

痢疾菌 및 살모넬라의 藥劑耐性, 耐性化防止 및 除去

慶北大學校 醫科大學 細菌學教室

全 燕 基 · 薛 盛 用

=Abstract=

Drug resistance of *Shigella* and *Salmonella* and the inhibition and elimination of drug resistance

Doki Chun, and Sung Yong Seol

Department of Bacteriology, Kyungpook National University School of
Medicine, Taegu, Korea

Ninety-five strains of *Shigella*, 70 of *Salmonella paratyphi* A, and 230 of *Salmonella typhi* were tested for their resistance to drugs. Also studied was the inhibition and elimination of drug resistance. All except one strain of *Shigella* consisted of 79 *Sh. flexneri* and 16 *Sh. sonnei* were multiply resistant to chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, and sulfisomidine. Among them, 70 strains were resistant to ampicillin and carbenicillin, 80 to trimethoprim-sulfamethoxazole, 22 to nalidixic acid, and one to kanamycin, but strain resistant to gentamicin, cephaloridine, and rifampin was not encountered. All strains of *S. paratyphi* A and *S. typhi* were susceptible to drugs tested, except sulfisomidine and rifampin, for which all *S. paratyphi* A were slightly resistant to sulfisomidine and the majority of *S. paratyphi* A and *S. typhi* were slightly resistant to rifampin. Approximately 80% of multiply drug-resistant *Shigella* transferred their resistance to *E. coli* by conjugation, and the resistance was considered to be mediated by R plasmids. The frequency of transfer of drug resistance varied by donor strains and recipients, but not by selecting drugs. Resistance to nalidixic acid was not transferred by conjugation to the recipients. Drug-resistant *Shigella* strains successively subcultured in nutrient agar stabs contained clones resistant to drugs and those susceptible to drugs, but the ratio of resistant and susceptible clones varied by strains. The multiply drug-resistant *S. typhi* and *Shigella* strains were found to not lose completely their drug resistance by subculture in media. Acriflavine has some effect on the elimination of drug resistance mediated by R plasmids, but the effect varied markedly by strains. Atabrine has no effect among strains tested. The combination of drugs increased the drug actions in majority of cases with synergistic or additive effects.

서 론

細菌性痢疾 및腸티프스등 水因性 腸系傳染病은 우리나라에서는 地方病의 性格을 띠우고 있어 四季를 통하여 많이 發生하고 있으며 특히 夏季에는 많은 患者를 볼 수 있어 國民保健上 重要한 問題가 되고 있으며 이로 인하여 莫大한 勞動力을 遊休시키고 經濟的損失을 招來하고 있다. 이들 菌은 元來 各種 抗菌性物質에 對하여 抵抗力이 弱하거나 거의 없었으나 抗菌劑가 널리 使用됨에 따라 藥劑에 對한 耐性을 가진 菌이 나타나기 始作하였고 특히 痢疾菌에서 強한 多藥劑耐性을 가진 菌이 많이 나타나서 이들 疾患의 治療에 큰 困難을 느끼고 있다. 이들 菌의 藥劑耐性에 關한 研究의 動向을 보면 各國에서 耐性菌의 地域의 分布, 耐性樣相, 年次的增減 등에 對하여 많은 業績이 發表되었고¹⁻⁴⁾ 耐性化的 機轉도 究明되어 있으며^{2,5)} 耐性的 除去 및 防止 등에 關한 研究도 볼 수 있다.⁵⁻⁷⁾

本敎室에서도 數次에 걸쳐 이들 菌의 耐性에 關하여 報告한 바 있다. 現在까지의 結果를 綜合하여 보면 痢疾菌은 大部分이 chloramphenicol(Cm), tetracycline(Tc), streptomycin(Sm), sulfonamide에 多藥劑耐性이며 ampicillin(Ap)에 耐性을 가진 菌도 間或 分離되고 있으며 이 耐性은 R plasmid에 의하여 傳達됨이 알려져 있다.^{8,9)} 腸티프스菌은 藥劑에 對하여 쉽게 耐性化되지 않으나 Cm에 對한 耐性菌이 發表되었고¹⁰⁾ 1972~3年 Mexico에서 Cm, Tc, Sm, sulfonamide, Ap 및 kanamycin(Km) 등에 多藥劑耐性인 菌에 의한 大流行이 있는 後 美國 등 各國에서 이런 菌에 의한 感染이 報告되었고¹¹⁻¹³⁾ 우리나라에서도 多藥劑耐性인 腸티프스菌이 分離되었으며 이들 耐성이 接合에 의하여 傳達되는 R plasmid에 의한 것으로 判明되었으나¹⁴⁾ 1975年以後는 그 數가 적어졌다.^{9,15)}

이러한 耐性菌에 있어서의 耐性除去의 方法도 많이 試圖되었으며⁵⁾ 耐性化的 防止 및 效果의인 治療에 關한 研究의 한 方法으로 各藥劑의 併用效果도 追究되었으나^{6,7)} 큰 效果를 보지 못하고 있다. 著者は 우리나라에서 痢疾菌 및 살모넬라가 分離되는 狀況, 藥劑耐性 및 그 機轉, 耐性的 除去 및 防止에 關하여 몇가지 實驗을 하였기에 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

菌株: 1978年 1월부터 12월까지 1年間 本敎室 및 大邱市 東山基督病院과 파타마病院 臨床檢査室에서 分離

한 salmonella 및 shigella를 供試하였는 바 分離된 菌株는 Salmonella paratyphi A 70株, Salmonella typhi 230株였으며 shigella는 95株였는데 그 中 Shigella flexneri가 79株, Shigella sonnei가 16株였다. Salmonella는 主로 血液培養에서 分離하였고 shigella는 患者의 大便을 培養하여 分離한 것인바 生物學的 및 免疫學的으로 各菌의 定型의인 性狀을 갖추고 있었다. 上記 菌株外에 1977以前에 分離한 菌株도 必要에 따라 供試하였다.

藥劑 및 藥劑耐性檢査: 供試藥劑는 Cm, Tc, Sm, sulfisomidine(Sa), nalidixic acid(Na), Ap, Km, gentamicin(Gm), amikacin(Ak), trimethoprim과 sulfamethoxazole을 1:20으로 混合한 것(T-S), carbenicillin(Cb), cephaloridine(Cr), 및 rifampin (Rf)의 13種으로 이들 抗菌劑를 各各 適當한 溶媒에 溶解하여서 原液을 만들어 冷凍保存하였고 使用時에는 이를 다시 pH 7.2의 phosphate buffer 또는 食鹽水로 稀釋하여 使用하였다.^{9,16)}

耐性檢査는 平板稀釋法으로 實驗하였고 培地는 trypticase soy(TS) broth 또는 agar를 供試하였으나 Sa의 檢査에는 Mueller-Hinton(MH) 培地를 使用하였다. 各藥劑를 稀釋하여 3,200 μ g/ml에서 0.8 μ g/ml에 이르는 2배로 順次稀釋된 溶液을 만들고 各濃度의 溶液을 미리 溶解하여 50~55°C에 保存한 2배濃度의 TS 또는 MH 寒天培地에 同量 加하여 充分히 混和한 다음 Petri dish에 分注하여 凝固시킨다. 이로서 1,600~0.4 μ g/ml의 各藥劑를 含有하는 寒天培地가 調製된다. TS broth에 18~20時間 培養한 供試菌液을 食鹽水로 100배 稀釋하여 Steers inoculator로 藥劑含有培地에 接種하였으며¹⁷⁾ 37°C에 20~24時間 培養後 菌發育 有無를 보아 最少發育阻止濃度(MIC)를 決定하였으며^{14,18)} 菌에 對한 藥劑의 MIC가 Cm, Tc, Na, Ap, Km, T-S, Cr, 및 Rf에서 25 μ g/ml, Gm 및 Ak에서 6.3 μ g/ml, Sm에서 50 μ g/ml, Sa 및 Cb에서 100 μ g/ml 이상일 때는 이들을 耐性菌으로 規定하였다.

耐性傳達: Chun 등¹⁹⁾의 方法에 의하여 實驗하였다. 耐性的 被傳達菌으로는 E. coli ML 1410¹⁹⁾, RG 176 및 RG 488²⁰⁾을 使用하였는데 ML 1410과 RG 176은 Na에 耐성이었고 RG 488은 Rf에 耐성이나 其他 供試藥劑에는 感受성이 強한 菌이다. 供試菌과 E. coli를 各各 TS broth에 18時間 培養한 것 0.1ml를 各各 5ml의 TS broth에 接種, 37°C에 3~4時間 때때로 振盪하면서 培養한 다음 0.5ml의 供試菌液과 4ml의 E. coli培養液을 混合하여 隨時로 振盪하면서 18~20時間 培養하였고 이 培養液을 選擇培地에 塗沫培養하였다.

選擇培地로는 TS 또는 MH寒天培地に 25 μ g/ml의 Na 또는 50 μ g/ml의 Rf와 25 μ g/ml의 Cm, Tc, Ap, Km, T-S, 50 μ g/ml의 Sm 또는 100 μ g/ml의 Sa 또는 Cb를 함유토록 調製하였으며 이들培地에는 供試菌과 被傳達菌인 E. coli는 發育하지 못하였다. 選擇培地上에 發育한 E. coli集落은 供試菌으로 부터 耐性を 傳達한 菌으로 보고 任意로 選擇한 10개의 集落을 MacConkey agar에 分離培養하여 生物學的으로 다시 E. coli임을 確認한 다음 各抗菌藥劑에 對한 耐性を 平板法으로 檢査하여 原菌의 耐性樣相과 比較하였다.

耐性除去實驗: 먼저 保存狀態에서 藥劑耐性の 脫落與否를 보기 위하여 몇가지 實驗을 하였으며 方法은 後述한다. 藥劑處理에 의한 耐性の 脫落은 Watanabe 및 Fukasawa²¹⁾의 方法에 準하여 實驗하였다. 2ml의 TS broth에 培養한 供試菌液을 1,000倍 稀釋하여 그 0.1ml을 藥劑를 加한 TS broth에 培養한 것을 MacConkey agar平板에 移植하여 菌數를 計算하고 任意로 選擇한 100個의 集落을 取하여 各各 增菌한 다음 抗菌藥劑加培地에 移植하여 耐性脫落有無를 보았다.

藥劑의 併用效果實驗: Checkerboard法²²⁾에 의하여 實驗하였다. 各各 다른 濃度의 2種의 藥劑를 含有하는 TS broth 溶液을 만들고 여기에 供試菌의 培養稀釋液(菌數는 約 10⁴)을 接種하여 20時間 培養後肉眼으로 菌發育有無를 보아 兩藥劑의 共同作用에 의한 MIC를 定하고 併用效果는 兩藥劑의 相加量의 中央點에서 가장 強하게 나타남으로 이 點에서의 fractional inhibitory concentration(FIC)係數로 判定하였다^{22,23)}. 菌發育이 認知되지 않는 試驗管의 內容液을 1白金耳식 取하여 peptone agar에 移植하여 培養한 다음 菌發育의 有無를 보아 兩藥劑의 共同作用에 의한 最少殺菌濃度(MBC)를 定하고 併用に 의한 殺菌效果는 兩藥劑의 相加量의 中央點에서의 fractional bactericidal concentration(FBC)係數로 判定하였다²⁴⁾. FIC 係數와 FBC係數의 計算法은 다음과 같다(A와 B는 抗菌劑).

$$FIC\text{係數} = \frac{MIC\text{ of A in combination}}{MIC\text{ of A alone}} + \frac{MIC\text{ of B in combination}}{MIC\text{ of B alone}}$$

$$FBC\text{係數} = \frac{MBC\text{ of A in combination}}{MBC\text{ of A alone}} + \frac{MBC\text{ of B in combination}}{MBC\text{ of B alone}}$$

上記 等式에서 FIC係數 또는 FBC係數가 0.75 또는 그 以下일 때는 相乘作用, 1일 때는 相加作用, 1보다 높을 때는 無關, 2 以上일 때는 拮抗作用으로 判定하였다.

Shigella의 藥劑耐性頻度와 MIC를 보면 第1表와 같이 95株中 1株만이 供試藥劑全部에 感受性이었고 94株는 藥劑에 耐性を 나타냈는데 그中 Cm, Tc, Sm 또는 Sa에 耐性인 것이 94株, Ap 또는 Cb에 耐性인 것이 70株였으며 T-S에는 80株, Na에는 22株가 耐性이었으며 Km에 耐性인 것도 1株 있었으나 Gm, Ak, Cr 및 Rf에는 全菌株가 感受性이었다. 耐性菌에 對한 藥劑의 MIC를 보면 Cm, Tc 또는 Sm는 100~400 μ g/ml, Sa는 1,600 μ g/ml以上, Na는 25~800 μ g/ml以上, Ap는 200~800 μ g/ml, Km 및 Cb는 800 μ g/ml以上, T-S는 400~800 μ g/ml 以上으로 이들 菌은 比較的 높은 耐性を 가지고 있었다. 供試藥劑에 感受性인 菌의 MIC를 比較해 보면 大體로 0.8~12.5 μ g/ml 이었으며 特히 Ap 및 Gm에 感受性이 가장 높았고 其他藥劑에는 感受性이 낮은 便이었으나 注目할만한 큰

Table 1. Frequency of drug resistance and MICs of *Shigella* isolated in 1978^a

Drug ^b	No.(%) of resistant strains	MIC(μ g/ml) range of strains	
		Susceptible	Resistant
Cm	94 (98.9)	6.3	100-400
Tc	94 (98.9)	3.1	100-400
Sm	94 (98.9)	12.5	100-400
Sa	94 (98.9)	50	>1,600
Na	22 (23.2)	1.6-3.1	25->800
Ap	70 (73.7)	0.8-3.1	200-800
Km	1 (1.1)	3.1-6.3	>800
Gm	0	0.8-1.6	
Ak	0	3.1-6.3	
T-S	80 (84.2)	1.6-3.1	400->800
Cb	70 (73.7)	0.8-6.3	>800
Cr	0	3.1-12.5	
Rf	0	6.3-12.5	

^a No. of strains isolated was 95.

^b Abbreviation with critical MICs (μ g/ml) to resistant strains in parentheses: Cm, chloramphenicol (25); Tc, tetracycline (25); Sm, streptomycin (50); Sa, sulfisomidine (100); Na, nalidixic acid (25); Ap, ampicillin (25); Km, kanamycin(25); Gm, gentamicin (6.3); Ak, amikacin (6.3); T-S, trimethoprim-sulfamethoxazole (25); Cb, carbenicillin (100); Cr, cephaloridine (25); Rf, rifampin (25).

Table 2. MIC ranges of *S. paratyphi* A and *S. typhi* isolated in 1978^a

Drug ^b	Range of MIC(μ g/ml)	
	<i>S. paratyphi</i> A	<i>S. typhi</i>
Cm	6.3-12.5	3.1-6.3
Tc	3.1	1.6-3.1
Sm	12.5-25	12.5-25
Sa	100-200	25-50
Na	6.3-12.5	3.1-12.5
Ap	1.6-3.1	0.4-1.6
Km	1.6-3.1	1.6-6.3
Gm	0.4-0.8	0.4-1.6
Ak	0.8-3.1	1.6-3.1
T-S	1.6-6.3	0.8-3.1
Cb	6.3-12.5	0.8-3.1
Cr	1.6-3.1	0.8-3.1
Rf ^c	12.5-25	12.5-25

^a No. of strains isolated were 70 *S. paratyphi* A and 230 *S. typhi*.

^b See Table 1.

^c No. of resistant strains to Rf were 67 (95.7%) of *S. paratyphi* A and 193(83.9%) of *S. typhi*.

差異라고는 할 수 없었다. 다만 Sa와 Rf의 MIC는多少 높아져 耐性を 規定하는 臨界濃度에 가까운 濃度에서 發育이 阻止되는 菌株도 있었다. 本實驗에서 注目되는 結果는 藥劑의 MIC가 耐性菌과 感受性菌사이에서 差異가 있는 點이며 Na에 耐性인 몇株를 除外하고는 耐性菌에 對한 MIC가 耐性を 規定하는 臨界濃度보다 훨씬 높았다.

Salmonella에 對한 藥劑의 MIC를 比較해 보면 第2表와 같이 *S. paratyphi* A는 Gm에 感受性이 가장 높으며 Ak에는 多少 낮고 Tc, Ap, Km, T-S, Cr 등에는 感受性이 若干 더 낮다. 其他藥劑의 MIC는 6.3~25 μ g/ml이 있으며 Rf에는 大部分이 耐性菌이라고 規定할 수 있고 Sa에는 程度는 弱하나 全菌株가 耐性이었다. *S. typhi*는 Ap 및 Gm에 가장 感受性이 높고 T-S, Cb 및 Cr에는 이보다 多少 낮으며 Cm, Tc, Km, Ak에는 더 낮고 Na, Sm, Sa, Rf 등에는 더 낮으나 Rf에 弱한 耐性を 가진다고 生覺되는 것(193株)을 除外하면 其他藥劑에 耐性인 菌은 없었다.

藥劑耐性인 *Shigella*의 耐性樣相(pattern)을 보면 第3表와 같다. Cm, Tc, Sm, Sa, Ap, T-S, Cb의 7劑에 耐性인 菌이 47株로 가장 많으며 Na를 包含한 8劑耐性菌이 22株였고 Km을 包含한 8劑耐性菌이 1株 있었는데 이들은 全部 *Sh. flexneri*였다. Cm, Tc, Sm, Sa, T-S의 5劑耐性菌은 10株였는데 그중 *Sh.*

Table 3. Patterns and transfer of multiple drug resistance of *Shigella* strains

Resistant to	<i>Shigella</i> group	No. of strains	Recipient ^a	No.(%) of strains transferred resistance	R plasmid demonstrated
Cm, Tc, Sm, Sa, Ap, Km, T-S, Cb	B	1	ML 1410	0	Cm Tc Sm Sa Ap Km T-S Cb
			RG 176	1 (100.0)	
Cm, Tc, Sm, Sa, Ap, Na, T-S, Cb	B	22	RG 488	20 (90.9)	Cm Tc Sm Sa Ap T-S Cb
			ML 1410	33 (70.2)	
Cm, Tc, Sm, Sa, Ap, T-S, Cb	B	47	RG 176	2 (4.3)	Cm Tc Sm Sa Ap T-S Cb
			ML 1410	2 (66.7)	
Cm, Tc, Sm, Sa, T-S	B	3	RG 176	1 (33.3)	Cm Tc Sm Sa T-S
			ML 1410	0	
Cm, Tc, Sm, Sa, T-S	D	7	RG 176	7 (100.0)	Cm Tc Sm Sa T-S
			ML 1410	0	
Cm, Tc, Sm, Sa	B	5	ML 1410	3 (60.0)	Cm Tc Sm Sa
			RG 176	0	
Cm, Tc, Sm, Sa	D	9	ML 1410	0	Cm Tc Sm Sa
			RG 176	6 (66.7)	
Total	B	78		62(79.5)	
			D	16	

^a Strains were tested with *E. coli* ML 1410 as recipient, and negative strains were tested again with *E. coli* RG 176. Nalidixic acid-resistant strains were tested with *E. coli* RG 488.

Table 4. Transfer frequency of drug resistance of *Shigella*

Donor no. ^a	<i>Shigella</i> group	Recipient	Selecting drug	Transfer frequency ^b	
78-KH2	B	ML1410	Cm	10 ^{-2.5}	
			Ap	10 ^{-2.9}	
78-DH48	B	ML1410	Cm	10 ^{-6.0}	
			RG176	Cm	10 ^{-2.9}
			T-S	10 ^{-2.8}	
78-DH47	D	ML1410	Cm	0	
			T-S	0	
			RG176	Cm	10 ^{-5.7}
78-DH5	D	ML1410	Cm	10 ^{-6.0}	
			RG176	Cm	10 ^{-4.4}
			T-S	10 ^{-5.1}	

^a Donors 78-KH2 and 78-KH48 are resistant to Cm, Tc, Sm, Sa, Ap, T-S, and Cb; 78-DH47 to Cm, Tc, Sm, Sa, and T-S; and 78-DH5 to Cm, Tc, Sm, and Sa.

^b Expressed as the number of transconjugants per number of donor cells after 18 hrs of incubation.

flexneri가 3株, Sh. sonnei가 7株였고 Cm, Tc, Sm, Sa의 4劑耐性菌은 14株였는데 Sh. flexneri가 5株, Sh. sonnei가 9株였으며 3劑以下에 耐性인 菌은 볼 수 없었다. 또한 注目되는 것은 Sh. sonnei에는 Ap, Cb,

Na 등에 耐性인 菌은 볼 수 없었던 點이다. 耐性傳達は Na耐性菌은 Rf에 耐性이나 Na에 感受性인 E. coli RG 488을 被傳達菌으로 使用하였고 其他菌株는 먼저 E. coli ML 1410으로 實驗한 다음 耐性이 傳達되지 않은 菌은 RG 176으로 다시 實驗하였는 바 接合에 의하여 耐性을 傳達하는 菌은 Sh. flexneri가 78株中 62株(79.5%), Sh. sonnei가 16株中 13株(81.2%)로 約 80%의 菌이 傳達性 R plasmid를 가지고 있었다. 耐性樣相別로 傳達狀況을 보던 8劑耐性菌은 約 91%, 7劑耐性菌은 74.5%, 5劑耐性菌은 100%, 4劑耐性菌은 60~67%가 耐性을 傳達하였다. 被傳達菌에 따르는 差異를 보던 ML 1410에는 耐性이 傳達되지 않으나 RG 176에는 傳達되는 耐性菌이 相當數 있었으며 이런 現象은 特히 Sh. sonnei에서 많이 볼 수 있어서 ML 1410에는 耐性이 傳達되지 않는 Sh. sonnei 菌株의 67~100%가 RG 176을 供試하던 耐性을 傳達할 수 있었다 (第3表). 傳達되는 耐性의 樣相은 原菌과 같으며 耐性の 程度도 原菌과 거의 같으며 Na를 除外한 7種의 藥劑로 選擇하여도 그 結果가 같으니 이들 接合에 의하여 傳達되는 耐性은 單一 plasmid에 由來하는 것으로 生覺되었다. 다만 Na耐性은 接合에 의하여 傳達되지 않으며 또 Na로 選擇하던 다른 耐性의 傳達도 볼 수 없었다.

接合에 의한 藥劑耐性의 傳達頻도를 보던 第4表와 같이 選擇藥劑에 따르는 差異는 거의 없으나 被傳達菌에 따르는 差異는 커서 Sh. flexneri 78-DH 48의 境遇

Table 5. Viable cell counts of *S. typhi* and *Shigella* grown in nutrient broth with and without tetracycline

Strain no.	Grown in ^a	No. of colonies on nutrient agar containing Tc (μg/ml) of:			
		None	25	50	100
<i>S. typhi</i>					
74-KS3(100)	A	323×10 ^{6b}	164×10 ⁵	5×10 ⁴	0×10 ⁴
	B	47×10 ⁶	24×10 ⁵	21×10 ⁴	20×10 ³
75-D131(200)	A	129×10 ⁶	118×10 ⁶	59×10 ⁵	76×10 ⁴
	B	65×10 ⁵	53×10 ⁵	56×10 ⁵	40×10 ⁵
75-D126(200)	A	393×10 ⁶	105×10 ⁶	5×10 ⁵	174×10 ⁶
	B	146×10 ⁶	130×10 ⁶	138×10 ⁶	14×10 ⁶
76-B132(400)	A	120×10 ⁶	111×10 ⁶	96×10 ⁵	12×10 ⁶
	B	85×10 ⁶	71×10 ⁶	70×10 ⁶	37×10 ⁶
<i>Shigella</i>					
74-DH2(200)	A	112×10 ⁶	46×10 ⁶	98×10 ⁵	53×10 ⁵
75-DH5(400)	A	193×10 ⁶	154×10 ⁶	195×10 ⁵	9×10 ⁵

^a A, nutrient broth without tetracycline; B, nutrient broth containing 100μg/ml of tetracycline.

^b No./0.1ml of broth.

Table 6. Viable cell counts of *S. typhi* in broth

Strain no. ^a	Culture ^b	No. of colonies on nutrient agar containing Tc ($\mu\text{g/ml}$) of:			
		None	25	50	100
74-KS3	A	300×10^4 ^c	272×10^4	278×10^4	111×10^4
	B	456×10^5	462×10^4	450×10^5	195×10^5
75-126	A	123×10^4	118×10^4	136×10^4	120×10^4
	B	318×10^5	202×10^5	232×10^5	112×10^5
74-D48	A	257×10^4	235×10^4	150×10^4	229×10^4
	B	310×10^5		294×10^5	232×10^5

^a Colonies of drug-resistant strains grown on media containing $100\mu\text{g/ml}$ of Tc were tested.

^b A, incubated for 15 days at 37°C ; B, subcultured at 5 day-intervals at 37°C .

^c No/0.1ml of broth.

Table 7. Elimination of drug resistance of R plasmid-carrying *S. typhi* and *Shigella* by acriflavine treatment

Strain no. ^a	Concn of acriflavine ($\mu\text{g/ml}$) added	No. of viable cells in 0.1ml	% of cells lost resistance ^b
<i>S. typhi</i>			
74-D12	10	15×10^6	2
	5	57×10^5	0
	0	30×10^5	2
74-B62	6.3		4
	0		1
75-D131	6.3	310×10^4	42
	3.1	612×10^5	6
	0	310×10^5	3
77-D1	6.3	25×10^5	2
	0	55×10^5	1
<i>Shigella</i>			
74-H1	6.3		98
	0		60
	10	12×10^5	36
75-H1	5	15×10^6	12
	0	77×10^5	3
	10	19×10^5	2
77-H1	5	21×10^5	6
	0	82×10^5	0

^a Multiply resistant to 4 or more drugs.

^b 100 colonies were tested in media containing chloramphenicol.

ML 1410에는 $10^{-6.0}$ 의 頻度로 傳達되나 RG 176에는 $10^{-2.9}$ 의 頻度로 傳達되어 ML 1410보다 1,000배나 頻

Table 8. Elimination of drug resistance of R plasmid-carrying *S. typhi* and *Shigella* by atabrine treatment

Strain no. ^a	Concn of atabrine ($\mu\text{g/ml}$) added	No. of viable cells in 0.1ml	% of cells lost resistance ^b
<i>S. typhi</i>			
75-D131	200	49×10^6	1
	100	43×10^6	0
	0	49×10^6	1
77-D1	400	25×10^6	3
	200	15×10^6	1
	100	24×10^6	1
	0	46×10^6	1
<i>Shigella</i>			
75-H1	200	34×10^5	0
	100	43×10^5	0
	0	40×10^5	0
77-H1	200	43×10^5	0
	100	36×10^5	0
	0	40×10^5	0

^a Multiply resistant to 4 or more drugs.

^b 100 colonies were tested in media containing chloramphenicol.

도가 높았으며 Sh. sonnei 78-DH47의 境遇는 ML 1410에는 傳達되지 않으나 RG 176에는 $10^{-5.7}$ 程度의 頻度로 傳達되었고 78-DH5에서는 그 頻도가 ML 1410보다 RG 176에서 約 100倍程度 높았다. 勿論 原菌에 따르는 差異가 있으며 ML 1410에의 傳達頻도가 78-KH2에서는 $10^{-2.5}$ 程度였으나 78-DH 48에서는 $10^{-6.0}$ 으로 훨씬 낮았으며 本實驗의 範圍內에서 보던 Sh. flexneri

Table 9. Combined activity of chloramphenicol and ampicillin in trypticase soy broth on *Sh. flexneri* 78-KH9

Ampicillin ($\mu\text{g/ml}$)	Chloramphenicol ($\mu\text{g/ml}$)							
	3200	1600	800	400	200	100	50	0
3200	— ^a	—	—	—	—	—	—	—
1600	—	—	—	—	—	—	—	—
800	—	—	—	—	—	—	—	—
400	—	—	—	—	—	(+) ^b	(+)	(+)
200	—	—	—	—	(+)	(+)	+ ^c	+
100	—	—	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
50	—	—	(+)	(+)	(+)	+	+	+
0	—	—	(+)	(+)	(+)	+	+	+

^a No growth (sterilized).

^b No visible growth, but subculture on nutrient agar produces 3 or more colonies.

^c Visible growth.

Calculated FIC index=0.75, and FBC index=0.5.

Table 10. Combined activity of chloramphenicol and other drugs on *Shigella* in trypticase soy broth

Strain no.	Drug combination	MIC ^a	MBC ^a	Index ^b	
				FIC	FBC
78-KH9	Cm Ap	200 400	1600 800	0.75	0.5
78-DH32	Cm Ap	0.8 0.8	25 1.6	1.0	1.0
78-KH6	Cm Ap	800 3.1	1600 3.1	0.75	1.5
78-KH3	Cm Ap	800 3.1	1600 3.1	0.6	1.5
78-KH6	Cm Tmp ^c	400 1600	1600 6400	0.75	0.37
78-KH11	Cm Tmp	200 1600	1600 6400	0.37	0.25
78-DH53	Cm Cb	50 6.3	200 12.5	0.62	0.28
78-KH2	Cm Ak	200 12.5	400 12.5	1.0	1.0
78-KH2	Cm Tc	200 200	800 400	0.75	0.38
78-KH9	Cm Tc	400 200	1600 400	0.75	0.5

^a $\mu\text{g/ml}$.

^b see text.

^c Trimethoprim.

가 *Sh. sonnei*보다 더 쉽게 내성을 전달하였다.

내성균을 보존하였을 때 그 균의 내성도가 어떻게

Table 11. Combined activity of antimicrobial drugs on *Shigella* in trypticase soy broth^a

Strain no.	Drug combination	MIC ^a	MBC ^a	Index ^b	
				FIC	FBC
78-KH9	Cb Gm	3200 6.3	6400 12.5	0.75	0.49
78-DH53	Cb Gm	3.1 3.1	6.3 6.3	1.0	0.63
78-KH9	Tc Gm	200 6.3	200 6.3	0.75	0.63
78-DH53	Tc Gm	400 3.1	800 3.1	0.56	0.56
78-KH9	Tc Km	200 25	400 25	0.75	0.56
78-DH53	Tc Km	400 12.5	400 12.5	0.38	0.56

^a $\mu\text{g/ml}$.

^b See text.

변하는가를 보기 위하여 nutrient agar에 보존한 *S. typhi*와 *shigella*를 nutrient broth와 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 Tc를 가한 nutrient broth에 20시간 배양한 다음 몇 가지 농도의 Tc를 함유하는培地上에서菌數를計算하였다(第5表). 이들菌은元來 Tc에耐性이나그耐性도는菌株에 따라多少의差異가 있었다. *S. typhi* 74-KS3의 MIC는 100 $\mu\text{g/ml}$ 인바 보존菌은培地內 Tc의濃도의增加에 따라集落을形成하는菌數가顯著히減少되었으나 Tc含有培地에培養한菌은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 Tc를 함유하는培地에서도 Tc가 들어 있지 않은

nutrient agar上的 集落과 거의 같은 數의 集落을 形成하였다. 다른 3株의 Tc耐性菌도 程度의 差異는 있으나 같은 傾向을 나타내서 nutrient agar에 保存한 菌株는 MIC가 낮은 菌과 MIC가 높은 菌으로 構成되어 있으나 그 構成比는 菌株에 따라 달라서 100 μ g/ml의 Tc存在下에서 크는 菌은 總菌數의 10分の 1乃至 100萬分の 1이었다. 그러나 Tc 含有培地에 培養한 菌은 거의 大部分이 100 μ g/ml의 Tc에 耐性이었다. Shigella도 같은 傾向을 보였으며 100 μ g/ml의 Tc含有培地에서 크는 菌은 nutrient agar에 保存한 것을 培養한 總菌數의 約 1,000分の 1 程度였다. 100 μ g/ml의 Tc를 含有하는 培地에 培養하여 얻은 S. typhi의 集落을 nutrient broth에 37°C에서 15日間 培養한 것과 5日間隔으로 15日間 3回 移植한 것을 Tc 含有培地에 移植하여 發育하는 集落數를 計算하였던 바 第6表와 같이 15日 培養으로서는 別다른 變動없이 Tc의 低濃度 또는 高濃度에서 數的으로는 큰 差異가 없는 많은 集落을 形成하였다.

傳達性 R plasmid를 가진 菌의 耐性이 藥品處理에 의하여 脫落되는가를 보기 위하여 耐性을 脫落시키는 것으로 알려진 acriflavine으로 處理하여 그 結果를 본 바 第7表와 같이 耐性이 脫落되는 樣相은 菌株에 따라 다르며 S. typhi에 있어서는 菌株 75-D131은 6.3 μ g/ml의 acriflavine存在下에서 42%의 菌에서 耐性이 脫落되었으나 其他 菌株에서는 耐性이 脫落되는 集落은 極히 적어서 對照와 別差異가 없었다. Shigella에 있어서도 菌株에 따라서 耐性이 脫落되는 集落數에 큰 差異가 있었다. 第8表는 atabrine으로 處理하여 耐性脫落의 樣相을 본 것인데 atabrine은 耐性脫落到 別效果가 없음을 알았다.

菌株의 併用이 菌에 미치는 影響을 보기 위하여 checkerboard法에 의하여 實驗하였는 바 그 1例로 菌株 78-DH9에 미치는 Cm과 Ap의 併用效果를 보면 第9表와 같이 兩抗菌劑는 共存下에서 抗菌力 및 殺菌力이 增強됨을 볼 수 있으며 FIC係數는 0.75, FBC係數는 0.5로 相乘作用을 나타냈으나 그 程度는 弱하였다. 第10表는 Cm과 다른 藥劑의 併用效果를 FIC 및 FBC係數로 表示한 것인데 그 效果는 菌株에 따라서 差異가 있었다. FIC係數는 1.0~0.37로 相加作用乃至 相乘作用을 나타냈으며 拮抗作用은 볼 수 없었고 FBC係數를 보면 1.5~0.25로 藥劑에 따라 差異가 있었다. 藥劑別로 보면 Cm과 trimethoprim, Cm과 Cb의 併用은 FBC係數로 評價할 때 더욱 強한 相乘作用을 나타내며 Cm과 Tc의 併用도 같은 傾向을 보였으나 Cm과 Ap, Cm과 Ak의 併用은 弱한 相乘作用으로

보이는 境遇도 있으나 大體로 相加的 또는 無關的 效果밖에 볼 수 없었다. 第11表는 Cb와 Gm, Tc와 Gm, Tc, Km의 併用效果를 본 것인데 이들 藥劑사이에는 그 程度에 差異는 있으나 大體로 相乘作用이 있었다.

考 察

Shigella에는 多藥劑耐性菌이 많음이 알려져 있다¹⁻⁴⁾. 우리나라에서 近年分離되는 菌株의 거의 全部가 Cm, Tc, Sm 및 Sa에 耐性이었으며^{5,6)} 本實驗의 成績도 같은 結果였다. 本實驗에서 注目되는 現象은 Ap, Cb 및 T-S에 對한 耐性菌株의 出現이다. Ap에 對한 耐性菌이 많이 나타남은 外國에서는 많이 發表되었으나⁷⁾ 우리나라에서는 이러한 菌을 間或 볼 수 있었을 뿐이었는데⁸⁾ 1978年 分離菌株는 約 74%가 Ap耐性이었다. 耐性菌의 出現은 그 地方의 藥劑使用頻度에 關係가 있다고 하지만 Ap등에 對한 耐性菌의 急激한 增加는 意外이다. 또한 注目되는 結果는 Ap耐性菌은 Sh. flexneri에서만 볼 수 있고 Sh. sonnei에서는 볼 수 없는 點이며 이러한 結果는 우리나라에서는 Sh. sonnei가 적기 때문인지 모르겠으나 外國에서의 成績과는 크게 다르다⁹⁾. Cb耐性菌이 많이 있었으나 Cb耐性은 恒常 Ap耐性和 같이 나타나 이 두가지 抗菌劑는 같은 penicillin系에서 交叉耐性을 나타내는 것으로 생각된다. T-S에 對한 耐性菌의 出現도 顯著하여 85%의 分離菌이 耐性이었으나 1977年以前에 分離한 菌중에는 T-S耐性菌은 1株도 없었다¹⁰⁾. Trimethoprim耐性인 腸內細菌이 報告되었¹¹⁾ Sa에는 shigella가 쉽게 耐性을 獲得함으로 T-S耐性菌의 出現은 높다운 事實은 안이나 1978年分離菌에서 갑자기 高率로 나타남은 奇異한 結果이다. Shigella가 T-S에 感受性이 높으며¹²⁾ 따라서 抗菌劑耐性인 shigella의 感染이 T-S로 잘 治療될 것이라고 하나¹³⁾ 本實驗의 結果에서 推測컨대 우리나라에서 發生하는 痢疾은 T-S로 治療效果를 期待하기 어려울 것으로 생각된다.

Shigella에 있어서 耐性菌과 感受性菌사이 MIC의 差異가 크며 中間程度의 MIC를 가진 菌이 없음을 이 耐性이 選擇에 의하여 생긴다고 생각하기 보다는 R plasmid에 의하여 傳達되는 것으로 생각되기에 接合에 의한 耐性傳達을 實驗하였던 바 shigella의 約 80%가 傳達性 R plasmid를 가지고 있음을 알았다. 이 R plasmid는 各菌에 單一 plasmid로 되어 있으니 이는 Sh. dysenteriae에서 보는 바와는 다르며¹⁴⁾ Sh. flexneri에 있어서의 Tanaka 등¹⁵⁾의 所見과 一致된

다. 耐性傳達は 被傳達菌에 따라 다르며 E. coli ML 1410에는 傳達되지 안하나 RG 176에 傳達되는 것이 相當數 있으며 특히 Sh. sonnei는 RG 176에만 傳達되었는 바 1977년에 分離한 Sh. sonnei는 ML 1410에도 잘 傳達되었으니¹¹⁾ 이러한 差異가 어디서 由來하는 알 수 없다. 傳達頻度は 選擇藥劑의는 別로 關係가 없는 것 같으며 原菌에 따라 差異가 있고 被傳達菌에 따라 큰 差異가 있으니 이러한 結果는 自然界에 있어서의 傳達을 支配하는 要因이 되는 것으로 생각된다. Na에 耐性인 菌도 相當數이었으나 Na耐性은 接合에 의하여 傳達되지 안하며 Na로 選擇하면 다른 耐性도 傳達되지 안하나 Na耐性은 非傳達성이거나 chromosome과 結合된 gene에 由來하는 耐性으로 생각되었다.

S. paratyphi A는 全菌株가 Sa에 弱한 耐性을 가지고 있고 Rf에도 弱한 耐性을 가진 菌이 있으나 다른 供試藥劑에는 全菌株가 感受性이었으니 이들 菌은 抗 菌劑에 쉽게 耐性化하지 않는 것으로 생각된다. 1972~1973年 Mexico에서 多藥劑耐性이며 R plasmid를 가진 菌에 의한 腸티프스의 大流行이 있은 後¹²⁾ 各國에서 多藥劑耐性 S. typhi가 分離되었으니^{12, 13)} 其後 이런 S. typhi가 次次 적어졌고¹³⁾ 우리나라에서도 1978年以後는 이러한 菌이 分離되지 안하였다¹³⁾.

藥劑耐性이 自然發生的으로 消失되는 일이 있으나 그 頻度は 菌에 따라 다르며 頻繁히 볼 수 있는 것은 안이다. R plasmid에 의한 藥劑耐性이 acriflavine 處理에 의하여 除去됨이 알려져 있으며^{21, 22)} 各種藥劑을 使用하여 耐性을 除去하고자 하는 研究가 많이 發表되었으나 특히 注目할만한 結果는 얻지 못하고 있다^{30, 31)}. S. paratyphi A와 S. typhi는 常用의 抗 菌劑에 耐性인 菌株가 거의 없으니 別로 問題가 되지 안 하지만 거의 全菌株가 藥劑耐性인 shigella에 있어서는 藥劑耐性的의 效果的인 除去方法이 있다면 이는 學問的인 見地에서 擘단 안이라 實驗的인 面에서 重要한 意味를 가질 것이다. 그러나 가장 有効하다고 報告된 acriflavine도 耐性除去效果는 菌株에 따라서 큰 差異가 있으며 그 效果가 全菌株에 該當되는 것은 안이었다²³⁾. Atabrine도 有効하다는 報告가 있으나^{30, 32)} 本 實驗의 結果로 보면 全然 그런 效果가 없었다.

菌株를 長時日 保存하면 耐性이 低下되는 것으로 알려져 있어서 保存한 耐性菌株에서의 耐性變動을 보았던 바 우리의 實驗範圍內에서는 耐性的의 變動을 볼 수 없었다.

藥劑에 對한 菌의 耐性獲得을 阻止하기 위하여 藥劑의 併用이 試圖되어 왔으며^{18, 23, 24)} 또 藥劑를 併用함으로써 적은 量으로 큰 治療效果를 期待하는 研究도 많

이 볼 수 있다²³⁾. 거의 全菌株가 多藥劑耐性인 shigella에서는 藥劑의 併用に 의하여 좋은 治療效果를 期待하는 것은 當然한 일이다. 日常 많이 使用되는 藥劑의 併用效果를 본바 두가지 藥劑의 併用에서 拮抗作用을 나타내는 예는 볼 수 없었고 大體로 相乘作用乃至 相加作用을 나타내는 境遇가 많음은 多幸한 일이며 이 方面에 對하여 더욱 많은 研究가 必要하다고 생각된다. 다만 이러한 併用效果는 菌株에 따라서 差異가 있으니²⁴⁾ 많은 菌株에 對하여 實驗하여야 하겠으나 本 實驗의 範圍에서 보면 Cm과 trimethoprim, Cm과 Cb의 併用이 가장 效果的인 것 같이 생각되었다.

要 約

1978年에 分離한 95株의 Shigella, 70株의 Salmonella paratyphi A 및 230株의 S. typhi의 藥劑耐性, 耐性化防止 및 除去에 對하여 實驗하여 다음과 같은 成績을 얻었다. Shigella는 79株가 Sh. flexneri, 16株가 Sh. sonnei였는데 1株를 除外한 94株가 chloramphenicol tetracycline, streptomycin, sulfisomidine에 多藥劑耐性이었으며 그中 70株는 ampicillin과 carbenicilline에, 80株는 trimethoprim-sulfamethoxazole에, 22株는 nalidixic acid에, 1株는 kanamycin에도 耐性이었다. Gentamicin, amikacin, cephaloridine, rifampin에 耐性인 菌株를 얻었다. S. paratyphi A와 S. typhi는 供試藥劑에 感受性이었으나 다만 rifampin, 또는 sulfisomidine에 弱한 耐性을 가진 것이 있었다. 多藥劑耐性인 shigella의 約 80%가 傳達性 R plasmid를 가지고 있어서 그 耐性을 E. coli에 傳達시킬 수 있었다. 耐性傳達頻度は 供試菌株 및 被傳達菌에 따라 差異가 있었다. 保存한 耐性菌株는 그 比率는 菌株에 따라 差異가 있으나 耐性菌과 感受性菌으로 構成되어 있었으며 繼代培養에 의하여 耐性이 쉽게 脫落되지는 안하였다. Acriflavine은 耐性을 脫落시키는 效果는 있었으며 菌株에 따라 그 差異가 甚하였고 atabrine은 效果가 없었다. 藥劑의 併用은 Shigella에 對한 作用을 增強시키는 境遇가 많으며 大體로 相乘作用을 나타냈고 相加作用을 나타내는 境遇가 있었으나 拮抗作用은 볼 수 없었다.

本 研究는 峨山社會福祉財團 研究開發部門 1977年度 研究費에 의하여 이루어졌다.

參考文獻

1. Mitsuhashi, S.: Review: the R factors. *J. Infect. Dis.* 119:89~100, 1969.
2. Farrar, W.E., Jr., and M. Eidson.: Antibiotic resistance of *Shigella* mediated by R factors. *J. Infect. Dis.* 123:477~484, 1971.
3. Smith, J.I., D.A. Bremner, and N. Datta.: Ampicillin resistance of *Shigella sonnei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6:418~421, 1974.
4. Neu, H.C., C.E. Cherubin, E. D. Longo, and J. Winter.: Antimicrobial resistance of *Shigella* isolated in New York City in 1973. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:833~835, 1975.
5. Mitsuhashi, S., K. Harada, and M. Kameda.: Elimination of transmissible drug-resistance by treatment with acriflavine. *Nature* 189: 947, 1961.
6. Rudoy, R.C., J.D. Nelson, and K.C.Haltalin.: In vitro susceptibility of *Shigella* strains to trimethoprim and sulfamethoxazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5:439~443, 1974.
7. Perea, E.J., M.A. Torres, and M.V. Borobio.: Synergism of fosfomycin-ampicillin and fosfomycin-chloramphenicol against *Salmonella* and *Shigella*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:705~709, 1978.
8. 朴文在·全壽基: 1977. 1977年 大邱에서 分離한 salmonella 및 shigella의 抗菌劑感受性. 大韓微生物學會誌 13:31~36,
9. Chun, D., and S.Y. Seol.: Drug resistance and R plasmids of *Salmonella* and *Shigella* in Korea. *Trop. Med. (Japan)* 20:123~129, 1978.
10. Murti, B.R., K. Rajavalakshmi, and C. S. Bhaskaren.: Resistance of *Salmonella typhi* to chloramphenicol. *J. Clin. Pathol.* 15:544~554, 1962.
11. Olarte, J., and E. Galindo.: *Salmonella typhi* resistant to chloramphenicol, ampicillin, and other antimicrobial agents: strains isolated during an extensive typhoid fever epidemic in Mexico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 439~443, 1973.
12. Bissett, M.L., S.L. Abbott, and R.M. Wood.: Antimicrobial resistance and R factors in *Salmonella* isolated in California (1972~1973). *Antimicrob. Agents Chemother.* 5:161~168, 1974.
13. Butler, T., N.N. Linh, K. Arnold, and M. Pollack.: Chloramphenicol resistant typhoid fever in Vietnam associated with R factor. *Lancet* 11:983~985, 1973.
14. Chun, D., S.Y. Seol, D.T. Cho, and R. Tak.: Drug resistance and R plasmids in *Salmonella typhi* isolated in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:209~213, 1977.
15. Baine, W.B., J.J. Farmer III, E.J. Gangarosa, G.T. Hermann, C. Thornsberry, and P.A. Rice.: Typhoid fever in the United States associated with the 1972~73 epidemic in Mexico. *J. Infect. Dis.* 185:649~653, 1977.
16. MacLowry, J.D., M.J. Jaqua, and S.T. Selepak.: Detailed methodology and implementation of a semiautomated serial microtechnique for antimicrobial susceptibility testing. *Appl. Microbiol.* 20:46~53, 1970.
17. Steers, E., E.L. Flotz, and B.S. Graves.: Inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. Chemother.* 9:307~311, 1959.
18. Marks, M.I., M. Kazemi, and E. MacKay.: In vitro sensitivity of *Salmonella* to ten antimicrobial agents including sulfamethoxazole and trimethoprim, alone and in combination. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 555T~559, 1973.
19. Tanaka, T., M. sunoda, and S. Mitsuhashi.: Distribution of R factors among *Shigella* strains isolated in Japan (II). *Jpn. J. Microbiol.* 17:291~295, 1973.
20. Grant, R.B., R. M. Bannatyne, and A.J. Shapley.: Resistance to chloramphenicol and ampicillin of *Salmonella typhimurium* in Ontario, Canada. *J. Infect. Dis.* 134:354~361, 1976.
21. Watanabe, T., and T. Fukazawa.: Episome-

- mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. II. Elimination of resistance factors with acridine dyes. *J. Bacteriol.* **81**:679~683, 1961.
22. Elion, G.B., S. Singer, and G.H. Hitchings.: Antagonists of nucleic acid derivatives. *J. Biol. Chem.* **208**:477~488, 1954.
 23. Philips, I., and C. Warren.: Activity of sulfamethoxazole and trimethoprim against *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**:736~740, 1976.
 24. Parsley, T.L., R.B. Provonchee, C. Glicksman, and S.H. Zinner.: Synergistic activity of trimethoprim and amikacin against gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **12**:349~352, 1977.
 25. Datta, N., and R.W. Hedges.: Trimethoprim resistance conferred by *W* plasmids in *Enterobacteriaceae*. *J. Gen. Microbiol.* **72**:349~355, 1972.
 26. Marks, M.I.: Pharmacokinetics and efficacy of trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of gastroenteritis in children. *Can. Med. Assoc. J.* **112**:33s~34s, 1975.
 27. Olarte, J., L. Filloy, and E. Galindo.: Resistance of *Shigella dysenteriae* type 1 to ampicillin and other antimicrobial agents: strains isolated during a dysentery outbreak in a hospital in Mexico City. *J. Infect. Dis.* **133**:572~575, 1976.
 28. Tanaka, T., H. Hashimoto, and S. Mitsuhashi.: Ampicillin-resistant *R* factors derived from *Shigella* strains. *Jpn. J. Microbiol.* **17**:323~330, 1973.
 29. Mitsuhashi, S., K. Harada, and M. Kameda.: Elimination of transmissible drug-resistance by treatment of acriflavine. *Nature*: **189**:947, 1961.
 30. Heller, C.S., and M.G. Sevag.: Prevention of the emergence of drug resistance in bacteria by acridine, phenothiazines, and dibenzocycloheptenes. *Appl. Microbiol.* **14**:879~885, 1966.
 31. Tribe, M.J., and R.J. Pinney.: Cyclic thymidineless death significantly increase frequency of *R*-plasmid elimination. *Antimicrob. Agents Chemother.* **12**:555~556, 1977.
 32. Yoshikawa, M., and M.G. Sevag.: Sensitivity of *Escherichia coli* to atabrine conferred by *R* factors and its potential clinical significance. *J. Bacteriol.* **93**:245~253, 1967.