

Shigella균속의 항균제내성, 전달성 R-plasmid 및 제거에 관한 연구

단국대학교 이공대학 미생물학과

홍성노·이연태

= Abstract =

The R-Plasmid Transfer and Elimination of *Shigella* Cultures

Sung Ro Hong and Yun Tai Lee

Department of Microbiology, Sciences and Engineering, Dan Kook University, Korea

On hundred and forty stains of *shigella* cultures isolated from the twelve hygiene laboratories of cities and provincial general hospital laboratories in 1983 were tested for their resistance to thirteen antimicrobial drugs and their R-plasmid transfer.

Antimicrobial drugs were used amikacin, ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, rifampicin, streptomycin, tetracycline, tobramycin, cefoperazone and piperacillin.

All strains were resistant to one or more of thirteen antimicrobial drugs but 94.3% were susceptible to amikacin, gentamicin and tobramycin of total isolated.

The most strains commonly found resistance was to chloramphenicol (94%) followed by streptomycin (93%), tetracycline (92%) piperacillin (90%) ampicillin (83%), cefoperazone (42%), nalidixic acid (14%), cephalothin (17%), rifampicin (22%) and kanamycin (6%), sixty percent of strains among 140 were resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, tetracycline at the same time.

The transfer of drug resistance by conjugation was tested and ninety four strains (94.3%) were resistant to one or more drugs were found to transfer their drug resistance of *E. coli*.

percentage of transfer frequency by conjugation was one strains (54%), the transfer frequency of drug resistance varied by donor strains and recipients, but not by selecting drugs. Resistance to nalidixic acid was not transferred by conjugation to recipients.

Percentage of plasmid curing after the treatment of acriflavine, acridine orange was about 8%.

Among strains cured two strains were tested compare original strains with them in biochemical properties in arginine dihydrolase and arabinose fermentation reaction.

It was found to growth curves of No. 2 *shigella flexneri*, serotype 1b, and its derivatives cured with acriflavine in Müller Hinton broth medium(pH 7.4, 38°C) by temperature Gradient Biophoto Recorder TN-1120 (Tokyo, Japan).

서 론

수인성 전염병중의 하나인 세균성 이질은 우리나라에서는 4계절을 통하여 빈번하게 발생하고 있으며 여름에 특히 많이 발생하며 풍토병적인 성격을 띠우고 있다¹⁾.

대장균군, 이질균속, *Salmonella*균속, 페렴간균, 녹농균 및 콜레라균등 주로 gram 음성 장내 병원성간

균은 현재 상용되는 항균제에 내성을 갖고 있기 때문에²⁾ 반드시 항균제 검사에 의한 의사의 처방에 의해 적절한 항균제가 선택 투여되어야 하나 현재 항균제를 쉽게 복용할 수 있어 항균제 내성균의 출현이 급증하고 있을 뿐만 아니라, 내성균이 다약제 내성화 되고 있는 실정이다³⁻⁵⁾.

이와 같은 다약제 내성균은 1950년대 일본에서 다약제 내성 *Shigella*균주가 최초로 보고되었고⁶⁾, 이 약제내성은 streptomycin(Sm), tetracycline(Te),

sulfonamide에 다약제 내성을 띠고 있었다^{11, 13, 17, 21}.

다약제 내성전달은 1959년 *Shigella*와 *E. coli*의 혼합 배양으로 cell-to-cell contact로¹¹ 직접 다약제 내성이 *E. coli* 혹은 *Salmonella*, *Cholera*, *Pseudomonas* 등으로^{14, 16} 전달된다고 하였다. 이와 같은 R-plasmid는 역학적, 유전학적, 분자생물학적 및 생화학적 특성에 관하여 많은 연구가 행하여져서 R-plasmid는 자율적으로 복제되는 세균의 염색체의 DNA(extrachromosomal)입자로서 covalently closed circular super coiled form으로 존재하며^{16, 17} 약제 내성뿐만 아니라 hemolysin 또는 enterotoxin 생성에도 관여함이 알려지게 되었다^{16, 20}.

Watanabe와 Davis 등의^{21, 22} 보고처럼 장내세균의 약제내성 및 금속이온의 내성의 성질을 지배하는 집합성 R-plasmid는 resistant determinant와 resistant transfer factor의 두가지 인자로 세포질내 유전인자로서 집합에 의해 장내의 다약제 내성균주로부터 장내에 들어온 병원성 세균에 R-plasmid가 전달되어 세균의 다약제 내성화의 가능성 또는 내성균의 장내침입으로 인해 다약제에 대한 내성화가 이루어진다.

1957년 Hirota 등은²³ 일종의 plasmid인 fertility factor(F) 보유균인 *E. coli* K-12 F⁺가 acriflavine 존재하에서 F⁻ 인균으로 전환되는 것을 관찰한 후 인공적으로 plasmid 제거의 가능성을 최초로 시사하였으며 그는 이러한 현상이 acriflavine에 의해 세균으로부터 F의 상실에 의한 결과라고 주장하였다.

Hirota 등의²³ 보고이후 화학물질을 이용하여 약제내성균주로부터 R-plasmid를 제거하여 약제내성균주를 약제감수성 균주로 전환시켜 세균 감염증 환자의 치료에 혁신에 가져오려는 노력이 많은 학자들에 의해 행해져 왔다. Watanabe 등과²⁴ Mitsubashi 등은²⁵ acriflavine을 이용하여 대장균과 이질균에서 R-Plasmid 제거에 성공하였으며, acriflavine과 같은 acridine orange 및 chloroquine 등과²⁶ 그와 sodium dodecyl sulfate^{27, 28}, rifampin, nalidixic acid 및^{29, 30} novobiocine 등의³¹ 약제를 이용하여 어느 정도 R-plasmid를 제거하는데 성공하였다.

본 실험에서는 항균제 내성화 방지 및 올바른 항균제를 사용할 수 있는 기초자료를 얻기 위한 목적으로 이질균을 대상으로 항균제 감수성 정도를 실시하여 이질균속의 항균제에 대한 내성정도, 내성양상, 내성의 전달성 등을 알아 보았고, curing compound와 항균제를 이용하여 시험관내에서 R-plasmid의 제거빈도도 알아 보았다.

재료 및 방법

1. 사용균주

1983년도 1월부터 12월사이 전국 각지의 보건 연구소와 시내 종합병원임상병리과에서 수집한 *Shigella* 균속을 Edward and Ewing(1972)의³² 방법에 따라 확인 동정하여 MacConkey 한천평판배지에 보관하면서 이중 총 140균주를 실험대상균주로 사용하였다.

2. 배지 및 항균제

증균배지로는 Müller Hinton broth(M-H broth, Difco)를 항생제 감수성 검사용배지로 Müller-Hinton agar(M-H agar, Difco)를 사용하였으며 혼합 실험용 배지로는 주로 Müller Hinton broth를 사용하였다.

실험에 사용된 항균제는 WHO 표준품을 국립보건연구원 약품부 항생물질과에서 분양받은 것으로 amikacin(AK)을 포함하여 13종류의 항생제로 ampicillin(Am), cephalothin(Cf), chloramphenicol(C), cefoperazone(Ce), gentamicin(G), piperacilline(Pc), rifampicin(Rf), streptomycin(Sm), tetracycline(Te), tobramycin(To), kanamycin(K), nalidixic acid(NA) 등이다.

각 항균제는 알맞은 용매에 녹여 영하 20°C에 동결보존하였고 사용시에 멸균 증류수로 필요한 농도까지 희석해서 사용하였다.

이에 대한 조제방법은 Edwin(1980)³³과 Lorian(1980)³⁴의 법을 인용하였다.

3. 항균제 내성실험

내성실험은 한천평판희석법으로 실시하였으며³¹⁻³⁴ 배지는 Müller Hinton agar를 사용하였다.

항균제는 2배수로 순차적으로 희석하여 배지에 포함시켜서 만든 한천평판배지는 4°C냉장고에 보관하면서 48시간내에 모두 사용하였다.

각 항균제가 배지에 항균제 농도를 확인하기 위하여 사용할 때마다 표준균속 *E. coli* ATCC25922을 사용하여 농도를 확인하였다.

37°C에서 Müller Hinton broth에 18시간 배양한 균을 내경 3mm백금이로 항균제가 농도별로 희석되어진 Müller Hinton agar에 접종하여 37°C에서 하룻밤을 배양한 후 접종한 부분의 발육을 육안으로 관찰하여 최소 발육억제농도(MIC)를 결정하였다.

나타난 MIC가 Table 1의^{31, 33} 농도보다 높은 경우에 내성균으로 판정하였다.

4. 내성전달실험

공시균주에 대한 항균제 내성검사 결과 1제 또는 그 이상의 약제에 내성을 나타난 균주를 donor 균으로 사용하였으며 *E. coli* ML1410, RG176, RG488은 recipient균으로 사용하였다.

이중 *E. coli* ML1410, RG176은 nalidixic acid에 내성을, *E. coli* RG488은 rifampicin에 내성을 지니고 있다.

Donor균과 recipient균을 각각 Müller-Hinton broth에서 18시간 배양시킨 후 그 균액 0.1ml를 5ml Müller Hinton broth에 접종하여 37°C에서 3~4시간 진탕배양하였다⁶⁾.

배양한 donor균과 recipient균을 1:4로 잘 혼합하여 37°C에서 18시간 배양한 다음 내성을 전달받은 것을 확인하기 위하여 이혼합배양액 0.1ml을 항균제가 든 선택배지에 접종도말하여 37°C에서 18시간 배양시킨 다음 균이 발육했으면 donor균주 R-plasmid가 recipient균주로 전달한 것으로 판정했다⁹⁾.

이때 donor균과 recipient균을 같은 조건하에서 배양하여 선택배지에 접종, 자연돌연변이의 발현여부 및 선택배지의 항균제 농도를 확인하였다.

선택배지는 Müller Hinton agar에 64µg/ml의 nalidixic acid와 항균제에 내성을 가진 항균제의 농도 64µg/ml을 혼합하여 사용하였다.

내성을 전달받은 균으로 보고 임의로 선택한 몇 개의 집락을 MacConkey 한천평판배지에 분리배양하여 다시 *E. coli*임을 확인한 후 항생제 디스크 확산법으로 내성전달을 확인하였다.

5. 내성 전달 빈도실험

Ten fold dilution한 donor와 recipient균의 혼합배양액 0.1ml를 nalidixic acid 64µg/ml이 함유된 MacConkey 한천평판배지에 접종하여 37°C에서 24~48시간 배양한 후 나타난 집락을 관찰하여 혼합배양액내의 recipient의 총수를 계산한 후 다음의 식에 의하여 내성전달 빈도를 산출하였다.

$$\text{Percentage of transfer frequency} = \frac{\text{No. of transconjugate cell}}{\text{Total No. of recipient cell in mixture culture}} \times 100$$

6. R-plasmid 제거실험

약제 처리에 의한 R-plasmid제거의 실험은 Watanabe 및 Fukasawa의¹⁰⁾ 방법에 준하여 실시하였다.

Table 1. Criteria of resistant strains expressed by MIC (mcg/ml)

Antimicrobials	Resistant
Amikacin	≥32
Ampicillin	≥32
Cefoperazone	≥32
Cephalothin	≥32
Chloramphenicol	≥25
Gentamicin	≥16
Kanamycin	≥25
Nalidixic Acid	≥32
Piperacillin	≥32
Rifampicin	≥32
Streptomycin	≥15
Tetracycline	≥12
Tobramycin	≥16

즉 *Shigella* 2(Am^r, Cm^r, Sm^r, Te^r, Nal^r), *Shigella* 30(Am^r, Sm^r, Te^r, K^r)과 같은 내성을 가진 2균주를 선택하여 Müller Hinton broth 5ml에 접종하여 18시간 배양 후 Müller Hinton broth(pH7.4)에 acridin2 orange 10µg/ml과 acriflavine 2.5µg/ml 농도로 넣어 시험관에 시험균주를 1×10⁴CFU/1되게 접종하여 37°C에서 24, 48, 72시간 배양하였다.

그후 curing compound의 subinhibitory 농도에서 증식한 균액을 50~200개의 집락이 형성되도록 멸균생리 식염수로 적당히 희석한 균액 0.1ml을 MacConkey 한천평판배지에 접종하여 37°C에서 12~24시간 배양하였다.

이때 형성된 집락을 항생제 감수성검사에 사용했던 동일한 농도의 항생제가 첨가된 Müller Hinton agar에 replica method를 이용하여 옮긴 후 37°C에 10~18시간 배양하여 나타난 집락수를 관찰하여 다음의 식에 의하여 R-plasmid 제거빈도를 구하였다.

$$\text{Percent elimination} = \frac{\text{No. of antibiotic sensitive colonies}}{\text{No. of colonies tested}} \times 100$$

이때 대조로 curing compound가 첨가되지 않은 Müller Hinton broth에 증균시킨 각 균주를 같은 조건하에서 처리하여 자연발생적인 R-plasmid의 소실현상(spontaneous loss)을 관찰하였다.

7. 생물 및 생화학적 특성실험

curing compounds로 처리하여 제거된 일부 균주

Table 2. Drugs susceptibility patterns of *Shigella*

Drugs	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	0.25	0.5	1	2	1	8	16	32	64	64	128	256	≥ 256	512	1024	≥ 1024
Amikacin	No. of strains			1		6	109	23	1								
	Percentage			1		4	78	16	1								
	Cumulative %			1		5	83	99	100								
Ampicillin	No. of strains				2	8	5	7	1						1	8	108
	Percentage				1	6	4	5	1						1	6	76
	Cumulative %				1	7	11	16	17						18	24	100
Cephalothin	No. of strains				1		3	47	64	14		5	1		3		
	Percentage				1		2	34	46	10		4	1		2		
	Cumulative %				1		3	37	83	93		97	98		100		
Cefoperazone	No. of strains	8	22	16		5		7	33	18	41						
	Percentage	6	16	11		4		45	16	13	29						
	Cumulative %	6	22	33		37		42	58	71	100						
Chloramphenicol	No. of strains				6	2	1					19	58		33	21	
	Percentage				4	1	1					14	41		24	15	
	Cumulative %				4	5	6					20	61		85	100	
Gentamicin	No. of strains			37	73	30											
	Percentage			26	53	21											
	Cumulative %			26	79	100											
Kanamycin	No. of strains					2	124	6							8		
	Percentage					1	90	94							6		
	Cumulative %					1	90	94							100		
Nalidixic acid	No. of strains			64	40	17	2		1			2	17				
	Percentage			44	29	12	1		1			1	12				
	Cumulative %			44	73	85	86		87			88	100				
Piperacillin	No. of strains			4	6	4				2	124						
	Percentage			3	4	3				1	89						
	Cumulative %			3	7	10				11	100						
Rifampicin	No. of strains					2	46	52	9	29					2		
	Percentage					1	33	38	6	21					1		
	Cumulative %					1	34	72	78	99					100		
Streptomycin	No. of strains			1	3	5	4	4			18				13	30	62
	Percentage			1	2	4	3	3			13				9	21	44
	Cumulative %			1	3	7	10	13			26				35	55	100
Tetracycline	No. of strains			6	4	1		1	2		6	120					
	Percentage			4	3	1		1	1		4	86					
	Cumulative %			4	7	8		9	10		14	100					
Tobramycin	No. of strains		1	60	62	17											
	Percentage		1	43	44	12											
	Cumulative %		1	44	88	100											

에 대한 생물, 생화학적 특성 변이를 조사하였으며 R-plasmid를 전달받은 *E. coli*가 어떤 생물학적 특성변화가 있는지를 조사하였으며 Temperature Gradient Bio-photo Recorder TN-1120(Toyo, Japan)을 이용하여 성장곡선을 조사하였다.

성 적

Amikacin은 $32\mu\text{g/ml}$ 에서 gentamicin은 $4\mu\text{g/ml}$ 에서 tobramycin은 $8\mu\text{g/ml}$ 에서 모두 감수성을 보였다.

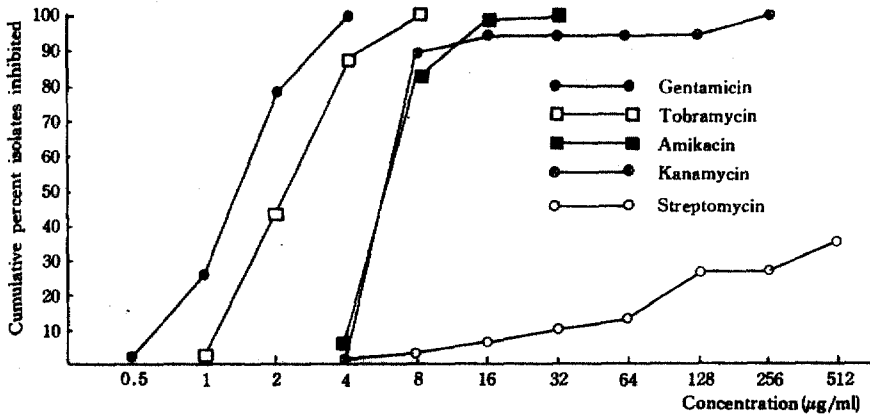


Fig. 1. Curvilinear nature of dose response curves with aminoglycoside type antimicrobial agents, tested over a wide range of concentration.

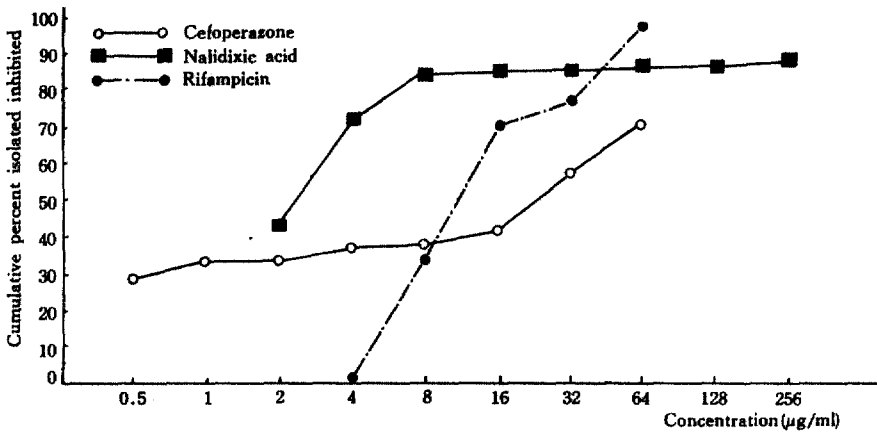


Fig. 2. Curvilinear nature dose response curves with three different antimicrobial agents, tested over a wide range of concentration.

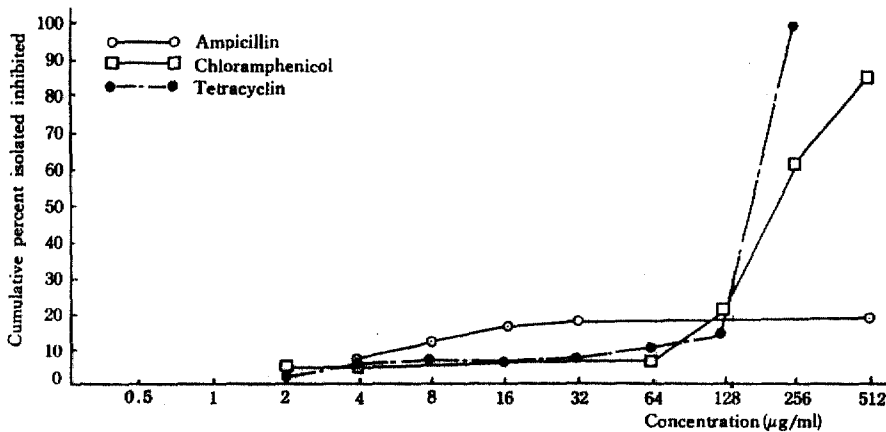


Fig. 3. Curvilinear nature dose response curves with three different antimicrobial agents, tested over a wide range of concentration.

Table 3. Drug resistance patterns of *Shigella*

No. of drugs multiply resistant to	Resistance pattern	No. of strains
8	Am C CF Ce K PC Sm Te#	1
	Am C CF NA PC Sm Te	8
7	Am C CF CE PC Rf Sm Te	1
	Am C Ce K PC Sm Te	4
	Am C Ce NA PC Sm Te	8
	Am C Ce PC Rf Sm Te	3
	Am C Ce CF PC Sm Te	23
6	Am C CF NA PC Sm Te	2
	Am C Ce PC Sm Te	39
	Am C Ce K PC Sm	1
	Am C CF PC Sm Te	1
	Am C K PC Sm Te	2
	Am C NA PC Sm Te	2
	Am C PC Rf Sm Te	3
	Am Ce CF PC Sm Te	1
	Am C CF Sm Te	1
	Am C PC Rf St	1
5	Am C PC Sm Te	15
	C CE PC Sm Te	3
	Am C Sm Te	1
4	C PC Sm Te	2
	Am Ce PC	1
3	C Sm Te	6
	Ce CF PC	1
	C PC	1
2	C Sm	2
	C Te	1
	Ce PC	1
	C	1
1	PC	2
	Sm	2

#Am, Ampicillin; C, Chloramphenicol; Cf, Cephalothin; Ce, Cefoperazone; D, Kanamycin; NA, Nalidixic acid; Pc, Piperacilline; Rf, Rifampicin; Sm, Streptomycin; Te, Tetracycline

Kanamycin은 8 μ g/ml에서 90% 감수성을, rifampicin은 16 μ g/ml에서 72%의 감수성을, cefoperazone은 32 μ g/ml에서 58%의 감수성을 보인 반면, ampicillin은 1,024 μ g/ml에서도 MIC₅₀에 미달되었으며 chloramphenicol은 94%가 내성을, tetracycline은 128 μ g/ml에서 전체 14%만이 감수성을 나타내었다.

Nalidixic acid MIC₅₀은 2~4 μ g/ml에서 나타난 반면 streptomycin MIC₅₀은 1,024 μ g/ml의 높은 농

도에서 나타났다.

본 실험에서 13가지 항균제에 대한 MIC 실험 결과는 Table 2 과 같다.

이들에 대한 MIC 백분율 성적을 도표로 나타낸 것은 Fig. 1, 2, 3 과 같다.

Fig. 1은 aminoglycoside계통을 모은 것으로 streptomycin만이 높은 내성을 나타내었으며 Fig. 2에 서는 nalidixic acid, cefoperazone 및 rifampicin이 비교적 높은 감수성을 나타내었다.

Fig. 3은 ampicillin, chloramphenicol 및 tetracycline은 높은 내성을 나타내었다.

각 항균제에 대한 내성 패턴을 보면 Am, C, Ce, Pc, Sm, Te 등의 6제내성인 균주가 전체의 27.9%를 나타내는 39균주로 가장 많으며, 다음이 Am, C, Ce, Cf, Pc, Sm, Te 7제내성을 나타내는 균주가 16.4%인 23균주로 나왔다.

전 균주가 한가지 이상의 항균제에 내성을 가지는 것으로 나타났다(Table 3).

항균제 내성을 수량별로 보면 단제 내성이 4%, 2제내성이 4%로 낮게 나타났으며 6제내성은 35%, 7제내성이 29% 및 8제내성이 7%로 나타났다(Fig. 4).

이질균 내성이 *E. coli*로 전달되는 내성전달패턴을 보면 Table 4와 같다.

이 내성전달실험대상은 Am, C, Sm 및 Te에 내

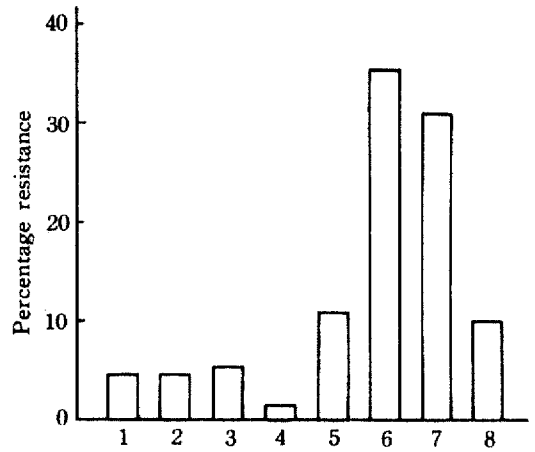


Fig. 4. Resistance pattern to some combination of thirteen antimicrobial agents.

Table 4. Original and transferred drugs resistance pattern of *E. coli*

No. of drugs* multiply	Resistance pattern	No. of strains	Resistance patterns transferred	No. of strains transferred resistance
5	AM C K Sm Te	8	Am C K Sm Te	2
			AM C K Te	1
			AM C Sm Te	3
			AM C Sm	1
			K Sm	1
5	AM C NA Sm Te	18	AM C NA Sm	1
			Te	1
			AM C Sm Te	4
			AM C Sm	11
			NA Sm	1
			Sm	1
			AM C Sm Te	51
4	AM C Sm Te	59	Am Se Te	3
			C Sm Te	2
			Sm Te	1
			none	2
3	C Sm Te	10	C Sm Te	6
			C Sm	1
			none	3
2	C Sm	1	C Sm	1
2	C Te	1	none	1
1	C	1	none	1
1	Sm	2	none	2
Total		100	100	

*AM, Ampicillin; C, Chloramphenicol; K, Kanamycin; NA, Nalidixic acid; Sm, Streptomycin; Te, Tetracycline; *None; Not transferred

Table 5. Frequency of resistance transfer of *Shigella* No. 30

Donor	<i>Shigella</i> No. 30 (B group)		
Recipient	<i>E. coli</i> ML 1410		
Resistant pattern	Am. C.K. Sm. Te		
Dilution concentration	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Kanamycin (64μg/ml)	48	12	7
Nalidixic acid (64μg/ml)	104	23	11
Transfer frequency (%)	(46.2)	(52.2)	(63.6)

() : percent

Kanamycin/Nalidixic acid = No. of transconjugate cell/Total No. of recipient cell

Table 6. Effect of incubation time with curing agent on elimination of R- plasmid from *Shigella* No. 2 and No. 30 culture

Lab strains	Curing agents	24 hrs						48 hrs						72 hrs						
		Am	C	Sm	Te	NA	Cont	Am*	C	Sm	Te	NA	Cont	Am	C	Sm	Te	NA	Cont	
<i>Shigella-2</i>	Acridine orange (10μg/ml)	0/603 (0)	0/603 (0)	15/603 (2.5)	17/603 (2.8)	19/603 (3.2)	0/603 (0)	0/257 (0)	0/257 (0)	0/257 (0)	9/257 (3.5)	12/257 (4.7)	6/257 (2.3)	0/257 (0)	0/253 (0)	0/253 (0)	0/253 (0)	13/253 (5.1)	17/253 (6.7)	0/253 (0)
	Acriflavine (2.5μg/ml)	0/603 (0)	0/603 (0)	11/603 (1.8)	15/603 (2.5)	24/603 (4.0)	0/603 (0)	0/257 (0)	0/257 (0)	0/257 (0)	7/257 (2.7)	11/257 (4.2)	14/257 (5.4)	0/257 (0)	0/253 (0)	17/253 (6.7)	28/253 (11.1)	15/253 (5.9)	13/253 (5.1)	0/253 (0)
	Acridine orange (10 μg/ml)	0/603 (0)	66/603 (10.9)	0/603 (0)	76/603 (12.6)		0/603 (0)	0/257 (0)	12/257 (4.6)	0/257 (0)	47/257 (18.2)		0/257 (0)	0/253 (0)	6/253 (2.4)	0/253 (0)	79/253 (31.2)			0/253 (0)
<i>Shigella-30</i>	Acriflavine (2.5μg/ml)	0/603 (0)	54/603 (9.0)	0/603 (0)	62/603 (10.2)		0/603 (0)	0/257 (0)	15/257 (5.8)	0/257 (0)	51/257 (19.8)		0/257 (0)	0/253 (0)	7/253 (2.7)	0/253 (0)	37/253 (14.6)			0/253 (0)

* These are some different result between the figures and control ones

* No. of cured cultures/No. of test cultures

* () : percent, * cont. : control.

성을 가지는 조합을 중심으로 하였다.

Am, C, Sm 및 Te을 가지는 내성이 모두 그대로 전달되는 경우가 86.4%로 가장 높고 Am, C, Na, Sm 및 Te가 Am, C 및 Sm으로 전달되는 경우는 61%로 나타났으며 Am, C, Sm 및 Te에서 2 균주가 전혀 내성을 전달하지 못하였으며, C, Sm, Te에서는 3 균주가 C, Te에서는 1 균주가 Sm내성에서는 2 균주가 내성이 전달되지 못했다 (Table 6).

Am, C, K, Sm 및 Te의 내성을 갖고 있는 *Shigella* No. 30균주가 *E. coli* ML1410에 내성이 전달되는 율은 ten fold dilution한 donor와 recipient

의 혼합배양액 0.1ml을 Am과 NA, C와 NA, K와 NA, Te와 NA, K 및 NA(64μg/ml)가 회석된 Mac-Conkey 한천평판배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양해 본 결과 K항균제 (64μg/ml)가 회석된 Mac-Conkey 한천배지상에서만 conjugate된 집락형성을 관찰했다.

그 결과 내성전달빈도는 10⁻³에서 46.2%, 10⁻⁴에서 52.2% 및 10⁻⁵에서 63.6%로 전달되었다 (Table 5).

각 curing agent에 대한 plasmid curing 상태를 보면 Table 7과 같다.

각 curing 물질에 대한 정도의 차이는 크게 나타

Table 7. Biochemical properties of *Shigella* culture, its original strains

Test	<i>Shigella</i> 2*	Af 1**	Af 2***
KIA	K/A	K/A	K/A
H ₂ S in KIA	-	-	-
Indol	-	-	-
Methyl red	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-
Citrate	-	-	-
Urease	-	-	-
Motility in SIM	-	-	-
Lysin decarboxylase	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	+	+
Ornithin decarboxylase	-	-	-
Malonate	-	-	-
Phenylalanine deaminase	-	-	-
Gas from glucose	-	-	-
Acid from glucose	+	+	+
Acid from lactose	-	-	-
Acid from sucrose	-	-	-
Acid from mannitol	+	+	+
Acid from dulctiol	-	-	-
Acid from salicin	-	-	-
Acid from adonitol	-	-	-
Acid from inositol	-	-	-
Acid from sorbitol	-	-	-
Acid from arabinose	-	+	+
Acid from raffinose	+	+	+
Acid from rhamnose	-	-	-

**Shigella*-2 contains R-plasmid (Am, C, Sm, Te, Nal)

**Af 1 culture were cured with acriflavin, and are susceptible to Am, C, Sm, Te, its origin from *Shigella*-2.

***Af 2 culture cured with acriflavin are susceptible to C, Sm, Te, its origin from *Shigella* 2

나지 않았으며 대체로 curing율이 매우 낮았다.

Streptomycin과 tetracycline curing 실험에서는 매우 불안정한 상태를 나타내었다.

실험한 총 1113 집락에서 streptomycin, tetracycline에서는 감수성 패턴이 불안정하여 curing을 판정하는데 control과 비교하여 별 차이가 없었다 (Table 6).

Curing 물질로 처리한 것중 acriflavine으로 처리한 *Shigella* Af 1과 Af 2 두 균주에 대한 생화학 반응결과는 Table 7과 같다.

본래 *Shigella* No.2 균주의 생화학적 특성에 비

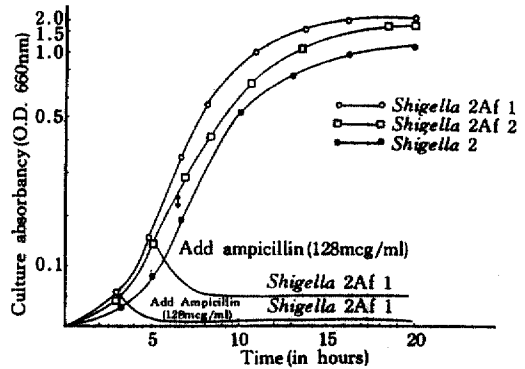


Fig. 5. Growth curves of *Shigella flexneri* No. 2, sero type 1b, and its derivatives cured with acriflavine in Müller Hinton broth medium (pH.7.2, 38°C).

해 arabinose가 양성반응으로 변하였다 (Table 7).

Acriflavine으로 처리한 *Shigella* Af 1, Af 2와 원래균주와의 성장곡선을 보면 Fig. 5와 같다.

배양후 3시간후 대수증식기에 도달하면 항균제를 첨가해 주었을 때 R-plasmid가 curing된 상태는 감수성곡선을 나타내었다.

Af 1에다 3시간 배양후에 ampicillin을 첨가하여 배양했을 때 감수성곡선을 나타내었으며, Af 2에다 5시간 배양후에 ampicillin을 첨가하여 배양했을 때에도 감수성을 나타내었다 (Fig. 5).

고 찰

항균제의 사용이 증가함에 따라 점차 내성균의 출현빈도가 많아지고 치료에 새로운 문제점을 낳고 있다.

본 실험에서 13종의 항균제 선택은 단백질합성의 저해, 핵산합성의 저해, 세포벽합성의 자해, 세포막투과력의 변경 및 세포막을 통한 능동적인 수송의 억제 등의 항균제 작용기작을 고려하여 선택하였으며 임상에서 장내세균군 치료에 상용하고 있는 항균제를 선택하여 실험하였습니다¹¹⁻¹³.

본 실험에서 *Shigella* 균주에서는 단백질합성의 저해기작 (chloramphenicol, tetracycline, amikacin, tamicin, kanamycin, streptomycin 및 tobramycin, etc.)으로 작용하는 항균제의 내성이 가장 많이 전달되었다¹¹.

항균제에 대한 내성을 세균이 가지는 현상은 1959년 이미 인식되기 시작했다^{28, 29, 37}.

일본에서 조사한 바에 의하면 1953년 *Shigella* 4,000균주 중 streptomycin 및 tetracycline에 내성을 갖는 균주가 각각 5주 및 3주였으며, 두가지

이상 항균제에 내성을 나타내는 균주는 발견되지 않았으나, 1959년에는 *Shigella* 총 분리균주 4,873 균주에서 streptomycin, chloramphenicol 및 tetracycline에 동시에 내성을 갖는 균주가 0.76%인 37주가 나타났으며 1960년도에는 9.1%인 308균주가 다제내성균주로 나타났다.

따라서 항균제에 대한 내성인식이 점점 주목을 받기 시작했으며 1959년에는 이질균과 대장균을 혼합배양하면 약제 내성이 전달되는 현상을 처음으로 발견하고부터는 이에 대한 연구가 활기를 띠기 시작했다.

Mitsuhashi 등은¹¹⁾ 또한 대장균에서 F factor는 약제전달에 반드시 필요한 것이 아니다. Phage P1 K2에 의해서 내성을 갖는 것도 확인하였다^{12, 13)}. Watanabe 와 Fukase는¹⁴⁾ 장내세균군에서 약제내성에 관여하는 episome에 대한 연구를 1961년에 밝힌 이래 여기에 관한 많은 연구자료가 보고되었다.^{15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24)}

Shigella 균속에 대한 항균제 내성검사를 보면 1979년 정윤섭 등의 보고에 의하면²⁵⁾ *Shigella flexneri*(B2)에서 5년동안 항균제 내성변화율은 ampicillin이 1974년에 15.6%의 내성을 보였으나 5년 후 1978년에도 73.3%의 높은 내성을 대였으며 chloramphenicol의 경우 1974년에도 70.6%의 1975년에는 92.6% 1978년에는 90.8%의 내성을 나타내었다.

1980~1981년도에 분리된 *Shigella*에 대한 박승함의 보고에 의하면²⁶⁾ ampicillin, chloramphenicol 및 streptomycin에 내성을 가지는율이 97.2%, 98.1% 및 81.1%로 나타났다.

이연태, 박경란의 결과에 의하면²⁷⁾ 이질균 117주에서 ampicillin 내성이 87.4% tetracycline, streptomycin 및 chloramphenicol 내성이 96.4%, 95.5% 및 94.8%로 나타났다.

본 실험 연구에서는 ampicillin에 내성인 균주가 83% chloramphenicol에 94%, tetracycline에 92% 및 streptomycin에 93%의 내성을 보인 것은 앞의 실험결과들과 거의 비슷한 패턴을 보여주고 있다.

그러나 박승함의²⁶⁾ kanamycin, amikacin, tobramycin의 감수성 결과에서 83%, 98.1%, 97%로 나왔으나 본 실험결과에서는 94, 100%, 100의 조금 더 높은 감수성 결과를 보이지만 큰 차이는 없었다.

본 실험결과에서 ampicillin의 경우 1,024 μ g/ml의 농도에서도 내성을 갖는 경우가 76%인 108균주로 나타났으며 streptomycin의 경우에도 1,024 μ g/ml에서 살아남은 균주가 44%인 62%균주가 나타

났다.

이것은 32 μ g/ml농도의 기준보다 4 배나 높은 농도에서 성장한다는 것은 항균제의 효과에 대한 문제점을 시사해 주고 있다.

또한 조와 설의 결과에 의하면²⁸⁾ *Shigella*가 4가지 항균제에 내성을 갖는 율이 62%로 나타났으며 본 실험에서도 단제내성(4%)보다는 다제내성(90%)이 많았고 6제내성이 가장 많은 35%로 4주였으며 7제내성이 29%인 41%인 41주로 다음으로 많았다.

이것은 여러 보고서에 볼 수 있는 것과 같이 다제내성화 되어가는 경향이 뚜렷하게 나타나고 있다.

R-plasmid 전달실험에서 조와 설은²⁹⁾ 약제내성을 갖는 *Shigella* 79균주중 59주(74.7%)가 내성을 전달했다고 했으며, 이연태, 박경란의 보고에 의하면²⁷⁾ 내성을 갖는 *Shigella* 111균주 중 73%인 81균주가 단제 혹은 다제내성을 전달하였다.

본 실험결과에서도 67%정도로 내성이 전달되는 것으로 나타났으며 단제 내성 전달을 보다는 다제 내성 전달빈도가 훨씬 높은 것으로 나타났다.

이 결과는 조동택, 전도기에서는³⁰⁾ 67.8, 설성용의³¹⁾ 68.8%의 전달결과와 본 실험결과와는 거의 같은 비율을 보여주고 있다.

R-plasmid curing 실험에서 Watanabe의 결과에 의하면³²⁾ *Shigella flexneri*에 acriflavine 과 acridine orange로 처리했을 때 acriflavine 5 μ g/ml에서는 100%의 제거율을, acridine orange 10 μ g/ml에서 8.5%, 20 μ g/ml, 40 μ g/ml의 높은 농도에서는 전혀 curing이 되지 않았다고 보고하고 있다.

본 실험에서는 acridine orange와 acriflavine으로 처리했을 때 앞의 실험결과에 비해서 R-plasmid 제거율은 8% 정도로 낮게 나왔다.

R-plasmid가 curing되는 기작은 plasmid만 복제하는 것을 방해하는 물질(acridine, ethidium bromide, novobiocin)과 plasmid가 세포벽에 부착하지 못하게 하는 것(sodium dodecyl sulfate, 높은 온도배양)으로 나눌 수 있다.

Curing된 균주 중 acriflavine을 처리한 균주에서 완전 curing된 것과 부분 curing된 균주가 형질에 어떤 변화를 주었는가 조사했을 때 arginine dihydrolase 실험에서 음성이 양성으로 변하였으며, arabinose fermentation 실험에서 음성이 둘 다 모두 양성으로 바뀌었다.

즉 curing agents가 유전자 구조에 변화를 가져왔다고 볼 수 있다.

Curing시킨 균주와 원래 균주에 대한 정상성장 곡선 및 항균제를 첨가했을 때 성장곡선을 보면

Shigella No. 2, Af1 및 Af2 모두 항균제를 첨가하지 않았을 때는 정상 성장곡선을 나타내었으나 AF1 및 Af2를 3시간 배양 및 5시간 배양후 항균제(Am)를 첨가하여 배양했을 때 감수성곡선을 나타내었다.

대수기에 들어선 AF1 및 AF2에 항균제를 첨가후 18시간 배양했을 때 medium속에서 세포용해가 생긴 것으로 보이는 덩어리가 생겼다. 이것은 auto lysis products가 아닌가 생각이 든다.

결 론

1983년도 각 사 도 연구소와 서울시내 종합병원 임상병리과에서 수집한 140주의 *Shigella*균속에 대해 13가지 항균제의 내성, R-plasmid전달 및 제거에 관찰 실험을 하였다.

실험에 사용한 항균제는 Am, AK, Cf, C, Ce, G, K, NA, Pc, Rf, St, Te 및 To 등 13개를 사용하였다.

13종의 항균제로 실험을 해본 결과 총 140균주가 1제 내지는 2제이상의 내성을 띠고 있었지만 amikacin, gentamicin 및 tobramycin에는 94.3%가 높은 감수성을 나타내었다.

대부분의 균주가 chloramphenicol(94%), streptomycin (93%), tetracycline (92%), piperacillin (90%), ampicillin(83%), cefoperzone(42%), flalidixicacid (14%), cephalothin(17%), rifampicin (2%) 및 amikacin(6%)에 내성을 띠고 있으며 140균주 중 60%는 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin 및 tetracycline에 혼합내성을 띠고 있다.

내성전달실험에서 총 140균주중 94균주(94.3%)는 1제 혹은 그이상의 항균제내성이 *E. coli* ML 1410에 전달되었다.

Donor와 recipient간에 내성전달빈도는 약 54%이며, 여러 가지 패턴으로 전달되었다.

내성이 plasmid curing 실험에서 acriflavine과 acridine orange로 처리했을 때 약 8%정도가 제거되었다.

Shigella No. 2와 Af1 및 Af2의 생화학적 특성 비교실험에서 *Shigella* No. 2는 arginine dihydro-lase와 arabinose fermentation이 음성인데 plasmid가 제거된 Af1과 Af2는 양성으로 변화하였다.

이들 세균주를 Temperature Gradient Biophoto Recorder TN-1120(Toyo, Japan)을 이용하여 *Shigella* Af1, Af2와 원래 균주와 원래 균주와의 성장곡선을 비교해 보았는데 항균제를 첨가하지 않았을 때는 이들 모두가 정상성장곡선을 나타내었으나 cur-

ing시킨 Af1과 Af2에 항균제를 첨가하여 배양했을 때는 감수성곡선을 나타내었다.

감의말씀: 본 연구수행에 물심양면으로 지원해 주신 국립보건연구원 정태화과장님, 이명원선생님, 이복권선생님, 김기상선생님께 진심으로 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) 김재린, 정희영: 이질의 역학, 대한의학협회지, 13: 5~7, 1970.
- 2) 정운섭, 송경순, 이귀녕, 이삼열: 최근 5년간 분리된 enteropathogenic bacteria, 대한미생물학회지, 14: 17~25, 1979.
- 3) 박승함: 1979년에 분리된 병원성 세균의 항균제에 대한 감수성. 대한의학협회지, 23: 605~610, 1980.
- 4) 설성용: *Salmonella* 및 *Shigella*의 균형제 내성의 추이, 경북의대잡지, 12: 245~249, 1980.
- 5) 조동택: 대구지방에서 분리한 *Salmonella*의 균형 및 항균제내성 (1973~1980), 경북의대잡지 21: 522~525, 1980.
- 6) 이연태, 박경란: 대장균 및 이질균의 전달성, R-plasmid에 관한 연구, 감염학회지 15: 77~88, 1983.
- 7) 하대유, 김형노, 김귀차, 이현구: 항생제 내성 전달인자의 제거에 관한 실험적 연구, 대한의학협회지, 22: 749~753, 1979.
- 8) 조동택, 전도기: 대장균의 항생제 내성 및 전달성 내성 plasmid, 대한미생물학회지, 17: 21~25, 1982.
- 9) Kitamoto ON, Fukaya K, and Kawashima A: Drug sensitivity of *Shigella* strains isolated in 1956. *J. Jap. Assn. Infect Dis.*, 30:403-405, 1956.
- 10) Hardy K: R-plasmid p. 50. Bacterial plasmids, Thomas Nelson and Sons Ltd.
- 11) Mitsuhashi SK Harda and Hashimoto H: Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug resistance to other bacteria by mixed cultivation. *Japan. J. Exptl. M.*, 30:170-184, 1960.
- 12) Ochiaia K, Yamanaka K Kimura and Sawada O: Studies on the inheritance of drug resistance between *Shigella* strains and *Escherichia coli*. *Nippon Iji Shimpo.*, 1861:34-46, 1969.
- 13) Akiba T, Koyama T, Isshiki S and Tukushimma T: Studies on the mechanism of development of multiple drug resistant *Shigella* strains. *Nippon Iji. Shim-*

- po., 1886:45-46, 1960.
- 14) Baron LS and Falkow S: Genetic transfer of episomes from *Salmonella typhosa* to *Vibrio cholerae*. P. 59 in *Genet. Soc. Amer. rec.*, 30, 1961.
 - 15) Datta N: Drug resistance and R-factors in the bowel bacteria of London patients before and after admission to hospital. *Brit. Med. J.*, 2:408-411, 1969.
 - 16) Clowes RC: Molecular structure of bacterial plasmid. *Bacteriol. Rev.*, 36:361-369, 1972.
 - 17) Watanabe T: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 27:87-98, 1963.
 - 18) Smith HW and Halls S: The transmissible nature of the genetic factors in *Escherichia coli* that controls hemolysin production. *J. Gen. Microbiol.*, 47:153-161, 1967.
 - 19) Smith HW and Linggood HA: Transmissible nature of the genetic factors in *Escherichia coli* that controls enterotoxin production. *J. Gen. Microbiol.*, 53:319-334, 1968.
 - 20) Pitt J and Helmstetter CE: Naturally occurring R-lactose factor. *Bact. Proc. Gp.*, 76, 1970.
 - 21) Watanabe T: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bact. Rev.*, 27:87-115., 1963.
 - 22) Davis J and Smith DI: Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Ann. Rev. Microbiol.*, 32:469-518, 1978.
 - 23) Hirota Y and Iijima T: Acrifravine as an Effective agent for Eliminating F-factor in *Escherichia coli* k-12. *Nature, Lond.*, 180:655-667, 1957.
 - 24) Watanabe T and Fukasawa T: Episome-Mediated Transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae II. Elimination of resistance factors with acridine dyes. *J. Bacteriol.*, 81:679-687, 1961.
 - 25) Mitsuhashi S, Harada K and Kameda M: Elimination of transmissible drug resistance by treatment with Acrifravine. *Nature Lond.*, 189:947-949, 1961.
 - 26) Hahn FE and Clark J: Elimination of bacterial episomes by DNA-Complexing compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 182:295-321, 1971.
 - 27) Tomoeda M, Inuzuka M, Kuno N and Nakamura S: Effective Elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dedecyl sulfate *J. Bact.*, 95[3]:1078-1089, 1968.
 - 28) Ingram L, Sykes RB, Grinstead J, Saunders JR, and Richmond MI: A Transmissible resistant *cliniment* from a strain of *Pseudomonas aeruginosa* containing No. detectable extrachromosomal DNA. *J Gen Microbiol.*, 72:269-289, 1972.
 - 29) Chabbert YA, Baudens JG and Bouanchaud DH: Medical aspects of transferable drug resistance: in bacterial episome and plasmids. Liba Found. Stmp. Churchill, London, 1969.
 - 30) Hahn FE and Clak J: Elimination of plasmid determinants by DNA-complexing compounds. *Topics in Infect., Dis.*, 1:99:107, springer N.Y. Wien, 1975.
 - 31) Mchugh GL and Swartz MN: Elimination of plasmids from several bacterial species by novobiocin, antimicrob. *Agents Chemother.*, 12:423-436, 1977.
 - 32) Edwin HL: Laboratory tests in chemotherapy p. 446, Manual of clinical microbiology 3rd ed. ASM., Washington, D.C. 1980.
 - 33) Lorian V: Susceptibility testing of antibiotics in liquid media the characterization of plasmids that carry antibiotic resistance genes p. 73, p. 433, Antibiotics in laboratory medicine Williams and Wilkins Baltimore/Lond. 1980.
 - 34) Farrar WE Jr. and Margene Edison: Antibiotic resistance in *Shigella* mediated by R factor. *J. Infect. Dis.*, 123:477-496, 1971.
 - 35) Davey RB and Pittard J: Genetic and biophysical study on R-plasmids conferring sulfonamide resistance in *Shigella* strains isolated in 1952 and 1956, *J. bacteriol.*, 120:1186-1198, 1974.
 - 36) Schneider H and Falkows: characterization of an Hfr strain of *Shigella flexneri*, *J. Bacteriol.*, 88:682-716, 1962.
 - 37) Watanabe T and Fukasawa T: Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae I. Transfer of resistance factors by conjugations *J. Bacteriol.*, 81:666-677, 1961.
 - 38) Suzuki S, S. Nakazawa and Ushioda T: Yearly change of drug resistance of *Shigella* strains isolated in kyoto for five years from 1951. *Chemother*, 4:336-338, 1956.
 - 39) Gehardt P et al.: Manual of methods for general bacteriology, ASM, Washington D.C. 228, 1981.
 - 40) Edward PR and Ewing WH: Identification of Enterobacteraceae, 3rd ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, pp. 362, 1972.
 - 41) Benveniste R, Davies J: Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. *Ann. Rev. Biochem.* 43:471-478, 1973.
 - 42) Vasquez D: Inhibitors of protein synthesis. FERS Let-

ters 40 [Suppl]: S63-S84, 1974.

43) Rogers HJ, Perkins HR, Ward JB: Microbiol cell walls and Membranes. New York, Chapman and Hall, 1980, Chapter 9.

44) Cozzarelli NR: The mechanism of action of inhibitors

of DNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 46:641-652, 1977.

45) Davies J, Smith DI: Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annu. Rev. Microbiol.* 32:469-477, 1978.