

녹농균의 항생제 내성의 특성

대구 파티마병원 일반의과¹, 경북대학교 의과대학 미생물학교실², 계명대학교 의과대학 미생물학 교실³
김상윤¹, 이유철², 설성용², 조동택², 전도기³

= Abstract =

Characteristics of Gentamicin Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Sang Yoon Kim¹, Yoo Chul Lee¹, Sung Yong Seol¹, Dong Taek Cho² and Doki Chun³

Department of General Surgery, Fatima Hospital¹

Department of Microbiology, School of Medicine, Kyung Pook National University²

Department of Microbiology, School of Medicine, Keimyung University,³ Taegu, Korea

Fifty-one strains of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from various clinical specimens. Among them, 26 (51%) strains were gentamicin-resistant (Gm^r) and 25 (49%) were susceptible to gentamicin (Gm^s).

The frequencies of resistant strains to piperacillin (Pi), cefotaxime, moxalactam, cefoperazone (Cz), and amikacin (Ak) ranged from 21.6 to 31.4%, and MIC₅₀ of these drugs were lower than the critical concentrations of susceptibility and resistance.

Thirty (58.8%) strains were multiply resistant to 12 or more drugs. All Gm^r strains were multiply resistant to 12 or more drugs and one was resistant to all 18 drugs tested, while only four Gm^r strains were multiply resistant to 12 drugs and the multiplicity of resistance of the other Gm^r strains were less than 10 drugs.

Resistance to Gm appeared to have a significant correlation with the resistance to tobramycin (Tb), Ak, Pi, and Cz. All Gm^r strains were resistant to Tb and about 38.4 to 46.1% of them were resistant to Ak, Pi, and Cz.

The incorporation of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions in Mueller-Hinton agar (MHA) did not influence the MICs of Gm, Tb, carbenicillin (Cb), Pi, and Cz as compared with the results obtained in MHA without these ions.

Gm strains were studied on the combined effect of beta-lactam antibiotics and aminoglycosides by the methods of checkerboard and modified paper strip diffusion. Most Gm^r strains showed significant synergistic effects by the FIC index between Ak and three beta-lactam antibiotics; Cb, Pi, and Cz, but these results did not in agreement the results obtained through the method of modified paper strip diffusion test.

In order to know the nature of the drug resistance of *P. aeruginosa*, the plasmid profile analysis was studied. Agarose gel electrophoresis of lysates processed by the method of Kado and Liu showed one or more plasmids in 22 (43.1%) strains. A group of 19 strains showed at least one band of plasmid and three strains two bands. The range of the molecular weight of plasmids was 3.8 to 243 Mdal. All strains carrying large plasmids larger than 200 Mdal were isolated from wound specimens. Three Gm^r strains also harboured the plasmids of 13 to 203 Mdal.

서 론

생존력이 강한 *Pseudomonas* 균속은 토양, 하수 혹은 인체의 피부나 장관등 여러 가지 환경에서 서식하며, 그중에는 소독제내에서 생존할 수 있는 *Pseudomonas cepacia*도 있다.^{1,2)}

항균제의 사용빈도가 높은 병원환경에서는 내성

균만이 선택적으로 살아남게 되므로 병원환경 유래의 *Pseudomonas aeruginosa* (이하 녹농균)는 항균제 내성빈도가 크고 다제내성이기 때문에 이들 녹농균이 기회감염병식으로 혹은 다른 양식에 의해서 초래되는 원내감염은 약제 선택에 따른 치료상의 난점 때문에 심각하다.^{3,4)}

항균제에 다제내성을 나타내는 녹농균일수록 대체로 병원성이 약하다고 하나 환자의 면역기능이

저하된 상황에서는 균자체의 병원성 보다는 항균제 내성문제가 더욱 심각하다고 할 수 있다. 특히 녹농균은 모든 환경에서 발견되고 전과경로도 다양하므로 병원환경에서 이들 녹농균을 완전히 제거하기는 힘들다³⁾. 각종 가검물에서 분리되는 녹농균은 바로 원내감염의 원인이 될 수 있으므로 분리빈도가 증가하고 있음은 당연한 결과이다³⁾.

현재 상용되는 각종 항균제에 다제내성을 나타내는 녹농균에 대한 치료제 선택의 폭은 좁다고 할 수 있으며 흔히 aminoglycoside계 항균제를 단독 혹은 타 항균제와 병합해서 치료하고 있다⁴⁾. 그러나 aminoglycoside계 항균제의 사용이 급증된 결과 이들 약제에도 녹농균은 내성을 갖게되어 더욱 치료가 어렵게 되었다.

저항력이 약화된 환자에 감염되어 생명을 위협하는 녹농균의 내다수가 다제내성이므로 항균제의 단독사용 보다는 병합사용이 효과적이다. 1967년 Brumfitt 등⁵⁾이 carbenicillin(Cb)과 gentamicin(Gm)의 상승효과를 보고한 후 녹농균의 병합사용시의 상승작용에 관한 많은 보고가 있었다^{3, 6)}.

다약제 내성인 녹농균의 만연을 줄이는 대책으로 항균제선택에 신중을 기해야겠으며 특히 새로이 개발된 항균제에 대한 지나친 의존이나 남용은 억제되어야 한다.

Shigella를 비롯한 각종 장제 gram 음성균들에 있어서 R plasmid가 다약제 내성획득의 주요 기전임이 밝혀진 후⁷⁾ 다약제에 내성인 녹농균에 있어서도 이들 plasmid와 내성과의 관계가 관심사가 되어왔다. 그러나 대체로 녹농균의 내성은 항균제의 세포내로의 투과성을 차단하는 기전에 의해서 발현된다고 보고되어 있는 반면에⁸⁾ 녹농균에서 R plasmid의 증명 혹은 분리에 관한 보고는 적다.

Pseudomonas 균속 가운데 녹농균이 아닌 다른 균종에 있어서 각종 물질을 분해하는 능력이 plasmid에 의해 발휘되고 있음은 잘 알려져 있으나⁴⁾ 녹농균의 plasmid에 관해서는 보고가 드물다.

본 연구에서는 이들 녹농균의 내성본태가 plasmid에 의한 것인가를 조사하기 위해 항균제 내성 실태를 조사하고 이들 내성균과 감수성균의 plasmid profile을 조사하는 실험을 하였다.

원래 Gm은 녹농균 치료제로 주로 사용되어왔으나 현재 Gm에 대한 내성균이 만연되어 있어서 다른 약제로 대체해야될 단계에 이르렀으며, 두가지 이상의 약제를 병합해서 사용하는 요법의 효율성도 기대하고 있다.

이 병합효과의 상승작용은 실험방법에 따라 관정이 애매한 경우가 많다. 본 실험에서는 Gm내성인

녹농균의 병합요법에 의한 상승작용의 유무를 보기 위해 checkerboard 시험 및 한천확산법의 두가지 방법으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 균 주

경북의대 미생물학교실에서 분리동정한 녹농균 51주를 공시하였다. 농은 혈액한천배지와 MacConkey agar에 백금이 혹은 면봉으로 직접도말배양하여 집락을 취하였고, 노는 세균의 규정에 필요한 균수인 1ml 당 10^8 이상인가를 확인하기 위하여 균집락계산법을 이용하여 배양하였으며, 혈액은 trypticase soy both (TSB)에 집중한 것을 37°C에서 1 주야 증균배양한 후 일부를 백금으로 취하여 혈액한천배지와 MacConkey agar에 도말배양하여 집락을 얻었고, 객담과 인후 swab은 농과 같이 처리하였다.

이상의 방법으로 처리한 후 혈액한천배지와 MacConkey agar에서 녹농균으로 의심되는 집락을 Lennette⁹⁾ 및 King¹⁰⁾의 동정법을 근거로 균종을 동정하였다.

2. 항균제

사용항균제는 ampicillin(Ap), Cb, piperacillin(Pi), cephalothin(Cl), cefotaxime(Ct), moxalactam(Mx), cefoperazone(Cz) 등 β -lactam계 항생제 7종, streptomycin(Sm), kanamycin(Km), Gm, amikacin(Ak), 및 tobramycin(Tb) 등 aminoglycoside 항생제 5종과, sulfisomidine(Su), trimethoprim(Tp), chloramphenicol(Cm), tetracycline(Tc), nalidixic acid(Na) 및 rifampin(Rf) 등 도합 18종이다.

3. 배 지

Mueller-Hinton agar(MHA)를 항균제감수성 검사용 배지로 사용하였으며, 필요에 따라 배지 1ml 당 CaCl₂을 50 μ g, MgCl₂을 25 μ g 첨가하였다.

4. 최소발육억제 농도(MIC)

한천회석법에 의하여 결정하였다. 최종 항균제농도의 범위가 Su는 2048 μ g/ml에서 32 μ g/ml, 기타 항균제는 512 μ g/ml에서 0.25~1 μ g/ml되게 각 약제를 순차적으로 희석된 농도로 함유하는 MHA를 만들었다.

TSB에 1 주야 배양한 녹농균을 식염수로 100배 희석하여 multiple inoculator로 집중한후 37°C에서 1 주야 배양한 후 접종부위의 균발육유무를 보아

MIC를 결정하였다.

각 항균제별 내성범위는 미국 National Committee for Clinical Laboratory Standard의 기준을 따랐으며, 결과의 정도판리를 위하여 *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27893을 함께 공시하였다.

5. 항균제 병합실험

Checkerboard법과 paper strip diffusion법을 사용하여 실시하였다²⁰⁾.

한천희석법은 다음과 같이 실시하였다. β -lactam 항생제는 최종농도가 512 μ g/ml에서 1 μ g/ml, Gm과 Tb는 8, 4, 및 2 μ g/ml, Ak은 32, 16, 및 8 μ g/되게 β -lactam 항생제와 aminoglycoside 항생제를 복합함유한 배지에 37°C 18시간 배양한 균의 희석액을 접종하여 37°C 1주야 배양후 균발육유무에 따라 병합시의 각 항균제별 MIC를 결정하였다.

병용효과의 판정은 fractional inhibitory concentration(FIC)계수가 0.5이하일 때 상승작용으로 판정하였으며 FIC계수의 산출방법은 다음과 같다²¹⁾.

$$FIC계수 = \frac{\text{병합시 A의 MIC}}{\text{단독사용시 A의 MIC}} + \frac{\text{병합시 B의 MIC}}{\text{단독사용시 B의 MIC}}$$

원판확산법은 MHA 전면에 멸균된 면봉으로 균 배양액을 균등하게 도말한 다음 소정농도의 항생제를 함유하는 β -lactam 항원제원판을 일열로 5개었고, 직각되게 aminoglycoside 항생제 원판 4개를 얹은 다음 37°C 1주야 배양후 억제대의 모양을 보아 상승작용유무를 판별하였다.

6. Plasmid DNA 분리

Kado 및 Liu²²⁾의 방법을 다소 변경하여 실시하였다.

균을 3ml TSB에 37°C 1주야 진탕배양한 배양액 0.5ml를 취한 다음 12,000rpm(Microfuge, Beckman), 2분간 원심시켰다.

세포침사물 200 μ l의 TE buffer(10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0)에 부유시키고, 3% sodium dodecyl sulfate(SDS)와 50mM Tris를 함유하여 NaOH로 pH를 12.6으로 조절하여 lysis mixture를 제조하였다. 이용액을 400 μ l 가하여 진탕혼합하면서 세포를 파쇄시켰다. 56°C수조에서 45분간 가온시킨 다음 5분간 얼음으로 냉각시킨후 phenol-chloroform 혼합액을 가하였다.

단백제거에 사용되는 phenol-chloroform 혼합액은 중류하여 정제된 phenol과 chloroform(chloroform:

isoamyl alcohol, 24:1, v/v)을 50:50으로 혼합하여 제조하였다. phenol-chloroform 혼합액을 용균시킨 시료에 가한후 잘 흔들어서 단백제거가 충분히 이루어지게한 후 12,000rpm으로 15분간 원심시키고 Pasteur 피펫을 이용하여 경계면의 침사층을 피하면서 상층을 회수하였다. 이 상층액을 0.07% bromphenol blue, 7% SDS, 33% glycerol을 함유하는 buffer와 혼합하여 전기영동에 이용하였다.

7. Plasmid DNA의 전기영동

0.7% agarose gel을 이용하였으며 buffer는 89 mM Tris, 89mM boric acid, 2mM EDTA를 함유하는 TBE buffer를 이용하였다. 수직형 영동장치를 이용하여 50mA로 150분가량 실시하였다. 매 전기영동마다 plasmid 분자량을 측정하기 위해 63 megadalton(Mdal)의 F' kan, 45 Mdal의 R 1033, 35 Mdal의 RP4, 26 Mdal의 R 6K, 5.8 Mdal의 p SC 101 및 2.6 Mdal의 pBR 322 등의 표준 plasmid DNA를 함께 영동시켰다.

Plasmid DNA의 관찰은 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide 용액에 20분간 염색한 gel을 UV transilluminator(TR 302, Spectroline)상에서 Polaroid MP 4 camera와 black and white land film(Polaroid type 665)을 사용하였다. Plasmid의 분자량은 plasmid band의 이동거리를 사진상에서 Vernier caliper로 측정한 후, 분자량이 알려져 있는 plasmid와 공시균이 지닌 plasmid간의 상대적인 이동거리를 linear regression공식을 이용하여 Apple II 컴퓨터에 입력하여 공시균의 plasmid분자량을 산출하였다.

성 적

각종 가검물의 종류별로 녹농균의 분리빈도 및

Table 1. Isolation frequency and incidence of gentamicin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from clinical specimens

Clinical specimens	No. of strains isolated	No. (%) of strains resistant to gentamicin
Wound discharge	35	18 (51.4)
Urine	9	6 (66.7)
Sputum	5	2 (40.0)
Throat swab	1	0 (0.0)
Blood	1	0 (0.0)
Total	51	26 (51.0)

Table 2. Antimicrobial activity of drugs on 51 strains of *Pseudomonas aeruginosa*

Drug	No. (%) of resistant strains	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$) for:	
			90% of strains	50% of strains
Ap*	51 (100.0)	>512-32	>512	>512
Cb	21 (41.2)	>512-2	>512	128
Pi	11 (21.6)	512-1	512	16
Cl	51 (100.0)	>512	>512	>512
Ct	12 (23.5)	>512-0.25	512	16
Mx	16 (31.4)	256-1	128	16
Cz	11 (21.6)	256- \leq 0.5	128	16
Sm	44 (86.3)	>512-2	>512	>512
Km	47 (92.2)	>512-1	>512	>512
Gm	26 (51.0)	>512-1	>512	64
Ak	13 (25.5)	>512-1	512	8
Tb	27 (52.9)	>512- \leq 0.5	>512	32
Su	48 (94.1)	>2048-128	>2048	>2048
Tp	50 (98.0)	>512- \leq 0.25	512	128
Cm	49 (96.1)	>512-16	>512	512
Tc	43 (84.3)	>512-1	>512	64
Na	48 (94.1)	>512-4	>512	128
Rf	32 (62.7)	64-4	32	32

*Abbreviation : see text.

Gm 내성인 녹농균의 빈도를 표 1에 나타내었다. 총 51주의 녹농균이 분리되었는데 농에서 35주(68.6%)로 가장 많았으며, 뇨, 객담에서 9주와 5주가 각각 분리되었고, 인후, 혈액에서 각각 1주씩 분리되었다. Gm 내성균은 26주(51.0%)가 분리되었는데 그 빈도는 뇨유래주가 66.7%로 가장 높았으며 농유래주는 분리주중 51.4%가 Gm 내성이었고 인후, 혈액에서는 Gm 내성주가 없었다.

18종의 항균제에 대한 내성균의 수와 MIC의 범위 및 50%와 90%의 균주에 억제하는 MIC₅₀, MIC₉₀의 약제농도를 표 2에 나타내었다.

분리된 녹농균은 Pi, Ct, Mx, 및 Cz 등의 β -lactam 항균제와 Ak에는 20~30%가 내성이었다. Gm에는 전체 51주중 26주(51%)가 내성이었고, Cb, Tb, Rf 등에도 이와 비슷하게 절반정도가 내성이었다. Ap, Cl에는 모든 균주가, Sm, Km, Su, Tp, Cm 및 Na 등에는 대부분의 균주가 내성이었다.

MIC의 범위는 대부분의 항균제에서 실험한 농도 전체에 넓게 분포하나 Cl에는 전 균주가 512 $\mu\text{g/ml}$ 이상이었으며, Rf에는 4~64 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 좁은 MIC의 범위를 보였다.

실험한 모든 항균제의 MIC₅₀은 내성의 하한치보다 높았으며, Pi, Ct, Mx, Cz 및 Ak의 MIC₅₀은 8~16 $\mu\text{g/ml}$ 로 내성의 하한치보다 낮았다.

녹농균의 18종의 항균제에 대한 내성유형을 표 3에 나타내었다.

전체 분리균주가 4종이상의 항균제에 내성을 나타내었으며 반수이상인 12종이상의 항균제에 내성이었고, 10종이상의 항균제에 내성을 나타낸 것이 37주(72.5%)였다. 내성유형을 보면 실험한 18종의 항균제에 모두 내성을 나타내는 형부터 Ap, Cl, Km, Rf 등 4종의 항균제에 내성을 나타내는 형까지 다양하였으며, 16종의 항균제 즉 Cm, Tc, Sm, Su, Na, Ap, Tp, Cl, Km, Tb, Ak, Rf, Cb, Pi, Cz 내성형과 10종의 항균제 즉 Cm, Tc, Sm, Su, Na, Ap, Tp, Cl, Km, Rf, 내성형이 각 6주씩으로 가장 많은 내성형이었다.

Gm에 내성인 균주 26주 모두가 12종의 항균제에 다제내성을 나타내었으며 Gm에 내성인 것이 12종이상인 내성인 균주 30주 가운데 26주(86.7%)였다. 반면 Gm에 감수성인 균은 12종의 항균제에 내성인 것이 4주 있었을 뿐 모두가 10종이하의 항

Table 3. Drug resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa*

Multiplicity of resistance	Resistance pattern	No. of strains
18	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbAkRfCbPiCtMxCz	1
17	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbRfCbPiCtMxCz	1
16	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbAkRfCbPiCz	6
	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbRfCbPiCtMx	1
15	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbRfCbCtMx	1
14	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbCbCtMx	3
	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbRfCtMx	1
	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbAkRfCb	1
	CmTcSuNaApTpClKmGmTbAkRfPiCz	1
	CmTcNaApTpClKmGmTbAkRfCbPiCz	1
13	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbRfCb	3
	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbAkRf	2
12	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbRfCb	4
	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbCb	3
	TcSmSuNaApTpClKmGmTbRfMx	1
10	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbRfMx	6
	CmTcSmSuNaApTpClKmMx	1
9	CmTcSmSuNaApTpClKm	4
	CmSmSuNaApTpClKmTb	1
	CmSmSuNaApTpClKmCz	1
	CmSmSuNaApTpClKmMx	1
8	CmSmSuNaApTpClKm	2
	CmTcSuNaApTpClRf	1
7	CmTcSuApTpClAk	1
6	CmSuNaApTpCl	1
5	CmApTpClMx	1
4	ApClKmRf	1
Total		51

ml 첨가한 경우와 그냥 사용한 경우에서 6종의 항농균에 유효한 것으로 알려진 5가지 항균제에 대한 Gm내성주와 감수성주의 MIC분포를 표 4에 정리하였다.

Gm내성주는 감수성주에 비해 5가지 항균제 모두에서 훨씬 높은 MIC분포를 보였는데 Tb에는 MIC가 16 μ g/ml 이상으로 모두 내성이었다. Gm내성인 26주중 Cb에는 21주(80.7%)가 내성이었으며 Ak에 12주(46.1%), Pi에 11주(42.3%), Cz에 10주(38.4%)가 내성이었다.

Gm감수성인 25주는 Tb, Ak, Cz에 각 1주만 내성이었으며, 나머지 균주는 4~16 μ g/ml 이하의 MIC를 나타내었고, Cb에는 128 μ g/ml 이하, Pi에는 32 μ g/ml 이하의 MIC를 보여 Gm내성주보다 현저히 낮은 MIC분포를 보였다.

MHA에 MgCl₂와 CaCl₂를 각 25 μ g/ml, 50 μ g/

균계에 내성이었다.

생체에 대한 MIC를 표 5에서 비교하였다.

Gm, Tb, Pi, Cz은 MIC의 범위나 MIC₉₀ 및 MIC₅₀은 Mg⁺⁺과 Ca⁺⁺의 첨가와 무관하였다. Ak은 Mg⁺⁺과 Ca⁺⁺을 첨가한 배지에서 MIC₉₀이 256 μ g/ml로서 첨가하지 않은 배지의 512 μ g/ml보다 2배 낮았고, Cb은 Mg⁺⁺과 Ca⁺⁺을 첨가한 배지에서 MIC₉₀이 256 μ g/ml로서 첨가하지 않은 배지의 128 μ g/ml보다 2배 높았다.

Gm내성인 26주의 농균을 공시하여 3종의 β -lactam 항균제와 Gm, Tb, 및 Ak 등 3종의 aminoglycoside 제제와의 병합작용을 보기 위해 2가지 계열의 약제가 함께 함유된 MHA 상에서 균발육억제를 관찰한 결과를 도 1, 2, 및 3으로 나타내었다. 도 1은 2배 계단희석된 Cb의 농도별로, 내성 하한치의 MIC농도의 Gm, Tb, 및 Ak의 3종의 am-

Table 4. MIC distribution of some drugs against gentamicin resistant (Gm^r) and gentamicin susceptible (Gm^s) *Pseudomonas aeruginosa*^a

Drug		No. of strains inhibited at concentration ($\mu\text{g/ml}$) of;													
		>512	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	<0.5	
Tb	Gm ^r	14	0	4	4	2	1	1							
	Gm ^s						1	0	0	3	8	8	0	5	
Ak	Gm ^r	1	7	0	3	1	0	6	8						
	Gm ^s		1	0	0	0	0	1	12	7	3	1			
Cb	Gm ^r	11	2	8	3	0	2								
	Gm ^s				2	5	16	1	0	0	1				
Pi	Gm ^r		10	1	0	7	3	1	2	2					
	Gm ^s						1	0	5	15	3	1			
Cz	Gm ^r			5	5	7	5	2	0	2					
	Gm ^s				1	0	0	2	7	12	1	1	0	1	

^a Gm^r, 26 strains. Gm^s, 25 strains.

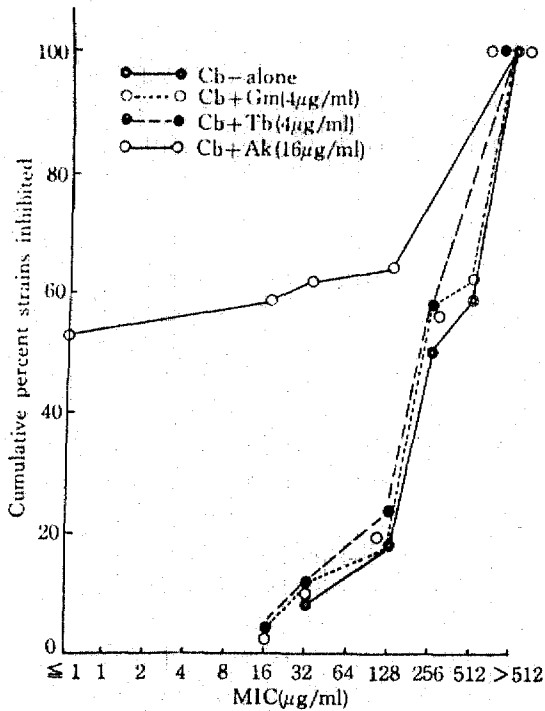


Fig. 1. Comparative MIC of Cb alone and in combination with Gm, Tb or Ak against 26 Gm-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

inoglycoside 약제를 각각 함께 함유된 배지에서 발육억제된 균의 누적퍼센트를 그림으로 나타내었다. 도 2는 Pi을 2배 계산화석된 농도별로 3 종류의 aminoglycoside 제제와의 병합작용을, 그리고 도 3은 Cz을 동일방법으로 실험하여 나타낸 결과이

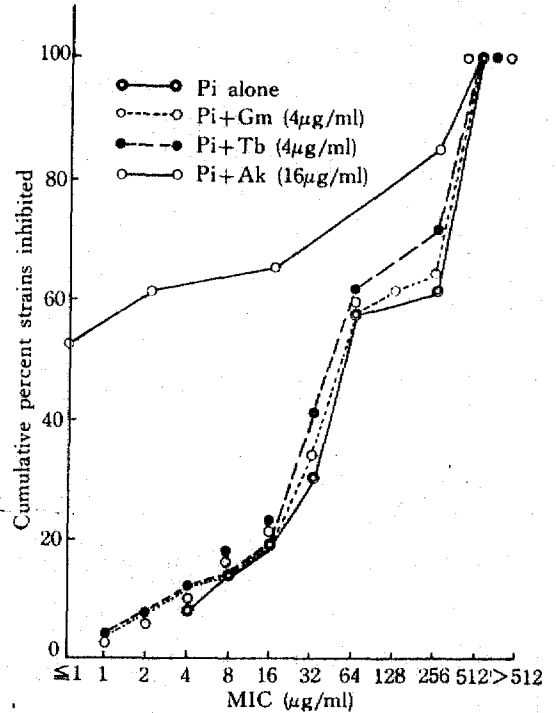


Fig. 2. Comparative MIC of Pi alone and in combination with Gm, Tb or Ak against 26 Gm-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

다.

도표상으로는 Tb와의 병합이 Gm과의 병합보다 다소 유효해 보이는 것 같으나 β -lactam 제제의 단독사용시의 β -lactam 약제의 MIC 농도와 비교하면 유의한 차이가 없다. Ak을 16 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 경우에

Table 5. Antimicrobial activity of 6 drugs on *Pseudomonas aeruginosa* in supplemented and nonsupplemented Mueller-Hinton agar*

Drug	Supplemented agar			Nonsupplemented agar		
	MIC range	MIC ₉₀ ^c	MIC ₅₀ ^c	MIC range	MIC ₉₀	MIC ₅₀
Gm [†]	>512-1	>512	64	>512-1	>512	64
Tb	>512- <0.5	>512	32	>512- <0.5	>512	32
Ak	>512-1	256	8	>512-1	512	8
Cb	>512-4	>512	256	>512-2	>512	128
Pi	512-1	512	8	512-1	512	8
Cz	256-<0.5	128	16	256-<0.5	128	16

* Agar was supplemented with 25mg of Mg⁺⁺ and 50mg of Ca⁺⁺ per liter. All results are given in microgram per milliliter.

[†] Abbreviation : see text.

^c Concentration at which 90% or 50% of the organisms were inhibited.

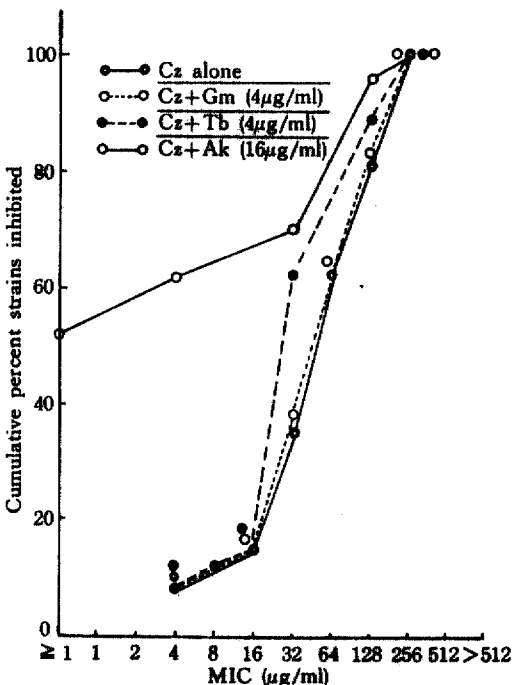


Fig. 3. Comparative MIC of Cz alone and in combination with Gm, Tb or Ak against 26 Gm-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

는 14주(50%)가 Ak에 대한 MIC가 8μg/ml 이하여서 정확한 비교는 어려우나 Gm, Tb보다는 더 유효한 양상이었다.

요약하면 Gm 또는 Tb을 β-lactam 항균제와 병합했을 경우 β-lactam 항균제 단독으로 사용했을 경우와 비교하면 %MIC의 차이가 없으나 Ak과 병합시는 β-lactam 항균제의 MIC가 낮아졌다.

Gm내성 녹농균에 대해 3종의 β-lactam 항균제

와 3종의 aminoglycoside 항균제를 병합시 그 효과를 FIC계수로 비교정리하여 표 6에 나타내었다.

Cb과 aminoglycoside제제를 병합했을 경우에 상승작용에 해당하는 FIC계수 0.5이하는 8μg/ml농도의 Ak을 병합했을 경우뿐이었으며, Cb이나 Cz에서 보다 Pi에 병합한 경우에서 aminoglycoside제제의 소정농도에 따른 FIC계수가 0.5이하인 균주수가 많았다.

또 Pi과 Gm이나 Ak과의 병합시 FIC계수 0.75이하인 균주수도 Cb이나 Cz보다 많았다.

반면 Cz과 Tb 8μg/ml 또는 Ak 16μg/ml병합시에는 FIC계수 0.5이하인 균주수가 Cb보다 많았으나 FIC계수 0.75이하인 균주는 Cb, Pi보다 적었다. FIC계수상으로 보면 상승작용이 있는 2가지 약제의 병합은 Cb와 Ak, Pi와 Ak 및 Cz와 Ak로서 7~17%의 균주가 소정농도에서 상승작용을 보였다.

그림 4는 Gm, Tb, Ak, Cb, Pi, Cz에 모두 감수성인 녹농균 P71에 대해 이들 항생제의 병합효과를 원판확산법으로 관찰하였다.

두항생제의 원판이 만나는 곳에서 생기는 세균억제대가 직각을 이루지않고 확산되었으므로 모두 상승작용으로 판정할 수 있었다. 현친회석법에 의한 녹농균 P71의 항균제 병합효과는 Cb과 Gm에서 FIC계수가 0.5, Pi과 Gm에서는 FIC계수가 1.0이었으며 나머지 병합에서는 FIC계수 확인불능이었다. FIC계수와 원판확산법의 성적과는 일치되지 않는 경우가 있다.

그림 5는 Gm, Tb, Cb, Pi 내성인 녹농균 P14 및 Gm, Tb, Ak, Cb, Pi, Cz 내성인 녹농균 P15의 원판확산법에 의한 병합효과 실험의 결과이다. 우측

Table 6. Cumulative fractional inhibitory concentration index of β -lactam and aminoglycoside antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotic combination	Concentration ($\mu\text{g/ml}$) of aminoglycosides added	Cumulative % strains with FIC index*			
		≤ 0.5	≤ 0.75	≤ 1	≤ 1.5
Carbenicillin^c plus					
Gentamicin	8	— ^b	15	—	100
	4	—	15	—	100
	2	—	15	—	100
Tobramycin	8	—	23	—	100
	4	—	19	—	100
	2	—	15	—	100
Amikacin	32	—	8	—	100
	16	—	14	—	100
	8	11	23	—	100
Piperacillin^c plus					
Gentamicin	8	4	38	—	100
	4	4	23	—	100
	2	—	19	—	100
Tobramycin	8	4	27	—	100
	4	—	19	—	100
	2	—	19	—	100
Amikacin	32	—	41	—	100
	16	7	28	—	100
	8	17	35	—	100
Cefoperazone^c					
Gentamicin	8	—	12	—	100
	4	—	4	—	100
	2	—	—	—	100
Tobramycin	8	4	15	—	100
	4	—	12	—	100
	2	—	4	—	100
Amikacin	32	—	—	—	100
	16	7	—	14	100
	8	11	29	—	100

*FIC index ; see text.

^b—, Not applicable.

^cConcentration of β -lactams: 1-512 $\mu\text{g/ml}$.

하단의 P15는 Cz의 억제대가 Ak 원관이 놓인 곳에서 훨씬 커진 것을 볼 수 있어 상승작용으로 판정할 수 있으나 FIC계수는 1.5로서 상승작용이라고 할 수 없었다. 반면 녹농균 P14의 경우 Cb과 Ak 병합시에 Ak과 Cb의 원관이 접하는 부위의 억제

대가 Ak만에 의한 억제대와 차이가 없어 무관하다고 판정하였는데 FIC계수는 확인불능이었으며 나머지 Pi과 Tb, Cz과 Tb, 또는 Gm은 상승작용으로 판정할 수 있었는데 FIC계수는 각기 0.5~0.75, 0.5~1.5 및 1.5였다.

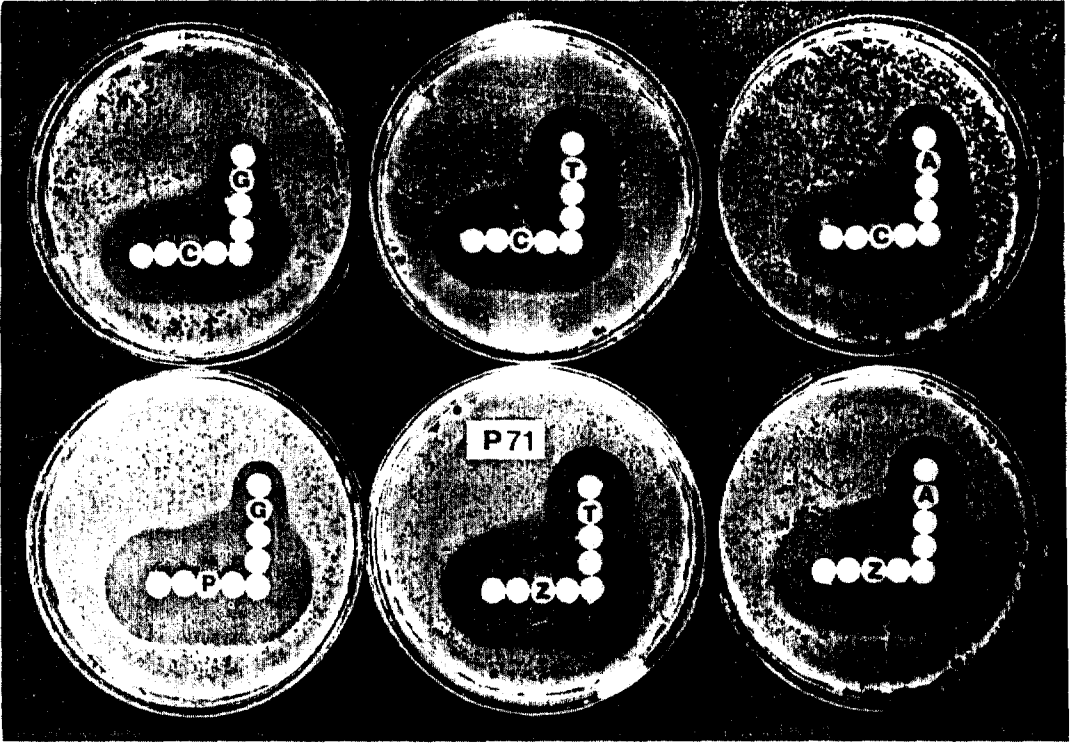


Fig. 4. Antimicrobial combination on *Pseudomonas aeruginosa* P71 by disc diffusion technique. A. amikacin. G. gentamicin. T. tobramycin. C. carbenicillin. P. piperacillin. Z. cefoperazone.

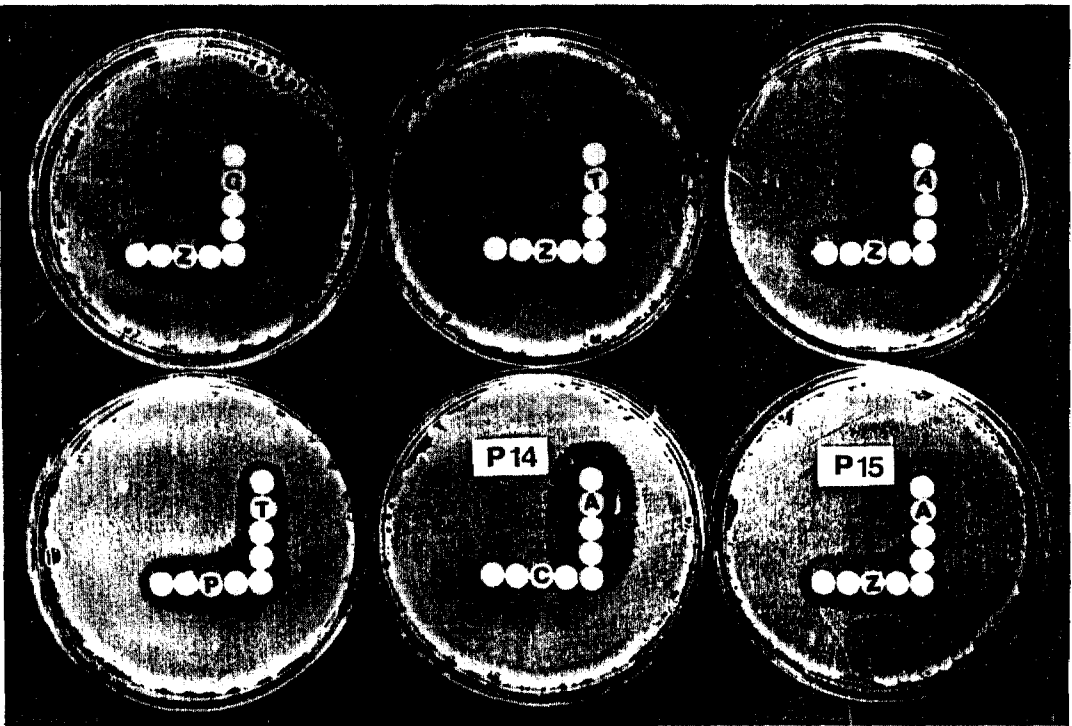


Fig. 5. Antimicrobial combination on *Pseudomonas aeruginosa* P14 and P15 by disc diffusion technique. A. amikacin. G. gentamicin. T. tobramycin. C. carbenicillin. P. piperacillin. Z. cefoperazone.

Table 7. Plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa*

Source	Strain No.	Gentamicin resistance	Molecular weight of plasmids (megadalton)	
Wound discharge	P38	+	243	
	P50	+	230	
	P36	+	218	
	P32	+	212	
	P51	-	203	
	P14	+	184	
	P46	+	183	
	P41	+	181	
	P16	+	175	
	P40	+	158	
	P52	-	146	
	P 7	+	107,55	
	P 6	+	88	
	P28	-	55,13	
	P27	+	54	
	P39	+	46,17	
	Urine	P37	+	88
		P20	+	55
		P22	+	52
P 8		+	3.8	
Sputum	P18	+	155	
	P42	+	3.8	

Plasmid profile 을 볼 수 있었던 녹농균을 가검물 별로 표 7에 정리하였다.

Plasmid profile 을 볼 수 있었던 것은 농유래 16주, 뇨유래 4주, 객담유래 2주로 합계 22주였으며, 뇨 및 객담유래주로 plasmid 를 보유한 균은 모두 Gm 내성이었고, 농유래균주로서 plasmid 를 보유한 16주중 3주(19.8%)가 Gm 감수성이었다. plasmid 를 보유한 녹농균 22주중 3주는 2개의 plasmid 를 가지고 있었으며 나머지 19주는 1개의 plasmid 만을 가지고 있었다.

Plasmid 의 분자량은 최고 243Mdal 의 거대 plasmid 부터 3.8Mdal 까지 다양 하였는데 200 Mdal 이상의 plasmid 는 농유래 5주에서만 보유하고 있었고, 100~200Mdal 의 plasmid 는 농유래 7주, 객담유래 1주가 보유하고 있었다. 그리고 13~17 Mdal 의 plasmid 는 농유래 2주가, 3.8Mdal 의 plasmid 는 뇨 및 객담유래 각 1주만이 보유하고 있었다.

녹농균의 agarose gel 전기영동양상을 그림 6, 7

에 나타내었다.

Lane C는 분자량측정을 위한 표준 plasmid 로써 63Mdal 의 F' kan, 45Mdal 의 R 1033, 34Mdal 의 RP 4, 26Mdal 의 R6K, 10Mdal 의 염색체 DNA 조각, 5.8Mdal 의 pSC101, 2.6Mdal 의 pBR322의 영동상이다.

그림 6의 lane 2, 3은 농유래로 16종의 항균제에 내성인 균주의 영동상인데 각각 184Mdal 55Mdal 의 plasmid band 가 보인다. Lane 4는 농유래로 실험한 18종의 항균제에 모두 내성인 균주의 영동상으로 175Mdal 의 plasmid band 가 보인다. Lane 6은 객담유래로 16종의 항균제에 내성인 균주의 영동상으로 155Mdal 의 plasmid band 가 보인다.

그림 7의 lane 2, 3, 10은 농유래로 12종의 항균제에 내성인 균주의 영동상으로 lane 2에서는 46 Mdal, 17Mdal 의 2개의 plasmid band 를, lane 3과 10에서는 각각 158Mdal, 54Mdal 의 plasmid band 가 보인다. Lane 4, 9는 농유래로 14종, 13종의 항균제에 내성인 균주의 영동상으로 lane 4에서는

Fig. 6. Plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* (0.7% agarose gel electrophoresis, 50 mA, 150 min).

Lane	Source	Resistance marker
2	Wound discharge	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbRfCbPiCtMx.
3	Wound discharge	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbAkRfCbPiCz.
4	Wound discharge	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbAkRfCbPiCtMxCz.
5	Urine	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbCb.
6	Sputum	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbAkRfCbPiCz.
8	Urine	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbAkRf.

181Mdal, lane 9에서는 183Mdal의 plasmid band가 보인다. Lane 5는 객담유래로 12종의 항균제에 내성인 균주의 영상동인데 3.8Mdal의 plasmid band가 보인다.

고 찰

Gram 음성인 장제세균에 속하는 대장균, 폐렴간균, Enterobacter, Serratia 및 녹농균등의 항균제 내성균에 의한 원내감염에 관한 보고가 구미제국에서는 많이 있었지만^{16, 17}, 우리나라에서는 공식적인 보고가 없다.

원내감염에 관한 외국의 보고를 보면 때때로 집단적으로 발생하기도 한다¹⁸. 원내감염의 빈도는 병원규모에 따라 7.2~15.5% 정도이며¹⁹, 원인균의 빈도는 대장균, 포도구균, 녹농균, 폐렴간균등의 순인데 녹농균은 원내감염의 10~12.5%를 차지하나 화상병동이나 암센터등에서는 30%정도가 이균에 의한다고 한다²⁰.

녹농균에 의한 감염의 부위별 빈도는 보고자에

따라 차이가 있으나 화상, 수술부위를 포함하는 모든 창상에서 분리빈도가 가장 높다²¹.

본 실험에 공시한 51주의 녹농균중 35주 (68.6%)가 창상유래주로 녹농균에 유효하게 사용되는 aminoglycoside 항생제중 특히 Gm에 대한 내성은 분자생물학적 내성기전연구에 관심의 대상이 되어 왔는데 이들 Gm내성주는 세포벽의 외막의 변화로인하여 Gm 감수성주와는 다른 생물학적 특성을 지니게 되어 노로나 창상등 주로 국소감염을 일으키며, 혈행이나 내부장기에의 감염은 드물다고 알려져 있는데²² 본 실험에서 분리한 Gm 내성주는 창상, 뇨 및 객담유래주였다.

녹농균감염의 치료에서의 Gm의 비중으로 보아 Gm 내성주의 기타 항생제 내성과의 관련성은 중요한 의의가 있다. Houang 등²³은 Gm 내성주가 Tb에 13%, Ak에는 30%가 내성으로 Tb이 이들 균주에 유효하다고 하였으며, Markes 등²⁴은 Gm 내성주는 Tb에 77%, Ak에는 92%가 내성을 띠다고 보고하였다. 또 Wu 등²⁵은 aminoglycoside 항생제 내성과 β -lactam 항생제 내성과는 차이가 없다고

Ak의 MIC에 유의한 차이가 없었다.

녹농균감염의 치료시 Cb, ticarcillin 또는 Pi과 병용해서 Gm, Tb 등의 aminoglycoside 항생제를 사용하며, amikacin은 2차적으로 선택되는 항생제이다²⁰. 이러한 β -lactam 항생제와 aminoglycoside 항생제의 병용시 상승작용에 대해서는 많은 보고가 있으나^{24, 25, 26}, 각 연구자마다 가장 좋은 상승작용이 나타나는 약제가 달라 절대적인 기준을 확립할 수 없으며 본 실험에서는 Pi과 Gm 또는 Ak의 병합이 다른 병합보다 다소 좋은 것으로 나타났으며, 상승작용은 Ak과 β -lactam 항생제를 병합했을 때 가장 현저히 나타났다.

병합효과를 관찰할 수 있는 실험방법으로는 checkerboard법, 원판확산법등이 있는데 간단히 병합효과를 관찰할 수 있는 원판확산법은 편리성은 인정되나 판정에 애매한 점이 있었으며 FIC계수와 완전히 일치는 되지않았다.

세균의 유전자에 의한 내성은 염색체 또는 비염색체인 plasmid에 의해 일어나는데 녹농균 PAO strain의 염색체에는 aminoglycoside 항생제에 내성을 갖게하는 phosphotransferase 및 β -lactam 항생제에 내성을 갖게하는 β -lactamase 등을 산생하는 유전자가 있으며, Na, Rf, Sm 및 pipemidic acid 등에 대해 내성을 나타내게 하는 유전자가 있다²⁷. 또 plasmid에 의한 aminoglycoside 항생제 내성기전에는 aminoglycoside의 구조를 변화시키는 효소가 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁵.

녹농균의 β -lactam 항생제에 대한 내성은 β -lactamase에 의해 β -lactam ring이 가수분해됨과 아울러 세포벽의 외막에 의한 투과장애로 인해서 항생제가 균체밖으로 배척되는 현상에 기인된 것이며 이것은 gram 음성세균의 β -lactam 항생제 내성에 있어서 중요한 기전인데 특히 녹농균에서 현저하게 관찰된다¹⁵.

녹농균의 aminoglycoside 항생제에 내성 대한 혹은 감성에는 많은 요소가 관여하는데 약제를 adenylation 및 phosphorylation 하므로써 이들 항생제의 세포막 투과장애가 내성발휘의 가장 중요한 원인이다¹⁶. 또 aminoglycoside 항생제를 많이 사용하는 병원환경에서 분리되는 녹농균은 plasmid에 의해서 고도의 내성이 발휘되지는 않더라도 돌연변이에 의해서도 Gm, Tb, 및 Ak 등의 aminoglycoside 항생제에 대한 투과성의 저하가 일어나므로 대체로 낮은 단계의 약제농도에 내성을 지니는 것으로 나타난다²⁸.

Bryan 등²⁹은 녹농균의 Gm 및 Sm에 대한 내성에 관한 연구에서 동일한 R plasmid가 균주에 따

라서 MIC가 다르게 나타남을 관찰하고 그 기전이 R plasmid에 의해 산생된 효소의 활성도의 차이가 아니고 세포벽의 성상이 균주에 따라 다른데서 기인한 균주별 항생제 운반기전의 차이에 의한 것이라고 하였다. 즉 aminoglycoside 항생제에 대한 내성 내성이 반드시 plasmid에 의해 산생된 aminoglycoside 구조변화 효소에 의해서만 나타나는 것은 아니다. 그러나 R plasmid는 녹농균이 aminoglycoside 항생제에 대해서 고도의 내성을 획득하는데는 중요한 의의가 있다. 또 Jacoby³⁰는 Cb과 Gm의 내성에 관련된 14~300Mdal의 크기를 지닌 R plasmid들을 보고하였다.

본 실험에서는 3.8~243Mdal의 plasmid를 볼 수 있었는데 200Mdal이상의 거대 plasmid는 농유래주에서만 관찰되었고, 3.8Mdal의 plasmid는 노 및 객담유래주가 보유하고 있었다. 이상의 본 실험성적에서 나타난 각종 크기의 plasmid들이 내성을 발휘하는 R plasmid라고 단정할 수 없고 그들중의 어떤 것들이 R plasmid일 가능성은 있다. 녹농균에 있어서는 다른 gram 음성 장제세균과는 달리 균체의 접합에 의해 피전달균으로 전달되는 성질의 내성이 아닌 것이 대부분이라서 장제세균에서의 방법으로 내성양성을 관찰하여 R plasmid라고 확실히 규명할 수는 없다. 단지 용균추출된 plasmid를 transformation 혹은 vector plasmid에다가 recombinant assay를 해서 유전적 내용을 확인해야만 된다.

녹농균에 의한 중증감염의 위험이 있는 환자의 치료에 항균제요법에만 의존할 것이 아니라 vaccine이나 hyperimmune globulin 등의 부여방법도 치료적 가치가 있을 것이므로 고려해볼적하다.

결 론

각종의 임상검체에서 51주의 *Pseudomonas aeruginosa*(녹농균)를 분리하였는데 26주(51.0%)는 gentamicin(Gm)에 내성이었으며 25주(49.0%)는 Gm에 감수성이었다.

Piperacillin(Pi), cefotaxime(Ct), moxalactam(Mx), cefoperazone(Cz) 및 amikacin(Ak)에 대해서는 분리균의 21.6~31.4%가 내성이었는데 이들 5가지 항균제가 50%의 균주의 발육을 저지하는 MIC₅₀은 모두 내성하한치보다 낮았다.

분리된 녹농균중 30주(58.8%)가 12종 이상의 항균제에 내성이었는데 Gm내성주는 전균주가 12종 이상의 항균제에 내성이었으며 그중 1주는 실험한 18종의 항균제에 모두 내성이었다. 반면에 Gm감

Fig. 7. Plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* (0.7% agarose gel electrophoresis, 50 mA, 150 min).

Lane	Source	Resistance marker
2	Wound discharge	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbCb.
3	Wound discharge	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbCb.
4	Wound discharge	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbCbCtMx.
5	Sputum	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbCb.
9	Wound discharge	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbRfCb.
10	Wound discharge	CmTcSmSuNaApTpClKmGmTbCb.

보고하였으나 본 실험에서는 Gm 내성주는 26주 모두가 Tb에도 MIC가 $16\mu\text{/ml}$ 이상으로 내성이었으며, Ak에는 12주(46%)가 내성이었다. 또 Gm 내성주와 감수성주가 Tb과 Cb, Pi, Cz 등의 β -lactam 항균제에 대해 뚜렷한 MIC의 차이를 나타내어 Gm 내성이 녹농균내성의 연구에 적합한 지표로 사용될 수 있음을 시사하였다.

항균제의 빈번한 사용이 내성균의 증가를 초래하는데 Atkinson 등¹⁾, Huovinen 등²⁾ 및 Levine 등³⁾은 aminoglycoside 항생제의 사용증가와 비례하여 Gm, Tb 및 Ak에 대해 녹농균의 내성이 증가함을 보고하였다. 본 실험에서 나타난 aminoglycoside 항생제의 MIC를 82년의 보고들⁴⁾과 비교해 보면 Gm에 대한 MIC₅₀은 $64\mu\text{g/ml}$, MIC₉₀은 $512\mu\text{g/ml}$ 이상으로 82년의 MIC₅₀인 $2\sim 32\mu\text{g/ml}$ 및 MIC₉₀인 $128\mu\text{g/ml}$ 보다 높았다. Ak에 대한 MIC 역시 MIC₅₀이 $8\mu\text{g/ml}$, MIC₉₀이 $512\mu\text{g/ml}$ 로 82년의 MIC₅₀인 $4\mu\text{g/ml}$, 및 MIC₉₀인 $128\mu\text{g/ml}$ 보다 높았다.

Pi은 Cb이나 ticarcillin보다 녹농균에 대해 좋은 효과를 나타내며, Cz은 Ct이나 Mx 등의 다른 제 3세대의 cephalosporin보다 녹농균감염증에 더 좋

은 효과를 지니는 것으로 알려져 있는데^{12, 17, 21)} 본 실험의 내성빈도 및 MIC를 비교하여 볼 때 Pi은 Cb의 절반인 21.6%의 내성빈도 및 낮은 MIC₅₀을 나타내었으며, Mx, Ct, Cz과 비슷한 효과를 나타내었다. 본 실험의 성적으로 보아 녹농균감염의 치료에는 Pi, Ct, Mx, Cz, 및 Ak 등이 유효할 것으로 생각된다.

Donovick 등¹⁶⁾이 streptomycin이 폐염균에 대한 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺의 길항효과를 증명한 이후 각종의 이온 및 많은 배지성분들이 녹농균에 대한 aminoglycoside 항생제의 역가에 영향을 미친다는 연구가 있었으며 특히 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺의 농도는 gentamicin, tobramycin, amikacin 등의 MIC와 밀접한 관계가 있음이 알려져 있다²⁰⁾.

따라서 액체배지로 검사할 때는 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺를 첨가해야 한다²²⁾. 그러나 한천의 이온농도는 제품마다 달라 MIC의 차이가 있는데 Washington 등²³⁾은 여러 제품의 MHA에서 MIC를 측정할 결과 Gm은 $0.5\sim 6.0\mu\text{g/ml}$, Tb은 $0.2\sim 2.0\mu\text{g/ml}$, Ak은 $0.8\sim 11\mu\text{g/ml}$ 로 차이가 있음을 보고하였다. 본 실험에서는 MHA에 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺을 $50\mu\text{g/ml}$, $25\mu\text{g/ml}$ 를 첨가했을 경우나 그냥 씻은 경우 Gm, Tb, 및

수성주는 5주만이 12종의 항균제에 내성일뿐 나머지 균주는 10종이하의 항균제에 내성이었다.

Gm내성의 유무는 tobramycin (Tb), Pi 및 Cz의 MIC와 밀접한 관계가 있었으며, Gm내성주는 Tb에는 전균주가 내성이었고, Ak, Pi 및 Cz에는 38.4~46.1%의 균주가 내성이었다.

Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺를 첨가한 Mueller-Hinton agar와 첨가하지 않은 경우에는 Gm, Tb, Ak, carbenicillin (Cb), Pi 및 Cz의 MIC의 유의한 차이는 없었다.

Gm내성 녹농균에 대한 β -lactam제재와 aminoglycoside제재의 병합효과를 보기 위하여 checker-board법과 paper strip 대신 항균제 disc를 사용하는 방법등 2가지 방법을 비교 관찰하였다. FIC계수상으로 보아 Ak과 Cb, Pi 및 Cz등 β -lactam제재와의 병합시 가장 많은 균주가 상승효과를 보였다. 항균제 disc의 확산으로 병합효과를 관찰한 결과 FIC계수와 일치하지 않는 경우가 있었다.

녹농균의 항균제내성의 본태를 조사하기 위해 plasmid profile analysis를 실시하였다. Kado 및 Liu의 방법으로 plasmid를 분리한 다음 agarose gel electrophoresis를 실시한 결과 22주 (43.1%)에서 plasmid profile을 확인할 수 있었는데 19주가 1개의 plasmid를 보유하고 있었으며, 3주는 2개의 plasmid를 보유하고 있었다. 이들 plasmid들의 분자량은 3.8~243 megadalton (Mdal)이었는데 200 Mdal이상의 거대 plasmid와 13~17 Mdal의 plasmid는 농유래주에서만 관찰되었다. 그러나 Gm에 감수성인 균주도 분자량 13~203 Mdal의 plasmid를 보유하고 있었다.

참 고 문 헌

- 1) 이삼열, 정윤섭, 김상인, 석종성, 김기홍, 정화순, 김중명, 김재식: 임상 검체에서 1982년에 분리된 세균의 항균제에 대한 감수성, 대한 의학협회지, **26(8)**: 747, 1983.
- 2) 임영수, 이유철, 서민호, 설성용, 조동택, 전도기: *Pseudomonas aeruginosa*의 Pyocin형 및 항균제 내성, 대한화학요법학회지, **1(2)**: 270, 1983.
- 3) Aronoff SC and Klinger JD: In vitro activities of aztreonam, piperacillin, and ticarcillin combined with amikacin against amikacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *P. cepacia* isolates from children with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **25**:279, 1984.
- 4) Atkinson BA and Lorian V: Antimicrobial agent susceptibility patterns of bacteria in hospitals from 1971-1982, *J. Clin. Microbiol.*, **20**:791, 1984.
- 5) Barrett FF, Casey JI and Finland M: Infection and antibiotic use among patients at Boston city hospital, *N. Engl. J. Med.*, **278**:5, 1968.
- 6) Bennett JV: Nosocomial infections due to *Pseudomonas*, *J. Infect. Dis.*, **130**:S4, 1974.
- 7) Braude AI: Infectious Diseases and Medical Microbiology, p. 314, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1986.
- 8) Brit MR, Burke JP, Nordouist AG, Wilfert JN and SmithCB: Infectious control in small hospital: prevalence surveys in 18 institutions, *J. Am. Med. Assoc.*, **236**:1700, 1976.
- 9) Brumfitt W, Percival A and Leigh DA: Clinical and laboratory studies with carbenicillin: a new penicillin active against *Pseudomonas pyocyanea*, *Lancet*, **1**:1289, 1967.
- 10) Bukhari AI, Shapiro JA and Adhya SL: DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes, p. 639, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1977.
- 11) Clark RB, Janda JM and Bottone EJ: Phenotypic factors correlated with the absence of virulence among gentamicin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains, *J. Clin. Microbiol.*, **20**:235, 1984.
- 12) Cunha BA and Ristuccia AM: Third generation cephalosporins, *Med. Clin. N. Amer.*, **66**:283, 1982.
- 13) Curtis N.A.C., Orr D, Ross GW and Bouton MG: Competition of β -lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus rettgeri*, and *Escherichia coli*: comparison with antibacterial activity and effects upon bacterial morphology, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **16**:325, 1979.
- 14) Davies J and Courvalin P: Mechanisms of resistance to aminoglycosides, *Am. J. Med.*, **62**:868, 1977.
- 15) Davies J and Smith DI: Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents, *Ann. Rev. Microbiol.*, **32**:496, 1978.
- 16) Donovan R, Bayan AP, Canales P and Pansy F: The influence of certain substances on the activity of streptomycin III. Differential effects of various electrolytes on the action of streptomycin, *J. Bacteriol.*, **56**:125, 1948.
- 17) Eliopoulos GM and Mollering RC: Azlocillin, mezlocillin, and piperacillin; new broad-spectrum

- penicillins, *Ann. Int. Med.*, **97**:755, 1982.
- 18) Evans AS and Feldman HA: Bacterial Infections of Humans, p. 367, Plenum Press, New York, 1982.
 - 19) Gerding DN, Buxton AE, Hughers RA, Cleary PP, Arbaczawski J and Stamm WE: Nosocomial multiply resistant *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology of and outbreak of apparent index case origin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**:608, 1979.
 - 20) Gravenitz A: The role of opportunistic bacteria in human disease, *Ann. Rev. Microbiol.*, **31**:447, 1977.
 - 21) Houang ET and McKay-Ferguson E: Activities of tobramycin and amikacin against gentamicin-resistant gram-negative bacilli, *Lancet*, **1**:423, 1976.
 - 22) Huovinen P, Groensoos P, Herva E, Katila M, Klossner M, Renkonen O and Joivanen P: Aminoglycoside resistance among blood culture isolates, *J. Clin. Microbiol.*, **20**:65, 1984.
 - 23) Joklik WK, Willett HP and Amos DB: Zinsser Microbiology, 18th ed., p. 631. Appleton-Century-Crofts, East Norwalk 1984.
 - 24) Jorgensen JH, Crawford SA and Alexander GA: In vitro activities of moxalactam and cefotaxime against aerobic gram-negative bacilli, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**:937, 1980.
 - 25) Kado CI and Liu ST: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, *J. Bacteriol.*, **145**:1365, 1981.
 - 26) Kagan BM: Antimicrobial Therapy, 3rd ed., p. 231, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1980.
 - 27) King EO: The identification of unusual pathogenic gram negative bacteria, p. 2. Center for Disease Control, Atlanta, 1979.
 - 28) Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Jr and Shadomy HJ: Manual of Clinical Microbiology, 4th ed., p. 350. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1985.
 - 29) Levine JF, Maslow MJ, Leibowitz RE, Pollock AA, Hanna BA, Schaeffer S, Simberkoff MS and Rahal J Jr: Amikacin-resistant gram-negative bacilli: correlation of occurrence with amikacin use, *J. Infect. Dis.*, **151**:295, 1985.
 - 30) Lorian V: Antibiotics in Laboratory Medicine, p. 300. Williams & Wilkins, Baltimore, 1980.
 - 31) Magnussen CR, Sammartino MT and Ernest KD: Aminoglycoside resistant gram-negative bacilli in a community hospital: comparative in vitro activity of cefotaxime, moxalactam, cefoperazone, and piperacillin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **22**:154, 1982.
 - 32) Marks MI, Hammerberg S, Greenstore G and Silver B: Activity of newer aminoglycosides and carbenicillin, alone and in combination, against gentamicin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **10**:399, 1976.
 - 33) Mayer KH and Zinner SH: Bacterial pathogens of increasing significance in hospital-acquired infections, *Rev. Infect. Dis.* **7**:S371, 1985.
 - 34) Mintz L and Drew WL: Comparative synergistic activity of cefoperazone, cefotaxime, moxalactam, and carbenicillin, combined with tobramycin, against *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **19**:332, 1981.
 - 35) Mitsuhashi S: Review: The R factors, *J. Infect. Dis.*, **119**:89, 1969.
 - 36) Mitsuhashi S and Hashimoto H: Microbial Drug Resistance, p. 475. Japan Scientific Societies Press, Tokyo 1975.
 - 37) O'Brien SJ: Genetic Maps 1984, Vol. 3, p. 193. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1984.
 - 38) Olson B, Weinstein RA, Nathan C Chamberlin W and Kabins SA: Epidemiology of endemic *Pseudomonas aeruginosa*: why infection control effort have failed, *J. Infect. Dis.*, **150**:808, 1984.
 - 39) Scribner RK, Marks MI, Weber AH, Trapay MM and Welch DF: Activities of various β -lactams and aminoglycosides, alone and in combination, against isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**:939, 1982.
 - 40) Sheretz RJ and Sarubbi FA: A three-year study of nosocomial infections associated with *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Clin. Microbiol.*, **18**:160, 1983.
 - 41) Stuttard C and Rozee KR: Plasmids and Transposons, p. 1, p. 83. Academic Press, New York 1980.
 - 42) Thornsberry C et al: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, p. 31. National Committee for Clinical Laboratory standard, Villanova, 1983.
 - 43) Washington II JA, Synder RJ, Kohner PC, Wiltse CG, Ilstrup DM and McCall JT: Effect of cation content of agar on the activity of gentamicin, tobramycin,

- and amikacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Infect. Dis.*, **137**:103, 1978.
- 44) Weinstein RA, Nathan C, Gruensfelder R and Kabins SA: Epidemic aminoglycoside resistance in gram-negative bacilli: Epidemiology and mechanisms, *J. Infect. Dis.*, **141**:338, 1980.
- 45) Wu DH, Baltch AL and Smith RP: In vitro comparison of *Pseudomonas aeruginosa* isolates with various susceptibilities to aminoglycosides and ten β -lactam antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **25**:488, 1984.