

大腸菌의 抗菌劑耐性 및 傳達性 Plasmid

慶北大學校 醫科大學 微生物學教室

趙東澤·全燕基*

=Abstract=

Antimicrobial Drug Resistance and Transferable Resistance Plasmid in *Escherichia coli**

Dong Taek Cho and Do Ki Chun*

Department of Microbiology, Kyungpook National University, School of Medicine, Taegu, Korea

One hundred and twenty-one strains each of *Escherichia coli* isolated from stools of 60 patients who received various antimicrobial drugs in hospital for more than one week and apparently healthy 60 students who have no history of taking antimicrobial drugs during recent one month, were tested for their resistance to 13 antimicrobial drugs.

The frequency of resistance strains was highest to tetracycline with 69.2%, and followed by streptomycin (Sm), sulfisomidine (Su), chloramphenicol (Cm), ampicillin (Ap), and carbenicillin (Cb) in the decreasing order, ranging from 61.2% to 39.3%. Strains resistant to kanamycin (Km), cephaloridine (Cr), and trimethoprim (Tp) occupied about one-fourth of strains, and only four strains were resistant either one or more of nalidixic acid, gentamicin and amikacin, and no strain was resistant to rifampicin. The frequency of resistant strains to Cm, Ap, Km, Cr, and Cb was much higher among patient isolates than student strains, but strains resistant to the other drugs showed almost the same frequencies between patient and student isolates. There was a marked difference in average minimum inhibitory concentrations of between resistant and susceptible strains, suggesting that the resistance to drugs is the plasmid origin.

Seventy-six percent of strains were resistant to one to 10 drugs tested, and no much difference was observed between strains from patients and students. However, strains resistant to four or more drugs were much more frequently found among patient isolates than student strains, with the increasing tendency of multiply resistant strains among patient isolates following the increase in the number of resistant drugs.

The transfer of drug resistance by conjugation was tested and 98 strains (67.5%) among 145 which were resistant to two or more drugs were found to transfer their drug resistance to *E. coli*. Among 74 strains resistant to 7 or more drugs, all except one transferred the resistance, and the number of strains with transferable resistance decreased, as the number of resistant drugs decrease.

A R plasmid from randomly selected p13 strain was tested for the incompatibility group, and the plasmid was classified into Inc F II.

R plasmid DNA bands were identified by polyacrylamide gel electrophoresis.

* 啓明大學校 醫科大學 微生物學教室, 本 研究는 啓明醫大 臨床研究費의 支援을 一部 받았음

緒 論

先進國에서는 거의 없는 것으로 알려진 水因性 腸系疾患은 우리나라에서는 每年 四季를 通해 發生하고 있으며, 그 原因菌의 상당수가 現在 常用되는 各種 抗菌劑에 多藥劑耐性을 갖고 있다. 이러한 多藥劑 耐性菌이 出現하는 機轉은 抗菌劑 自體가 菌體에 直接 作用하여 일으킨 變異株가 抗菌劑에 依해 選擇된다고 할 수 있으나 耐性菌의 出現頻度로 보아 그 全部가 突然變異에 依한 것이라고는 보기 어렵고 chromosome과는 別個로 存在하는 自家複製 能力을 가진 DNA分子인 plasmid의 媒介로 菌體의 接合에 의해 感受性菌에 耐性이 傳達되는 所謂 傳達性耐性(R) plasmid에 起因된 것으로 說明되고 있다^{1,2)}. 이러한 R plasmid에 關해서는 腸內細菌에서 가장 많이 研究되어 있는바, 腸內의 正常菌叢은 抗菌劑에 依하여 耐性菌만이 受動的으로 選擇되어 살아남게 되므로 耐性을 獲得한 菌株가 他 腸內細菌이나 其他 病原菌들에게 R plasmid에 依해서 耐性을 容易하게 傳達하므로써 抗菌劑耐性菌의 출현은 菌種에 關係없이 一般化되고 比較的 널리 分布될 可能性이 있다^{1,2)}. 이 plasmid는 抗菌劑耐性에만 關係할 뿐만 아니라 腸毒素產生能과 같은 病原性에도 關係하며 그외에도 여러가지 生物學的 特性을 發揮하는 것으로 알려져 있다^{3,4,5)}.

醫師의 處方없이도 抗菌劑를 自由로이 購入하여 服用할 수 있을 뿐 아니라 적지않은 量의 抗菌劑가 家畜 飼料에 添加되기도 하므로써 抗菌劑가 濫用되는 우리나라의 深刻한 現實은 多劑耐性菌을 繼續 增加시키는 要因이 되고 있다^{6,7,8,9)}.

Mexico에서 1972년에 突發하여 數年에 걸쳐 蔓延된 腸티프스와 痢疾의 大流行은 그 原因菌이 各種 抗菌劑에 高度耐性을 가진 *Salmonella*菌과 *Shigella*菌에 依한 것으로서 그들의 耐性도 R plasmid에 起因된 것임이 確認되었으^{10,11)}. 우리나라에서도 그와 類似한 狀況이 發生할 可能性이 있다는 見地에서, 抗菌劑 耐性菌의 分離檢査 및 그 耐性의 本態를 把握하기 爲한 傳達性檢査를 不斷히 實施하여 抗菌劑耐性樣相의 變動推移를 觀察하고 R plasmid 保有菌의 出현을 抑制시키는 對策을 時急히 講究하여야 할 것이다.

前述한 R plasmid의 菌體 相互間의 傳達에는 여러 가지 條件이 關係되어 있는데, R plasmid의 種類, 菌種 또는 菌株에 따라서 傳達頻度나 傳達內容에 差異가 있으며 傳達 與否에도 關係된다^{13,14,15)}.

R plasmid를 이미 갖고 있는 菌에 다른 R plasmid

가 傳達될 때는 그들 R plasmid가 相關성이 없으면 R plasmid를 갖지 않는 菌에 傳達되는 것과 같은 程度로 傳達되나 兩 plasmid사이에 相關성이 있으면 被傳達菌에 있던 既存의 R plasmid는 除去되고 새로 導入된 R plasmid가 주로 남게 된다^{16,17)}. 이러한 相關性을 利用하여, 同一 菌體內에 서로 다른 2個의 R plasmid가 共存할 수 있느냐의 與否에 따라 非適合性群으로 plasmid를 分類할 수 있게 되어 耐性菌의 R plasmid의 由來를 推測할 수 있게 하므로써 重要한 疫學的인 端緒를 얻을 수 있다^{18,19)}.

將次 닥쳐올지도 모를 抗菌劑耐性인 病原性 腸系細菌에 依해서 일어날 수 있는 各種 傳染性 水因性疾患의 豫防이나 事後對策에 必要한 疫學的 資料를 爲해서 抗菌劑耐性的 傳達에 關係하는 R plasmid를 非適合性群에 의해 分類를 해 두거나 內容을 把握하여야 될 것으로 思料되어 現在 本 敎室에서는 最近에 分離되는 各種 耐性菌의 R plasmid의 非適合性群을 確定하고 있으며^{20,21)} 그 一環으로 本 實驗을 實施하였다.

抗生劑를 抗與한 患者群과 對照群인 學生群의 大便에서 分離한 大腸菌(*E. coli*)을 供試하여 抗菌劑耐性檢査를 實施하여 耐性樣相을 調査하고 耐性傳達實驗으로 R plasmid 菌株를 確認한 후 이들 R plasmid를 標準 plasmid를 利用한 非適合性檢査에 依해 群을 決定하여 最近에 本 敎室에서 分離된 *Salmonella*菌과 *Shigella*菌의 R plasmid의 非適合性群과 比較하였으며, chromosome內의 DNA와 別途로 存在하는, 共有結合된 閉鎖環의 R plasmid DNA 分子를 菌體에서 分離抽出하여 電氣泳動法으로 直接 確認하여 그 成績을 報告한다.

材料 및 方法

菌 株: 1981年 5월부터 12月 사이에 慶北醫大 大學病院에 入院하여 一週 以上 各種 抗菌劑로 治療를 받은 60名 患者의 大便과 最近 1個月間 抗菌劑를 服用한 일이 없는 正常學生 60名의 大便을 各各 EMB 寒天培地에 塗沫培養하여 얻은 典型的인 *E. coli*의 集落을 任意로 2個以上 各各 選擇하여 KIA培地에 保存하면서 基本的인 生物學的 性狀檢査를 하여 *E. coli*로 同定된 患者由來菌 121株와 學生由來菌 121株 都合 242株를 本 實驗에 供試하였다.

標準 R plasmid 및 被傳達菌株: 本 實驗에 供試한 標準 R plasmid는 日本 Obihiro農科獸醫科 大學의 Sato, Canada의 Hospital for Sick Children의 Grant, 美國 Stanford 大學校 醫科大學 國際 Plasmid Center

의 Lederberg로부터 分讓받은 것이다. 이들은 各各 *E. coli*에 傳達시켜 보내온 것으로 本教室에서 이를 다시 必要한 *E. coli*에 傳達시켜 供試하였다. 被傳達菌으로는 nalidixic acid(Na)에 耐性인 *E. coli* K12에 屬하는 ML1410 및 RG176과 rifampicin (Rf)에 耐性인 RG488 등으로서, 日本 Gunma大學의 Mitsuhashi와 Canada의 Grant로부터 分讓받은 것이다.

供試抗菌劑 및 藥劑 耐性檢査: Chloramphenicol (Cm, Park Davis & Co.), tetracycline (Tc, Pfizer Co.) streptomycin (Sm, 日本萬有製藥), sulfisomidine(Su, 大日本製藥), Na(Sterling-Winthrop Labs.), ampicillin (Ap, Beecham Research Lab.), gentamicin (Gm, Schering Co.) Rf(國立保健院), cephaloridine(Cr, 柳柳産業), carbenicillin(Cb, Pfizer Co), trimethoprim (Tp, Roche Co) 및 amikacin (Ak, 日本萬有製藥) 등의 13種 藥劑를 使用하였다. Sm, Su, Ap, Km, Gm, Ak, Cb 및 Cr은 蒸溜水를 溶媒로, Cm은 ethanol을, Rf은 methanol에 Tc는 0.01N HCl溶液에, Na는 1N NaOH溶液에, 그리고 Tp는 0.1N lactic acid溶液에 溶解시켜 冷凍保存하였고 使用時에 이를 pH 7.2의 phosphate buffer나 蒸溜水로 稀釋하였다^{25, 26}. 耐性檢査는 平板稀釋法으로^{9, 20} 實施하였고, 培地는 trypticase soy broth (TSB)와 trypticase soy agar (TSA) 或은 Mueller-Hinton (MH) agar를 使用하였다. 各 藥劑를 順次的으로 稀釋된 濃度로 含有하는 TSA 또는 MH agar 平板培地를 만들어 4°C에 保存하면서 使用前 一週日을 超過하지 않았다. 37°C에 18時間 培養한 供試菌液을 食鹽水로 100倍 稀釋하여 Steers²⁵ 등의 multiple inoculator로 接種하여 37°C에 24時間 培養한 다음 接種部位의 菌發育有無를 보아 最少發育阻止濃度(MIC)를 決定하였는바, 抗菌劑의 MIC가 Cm, Tc, Na, Ap, Km, Cr 및 Rf에서 25 μ g/ml, Sm에서 50 μ g/ml, Su 및 Cb에서 100 μ g/ml, Gm 및 Ak에서 6.3 μ g/ml, Tp에서 2.5 μ g/ml 以上일 때는 이들 菌은 耐性菌으로 判定하였다⁹. 各 藥劑의 稀釋段階別로 菌株들의 MIC의 分布를 把握하기 爲해, 耐性株는 高濃度順으로 3乃至 4段階의, 그리고 感受性 菌株는 低濃度方向으로 3乃至 4段階의 藥劑濃度가 含有된 培地로 耐性檢査를 反覆 實施하여 各 菌株마다 最終 MIC를 定하였다.

耐性傳達實驗: 供試菌株인 分離된 *E. coli* 中 Na에 耐性인 菌株는 *E. coli* RG 488을 被傳達菌으로, 其他의 菌株는 ML 1410과 RG 176을 被傳達菌으로 하여 供試菌과 被傳達菌을 各各 TSB에 1晝夜 培養한 菌液 0.1ml를 各各 5ml의 TSB에 接種, 37°C에서 3~4時

間 隨時로 振盪하면서 培養한 供試菌과 被傳達菌을 1:4로 混合하여 18時間 培養하였다. 이 混合培養液을 選擇培地에 塗沫培養하여 나타난 集落을 擇하여 該當 種類의 抗菌劑에 對한 耐性을 檢査하여 耐性傳達樣相을 보았다.⁹ 選擇培地는 TSA 또는 MH agar에 被傳達菌이 耐性인 Na 또는 Rf와 供試菌이 耐性인 藥劑를 함께 넣어 耐性을 傳達받은 被傳達菌만이 集落을 形成할 수 있게 한다.

表面排除係數: 17個의 各 非適合性群에 屬하는 標準 *R plasmid*의 耐性樣相이, 患者에서 分離된 P13 菌株의 *R plasmid*의 耐性樣相(Ap, Km, Cb 및 Tp에 耐性)과 相異하므로 이 P13菌株의 *plasmid*를 Na에 耐性인 *E. coli* ML1410에 傳達시켜 이를 供與株(donor)로 하고, 各 標準 *R plasmid*를 갖고 있는 Rf에 耐性인 RG 488을 被傳達菌으로 하여 耐性傳達實驗을 하였으며, 使用한 選擇培地는 Tp와 Rf이 含有된 것으로 P13菌의 *plasmid*를 傳達받은 RG 488만이 集落을 形成하게 된다. 表面排除係數는 *R plasmid*를 가진 被傳達菌에 耐性이 傳達되는 頻度를 計算하고, *R plasmid*를 갖지 않은 RG 488에 耐性이 傳達되는 頻度를 計算하여 後者를 前者로 나눈 數字로 表示하였으며 係數가 클수록 表面排除가 強함을 시사한다^{26, 27}.

非適合性實驗: 排除係數가 높으면 2個의 *plasmid*는 같은 非適合性群일 可能性이 있을 것으로 推測되어 排除係數가 越等히 높은 標準 *R plasmid*群들을 擇하여 被傳達菌으로 供試하여 colony test에 依하여 實驗하였다^{17, 26}. 各各 다른 耐性樣相의 *R plasmid*를 가진 2個의 菌을 混合培養한 다음 供與 *R plasmid*를 가진 *E. coli*만이 耐性을 지니고 있는 藥劑와 被傳達菌 *E. coli*가 耐性을 갖고 있는 Na 또는 Rf을 함께 넣는 選擇培地에 塗沫培養하여 나타나는 集落을 20개 任意選擇한다. 이들 集落의 菌은 供與菌의 *R plasmid*를 가지고 있는 被傳達菌임을 意味한다. 이들을 다시 broth에 培養한 다음 平板에 塗沫培養하여 나타나는 集落을 任意로 選擇하여 colony test를 하였다. 各各 供與菌만이 가지고 있는 耐性的 藥劑가 含有된 培地와 被傳達菌만이 가지고 있는 耐性藥劑가 含有된 培地에 接種培養하여 그들 藥劑에 對한 耐性有無를 본다. 全部 또는 大多數의 集落이 供有菌만이 耐性인 藥劑에 耐性이고 被傳達菌이 性耐인 藥劑에는 感受性일 때는 被傳達菌이 가지고 있던 *R plasmid*는 除去되고 供與菌의 *R plasmid*가 들어간 것으로 看做되어 이들 菌들이 各各 갖고 있는 *R plasmid*는 非適合性이라고 規定하였다. 이때는 供與菌과 被傳達菌을 反對로 바꾸어 實驗을 해도 그 結果는 同一함을 確認하였다²⁰.

Plasmid DNA의分離 및 電氣泳動: *plasmid* DNA의 分離는 SDS-lysozyme處理法에 依해 實施하였다^{28,29}. 任意로 選擇한 多劑耐性菌株의 *R plasmid*를 ML 1410과 RG 176에 傳達시킨 菌을 供試하고 對照群으로는 *plasmid*를 갖지 않는 ML 1410을 使用하였다. 30ml의 brain heart infusion broth에 菌을 接種하여 一晝夜 培養後 遠沈하여 菌을 收集하여 1.5ml의 tris-EDTA-sucrose buffer 溶液 (TES, 25% sucrose in 10mM tris, 1mM EDTA buffer)에 懸濁시킨後 0.2ml의 lysozyme溶液 (Sigma Co. 0.5mg/ml in 0.25M tris, pH 8.0)을 加하여 4°C에서 5分間 反應시킨 後 EDTA 0.4ml (0.25M, pH 8.0)를 加하여 再 次 4°C에서 5分間 放置하였다가 SDS를 最終濃度가 1%되게 加하여 菌이 安全히 溶解되게 한 다음 20 μ g의 ribonuclease (Sigma Co.)를 加하고 最終濃度가 1M이 되게 5M NaCl을 高粘度의 溶菌液에 加하여 4°C에 一晝夜 保存하였다가 17,000g로 30分間 冷却遠沈시켰다. 이때 細胞膜에 附着된 chromosomal DNA는 가라앉고 *plasmid* DNA만이 上層液에 남게 된다.

抽出된 *plasmid* DNA의 電氣泳動은 polyacrylamide gel 泳動法으로 實施하였다^{28,29,30}. 泳動의 支柱媒質은 TES buffer (0.05M tris, 0.005M EDTA, 0.05M NaCl)에 全體 gel 濃度가 4%가 되게 acrylamide와 bisacryl (Fluka製)를 녹인後 TEMED (Fluka製)를 最終濃度가 0.1%되게 加한 後, 역시 最終濃度가 0.1%되게 ammonium persulfate를 加하여 gel化 시켰다. 泳動은 vertical slab gel裝置를 使用하였고, 60mA, 120V에서 2時間 泳動시켰다. 泳動이 安了되면 ethidium bromide溶液 (Sigma Co, 0.4 μ g/ml) 15分間 染色하여 253.7nm의 短波長 紫外線 照明下에서 紅色의 螢光帶를 觀察하였다.

成 績

分離된 菌株들의 藥劑別 耐性頻度を 보면 第1表와 같이 Tc에 68.2%로 가장 높고 Sm(61.2%), Su (50%), Cm (40.9%), Ap (40.1%), Cb (39.3%)의 順으로 낮아지며 其他 藥劑에 耐性인 菌은 27.3% 以下였으며 Na, Gm 및 Ak에 耐性인 菌은 各各 4株 만이었고 Rf에 耐性인 菌은 없었다. 患者由來菌과 學生由來菌의 藥劑耐性頻度を 比較하여보면 Cm, Ap, Km, Cr 및 Cb의 5劑에 對한 耐性頻도는 患者由來菌에서 顯著히 높았고 (p<0.001), Sm, Su 및 Tp에도 患者由來菌의 耐性頻도가 有意하게 높았으나 (p<0.02), Tc에서는 別差異가 있었고 其他 藥劑에는 耐性菌株가 적어

Table 1. Isolation frequency of drug-resistant *E. coli*

Drug ^b	No. ^a of resistant strains (%) from :		
	Patients	Students	Total
Cm	63(52.0)	36(29.8)	99(40.9)
Tc	83(68.6)	82(67.8)	165(68.2)
Sm	86(71.1)	62(51.2)	148(61.2)
Su	70(57.9)	51(42.1)	121(50.0)
Na	3(2.5)	1(0.8)	4(1.7)
AP	67(55.4)	30(24.8)	97(40.1)
Km	41(33.9)	20(16.5)	61(25.2)
Gm	2(1.7)	2(1.7)	4(1.7)
Cr	53(43.8)	13(10.7)	66(27.3)
Rf	0	0	0
Ak	2(1.7)	2(1.7)	4(1.7)
Cb	66(54.5)	29(24.0)	95(39.3)
Tp	40(33.1)	26(21.4)	66(27.3)

^aOne hundred and twenty-one strains each isolated from patients and students, respectively, were tested, ^bAbbreviation: see text.

Table 2. Susceptibility patterns of *E. coli* strains

Drug Source ^a		No. of strains inhibited at MIC (μ g/ml):										
		>200	200	100	50	25	12.5	6.3	3.1	1.6	<1.6	
Cm	P	49	0	4	8	6	14	34	3	3		
	S	36	0	0	0	0	21	60	4	0		
Tc	P	13	37	32	3	0	1	26	6	3		
	S	1	30	50	1	0	2	32	0	5		
Sm	P	10	15	20	38	6	2	2	26	2		
	S	0	4	19	24	12	8	0	47	4	3	
Su	P	69	0	6	44	2						
	S	43	7	2	61	8						
Na	P				3	0	0	0	20	79	19	
	S				1	0	0	0	17	89	14	
Ap	P	57	1	0	9	1	6	19	7	21		
	S	28	0	1	0	0	0	35	13	44		
Km	P	40	0	0	0	10	1	46	24			
	S	17	0	2	0	12	7	50	27	6		
Gm	P						1	1	92	2	25	
	S						1	1	48	1	70	
Cr	P	4	15	12	22	5	24	37	1	1		
	S	0	0	3	10	12	38	58	0	0		
Rf	P					15	91	14	1	0		
	S					0	88	24	2	7		
Ak	P						2	0	2	83	34	
	S						0	2	1	5	113	
Cb	P	58	0	8	1	0	0	54				
	S	29	0	0	0	0	2	90				
Tp	P					17	1	15	5	1	82	
	S					21	0	0	1	1	98	

^aP, patient; S, student

Table 3. Antibacterial activity of drugs on *E. coli*

Drug	Source	MIC($\mu\text{g/ml}$) needed to inhibit:					
		MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	90% of strains	75% of strains	50% of strains	30% of strains	10% of strains
Cm	P	<1.6->100		>100	125	3.1	
	S			>100	3.1	—	
Tc	P	<1.6->100	>100	100	50	3.1	
	S		>100	100	50	3.1	
Sm	P	<1.6->200	200	100	50	25	3.1
	S		100	50	25	3.1	—
Su	P	12.5->1,600		>1,600	>1,600	50	
	S			>1,600	>1,600	50	
Na	P	0.8-50	3.1	1.6	—	—	0.8
	S		3.1	1.6	—	—	0.8
Ap	P	<1.6->100	>100	>100	25	3.1	<1.6
	S		>100	3.1	—	<1.6	—
Km	P	<1.6->100	>100	>100	3.1	—	
	S		100	12.5	6.3	3.1	
Gm	P	0.2->6.3	3.1	—	—	—	0.4
	S		3.1	—	0.4	0.2	—
Cr	P	<1.6->100	100	50	6.3	3.1	
	S		25	6.3	—	3.1	
Rf	P	1.6-2.5	25	12.5	—	—	6.3
	S		12.5	—	—	6.3	—
Ak	P	0.4-12.5	1.6	—	—	—	0.4
	S		0.8	—	—	—	0.4
Cb	P	6.3->400	>400	—	100	6.3	
	S		>400	12.5	—	—	
Tp	P	0.31->20	>20	10	0.31	<0.31	
	S		>20	0.31	—	—	

Table 4. Multiple drug resistance patterns of *E. coli*

No. of drugs multiply resistant	No. of strains (%) from:		
	Patients	Students	Total
10	2(1.7)	0	2(0.8)
9	28(23.1)	5(4.1)	33(13.6)
8	13(10.7)	16(13.2)	29(12.0)
7	6(5.0)	4(3.3)	10(4.1)
6	4(3.3)	0	4(1.7)
5	5(4.1)	3(2.5)	8(3.3)
4	10(8.3)	14(11.6)	24(9.9)
3	9(7.4)	2(1.7)	11(4.5)
2	7(5.8)	17(14.0)	24(9.9)
1	11(9.1)	28(23.1)	39(16.1)
0	26(21.5)	32(26.4)	58(24.0)
Total no. of resistant strains	95(78.5)	89(73.6)	184(76.0)
Grand total	121(100.0)	121(100.0)	242(100.0)

서 比較할 수 없었다(Table 1).

分離菌株에 對한 各藥劑의 MIC分布를 患者由來菌과 學生由來菌으로 나누어 比較하여 보면 Table 2와 같다. 大體의인 傾向을 보면 各藥劑의 濃度別 MIC의 分布가 고르지 않고 藥劑에 따라 MIC가 어떤 濃度를 中心으로 모이는 것을 알 수 있다. 感受성이 높은 菌들은 낮은 1~3段階의 MIC에 耐性菌은 높은 몇 段階의 MIC에 耐性이 있고 이러한 傾向은 Cm, Tc, Sm, Su, Na, Ap, Km, Cb 및 Tp에서 뚜렷히 나타나 感受性 菌株와 耐性菌株의 MIC에는 顯著한 差異가 있고 中間段階의 MIC를 가진 菌은 그 數가 적었다. Su의 境遇 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 濃度에 耐性인 菌들은 大部分이 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 以上에서 菌이 發育함으로 最終 MIC로 算出할 수 없었고 Cb에서도 같은 樣相을 보였다.

患者由來菌과 學生由來菌의 藥劑耐性樣相分布를 Table 2에서는 理解하기가 困難하므로 이를 다시 Table 3에 整理하였다. 90%, 75%, 50%, 30% 및 10%의 菌株의 發育을 抑制하는 MIC를 比較한바 Cm에서 50%의 菌의 MIC는 患者由來菌(12.5 $\mu\text{g/ml}$)과 學生由來菌(3.1 $\mu\text{g/ml}$)에서 큰 差異가 있었으나 75%의 菌의 MIC는 같았다. Sm에서는 90~50%의 菌에 對한 MIC가

Table 5. Original and transferred resistance patterns of *E. coli*

No. of drugs multiply resistant to	Resistance pattern	No. of strains	Resistance pattern transferred	No. of strains transferred resistance				
				ML 1410	RG 176			
10	CmTcSmSuNaApKmCrCbTp	2	SuApCb	1 ^a				
			SuAp	1 ^a				
9	CmTcSmSuNaApKmCrCb	1	SuAp	1 ^a				
9	CmTcSmSuApKmCrCbTp	30	CmTcApKmCrCbTp	5	1			
			TcSmSuApCrCb	0	1			
			TcSuApKmCbTp	0	2			
			SuApKmCrCbTp	4	2			
			SuApCrCb	17	8			
			ApCrCbTp	0	1			
			SuApCb	4	9			
			ApCrCb	0	2			
			ApCb	0	2			
			9	CmTcSmSuApKmCrAkCb	2	TcSmApKmCrCb	2	2
			8	CmTcSmSuApCrCbTp	5	TcSuApCrCb	1	0
						SuApCrCb	4	3
SuApCr	0	1						
SuApCb	0	1						
8	CmTcSmSuApKmCbTp	8	CmTcSmApKmCbTp	3	1			
			CmTcApKmCbTp	3	0			
			TcSuApKmCbTp	0	1			
			TcSuApKmCb	0	1			
			SuApKmCbTp	0	1			
			TcApKmCb	0	1			
			SuApKmCb	0	1			
			ApKmCbTp	2	0			
			SuApCb	0	1			
			8	CmTcSmSuApGmCrCb	1	None ^b	1	1
8	CmTcSuApKmCrCbTp	1	CmTcApKmCbTp	1	0			
			TcSuApKmCb	0	1			
8	CmTcSmSuApCrCbTp	1	SmSuApCrCbTp	1	1			

患者由來菌에서 學生由來菌에서 보다 1段階씩 높았고 Su에서는 亦是 患者由來菌 50%의 MIC가 學生由來菌 보다 越等히 높았다. Ap, Km, Cr 및 Tp에서는 75%의 患者由來菌의 MIC가 學生由來菌보다 顯著히 높았으며 Cb에서는 위와 같은 關係가 分明치 않다. Tc와 Na, Gm, Rf 및 Ak등에서는 耐性菌이 적은 탓인지 患者由來菌과 學生由來菌사이의 MIC의 差異는 볼 수 없었다.

Table 4는 藥劑耐性을 耐性藥劑數別로 分類한 것인

데 耐性菌의 頻度를 보면 患者由來菌이 95株(78.5%)였고 學生由來菌이 89株(73.6%)로서 有意한 差異가 있다고 볼 수 없으나 많은 藥劑에 耐性인 菌은 患者由來菌에서 學生由來菌에 比하여 훨씬 많았다. 即 4劑 以上에 耐性인 것은 患者由來菌에 68株(56.2%), 學生由來菌에 42株(34.7%)있어서 有意한 差(p<0.025)를 보였고 7劑 以上에 耐性인 菌도 患者由來菌이 49株(40.5%) 學生由來菌이 25株(20.7%)로 4劑 以上 耐性菌에서보다 더 큰 差異(p<0.001)를 보임으로써 多藥

Table 5. Continued.

No. of drugs multiply resistant to	Resistance pattern	No. of starins	Resistance pattern transferred	No. of strains transferred resistance	
				ML 1410	RG 176
8	CmTcSmSuApKmCrCb	13	TcSmSuApKmCrCb	2	3
			TcSmApKmCrCb	2	0
			SmSuApKmCrCb	0	1
			SuApKmCrCb	0	1
			ApKmCrCb	3	2
			SuApCb	0	1
			SuAp	5	3
			Ap	1	1
7	CmTcSmSuApCbTp	3	SuApCb	3	1
			ApCb	0	1
			Ap	0	1
7	TcSmSuApCrCbTp	2	TcSmSuApCrCbTp	2	2
7	CmTcSmSuApCrCb	4	CmTcSuApCrCb	0	1
			CmTcApCrCb	1	0
			SmSuApCrCb	1	0
			SmApCrCb	0	1
			SuAp	1	1
			Ap	1	0
			None	0	1
7	CmTcSmSuApKmCb	1	SuAp	1	1
6	CmTcSuApCbTp	1	SuAp	1	0
			None	0	1
6	TcSmSuApCbTp	1	SmSuApCbTp	1	1
6	CmTcSmSuApCb	1	None	1	1
6	TcSmSuApCrCb	1	SmSuApCrCb	0	1
			SmSuCrCb	1	0
5	CmTcSmSuTp	1	Cm	0	1
			None	1	0
5	TcSmSuKmGm	1	Su	1	1
5	CmTcSmApCb	5	None	5	5

劑 耐性化傾向은 患者由來菌에서 훨씬 높다고 하겠다.

특히 10劑 耐性菌은 學生由來菌에는 없었고 9劑 耐性菌은 患者由來菌에는 28株나 되었으나 學生由來菌에는 5株 뿐이었다.

2種 以上の 藥劑에 重復耐性인 分離菌 株의 耐性이 傳達性인가를 보기 위하여 分離菌株를 供與菌으로 하여 Na에 耐性인 것은 Rf 耐性 *E. coli* RG 488에의 傳達實驗을 하였고 Na에 感受性인 菌은 ML 1410과 RG 176에 耐性을 傳達시켜 耐性傳達與否와 被傳達菌의 而

性樣相을 보아 그 結果를 Table 5에 表示하였다. 總 145株의 多藥劑 耐性菌中 98株(67.8%)가 接合에 의하여 被傳達菌에 傳達됨으로 *R plasmid*를 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. 多劑耐性的 重復度가 클수록 *R plasmid* 保有菌이 많았으며 9劑 및 10劑에 耐性인 35株는 全部가 그 耐性을 傳達시켰으며 7劑와 8劑에 耐性인 39株中 38株(97.4%)가 傳達耐性株였으며 4劑, 5劑 및 6劑에 耐性인 36株에서는 19株(52.8%)가 *R plasmid*를 가지고 있었으나 2劑 및 3劑에 耐性인 菌株는 35株

Table 5. Continued

No. of drugs multiply resistance to	Resistance pattern	No. of strains	Resistance pattern transferred	No. of strains transferred resistance	
				ML 1140	RG 176
5	TcSuApKmCb	1	None	1	1
4	TcSmSuGm	1	None	1	1
4	TcSmSuTp	1	None	1	1
4	SmSuKmTp	1	None	1	1
4	CmTcSmSu	14	CmTc	1	1
			CmSu	0	1
			Cm	0	5
			Su	0	4
			None	13	3
4	CmTcApCb	1	None	1	1
4	TcSuApCb	2	SuAp	1	0
			Su	0	1
			None	1	1
4	TcNaKmGm	1	None		1 ^a
4	SmApCrCb	3	SmApCrCb	3	3
3	TcSmTp	1	None	1	1
3	CmTcSu	2	None	2	2
3	TcSmSu	4	TcSmSu	1	0
			SmSu	0	1
			None	3	3
3	TcSmAp	1	None	1	1
3	SmApCb	2	SmApCb	1	1
			Ap	1	1
3	CmTcCb	1	None	1	1
2	TcTp	1	None	1	1
2	SmSu	1	None	1	1
2	TcSm	17	None	17	17
2	TcSu	2	TcSu	1	0
			Su	0	2
			None	1	0
2	SuAk	1	Su	1	1
2	ApCb	1	Ap	1	0
			None	0	1
2	TcAk	1	None	1	1

^aNa-resistant strains were conjugated with Na-sensitive and Rf-resistant *E. coli* RG488, ^bNone: not transferred.

中 6株(17.1%)만이 傳達性耐性을 가지고 있었다.
本 實驗에서는 被傳達菌인 ML 1410과 RG 176을 同時
에 供試하여 耐性傳達實驗을 하였던바 Na에 耐性인 141

株中 ML 1410에는 84株(59.5%)가 傳達되었고 RG
176에는 95株(67.3%)가 傳達되어 그 菌株數에는 有意
한 差異 없으며 (t=1.756) 傳達되는 耐性樣相은 被傳達

Table 6. Distribution of transferable resistance of strains to drugs associated with *R plasmid*

Drugs	Total no. of resistance strains	No. of strains with transferable resistance (%)	Patient		Student	
			No. of resistant strains	No. of strains with transferable resistance (%)	No. of resistant strains	No. of strains with transferable resistance (%)
Cm	99	20 (20.2)	63	1 (1.6)	36	19 (52.8)
Tc	165	27 (16.4)	83	12 (14.5)	82	15 (18.3)
Sm	148	19 (12.8)	86	19 (22.1)	62	0
Su	121	84 (69.4)	70	58 (82.9)	51	26 (51.0)
Ap	97	81 (83.5)	67	55 (82.1)	30	26 (86.7)
Km	61	26 (42.6)	41	12 (29.3)	20	14 (70.0)
Cr	66	51 (77.3)	53	42 (79.2)	13	9 (69.2)
Cb	95	70 (73.7)	66	48 (72.7)	29	22 (75.9)
Tp	66	25 (37.9)	40	9 (22.5)	26	16 (61.5)

Table 7. Patterns of transferred resistance of strains and their distribution by patients and students

Transferred resistance pattern	No. of strains		
	Patient	Student	Total
Cm Tc Su Ap Km Cr Cb Tp	0	3	3
Cm Tc Su Ap Km Cb Tp	0	7	7
Cm Tc Ap Km Cr Cb Tp	0	2	2
Tc Sm Su Ap Km Cr Cb	4	0	4
Tc Sm Su Ap Cr Cb Tp	2	0	2
Cm Tc Su Ap Cr Cb	1	0	1
Tc Sm Su Ap Cr Cb	1	0	1
Tc Sm Ap Km Cr Cb	2	0	2
Sm Su Ap Cr Cb Tp	1	0	1
Su Ap Km Cr Cb Tp	3	0	3
Tc Su Ap Cr Cb	1	0	1
Sm Su Ap Cr Cb	1	0	1
Sm Su Ap Cb Tp	1	0	1
Su Ap Cr Cb Tp	1	0	1
Su Ap Km Cr Cb	1	0	1
Su Ap Km Cb Tp	0	2	2
Sm Su Cr Cb	1	0	1
Sm Ap Cr Cb	3	0	3
Su Ap Cr Cb	18	4	22
Ap Km Cr Cb	2	0	2
Cm Cb Tp	0	1	1
Tc Sm Su	1	0	1
Sm Ap Cb	1	0	1
Su Ap Cb	2	3	5
Cm Tc	0	1	1
Cm Su	0	1	1
Tc Su	0	1	1
Sm Su	1	0	1
Su Ap	5	4	9
Cm	0	4	4
Tc	0	1	1
Sm	1	0	1
Ap	2	2	4
Tp	0	1	1
Total	68	39	107

菌에 따라 다르게 나타난다 (Table 5).

藥劑別로 耐性菌株의 分布와 接合에 의하여 傳達되는 耐性株의 頻度를 보면 Table 6과 같이 總 242株中 Tc에 耐性인 것이 165株 (68.2%)로 가장 많으나 傳達性耐性株는 27株 (16.4%)로 다른 藥劑에 比하여 적었다. Cm 및 Sm에 耐性인 菌株에도 傳達性耐性株는 Tc에서와 같이 많지는 않았으나 Su, Ap, Cr 및 Cb에 耐性인 菌株中에는 傳達性인 耐性을 가진 것이 70~84%로 그 頻도가 높았고 Km과 Tp 耐性菌株에서는 傳達性耐性을 가진 것이 38~43%로 Su등에 比하여 多少 낮았다. 患者由來菌과 學生由來菌을 比較하여 보면 Cm, Km 및 Tp등에 耐性인 菌에 있어서는 學生由來菌에서 患者由來菌보다 傳達性耐性菌株의 比率이 越等히 높았으나 Sm, Su 및 Ap 耐性菌株들中에는 反對로 患者由來菌에서 傳達性耐性菌의 比率이 높았으며 Tc, Cr 및 Cb 耐性菌株에 있어서는 兩群菌間에 差異가 없었다.

以上の 藥劑耐性檢査와 耐性傳達實驗에서 各種의 傳達된 耐性樣相을 가진 菌 107株를 얻었는데 그 傳達된 耐性樣相과 菌株分布를 보면 Table 7과 같다. 107株中 學生由來株는 39株인데 比하여 患者由來菌은 68株로서 越等히 높았다 ($p < 0.001$).

이들 *E. coli*의 *R plasmid*는 腸系感染을 일으키는 *Shigella* 또는 *Salmonella*의 *R plasmid*와 關係가 있을 것으로 생각되기에 이들 *R plasmid*의 非適合性群決定을 試圖하였다. 于先 抗菌劑耐性樣相이 標準 *R plasmid*들과 다른 maker를 가지고 있는 P13 菌株의 *R plasmid*의 非適合性群을 決定하고자 먼저 豫備實驗으로 P13 *plasmid*를 18種의 標準 *R plasmid*에 接合傳達시켜 傳達頻도와 表面排除係數를 본 結果는 Table 8과 같다.

同一한 非適合性群에 屬하는 *R plasmid*는 同一菌體內에 共存하기 어려우니 表面排除係數가 크며 各各다 非適合性群의 *R plasmid*는 共存할 수 있으니 表面排除

Table 8. Surface exclusion between a plasmid in *E. coli* isolated (P13) and plasmids of incompatibility group

Incoming plasmid	Resident plasmid		Selecting marker	Donor cells	Trans conjugants	Transfer frequency*	Surface exclusion index
	Inc. group	Designation					
p13(ML 1410) ^c	A	RA1	Tp+Rf	184 × 10 ⁶ /ml	90 × 10 ² /ml	0.489 × 10 ⁻⁴ /ml	6.54
	C	R40a		126 × 10 ⁶ /ml	230 × 10 ² /ml	1.825 × 10 ⁻⁴ /ml	1.75
	FI	R386		150 × 10 ⁶ /ml	30 × 10 ² /ml	0.200 × 10 ⁻⁴ /ml	16.00
	FII	R1		80 × 10 ⁶ /ml	9 × 10 ² /ml	1.125 × 10 ⁻⁵ /ml	28.44
	FIV	R124		90 × 10 ⁶ /ml	8 × 10 ² /ml	0.888 × 10 ⁻⁵ /ml	36.03
	H1	3123		90 × 10 ⁶ /ml	60 × 10 ² /ml	0.666 × 10 ⁻⁴ /ml	4.80
	H2	R478		114 × 10 ⁶ /ml	230 × 10 ² /ml	2.017 × 10 ⁻⁴ /ml	1.58
	I α	R144		52 × 10 ⁶ /ml	160 × 10 ² /ml	3.076 × 10 ⁻⁴ /ml	1.04
	Iz	TP114		64 × 10 ⁶ /ml	100 × 10 ² /ml	1.562 × 10 ⁻⁴ /ml	2.04
	J	R391		164 × 10 ⁶ /ml	100 × 10 ² /ml	0.609 × 10 ⁻⁴ /ml	5.25
	K	R387		168 × 10 ⁶ /ml	250 × 10 ² /ml	1.488 × 10 ⁻⁴ /ml	2.15
	M	R446-b		160 × 10 ⁶ /ml	18 × 10 ² /ml	1.125 × 10 ⁻⁵ /ml	28.44
	N	RN3		108 × 10 ⁶ /ml	13 × 10 ² /ml	1.203 × 10 ⁻⁵ /ml	26.60
	O	R14		70 × 10 ⁶ /ml	10 × 10 ² /ml	1.428 × 10 ⁻⁵ /ml	22.40
	P	RP4		180 × 10 ⁶ /ml	50 × 10 ² /ml	0.277 × 10 ⁻⁴ /ml	11.55
	T	RtS1		164 × 10 ⁶ /ml	100 × 10 ² /ml	0.609 × 10 ⁻⁴ /ml	5.25
W	RS-a	300 × 10 ⁶ /ml	58 × 10 ² /ml	1.933 × 10 ⁻⁵ /ml	16.55		
	RG488(R-)		100 × 10 ⁶ /ml	320 × 10 ² /ml	3.2 × 10 ⁻⁴ /ml	1.00	

*Number of transconjugants per number of donor cells after 18 hours of incubation at 37°C.

^bDefined as the frequency of transfer of plasmid to a particular bacterial strain divided by the frequency of the plasmid under similar conditions to an R⁺ derivative of the same recipient strain.

^cResistant to Ap, Km, Cb, and Tp in a strain of *E. coli* isolated from patient was transferred to *E. coli* ML 1410(Na^r).

Table 9. Colony test for incompatibility between P13 plasmid and standard plasmids

Donor ^a	Recipient		Selection	No. of clones tested	Incoming plasmid only (Tp) ^b	Resident plasmid only (Km or Tc) ^b	Both (Tp+Km or Tp+Tc)								
	Inc. group	Designation													
P13(ML1410) Ap Km,Cb,Tp	FII	R1 (RG488)	Tp+Rf	20	20	0	0								
	(Cm, Tc, Sm, Ap, Km)														
	FIV	R124 (RG488)						Tp+Rf	20	20	20				
	(Tc)														
	M	R446-b (RG488)										Tp+Rf	20	20	20
	(Tc, Sm)														
N	RN3 (RG488)	Tp+Rf	20	20	20										
(Tc, Sm, Su)															
O	R14 (RG488)					Tp+Rf	20	20	20						
(Tc, Sm)															

^aPlasmid no. (host strain), makers, ^bSelecting drugs.

係數가 낮게 나타날 가능성이 있다. 이러한 理由에서 볼때 P13 plasmid는 FII, FIV, M, N 및 O에서 表面排除係數가 26.6~36으로 높이 나타나지만 其他 標準 R plasmid에서는 排除係數가 20以下로 比較的 낮은 편이었다. 따라서 P13 R plasmid는 FII, FIV, M, N 또는 O中的 어느 非適合性群에 屬하는 것으로 推測된다.

P13 plasmid의 非適合性群을 決定하기 위하여 Ap, Km, Cb 및 Tp에 耐性인 이 plasmid를 ML1410 (Na⁺)에 接合傳達시킨 다음, 이 plasmid 保有菌을 Rf의 RG 488에 옮겨 標準 plasmid FII, FIV, M, N 및 O 保有菌에 傳達시킨후 Rf 및 Tp含有培地에서 選擇하여 얻은 集落 20個를 任意로 選擇하여 colony test를 한바 그 結果는 Table 9와 같다. FII plasmid 保有菌에 P13 plasmid를 導入시켰을 때는 供與 plasmid 만이 證明되고 原來의 plasmid는 없어졌으니 이 R plasmid는 FII 非適合性群에 屬하는 것으로 判斷되었다. 또한 P13 plasmid를 FIV, M, N 및 O plasmid 保有菌에 接合시킨 다음 Tp와 Rf 含有培地에서 얻은 集落을 colony test에 의하여 檢査한바 이들 集落은 供與 및 原來의 R plasmid를 다 같이 가지고 있어서 P13 plasmid는 이들 plasmid와는 다른 群임을 알 수 있다.

任意로 選擇한 3株의 多藥劑耐性菌株의 R plasmid를 ML 1410과 RG 176에 傳達시킨 다음 이들을 SDS-lysozyme으로 處理한 것을 遠心하여 plasmid DNA를 分離하여 polyacrylamide gel electrophoresis에 의하여 2時間 泳動한 것을 ethidium bromide로 染色하여 紫外線照射下에 나타난 螢光帶를 관찰한바 Fig. 1과 같다. A, B 및 C는 ML 1410에 D, E 및 F는 RG 176에 傳達시킨 plasmid이고 G는 plasmid가 없는 ML1410을 處理하여 얻은 對照인바 plasmid 保有菌에

서 얻은 것에서는 plasmid라고 생각되는 螢光帶를 볼 수 있었다.

考 察

本 實驗의 結果를 보면 耐性菌의 頻度는 Tc에서 가장 높고 Sm, Su, Cm, Ap, Cb의 順 인바 本教室의 過去의 成績을 보면 1973년에는 Cm, Ap, Tc, Km, Sm의 順으로 낮았으며³¹⁾ 1977年 患者와 學生에서 分離한 *E. coli*의 耐性菌分布³²⁾는 本 成績과 比較的 같은 傾向을 보였으나 大體로 頻度가 낮았다. 1981年 大便에서 分離한 菌도 Cm, Ap, Cb, Km, Tp등에 40~25%가 耐性이 있는바³³⁾ Rf에 耐性菌이 없음은 本 實驗의 結果와 같다.

常用되는 Cm, Tc, Sm, Su 및 Ap등에 對한 耐性株는 抗菌劑를 投與받지 아니한 正常人에서는 1960~1970年初에는 平均 20% 內外였다고 報告되고 있으나³⁴⁻³⁷⁾, 本 實驗에서는 25~68%의 높은 耐性率을 볼 수 있어서 醫師의 處方없이 抗菌劑를 濫用하는 우리 現實에서는 耐性菌出現이 加速化되는 것으로 생각하여야 할 것이다. 特히 Tc에 對한 耐性菌의 頻度가 患者 由來菌과 學生由來菌사이의 差異가 없음은 이 藥品이 가벼운 感冒 같은 呼吸器疾患에 많이 使用되기 때문에 耐性화된 菌이 正常人에도 많이 있는 것으로 解釋된다.

抗菌劑投與中에 耐性菌이 急激히 增加되는 理由는 藥劑에 의한 選擇現象이라고 볼 수 있으나³⁸⁾ 本 實驗結果에서 보면 耐性菌과 感受性菌사이의 MIC의 差가 큰 選擇도 關係되겠지만 耐性이 R. plasmid에 의하여 傳達되어 있음을 暗示한다. Tc를 除外한 他 藥劑에 對한 耐性菌의 頻度는 大體로 患者由來菌에서 學生由來菌에서 보다 相當히 높게 나타났으며 이는 1977年의 成績³²⁾에 比하면 큰 差異가 없다.

1960年代에 分離한 *Shigella*나 *E. coli*에서는 Cm, Tc, Sm 및 Su의 4劑 耐性菌이 主였으나³⁹⁾ 1970年代에는 上記 抗菌劑와 더불어 Ap등의 5劑에 耐性인 것이 나타났으며^{37, 40, 41)}, Seol³²⁾의 報告에 의하면 Km에 耐性인 것도 나타난다고 하였으며 이러한 傾向은 外國에서도 示唆되었다^{42, 43)}. Seol³²⁾에 따르면 1977년에는 9.5%가 Km 耐性이었는데 本 實驗에서는 25.2%로 顯著히 增加되었고 Cm, Tc, Sm, Su, Ap 및 Km등에 同時에 耐性인 菌株가 많은데 現在는 여기에 Cb와 Tp에 耐性菌도 追加되고 있어서 多藥劑耐性的 抗菌劑數가 次次 增加함을 볼 수 있었다. 이러한 多藥劑耐性菌株數가 患者由來菌에서 學生由來菌보다 많은 Seol³²⁾의 報告에서도 볼 수 있었다.

Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of plasmid DNA of *E. coli* strains isolated.

多藥劑耐性일수록 接合에 의한 耐性頻도가 높음은 잘 알려져 있는바 本成績에서는 그 結果가 複雜하게 나타났다. 1970年代의 報告^{5,7,32,44}와 1978~1981년에 分離된 腸系菌의 *R plasmid*^{29,45}를 보면 被傳達菌에 따른 比較는 없었으나 Cm, Tc, Sm 및 Su가 같이 傳達됨으로서 plasmid上的 *R determinant*의 Locus가 隣接되어 있는 듯한 印象을 주었으나, 本成績에서는 Cm은 脫落되고 殘餘의 耐性이 傳達된 것이 많은 點이 特異하였다. Ap와 Km은 約 50%가 함께 傳達되었고 Cr와 Cb는 大部分이 같이 傳達되었다. *R plasmid*에 의한 傳達性耐性的 頻도는 1977年の 成績³²에 비해 Cm, Tc, Sm 및 Km은 현저히 낮아졌고 Su는 反對로 높아졌다.

本實驗의 主目的은 抗菌劑耐性的의 變動推移를 把握하고 *R plasmid*의 頻도를 알고자 하는데 있었으나 分離菌 *R plasmid*의 非適合性 群別도 試圖하였다. 이는 *R plasmid*의 由來를 把握함으로써 疫學的으로 重要한 意味가 있는 것이다^{18,19}. 耐性樣相이 非適合性檢査가 가능한 1菌株의 *R plasmid*를 群別한바 F II 群으로 밝혀졌다. 이는 最近 本敎室에서 報告한 多藥劑耐性的의 *Shigella*의 *R plasmid*와 同一한 非適合性群이었다는 點에서 意義가 있다고 하겠으나 多劑耐性인 全菌株의 *R plasmid*에 對하여 그群別을 試圖하여야 疫學的인 意義가 確實하여질 것이다.

Plasmid DNA의 抽出 및 確認은 여러가지 方法이 있으나 SDS-lyzosome處理法은 *E. coli* K12에 가장 普遍的으로 適用하는 方法이어서 本實驗에서 採擇하였다^{28,29}. DNA의 電氣泳動은 agarose를 利用하고 있으나^{28,29,50,51} 混濁도가 polyacrylamide보다 甚하고, molecular sieving effect가 있는 polyacrylamide는 未知의 分子量의 DNA를 確認하는데 便利하고 泳動帶의 解像力도 鮮明하기 때문에 本實驗에서는 polyacrylamide를 利用하였다³⁰. 結果는 8 watt의 2537Å의 紫外線燈을 使用했기 때문에 出力이 낮아서 많은 泳動帶를 볼 수 없었고 한箇만 觀察되었는바 詳細한 DNA의 泳動樣相을 알기 위하여는 높은 出力의 紫外線燈을 使用하여야 할 것 같다.

要 約

各種疾患으로 入院하여 抗菌劑投與를 받은 患者와 最近 1個月間 抗菌劑를 投與받지 않은 學生 各 60名의 大便을 培養하여 各各 121株, 合計 242株의 大腸菌을 얻어 13種의 抗菌劑에 대한 耐性樣相을 調査하였다.

耐性頻도를 보면 tetracycline에 對한 耐性菌이

68.2%로 가장 많았고 streptomycin (Sm) 61.2%, sulfisomidine (Su) 50%, chloramphenicol (Cm) 40.9%, ampicillin (Ap) 40.1%, carbenicillin (Cb) 39.3%의 順으로 耐性菌의 比率이 낮아졌고 kanamycin (Km) cephaloridine (Cr) 및 trimethoprim (Tp)에 耐性인 菌은 約 1/4이었고 nalidixic acid, gentamicin 및 amikacin에는 4株씩 만이 耐性이고 rifampicin에 耐性인 菌은 없었다.

患者由來菌과 學生由來菌을 比較하여 보면 Cm, Ap, Km, Cr 또는 Cb 耐性은 患者由來菌에서 學生由來菌보다 越等히 많았으며 Sm, Su 또는 Tp 耐性菌도 多少 많았으나 其他 抗菌劑에 對한 耐性菌에서는 差異를 볼 수 없었다. 耐性菌과 感受性菌에 對한 各 抗菌劑의 最少 發育阻止濃度에는 큰 差異가 있어서 이들 耐性이 주로 *R plasmid*에 由來함을 示唆하였다.

供試菌의 76%가 1~10劑 以上の 藥劑에 耐性이었는데 4劑 以上の 抗菌劑에 耐性인 菌은 患者由來菌에서 學生由來菌에서 보다 많았으며 多藥劑耐性일수록 患者由來菌에서 많았다.

2劑 以上の 抗菌劑에 耐性인 菌에 接合에 의한 耐性 傳達을 145株中 98株(67.5%)가 耐性을 傳達하였으며 7劑 以上에 耐性인 菌은 1株를 除外한 全部(73株)가 그 耐性을 被傳達菌에 傳達시켰고 多藥劑耐性的의 藥劑數가 적을수록 傳達性耐性을 가진 菌이 적었다. 傳達되는 耐性樣相은 耐性菌株에 따라 다르며 被傳達菌에 따라서도 달랐다.

任意로 選擇한 P13菌株의 *R plasmid*의 非適合性群을 보았던바, 이 plasmid는 F II 群에 屬함이 判明되었다.

Gel electrophoresis에 의하여 大腸菌 *R plasmid*의 DNA의 螢光帶를 證明할 수 있었다.

參 考 文 獻

- 1) Falkow, S.: *Infectious multiple drug resistance*. London, Pion, 1975.
- 2) Meynell, G.G.: *Bacterial plasmids: Conjugation, Colicinogeny, and transmissible drug-resistance*. MacMillan Press, London, 1974.
- 3) Smith, H.W. and Linggood, M.A.: *Transmissible nature of the genetic factor in Escherichia coli that controls enterotoxin production*. *J Gen. Microbiol.* 52: 319-34, 1968.
- 4) Smith, H.W. and Halls, S.: *The transmissible nature of the genetic factor in Escherichia*

- coli* that controls haemolysin production. *J. Gen. Microbiol.* 47 : 153-61, 1967.
- 5) Pitt, J. and Helmstetter C.E.: Naturally occurring R-lactose factor. *Bact. Proc. Gp.* 76, 1970.
 - 6) Chun, D., Seol, S.Y., Cho, D.T. and Tak, R.: 1977. Drug resistant and R plasmids in *Salmonella typhi* isolated in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11 : 207-213, 1977.
 - 7) Chun, D. and Seol, S.Y.: Drug resistance and R plasmids of *Salmonella* and *Shigella* in Korea. *Trop. Med.* 20 : 123-129, 1978.
 - 8) 趙東澤 : 大邱地方에서分離한 *Salmonella*의 菌型 및 抗菌劑耐性(1973~1980), 慶北醫大雜誌 21 : 522-526, 1980.
 - 9) Anderson, J.D.: The problem and implication of chloramphenicol resistance in the typhoid bacillus. *J. Hyg. Camb.*, 74-289-299, 1974.
 - 10) Olarte, J. and Galindo, E.: *Salmonella typhi* resistant to chloramphenicol, ampicillin, and other antimicrobial agents: Strains isolated during an extensive typhoid fever epidemics in Mexico. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 4 : 597-601, 1973.
 - 11) Datta, N. and Olarte, J.: R factors in strains of *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae* I isolated during epidemics in Mexico: Classification by compatibility. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 5 : 310-317, 1974.
 - 12) 全燕基, 薛盛用 : 痢疾菌 및 살모넬라의 藥劑耐性, 耐性化防止 및 除去, 大韓微生物學會誌 14 : 27-37, 1979.
 - 13) Novick, R.P.: Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 33 : 210-235, 1969.
 - 14) Watanabe, T., Ogata, C. and Sato, S.: Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. VIII. Six drug-resistance R factor. *J. Bacteriol.* 88 : 922-928, 1964.
 - 15) Meynell, E., Meynell, G.G. and Datta, N.: Phylogenetic relationships of drug resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. *Bacteriol. Rev.* 32 : 55-83, 1968.
 - 16) Grindley, N.D.F., Grindley, J.N. and Anderson, E.S.: R factor compatibility group. *Molec. gen. Genetics.* 119 : 287-297, 1972.
 - 17) Uhlin, B.E. and Nordström, K.: Plasmid incompatibility and control of replication: copy mutants of the R factor R_1 in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 124 : 641-649, 1975.
 - 18) Novick, R.P., Clowes, R.C., Cohen, S.N., Curtiss, R. III, Datta, N. and Falkow, S.: Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.* 40.
 - 19) Hedges, R.W., Datta, N., Kontomichalou, P. and Smith, J.T.: Molecular Specificities of R factor-determined Beta-lactamases: correlation with plasmid compatibility. *J. Bacteriol.* 117 : 56-62, 1974.
 - 20) 曹圭弘, 薛盛用, 全燕基 : *Shigella* R plasmid의 incompatibility에 의한 分類, 慶北醫大雜誌 22 : 221-230, 1981.
 - 21) 徐民漢 : *Salmonella typhi*의 R plasmid의 非適合性, 慶北醫大雜誌 22 : 356-361, 1981.
 - 22) MacLowry, J.D., Jaqua, M.J., and Selepak, T.: Detailed methodology and implementation of a semi-automated serial dilution microtechnique for antimicrobial susceptibility testing. *Appl. Microbiol.* 20 : 46-53, 1970.
 - 23) Marks, M.I., Kazemi, M. and Mackey, E.: In vitro sensitivity of *Salmonella* to ten antimicrobial agents including sulfamethoxazole and trimethoprim, alone and in combination. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4 : 555-559, 1973.
 - 24) Williams, R.B. and Ewing, W.H.: The susceptibility of *Shigella* and *Escherichia* to antimicrobial agents. Communicable Disease Center, Atlanta, U.S.A., 1964.
 - 25) Steers, E., Flotz, F.L. and Graves, B.S.: Inocular replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. Chemother.* 9 : 307-311, 1959.
 - 26) Taylor, D.E. and Grant, R.B.: Incompatibility and surface exclusion of H_1 and H_2 plasmids. *J. Bacteriol.* 131 : 174-178, 1977.
 - 27) Taylor, D.E. and Grant, R.B.: Incompatibility and bacteriophage inhibition properties of N-1, a plasmid belonging to the H incompatibility group. *Molec. gen. Genet.* 153 : 5-10, 1977.
 - 28) Guerry, P., LeBlance, D.J. and Falkow, S.:

- General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol.* 116 : 1064—1066, 1973.
- 29) Crosa, J.H. and Stanley Falkow.: *Plasmid, in Manual of methods for general bacteriology. Amer. Soc. Microbiol. Washington, 1981.*
- 30) Shuster, L.: *Preparative acrylamide gel-electrophoresis: continuous and disc technique. Method Enzymol.* 22 : 412—433, 1978.
- 31) 金炳祐, 徐城鐸, 全燾基: 尿路系 및 腸系病原細菌의 各種 抗菌劑에 對한 感受性. *中央醫學* 25 : 165—175, 1973.
- 32) Seol, S.Y.: *Drug resistance and R plasmids of Escherichia coli in patients and healthy individuals in Korea. J. Korean. Society Microbiol.* 22 : 11—18, 1977.
- 33) 金龍卓, 趙東澤: 病原材料에서 分離한 菌의 分布 및 藥劑耐性. *慶北醫大雜誌* 22 : 362—368, 1981.
- 34) Guinée, P., Ugeto, N. and Van Leewen, N.: *Escherichia coli with resistance factors in vegetarians, babies, and nonvegetarians. Appl. Microbiol.* 20 : 531—535, 1970.
- 35) Lewis, M.J.: *Transferable drug resistance and other transferable agents in Strains of Escherichia coli from two human populations. Lancet* 1 : 1389—1393, 1968.
- 36) Linton, K.B., Lee, P.A., Richmond, M.H., Gillespie, W.A., Rowland, A.J. and Baker, V.N.: *Antibiotic resistance and transmissible R factors in the intestinal coliform flora of healthy adults and children in an urban and rural community. J. Hyg.* 770 : 99—104, 1972.
- 37) Mitsunashi, S.: *Review; R factors. J. Infect. Dis.* 119 : 89—100, 1969.
- 38) Hardy, K.: *Bacterial plasmids. Thomas Nelson and Sons LTD. R plasmids pp. 50—74, 1981*
- 39) Akiba, T., Koyama, T., Ishiki, T., Kimura, S. and Fukushima, T.: *Studies on the mechanism of development of multiply drug-resistant Shigella Strains. (in Japanese) Nihon Iji Shimpo* 1886 : 45—50, 1960.
- 40) Hashimoto, H., Tanaka, T. and Mitsunashi, S.: *Genetic structure of an R factor conferring ampicillin resistance. Jpn. J. Microbiol.* 17 : 331—337, 1973.
- 41) Tanaka, T., Hashimoto, H. and Mitsunashi, S.: *Ampicillin resistant R factors derived from Shigella strains. Jpn. J. Microbiol.* 17 : 323—330, 1973.
- 42) Camiolo, S.M., Beck, M.E. and Reynard, A.M.: *Tetracycline resistance in Escherichia coli isolated from hospital patients. Antimicrob. Agents Chemother.* 8 : 488—494, 1975.
- 43) Garbow, W.O.K. and Prozesky, O.W.: *Drug resistance of coliform bacteria in hospital and city sewage. Antimicrob. Agents Chemother.* 3 : 175—180, 1973.
- 44) 朴文在, 全燾基: 1977年 大邱에서 分離한 *Salmonella* 및 *Shigella*의 抗菌劑感受性, *大韓微生物學會誌* 13 : 31—36, 1978.
- 45) Chun, D., Seol, S.Y. and Suh, M.H.: *Transferable resistance to trimethoprim in Shigella. J. Infect. Dis.* 143 : 742, 1981.
- 46) 趙晟龍, 薛盛用, 全燾基: 痢疾 A 群菌의 R plasmid의 非適合性, *慶北醫大雜誌* 22 : 145—154, 1981.
- 47) Jacob, F., Brenner, S. and Cuzin, F.: *On the regulation of DNA replication in bacteria, Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology* 28 : 329—348, 1963.
- 48) Bedbrook, J.R., Lehrach, H. and Ausubel, F.M.: *Directive segregation is the basis of Col E₁ plasmid incompatibility. Nature* 281 : 447—452, 1979.
- 49) Pritchard, R.: *Control of DNA replication in bacteria. In: DNA Synthesis, pp. 1—29, Edited by I. Molineux and M. Kohiyama. Plenum, New York, 1978.*
- 50) Mayers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P. and Falkow, S.: *Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol.* 127 : 1529—1537, 1976.
- 51) Kado, C.I. and Liu, S.T.: *Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol.* 145 : 1365—1373, 1981.