



임상가검물에서 분리한 *Klebsiella pneumoniae* plasmid의 분자유전적 특성

Characterization of R plasmid and Antimicrobial Drug Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Specimens

저자 (Authors) 이경란, 백원기, 서성일, 박종욱, 서민호
Kyung-Ran Lee, Won-Ki Baek, Seong-Il Suh, Jong-Wook Park, Min-Ho Suh

출처 (Source) [The Journal of the Korean Society for Microbiology 26\(1\)](#), 1991.2, 25-35 (11 pages)

발행처 (Publisher) [대한미생물학회](#)
The Korean Society For Microbiology

URL <http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01485233>

APA Style 이경란, 백원기, 서성일, 박종욱, 서민호 (1991). 임상가검물에서 분리한 *Klebsiella pneumoniae* plasmid의 분자유전적 특성. *The Journal of the Korean Society for Microbiology*, 26(1), 25-35.

이용정보 (Accessed) 계명대학교
114.71.5.213
2016/01/11 13:29 (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).

임상가검물에서 분리한 *Klebsiella pneumoniae* plasmid의 분자유전적 특성

계명대학교 의과대학 미생물학교실

이경란 · 백원기 · 서성일 · 박종욱 · 서민호

= Abstract =

Characterization of R plasmid and Antimicrobial Drug Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Specimens

Kyung-Ran Lee, Won-Ki Baek, Seong-Il Suh, Jong-Wook Park and Min-Ho Suh

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

Ninety-one strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from various clinical specimens in Taegu area were tested for the antimicrobial susceptibility to 16 drugs and studied for molecular and genetic characterization of R plasmid. *K. pneumoniae* were most frequently isolated from urine(60.4%), and followed by pus(16.5%), sputum(15.4%), cervix(3.3%) and etc.

All strains were susceptible to amikacin(Ak) and norfloxacin(Nf). 1.1-8.8% of the strains were resistant to moxalactam(Mx), nalidixic acid(Na) and rifampin(Rf), and 16.5-26.4% were resistant to gentamicin, kanamycin, tobramycin(To), cefamandole, chloramphenicol, and trimethoprim. 31.9-59.3% were resistant to streptomycin(Sm), cephalothin, ampicillin, tetracycline and sulfisomidine. MIC₉₀ of Ak, Mx and Nf were below the antimicrobial concentration tested. MIC₉₀ of Na, Rf and To were 3.9-15.9 μ g/ml, and those of other drugs were 118.4->2048 μ g/ml.

Of 91 strains tested, 37 were multiply resistant to 5 or more drugs. The patterns of multiple drug resistance which were most frequently encountered were not found.

The ratio of conjugal transfer of *K. pneumoniae* was 25%. Plasmid profiles for molecular and genetic characterization of R plasmids from *K. pneumoniae* were studied through the method of alkaline SDS lysis and agarose gel electrophoresis. Molecular size of R plasmids were 35.9 to 81.3 megadalton. There was a R plasmid derived from the strain which did not harbor any other plasmids, in this case this plasmid was thought to be an episomal state in original strain. R plasmids which were able to be classified into incompatibility(Inc) FII group were analyzed by restriction endonuclease *EcoRI*, they did not show the similarity each other except pKM9431 and pKM9432.

Key Words: *K. pneumoniae*, R plasmid, Molecular characterization.

서 론

*K. pneumoniae*는 폐렴, 패혈증, 뇨로감염 및 각종 감염병을 유발하는 그람음성간균으로 특히 노약자, 알콜중독자, 화상환자, 호흡기질환자 및 비뇨기계통환자등에서 중증의 감염을 일으키며 여러가지 항균제에 동시에 내성을 가지는 균에 의한 감염이 빈번하여 치명적인 결과

가 초래되기도 한다^{22,31,32}.

*K. pneumoniae*는 원내감염의 주요 원인균 중 하나로 알려져 있으며, 전체 원내감염 원인균의 약 6% 정도를 차지하고 있다^{22,24,31}. 이들 대부분의 균들은 다른 원내감염원인균과 마찬가지로 원래부터 각종 항균제에 내성을 가지고 있거나 병원환경에서 여러가지 항균제 및 소독약제등과 접촉으로 인한 내성획득 균주들인데, 병원에서 15일 또는 그 이상 입원치료한 환자

들로 부터 분리된 *K. pneumoniae*의 약 18% 정도가 각종 항균제에 중복내성을 가진다고 알려져 있다¹⁶⁾. 특히 penicillin계열인 ampicillin 및 carbenicillin 등에는 내성균이 많은데 이는 주로 염색체성 또는 비염색체성 penicillinase에 기인하며^{10, 24, 25)}, 주치료약제로는 cephalosporin계열 및 aminoglycoside계열의 항균제등이 권장되고 있으나 cephalosporin계열 약제인 경우에는 β -lactamase 그리고 gentamicin(Gm), kanamycin(Km) 등을 비롯한 aminoglycoside계열 약제 경우에는 aminoglycoside-modifying enzyme(AME) 등을 산생하는 균주가 생겨나기 시작하고 있음은 주지의 사실이다^{23, 31, 32)}. Aminoglycoside계열 약제중 Gm, Km, tobramycin 등에 비해 AME에 의한 불활성화에 저항을 가지는 amikacin에도 내성균이 점차 증가되고 있다.^{23, 29, 31, 32)}

각종 항균제에 대한 내성획득의 기전으로는 여러가지가 있으나 그람음성간균에서는 R plasmid라고 하는 비염색체성 유전물질의 감수성균으로의 전파가 주된 원인이라 할 수 있는데^{8, 14, 15)}, 균과 균사이의 접합에 의해 R plasmid가 감수성 균으로 전달되어 내성의 획득이 이루어짐으로서 다약제 내성균은 점점 만연되고 있는 실정이다^{3, 8, 13)}.

그리고 내성균의 출현빈도는 항균제 사용 빈도와 더불어 증가하는 추세인데, 이것은 항균제가 남용 또는 오용될 수 있는 의료제도에 대한 원인이 있다^{8, 20)}. 그러므로 다약제내성균에 의한 감염병의 효과적인 치료와 내성균 증가의 억제를 위해서는 항균제감수성 결과를 토대로한 감염원인균에 대한 적절한 항균제의 선택이 요구되며 감염병의 역학조사 등의 기본적인 자료가 필요하다고 생각된다. 또한 내성획득의 기전과 R plasmid DNA의 분자생물학적 및 유전적 특성을 규명하여 약제내성의 실태 및 내성화기전을 유전자 차원에서의 자세한 이해가 필요하다고 하겠다.

저자는 최근 병원 임상가검물로부터 분리된 *K. pneumoniae*를 대상으로 16종 항균제에 대한 감수성검사를 실시하고, 접합에 의한 내성전달 검사 및 비적합검사에 의한 R plasmid의 분류와 plasmid DNA의 분리 및 전기영동, 그리고 제한 효소처리에 의한 절편 분석 등을 실시하여 약제내성양상의 실태, 내성화기전, R plasmid DNA의 분자생물학적 및 유전적 특성을 알아보고 내성화에 대한 대책수립의 기본적 역학자료를 구하고자 실험하였다.

재료 및 방법

1. 균주분리 및 동정

1988년에서 1989년 사이에 계명대학교 의과대학 미생물학교실에서 분리 동정된 *K. pneumoniae* 91주를 실험에 사용하였다. 동정기준은 Edwards 및 Ewing¹³⁾, Lennette등¹⁹⁾ 및 Kone-man등¹⁸⁾의 방법에 준하였다.

2. 항균제 감수성 검사

Chloramphenicol(Cm), tetracycline(Tc), sulfisomidine(Su), ampicillin(Ap), trimethoprim(Tp), amikacin(Ak), gentamicin(Gm), kanamycin(Km), tobramycin(To), streptomycin(Sm), cephalothin(Clt), cefamandole(Cfm), moxalactam(Mx), norfloxacin(Nf), nalidixic acid(Na) 및 rifampin(Rf) 등 16종 항균제에 대한 감수성 검사를 실시하였다^{18, 19)}. 감수성 검사는 Steers 등²⁷⁾의 multiple inoculator를 이용한 한천희석법(agar dilution method)에 준하여 최소발육저지농도(MIC)를 결정하였으며, 매 실험마다 정도관리의 공정성을 가하기 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 판정기준²⁸⁾에 준하였고, 균의 50% 및 90% MIC는 주로 Smith등²⁶⁾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 염색체성내성인 *E. coli* ML1410을 사용하였으며 colicin 산생균주의 경우에는 colicin 내성인 RG488 및 ML1410 돌연변이주를 사용하여 실험하였다. 선택배지는 Mueller-Hinton한천배지(Difco Co.)에 약제에 따라 15-20 μ g/ml의 각 선택약제와 피전달균이 내성인 Na 또는 Rf을 50 μ g/ml씩 첨가하여 내성을 전달받은 피전달균만이 성장할 수 있게 하였다. 매번실험시 실험균과 피전달균을 선택배지에 접종하여 증식되지 않음을 확인하였다^{2, 3)}.

4. 비적합성 검사

표준 plasmid를 보유한 피전달균에 실험하고자 하는 R plasmid를 접합에 의하여 전달시켰으며 공여 R plasmid만의 내성약제로 선택하여 나타나는 transconjugant 집락 20개씩을 취하여 순배양 후 새로 획득된 plasmid와 원래 존재하던 plasmid의 공존유무를 양 plasmid의 상이한 내성 marker로 확인하여 다음과 같이 판정하였다¹¹⁾. 원래 존재하던 plasmid의 내성 marker가 모든 transconjugant에서 제거되고 이를 역으로 표준 plasmid를 실험균에 전달시켰을 때 표준 plasmid의 marker만이 transconjugant에서 증명될 때 이를 동일 비적합성균으로 판정하였다^{2,3)}.

5. Plasmid DNA의 분리 및 전기영동

Plasmid검색을 위해서는 Kado와 Liu의 방법¹⁷⁾을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 전기영동은 0.7% agarose gel(15×15cm, 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(45 mega dalton:Md), RP4(38 Md), R1(58 Md)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.

6. 제한효소처리에 의한 R plasmid DNA절편 분석

제한효소처리를 위한 plasmid분리는 Birnboim과 Doly의 방법⁹⁾에 따랐다. 37°C에서 16-18시간 배양한 균액 1.5ml를 원침시킨후 세포침사를 lysozyme용액(50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris, pH 8.0, 2mg/ml lysozyme) 100μl로 부유시킨 후 alkaline-SDS용액 (0.2N NaOH, 1% SDS) 200μl를 가하여 잘 혼합한 후 얼음에서 5분간 방치하였다. 150μl의 high salt 용액(5M potassium acetate, pH 5.2)을 넣고 5분간 12,000 rpm으로 원침하여 상층액을 회수한 다음 phenol-chloroform mixture로 처리한 후 2.5배의 ethanol을 가하여 15분간 원침하여 DNA

를 침전시켰다. DNA침사를 vacuum desiccator에서 적당히 말려 RNase처리후 제한효소처리를 하였다. 제한효소는 BRL(Bethesda Research Laboratory)제 *EcoRI* 등을 실험에 사용하였다. 증류수에 녹인 DNA에 제한효소와 이에 적합한 buffer를 첨가한 후 37°C에서 90분간 반응시키고 type I gel loading buffer (0.5M EDTA, 0.25% BPB, 0.25% xylene cyanol, 40% sucrose)를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 전기영동하였다²¹⁾. Gel의 농도는 제한효소에 따라 0.8-1%정도로 하여 수평형 영동장치로 25mA, 20volt로 18시간 submarine electrophoresis하였다. 분자량 측정을 위하여 매 전기영동마다 제한효소에 처리된 lambda DNA를 size marker로 사용하였다.

성 적

1988년에서 1989년 사이에 각종 임상가검물로부터 분리된 *K. pneumoniae*의 분리빈도는 표 1에 나타내었다. 총 91주의 *K. pneumoniae*가 분리되었는데, 이중 요(urine)에서 55주(60.4%)로 분리빈도가 가장 높았으며, 농에서 15주(16.5%) 그리고 객담에서 14주(15.4%) 순으로 전체 분리균의 90%이상을 차지하였다. 그 다음은 자궁경부(3주), 귀(2주) 등의 순서로 분리빈도를 보였다.

16종 항균제에 대한 내성균수와 MIC범위 그리고 90% 및 50%의 균주를 억제하는 MIC를 표2에 나타내었다. Quinolone계열의 Nf와 aminoglycoside계열의 Ak에는 전 균주가 감수성이었으며, 가장 높은 내성을 보인 항균제는 Ap였는데 54주(59.3%)가 내성을 나타내었다. Su에

Table 1. Isolation frequency of *Klebsiella pneumoniae* from clinical specimens

Clinical specimens	No.(%) of strains isolated
Urine	55(60.4)
Wound discharge	15(16.5)
Sputum	14(15.4)
Cervix	3(3.3)
Ear	2(2.2)
Mouth	1(1.1)
Pleural fluid	1(1.1)
Total	91(100)

Table 2. Antimicrobial susceptibility of 91 strains of *Klebsiella pneumoniae*

Drugs ^{a)}	No. (%) of resistant strains ^{b)}	MIC($\mu\text{g/ml}$) ^{c)}			
		Range	MIC90	MIC50	
Ak	0(0)	<2 - 32	<2	<2	
Gm	24(26.4)	<1 - > 128	104.5	<1	
Km	15(16.5)	<2 - > 256	>256	<2	
To	20(22.0)	<1 - 64	15.3	<1	
Sm	36(39.6)	<2 - > 256	118.4	<2	
Clt	29(31.9)	<2 - > 256	240.4	3.4	
Cfm	22(24.2)	<2 - > 256	94.4	<2	
Mx	1(1.1)	<2 - 128	<2	<2	
Ap	54(59.3)	16 - > 256	>256	134.4	
Cm	22(24.2)	<2 - > 256	>256	3.35	
Tc	33(36.3)	<2 - > 256	>256	<2	
Su	40(44.0)	<16 - >2048	>2048	138.7	
Tp	17(18.7)	<1 - > 128	>128	<1	
Na	2(2.2)	<2 - 32	3.9	3.0	
Rf	8(8.8)	2 - 32	15.9	10.9	
Nf	0(0)	<0.25 - 4	<0.25	<0.25	

^{a)} Abbreviation: see test.

^{b)} Criteria of resistance were determined as described in NCCLS.

^{c)} 50% and 90% are MICs required to inhibited 50 and 90% of the strains, respectively.

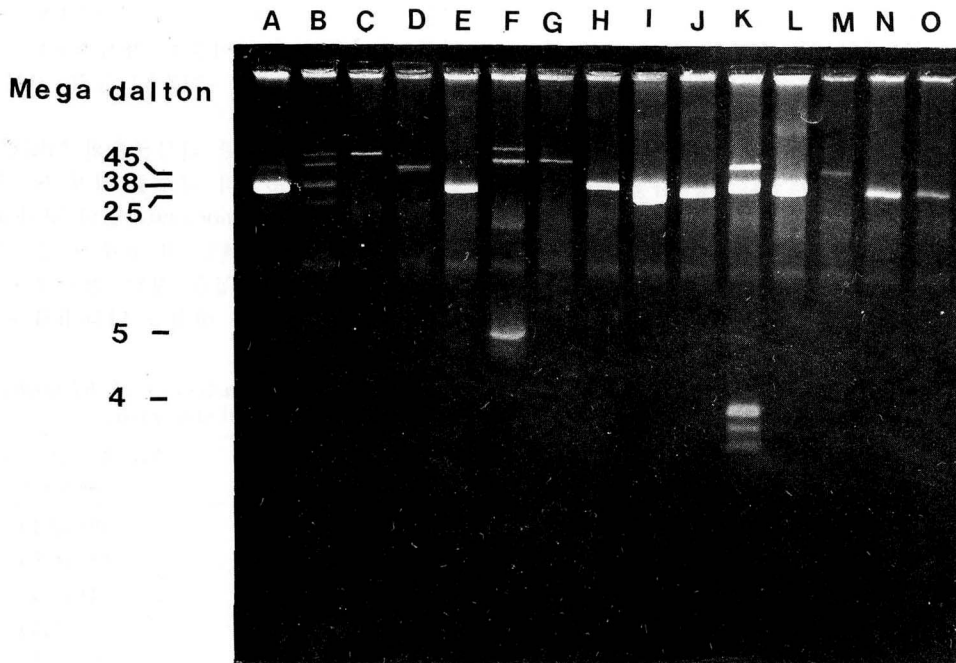


Fig. 1. Electrophoretic patterns of plasmid DNAs from *K. pneumoniae* and their conjugants(0.7% agarose gel electrophoresis, 90mA, 100V, 5 hours). A. 89KP50(RG488), B. 89KP41, C. 89KP41 (RG488), D. 88KP37(ML1410), E. 88KP65(ML1410), F. 89KP36, G. 89KP36(ML1410), H. R1033, I. R6K, J. RP4, K. E327, L. 89KP30(RG488), M. 89KP18(RG488), N. 89KP48(ML1410), O. 88KP4 (ML1410).

Table 3. Antimicrobial resistance patterns of *Klebsiella pneumoniae*

No. of drugs resistance	Resistance patterns	No. of strains	
		88yr.	89yr.
10	CmTcSmSuApTpKmGmClcCfm	0	2
9	CmTcSmSuApTpKmClcCfm	0	1
	CmTcSmSuApRfGmClcCfm	1	0
	CmTcSmSuApKmGmClcCfm	0	1
8	CmTcSmSuApGmClcCfm	2	0
	CmSmSuApTpGmClcCfm	1	0
	TcSmSuApKmGmClcCfm	2	0
	SmSuApTpKmGmClcCfm	0	1
7	CmTcSmSuApTpKm	1	0
	CmTcSmSuApTpGm	2	0
	CmTcSmSuApRfKm	1	0
	CmTcSuApTpKmGm	1	0
	TcSmSuApGmClcCfm	0	3
	SmSuApKmGmClcCfm	1	1
6	CmTcSuApTpkm	0	1
	CmTcSuApTpGm	0	1
	TcSmSuApTpKm	0	1
	TcSmApTpNaClc	0	1
	TcSuApGmClcCfm	1	0
	SuApTpNaClcCfm	1	0
5	CmTcSmSuAp	1	3
	CmSmApTpGm	0	1
	TcApGmClcCfm	1	0
	SmSuApTpKm	1	0
4	CmTcClcCfm	0	1
	CmApCfmMx	0	1
	TcSmSuAp	1	3
	ApTpRfClc	1	0
	ApGmClcCfm	0	1
3	TcSmAp	1	0
	SmSuAp	1	0
	SmApClc	1	0
	ApRfClc	1	0
2	SuAp	1	1
	SuClc	1	0
	ApRf	1	3
	ApClc	1	2
0		21	14
Total		48	43

는 44% 이상, Tc, Sm 및 Clc에는 30% 이상, Cm, Cfm, To 및 Gm에는 20% 이상의 내성빈도를 보였으며, Km, Tp, Rf 등에서는 18.7%-8.8%의 내성빈도를 보였다. Na에는 2주(2.2%) 그리고 Mx에는 단 1주(1.1%)만이 내성을 나타내었다. MIC범위와 50% 및 90% MIC는 내성빈도에 따라 상당한 차이를 나타내었으며, MIC범위의 최고치는 Ak, To, Mx, Na, Rf 및 Nf를 제외한 11종 항균제에서 실험최고농도 이상이었

으며 MIC범위도 상당히 넓었다. 50% MIC는 90% MIC에 비해 상당히 낮았는데 전균주가 감수성인 Ak 및 Nf를 비롯한 10종의 항균제에서 실험최소농도 이하였고, 90% MIC는 3종의 항균제 즉, Ak, Mx 및 Nf만이 실험최소농도 이하였으며 Km, Ap, Cm, Tc, Su 및 Tp 등에서는 실험최고농도 이상을 보였다.

표3은 16종 항균제에 대한 *K. pneumoniae*의 내성유형을 나타낸 것이다. 총 91주중 56주

Table 4. Original and transferred phenotypes and plasmid profiles of *Klebsiella pneumoniae*

Strain No.	Resistance pattern	No. of plasmid (molecular weight) ^{a)}	Plasmid designation	Transferred pattern	Molecular weight	Incompatibility group
89KP41	CmTcSmSuApTpKmGmCltCfm	4 (81.3, 62.3, 40.2, 29.4)	pKM9411	CmTcSmSuApTpKmGmCltCfm	81.3	
89KP36	CmTcSmSuApKpKmGmCltCfm	4 (94.2, 65.8, 21.1, 5.0)	pKM9361	SmSuApKpKmGm	65.8	
89KP1	SmSuApTpKmGmCltCfm	1 (49.1)	pKM9011	SmSuApTpKmGmCltCfm	49.1	
88KP32	CmTcSmSuApGmCltCfm	1 (48.1)	pKM8321	TcSmApGm	48.1	F II
88KP37	CmTcSmSuApTpGm	1 (58.1)	pKM8371	TcSmSuApTpGm	58.1	F II
88KP64	CmTcSmSuApTpKm	1 (48.1)	pKM8641	CmTcSmSuApTpKm	48.1	
88KP65	SmSuApKpKmGmCltCfm	1 (31.5)	pKM8651	SmSuApKpKmCltCfm	31.5	
89KP50	TcSmSuApGmCltCfm	1 (45.9)	pKM9501	ApGmCltCfm	45.9	
89KP30	CmTcSmSuApTpGm	1 (44.3)	pKM9301	ApGm	44.3	
88KP41	SmSuApTpKm	1 (47.6)	pKM8411	SmSuApTpKm	47.6	
89KP18	CmTcSmSuAp	1 (49.5)	pKM9181	CmTcSmSu	49.5	
89KP43	ApGmCltCfm	1 (47.6)	pKM9432	ApGmCltCfm	47.6	F II
89KP48	TcSmSuAp	-	pKM9481	ApGmClt	47.6	F II
88KP4	SmSuAp	1 (35.9)	pKM8041	SmAp SmSuAp	35.9	

^{a)} molecular weight: mega dalton

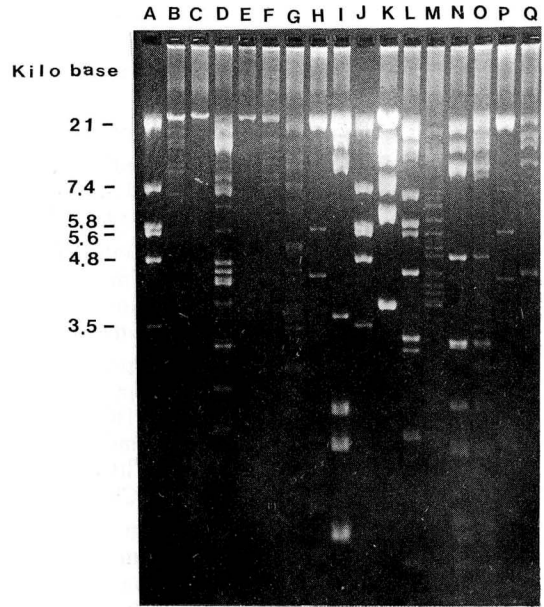


Fig. 2. Restriction endonuclease analysis patterns of R plasmids from *K. pneumoniae*(digested with *Eco*RI, 0.8% agarose gel electrophoresis, 25mA, 20V, 19 hours). A. Lambda DNA, B. pKM9411, C. pKM9361, D. pKM9011, E. pKM8321, F. pKM8371, G. pKM8641, H. pKM8651, I. pKM9501, J. Lambda DNA, K. pKM9301, L. pKM9411, M. pKM9181, N. pKM9431, O. pKM9432, P. pKM9481, Q. pKM8041.

(61.5%), 즉 88년도에 분리된 48주중 27주 (56.3%)와 89년도에 분리된 43주중 29주(67.4%)에서 2종이상의 항균제에 대해 내성을 나타내었으며 최고 10종 항균제에 대해 중복내성 양상을 보였다. 88년도에 분리된 *K. pneumoniae* 17주(35.4%)와 89년도에 분리된 균주 17주(39.5%)를 합하여 34주(37.4%)에서 5가지 이상의 항균제에 내성을 나타내었는데 최고 10종 항균제에 중복내성을 나타낸 균주(2주)는 89년도 분리균주였다. 특히 두드러지게 내성균이 많은 내성유형은 없었으며 ApRf, TcSmSuAp, CmTcSmSuAp 등에 중복내성을 보이는 것이 각 4주씩 있었다.

그림1은 실험균 및 피전달균의 plasmid DNA의 전기영동 양상을 나타낸 것으로 Lane H는 분자량 45Md의 R1033이며, Lane I는 25Md의 R6K, Lane J는 38.0 Md의 RP4, Lane K는 E327의 영동상이다. Lane B 및 F는 *K. pneumoniae* 89KP41과 89KP36의 plasmid영동상으로, 1개 또는 2개 정도의 plasmid를 보유하고

있는 거의 대부분의 *K. pneumoniae*와는 달리 89KP41은 분자량 81.3Md에서 29.4Md사이의, 그리고 89KP36은 94.2Md에서 6.5Md사이의 4개의 plasmid를 보유하고 있었다. Lane A, C, D, E, G, L, M, N 및 O는 *K. pneumoniae* 89KP50, 89KP41, 88KP37, 88KP65, 89KP36, 89KP30, 89KP18, 89KP48 및 88KP4의 R plasmid의 영동상으로 분자량은 81.3Md에서 35.9Md사이였다.

표4는 항균제내성균의 내성기전 및 전달성 내성인자를 조사하기 위해 검사한 접합에 의한 내성전달 성적이다. 전달성 R plasmid의 분자량은 분자량이 가장 큰 CmTcSmSuApTpKmGmCltCfm의 10종 항균제에 내성을 가지는 81.3Md (pKM9411)에서 가장 분자량이 작은 SmSuApKmCltCfm의 6종 항균제에 내성을 가지는 31.5Md(pKM 8651) 사이의 plasmid였다. 89KP43의 경우에는 영동상에서는 47.6Md의 1개의 plasmid만을 관찰할 수 있었는데 내성전달 실험결과 분자량은 동일하지만 내성유형의 차이를 보이는 2종류의 R plasmid (pKM9431과 pKM9432)가 존재함이 확인되었다. 그러나 89KP48은 plasmid를 관찰할 수 없었으나 피전달균으로 SmAp의 항균제에 내성을 가지는 35.9Md(pKM9481)의 R plasmid가 전달되었음이 관찰되었다. 4개의 서로 다른 분자량의 plasmid를 가지는 89KP41과 89KP36의 경우에는 각각 81.3Md(pKM9411)과 65.8Md(pKM9361)만이 피전달균으로 전달이 이루어졌다. 비적합성균 FII와 C에 대해 비적합성검사를 실시한 결과 C군에 속하는 것은 없었으며, pKM8381, 8371, 9301, 9431 및 9432가 FII group에 속하였다.

그림2는 *K. pneumoniae*의 R plasmid DNA를 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 그 분획을 전기영동한 것이다. Lane A와 J는 21-3.5 Kilobase (Kb) 사이의 6개의 절편을 갖고 있는 Lambda DNA의 영동상이며, Lane B, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, O, P 및 Q는 *K. pneumoniae*유래의 R plasmid의 영동상이다. 절편수는 R plasmid의 분자량에 따라 다양하였는데, 분자량은 48.1Md으로 동일하지만 항균제 내성양상의 차이를 보인 pKM8321(Lane E)과 pKM8641(Lane G)간의 분획상에도 차이가 있었다. ApGmCltCfm에 내성을 보이는 pKM9431(Lane N)과 ApGmClt에 내성을 보이는 pKM9432(Lane O)는 위에서 언급한 바와 같이 동일한 균주(89KP43)에서 전달된 R plasmid들인데, 비적합성균은 F

II로 동일하였고, 분자량도 같았으나 내성양상에서 Cfm에 대한 내성에 차이를 보였는데 *EcoRI*에 의해 pKM9431은 18.4Kb에서 1.3Kb사이의 11개의 절편으로, pKM9432는 19.3Kb에서 1.3Kb사이의 12개의 절편으로 잘려 분획상은 거의 비슷하였다. 같은 크기의 FII 비적합성균으로 분류된 plasmid중 pKM9431과 9432를 제외하고는 plasmid간의 분획상은 다소의 차이가 있었다.

고 찰

*K. pneumoniae*는 병원의 임상가검물로 부터 흔히 분리되는 균종중 하나로서 주로 폐렴과 같은 호흡기 감염병 및 비호흡기계통의 장관염, 뇌막염, 요로감염 및 폐혈증 등을 유발한다.^{16,22,23,31,32} 특히 신생아나 유아에서의 뇌막염인 경우에는 사망률이 90%에 달하고 있는데, 이 중에도 여러가지 항균제에 동시에 내성을 가지는 다약제내성균의 감염인 경우에는 문제가 더욱 심각하다.^{3,8,16,32} 정상인의 oropharynx에서 1-6% 정도의 빈도로 분리되는데¹⁸, 이는 개체의 면역저하 및 호흡기질환 그리고 호흡기내의 기계적 장치 등에 따른 방어능력이 저하된 경우에 폐렴 등 호흡기계통의 감염병이 유발될 소지를 제공하기도 한다²². 본 실험에 사용한 91주의 *K. pneumoniae*중 55주(60.4%)가 요에서 분리되어 가장 높은 분리빈도를 보였는데 항균제 남용과 요로에 대한 부적절한 기계조작 등으로 인해 요로감염이 증가되고 있는 것 같으며¹², 농에서 15주 그리고 객담에서 14주가 분리되어, 요, 농 그리고 객담에서 분리된 균이 전체 분리균의 90% 이상을 차지하는 것으로 보아 *K. pneumoniae*에 의한 감염병에는 요로감염, 창상감염 및 호흡기감염이 빈번한 것으로 사료된다.

항균제의 개발로 감염병의 치료가 용이해졌으나 여러가지 항균제에 동시에 내성을 가지는 균의 증가로 인한 감염병의 치료에는 난점이 많은데 이는 항균제의 부적절한 투여, 특히 남용에 따르는 문제가 큰 비중을 차지하고 있다^{2,3,8}. 남용에 따른 내성균의 출현을 방지하고 감염병의 치료를 적절히 하기 위해 감염원인균에 대한 항균제 감수성검사를 하여 적절한 약제 선별 투약하는 것이 바람직하지만 현재의 실정상 문제가 많다. 그러므로 과거의 또는 최근의 동일 환경이나 지역에서 분리되었던 균들의 항균제 내성양상을 염두에 둘 필요가 있겠다¹.

*K. pneumoniae*의 항균제 내성은 Pc계열에는 거의 대부분의 균에서 내성을 보이는데 이는 염색체성 β -lactamase에 기인하는데, 최근에는 비염색체성 TEM-like- β -lactamase 산생균주의 출현으로 Pc계열에 대한 내성은 점점 더 심화되고 있으며, 이러한 β -lactamase를 산생하는 균주의 증가로 인해 *K. pneumoniae*의 주 치료 약제로 사용되어 왔던 cephalosporin계열의 약제에도 내성균이 증가하고 있는 실정이다^{10, 22, 24, 25}. 본 실험에서는 Ap에 대한 내성이 59.3%였는데 서등⁵, 최등⁷, 이⁶의 보고 보다는 다소 낮은 내성을 보였다. Cephalosporin에 대한 내성은 Clt에 31.9%, Cfm에 24.2% 그리고 Mx에는 1.1%의 내성을 나타내어 Clt 및 Cfm은 서등⁵ 및 이⁶의 보고 보다는 낮았으나 최등⁷의 보고 보다는 다소 높은 내성빈도를 나타내었고, Mx에는 서등⁵은 내성균이 없음을 보고하였는데, 본 실험에서는 91주중 1주에서 내성을 나타내어 Mx가 아직까지 유효한 치료약제로 생각된다. 그러나 Mx과 같은 제3세대 cephalosporin약제의 전달성 내성을 가지는 균주의 출현이 보고되고 있다. 보통 흔히 사용되는 Cm(24.2%), Tc(36.3%), Su(44.0%) 등의 약제의 내성은 이⁶ 및 서등⁵의 보고에 비해 다소 낮았고 Tp와 Rf에는 8.8-18.7%의 내성을 보였는데 서등⁵은 Rf에 내성균이 없음을 보고하였는데 본 실험에서는 8주에서 내성을 보였지만 MIC90은 15.9 μ g/ml로 내성 정도는 낮았다. Aminoglycoside계 항생제에 대한 내성은 Km, Gm, To, Sm에 16.5-39.6%의 내성빈도를 나타내어 서등⁵, 이⁶의 보고와는 비슷한 내성빈도를 보였지만 외국의 보고에 비해서는 다소 높았다^{23, 32}. Ak는 Km유도체로서 1976년에 처음으로 소개되었으며 다른 aminoglycoside계 항균제에 비해 AME에 의한 불활성화에 저항을 가지는 약제로서^{23, 29, 31, 32} 본 실험에서도 전균주에서 Ak에 감수성을 보였다. Woloj등³²은 Ak에 약 7%의 분리균이 내성을 보이며 이것은 염색체성 및 비염색체성 내성에 기인하며, transposon이 관여함을 보고하였고, Tolmasky와 Crosa³⁰ 그리고 Tolmasky등²⁹도 Ak내성이 transposon과 관련이 있음을 보고하여 내성의 감수성균으로의 전파를 시사하였다. 그러나 아직까지는 Ak에 대한 내성빈도가 타 항균제에 비해 상당히 낮으며 Na(2.2%), Nf(0%) 및 Mx(1.1%)에 대한 내성빈도도 상당히 낮아, 또 MIC90도 Ak, Mx 및 Nf의 경우 실험최소농도 이하를 나타내

어, *K. pneumoniae*의 치료에 효과적인 약제로 생각된다.

항균제 내성유형은 최고 10종의 항균제에 중복내성을 나타내는 균주를 비롯하여 5가지 항균제 이상의 중복내성을 보이는 균주가 34주였다. 단 1주에서 Mx에 내성을 나타내는 균주는 Cm, Ap 그리고 Cfm에 중복내성을 보였다. 1988년도 분리균 48주 중 21주(43.8%)에서 실험한 항균제에 감수성을 나타내었는데, 1989년도 분리균은 43주중 14주(32.6%)에서 감수성을 보였고, 최고 10종 항균제에 내성을 보인 균주가 1989년도 분리균주여서 1988년에 비해 내성균의 증가를 시사하였다.

장내세균을 비롯한 각종 세균의 항균제 내성이 균체간의 접합에 의한 전달성 R plasmid에 기인함이 잘 알려져 있다.^{2, 3, 8, 14, 15} 본 실험에서는 피전달균으로 *E. coli* RG488과 ML1410을 이용하여 *K. pneumoniae*의 항균제내성이 전달성 내성인지를 알아보기 위해서 접합 실험을 실시한 결과, 다약제에 동시에 내성인 균 56주 중 14주(25%)에서 전달이 일어났는데, 대장균 및 이질균에 비해 전달성 R plasmid의 보유율은 상당히 낮았다. 균주를 용해시켜 plasmid DNA를 조사한 결과 최고 4개의 plasmid를 보유하는 균주가 있었고 대다수의 균주에서 1개 또는 2개의 plasmid를 보유하고 있었다. 전달성 R plasmid의 분자량은 31.5Md에서 81.3Md사이였는데 pKM9411(81.3Md), pKM9361(65.8Md) 그리고 pKM8371(58.1Md)를 제외하고는 이질균 및 대장균의 전달성 R plasmid와 비교해 볼 때 분자량이 다소 작았다^{3, 8}. 89KP43의 경우 전기영동상 47.6Md의 1개의 plasmid를 관찰할 수 있었는데 내성전달실험 결과, 분자량은 동일하지만 내성유형에 차이가 있는 2종류의 R plasmid를 관찰할 수 있었다. 이는 동일한 크기의 plasmid가 한 균체 내에서 공존하고 있다고 생각할 수 있으나, 비적합성검사 결과 모두 FII 균으로 분류되어 같은 비적합성균에 속한 plasmid들은 동일균체 내에서 공존할 수 없으므로 하나의 plasmid만이 존재한다고 생각할 수 있다. 그러므로 이러한 현상은 아마도 피전달균으로 R plasmid가 전달되는 동안에 또는 전달이 일어난 뒤 선택 배양하는 동안에 DNA 염기서열에 약간의 변화가 생긴 돌연변이주가 분리되어 차이가 생겼다고 생각할 수 있겠으며, 내성양상의 차이를 보인 Cfm에 대한 내성 인자가 transposon상태로 있다가 이것이 접합

에 의해 피전달균으로 내성을 전달하기 직전에 chromosomal DNA로 전이되어 그 내성이 전달되지 않았을 수도 있다고 생각된다. 그러나 분자량이 동일한 것으로 보아 전자의 경우라고 생각되는데, 분자량이 아주 작은 차이는 구별하기가 쉽지 않으므로 후자의 경우도 무시할 수는 없겠다. 또 chromosomal DNA에 위치하고 있었던 항균제내성과는 무관한 유전물질이 plasmid DNA의 Cfm유전자내로 전이되어 Cfm의 내성이 insertional inactivation이 일어났다고 생각할 수도 있겠다. 89KP48의 경우는 plasmid를 관찰할 수 없었는데, 접합실험 결과 SmAp의 내성을 나타내는 35.9 Md(pKM9481)의 plasmid가 피전달균으로의 전달을 관찰할 수 있었다. 이는 pKM9481이 89KP48내에서 episome상태로 존재하다가 전달이 일어났다고 생각된다.

항균제 내성 표현형의 정도와 분자량에 따라 R plasmid들이 어느 정도의 차이가 있는지를 알아 보기 위해서 제한효소를 처리하여 plasmid DNA를 절단하고 전기영동하여 그 분획을 조사하였다. 분자량에 따라 분획상은 다소의 차이가 있었으며 분자량은 같으나 내성유형이 다른 pKM8321과 pKM8641의 분획상에도 차이가 있었다. 이는 R plasmid DNA상에 존재하면서 내성을 실질적으로 지배하는 여러가지의 transposon들이 있는데 내성양상에 따라 존재하는 transposon이 달라서 분획의 차이가 생길 수 있다^{4,8)}. 그러나 pKM9431과 9432의 경우에는 거의 유사한 분획상을 관찰할 수 있었다. 비적합성실험 결과 FII균으로 밝혀진 plasmid의 분획상은 pKM9431과 9432를 제외하고는 분획상에 다소의 차이가 있었는데 이³⁰⁾도 *K. pneumoniae*의 R plasmid중 같은 비적합성균으로 분류된 plasmid간의 분획상에 차이가 있음을 보고한 바 있다. 이러한 분획상의 차이를 알아보기 위해서는 plasmid DNA서로간의 유사성을 검사하는 DNA-DNA hybridization실험 등이 추가되어야 하겠으며 DNA probe 등을 이용하여 특정 내성인자의 차이를 알아보아야 하겠다.

동일한 항균제에 내성을 나타내지만 R plasmid가 없는 균주도 있었는데 이러한 경우에는 염색체성 DNA를 제한효소로 절단하여 DNA절편을 비교 분석하고, 나아가 특정 DNA probe를 이용한 restriction fragment length polymorphism등의 실험을 해 봄이 바람직하겠다. 또 RNA level의 분자생물학적 실험도 하여야

할 것으로 생각된다.

결 론

임상가검물에서 분리된 91주의 *K. pneumoniae*를 대상으로 적절한 항균제의 선별과 약제내성의 기전을 조사하고 아울러 R plasmid의 분석을 통하여 plasmid의 분자생물학적 특성을 알아본 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

임상가검물별 분리빈도는 요(60.4%), 농(16.5%), 객담(15.4%) 등의 순서로 빈도를 보였다. Amikacin(Ak), moxalactam(Mx), nalidixic acid(Na), rifampin(Rf) 및 norfloxacin(Nf)에는 0-8.8%의 아주 낮은 내성을 나타내었다. Gentamicin, tobramycin(To), cefamandole 및 chloramphenicol 등에는 22.0-26.4%의 내성을 나타내었고, streptomycin, cephalothin, ampicillin, tetracycline 및 sulfisomidine에는 31.9-59.3%의 높은 내성을 나타내었다.

90%의 균주의 성장을 억제시키는 농도인 90% MIC(minimal inhibitory concentration)은 Ak, Mx 및 Nf에는 실험최소농도 이하였으며, To, Na 및 Rf는 3.9-15.9로 낮았으나 나머지 약제는 118.4->2048 μ g/ml로 매우 높았다. 다약제 내성양상으로는 두드러지게 내성균이 많은 내성유형은 없었고 5가지 이상의 항균제에 동시에 내성을 보이는 균주가 34주(37.4%)였다.

전달성 내성인자를 알아보기 위해 접합실험을 실시한 결과 25%에서 피전달균 *Escherichia coli* RG488 또는 ML1410으로 내성을 전달하여, 다약제내성의 원인이 전달성 R plasmid와 관련이 있음을 알 수 있었다. 89KP48의 경우는 전기영동상에서 plasmid DNA를 관찰할 수 없었으나 Sm과 Ap에 내성을 나타내는 35.9Md 크기의 plasmid가 피전달균으로의 전달을 관찰할 수 있었다. 전달성 R plasmid의 분자량은 35.9-81.3Md사이였으며, 비적합성검사 결과 C군에 속하는 R plasmid는 없었고, pKM8321, 8371, 9301, 9431 및 9432가 FII균으로 분류되었다.

R plasmid DNA를 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 그 분획상을 분석한 결과 분자량과 내성양상에 따라 다소의 차이가 있었는데, 비적합성균 FII에 속하는 plasmid들은 pKM9431과 9432를 제외하고는 분획상에 차이가 있었다.

참 고 문 헌

- 1) 백태원, 이유철, 조동택, 전도기: 1983년에 분리된 *Pseudomonas aeruginosa*의 항균제내성 및 pyocin형. 대한화학요법학회지, 2: 115-123, 1984.
- 2) 서민호, 박종욱, 서성일: 이질균의 R plasmid의 유전적 특성. 계명의대논문집, 7: 249-257, 1988.
- 3) 서민호, 설성용, 조동택, 전도기: *Shigella*의 R plasmid의 특성과 항균제내성의 본태. 대한화학요법학회지, 2: 97-114, 1984.
- 4) 서민호, 이명옥, 서성일: *Shigella* R plasmid와 recombination현상. 대한미생물학회지, 25: 195-202, 1990.
- 5) 서성일, 박종욱, 전도기: 임상재료에서 분리한 각종세균의 항균제내성. 대한미생물학회지, 22: 283-294, 1987.
- 6) 이상화: *Klebsiella*균의 항균제 감수성과 R-plasmid양상. 대한미생물학회지, 24: 335-343, 1989.
- 7) 최경진, 이유철, 서민호, 조동택: 요에서 분리한 Gram음성균의 분포 및 항균제내성. 대한화학요법학회지, 2: 124-133, 1984.
- 8) 하경임, 서성일, 박종욱, 서민호: 대장균의 R plasmid의 특성과 항균제 내성. 대한미생물학회지, 25: 19-26, 1990.
- 9) Birnboim IC and Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Reser.* 7: 1513-1523, 1979.
- 10) Chanal CM, Sirot DL, Labia R, Petit A, Mornad A, Sirot JL and Cluzel RA: Comparative study of a novel plasmid-mediated β -lactamase, CAZ-2 and CTX-1 and CAZ-1 enzymes conferring resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1660-1665, 1988.
- 11) Datta N and Olarte J: R factors in strains of *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae* 1 isolated during epidemics in Mexico: Classification by compatibility. *Antimicrob Agents Chemother* 5: 310-317, 1974.
- 12) Dealler SF, Hawkey PM and Millar MR: Enzymatic degradation of urinary sulfate by *Providencia stuartii* and *Klebsiella pneumoniae* causes the purple urine bag syndrome. *J Clin Microbiol* 26: 2152-2156, 1988.
- 13) Edwards PR and Ewing WH: Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed, New York, Elsevier Science Publishing Co. pp 93-136, 1986.
- 14) Falkow S: Infectious multiple drug resistance. 1st ed, New York, Methuen Inc, pp 1-110, 1975.
- 15) Farrar WE Jr: Antibiotic resistance in intestinal bacteria. *Clin Gastroent* 8: 803-826, 1976.
- 16) Joklik WK, Willett HP, Amos DB and Wilfert CM: Zinsser Microbiology, 9th ed, USA, Appleton & Lange, pp 467-468, 1988.
- 17) Kado CI and Liu ST: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 145: 1365-1373, 1981.
- 18) Koneman EW, Allen SD, Dowell VR Jr, Janda WM, Somers HM and Winn WC Jr: Color atlas textbook of diagnostic microbiology. 3rd ed, Philadelphia, JB Lippincott Co, pp 89-156, 473-534, 1988.
- 19) Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr and Shadomy HJ: Manual of clinical microbiology. 4th ed, Washington DC, American Society for Microbiology, pp 263-277, 959-971, 1985.
- 20) Ma MY, Goldstein EJC, Friedman MH, Anderson MS and Mulligan MM: Resistance of gram-negative bacilli as related to hospital use of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 24: 347-352, 1983.
- 21) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J: Molecular cloning. 1st ed, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, pp 98-106, 1982.
- 22) Nassif X and Sansonetti PJ: Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect and Immun* 54: 603-608, 1986.
- 23) GTV Neieu, Goldstein FW, Pinto ME, Acar JF and Collatz EC: Transfer of amikacin resistance by closely related plasmids in

- members of the family *Enterobacteriaceae* isolated in Chile. *Antimicrob Agents Chemother* **29**:833-837, 1986.
- 24) Petit A, Sirot DL, Chanal CM, Sirot JL, Labia R, Gerbaud G and Cluzel RA:Novel plasmid-mediated β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:626-630, 1988.
- 25) Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin, A Darfeuille-Michaud, Perroux R and Cluzel R:Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*:Identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* **20**:323-334, 1987.
- 26) Smith JA, Henry D, Ngui-Yen J, Castell A and Coderrs S:Comparison of agar dilution, microdilution, and disk elution methods for measuring the synergy of cefotaxime and its metabolite against anaerobes. *J Clin Microbiol* **23**:1104, 1986.
- 27) Steers E, Plotz EL and Graves BS:Inocular replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chemother* **9**:307-311, 1959.
- 28) Thornsberry C:Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards pp 31-91, 1983.
- 29) Tolmasky ME, Chamorro RM, Crosa JH and Marini PM:Transposon-mediated amikacin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **32**:1416-1420, 1988.
- 30) Tolmasky ME and Crosa JH:Tn1331, a novel multiresistance transposon encoding resistance to amikacin and ampicillin in *Klebsilla pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **31**:1955-1960, 1987.
- 31) Tolmasky ME, Roberts M, Woloj M and Crosa JH:Molecular cloning of amikacin resistance determinants from a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* **30**:315-320, 1986.
- 32) Woloj M, Tolmasky ME, Roberts MC and Crosa JH:Plasmid-encoded amikacin resistance in multiresistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonates with meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* **29**: 315-319, 1986.
-