

Enterobacter의 항균제내성 유전자의 분자적 특성*

계명대학교 의과대학 미생물학교실

김성홍·백원기·서민호

서 론

*Enterobacter*속은 장내세균으로서 *Enterobacter cloacae*, *E. aerogens*, *E. agglomerans* 등 11종으로 이루어져 있으며 이 중 *E. cloacae*가 가장 많이 임상가검물에서 분리되고 있다^{1,2)}. 이들은 물, 토양, 인체의 대장등에 서식하고 있으며, 객담, 뇨, 혈액 등의 임상가검물에서 분리되고 있다^{3,4)}. *Enterobacter*속은 입원환자나 면역결핍증 환자들에서 폐렴, 요로감염, 균혈증 등의 감염증을 일으켜 근래에 와서 병원감염의 중요한 원인균으로 알려지고 있으며 병원감염성 그람음성 균혈증의 원인균중 3~5번째로 빈번히 분리되었다는 보고도 있다^{3,4)}. 이들은 대장균등의 다른 장내세균과 마찬가지로 다약제내성을 나타내는 균들이 많으며 이는 증가된 항균제 사용에 따른 빈번한 항균제에의 노출의 결과로 생각되고 있다⁵⁾. 약제내성균의 증가는 intrinsic resistance를 가지거나 β -lactamase 등의 생산능을 가진 균의 선택적 증가에 기인하거나, 항균제내성에 관여하는 유전물질이 균간에 전달되어 내성을 획득하게 되어 발생하는 것으로 알려져 있으며 후자의 기전이 유력시되고 있다^{6,7)}. 균이 항균제내성 유전자를 획득하게 되는 기전으로는 특정한 유전물질 전달체가 없이 단순히 DNA(deoxyribonucleic acid)를 받아들임으로써 생기는 형질전환과 bacteriophage가 매개하는 형질도입 그리고 plasmid가 매개하여 균체간의 접합에 의해서 전달되는 conjugation 등이 알려져 있으며 특히 Gram음성균에 있어서는 비염색체성 유전물질인 resistant plasmid(R plasmid) DNA에 의해 다약제내성이 타균으로 전파되는 것이 가장 많다고 보고되어 있다^{7,8)}.

균이 항균제에 노출되는 것은 감염병 환자의 치

료를 위한 항균제의 투여에 따른 불가피한 현상일 것이다. 현재 우리나라에서는 항균제의 자유판매가 허용되고 있어 항균제가 오용 도는 남용되어 균의 항균제 노출빈도가 상당히 높아 내성균의 출현빈도가 증가되고 있다⁹⁾. 이러한 내성균의 발생을 억제하기 위해서는 최선의 항균제 선택과 적량투여 그리고 충분한 치료기간의 준수와 항균제 남용을 억제할 수 있는 사회제도적 기반이 마련되어야 하며, 이와 아울러 근본적으로 약제내성균의 발생 문제를 해결하기 위해서는 항균제 내성기전의 주류를 이루고 있는 R plasmid에 의한 약제내성 발생기전의 유전학적, 분자생물학적 규명이 이루어져야 한다.

저자들은 각종 병원 임상가검물로 부터 분리한 *Enterobacter*를 대상으로 최선의 항균제 선택 및 원내감염의 역학적 자료와 약제내성 발생기전 규명의 기본자료를 제공하고자 원인균의 분리동정, 항균제 감수성검사, 접합에 의한 내성전달검사, plasmid DNA의 분리 및 전기영동, 제한효소 처리에 의한 DNA절편분석 등을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 균주분리 및 동정

계명대학교 의과대학 미생물학교실에서 각종 임상가검물로 부터 분리 동정한 *Enterobacter* 42주를 실험에 사용하였다. 동정기준은 Ewing¹⁰⁾의 방법에 준하였다.

2. 항균제감수성 검사

Chloramphenicol(Cm), tetracycline(Tc), streptomycin(Sm), ampicillin(Ap), trimethoprim(Tp), rifampin(Rf), gentamicin(Gm), amikacin(Ak), kana-

* 이 논문은 김성홍의 석사학위 논문임.

mycin(Km), tobramycin(To), cephalothin(Clt), cefamandole(Cfm), moxalactam(Mx), enoxacin(Ex), norfloxacin(Nf), ciprofloxacin(Cp), ofloxacin(Of), pefloxacin(Pf) 및 nalidixic acid(Na) 등 19종 항균제에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 감수성검사는 Steers 등¹¹⁾의 multiple inoculator를 이용한 한천회석법(agar dilution method)에 준하여 최소발육저지농도(MIC)를 결정하였으며, 매 실험마다 정도관리의 공정성을 기하기 위하여 ATCC(American Type Culture and Collection)의 표준균주인 *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 및 *E. coli* ATCC 25922을 함께 사용하여 실시하였다. 내성균의 판정은 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 판정기준¹²⁾에 준하였고, 균의 50% 및 90%MIC는 주로 Smith 등¹³⁾이 제시한 방법에 따라 산출하였다.

3. 접합에 의한 내성전달검사

접합에 의한 전달성 내성인자를 검사하기 위하여 피전달균으로 각 약제에는 감수성이나 Rf에 염색체성 내성인 *E. coli* RG488과 Na에 염색체성 내성인 *E. coli* ML1410을 사용하였다. 선택배지는 Mueller-Hinton 한천배지(Difco Co.)에 약제에 따라 15~20 µg/ml의 각 선택약제와 피전달균이 내성인 Na 또는 Rf를 50µg/ml 씩 추가하여 내성을 전달받은 피전달균만이 성장할 수 있게 하였다. 매번 실험시 실험균과 피전달균을 선택배지에 접종하여 증식되지 않음을 확인하였다^{14,15)}.

4. Plasmid DNA의 분리 및 전기영동

Plasmid 검색을 위해서 Kado와 Liu의 방법¹⁶⁾을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 전기영동은 0.7% agarose gel(15x15cm, agarose type I, Sigma Co.)과 TBE buffer(89mM Tris base, 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 수평형 영동장치로 90mA, 100volt로 5시간 submarine electrophoresis를 실시하였다. Plasmid의 분자량 측정을 위하여 매 영동시마다 R1033(45mega dalton: Mdal), RP4(38Mdal), R1(58Mdal) 등의 표준 plasmid DNA를 함께 영동시켰다. 영동된 gel은 0.5µg/ml의 ethidium bromide로 염색시켜 자외선투사기를 사용하여 사진촬영하고 plasmid DNA의 영동거리를 표준 plasmid DNA 영동거리와의 linear regression을 이용하여 분자량을 계산하였다.

5. 제한효소처리에 의한 R-plasmid DNA 절편 분석

제한효소처리를 위한 plasmid 분리는 Birnboim과 Doly의 방법¹⁷⁾에 따랐다. 37°C에서 16~18시간 배양한 균액 1.5ml를 원침시킨 후 세포침사를 lysozyme-용액(50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris, pH8.0, 2mg/ml lysozyme) 100µl로 부유시킨후 alkaline-SDS-용액(0.2N NaOH, 1% SDS) 200µl를 가하여 잘 혼합한 후 열음에서 5분간 방치하였다. 150 µl의 high salt 용액(5M potassium acetate, pH5.2)을 놓고 5분간 12,000rpm으로 원침하여 상층액을 회수한 다음 phenol-chloroform mixture 처리 후 2.5 volume의 ethanol을 가하여 15분간 원심하여 DNA를 침전 시켰다. DNA 침사를 vacuum desiccator에서 적당히 말려 RNase 처리 후 제한효소처리를 하였다. 제한효소는 BRL(Bethesda Research Laboratory) 제 EcoR I과 HindIII를 실험에 사용하였다. 중류수에 녹인 DNA에 제한효소와 이에 적합한 buffer를 첨가한 후 37°C에서 90분간 반응 시키고 type I gel loading buffer(0.5M EDTA, 0.25% Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol, 40% Sucrose)를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 전기영동하였다²⁵⁾. Gel의 농도는 제한효소에 따라 0.8~1% 정도로 하여 수평형 영동 장치로 25mA, 20volt로 18시간 submarine electrophoresis 하였다. 분자량 측정을 위하여 매 전기영동마다 제한효소에 처리된 lambda DNA를 size marker로 사용하였다.

결 과

각종 임상가검물로부터 분리된 *Enterobacter*의 분리빈도를 표 1에 나타내었다. 분리빈도는 총 42주

Table 1. Isolation frequency of *Enterobacter* species from clinical specimens

Specimens	Strains isolated	
	No.	%
Urine	16	38.1
Sputum	11	26.2
Wound	7	16.7
Catheter tip	3	7.1
Ear	2	4.8
Eye	2	4.8
Throat	1	2.4
Total	42	

중요에서는 16주가 분리되어 38.1%로 가장 높았으며, 그 다음으로 객담 11주(26.2%), 창상부위 7주(16.7%), catheter tip 3주(7.1%) 순이었다.

표 2는 19종의 항균제에 대한 내성균수와 MIC범위 그리고 90% 및 50%MIC를 나타내었다. Mx, Rf 그리고 quinolone 계열약제인 Ex, Nf, Cp, Of, Pf에는 내성인 균수가 없었으며, Gm, Ak, Na, Tc, Tp에는 7.1~21.4%의 낮은 내성도를 보였다. Cfm, Km, Sm, Cm에는 26.2%~42.9%의 내성을, Ap, Clt, To에는 47.6~69%의 높은 내성을 나타내었다. MIC범위는 quinolone제제를 제외한 대부분의 약제에서 실험최소항균제농도에서 실험최고항균제농도까지의 범위를 나타내었다. 90%MIC는 Ex, Nf, Cp, Of, Pf에서 실험최소약제농도 이하를 나타내었고 Mx, Na, Rf에서는 내성균의 판정기준치 이하를 나타내었다. 90%MIC가 실험최고약제농도보다 높게 나타난 약

제는 Ap, Clt, Cfm, Sm, Km, Cm이었다. 표 3은 19종 항균제에 대한 *Enterobacter*의 내성유형을 나타내었다. 실험한 42균주 중에서 가장 많은 약제에 다양제내성을 나타낸것은 11종약제 즉 CmTcSmApTp-NaKmAkToCltCfm에 내성을 나타낸 균주였으며, 19종 항균제에 모두 감수성인 균주는 7주가 있었다. 내성전달실험 결과는 실험한 34주 중 16주에서 plasmid의 전달이 일어나 47%의 내성전달율을 나타내었다. 그럼 1은 *Enterobacter*로부터 분리한 plasmid DNA의 전기영동상이다. Lane A-D, H-K는 *Enterobacter* plasmid DNA이며 Lane E는 분자량 58 mega dalton(Mdal)의 RI이며, Lane F는 분자량 38 Mdal의 RP4, Lane G는 분자량 45 Mdal의 R1033의 영동상이다. 표 4는 각 transconjugant의 Phenotype marker와 각 plasmid의 분자량을 나타낸 것이다. 각 transconjugant는 43.1 Mdal에서 83.4 Mdal사이의

Table 2. Antimicrobial susceptibility of 42 strains of *Enterobacter*

Drugs ^{a)}	No.(%) of resistant strains ^{b)}	MIC(μ g/ml) ^{c)}	
		Range	50%
β-lactam antibiotics			
Ap	29(29)	<2~>256	>256
Clt	29(69)	<2~>256	<2
Cfm	15(35.7)	<2~>256	<2
Mx	0(0)	<2~ 16	<2
Aminoglycosides			
Sm	16(38.1)	<2~>256	4
Km	18(42.9)	<2~>256	4
Gm	7(16.7)	<2~>256	<2
Ak	9(21.4)	<2~ 16	<2
To	20(47.6)	<2~>256	4
Quinolones			
Na	3(7.1)	<2~>256	3
Ex	0(0)	<0.5~ 4	<0.5
Nf	0(0)	<0.5~ 2	<0.5
Cp	0(0)	<0.5	<0.5
Of	0(0)	<0.5~ 1	<0.5
Pf	0(0)	<0.5~ 2	<0.5
Others			
Cm	11(26.2)	<2~>256	3
Tc	7(16.7)	<2~>256	<2
Tp	5(16.7)	<2~>256	<2
Rf	0(0)	<2~ 16	14

^{a)} Abbreviation: see text.^{b)} Criteria of resistance were determined as described in NCCLS.^{c)} 50% and 90% are MICs required to inhibit 50 and 90% of the strains respectively.

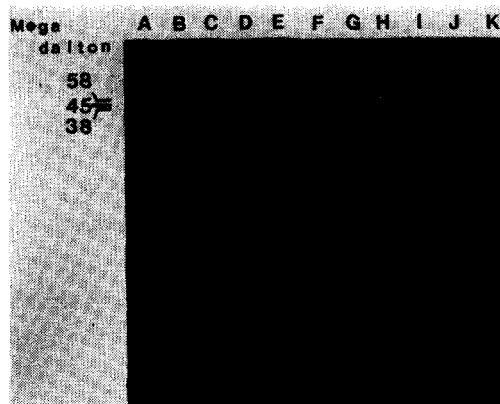


Fig. 1. Electrophoretic patterns of plasmid DNAs from *Enterobacter* (0.7% agarose gel electrophoresis, 90volt, 3 hours). A. 90En9, B. 90En10, C. 90En12, D. 90En13, E. RI, F. RP4, G. R1033, H. 90En14, I. 90En16, J. 90En18, K. 90En21.

분자량을 가진 1개씩의 plasmid를 가지고 있었다. CmSmApTpKmGmAkToCltCfm의 같은 내성 marker를 가진 1개씩의 plasmid를 가지고 있었다.

그림 1은 *Enterobacter*의 R plasmid DNA를 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 그분획을 전기영동한 것이다. Lane D는 21-3.5 Kilobase(Kb) 사이의 6 개의 절편을 가지는 *EcoRI*으로 제한효소처리된 λ DNA size marker이며, lane A-C, E-J는 *Enterobacter* 유래의 R plasmid의 *EcoRI* 제한효소 절단상으로 phenotype marker와 분자량에 따라 다양한 절단 양상을 나타내었으며 분획수는 5-14개를 나타내었다. 그림 2는 *Enterobacter*의 R plasmid DNA를 제한효소 *HindIII*로 절단하여 전기영동한 분획상이다. Lane G는 제한효소 *EcoRI*으로 절단한 λ DNA size marker이며, lane A-F, H-J는 *Enterobacter* 유

Table 3. Antimicrobial resistance patterns of *Enterobacter* species

No. of drugs resistance	Resistance patterns	No. of strains
11	CmTcSmApTpNaKmAkToCltCfm	1
10	CmTcSmApKmGmAkToCltCfm	2
	CmSmApTpKmGmAkToCltCfm	2
9	CmTcSmApKmGmToCltCfm	1
8	CmSmApKmGmToCltCfm	1
	CmSmApNaKmToCltCfm	1
	TcSmApKmGmToCltCfm	1
7	CmTcSmApTpKmClt	1
	SmApKmAkToCltCfm	2
6	SmApKmAkToClt	2
	SmApKmToCltCfm	1
5	ApKmToCltCfm	2
	ApNaToCltCfm	1
4	TcApTpKm	1
3	CmApClt	1
	ApToClt	1
2	ApClt	5
	SmAp	1
1	Clt	4
	Ap	2
	To	2
0	-	7
Total		42

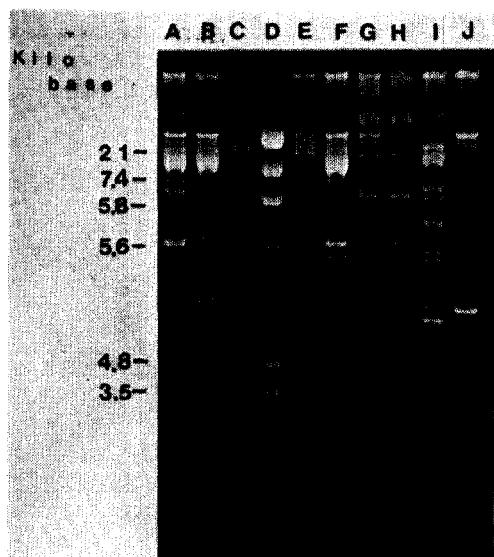


Fig. 2. Restriction endonuclease EcoRI digestion patterns of R plasmid DNAs from *Enterobacter* (0.8% agarose gel electrophoresis, 25volt, 18 hours). A. pDE9018, B. pDE9016, C. pDE9013, D. lambda DNA, E. pDE9012, F. pDE9009, G. pDE8810, H. pDE8803, I. pDE8502, J. pDE8811.

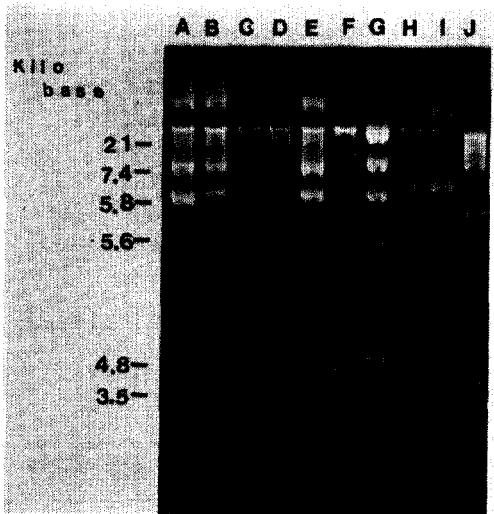


Fig. 3. Restriction endonuclease HindIII digestion patterns of R plasmid DNAs from *Enterobacter* (0.8% agarose gel electrophoresis, 25volt, 18 hours). A. pDE8811, B. pDE9018, C. pDE9016, D. pDE9013, E. pDE9012, F. pDE9009, G. EcoR I digested lambda DNA, H. pDE8810, I. pDE8803, J. pDE8502.

래의 R plasmid 절단상으로 8~16개의 절편수를 나타내었다. 제한효소 EcoRI와 HindIII로 각각 절

단된 R plasmid DNA 절편의 분자량 및 분획수를 표 5에 나타내었다. 절단상은 plasmid의 분자량과 제한효소에 따라 다양하게 나타났다. Phenotype marker는 다르나 분자량이 동일하게 나타났던 pDE 8803과 pDE8810은 제한효소 EcoRI에서 절단상이 거의 동일하게 나타났으며 제한효소 HindIII로 절단하였을 때에는 약간의 차이는 보이나 비슷한 절단 양상을 보였다.

고 칠

*Enterobacter*는 폐렴, 요로감염, 균혈증 등의 원인균으로서 주로 원내감염을 일으키는 것으로 알려져 있다^{2,3)}. 의학의 급진적 발전으로 인구의 고령화, 면역억제 및 항암요법제제 사용과 장기이식환자 등의 증가로 전반적으로 저항력저하숙주가 증가되어 원내감염의 중요성이 부각되면서 원내감염의 상당수를 차지하는 *Enterobacter*도 그 중요성이 더해지고 있다.

각종 임상가검물에서의 *Enterobacter*의 분리빈도를 Toala 등¹⁸⁾은 sputum, urine, wound의 순으로 보고하였으나 이번 실험에서는 urine, sputum, wound의 순으로 나타나 순위의 차이는 보이나 주로 이 세 가지 가검물에서 분리됨을 알 수 있었다. 감염균이 항균제 내성을 나타내는 것이 항균제의 사용빈도에 따라 증가된다는 것은 이미 널리 알려진 사실이며 우리나라에서는 항균제의 자유판매와 방만한 사용, 오용 등으로 감염균의 다약제내성이 만연되고 있는 실정이다. *Enterobacter*의 β-lactam항균제 계열의 약제에 대한 내성은 chromosomal inducible(Class I) β-lactamase에 의한 것이 많다는 것이 알려져 있다^{5,19,20)}. 이 실험에서 β-lactam계열의 항균제 중 Ap, Clt, Cfm에는 35.7~69%의 높은 내성도를 보였으나 Mx에는 전 균이 감수성으로 나타나 Mx이 *Enterobacter* 감염증의 치료에 아주 유용할 것으로 생각되었으며, 또한 Na 등 실험에 사용된 모든 quinolone 계열 약제와 Rf에도 0~7.1%의 내성도를 보여 효과가 아주 좋을 것으로 사료되었다. 균의 내성화정도를 파악할 때에는 균의 약제내성빈도도 중요하지만 %MIC 특히 90%MIC가 유용한 정보로 이용되고 있다. 이 실험에서 Ap, Clt, Cfm의 90%MIC는 모두 >256μg/ml로 실험최고항균제농도 이상을 나타내어 >128 μg/ml이라고 보고한 Muytjens 등²¹⁾과 일치하였으며 Mx의 90%MIC도 7μg/ml로 거의 비슷한 결과를 나

Table 4. R plasmid profiles of *Enterobacter* species and their transconjugants

Name of R plasmid	Phenotypic marker	Molecular weight (Mega dalton)
pDE8501	Cm Tc Sm Ap Km Gm To Clt Cfm	50.5
pDE8502	Cm Sm Ap Km Gm Clt Cfm	67.0
pDE8802	Sm Ap Km Ak To Clt	43.1
pDE8803	Sm Ap Km Ak To Clt Cfm	77.1
pDE8805	Cm Tc Sm Ap Km Gm Ak To Clt Cfm	62.2
pDE8810	Sm Ap	77.1
pDE8811	Cm Tc Sm Ap Km Gm Ak To Clt Cfm	58.9
pDE9008	Sm Ap Km Ak To Clt	65.0
pDE9009	Cm Sm Ap Tp Km Gm Ak To Clt Cfm	58.9
pDE9010	Tc Sm Ap Km Gm To Clt Cfm	83.4
pDE9012	Sm Ap Km Ak To Clt Cfm	61.9
pDE9013	Ap Km Ak To Clt Cfm	89.0
pDE9014	Ap	52.4
pDE9016	Ap Km Ak To Clt Cfm	78.7
pDE9018	Cm Sm Ap Tp Km Gm Ak To Clt Cfm	58.9
pDE9021	Sm Ap Km Ak To Clt Cfm	49.8

Table 5. Restriction endonuclease digestion patterns of R plasmid DNAs from *Enterobacter* species

Name of plasmid	Number(& molecular weight range*) of DNAs digested by	
	<i>EcoR I</i>	<i>Hind III</i>
pDE8502	14(30.3~3.4)	11(31.4~3.6)
pDE8803	8(27.1~6.6)	7(31.5~6.8)
pDE8810	8(27.1~6.6)	6(30.3~9.3)
pDE8811	14(43.8~4.1)	11(35.7~4.3)
pDE9009	16(33.6~3.6)	12(34.4~3.8)
pDE9012	12(30.1~4.8)	7(36.5~4.8)
pDE9013	14(30.7~4.9)	10(32.1~4.7)
pDE9016	12(20.1~4.8)	10(32.1~4.5)
pDE9018	12(33.6~4.7)	13(34.2~3.6)

* Kilo base

타내었다. 내성균주가 한 주도 없었던 Ex, Nf, Cp, Of, Pf의 90%MIC는 모두 <0.5μg/ml로 실험최소항균제농도 이하를 나타내어 월등히 우수한 항균효과를 기대할 수 있음을 시사하였으며 이는 Muytjens 등²¹⁾, Eliopoulos 등²²⁾, Chin 등²³⁾과 일치한 결과를 보여 주었다. 기타 실험항균제 중에서 내성균주가 없었던 것은 Rf이었으며 이의 90%MIC는 Muytjens 등²¹⁾이 *E. cloacae* 등 4종의 *Enterobacter*에서 보고한 8~64μg/ml과 비슷한 15μg/ml을 나타내었다. 이상의 결과를 볼때 *Enterobacter*의 감염증 치료에는 Mx, Na, Ex, Nf, Cp, Of, Pf, Rf 등의 사용이 유익할 것으로

사료된다.

아무리 균의 감수성이 높은 약제라도 부주의한 사용과 남용은 내성균발생을 초래할 수 있으므로 사려깊은 사용으로 최대한 내성균의 발생을 억제하여야 할 것이다. 또한 근본적인 대책 수립을 위해서는 내성화기전과 이에 관여하는 것으로 알려진 R plasmid DNA의 유전학적 및 분자생물학적 특성 규명에 필요한 연구를 시행하여 약제내성화의 유전적 차원에서의 이해를 이루어야 한다. 이러한 견지에서 본 실험에서는 *Enterobacter*의 내성전달실험을 시행하여 전달성 R plasmid를 검사하고 피전달

균으로 전달이 이루어진 R plasmid의 제한효소 처리에 의한 절단상의 비교분석으로 이들의 분자생물학적 특성규명을 시행하였다. 접합에 의한 내성 전달실험 결과 Na과 Rf에 내성이 없는 34주 중에서 16주가 plasmid를 전달하여 약 47%의 내성전달율을 나타내었는 바 이는 *Enterobacter*의 내성전파기전에 접합에 의한 전달성 R plasmid의 전파가 약제내성화 기전의 주된 인자임을 시사하는 것으로 생각되었다. 내성전달실험으로 피전달균으로 전달된 R plasmid의 분자생물학적 특성을 알기위해 피전달균으로부터 R plasmid DNA를 분리하여 전기영동법으로 분석한 결과 대부분의 R plasmid들이 분자량 43.1~83.4 Mdal로 하 등²⁴⁾, 서 등²⁵⁾, 이 등²⁶⁾이 보고한 *E. coli* 등의 다른 장내세균들과 비슷한 중형 plasmid들 이었다. plasmid를 제한효소로 절단한 후 전기영동하여 절단된 DNA 절편의 영동상을 비교분석하는 restriction enzyme analysis는 어느 한균에서 R plasmid가 여러 다른 균으로 전파되어 균의 내성화를 초래할 때 이에 대한 역학적 추적 즉 Molecular Epidemiology의 중요한 연구방법으로 사용되고 있다^{27,28)}. 이러한 제한효소절단법을 이용하여 항균제내성의 표현형에 따라 R plasmid들이 서로 어느정도의 차이를 가지는지와 epidemic strain의 존재에 대한 연구를 시행하기 위한 목적으로 GAA-TTC palindrom 부위를 선택적으로 절단하는 EcoR I 과 AAGCTT palindrom 부위를 절단하는 HindIII 를 사용하여 restriction enzyme analysis를 시행하였다. 대부분의 plasmid들은 EcoR I 으로는 8~16개의 절편으로 절단되었고 HindIII로는 6~13개의 절편으로 절단되었다. 같은 내성유형을 가지면서 분자량이 동일하였던 pDE9009와 pDE9018은 제한효소 EcoR I 으로 각각 분자량 33.6~3.6Kb와 33.6~4.7 Kb의 16개와 12개의 절편으로 잘렸으며 제한효소 HindIII에서는 34.4~3.8Kb, 34.2~3.6Kb의 분자량을 가진 12개와 13개의 절편으로 잘려 DNA염기서열의 차이가 존재함을 알수 있었다. 이러한 결과를 볼때 약제내성양상과 plasmid의 분자량이 동일하다고 해서 동일한 균에서 전파된 plasmid라고 추측하는 것은 어려울 것으로 생각된다. 분자량은 77.1 Mdal으로 같았으나 내성유형의 차이를 보였던 pDE 8803(SmApKmAkToCltCfm)과 pDE8810(SmAp)은 제한효소 EcoR I 으로 절단시 8개의 절편으로 거의 동일하게 잘렸으며 제한효소 HindIII로 절단시에는 7개와 6개의 절편으로 절단되면서 비슷한 절단양

상을 나타내어 이 2개의 plasmid가 동일한 균에서 유래된 plasmid일 것으로 생각되었다. 균수가 적어 epidemic strain이라 말하기는 어렵지만 만약 이 2 개의 plasmid가 동일한 균에서 전파되었다면 제한효소 HindIII에서 절단양상의 차이를 보인것과 내성유형의 차이를 보인것은 제한효소 HindIII가 인지하여 절단하는 부위를 포함한 plasmid 염기서열상에 point mutation 등에 따른 돌연변이주의 발생에 기인하였을 것으로 생각된다. 그러나 정확히 같은 plasmid에서 유래한 것인지 아닌지를 밝히기 위해서는 plasmid DNA 서로간의 homology를 검사하는 DNA-DNA hybridization 실험이나 plasmid DNA의 base sequencing에 의한 유전자 지도작성 등이 추가되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

각종 임상가검물로부터 분리된 42주의 *Enterobacter*를 대상으로 균의 약제내성화 실태 파악과 적절한 항균제의 선별을 위한 기본자료의 제공 그리고 R plasmid DNA 분석을 통한 plasmid DNA의 분자생물학적 특성규명을 추구하여 내성화에 대한 대책수립의 기본적 자료를 확보하고자 균의 분리동정, 항균제 감수성검사, 접합에 의한 내성전달실험, R plasmid의 분리 및 제한효소 처리에 의한 DNA 절편분석 등을 시행하였다.

각종 임상가검물로부터의 균의 분리빈도는 요(38.1%), 객담(26.2%), 창상부위(16.7%)의 순으로 나타나 요에서 가장 높은 분리 빈도를 나타내었다. 19종의 항균제에 대한 감수성 검사 결과 Ex, Nf, Cp, Of, Pf에는 전 균주가 감수성이었으며, Gm, Ak, Na, Tc, Tp에는 7.1~21.4%, Cfm, Km, Sm, Cm에는 2 6.2~42.9%, Ap, Clt, To에는 47.6~69%의 내성도를 나타내었다. 90% 균주의 성장을 억제하는 항균제 농도인 90%MIC에서 Ex, Nf, Cp, Of, Pf는 <0.5μg/ml로 실험최소항균제농도 이하를 나타내었으며 Ap, Clt, Cfm, Sm, Km, Cm은 실험최고항균제농도 이상을 나타내었다. 다약제내성 양상 중에서 가장많은 약제에 내성을 보인 것은 CmTcSmApTpNaKmAk-ToCltCfm의 11개 약제내성을 가진 것이었다. 접합에 의한 내성전달 성적은 47%의 전달율을 나타내어 전달성 R plasmid가 내성전파에 매우 중요한 인자임을 알수 있었다. R plasmid DNA를 분리하여 분자량을 측정한 결과 대부분 분자량 43.1~83.4 Mdal

의 중형 plasmid들 이었다. R plasmid를 제한효소 EcoR I과 HindIII로 절단하여 그 결과를 전기영동으로 분석한 결과 분자량은 77.1 Mdal으로 같았으나 내성유형의 차이를 보인 pDE8803과 pDE8810이 제한효소 EcoR I으로 절단시에는 거의 동일한 절단상을 나타내었고 제한효소 HindIII로 절단하였을 시에는 약간의 차이는 보이나 비슷한 절단 양상을 나타내어 동일한 균에서 유래된 plasmid일 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Zwadyk P: Opportunistic enterobactericeae, in Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM (eds): *Zinsser Microbiology*, ed 19. Connecticut, Appleton and Lange, 1988, pp. 464-472.
2. Falkow S: The enteric bacilli and vibrios, in Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS(eds): *Microbiology*, ed 4. Philadelphia, J. B. Lippincott Co, 1990, pp. 561-587.
3. Schaberg DR, Turck M: Disease caused by gram negative enteric bacilli, in Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK(eds): *Harrison's Principles of Internal Medicine*, ed 12. New York, McGraw-Hill Inc, 1991, pp. 600-606.
4. Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, et al: *Enterobacter* bacteremia: Clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med* 1991; 115: 585-590.
5. Lindh E, Dornbusch K, Jalakas K, et al: Antibiotic susceptibility and β -lactamase production in clinical isolates of *Enterobacter* spp. *APMIS* 1990; 98: 462-470.
6. Gaston MA, Crees-Morris JA, Pitt TL: Serotypes and biochemical profiles of British hospital strains of *Enterobacter cloacae* in relation to site of infection and antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect* 1987; 10: 17-27.
7. Farrar WE Jr: Antibiotic resistance in intestinal bacteria. *Clin Gastroent* 1979; 8: 803-826.
8. Pattee PA, Baldwin JN: Transduction of resistance to chlorotetracycline and novobiocin in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1961; 82: 875-881.
9. 배원기, 서성일, 서민호: 임상가검물에서 분리된 Gram음성 간균의 항균제 감수성. 계명의대논문집 1990; 9: 409-417.
10. Ewing WH: *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*, ed 4. New York, Elsevier Science Publishing Co, 1986, pp. 1-530.
11. Steers E, Flot EL, Graves BS: Inocular replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chemother* 1959; 9: 307-311.
12. Thornsberry C: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1983, pp. 31-91.
13. Smith JA, Henry D, Ngu-Yen J, et al: Comparison of agar dilution, microdilution, and disk elution methods for measuring the synergy of cefotaxime and its metabolites against anaerobes. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 1104.
14. 서민호, 박종욱, 서성일: 이질균의 R plasmid의 유전적 특성. 계명의대논문집 1988; 7: 249-257.
15. 서민호, 설성용, 조동택, 전도기: *Shigella* R Plasmid와 recombination 현상. 대한미생물학회지 1990; 25: 195-202.
16. Kado CI, Liu ST: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145: 1365-1373.
17. Birnboim IC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1513-1523.
18. Toala P, Lee YH, Wilcox C, et al: Susceptibility of *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* to 19 antimicrobial agents in vitro. *Am J Med Sci* 1970; 260: 41-55.
19. Heusser MF, Patterson JE, Kuritza AP, et al: Emergence of resistance to multiple beta-lactams in *Enterobacter cloacae* during treatment for neonatal meningitis with cefotaxime. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9: 509-512.
20. Bush K: Classification of β -lactamases: Groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 264-270.
21. Muytjens HL, Van der Ros-van de Repe J: Comparative in vitro susceptibilities of eight *Enterobacter* species, with special reference to *Enterobacter sakazakii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29: 367-370.
22. Eliopoulos GM, Gardella A, Moellering RC Jr: In vitro activity of ciprofloxacin, a new carbonyquinoline antimicrobial agent. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 331-335.

23. Chin NX, Neu HC: Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 319-326.
24. 하경임, 서성일, 박종욱, 서민호: 대장균의 R plasmid의 특성과 항균제 내성. 대한미생물학회지 1990; 25: 19-26.
25. 서민호, 이명옥, 서성일: *Shigella* R plasmid의 Recombination현상. 대한미생물학회지 1990; 25: 195-202.
26. 이경란, 백원기, 서성일, 박종욱, 서민호: 임상 가검물에서 분리한 *Klebsiella pneumoniae* plasmid의 분자유전적 특성. 대한미생물학회지 1991; 26: 25-35.
27. Bezanson GS, Pagnutti D: Plasmid profiles of value in differentiating *Salmonella muenster* isolates. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 1159-1160.
28. Holmberg SD, Cohen ML: Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella typhimurium* isolates from outbreaks. *J Clin Microbiol* 1984; 19: 100-104.

=Abstract=

Antimicrobial Drug Resistance and Molecular Characterization of R Plasmid for *Enterobacter*

Seong Hong Kam, MD; Won Ki Baek, MD; Min Ho Suh, MD

*Department of Microbiology, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea*

Forty two strains of *Enterobacter* isolated from clinical specimens in Taegu area were tested for the antimicrobial susceptibility to 19 drugs and studied for molecular and genetic characterization of R plasmid. 38.1% of the strains were isolated from urine and 26.2% from sputum. All strains were susceptible to enoxacin(Ex), norfloxacin(Nf), ciprofloxacin(Cp), ofloxacin(Of) and pefloxacin(Pf).

7.1-21.4% of the strains were resistant to gentamicin(Gm), amikacin(Ak), nalidixic acid(Na), tetracycline(Tc), and trimethoprim(Tp), 26.2-42.9% to cefamandole(Cfm), kanamycin(Km), streptomycin(Sm), chloramphenicol(Cm) and 47.6-69% to ampicillin(Ap), cephalothin(Clt), tobramycin(To).

MIC90 of Ex, Nf, Cp, Of and Pf were below the antimicrobial concentration tested. Most of drug resistances except to Na and Rf in 47% of resistant strains were co-transferred to recipient *E. coli* RG488 or RG176, indicating that multiple drug resistance were R plasmid mediated phenomenon.

Plasmid profiles for molecular characterization of R plasmids from *Enterobacter* strains were studied through the methods of alkaline SDS lysis and agarose gel electrophoresis. R plasmids were 43.1-83.4 mega dalton in molecular size. *EcoR I* and *HindIII* restriction enzyme digestion patterns of R plasmid DNAs were examined. R plasmids that had different molecular weights and phenotype markers showed different restriction patterns. pDE8803 and pDE8810, which have different phenotype marker but same molecular weight, showed identical *EcoR I* digestion pattern and similar *HindIII* digestion pattern, so We think these two R plasmids were derived from same source.

Key Words: Antibiotics, *Enterobacter*, R plasmid