I	I	R	S	S	S	S	S	S
	<i>E. faecalis</i>	I	I	R	I	S	S	S	S	S
	<i>E. faecium</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	I

^aCIP, Ciprofloxacin; E, Erythromycin; QDA, Quinupristin/Dalfopristin; LNZ, Linezolid; TEC, Teicoplanin; VA, Vancomycin; TE, Tetracycline; TGC, Tigecycline; FT, Nitrofurantoin

^bR, resistant to antibiotics; I, intermediate resistant to antibiotics; S, sensitive to antibiotics

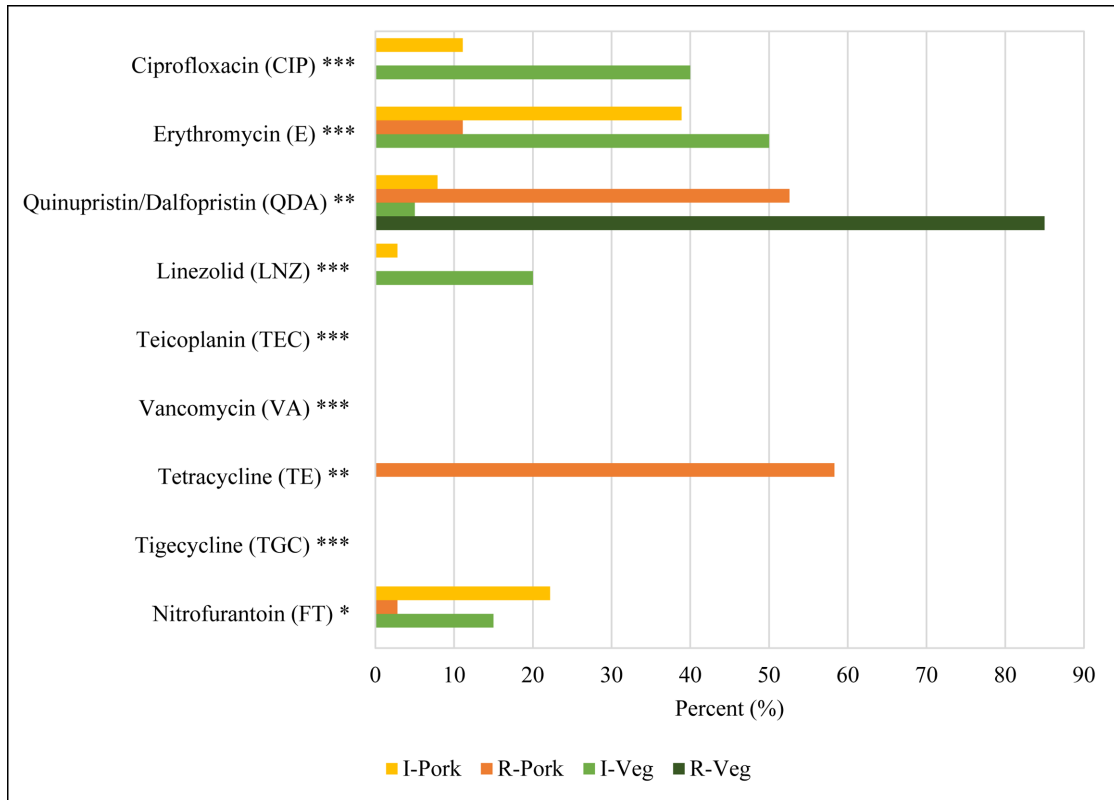


Fig. 1. Comparison of antimicrobial resistance patterns of *E. faecalis* and *E. faecium* isolated from fresh-cut products (Veg) and pork meat products (Pork). Antimicrobial resistance data of enterococci originated from pork meat products were adopted for comparison from our previous study (Koo *et al.*, 2013). Pork meat products includes minced meat and seasoned pork meat with soy sauce or hot pepper paste. ***, Critically important antimicrobials for human medicine categorized by WHO AGISAR (2011); **, Highly important antimicrobials for human medicine categorized by WHO AGISAR (2011); *, Important antimicrobials for human medicine categorized by WHO AGISAR (2011). I, intermediate resistant to antibiotics; R, resistant to antibiotics.

성이 낮은 것으로 나타났는데, 이는 우리나라에서 생산되는 샐러드, 어린이일, 새싹 채소의 재배환경이 비교적 청결함을 시사한다. 또한 수경재배의 경우 토양재배보다는 분변과의 접촉 기회가 많지 않아 enterococci에 의한 항생제 저항 유전자 전이 가능성이 낮을 것으로 사료된다.

특별한 열처리가 필요없이 섭취되는 신선 편이식품에 항생제 저항성을 가지는 enterococci가 존재하면 제어될 기회 없이 항생제 저항 유전자를 쉽게 전이시켜 심각한 문제를 일으킬 수 있다. 식품 내에서 enterococci가 얼마나 빠르게 플라스미드에 암호화되어 있는 항생제 저항성이나 독성 유전자를 획득하여 병원성을 나타낼 수 있는지, 또 얼마나 빨리 이 유전자를 전이시킬 수 있는지에 따라 이 세균을 병원균으로 규정할 수 있다(Franz 등, 1999). 이러한 맥락에서 식품으로부터 분리된 *Enterococcus*속의 항생제 저항성 패턴을 연구해야 할 필요가 있다. 추후 연구에서는 식품뿐만 아니라 미생물 군집 혹은 임상에서 분리된 enterococci의 항생제 저항성 패턴과 잠재적 독성인자 역시 파악할 필요가 있다. 또한 본 연구는 신선 편이식품에 오염된 항생제 저항성 enterococci가 확산되지 않도록 농산물이력 추적제도와 같은 효율적인 감시망을 구축할 필요가 있음을 시사한다.

요 약

본 연구에서는 서울과 경기도 지역 소매점 및 대형마트에서 판매되고 있는 샐러드, 어린이일, 새싹채소로부터 *Enterococcus*의 존

재를 파악하고 9개 항생제에 대한 항생제 저항성 프로파일을 확보했다. Quinupristin/dalfopristin에 저항성을 가지는 분리주가 85.0%에 이르렀고, 특히 *E. faecalis* 분리주는 18종 중 17종이 저항성을 나타냈다. 또한 critically important 항생제 중 highest priority로 분류되는 ciprofloxacin과 erythromycin에 대해 각각 40.0, 50.0%가 중간 정도의 저항성을 보였으며, vancomycin에 대한 저항성을 가지는 분리주는 검출되지 않았다. Enterococci의 항생제 저항성 정도는 식품 안전뿐만 아니라 공중 보건에 있어서도 중요하다. 본 연구의 *Enterococcus* 오염 정도, 항생제 내성율에 대한 결과는 향후 신선 편이식품 섭취가 인체 건강에 미치는 위험분석을 위한 기초자료로서 유용한 정보를 제공할 것으로 보이며 앞으로 특별한 열처리 없이 섭취하는 신선 편이식품에 대한 지속적인 모니터링이 필요할 것이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 한국방송통신대학교 학술연구비 지원을 받아 작성된 것이며 이에 감사드립니다.

References

Agudelo Higueta NI, Huycke MM. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. pp. 1-27. In: Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Massachusetts Eye and Ear Infirmary. Boston, MA, USA

- (2014)
- Baselice A, Colantuoni F, Lass DA, Nardone G, Stasi A. Trends in EU consumers' attitude towards fresh-cut fruit and vegetables. *Food Qual. Prefer.* 59: 87-96 (2017)
- Clewell DB, Flannagan SE, Jaworski DD. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends. Microbiol.* 3: 229-236 (1995)
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA, USA (2010)
- Courvalin P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1447-1451 (1994)
- de Fatima Silva Lopes M, Ribeiro T, Abrantes M, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, Crespo MT. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 191-198 (2005)
- Dutka-Malen SD, Evers S, courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 24-27 (1995)
- Fantin B, Leclercq R, Garry L, Carbon C. Influence of inducible cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B-type antibiotics in *Enterococcus faecium* on activity of quinupristin-dalfopristin *in vitro* and in rabbits with experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5: 931-935 (1997)
- Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47: 1-24 (1999)
- Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 744: 1-9 (2002)
- Ham H. Distributions of *Bacillus cereus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, and coliforms isolated from agricultural products. *J. Bacteriol. Virol.* 47: 139-147 (2017)
- Hanchi H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R. The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns-an update. *Front. Microbiol.* 9: 1791 (2018)
- ISO (International Organization for Standardization). 7899-1: Water quality-Detection and enumeration of intestinal enterococci in surface and waste water. Part I: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium. Switzerland (1998)
- Johnston LM, Jaykus LA. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3133-3137 (2004)
- Kang HM, Kim IS. Comparison of storability of some sprout vegetables in MA storage. *J. Bio-Environ. Control.* 16: 415-419 (2007)
- Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3092-3095 (2000)
- Kim GH. Development of minimal processing technology for Korean fruit and vegetables. *Korean J. Soc. Food Sci.* 16: 577-583 (2000)
- Kim AR, Cho YM, Her M, Jung BY, Lim SK, Jung SC, Song CS, Lee JY. Quinupristin/dalfopristin resistance patterns in *Enterococcus faecium* isolated from chicken farms in South Korea. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 35: 91-96 (2011)
- Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 123-131 (2003)
- Koo M, Cho AR, Jeong AR, Kim HJ, Park YH, Kwak HS, Hwang IG. Antibiotic susceptibility and molecular typing of *Enterococcus faecalis* from retail pork meat products in Korea. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 56: 295-299 (2013)
- Lim SK, Lee JE, Lee HS, Nam HM, Moon DC, Jang GC, Park YJ, Jung YG, Jung SC, Wee SH. Trends in antimicrobial sales for livestock and fisheries in Korea during 2003-2012. *Kor. J. Vet. Res.* 54: 81-86 (2014)
- Ma L, Zhang M, Bhandari B, Gao Z. Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables. *Trends. Food Sci. Tech.* 64: 23-38 (2017)
- MAFRA (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs), APQA (Animal and Plant Quarantine Agency), MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). Monitoring and characterization of antimicrobial resistance of bacteria from livestock products in 2017. Available from: http://ebook.qia.go.kr/home/view.php?host=main&site=20180704_110723. Accessed Nov. 19, 2018.
- Mundy LM, Sahn DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 513-522 (2000)
- Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 93: 195-198 (1992)
- Nwosu VC. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Res. Microbiol.* 152: 421-430 (2001)
- Pesavento G, Calonico C, Ducci B, Magnanini A, Lo Nostro A. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiol.* 41: 1-7 (2014)
- Pesavento G, Ducci B, Nieri D, Comodo N, Lo Nostro A. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control* 21: 708-713 (2010)
- Quednau M, Ahrné S, Petersson AC, Molin G. Antibiotic-resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. *J. Appl. Microbiol.* 84: 1163-1170 (1998)
- Schaberg DR, Dillon WI, Terpenning MS, Robinson KA, Bradley SF, Kauffman CA. Increasing resistance of enterococci to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 2533-2535 (1992)
- Sengeløv G, Yvonne A, Halling-Sørensen B, Baloda S, Andersen JS, Jensen LB. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ. Int.* 953: 1-9 (2002)
- Seo KS, Kim JY, Yoo HS, Bae WK, and Park YH. Comparison of vancomycin-resistant enterococci isolates from human, poultry and pigs in Korea. *Vet. Microbiol.* 106: 225-233 (2005)
- Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6: 1845-1850 (2002)
- Sparo M, Urbizu L, Solana MV, Pourcel G, Delpech G, Confalonieri A, Ceci M, Sanchez Bruni SF. High-level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota. *Lett. Appl. Microbiol.* 54: 119-125 (2011)
- Weiss A, Domig KJ, Kneifel W. Comparison of selective media for the enumeration of probiotic enterococci from animal feed. *Food Technol. Biotechnol.* 43: 147-155 (2005)
- Weiss A, Konrad JD, Kneifel W, Mayer HK. Evaluation of PCR-based typing methods for the identification of probiotic *Enterococcus faecium* strains from animal feeds. *Animal Feed Sci. Technol.* 158: 187-196 (2010)
- WHO AGISAR (World Health Organization Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine-5th Revision 2017. Geneva, Switzerland (2017)
- Woodford N, Levermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J. Infect.* 59: S4-16 (2009)