대장균의 R plasmid의 특성과 항균제 내성

Characterization of R plasmid and Antimicrobial drug Resistance of Escherichia coli

저자
(Authors)

하경임, 서성일, 박종욱, 서민호
Kyung-Im Ha, Seong-Il Suh, Jong-Wook Park , Min-Ho Suh

출처
(Source)

The Journal of the Korean Society for Microbiology 25(1), 1990.2, 19-26 (8 pages)

발행처
(Publisher)

대한미생물학회
The Korean Society For Microblology

URL

http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01488685

APA Style

하경임, 서성일, 박종욱, 서민호 (1990). 대장균의 R plasmid의 특성과 항균제 내성. The Journal of the Korean Society for Microbiology, 25(1), 19-26.

이용정보
(Accessed)

계명대학교
203.247.13.27
2016/01/11 09:42 (KST)

저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.
이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.
You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

大韓微生物學會誌: 第25卷 第1號 1990
J. Korean Soc. Microbiol., Vol. 25, No. 1, 1990

대장균의 R plasmid의 특성과 항균제 내성

계명대학교 의과대학 미생물학교실

하경임 · 서성일 · 박종욱 · 서민호

=Abstract=

Characterization of R plasmid and Antimicrobial drug Resistance of *Escherichia coli*

Kyung-Im Ha, Seong-Il Suh, Jong-Wook Park and Min-Ho Suh

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

One hundred and four strains of *Escherichia coli* isolated in Taegu area were tested for the antimicrobial susceptibility to 15 drugs. All strains were susceptible to amikacin(AK) and moxalactam(MX). 1.9-3.9% of the strains were resistant to cefamandole(Cmd), nalidixic acid(Na) and rifampin(Rf), and 18.3-21.2% were resistant to gentamicin and cephalothin. 41.3%-57.7% were resistant to kanamycin, streptomycin(Sm), chloramphenicol(Cm), and trimethoprim(Tp). 67.6-83.7 % were resistant to penicillin(Pc), ampicillin(Ap), tetracycline(Tc), and sulfamethoxazol(Smx). MIC90 of Ak, Mx, amd Na was 8μg/ml. MIC90 of other drugs were about 16-1,024μg/ml.

Strains multiply resistant to the 8 drugs, Cm, Tc, Sm, Smx, Ap, Km, Tp, Pc were most frequently encountered.

Most of drug resistances except to Na and Rf in 75.3% of resistant strains were co-transferred to recipient *E. coli* RG176 or RG488, indicating that multiple drug resistances were R plasmid mediated phenomenon.

Plasmid profiles for molecular characterization of R plasmids from *E. coli* strains were studied through the methods of alkaline SDS lysis and agarose gelectrophoresis. Most of R plasmids were 63.2 to 79.8 Mdal in molecular size.

*Eco*RI restriction enzyme digestion patterns of R plasmid DNAs were examined. R plasmid of 79.8 Mdal in size had 13 DNA fragments, their molecular sizes were 4 to 25 kilobase R plasmids of 63.2 Mdal in size had 7 to 16 fragments, 3 to 25 kilobase in size and those of 66.8 Mdal in size had 11 fragments, 8 to 25 kilobase in size.

Key Words: *Escherichia coli*, R-plasmid

서 론

대장균은 뇨로감염, 설사증, 뇌막염, 패혈증 등 임상적으로 많은 질환을 유발하며 특히 유소아나 노약자 및 면역결핍증 환자들에게는 치명적인 결과를 초래하는 경우도 있다고 한다[15]. 대장균 감염증을 효과적으로 치료하는데 있어서는 원인균의 조속한 분리동정과 적절한 항균제의 선택이 필수적이라 보고한 바 있다[10,17,18].

항균제가 감염병의 치료에 도입되었을 때에는 대다수의 균이 감수성이어서 감염병의 치료는 더이상의 큰 문제가 되지 않을 것으로 기대되었으나 약제의 사용이 빈번해짐에 따라 약제의 남용과 내성균의 출현 등으로 약제에 대한 균의 감수성이 급격히 저하하여 항균제의 선택에 큰 어려움을 주고 있는 실정이다.

이들 균의 약제내성화의 기전으로는 특정한 유전물질전달체가 없이 단순히 DNA(deoxyribonucleic acid)를 받아들이므로써 생기는 trans-

계명대학교 | IP: 203.247.13.27 | Accessed 2016/01/11 09:42(KST)

formation과, bacteriophage가 매개하는 transduction, 그리고 plasmid가 매개하여 균체간의 집합에 의해서 전달되는 conjugation등이 알려져 있으며[8,9,22] 특히 Gram 음성균에 있어서는 비염색체성 유전물질인 resistance plasmid(R plasmid) DNA에 의해 다약제내성이 타균으로 전파되는 경우가 가장 많다고 보고되어 있다[11,21].

내성균의 출현을 줄이기 위해서는 항균제 남용을 방지할 수 있는 사회제도적 보완이 요구되지만[3] 그에 앞서 내성균이 갖고있는 R plasmid DNA의 특성에 대해 분자생물학적, 유전학적으로 자세한 규명이 필요하다고 보고된 바가 있다[1,2].

저자는 최근에 분리된 *E. coli*에 대해 15종의 항균제를 선정하여 약제내성의 실태 및 내성화 기전을 조사함과 아울러 plasmid DNA의 분석을 통하여 R plasmid의 분자생물학적 성질을 규명하고, 내성화에 대한 대책수립의 기본적 자료를 확보하고자 원인균의 분리동정, 항균제 감수성검사, 접합에 의한 내성전달검사, plasmid DNA의 분리 및 전기영동, 제한효소처리에 의한 DNA절편분석 등을 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 균주분리 및 동정

1987년에서 1988년 사이에 계명대학교 의과대학 미생물학 교실에서 분리, 동정된 *E. coli* 104주를 실험에 사용하였다. 동정기준은 Edwards 및 Ewing[7], Lennette[18] 및 Koneman등[17]의 방법에 준하였다.

2. 항균제 감수성검사

15종 항균제, amikacin(Ak), gentamicin(Gm), kanamycin(Km), streptomycin(Sm), cephalothin(Cl), cefamandol(Cmd), moxalactam(Mx), penicillin(Pc), ampicillin(Ap), chloramphenicol (Cm), tetracyclin(Tc), sulfamethoxazole(Smx), trimethoprim(Tp), nalidixic acid(Na), 및 rifampin (Rf) 에 대한 감수성검사는 Steers 등[24]의 multiple inoculator를 이용한 agar dilution method[17,18]를 사용하였다. 매 실험마다 정도관리의 공정성을 기하기 위하여 ATCC(American Type Culture and Collection)의 표준균주들 (*E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923)을 함께 실시하였고, 내성균의 판정은 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standard)의 판정기준[26]에 준하였다.

3. Conjugation에 의한 내성전달검사

접합에 의한 전달성 내성인자를 검사하기 위하여 피전달균으로, 각 약제에는 감수성이나 Rf에 염색체 내성인 *E. coli* RG176을 사용하였다. 선택배지는 Mueller Hinton(MH)배지에 약제에 따라 15~20μg/ml의 선택약제와 피전달균이 내성인 Na 또는 Rf를 50μg/ml씩 첨가하여 내성을 전달받은 피전달균을 선택배지에 접종하여 증식되지 않음을 확인하였다[1,2].

4. Plasmid DNA의 분리 및 전기영동

Plasmid DNA는 Kado와 Liu[16]의 방법을 사용하여 분리하였다. 전기영동은 0.7% agarose gel (15×15cm, agarose type I)과 TBE buffer(89mM Tris base, 89mM Boric acid, 2mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 수평형 영동장치로 90mA, 90volt로 4시간 동안 submarine electrophoresis를 실시하였다. Plasmid의 분자량측정을 위하여 매 영동마다 R1033(45 mega dalton:Mdal), RP4(38 Mdal), 및 R6K(26 Mdal)등의 표준 plasmid DNA를 size marker로 사용하였으며 영동된 gel은 0.5μg/ml의 ethidium bromide로 염색시켜 UV transilluminator를 이용하여 사진촬영을 하고 plasmid DNA의 영동거리를 표준 plasmid DNA의 영동거리와의 linear regression을 이용하여 분자량을 계산하였다.

5. 제한효소 처리에 의한 R plasmid DNA절편분석

BRL(Bethesta Research Laboratory)제 제한효소 *Eco*RI을 실험에 사용하였다. 증류수에 녹인 DNA에 제한효소와 Buffer(100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, lmM DTT)를 첨가한 후 37℃에서 90분간 반응시키고 0.5M EDTA, 0.25% BPB, 0.25% xylene cyanol 및 40% sucrose를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 전기영동 하였다[19]. Gel의 농도를 0.8%로 하여 수평형 영동장치로 25mA, 20volt로 18시간 submarine electrophoresis 하였다. 분자량 측정을 위하여 매 전기영동마다 제한효소에 처리된 lambda DNA를 size marker로 사용하였다.

계명대학교 | IP: 203.247.13.27 | Accessed 2016/01/11 09:42(KST)

성 적

15종의 항균제에 대한 *E. coli*의 내성성적은 Table 1과 같다. Ak와 Mx에는 내성균이 없었고 Cmd와 Na 및 Rf에도 1.9-3.9%의 낮은 내성을 나타내었다. Gm과 Cl에도 18.3-21.2%의 낮은 내성을 나타내었고 Km, Sm, Cm, Tp에는 41.3-57.7%의 높은 내성을 나타내었다. Pc, Ap, Tc, 및 Smx에는 67.6-83.7%의 높은 내성을 나타내었다.

90% MIC를 보면 Ak, Mx, 및 Na는 8μg/ml로 낮았으나 나머지 약제는 모두 16-1024μg/ml로 내성균의 판정 기준치[15] 보다 훨씬 높았다.

다약제 내성 *E. coli*의 내성기전 및 전달성 내성인자를 조사하기 위해 실시한 접합에 의한 내성전달 성적은 Table 2와 같다. 내성양상에 따라 50-100%(평균 75.3%)의 내성전달 빈도를 볼 수 있었다. 다약제 내성양상 중에는 CmTcSmSuApKmTpPc 내성균이 4주, CmTcSmSuApKmClTpPc 내성균이 3주였으며 그외의 내성형은 대부분이 2주씩 이었다.

Figure 1은 실험균 및 피전달균에서 분리된 Plasmid DNA의 전기영동 양상을 나타낸 것이다. Lane A는 분자량 45.0Mdal의 R1033이며 Lane B는 26.0Mdal의 R6K, Lane C는 38.0Mdal의 RP4, Lane D는 E327의 영동상을 나타

Table 1. Antimicrobial drug susceptibility of *Escherichia coli*[a]

Drug	number(%) of resistant strains	90%MIC (ug/ml)[b]
amikacin	0 (0)	8
gentamicin	19 (18.3)	32
kanamycin	54 (51.9)	64
streptomycin	60 (57.7)	64
cephalothin	22 (21.2)	64
cefamandole	3 (2.9)	16
moxalactam	0 (0)	8
penicillin	87 (83.7)	64
ampicillin	76 (73.1)	64
chloramphenicol	53 (51.0)	64
tetracycline	65 (67.6)	16
sulfamethoxazole	74 (71.2)	1,024
trimethoprim	43 (41.3)	32
nalidixic acid	2 (1.9)	8
rifampin	4 (3.8)	16

[a]Total 104 strains were tested. [b]Concentration required for inhibition of 90% of strains.

Table 2. Conjugal transfer of multiple drug resistances of *Escherichia coli*

Resistance patterns of donor[a]	number of strains	number(%) of strains conjugally transferred[b]
CmTcSmSuApKmTpPc	16	13 (81.3)
CmTcSmSuApKmGmTpPc	4	4 (100.0)
CmTcSmSuApKmClTpPc	3	3 (100.0)
CmTcSmSuApKmClPc	2	1 (50.0)
CmTcSmSuApClPc	2	1 (50.0)
CmTcSuApTpPc	2	1 (50.0)
CmTcKmRfPc	2	2 (100.0)
TcSmSuApKmPc	2	2 (100.0)
TcSmSu	2	2 (100.0)
SuApKmGmClCmdPc	2	2 (100.0)
SuApKmGmPc	2	1 (50.0)
SuApKmPc	2	2 (100.0)
ApKmPc	2	1 (50.0)
Miscellaneous patterns	34	23 (67.6)
Total	77	58 (75.3)

[a]*E. coli* expressing resistances to three or more drugs were tested. [b]*E. coli* RG176 or RG488 were used as recipients.

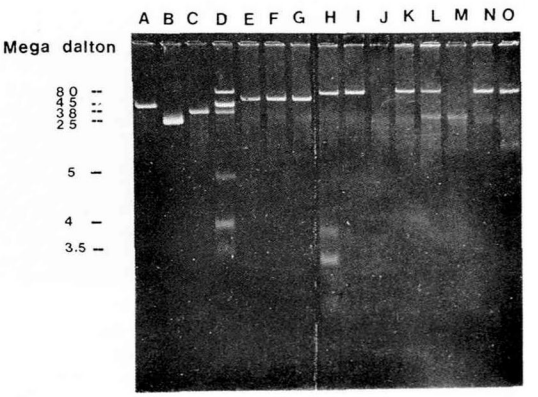

Fig. 1. Electrophoretic patterns of plasmid DNAs from *E. coli* and their transconjugants (0.7% agarose gel electrophoresis, 90mA, 90V, 4 hours). A. R1033, B. R6K, C. RP4, D. E327, E. 87E14(RG176), F.87E30(RG176), G. 88E4 (RG488), H. 87E18, I. 87E18(RG176), J. RG488, K. 87E24(RG176), L. 88E1(RG176), M. RG176, N. 88E7(RG176), O. 88E38 (RG176).

계명대학교 | IP: 203.247.13.27 | Accessed 2016/01/11 09:42(KST)

Table 3. R plasmid profiles of *Escherichia coli* and their transconjugants

Name of R plasmid	phenotypic marker	molecular weight (Mega dalton)
pDE703	CmTcSmSuApKmTpPc	79.8
pDE711	CmTcSuApPc	79.8
pDE714	TcSmSuApKmPc	63.2
pDE718	CmTcSmSuApKmClTpPc	79.8
pDE724	CmTcSmSuApKmTpPc	79.8
pDE730	CmTcSmSuApKmGmTpPc	63.2
pDE801	CmTcSmSuApKmTpPc	79.8
pDE804	CmTcSmSuApKmTpPc	63.2
pDE807	CmTcSmSuApKmTpPc	79.8
pDE810	CmTcSmSuApKmGmPc	66.8
pDE813	SuApKmGmClCmdTpPc	63.2
pDE816	TcApPc	63.2
pDE825-1	CmTcSuApKmGmTpPc	79.8
pDE825-2	CmTcSuApKmGmTpPc	63.2
pDE838	CmTcSmSuApKmClPc	63.2
R1033		45.0
R6k	SmAp	25.0
Rp4	ApKmTc	38.0

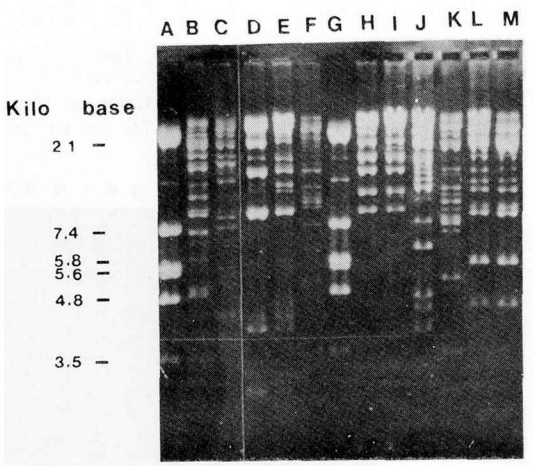

Fig. 2. Restriction endonuclease analysis patterns of R plasmids from *E. coli* (digested with *Eco*RI, 0,8% agarose gel electrophoresis, 25 mA, 20 V, 18 hours). A. Lambda DNA, B. pDE702, C. pDE711, D. pDE804-1, E. pDE804-2, F. pDE808, G. Lambda DNA, H. pDE810-1, I. pDE810-2, J. pDE813-1, K. pDE813-2, L. pDE816-1(in RG176) M. pDE816-2(in RG488).

낸 것이다. Lane E, F, G, O는 *E. coli* 87E14, 87E30 88E4, 및 88E38의 R plasmid의 영동상으로 분자량은 79.8Mdal이었다. Lane J, M은

Table 4. *Eco*RI digestion patterns of R plasmid DNAs from *Escherichia coli*

Name of plasmid	Molecular weight(Mega dalton)	Number of fragments	Range of molecular weight (Kilo base)
pDE702	63.2	15	15-25
pDE711	79.8	13	4-25
pDE714	63.2	7	18-25
pDE724	79.8	9	7-25
pDE802	79.8	13	6-25
pDE804	63.2	10	3-25
pDE808	79.8	13	5-25
pDE810-1	66.8	11	8-25
pDE810-2	66.8	11	8-25
pDE813-1	63.2	16	4-25
pDE813-2	63.2	16	5-25
pDE816	63.2	11	4-25
pDE838	63.2	10	8-25

plasmid가 없는 *E. coli*에 있어서 R plasmid의 내성양상별 종류와 분자량을 나타낸 것이다. 내성양상은 다양하였으나, R plasmid의 분자량은 79.8Mdal과 63.2Mdal의 것이 대부분이었고, 66.8Mdal의 것도 있었다. R1033과 R6K 및 RP4는 control plasmid이다.

Figure 2는 *E. coli*의 R plasmid DNA를 제한효소 *Eco*RI으로 절단하여 그 분획을 전기영동한 것이다. Lane A와 G는 Lambda DNA로서 3.5-21Kilobase 사이의 6개의 절편을 갖고 있었다. Lane B, C, D, E, F, H, I, J, K, L 및 M은 *E. coli*유래 R plasmid인 pED816으로서 host cell만 L은 RG176이고 M은 RG488로서 다른 경우인데, 이때 제한효소의 절단양상은 동일하였다.

Table 4는 *Eco*RI으로 처리된 R plasmid DNA 절편의 분자량 및 분획수를 나타낸 것이다. 79.8Mdal의 R plasmid들은 13개의 분획을 가졌고 분자량은 4-25 kilobase였다. 63.2Mdal의 R plasmid들은 분획의 수가 7-16개로 다양하였으며 분자량은 3-25 kilobase였다. 66.8Mdal의 R plasmid들은 11개의 분획을 가졌고 분자량은 8-25 kilobase였다. 또 R plasmid pDE 810은 접합시에는 Ap로 선택된 pDE810-1이나 Km으로 선택된 pDE810-2나 EcoRI 절단양상이 동일하였다. R plasmid pDE813은 접합시에 Ap로 선택된 pDE813-1과 Km으로 선택된 pDE813-2는 그 절편이 수는 동일하였으나 분자량의 크기가 전

계명대학교 | IP: 203.247.13.27 | Accessed 2016/01/11 09:42(KST)

자는 4-25kilobase사이이고 후자는 5-25kilobase 사이로서 다소 차이가 있었다.

고 찰

*E. coli*는 신우신장염 등의 뇨로감염, 창상감염, 뇌막염, 패혈증 및 설사증 등을 유발하는 감염병의 중요한 원인균의 하나이다[15]. 세균감염의 최선의 대책은 조속한 원인균의 분리동정과 적절한 항균제의 선택에 달려있다고 하겠다[17,18].

대장균의 분리동정은 Lennette등[18], Koneman[17], Edwards 및 Ewing[7]등 여러가지 방법이 소개되어 있어서 비교적 쉽고 정확하게 균검출이 이루어지고 있다. 그러나 약제에 대한 내성균의 출현이 증가함에 따라 과거와 같이 어느 균에 어느약제가 잘 듣는다는 통념은 적용되기 어렵고, 적절한 항균제의 선택에 큰 어려움을 주고 있으며 감염병 치료에 있어서 가장 큰 난제중의 하나인 실정이다[9,10].

내성균이 증가되는 것은 항균제의 남용으로 인한 균의 내성화가 가장 큰 이유라 하겠다[3,9]. 세균의 내성화기전으로는 항균제의 사용으로 인해 감수성균은 사멸하고 내성을 가진 돌연변이주만이 선택적으로 살아남게 되었다는 돌연변이설도 있으나 이것은 다약제에 중복내성(multiple drug resistance)을 나타내는 내성기전을 설명하기에는 확률적으로 불가능하였다[22,27].

이에 대두된 것이 resistance plasmid(R factor)에 의한 감염성 내성획득의 이론이다[21,27]. R factor는 비염색체성 유전물질로서 일종의 plasmid이며 이것이 균체간의 접합을 지령하여 타균으로 전달되어서 R plasmid를 전달 받은 균은 R plasmid가 지령하는 다약제에 동시에 내성을 갖게됨이 보고 되었다[13,21].

이 실험에서는 최근에 분리된 *E. coli*에 대한 항균제 감수성을 조사하였는데 aminoglycoside 계열의 항균제인 Ak와, 최근에 개발된 제3세대 cephalosporin계열인 Mx 등에는 내성균이 없어서 약효가 가장 우수함을 알수 있었다. 그 다음으로는 2세대 cephalosporin인 Cmd와, quinolone계열인 Na, 그리고 Rf등으로서 내성율이 4% 이하로 약효가 우수함을 알 수 있었고, Gm과 Cl도 18.3-21.2%만이 내성이어서 감수성이 높음을 알 수 있었다. 그러나 임상적으로 흔히 쓰이고 있는 Ap나Tc, Smx등에는 65-76%의 균이 내성을 나타내어, 대장균 감염에 대한 부적절한 치료가 야기될 수 있음을 시사하였다. 또 흔히 쓰이는 Cm 및 Km도 53-54%에서 내성을 나타내어, 과반수 이상의 경우에서 약효를 기대할 수 없음을 알 수 있었다. 그리고 균 내성화정도를 실질적으로 파악할 수 있는 percent MIC(%MIC), 특히 90%의 균주의 성장을 억제시킬 수 있는 농도인 90% MIC 성적을 보면 약제내성화가 훨씬 심각함을 알 수 있었다. 즉 Ak, Mx, Na 등은 8μg/ml로서 낮았으나 나머지 약제들은 모두가 16-1024μg/ml로서, 대장균의 내성판정기준치보다 훨씬 높았으며 이러한 사실은, 내성균은 말할 것도 없고 감수성인 균들도 MIC에 있어서는 매우 높음을 시사하는 것이다. 즉 MIC가 질적으로는 감수성이지만 그 양적으로는 거의 내성균에 접근해 있다는 것이다.

이러한 약제내성화를 최소한으로 줄이기 위해서는, 항균제 남용을 방지할 수 있는 사회제도적, 보건행정적 보완이 필요하나[3] 그에 앞서 내성화기전의 조사분석과 R plasmid DNA의 유전학적 및 분자생물학적 특성을 규명하여 약제내성의 실태 및 내성화기전의 유전자차원에서의 자세한 이해가 필요한 실정이다[2,4,25]. 이러한 견지에서 본 실험에서 접합에 의한 *E. coli*의 내성전달실험을 실시하였다. 그결과 다약제에 동시내성인 균 77주 중에서 58주가 Na 및 Rf를 제외한 원래의 내성양상 모두를 피전달균인 RG176이나 RG488로 전달시켜 75.3%의 높은 내성전달율을 나타내었다. 이것은 대장균의 내성전파의 대부분이 전달성 R plasmid에 의한 것임을 뜻하며, 약제내성화의 주된 원인이 돌연변이나 선택이 아니라 conjugation에 의한 감염성 내성인자의 전파임을 의미한다.

이들 내성인자의 분자생물학적 특성을 알기 위해 균체로부터 R plasmid DNA를 분리하고 전기영동법으로 분석한 결과, 대부분의 R plasmid DNA는 분자량 63.2-79.8Mdal의 중형 plasmid로서 covalently closed circular DNA임을 알 수 있었다. 이것은 분자량이 70Mdal 정도인 *Shigella*의 R plasmid와 유사한 크기라고 볼 수 있어서, 장내세균간에 R plasmid DNA의 전달에 의한 내성화의 만연이 시사되었다.

그러나 균종이 다른 R plasmid들 끼리의 유사성인, R plasmid가 어느 균에서 기원했는지를 파악하기 위해서는 plasmid DNA 서로간의 Homology를 검사하는 DNA-DNA hybridization 실험[4,12]이나, 각종 균종들이 보유하고 있는

계명대학교 | IP: 203.247.13.27 | Accessed 2016/01/11 09:42(KST)

plasmid 각각의 분자적 특성규명 등이 이루어져야 하며 나아가서 각 plasmid DNA의 base sequencing[5]에 의한 유전자 지도작성과 상호 비교분석등이 필요하다고 하겠다.

이 실험에서는 항균제 내성의 표현형에 따라 R plasmid DNA들이 서로 어느정도 차이가 있는 지를 파악하기 위해 DNA염기서열상의 G-A-A-T-T-C palindrome부위를 선택적으로 자르는 제한효소 *Eco*RI을 이용하여 plasmid DNA들을 절단하고 전기영동시켜 분석하였다. 제한효소로 처리한 plasmid DNA절편의 비교분석은 어느 한 균에서 R plasmid가 여러 다른 균으로 전파되어 균의 내성화를 초래할 경우 그 기원을 추적하는 Molecular Epidemiology[6,14]의 중요한 연구방법으로서 유용하게 쓰일 수 있다. 실험 결과 내성양상에는 큰 차이없이 79.8 Mdal의 R plasmid 들은 13개의 분획으로 절단되었고 절편의 크기는 4-25 kilobase 사이였다. 63.2Mdal의 R plasmid들은 7-16개의 분획으로 절단되었고 절편의 크기는 3-25kilobase 사이였다. 66.8Mdal의 R plasmid는 11개의 분획을 가졌고 절편의 크기는 8-25 kilobase였다. 또 동일한 R plasmid를 서로 다른 *E. coli* host cell에 전달시켜 증식시킨 후, 제한효소로 처리한 결과, 동일한 양상의 절편을 관찰할 수 있어서 동일한 R plasmid는 다른 균주로 전파 되어도 일정한 DNA염기서열을 그대로 유지하고 있으며 Host cell의 차이에는 무관함을 알 수 있었다.

그러나 R plasmid pDE813은 접합시에 Ap media로 선택된 후 분리된 pDE813-1과, Km media로 선택된 후 분리된 pDE813-2의 두 segment DNA에 있어서는 제한효소에 의한 절편의 수는 16개로 동일하였으나 절편의 크기는 pDE813-1의 경우는 4-25 kilobase사이였고 pDE813-2는 5-25 kilobase사이로서 다소 차이가 있었는데, 이것은 R plasmid DNA상에는 실질적으로 항균제내성을 지령하는 여러개의 transposon[23]들이 존재하는데 이들이 선택환경에 따라서 다시 recombination되거나, 유전표현되는 양상이 다소 변화되어 생겼거나, 혹은 단순히 분리배양되는 동안에 DNA염기서열에 약간의 변화가 생긴 돌연변이주가 분리되어 차이가 생겼을 수도 있다.

그러나 앞으로 특정 transposon을 감지할 수 있는 DNA probe를 이용한 restriction fragment length polymorphism(RFLP)[20]등의 실험이 추가된다면 이러한 현상을 더욱 확실히 이해할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

임상가검물에서 분리된 104주의 *Escherichia coli(E. coli)*에 대해 적절한 항균제의 선별과 약제내성의 기전을 조사함과 아울러 R plasmid의 분석을 통하여 plasmid DNA의 분자생물학적 특성을 규명하여, 내성화에 대한 대책수립의 기본적 자료를 확보하고자, 균분리동정, 항균제 감수검사, 접합에 의한 내성전달검사, R plasmid DNA의 분리 및 제한효소에 의한 DNA 절편 분석등을 실시하였다.

Amikacin(Ak)과 moxalactam(Mx), cefamandol(Cmd), nalidixic acid(Na), 및 rifampin(Rf)에는 0-38%의 아주 낮은 내성을 나타내었고, gentamicin (Gm)과 cephalothin (Cl)에도 18.3-21.2%의 낮은 내성을 나타내었다. Kanamycin (Km), streptomycin(Sm), chloramphenicol(Cm), 및 trimethoprim(Tp)에는 41.3-57.7%의 내성을 나타내었고 *penicillin*(Pc), *ampicillin*(Ap), *tetracycline* (Tc), 및 sulfamethoxazol (Smx)에는 67.6-83.7%의 높은 내성을 나타내었다.

90%의 균주의 성장을 억제시키는 농도인 90% MIC (Minimal Inhibitory Concentration)는 Ak, Mx, Na는 8μg/ml로 낮았으나 나머지 약제는 모두 16-1024μg/ml로 매우 높았다.

다약제 내성양상으로는 CmTcSmSuApKmTp-Pc 등 8가지 약제에 동시내성인 것이 16주로서 가장 많았고 그외의 내성형은 다양하게 분포되어 있었다.

내성전달 성적은 전체의 75.3%가 접합에 의하여 recipient *E. coli* RG176이나 RG488로 내성을 전달하여 그 내성의 원인이 전달성 R plasmid에 기인함을 알 수 있었다.

R plasmid DNA를 분리하여 분자량을 측정한 결과 대부분은 크기가 63.2-79.8 megadalton (Mdal)의 중형 plasmid이었다.

R plasmid DNA를 제한효소 *Eco*RI으로 절단하여 그 절편을 분석한 결과 79.8Mdal의 R plasmid들은 13개의 분획을 가졌고 4-25 kilobase의 크기였으며, 63.2Mdal의 R plasmid들은 분획의 7-16개로 다양하였고 분자량은 3-25 kilobase였다. 66.8Mdal의 R plasmid는 11개의 분획을 가졌고 분자량은 8-25 kilobase였다. 또 동일한 R plasmid로서 host cell만 다른 경우의 제한효소 절단양상은 동일하였다.

계명대학교 | IP: 203.247.13.27 | Accessed 2016/01/11 09:42(KST)

참 고 문 헌

1) 서민호, 박종욱, 서성일:이질균의 R plasmid의 유전적 특성. 계명의대논문집, **7**: 249-257, 1988.
2) 서민호, 설성용, 조동택, 전도기:*Shigella*의 R plasmid의 특성과 항균제 내성의 본태. 대한화학요법학회지, **2**: 97-114, 1984.
3) 임영수, 이유철, 서민호, 설성용, 조동택, 전도기:*Pseudomonas aeruginosa*의 pyocin형 및 항균제 내성. 대한화학요법학회지, **1**: 270-279, 1983.
4) Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K: Current protocols in molecular biology. 1st ed. John Wiley and Sons Inc., New York, pp2. 9. 1-9. 4, 1987.
5) Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K: Current protocols in molecular biology. 1st ed. John Wiley and Sons Inc., New York, pp7. 1.-7. 6, 1987.
6) Bezanson GS and Pagnutti D: Plasmid profiles of value in differentiating *Salmonella muenster* isolates. *J. Clin. Miorobiol.*, **17**:1159-1160, 1983.
7) Edwards PR and Ewing WH:Identification of *Enterobacteriaceae.* 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., New York, pp93-136, 1986.
8) Falkow S:Infectious multiple drug resistance. 1st ed. Methuen Inc., New Yourk, pp1-110, 1975.
9) Farrar WE Jr:Antibiotic resistance in intestinal bacteria. *Clin. Gastroent.*, **8**:803-826, 1979.
10) Finland M:Changing patterns of susceptibillity of common bacterial pathogens to antimicrobial agents. *Ann. Int. Med.*, **76**: 1009-1036, 1972.
11) Foster TJ:Plasmid-determined resistance to antimicrobial drug and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **47**:361-409, 1983.
12) Hames BD and Higgins SJ:Nucleic acid hybridization. 1st ed. IRL press, Oxford, pp3-16, 1985.
13) Hardy K:Bacterial plasmids. 2nd ed. Thomas Nelson Ltd., Hong Kong, pp1-99, 1981.
14) Holmberg SD and Cohen ML:Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella typhimurium* isolates from outbueaks. *J. Clin. Microbiol.*, **19**:100-104, 1984.
15) Joklik WK, Willett HP, Amos DB and Wilfert CM:Zinsser microbiology. 19th ed. Appleton and lange, East Norwalk, pp464-467, 1988.
16) Kado CI and Liu ST:Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, **145**:1365-1373, 1981.
17) Koneman EW, Allen SD, Dowell VR Jr, Janda WM, Somers HM and Winn WC Jr: Color atlas textbook of diagnostic microbiology. 3rd ed. JB Lippincott Co., Philade lphia, pp89-156, 473-534, 1988.
18) Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr and Truant JP: Manual of clinical microbiology. 3rd ed. American society for Microbiology, Washington DC, pp195-219, 446-500, 1980.
19) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J: Molecular cloning. 1st ed. Cold spring Harbor Laboratory, New York, pp98-106, 1982.
20) Murray RK:Harper's biochemistry. 21st ed. Appelton and Lange, Norwalk, pp374-375, 1988.
21) Novick RP:Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **33**:210-235, 1969.
22) Pattee PA and Baldwin JN:Transduction of resistance to chlortetracycline and novobiocin in *Staphylococcus aureus. J. Bacteriol.*, **82**:875-881, 1961.
23) Rubens CE, McNeill WF and Farrar WE Jr:Evolution of Multiple antibiotic resist ance plasmids mediated by transposable plasmid deoxynucleic acid sequences. *J. Bacteriol.*, **140**:713-719, 1979.
24) Steers E, Plotz EL and Graves BS:Inocular

계명대학교 | IP: 203.247.13.27 | Accessed 2016/01/11 09:42(KST)

replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. Chemother.*, **9**:307-311, 1959.

25) Tachet CO and Cohen ML:Usefulness of plasmid profiles for differentiation of *Shigella* isolates in Bangladash. *J. Clin. Microbiol* ., **20**:300-301, 1984.

26) Thornsberry C:Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, pp31-91, 1983.

27) Watanabe T:Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **27**:87-115, 1963.

계명대학교 | IP: 203.247.13.27 | Accessed 2016/01/11 09:42(KST)