

이질균의 R Plasmid의 유전적 특성*

계명대학교 의과대학 미생물학교실

서민호 · 박종욱 · 서성일

= Abstract =

Genetic characterization of R plasmid of *Shigella*

Min Ho Suh, MD; Jong Wook Park, MD; Seong Il Suh, MD

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

In order to choose adequate antimicrobial drugs for shigellosis and to know the mechanisms of drug resistances and molecular epidemiologic data, 67 strains of *Shigella flexneri* and 11 strains of *Shigella sonnei* were tested for the antimicrobial susceptibilities, conjugal transfer of R plasmids, incompatibility grouping, plasmid DNA profiles and the recombinations of resistance genes.

In *S. flexneri*, 88.1 to 97% of the strains were susceptible to kanamycin(Km) and rifampicin(Rf), 76.1% of the strains were susceptible to nalidixic acid(Na) and 37.3 to 52.2% of strains to sulfisomidine(Su), trimethoprim(Tp), and cotrimoxazol(Co).

Only 0 to 11.9% were susceptible to chloramphenicol(Cm), tetracycline(Tc), streptomycin(Sm), and ampicillin(Ap).

In *S. sonnei*, 100% were susceptible to Km and Rf, and 63.6% to Na. There was no susceptible strain to Cm, Tc, Sm, and Su.

In contrast to *S. flexneri*, many strains(81.8%) of *S. sonnei* were susceptible to Ap and few(0 to 9.1%) strains to Su, Tp, and Co.

Most of drug resistances except to Na and Km in 50 to 100% of resistant strains were co-transferred to recipient *E. coli* RG488, indicating that multiple drug resistances were R plasmid mediated phenomenon.

Most of R plasmids were 62.4 mega dalton(Mdal) in size and classified into the incompatibility group FII. Somewhat larger plasmids, 115.6 Mdal in size were frequently found in *Shigella*.

Doubles containing both resistances of incoming plasmid and resident plasmid in incompatibility grouping were tested for the plasmid DNA profiles and the conjugations to the plasmid free recipient. According to these results, we found that doubles had single recombinant plasmid, 64.5 Mdal in size and the mechanisms of the recombinations of these resistance genes were thought to be transpositions between two plasmids.

* 이 논문은 1988년도 계명대학교 율종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

서 론

이질은 수인성질환의 하나로서 여러 연령층에 발생하며 특히 개발도상국에서는 영유아사망의 상당한 원인이 되고있다¹⁾. 수인성질환은 그 나라의 보건환경위생의 수준을 반영하기 때문에 많은 나라에서 이질과 같은 수인성질환의 근절에 노력을 기울이고 있으나 아직도 근절되지 않고 있는 이유로는 항균제의 남용으로 인한 내성균의 만연이 큰 비중을 차지한다²⁾. 이질균에서의 내성은 R plasmid 라는 비염색체성 소형환상 DNA 에서 기인한 전달성 다제내성이 그 특징이며³⁾ R plasmid 에 의한 전달성 다제내성이 여러균종에 만연되므로써 초래되는 감염병치료의 문제는 항균제가 남용 혹은 과용될 수 있는 의료제도에도 큰 원인이 있다⁴⁾. 또한 환경위생시설이 우수한 서방 구미제국에서도 이질의 발생이 보고되고 있는데 이것은 국민들이 국외여행을 빈번히 다녀오는데서 균이 도입되어 전파되는 경우가 많다고 보고하였다⁵⁾. 이러한 이질발생의 역학적 규명과 내성화 방지 대책수립을 위해서는 제재적인 생물학적, 열칭학적 성상과약 뿐 아니라 R plasmid 의 비적합성균을 조사하고 plasmid DNA 의 전기영동상 등을 분석하는 분자생물학적 역학조사를^{6,7)} 실시하므로써 중요한 단서를 찾을 수 있다.

이에 저자들은 이질의 적절한 치료제 선택과 분자생물학적 역학조사 및 내성화기전연구에 기본적 자료를 구하고자 이질균의 최근의 항균제감수성을 조사하고 R plasmid 에 의한 전달성내성기전을 파악하며 비적합성검사에 의한 R plasmid 의 분류와 plasmid DNA 분석 및 내성유전자 상호간의 recombination 여부를 조사하여 그 성적을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 균주분리 및 동정

계명대학교 동산의료원에서 분리된 *Shigella flexneri* 67주와 *Shigella sonnei* 11주를 실험에 사용하였다. 동정기준은 Edwards 및 Ewing⁸⁾, Lennette⁹⁾ 및 Koneman¹⁰⁾의 방법에 의하였다.

2. 항균제감수성검사

chloramphenicol(Cm), tetracycline(Tc), streptomycin(Sm), kanamycin(Km), sulfisomidine

(Su), trimethoprim(Tp), cotrimoxazole(Co), ampicillin(Ap), rifampicin(Rf) 및 nalidixic acid(Na) 등 10종 항균제에 대한 감수성검사를 실시하였으며 검사방법으로는 Steers 등¹¹⁾의 multiple inoculator 를 이용한 agar dilution method 를 사용하였다. 매 실험마다 정도판리의 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 Standards)의 판정기준¹²⁾에 따랐다.

3. Conjugation 에 의한 내성전달검사

접합에 의한 전달성 내성인자를 검사하기 위하여 피전달균으로 각 약제에는 감수성이나 Rf 에 열색체성 내성인 *E. coli* RG488을 사용하였다. 또 colicin 산생균주의 경우에는 colicin 내성인 RG488 돌연변이주를 피전달균으로 이용하였다. 선택배지는 Mueller Hinton(MH) 배지에 약제에 따라 15~20µg/ml 의 각 선택약제와 피전달균이 내성인 Na 또는 Rf 를 50µg/ml 씩 첨가하여 내성을 전달받은 피전달균만이 발육할 수 있게 하였다. 매번 실험시 실험균과 피전달균을 선택배지에 접종하여 증식되지 않음을 확인하였다.

4. 비적합성검사^{13,14)}

표준 plasmid 를 보유한 피전달균에 실험하고자 하는 R plasmid 를 접합에 의하여 전달시켰으며 공여 R plasmid 만의 내성약제로 선택하여 나타나는 transconjugant 집락 20개씩을 취하여 순배양 후 새로 획득된 plasmid 와 원래 존재하던 plasmid 의 공존유무를 양 plasmid 의 상이한 내성 marker 로 확인하여 다음과 같이 판정하였다. 원래 존재하던 plasmid 의 내성 marker 가 모든 transconjugant 에서 제거되고 이를 역으로 표준 plasmid 를 실험균에 전달시켰을 때 표준 plasmid 의 marker 만이 transconjugant 에서 증명될 때 이를 동일 비적합성균으로 판정하였다.

5. R plasmid 간의 recombination 검사

실험하고자 하는 R plasmid 를 표준 R plasmid 를 보유한 피전달균에 접합에 의하여 전달시키고 공여 R plasmid 및 표준 R plasmid 의 내성약제에 동시에 내성인 transconjugant 집락(즉 doubles)을 취하

여 순배양 후 각 plasmid의 내성이 잔존하는가를 본다. 내성이 계속 공존할 때 이를 공여균으로 하여 plasmid를 갖고 있지 않은 피전달균에 접합시켜 각 plasmid의 내성이 공존하는가를 본다. 이때 양 plasmid의 내성이 안정된 공존을 하면 이를 recombinant로 판정하고³⁾ 이 plasmid DNA를 분리하여 agarose gel 전기영동에 의한 plasmid DNA의 recombination 여부를 관찰하여 확정하였다.

6. plasmid DNA의 분리 및 전기영동

plasmid DNA의 분리는 Kado와 Liu의 방법¹⁵⁾을 사용하였고 전기영동은 0.7% agarose gel(15×15cm, agarose type 1)과 TEB buffer(89mM Tris base, 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 수평형 영동장치로 70mA, 80Volt로 5시간 submarine electrophoresis를 실시하였다. Plasmid의 분자량 측정을 위하여 매 영동마다 R1033(45mega dalton: Mdal), RP4(38Mdal), R1(58 Mdal) 등의 표준 plasmid DNA를 함께 영동시켰다. 영동된 gel은 0.5μg/ml의 ethidium bromide로 염색시켜 자외선투사기를 사용하여 사진촬영하고 plasmid DNA의 영동거리를 표준 plasmid DNA의 영동거리와의 linear regression을 이용하여 분자량을 계산하였다.

성 적

이질균의 항균제 감수성검사성적은 Table 1.과 같다. *S. flexneri*는 Rf에 97%가 감수성이었고 Km에 88.1%, Na에 76.1%가 감수성이었으며 Su, Tp, 및 Co에는 37.3~52.2%가 감수성이었다. Sm과 Ap에는 10.4~11.9%가, Tc에는 1.5%만이 감수성

Table 1. Antimicrobial drug susceptibility of *Shigella* species

Drug ^a	<i>Shigella flexneri</i> ^b		<i>Shigella sonnei</i> ^c	
	susceptible number(%)	90% MIC	susceptible number(%)	90% MIC
Cm	0(0)	256	0(0)	256
Tc	1(1.5)	256	0(0)	256
Sm	8(11.9)	256	0(0)	256
Km	59(88.1)	256	11(100)	4
Su	25(37.3)	2048	0(0)	2048
Tp	35(52.2)	256	1(9.1)	64
Co	33(49.3)	640	1(9.1)	64
Ap	7(10.4)	256	9(81.8)	256
Rf	65(97.0)	16	11(100)	16
Na	51(76.1)	256	7(63.6)	256

a: Abbreviation: See text.

b: Total 67 strains were tested.

c: Total 11 strains were tested.

이었고 Cm에는 감수성이 없었다. 90%의 균주를 성장억제 할 수 있는 농도인 90% MIC(minimal inhibitory concentration)를 조사한 결과 Rf가 16μg/ml로 가장 낮았고 Tc, Sm, Km, Na는 256μg/ml이었으며 Cm, Tp, Ap는 256μg/ml 이상이었고 Co와 Su는 640 및 2048μg/ml 이상으로 아주 높았다.

*S. sonnei*는 Km과 Rf에 100%가 감수성이었고 Ap에 81.8%, Na에 63.6%였으며 Tp와 Co는 9.1%였고 Cm, Tc, Sm, Su에는 감수성이 없었다. 90% MIC는 Km이 4, Rf가 16μg/ml이었으며 Tp와 Co가 64μg/ml, Tc, Sm, Ap, Na는 256μg/ml였고 Cm과 Su는 256 및 2048μg/ml 이상으로 아주 높았다.

Table 2.는 항균제내성균의 내성기전 및 전달성

Table 2. Conjugal transfer of multiple drug resistances of *Shigella*

Resistance pattern of donor	Number of strains	Recipient	Number of Transconjugants	Transferred resistance
Cm Tc Sm Su Ap Tp Co Na	12		11	Cm Tc Sm Su Ap Tp Co
Cm Tc Sm Su Ap Tp Co Km	6		5 ^a	Cm Tc Sm Su Ap Tp Co
Cm Tc Sm Su Tp Co Na	4	RG488 ^b or	4	Cm Tc Sm Su Tp Co
Cm Tc Sm Su Ap Tp Co	13		12	Cm Tc Sm Su Ap Tp Co
Cm Tc Sm Su Ap	6	RG488-col ^c	3	Cm Tc Sm Su Ap
Cm Tc Sm Su Tp Co	6		6	Cm Tc Sm Su Tp Co
Cm Tc Sm Ap	17		9	Cm Tc Sm Ap

a: Only one transconjugant strain was resistant to Km.

b: Recipient RG488 is lactose non-fermenting *E. coli* chromosomally resistant to rifampicin.

c: When donor cell produced colicin, we used colicin-resistant RG488-col as a recipient.

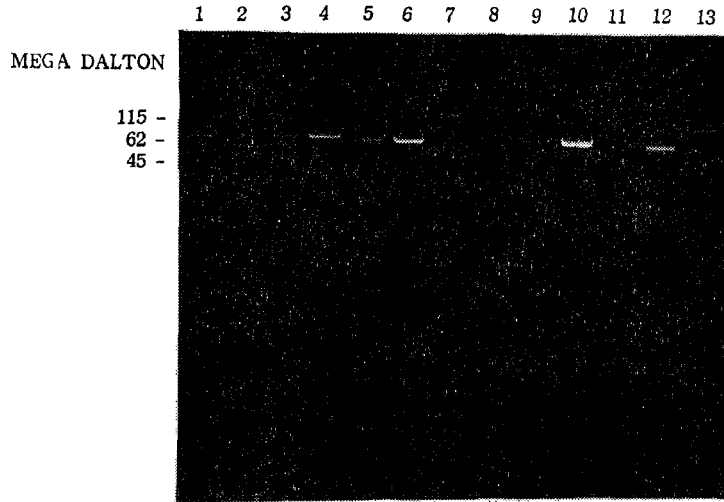


Fig 1. Plasmid profiles of *Shigella* and their transconjugant *E. coli*.

Lane	Name of strains or plasmids	Molecular weights of plasmids(mega dalton)
1	<i>Shigella</i> DS07	62.4, 83.9
2	<i>E. coli</i> harboring pDS07 and pDS07-1	62.4, 83.9
3	<i>Shigella</i> DS22	42.4, 62.4, 115.6
4	<i>E. coli</i> harboring pDS22 and pDS22-1	62.4 42.4
5	<i>Shigella</i> DS28	62.4
6	<i>E. coli</i> harboring pDS28	62.4
7	R1033	45.0
8	RP4	38.0
9	<i>Shigella</i> DS29	62.4, 115.6
10	<i>E. coli</i> harboring pDS29 and pDS29-1	62.4, 44.5
11	<i>Shigella</i> DS37	62.4, 115.6
12	<i>E. coli</i> harboring pDS37	62.4
13	<i>E. coli</i> harboring pDS45	83.9

내성인자를 조사하기 위해 검사한 접합에 의한 내성 전달성적이다. 내성양상에 따라 50~100%의 내성 전달빈도를 볼 수 있었고 원래의 내성양상중 Na 및 Km 내성을 제외한 전 내성이 전달되었다.

Figure 1.은 실험균 및 피전달균의 plasmid DNA의 전기영동양상을 나타낸 것이다. Lane 1은 *shigella* DS07의 영동상으로 62.4Mdal 및 83.9Mdal의 plasmid가 있었다. Lane 2는 62.4Mdal의 pDS07과 83.9 Mdal의 pDS07-1을 가진 *E. coli* RG488이다. Lane 3은 42.4, 62.4 및 115.6Mdal의 plasmids를 가진 *shigella* DS22이다. Lane 4는 62.4Mdal의 pDS 22, 42.4Mdal의 pDS22-1을 가진 *E. coli* RG488이다. Lane 5는 *shigella* DS28의 62.4Mdal의 plasmid 영동상이다. Lane 6은 62.4Mdal의 pDS28을

가진 *E. coli* RG488이다. Lane 7은 45.0Mdal의 R1033이다. Lane 8은 38.0Mdal의 Rp4이다. Lane 9는 62.4 및 115.6 Mdal의 plasmids를 가진 *shigella* DS29이다. Lane 10은 62.4 Mdal의 pDS 29와 44.5 Mdal의 pDS29-1을 가진 *E. coli* RG488이다. Lane 11은 62.4 및 115.6 Mdal의 plasmids를 가진 *shigella* DS37이다. Lane 12는 62.4 Mdal의 pDS37을 가진 *E. coli* RG488이다. Lane 13은 83.9 Mdal의 pDS45를 가진 *E. coli* RG488이다.

Table 3은 실험균의 R plasmid의 비적합성균 검사성적이다. pDS05, pDS07, pDS22, pDS28, pDS 29, pDS37, pDS38, pDS43, pDS44, pDS46, pDS47 등의 R plasmid가 비적합성균 F II에 속하였다. Donor plasmid의 내성 marker와 recipient plasmid

Table 3. Results of incompatibility test of R plasmids of *Shigella*

Donor* plasmid	Resistance pattern	Resident plasmid	daughter colonies* containing		
			incoming plas- mid only(Tc)	resident plas- mid only(Km)	both (Tc+Km)
p DS05	Cm Tc Sm Su Tp Co		17	0	3
p DS07	Cm Tc Sm Su Ap Tp Co		16	0	4
p DS22	Cm Tc Sm Su Ap Tp Co		18	0	2
p DS28	Cm Tc Sm Su Tp Co	R1 ^b (Inc FII)	17	0	3
p DS29	Cm Tc Sm Su Ap Tp Co		16	0	4
p DS37	Cm Tc Sm Su Tp Co		17	0	3
p DS38	Cm Tc Sm Su Ap Tp Co		18	0	2
p DS43	Cm Tc Sm Su Ap Tp Co		19	0	1
p DS44	Cm Tc Sm Su Ap Tp Co		19	0	1
p DS46	Cm Tc Sm Su Ap Tp Co		20	0	0
p DS47	Cm Tc Sm Su Tp Co		20	0	0

a: Host strain is *E. coli* RG488.

b: Plasmid R1 belongs to incompatibility group FII and has resistances to Cm, Sm, Km, Su and Ap. Host strain is *E. coli* ML1410 chromosomally resistant to nalidixic acid.

c: Twenty colonies were randomly selected and tested.

의 내성 marker 를 동시에 가지는 균, 즉 doubles 들이 0~20%의 빈도로 나타났다.

이 doubles 들에서 각각의 plasmid 가 공존하고 있는 것인지 아니면 내성유전자가 recombination 된 것인지를 알기위해 재조합실험을 실시한 성적이 Table 4이다. pDS05, pDS07, pDS22, pDS28, pDS29, pDS37, pDS38 및 pDS43 등에서 유래된 doubles 들은 모두가 양쪽 plasmid 의 내성을 함께 가지고 있어서 recombination 됐음을 시사하였고 pDS44 유래의 doubles 는 전부가 resident plasmid 가 가지고 있던 Km 내성만을 나타내어 recombination 되지 않고 비조합성이었음을 시사하였다.

Figure 2는 내성유전자가 recombination 된 doubles 와 실험균 및 피전달균의 plasmid DNA 영동양상이다. Lane 1은 pDS05 유래 doubles 의 영동상으로서 64.5 Mdal 의 single plasmid 가 있었다. Lane 2는 pDS07 유래의 64.5 Mdal 의 plasmid 이다. Lane 3은 pDS22 유래의 64.5 Mdal 의 plasmid 이다. Lane 4는 62.4 Mdal 의 pDS37을 가진 *E. coli* RG488이다. Lane 5는 pDS37 유래의 64.5 Mdal 의 plasmid 이다. Lane 6은 62.4, 115.6 Mdal 의 plasmid 를 가진 *shigella* DS38이다. Lane 7은 62.4 Mdal 의 pDS38과 48.4 Mdal 의 pDS38-1을 가진 *E. coli* RG488이다. Lane 8은 pDS38 유래의 64.5 Mdal 의 plasmid 이다. Lane 9는 58.1 Mdal 의 R1 이다. Lane 10은 45.0 Mdal 의 R1033이다. Lane 11은 38.0 Mdal 의 RP4이다. Lane 12는 46.9 및 33.4 Mdal 의 plasmids 및 기타 small plasmids 를

Table 4. Results of recombination test of doubles* in incompatibility grouping

Doubles* from	Recipient	Daughter containi- resista-		
		colonies* Tc only	ng Km only	nces to both
p DS05		0	0	20
p DS07		0	0	20
p DS22		0	0	20
p DS28	RG488	0	0	20
p DS29		0	0	20
p DS37		0	0	20
p DS38		0	0	20
p DS43		0	0	20
p DS44		0	20	0

a: Daughter colonies containing both Tc and Km resistances in table 3. were designated as doubles.

b: Host strain is *E. coli* ML1410.

c: Twenty colonies were randomly selected and tested.

가진 *E. coli* 83-27이다. Lane 13은 62.4 및 115.6 Mdal 의 plasmid 를 가진 *Shigella* DS43이다. Lane 14는 62.4 Mdal 의 pDS43과 48.4 Mdal 의 pDS43-1을 가진 *E. coli* RG488이다. Lane 15는 pDS43 유래의 64.5 Mdal 의 plasmid 이다. Lane 16은 62.4 및 115.6 Mdal 의 plasmids 를 가진 *Shigella* DS44이다. Lane 17은 62.4 Mdal 의 pDS44를 가진 *E. coli* RG488이다. Lane 18은 pDS44 유래의 58.1 Mdal 의 plasmid 이다.

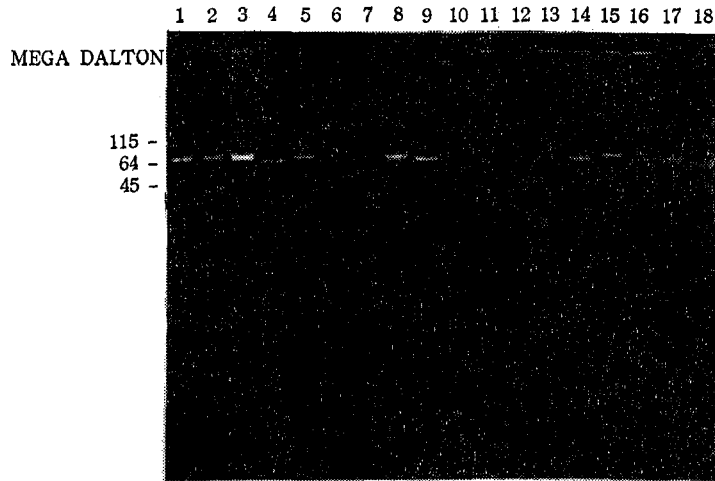


Fig 2. Plasmid profiles of doubles obtained from conjugations between *E. coli* RG488(harboring Shigellar R plasmid) and *E. coli* ML1410 (harboring plasmid R1).

Lane	Name of strains or plasmids	Molecular weights of plasmids(mega dalton)
1	doubles between pDS05 and R1	64.5
2	doubles between pDS07 and R1	64.5
3	doubles between pDS22 and R1	64.5
4	<i>E. coli</i> RG488 harboring pDS37	62.4
5	doubles between pDS37 and R1	64.5
6	<i>Shigella</i> DS38	62.4, 115.6
7	<i>E. coli</i> RG488 harboring pDS38 and pDS38-1	62.4, 48.4
8	doubles between pDS38 and R1	64.5
9	R1	58.1
10	R1033	45.0
11	RP4	38.0
12	<i>E. coli</i> 83-27	46.9, 33.4
13	<i>Shigella</i> DS43	62.4, 115.6
14	<i>E. coli</i> RG488 harboring pDS43 and pDS43-1	62.4, 48.4
15	doubles between pDS43 and R1	64.5
16	<i>Shigella</i> DS44	62.4, 115.6
17	<i>E. coli</i> RG488 harboring pDS44	62.4
18	doubles between pDS44 and R1	58.1

고 찰

이질은 *Salmonella*나 *Vibrio*, Enterotoxigenic *E. coli*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *ameba*, *rotavirus* 등에 의해 초래되는 전염성 설사 질환 가운데서 큰 비중을 차지하고 있으며 아직도

개발도상국에서는 영유아사망의 중요한 원인이 되고 있다^{1,16)}. 우리나라에서는 과거에 비해 발생빈도가 많이 감소하였으며^{17~19)} 균종으로는 아직은 *S. flexneri*가 많이 분리되고 있으나 해마다 *S. sonnei*의 분리율이 상대적으로 증가되고 있는데^{17~19)} 대부분의 이질이 *S. sonnei*에 의해 생기는 서방 구미 제국과 비슷하다¹⁸⁾. 이질균은 1950년대부터 내성균

이 출현되어²⁰⁾ 요즘은 Cm, Tc, Ap, Su 등 대다수 치료제에 다약제내성을 나타내는데 이 실험에서도 *S. flexneri*의 경우 Na와 Km 및 Rf에만 감수성이 높았고 임상적으로 널리 쓰이는 Cm, Tc, Ap에는 약 90~100%의 균이 내성을 나타내었다. Su, Tp 및 Co와 같은 sulfa제에는 약 과반수가 내성이었다. *S. sonnei*는 sulfa제에 대한 내성이 90~100%로 *S. flexneri*에 비해 훨씬 높았고 Km과 Rf에는 100%가 감수성이었다. *S. flexneri*에서는 11.9%만이 감수성이던 Ap가 *S. sonnei*에서는 81.8%의 높은 감수성을 나타내어 *S. sonnei*가 주종을 이루는 서구세계에서 Ap가 유효한 약제로 사용될 수 있음을 알 수 있다. Cm, Tc, Sm, Su, Tp 및 Co에는 90~100%가 내성이었다. 이질균은 Watanabe^{20,21)} Falkow²²⁾ 등에 의해 내성의 기원이 R plasmid에 의한 균체간의 접합에 기인함이 보고되었다. 이 실험에서도 내성양상에 따라 50~100%의 다약제내성 전달빈도를 보여서 대다수의 이질균이 전달성 R plasmid를 갖고 있음을 알 수 있었고 원래의 내성양상증 Na 및 Km 내성을 제외한 전 내성이 전달되어 이들 R plasmid가 multiple drug resistance의 주된 원인을 알 수 있었다. 그런데 Tp 및 Co 내성이 없는 내성균들은 전달빈도가 약 50% 정도로 낮았고 Tp, Co 내성이 있는 균들은 약 83~100%의 높은 전달빈도를 나타내어 내성양상이 전달빈도에 영향을 미칠 수 있었다.

균을 용해시켜 plasmid DNA를 조사한 결과 이질균의 내성은 대부분이 62.4 Mdal의 중형 R plasmid에 기인하였고 잔폭 83.9 Mdal의 다소 큰 것도 있었다. 또 R plasmid 이외에도 115.6 Mdal 정도의 대형 plasmid들을 가진 균이 많았는데 이것은 Sansonetti²³⁾ 등의 보고에서 처럼 세균의 숙주세포 침투성에 관계하는 virulence plasmid일 가능성이 높으며 이를 뒷받침하기 위해 앞으로 cell culture 실험에 의한 균의 세포 부착성 및 침투성검사²³⁾와 실험동물에 결막염을 유도하는 Seleni test²⁴⁾가 실시되어야 하겠다.

수인성전염병의 전파경로를 추적하는 역학조사를 위해서는 균종의 식별, 혈청형검사, 당분해성상조사, colicin형조사, bacteriophage형조사 등의 것이 쓰이고 있으나 내성균의 전파경로를 조사하는 데는 이러한 방법만으로는 불충분하며 내성인자들 상호간의 접합에 의한 비적합성검사^{6,13,14)} 및 plasmid DNA의 분자적 특성규명^{7,25,26)} 등이 필수적이라 하겠다. 이 실험에서 62.4Mdal의 대부분의 R plasmid는

FII군에 속하였으며 83.9 Mdal의 pDS45 등의 다소 큰 R plasmid들은 FII군이 아니었다. Plasmid의 비적합성군과 내성양상은 국가나 지역에 따라 차이가 있어서 미국 등은 B군, O군 등의 plasmid가 많으며 아프리카에서는 B군 및 F군, 중남미에서는 H군 등이 많고 동남아시아나 일본에서는 F군이 많은 것으로 보고되어 있다.^{3,13,27)}

그런데 비적합성검사를 위한 접합실험중 Table 3 및 4와 같은 doubles들이 0~20% 정도 나타난다. 이들이 각각의 plasmid가 공존하는 것인지, 내성유전자가 recombination 되어 single recombinant plasmid로 된 것인지의 감별은 doubles들을 공여균으로 하여 plasmid가 없는 피전달균으로 재적합시키고 이들의 transconjugant들의 daughter colonies의 내성 marker를 조사함으로써 알 수 있다³⁾. 이 실험에서 Table 4와 같이 대부분의 doubles들이 양쪽 내성 marker를 함께 갖고 있어서 recombination됐음을 시사하였고 이들의 plasmid DNA를 분석한 결과 Figure 4와 같이 64.5 Mdal의 single recombinant plasmid를 갖고 있음을 확인할 수 있었다. 이 recombination의 기전으로는 donor plasmid의 내성유전자가 resident plasmid로 transposition되었거나 반대로 resident plasmid의 것이 donor로 transposition됐을 것으로 생각된다²⁸⁾. 이와 같이 이들 Tc 및 Km 내성유전자가 transposition된 것으로 가정한다면 이 실험에서 recombinant plasmid는 64.5 Mdal이고 donor 것은 62.4 Mdal, resident는 58.1 Mdal이므로 donor 것이 transposition된 경우는 이 Tc 내성유전자가 Tn(Transposon) 10(6 Mdal, 9,300 base pairs)일 가능성이 많고 후자의 경우는 Km 내성유전자가 Tn903(2 Mdal, 3,100 base pairs)일 가능성이 많다. 그러나 이러한 사실을 확인하기 위해서는 앞으로 제한효소에 의한 DNA 절편을 비교분석하고 더 나아가 DNA 절편을 Southern blotting³⁰⁾시키고 DNA probe로써 hybridization³¹⁾을 행하는 RFLP³²⁾ 즉 restriction fragment length polymorphism을 실시하여 분석함이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

이질의 적절한 치료제 선택과 분자생물학적 역학조사 및 내성화기전연구의 기본자료를 얻기 위해 *S. flexneri* 67주 및 *S. sonnei* 11주에 대하여 항균제 감수성검사, 전달성내성검사, 비적합성검사에 의한

R plasmid의 분류, plasmid DNA 분석 및 내성유전자들의 recombination 검사 등을 실시하였다.

*S. flexneri*는 Km과 Rf에 88.1~97%, Na에 76.1%, Su, Tp 및 Co에 37.3~52.2%가 감수성이었고 Cm, Tc, Sm 및 Ap에는 0~11.9%만이 감수성이었다. *S. sonnei*는 Km과 Rf에 100%, Na에 63.6%가 감수성이었고 Cm, Tc, Sm 및 Su에는 감수성균이 없었으며 *S. flexneri*와는 대조적으로 Ap에 81.8%의 높은 감수성을 나타내었고 Su와 Tp 및 Co에는 0~9.1%의 낮은 감수성을 나타내었다.

내성기전 및 전달성내성인자를 조사하기 위해 접합을 실시한 결과 50~100%의 전달빈도를 볼 수 있어서 대다수의 이질균이 전달성 R plasmid를 갖고 있음을 알았다. Plasmid DNA를 조사한 결과 R plasmid는 대부분이 62.4 Mdal의 중형이었고 간혹 83.9 Mdal의 것도 있었다. 또 대다수의 이질균이 115.6 Mdal의 다소 큰 plasmid도 보유하고 있었다. 대다수의 62.4 Mdal의 R plasmid들은 비적합성 FII 균였으나 83.9 Mdal의 것은 FII가 아니었다. Doubles들을 재접합시킨 성적과 이들의 plasmid DNA 분석성적을 종합하여 두 plasmid의 내성유전자들이 recombination되어 64.5 Mdal의 single recombinant plasmid를 갖고 있음을 알았고 그 기전으로는 plasmids 간의 내성유전자의 transposition으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Butler T, Mahmoud AAF, Warren KS: Algorithms in the diagnosis and management of exotic diseases. XXVII. Shigellosis. *J Infect Dis* 1977; 136: 465-468.
2. Farrar WE Jr: Antibiotic resistance in intestinal bacteria. *Clin Gastroent* 1979; 8: 803-826.
3. 서민호, 설성용, 조동택, 전도기: *Shigella*의 R plasmid의 특성과 항균제내성의 본태. 대한화학요법학회지 1984; 2: 97.
4. 임영수, 이유철, 서민호, 설성용, 조동택, 전도기: *Pseudomonas aeruginosa*의 pyocin형 및 항균제내성. 대한화학요법학회지 1983; 1: 270-279.
5. Black RE, Craun GF, Blake PA: Epidemiology of common source outbreaks of Shigellosis in the U.S., 1961-1975. *Am J Epidemiol*

- 1978; 108: 47-50.
6. Thorne GM, Farrar WE Jr.: Superinfection compatibility of R factors in *Shigella dysenteriae* type 1 from central america and *Salmonella typhi* from Mexico. *J Infect Dis* 1974; 130: 284-287.
7. Bezanson GS, Khakhria R, Pagnutti D: Plasmid profiles of value in differentiating *Salmonella muenster* isolates. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 1159-1160.
8. Edwards PR, Ewing WH: *Identification of Enterobacteriaceae*, ed 3. Burgess Publishing Co, 1972, pp 108-142.
9. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr, Truant JP: *Manual of clinical microbiology*, ed 3. Washington, American Society for Microbiology, 1980, pp 195-219.
10. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR Jr, Sommer HM: *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, ed 2. Philadelphia, JB Lippincott Co, 1983, pp 57-124.
11. Streers E, Plotz 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 tests for bacteria that grow aerobically, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, 1983, pp 31-91.
13. Datta N, Olarte J: R factors in strains of *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae* 1 isolated during epidemics in Mexico: Classification by compatibility. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 5: 310-317.
14. Crosa JH, Olarte J, Mata LJ, Luttrupp LK, Penaranda ME: Characterazation of an R-plasmid associated with ampicillin resistance in *Shigella dysenteriae* type 1 isolated from epidemics. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 11: 553-558.
15. Kado CI, Liu ST: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145: 1365-1373.
16. Moffet HL: *Pediatric infectious diseases*, ed

2. Philadelphia, JB Lippincott Co, 1981, pp 303—318.
17. 설성용 : 1980년 대구지방에서 분리한 *Shigella*의 균형 및 항균제내성. 경북의대잡지 1980 ; 21 : 527.
18. 설성용, 서민호, 이유철 : 1982년 대구지방에서 분리한 *Shigella*의 항균제내성 및 R plasmid. 대한화학요법학회지 1983 ; 1 : 249.
19. Chun D, Cho DT, Seol SY, Suh MH, Lee YC: R plasmids conferring multiple drug resistance from *Shigella* isolated in Korea. *J Hyg*(Camb.) 1984 ; 92 : 153—160.
20. Watanabe T: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol Rev* 1963 ; 27 : 87—115.
21. Watanabe T, Fukasawa T: Episome mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. I. Transfer of resistance factors by conjugation. *J Bacteriol* 1961 ; 81 : 669—678.
22. Falkow S: *Infectious multiple drug resistance*, ed 1. New York, Methuen Inc, 1975, pp 40—48.
23. Sansonetti PJ, Kopecko DJ, Formal SB: *Shigella sonnei* plasmids: Evidence that a large plasmid is necessary for virulence. *Infect Immunol* 1981 ; 34 : 75—83.
24. 김기상의 6인 : 한국에서 분리된 장내세균의 병원적 역할에 관한 연구(II). 대한미생물학회지 1987 ; 22 : 71—78.
25. Schaberg DR, Tompkins LS, Falkow S: Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1981 ; 13 : 1105—1108.
26. Holmberg S, Wachsmuth IK, Brenner FWH, 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.
27. Watson CE: Infectious drug resistance in *Shigella* in Cape Town. *South African Med J* 1967 ; 41 : 728—731.
28. Rubens CE, Mc Neill WF, Farrar WE Jr: Evolution of multiple antibiotic resistance plasmids mediated by transposable plasmid deoxynucleic acid sequences. *J Bacteriol* 1979 ; 140 : 713—719.
29. Hardy K: *Bacterial plasmids*, ed 2. Nairobi, Thomas Nelson and Sons LTD, 1981, pp 50—74.
30. Ausubel FM, et al: *Current Protocols in Molecular Biology*, ed 1. New York, John Wiley & Sons Inc, 1987, pp 291—294.
31. Hames BD, Higgins SJ: *Nucleic Acid Hybridisation*, ed 1. Oxford, IRL press, 1985, pp 3—16.
32. Murray RK, et al: *Harper's Biochemistry*, ed 21. Norwalk, Appleton & Lange, 1988, pp 374—375.