

시판 젓갈에서 분리한 *Clostridium perfringens*의 독소 유전자 및 항균제 내성 분석

이신혜 · 박권삼*

군산대학교 식품생명공학과

Toxin Genes and Antimicrobial Resistance of *Clostridium perfringens* Strains Isolated from Commercial Jeotgals

Shin-Hye Lee and Kwon-Sam Park*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Gunsan 54150, Republic of Korea

Clostridium perfringens causes diarrhea and other diseases in humans and animals. We investigated the prevalence, toxin gene profiles, and antimicrobial resistance of *C. perfringens* isolated from commercial jeotgal sample. *C. perfringens* was isolated from 11 of 22 commercial jeotgals. All *C. perfringens* strains were positive for the alpha toxin gene, but not for the beta, epsilon, iota, CPE or NetB toxin genes; therefore, all strains were identified as type A *C. perfringens*. However, the beta2 toxin gene was identified in 54.5% of isolates. Disk diffusion susceptibility tests showed that most isolates were resistant to kanamycin (90.9%), nalidixic acid (72.7%), oxacillin (54.5%), erythromycin (27.3%), ciprofloxacin (9.1%) and clindamycin (9.1%). However, all strains were susceptible to 14 other antimicrobial including amoxicillin, ampicillin, and chloramphenicol. The average minimum inhibitory concentrations against *C. perfringens* of clindamycin, kanamycin, and nalidixic acid were 128.0, 128.0, and 54.0 µg/mL, respectively. These results provide new insight into the necessity for sanitation of commercial jeotgal, and provide evidence to help reduce the risk of contamination with antimicrobial-resistant bacteria.

Keywords: Antimicrobial susceptibility, *Clostridium perfringens*, Commercial jeotgals, Minimum inhibitory concentration, Toxin genes

서 론

*Clostridium perfringens*는 혐기성의 포자를 형성하는 그람 양성 간균으로 토양 및 사람과 동물의 장관에 존재하며 가스 괴저, 식중독, 장염괴사, 장관독혈증 및 항생제 관련 설사를 유발하는 병원성 세균이다(Ohtani and Shimizu, 2016; Rood et al., 2018; Kiu et al., 2019). *C. perfringens*는 20종 이상의 독소가 알려져 있으며 생산하는 독소에 의해 A-G형까지 7개 type 으로 구별하며 주요 독소로는 alpha (*cpa*), beta (*cpb*), epsilon (*etx*), iota (*iap*), enterotoxin (CPE) 및 NetB 등이 있다(Petit et al., 1999; Jang et al., 2020). Type A형은 alpha toxin을 생산하는 균주이며, type B형은 beta와 epsilon toxin, type C형은 beta toxin, type D형은 epsilon toxin, type E형은 iota toxin, type F

형은 CPE 독소 및 type G형은 NetB 독소를 생산하는 균주이다 (Petit et al., 1999; Jang et al., 2020). Alpha 독소 유전자는 염색체 DNA에 존재하지만 beta1 및 beta2, epsilon, iota 및 NetB 독소 유전자는 plasmid DNA에 존재하며, CPE 독소 유전자는 염색체 또는 plasmid DNA에 존재하는 것으로 알려져 있다(Petit et al., 1999; Rood et al., 2018). 식품의약품안전처 식품안전정보포털의 식중독 통계에 의하면 2013년부터 2022년까지 최근 10년간 우리나라에서 발생한 *C. perfringens*에 의한 식중독 사고의 발생건수 및 환자수는 각각 143건 및 5,630명으로 이 균에 의한 식중독 환자수는 건당 평균 39.4명이 발생하였다(MFDS, 2023a). 세균성 식중독 원인균인 병원성대장균, 살모넬라, 캄피로박터에 이어 식중독 발생건수로는 4위에 해당하며, 환자수로는 병원성대장균, 살모넬라에 이어 3위로 과거에 비해서는 *C.*

*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469. 1822 Fax: +82. 63. 469. 7448

E-mail address: parkks@kunsan.ac.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.2023.0826>

Korean J Fish Aquat Sci 56(6), 826-832, December 2023

Received 26 September 2023; Revised 10 November 2023; Accepted 14 November 2023

저자 직위: 이신혜(대학원생), 박권삼(교수)

*perfringens*에 의한 식중독 사고의 비중은 점차 증가하고 있는 추세이다(MFDS, 2023a).

국내의 다양한 시료에서 분리한 *C. perfringens*에 대한 독소 유전자 및 항균제 내성에 관한 연구는 많으나(Lee et al., 2014; Jeong et al., 2017; Park et al., 2019; Jang et al., 2020), 시판 젓갈 등을 포함한 수산식품에서 *C. perfringens*의 오염 실태에 관한 연구논문은 전혀 없는 실정이다. 젓갈은 어류, 갑각류, 연체류 및 극피류 등의 전체 또는 일부분에 식염을 가하여 발효 숙성시킨 것으로 원료 자체에 존재하는 미생물 및 효소작용으로 분해와 숙성되어 독특한 풍미를 가지는 수산발효식품이다. 식품공전에서 젓갈에 대한 기준 및 규격은 타르색소 불검출, 보존료는 식염 함량이 8.0% 이하의 제품에 한하여 소르빈산으로서 1 g/kg 이하로 첨가할 수 있으며, 식중독균(*Bacillus cereus*는 g 당 10,000 CFU (colony forming unit) 이하 및 *C. perfringens*는 n=5, c=2, m=100, M=1,000)에 관한 기준 및 규격이 설정되어 있다(MFDS, 2023b). 따라서 시판 젓갈의 안전성 확보를 위하여 시판젓갈에서 분리한 *C. perfringens*의 독소 유전자 보유성 및 항균제 내성에 관한 연구 결과의 축적은 절실히 요구된다. 이를 위하여 시판 젓갈에서 분리한 총 11균주 *C. perfringens*을 대상으로 독소 유전자의 보유성, 항균제 내성 양상 및 내성 항균제에 대한 최소발육억제농도를 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

실험에 사용한 *C. perfringens*는 2023년 6월 충남 논산시 강경대흥시장 소재의 젓갈 도매점에서 구입한 11종의 젓갈 및 전북 부안군 곰소젓갈식품센터의 도매점에서 구입한 11종의 젓갈 총 22종의 시판 젓갈에서 분리한 11균주 및 독소 유전자 유무와 항균제 감수성 정도 관리를 판정하기 위하여 *C. perfringens* KCTC 5101 균주를 사용하였다.

*C. perfringens*의 분리 및 동정

시판 젓갈에서 *C. perfringens*의 분리 및 동정은 다음과 같이 실시하였다. 시료 25–30 g에 9배량의 phosphate buffered saline (PBS; 140 mM NaCl, 5 mM anhydrous Na₂HPO₄ and 1.5 mM KH₂PO₄; pH 7.4)을 가하고 2분간 균질화 후 검액은 단계 희석하여 단계별 검액 1 mL씩을 3장의 TSC *perfringens* agar (Oxoid, Basingstoke, England)에 접종하여 37±1.0°C의 GasPak jar (BD BBL, Mississauga, Canada)에서 24시간 혐기 배양한 후 황회색 집락을 계수하였으며, *C. perfringens*로 추정되는 모든 균주는 순수 분리하여 그람 염색 및 API 20A kit (bioMerieux, Marcy-l'Étoile, France)를 사용하여 생화학 분석과 표적 유전자 16S rRNA의 증폭 유무를 PCR assay로 확인하여 동정하였다. PCR assay로 동정하기 위하여 균주는 Reinforced Clostridial medium (Difco, Sparks, MD, USA)에 접종

하여 37±1.0°C에서 24시간 혐기 배양한 후 배양액 1 mL를 취하여 12,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 얻은 균체에 멸균 증류수 100 µL을 가하여 현탁 및 100°C에서 10분 가열하고 얼음에 2분간 정치 후 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 상층액을 PCR assay를 위한 template DNA로 사용하였다. PCR 반응은 EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara, Otsu, Japan) 12.5 µL, primer 각각 1.0 µL, 2.5 µL의 DNA template에 DW를 최종 25 µL가 되게 첨가하여 SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, Marsiling, Singapore)를 사용하여 증폭하였다. *C. perfringens*의 동정을 위한 PCR 반응 조건은 95°C에서 5분간 1회 열 변성 후 94°C 1분, 53°C 1분, 72°C 1분을 한 단위로 하여 이를 35회 반복하여 DNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA 산물은 1.5% agarose (Biosesang, Seongnam, Korea) gel에서 전기영동 후 ethidium bromide (Bioneer, Daejeon, Korea)로 염색하여 Vilber Lourmat (Bio-Paint ST4; Marne-la-Vallée, France)사 Gel-Doc system으로 확인하였다. 동정이 완료된 *C. perfringens*는 최종 농도 15%가 되도록 멸균된 글리세린을 첨가하여 cryovial storage box (Simport, Beloeil QC, Canada)에 넣어 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

*C. perfringens*의 용혈능 분석

용혈능 시험은 기산바이오(주) (Seoul, Korea)에서 구매한 Sheep blood (Kisan Bio Co., Seoul, Korea)를 멸균 PBS (140 mM NaCl, 5 mM anhydrous Na₂HPO₄ and 1.5 mM KH₂PO₄; pH 7.4)로 3회 세정 후 Reinforced Clostridial agar (Difco)에 5%를 첨가하여 제조한 배지에 시험균을 접종하여 37±1.0°C에서 24시간 혐기 배양 후 균체 주위의 투명화 생성 여부로 용혈능을 확인하였다.

독소 유전자의 분석

*C. perfringens*의 7종 독소 유전자의 분석에 사용한 primers의 염기서열, 증폭 DNA 크기 및 annealing 온도 등은 Table 1에 나타내었으며, primers는 Bioneer (Daejeon, Korea)에 의뢰 합성하였다. 사용한 template DNA는 동정에 사용한 것과 동일한 것을 사용하여 분석하였으며, PCR 조건은 94°C 5분간 1회 열 변성 후 94°C에서 30초 열 변성 및 신장 시간은 1분간 실시하였다. 증폭된 DNA 산물은 1.5% agarose (Biosesang, Seongnam, Korea) gel에서 전기영동 후 ethidium bromide (Bioneer, Daejeon, Korea)로 염색하여 Vilber Lourmat (Bio-Paint ST4;) 사 Gel-Doc system으로 확인하였다.

항균제 감수성 시험

각종 항균제에 대한 분리 균주의 감수성은 Becton Dickinson (BBL Sensi-Disk; Sparks, MD, USA)사의 항균제 디스크 제품을 사용하여 Acar and Goldstein (1991)의 디스크확산법으로 실시하였다. Reinforced Clostridial medium (Difco)에 시험 균주를 접종하여 37±1.0°C에서 하룻밤 혐기 배양 후 멸균 생리

식염수로 2회 세정하고 농도를 McFarland No. 0.5로 조정하여 4.0 mm의 Reinforced Clostridial agar (Difco) 평판에 멸균 유리병으로 균을 도말 하였다. 여기에 검사 항균제 디스크를 고착하여 37±1.0°C에서 24시간 혐기 배양 후 각 항균제에 의해 형성된 생육저지환의 크기를 측정하고 표준 지표에 따라 감수성 여부를 평가하였다(CLSI, 2018). 시험 항균제는 amoxicillin (25 µg), ampicillin (10 µg), cefotaxime (30 µg), cefoxitin (30 µg), cefuroxime (30 µg), ceftriaxone (30 µg), cephalothin (30 µg), cephalozin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), clindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg), kanamycin (30 µg), lincomycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), oxacillin (1 µg), penicillin G (10 µg), rifampin (5 µg), tetracycline (30 µg) 및 vancomycin (30 µg) 등 20종의 항균제 디스크를 사용하였다. MAR index는 내성을 나타내는 항균제 수를 실험에 사용한 전체 항균제 수로 나눈 값으로 계산하였다.

최소발육억제농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)의 측정

내성을 나타내는 항균제 6종(ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, kanamycin, nalidixic acid, oxacillin)에 대한 최소발육억제농도는 MIC test strip (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy)을 사용하여 측정하였다. Reinforced Clostridial medium (Difco)에 시험 균주를 접종하여 37±1.0°C에서 하룻밤 혐기 배양 후 멸균 생리식염수로 2회 세정하고 농도를 McFarland No. 0.5로 조정하여 4.0 mm의 Reinforced Clostridial agar (Difco) 평판에 멸균 유리병으로 균을 도말 하였다. 여기에 MIC test strip을 고착하여 37±1.0°C에서 24시간 혐기 배양 후 제조사의 지침에 따라 최소억제농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

시판 젓갈에서 *C. perfringens*의 분리 및 동정

시판 젓갈에서 *C. perfringens*의 오염 정도를 파악하기 위하여 2023년 6월 충남 논산시 강경대흥시장 소재의 젓갈 도매점 및 전북 부안군 곰소젓갈식품센터의 도매점에서 소비량이 많다고 판단되는 젓갈 각 11종(낙지젓, 오징어젓, 새우젓, 갈치속젓, 어리굴젓, 명란젓, 꼴뚜기젓, 창란젓, 조개젓, 뱀망이젓 및 가리비젓) 총 22종 젓갈을 구입하여 분석하였다. 그 결과 강경대흥시장에서 구입한 낙지젓(10 CFU/g), 어리굴젓(20 CFU/g), 뱀망이젓(10 CFU/g) 및 가리비젓(10 CFU/g)에서 *C. perfringens*이 검출되었으며, 곰소젓갈식품센터에서 구입한 시료에서는 낙지젓(10 CFU/g), 갈치속젓(20 CFU/g), 조개젓 (20 CFU/g) 및 가리비젓(10 CFU/g)에서 *C. perfringens*가 검출되었다. 식품공전에서 제시하는 젓갈류에 대한 *C. perfringens*의 기준인 1,000 CFU/g 이하를 초과한 제품은 없었으나 낙지젓과 가리비젓은 2개소 구입처 시료에서 공히 검출되었다는 점에서 주의가 필요하다고 판단된다. 분리된 *C. perfringens*의 동정은 API 20A kit을 사용한 생화학적 시험 및 유전학적 방법 즉, PCR assay에 의한 16S rRNA 유전자의 존재 유무로 동정하였다(Wu et al., 2009). 생화학적 시험에서는 *C. perfringens*로 동정되었으나 16S rRNA 유전자의 증폭이 확인되지 않은 2균주는 실험에서 배제하고 11균주를 대상으로 추후 실험에 사용하였다. 분리한 11균주 *C. perfringens*에 대한 용혈능 분석에서 모든 균주는 sheep blood에 β-용혈능을 나타내는 것으로 확인되었다(결과 미제시). 국내 수산물에서 *C. perfringens*의 분리에 관한 연구보고는 아직 없으나 외국의 사례는 많은 편이다. 이집트의 다양한 장소의 어류로부터 *C. perfringens*의 오염도를 조사한 결과, 시

Table 1. Polymerase chain reaction primers and reaction conditions used in this study

Target gene	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Annealing temperature (°C)	Reference
16S rRNA	5'-AAAGATGGCATCATCATTCAAC-3' 5'-TACCGTCATTATCTTCCCAA-3'	279	53	Wu et al. (2009)
<i>cpa</i>	5'-GCTAATGTTACTGCCGTTGA-3' 5'-CCTCTGATACATCGTGTAAG-3'	324	55	Meer and Songer (1997)
<i>cpb</i>	5'-TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA-3' 5'-TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA-3'	611	55	Baums et al. (2004)
<i>ext</i>	5'-TGGGAACCTTCGATACAAGCA-3' 5'-TTAACTCATCTCCATAACTGCAC-3'	396	55	Baums et al. (2004)
<i>iap</i>	5'-AAACGCATTAAGCTCACACC-3' 5'-CTGCATAACCTGGAATGGCT-3'	293	55	Baums et al. (2004)
<i>cpe</i>	5'-GGGGAACCCCTCAGTAGTTTCA-3' 5'-ACCAGCTGGATTTGAGTTTAATG-3'	506	55	Baums et al. (2004)
<i>netB</i>	5'-CGCTTCACATAAAGGTTGGAAGGC-3' 5'-TCCAGCACCAGCAGTTTTTCT-3'	316	55	Bailey et al. (2013)
<i>cpb2</i>	5'-AGATTTTAAATATGATCCTAACC-3' 5'-CAATACCCTCACCAAATACTC-3'	567	54	Bueschel et al. (2003)

장에서 판매되고 있는 어류(71.0%), 사람이 만진 어류(63.0%), 양식장에서 수거한 신선한 어류(54.5%), 어류의 신선도를 유지하기 위해 사용한 물(27.3%) 및 어류통조림 제조에 사용했던 물(17.8%)에서 균이 검출되었다는 보고가 있으며(Sabry et al., 2016), 인도 카슈미르 히말라야의 3개 호수에서 수거한 물 210개 시료 및 잉어와 송어 시료 각 150개 시료에서 100% 및 26.66%로 검출되었다는 보고(Hafeez et al., 2022)도 있기 때문에 수산물 소비량이 많은 국내 상황을 감안한다면 식중독 사고의 비중이 점차 증가하고 있는 *C. perfringens*에 대한 수산식품에서의 연구는 매우 필요하다고 판단된다.

*C. perfringens*의 독소 유전자 분석

시판 젓갈에서 분리한 11균주 *C. perfringens*에 대해 7종의 독소 유전자(*cpa*, *cpb*, *ext*, *iap*, *cpe*, *netB* 및 *cpb2*)의 보유성은 PCR assay로 분석하였으며 그 결과는 Table 2에 나타내었다. *cpa* 유전자는 모든 균주에서 보유성이 검출된 반면 *cpb*, *ext*, *iap*, *cpe* 및 *netB* 등 5종의 독소유전자는 모든 균주에서 검출되지 않았다. 또한 *cpb2* 독소 유전자는 6균주(54.5%)에서는 양성인 반면 5균주(45.5%)에서는 음성인 것으로 확인되었다. 따라서 독소 유전자의 보유성에 따른 분류에 의하면 11균주 *C. perfringens*는 모두 type A형의 *C. perfringens*로 동정되었다. 서울시 소재 동물병원의 개 분변에서 분리한 52균주 *C. perfringens*는 모두 *cpa* 독소 유전자는 양성인 반면 *cpb*, *iap* 및 *ext* 독소 유전자는 음성이었으며, *cpb2* 독소 유전자는 39균주(75.0%)의 균주에서 양성으로 확인되어 모든 분리된 균주는 A형 *C. perfringens*로 확인되었다는 보고(Chon et al., 2018)와 본 결과와는 유사하였다. 225마리 말 분변에서 분리한 25균주 *C. perfringens*는 *cpe*, *ext*, *itx* 및 *NetF* 독소 유전자는 모두 음성인 반면 *cpa* 독소 유전자는 모든 시료에서 양성으로 검출되었으며, *cpb* 및 *cpb2* 독소 유전자는 10균주(40.0%) 및 15균주(60.0%)에서

양성으로 검출되었다. 결과적으로 type A형이 15균주(60.0%), type C형이 10균주(40.0%)이며 type B, type D 및 type E형은 검출되지 않았다는 연구결과(Park et al., 2019)와 비교해도 시판 젓갈에서 분리한 *C. perfringens* 균주의 독소 유전자 보유성과는 차이가 있는 것으로 확인되었다. 또한 서울시 소재 소매시장에서 구입한 200개의 육류 샘플(소고기 50건, 닭고기 100건 및 돼지고기 50건)에서 분리한 38균주 *C. perfringens*의 독소 유전자 보유성을 PCR assay로 확인한 결과, *cpe*, *cpb*, *ext*, *iap* 및 *netB* 독소 유전자는 검출되지 않은 반면 모든 균주에서 *cpa* 독소 유전자만 검출되어 모든 균주는 type A형의 *C. perfringens*였다는 보고도 있다(Jang et al., 2020). 이러한 결과의 차이는 *C. perfringens*의 분리원, 분리 시기 및 분리 장소 등이 다르다는 점이 원인으로 분석된다.

*C. perfringens*의 항균제 내성 분석

시판 젓갈에서 분리한 11균주 *C. perfringens*를 대상으로 20종의 항균제에 대한 감수성 분석은 디스크확산법으로 측정하였으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 20종의 항균제 중 kanamycin을 포함한 6종의 항균제에는 11균주 중 일부 균주에서 내성을 나타낸 반면, amoxicillin를 포함한 14종의 항균제에는 모든 균주가 감수성을 나타내었다. 내성율이 높은 항균제는 kanamycin (90.9%), nalidixic acid (72.7%), oxacillin (54.5%), erythromycin (27.3%), ciprofloxacin (9.1%) 및 clindamycin (9.1%) 순서였다. 서울시 소재 소매시장에서 구입한 200개의 육류 샘플(쇠고기 50건, 닭고기 100건 및 돼지고기 50건)에서 분리한 38균주 *C. perfringens*의 항균제 내성을 검토한 결과, tetracycline (100.0%), imipenem (71.0%), chloramphenicol (68.4%), ampicillin (34.2%), metronidazole (34.2%)로 확인되었으며 분리 균주의 78.9%가 3종 이상의 항균제에 내성을 나타내는 다제내성균이었다는 보고(Jang et al., 2020)와는

Table 2. Toxin gene profiles of *Clostridium perfringens* strains isolated from commercial Jeotgals

Strain No.	Source (Jeotgal)	Toxin gene							Toxin type
		<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>ext</i>	<i>iap</i>	<i>cpe</i>	<i>netB</i>	<i>cpb2</i>	
1	Octopus	+	-	-	-	-	-	+	A
2	Oyster	+	-	-	-	-	-	+	A
3	Oyster	+	-	-	-	-	-	-	A
4	Pollack roe	+	-	-	-	-	-	-	A
5	Scallop	+	-	-	-	-	-	+	A
6	Octopus	+	-	-	-	-	-	+	A
7	Hairtail	+	-	-	-	-	-	+	A
8	Hairtail	+	-	-	-	-	-	-	A
9	Clam	+	-	-	-	-	-	-	A
10	Clam	+	-	-	-	-	-	+	A
11	Scallop	+	-	-	-	-	-	-	A

+, Positive; -, Negative.

다른 결과를 나타내고 있다. 225마리 말 분변에서 분리한 25 균주 *C. perfringens*의 항균제 내성은 amoxicillin/clavulanic acid (12.0%), meropenem (4.0%) 및 vancomycin (4.0%)이며 (Park et al., 2019), 서울시 소재 동물병원의 개 분변에서 분리한 52균주 *C. perfringens*는 tetracycline (25.0%)과 clindamycin (21.2%)에는 내성을 나타내나 ampicillin (94.0%), chloramphenicol (92.0%), metronidazole (100.0%), moxifloxacin (96.0%) 및 imipenem (100.0%)에는 감수성이었다는 보고도 있다(Chon et al., 2018). 경남 지역의 학교 식당과 슈퍼마켓에서 수거한 232건의 신선육(쇠고기, 돼지고기, 닭고기 및 오리고기)에서 분리한 30균주 *C. perfringens*의 항균제 내성은 ampicillin (100.0%), bacitracin (97.0%), penicillin (97.0%), tetracycline (93.0%), erythromycin (83.0%), oxytetracycline (73.0%), lincomycin (20.0%), gentamicin (10.0%), amikacin (7.0%), trimethoprim (7.0%) 및 streptomycin (3.0%)이었다는 보고도 있다(Hu et al., 2018). 또한 실험에 사용한 11균주에 대한 항균제 내성 양상에 관한 결과는 Table 4에 나타내었다. 1균주는 20종의 항균제에 감수성을 나타내고 있으며, 10균주의 내성 양상은 1종의 항균제에서 5종의 항균제까지 내성 양상을 나타내고 있는데 kanamycin에만 내성을 나타내는 균주는 1

균주(9.1%)로 multiple antimicrobial resistance (MAR) index는 0.05로 매우 낮았다. Kanamycin-nalidixic acid 조합 또는 kanamycin-oxacillin 조합, 즉 2종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 각각 1균주이며 MAR index는 0.05이었다. Erythromycin-kanamycin-nalidixic acid 조합 및 kanamycin-nalidixic acid-oxacillin 조합, 즉 3종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 1균주 및 4균주이며, erythromycin-kanamycin-nalidixic acid-oxacillin의 4종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 1균주이며, ciprofloxacin-clindamycin-erythromycin-kanamycin-nalidixic acid의 5종의 항균제에 내성을 나타내는 1균주로 파악되었다. 11균주 중 3종 이상의 항균제에 내성을 나타내는 다제내성균이 7균주로 확인되었다는 점에서 다제내성의 심각성은 대두될 것으로 판단된다.

내성 항균제에 대한 *C. perfringens*의 최소발육억제농도 측정

내성을 나타내는 6종의 항균제에 대한 11균주 *C. perfringens*의 최소발육억제농도를 측정한 결과는 Table 5에 나타내었다. Ciprofloxacin에 내성을 나타내는 균주는 4번의 1균주로 MIC는 >32 µg/mL이며, 감수성을 나타내는 나머지 10균주는 1.5–1.7 µg/mL로 낮은 수준으로 측정되었다. Clindamycin에 내성을 나타내는 균주는 4번의 1균주로 MIC는 128 µg/mL이며, 감수성을 나타내는 나머지 10균주는 0.064–0.75 µg/mL로 매우 낮은 수준으로 측정되었다. Erythromycin에 내성을 나타내는 균주는 1번, 4번 및 11번 균주로 MIC는 16→256 µg/mL이며, 감수성을 나타내는 나머지 8균주는 1.5–8.0 µg/mL 수준으로 측정되었다. Kanamycin에 내성을 나타내는 균주는 8번을 제외한 10균주로 MIC는 96→256 µg/mL 범위로 측정되었으며 평균 MIC는 128 µg/mL이었다. Nalidixic acid에 내성을 나타내는 균주는 2번, 8번 및 9번을 제외한 8균주로 MIC는 32–64 µg/

Table 3. Antimicrobial susceptibility and resistance of *Clostridium perfringens* isolated from commercial Jeotgals

Antimicrobials	Disc content (µg)	No. of isolates		
		Resistant	Intermediate	Susceptible
Amoxicillin (AML)	25	0	0	11
Ampicillin (AMP)	10	0	0	11
Cefotaxime (CTX)	30	0	1	10
Cefoxitin (FOX)	30	0	0	11
Cefuroxime (CXM)	30	0	0	11
Ceftriaxone (CRO)	30	0	0	11
Cephalothin (KF)	30	0	0	11
Cephazolin (KZ)	30	0	0	11
Chloramphenicol (C)	30	0	0	11
Ciprofloxacin (CIP)	5	1	1	9
Clindamycin (CD)	2	1	1	9
Erythromycin (E)	15	3	1	7
Kanamycin (K)	30	10	0	1
Lincomycin (LIN)	30	0	1	10
Nalidixic acid (NA)	30	8	2	1
Oxacillin (OX)	1	6	2	3
Penicillin G (P)	10	0	0	11
Rifampicin (RD)	5	0	0	11
Tetracycline (TE)	30	0	0	11
Vancomycin (VA)	30	0	0	11

Table 4. Antimicrobial resistance patterns and multiple antimicrobial resistance (MAR) indices of *Clostridium perfringens* isolated from commercial Jeotgals

Antimicrobial resistant patterns	No. of resistant strain	MAR index
None	1	0.05
K	1	0.05
K-NA	1	0.05
K-OX	1	0.05
E-K-NA	1	0.05
K-NA-OX	4	0.20
E-K-NA-OX	1	0.05
CIP-CD-E-K-NA	1	0.05
Total	11	

K, Kanamycin; NA, Nalidixic acid; OX, Oxacillin; E, Erythromycin; CIP, Ciprofloxacin; CD, Clindamycin.

Table 5. MIC of *Clostridium perfringens* isolated from commercial Jeotgals

Strain No.	MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
	CD	CIP	E	K	NA	OX
1	0.125	1.5	16	128	32	1.5
2	0.064	1.5	3.0	96	24	1.0
3	0.094	1.5	1.5	96	64	0.75
4	128	>32	>256	>256	64	0.25
5	0.125	2	8.0	128	48	2.0
6	0.125	3	2.0	96	32	1.5
7	0.5	1.5	2.0	128	64	2.0
8	0.38	1.5	2.0	8	12	0.016
9	0.75	1.5	2.0	128	16	0.016
10	0.5	1.5	2.0	128	64	1.0
11	1.5	1.5	16	96	64	0.75

MIC, Minimum inhibitory concentration; CD, Clindamycin; CIP, Ciprofloxacin; E, Erythromycin; K, Kanamycin; NA, Nalidixic acid; OX, Oxacillin.

mL 범위로 측정되었으며 평균 MIC는 54 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. Oxacillin에 내성을 나타내는 균주는 3번, 4번, 8번, 9번 및 11번을 제외한 6균주로 MIC는 1.0–2.0 $\mu\text{g/mL}$ 범위로 측정되었으며 평균 MIC는 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 결과적으로 시판 젓갈에서 분리한 11균주 *C. perfringens*는 clindamycin, kanamycin 및 nalidixic acid에 대해서는 MIC가 대체로 높은 반면 ciprofloxacin, erythromycin 및 oxacillin의 항균제에 대한 MIC은 상대적으로 낮은 것으로 확인되었다(Table 5). 농업용 바이오가스 플랜트에서 분리한 157균주 *C. perfringens*의 MIC는 clindamycin (≥ 16 $\mu\text{g/mL}$), tilmicosin (> 64 $\mu\text{g/mL}$), vancomycin (> 8 $\mu\text{g/mL}$) 및 imipenem (> 64 $\mu\text{g/mL}$)이었다는 결과와는 차이가 있었으며(Derongs et al., 2020), 2010–2016년 우리나라 닭고기에서 분리한 162균주 *C. perfringens*의 MIC는 erythromycin (0.12– ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$), clindamycin (0.5– ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$), streptomycin (8– ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$), bacitracin (1–64 $\mu\text{g/mL}$) 및 tetracycline (0.25– ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$)이었다는 결과와도 차이가 있었다(Wei et al., 2020).

시판 젓갈의 안전성 평가를 위하여 22개 시판 젓갈에서 식중독 원인 세균인 11균주 *C. perfringens*를 분리하여 독소 유전자 보유성을 확인한 결과, 주요 독소 유전자는 *cpa* (100.0%) 및 *cpb2* (54.5%)인 것으로 확인되었으며, *cpb*, *ext*, *iap*, *cpe* 및 *netB* 유전자는 모든 균주에서 검출되지 않았다. 또한 일부 균주는 kanamycin을 포함한 6종의 항균제에 내성을 나타내며, kanamycin과 nalidixic acid에 대해서는 상대적으로 높은 MIC를 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 시판 젓갈의 안전성 확보를 위해서는 젓갈의 위생적인 제조, 유통 및 판매 등이 요구되며, *C. perfringens*를 포함한 병원성 세균 및 바이러스의 꾸준한

모니터링도 필요하다고 판단된다.

References

- Acar JF and Goldstein FW. 1991. Disk susceptibility test. In: Antibiotics in Laboratory Medicine. Lorian V, ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, U.S.A., 17-52.
- Bailey MA, Macklin KS and Krehling JT. 2013. Use of a multiplex PCR for the detection of toxin-encoding genes *netB* and *tpeL* in strains of *Clostridium perfringens*. ISRN Vet Sci 2013, 865702. <https://doi.org/10.1155/2013/865702>.
- Baums CG, Schotte U, Amtsberg G and Goethe R. 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Vet Microbiol 100, 11-16. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00126-3).
- Bueschel DM, Jost BH, Billington SJ, Trinh HT and Songer JG. 2003. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: Correlation of genotype with phenotype. Vet Microbiol 94, 121-129. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00081-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00081-6).
- Chon JW, Seo KH, Bae D, Park JH, Khan S and Sung K. 2018. Prevalence, toxin gene profile, antibiotic resistance, and from molecular characterization of *Clostridium perfringens* diarrheic and non-diarrheic dogs in Korea. J Vet Sci 19, 368-374. <https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.3.368>.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100, Wayne, NJ, U.S.A., 60.
- Derongs L, Druilhe C, Ziebal C, Le Maréchal C and Pourcher AM. 2020. Characterization of *Clostridium perfringens* isolates collected from three agricultural biogas plants over a one-year period. Int J Environ Res Public Health 179, 5450. <https://doi.org/10.3390/ijerph17155450>.
- Hafeez M, Ahmad I, Qureshi S, Kashoo Z, Farooq S, Asmi O, Shah F and Razak N. 2022. *Clostridium perfringens* from fresh water fish of Kashmir Himalaya and their aquatic environment: Toxinotyping and phylogenetic analysis. Anaerobe 77, 102619. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102619>.
- Hu WS, Kim H and Koo OK. 2018. Molecular genotyping, biofilm formation and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolated from meat supplied to school cafeterias in South Korea. Anaerobe 52, 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.06.011>.
- Jang YS, Kim DH, Bae D, Kim SH, Kim H, Moon JS, Song KY, Chon JW and Seo KH. 2020. Prevalence, toxin-typing, and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from retail meats in Seoul, Korea. Anaerobe 64, 102235. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102235>.
- Jeong D, Kim DH, Kang IB, Chon JW, Kim H, Om AS, Lee JY, Moon JS, Oh DH and Seo KH. 2017. Prevalence and toxin

- type of *Clostridium perfringens* in beef from four different types of meat markets in Seoul, Korea. *Food Sci Biotechnol* 26, 545-548. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0075-5>.
- Kiu R, Brown J, Bedwell H, Leclaire C, Caim S, Pickard D, Dougan G, Dixon RA and Hall LJ. 2019. Genomic analysis on broiler-associated *Clostridium perfringens* strains and exploratory caecal microbiome investigation reveals key factors linked to poultry necrotic enteritis. *Anim Microbiome* 1, 12. <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0015-1>.
- Lee KE, Lim SI, Shin SH, Kwon YK, Kim HY, Song JY and An DJ. 2014. Distribution of *Clostridium perfringens* isolates from piglets in South Korea. *J Vet Med Sci* 76, 745-749. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0430>.
- Meer RR and Songer JG. 1997. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am J Vet Res* 58, 702-705.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2023a. Food Poisoning Statistics. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=4425&menu_grp=MENU_NEW02 on Sep 15, 2023.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2023b. Food Code. Retrieved from <https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#!/ext/Document/FC> on Sep 15, 2023.
- Ohtani K and Shimizu T. 2016. Regulation of toxin production in *Clostridium perfringens*. *Toxins* 8, 207. <https://doi.org/10.3390/toxins8070207>.
- Park CS, Hwang JY and Cho GJ. 2019. The first identification and antibiogram of *Clostridium perfringens* type C isolated from soil and the feces of dead foals in South Korea. *Animals* 9, 579. <https://doi.org/10.3390/ani9080579>.
- Petit L, Gibert M and Popoff MR. 1999. *Clostridium perfringens*: Toxinotype and genotype. *Trends Microbiol* 7, 104-110. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(98\)01430-9](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(98)01430-9).
- Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, Moore RJ, Popoff MR, Sarker MR, Songer JG, Uzal FA and Immerseel FV. 2018. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe* 53, 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>.
- Sabry M, Abd EI-Moein K, Hamza E and Abdel Kader F. 2016. Occurrence of *Clostridium perfringens* types A, E, and C in fresh fish and its Public health significance. *J Food Prot* 79, 994-1000. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-569>.
- Wei B, Cha SY, Zhang JF, Shang K, Park HC, Kang JW, Lee KJ, Kang M and Jang HK. 2020. Antimicrobial susceptibility and association with toxin determinants in *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Microorganisms* 8, 1825. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111825>.
- Wu J, Zhang W, Xie B, Wu M, Tong X, Kalpoe J and Zhang D. 2009. Detection and toxin typing of *Clostridium perfringens* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples by PCR. *J Clin Microbiol* 47, 807-810. <https://doi.org/10.1128/>JCM.01324-08.