

## *Shigella* R Plasmid의 분자적 특성

경북대학교 의과대학 미생물학교실 · 계명대학교 의과대학 미생물학교실<sup>1</sup>

이유철 · 설성용 · 조동택 · 전도기<sup>1</sup>

=Abstract=

### Molecular Characteristics of R Plasmids in *Shigella*

Yoo-Chul Lee, Sung-Yong Seol, Dong-Taek Cho and Doki Chun<sup>1</sup>

Department of Microbiology, School of Medicine, Kyungpook National University

Department of Microbiology, School of Medicine, Keimyung University<sup>1</sup>, Taegu, Korea

Multiply resistant *Shigella* strains isolated in Taegu area were subjected for the characterization of R plasmids. All strains isolated in 1984 and 1985 were susceptible to gentamicin, amikacin, and cephalothin, and most strains were susceptible to kanamycin(Km) and rifampin by agar dilution antimicrobial susceptibility test.

The resistance frequency of *S. flexneri* against ampicillin(Ap) was higher than that of *S. sonnei*. The strains resistant to sulfisomidine(Su) and trimethoprim(Tp) were found at higher frequency in *S. sonnei* than in *S. flexneri*. The most prevalent resistance pattern of *S. flexneri* was chloramphenicol(Cm) tetracycline(Tc) streptomycin(Sm) Ap, followed by the pattern of CmTcSmSuApTp, CmTcSmSuApTp nalidixic acid, and CmTcSmSuAp in the decreasing order. The antibiogram of CmTcSmSuTp was found to be the most frequent pattern in *S. sonnei*. The ratio of conjugal transfer of *S. flexneri* was 47% and 75% of *S. sonnei*.

The average number of plasmid harboring in *Shigella* was 4 and the size of plasmid ranged 1.3 to 134 megadalton(Mdal). Most *S. flexneri* carried plasmids of 2 to 3 Mdal and *S. sonnei* carried those of 3 to 4 Mdal size.

The sizes of conjugative plasmids ranged 40 - 90 Mdal. The incompatibility group(*Inc*) FII plasmids (54 - 59 Mdal) were most frequent and rare *Inc* B plasmids(60 Mdal) of isolates in 1979 and 1980 and *Inc* FI(87 Mdal) of 1983 isolates were able to be classified by the colony test with standard reference plasmids. The R plasmids of known *Inc* group were tested for the restriction endonuclease analysis. The pattern of plasmids digested by EcoRI were apparently different by the *Inc* group but there was no significant difference between species or by the resistance patterns.

Nonconjugative plasmids and their phenotypes were identified by transformation test. The transformants were resistant to less than two drugs. Colicin producing transformants carried the Col plasmid of 3.7 or 3.9 Mdal size.

Ap<sup>r</sup> plasmids derived from *S. sonnei* were found to be mobilized by transfer factor RT641 to *E. coli* #CS100. AP<sup>r</sup> plasmids of same size shared by *S. flexneri*, *S. sonnei*, and *E. coli* were digested with PstI. All of them showed two restriction fragments of 2.8 kilobase(kb) and 0.7kb. Other plasmids (Sm<sup>r</sup> Su<sup>r</sup>) derived from *S. flexneri*, *S. boydii*, and *S. sonnei* were digested with PstI and they showed same restriction fragment patterns of 3.1kb and 2.9kb.

The plasmid profiles of three strains of *S. sonnei* producing colicin and showing same resistance pattern of CmTcSmSuApTpKm appeared to be similar. Restriction patterns by EcoRI and the behavior of plasmids in conjugation or transformation process were also similar between those plasmids. The restriction patterns were significantly different between the plasmids of *Inc* FI group and those of un-

## 서 론

이질의 발생은 환경위생의 미비나 개인위생에 관한 의식수준이 낮은 개발도상국에서 집단적으로 일어난다는 고정관념이 일반화되어 있다. 그러나 구미제국에서도 이질은 발생하는데<sup>34)</sup> 이러한 사실은, 이질발생이 토착화된 지역에 다녀온 여행객이 전파시킨데 기인된 것으로 국민들의 빈번한 국제여행 때문이라는 편견으로 속단하고 있는 것이 이질에 관한 현재의 보편화된 사고이다<sup>14, 30)</sup>.

과거 우리나라에서는 이질의 집단발생이 있었으나 지금은 현저히 줄어들었고 소수의 산발적인 이질발생의 원인균도 classic dysentery (*Shigella dysenteriae* type 1)는 이미 보고된 지 오래이고 미국과 비슷한 *Shigella sonnei*에 의한 이질발생의 상대적인 빈도가 증가된 양상을 보여주고 있다<sup>2, 4, 5, 18)</sup>.

이질의 원인균이 외국에서 유입된 것인지 토착화된 것인지를 규명하기 위한 역학적인 조사방법으로 종래의 균형을 조사하는 것은 결정적인 단서가 될 수 없다. 그러나 *Shigella dysenteriae* 1의 경우는 어떤 국가에서는 산발적으로 발생하는 토착화된 질환이므로 예외이다. 따라서 보다 완벽한 자료로서는 이질균의 유전적 내용을 분자생물학적인 방법으로 규명하는 것만이 역학조사에 있어서 중요한 단서가 되고 있다<sup>26, 54, 59, 68, 69)</sup>.

서식환경에 따라서 균의 성상은 조금씩 다르다. 특히 항균제가 남용되고 있는 우리나라에서 분리된 이질균은 다약제 내성균이고 약제 내성양상도 복잡하고 특이하다. 종래의 생물학적, 혈청학적 제성상 외에 내성양상도 균의 유래를 추적하는데 중요한 성적이 된다.

현재 우리가 분리한 이질균은 대부분이 항균제에 다제내성이고 이들의 내성은 R plasmid에 의한 전달성 내성이다<sup>17, 19)</sup>. R plasmid에 의한 전달성 내성이 균종에 관계없이 만연되어 있음은 항균제가 과용 혹은 남용되는 우리나라의 현재 의료제도의 문제점에 그 원인이 있다. 분자생물학적 방법으로 이질균의 유전적 내용을 조사하는데는 첨단기술이 동원되고 있는바 R plasmid DNA의 분자적 특성을 규명하고 비적합성 실험에 의해 plasmid를 분류하는 유전적 특성을 조사하는 여러가지 방법을 포괄하고 있다.

저자는 이질균의 항균제 감수성검사를 실시하여

내성균은 내성이 R plasmid에 의한 전달성 내성인가를 확인하는 실험을 거쳐서 이들 plasmid들이 나타내는 내성양상을 조사한후 비적합성에 의해 plasmid를 분류하였다.

접합에 의해 전달되지 않는 R plasmid의 존재 여부를 확인하기 위해 transformation을 실시하였다.

균체가 갖고있는 여러개의 plasmid들은 직접균체로부터 추출하여 전기영동상을 분석하는 것을 간혹 plasmid finger printing이라고 하는데<sup>44)</sup> 그 이유는 범죄 수사에 있어서 범인의 지문처럼 결정적인 단서가 된다고 하기 때문이다. 본 실험에서도 plasmid profile을 분석하고 특성의 R plasmid는 제한 효소로 처리하여 보다 세밀한 plasmid의 분해상을 관찰하였다. 특히 plasmid의 유래를 추적하는데 중요한 비적합성에 의한 군별분류성과 plasmid DNA의 분자적 특성을 결부시켜서 흥미있는 단서를 얻었으므로 그 성적을 보고한다.

## 재료 및 방법

### 균 주

경북의대 미생물학교실과 대구동산의료원에서 분리된 *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* 및 *S. sonnei*를 공시하였으며, 동정은 Edward 및 E-wing<sup>24)</sup>, Lennette 등<sup>41)</sup>의 방법에 의하여었다.

### 항균제 및 감수성검사

Amikacin(Ak), ampicillin(Ap), cephalothin(CI), chloramphenicol(Cm), gentamicin(Gm), kanamycin(Km), nalidixic acid(Na), rifampin(Rf), streptomycin(Sm), sulfisomidine(Su), tetracycline(Tc) 및 trimethoprim(Tp) 등 도합 12종의 항균제를 공시하였다.

항균제감수성 검사는 평판회석법에 의하여었다<sup>41)</sup>. Mueller-Hinton agar(MHA)를 사용하였으며, 규정된 용매에 녹인 항균제를 2배 계단희석하였고, 최종 항균제 농도의 범위는 Su는 2048 $\mu$ g/ml에서 32 $\mu$ g/ml, 기타 항균제는 512 $\mu$ g/ml에서 0.5 $\mu$ g/ml 사이였다. 내성균의 판정은 Lennette 등<sup>41)</sup> 및 NCCL S<sup>37)</sup>의 판정기준에 따랐으며 감수성 결과의 정도판리를 위하여 *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 및 *P. aeruginosa* ATCC 27853을 함께 공시하였다.

## Colicin 산생검사

접합에 의한 내성전달에 장애가 되는 colicin 산생여부를 Shaw 등<sup>21)</sup>의 방법에 따라 조사하였다. 지시균은 접합실험시 피전달균으로 사용한 *E. coli* ML 1410과 RG 488을 사용하였다. Colicin 산생주는 내성전달 실험시에 colicin 내성주를 피전달균으로 사용하였다.

## 접합에 의한 내성전달실험

*E. coli* K12 ML 1410(Na<sup>r</sup>) 및 *E. coli* K12 RG 488(RF<sup>r</sup>)을 사용하였다. 공시균과 피전달균 각각을 4ml TSB에 접종하고 37°C 항온수조에서 3~4시간 진탕배양한 후 공시균과 피전달균을 1:8로 혼합하여 18시간 배양하였다. 이 혼합 배양액을 선택배지에 도말배양한 후 내성이 전달된 피전달균집락을 선택약제별로 3개씩 임의로 채취하여 MacConkey 한천 평판배지에 순 배양하였다. 피전달균이 선택된 약제 이외에 공여균이 원래 가지고 있던 항균제에 대한 내성도 함께 가지고 있는지 확인하였다. 선택배지는 trypticase soy agar(TSA) 또는 MHA에 약제별로 15~200µg/ml 농도의 각 선택약제와 피전달균이 내성인 Na 또는 Rf를 50µg/ml 되게 첨가하여 내성을 전달받은 피전달균만이 발육할 수 있게 하였다. 매번 실험에서 공여균과 내성을 전달받지 않은 피전달균은 해당 선택배지에서 증식할 수 없음을 확인하였다.

## 비전달성 R plasmid의 가동화

Anderson<sup>10)</sup>의 방법을 적당히 변형하여 실험하였다. TSB에서 각각 3~4시간 증식시킨 비전달성 R plasmid를 보유하는 공여균과 transfer factor를 보유하는 대장균을 1:1로 혼합하여 37°C 수조에서 2시간 배양하였으며, 이를 10배 희석한다음 여기에 최종 피전달균을 1:2로 첨가하여 18시간 혼합배양하였다. 이들 혼합배양액은 각각의 약제를 함유하는 선택배지에 도말배양한 후 나타나는 집락을 3개씩 취하여 순배양한 다음 내성을 검사하였다. 매번 실험에서 공여균액, 최종 피전달균액, transfer factor만을 보유한 대장균과 공여균의 혼합배양액을 선택배지에 도말하여 증식하지 못함을 확인하였다.

## 비적합성 실험

비적합성균의 분류는 colony test에 의하여 실험하였다. 표준 R plasmid를 *E. coli* ML 1410 및 RG 488에 전달시켜 사용하였다. 시험할 R plasmid를

표준 R plasmid 보유 피전달균에 전달시켰으며, 공여 R plasmid만의 내성약제로 선택하여 나타나는 집락을 20개 임의선택하여 순배양한 후 새로 획득된 R plasmid와 원래 존재하던 R plasmid의 존재 유무를 양 R plasmid의 상이한 내성 marker로 확인하여 다음과 같이 판정하였다<sup>21)</sup>. 즉 원래 존재하던 R plasmid marker가 피전달내성균에서 제거되었을때 이를 역으로 반복실험하였으며 같은 결과일때 비적합성으로 판정하였고, 이때 피전달균의 R plasmid가 상호배제에 의하지 않고는 자연상실되지 않음을 확인하였다.

## Plasmid의 분리 및 전기영동

Plasmid DNA의 검색을 위해서는 Kado 및 Liu<sup>22)</sup>의 방법을 다소 변경하여 실시하였다. 균을 3ml TSB에 37°C 24시간 진탕배양한 배양액 0.5ml를 취한 다음 12,000 rpm(Microfuge, Beckman)으로 2분간 원침시켰다. 세포침사를 200µl TE buffer(10 mM, Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 부유시키고 3% sodium dodecyl sulfate(SDS)와 50 mM Tris를 함유하여 NaOH로 PH 12.6으로 조절한 lysis 용액 400µl를 가하여 진탕혼합하면서 세포를 파쇄시켰다. 56°C 수조에서 45분간 가온한 다음 5분간 얼음으로 냉각시킨후 phenol-chloroform 혼합액을 가하여 잘 흔들어서 단백제거가 충분히 이루어지게 하였다. 12,000rpm으로 15분간 원침시키고 상층을 회수하여 0.07% bromphenol blue(BPB), 7% SDS, 33% glycerol을 함유하는 buffer와 혼합후 전기영동에 이용하였다.

## Transformation 및 제한효소와 반응시킬 plasmid의 분리

Birnboim 및 Doly<sup>12)</sup>의 방법에 따랐다. 37°C 24시간 배양한 배양액 0.5ml를 원침시킨후 세포침사를 100µl의 lysozyme 용액(2mg/ml lysozyme, 50mM dextrose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris)에 부유시키고 30분간 반응시킨후 200µl의 alkaline SDS 용액(0.2N NaOH, 1% SDS)을 첨가하여 5분간 얼음에 냉각시킨다. 150µl의 high salt 용액(3M sodium acetate, pH 4.8)을 첨가한후 60분간 얼음에 방치하여 단백, 고분자량의 RNA 및 염색체 DNA는 침전되게 한다. 5분간 원침한후 상층액을 회수한 다음 1ml의 냉각된 ethanol을 첨가하고 30분간 -20°C에 방치시켜 DNA를 침전시켰다. 원침후 침사 DNA를 100µl의 0.1M sodium acetate/50mM Tris HCl(pH 8.0)에 녹인다음 냉각된 ethanol을 첨가하여 다시 침전시킨다. 냉각된 ethanol에 의한

침전을 반복한후 세척된 DNA를 증류수에 녹여 transformation에 사용하였다.

제한효소 처리를 위해서는 4 $\mu$ l의 RNase 용액 (1 mg/ml)를 DNA 용액에 첨가한후 30분간 37°C 수조에서 반응시켜 RNA를 제거한다. Phenol-chloroform 혼합액을 가한후 잘 혼든다음 원침하고 상층액을 회수한 다음 냉각된 ethanol로 침전시키고, 70%의 냉각된 ethanol로 2회 세척후 원침한 다음 증류수에 녹여 제한효소처리를 한다.

전기영동에는 89mM Tris, 89mM boric acid 및 2mM EDTA를 함유하는 TBE buffer를 사용하였다. 0.7% agarose gel (15 $\times$ 15 cm)을 만들어 수평형 영동장치를 이용하여 50mA, 100V로 4시간 영동하였다. 매 전기영동마다 plasmid 분자량 측정을 위해 대장균 유래의 79 megadalton (Mdal), 47 Mdal, 33 Mdal, 4.9 Mdal, 3.9 Mdal, 3.5 Mdal 및 2.7 Mdal의 기지분자량의 7개 plasmid를 함께 영동하였다.

### Transformation

Lederberg 및 Cohen<sup>40)</sup>의 방법에 따랐으며 피전달균으로는 *E. coli* C(r<sup>-</sup>, m<sup>-</sup>, lac<sup>+</sup>, R<sup>F</sup>)를 사용하였는데 다음과 같이 처리하였다.

L-broth에 접종하여 1주야 배양한 균액을 50ml L-broth에 100배 희석되게 접종한 후 2시간 동안 37°C 항온수조에서 진탕배양후 15분간 얼음으로 냉각시킨다. 7,000g로 10분간 원심시킨후 침사를 동량의 0.1 M MgCl<sub>2</sub> 용액에 부유시키고, 다시 원심

한후 침사를 냉각된 25ml의 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 용액에 부유시킨다음 20분간 얼음으로 냉각시킨다. 원심후 침사를 냉각된 2.5ml의 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 용액에 부유시킨후 0°C에서 1주야 보관한 다음 다시 원심후 2.5ml의 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 용액에 부유시켰다. 이상의 과정으로 competent해진 피전달균의 균액 0.2ml를 DNA 용액 0.1 ml와 혼합한다. 혼합액을 30분간 얼음으로 냉각시킨다음 42°C에서 2분간 가온시키고 다시 얼음으로 10분간 냉각시킨다. 미리 가온된 L-broth로 10배 희석한 다음 선택배지에 도말배양한다. 선택배지에서 나타나는 모든 집락을 공여균이 내성을 가진 모든 항균제에 접종하여 피전달균의 내성양상을 조사한후 plasmid profile을 조사하였다. 매번 실험에서 피전달균은 선택배지에서 증식하지 못하며, plasmid DNA 용액이 무균상태인가를 확인하였다.

### 제한효소처리

EcoRI, BamHI, Hind III 및 Pst I 등의 제한효소는 New England BioLabs로부터 구입하였다. 증류수에 녹인 DNA에 제한효소를 첨가한후 각 제한효소에 아래의 buffer<sup>41)</sup>를 넣어 37°C에서 90분간 반응시킨후 0.5 M EDTA, 0.25% BPB, 0.25% xylene cyanol 및 40% (w/v) sucrose를 첨가하여 반응을 정지시킨다음 전기영동에 사용하였다. BamHI, Hind III 및 Pst I 50mM NaCl, 10mM Tris HCl (pH 7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dithiothreitol

Table 1. Antimicrobial susceptibility of *Shigella* isolated in 1984 and 1985<sup>a</sup>

Drug <sup>b</sup>	<i>Shigella flexneri</i>			<i>Shigella sonnei</i>		
	MIC range	MIC <sub>90</sub>	No. (%) of resistant strains	MIC range	MIC <sub>90</sub>	No. (%) of resistant strains
Cm	<0.5- 256 <sup>d</sup>	256	106 (99.1)	2- 512	512	31 ( 96.9)
Tc	<0.5- 256	128	105 (98.1)	1- 256	256	30 ( 93.8)
Sm	8- > 512	512	101 (94.4)	8- > 512	256	31 ( 96.9)
Su	< 32- >2048	>2048	77 (72.0)	< 32- >2048	>2048	32 (100.0)
Na	1- > 512	128	23 (21.5)	2- 128	16	3 ( 9.4)
Ap	<0.5- > 512	512	100 (93.5)	1- 512	2	2 ( 6.3)
Km	4- > 512	8	6 ( 5.6)	2- 16	8	0
Gm	<0.5- 4	2	0	<0.5- 8	2	0
Ak	2- 8	4	0	2- 16	2	0
Tp	<0.5- > 512	> 512	51 (47.7)	<0.5- > 512	> 512	30 ( 93.8)
Rf	1- > 512	16	2 ( 1.9)	2- > 512	16	1 ( 3.1)
Cl	2- 16	16	0	4- 16	8	0

<sup>a</sup>One hundred and seven strains of *S. flexneri* and 32 strains of *S. sonnei* were tested.

<sup>b</sup>Abbreviation: see text.

<sup>c</sup>Concentration required for inhibition of 90% of strains.

<sup>d</sup> $\mu$ /ml.

**Table 2.** Drug resistance pattern and transferable drug resistance of *Shigella* strains isolated in 1984 and 1985

Multiplicity of resistance drugs	Resistance pattern	Species	No. of strains	No. of strains transferred resistance	Resistance pattern transferred	No. of plasmids	Inc group
8	CmTcSmSuApTpKmNa	B	1	1	CmTcSmSuApTp CmTcSmSuKm	1 1	FII UC <sup>a</sup>
	CmTcSmSuApTpNaRf	B	1	0			
7	CmTcSmSuApTpKm	B	5	5	TcSmSuApTpKm SmSuApTpKm	1 4	UC UC
	CmTcSmSuApTpNa	B	20	20	CmTcSmSuApTp CmTcSmSuAp TcSmSu	18 1 1	FII FII UC
	CmTcSmSuApTp	B	23	18	CmTcSmSuApTp CmSmSuApTp TcSmSuApTp SmSuApTp CmTcSmSuApTp CmTcSmSuTp SmAp	10 2 1 1 1 1 1	FII FII FII UC UC FII UC
5	CmTcSmSuApNa	B	1	1	CmTcSmSuAp	1	UC
	CmTcSmSuTpNa	D	2	2	CmTcSmSuTp	2	FII
	CmTcSmSuTpRf	D	1	0			
	CmTcSmSuAp	B	20	4	CmTcSmSuAp	4	FII
		C	1	0			
	CmTcSmSuTp	B	1	1	CmTcSmSuTp	1	UC
		D	24	18	CmTcSmSuTp	14	FII
4	CmTcSmSuNa	D	1	1	CmTcSmSu	1	FII
	CmTcSmApRf	B	1	0			
	CmTcSmAp	B	27	0			
	CmSmSuTp	D	1	1	CmSmSuTp	1	FII
3	CmTcSu	B	5	0			
	CmSmAp	B	1	0			
1	Su	D	1	0			
Total		B	106	50			
		C	1	0			
		D	32	24			

<sup>a</sup>Unclassified

(DTT); EcoRI - 100mM NaCl, 50mM Tris · HCl (pH 7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT.

전술한 buffer 및 영동장치를 이용하였으며, gel의 농도는 제한효소 종류에 따라 달리하였다. EcoRI은 0.8%, Bam HI 및 Hind III는 1%, Pst I은 1.2% agarose gel (15×20 cm)을 만들어 35mA 60V로 10시간 영동하였다. 분자량 측정을 위해 매번의 전기영동마다 제한효소 처리된 lambda DNA를 같이 영동하였다.

### 성 적

Table 1은 1984년 및 1985년에 분리된 107주의 *S. flexneri*와 32주의 *S. sonnei*의 12종의 항균제에 대한 MIC 및 내성빈도를 균종별로 정리한 것이다.

*Shigella*는 Gm과 Ak등에 전균주가, Km에는 대부분이 감수성이어서 대부분의 aminoglycoside항균제에 감수성이었다. Cl에도 전부가 감수성이었다.

균종별로 보면 *S. flexneri*는 Ap에 대하여 93.5%가 내성이었고 MIC<sub>90</sub>은 512μg/ml로 *S. sonnei*의 내성빈도인 6.3%나 MIC<sub>90</sub>인 2μg/ml보다 현저히 높은 내성빈도 및 MIC를 나타내었다. *S. flexneri*는 Na에 대해서도 *S. sonnei* 보다 높은 MIC의 분포를 보였으며, Km에 대한 내성주도 6주 (5.6%)

**Table 3.** The distribution of molecular weights of plasmid molecules from *Shigella species*<sup>a</sup>

Range of molecular weight of plasmid	No. of plasmids (No. of strains)			Total
	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>	
100-140	28(27)	-	1(1)	29(28)
80-<100	16(14)	1(1)	10(9)	27(24)
70-<80	6(6)	-	-	6(6)
60-<70	22(22)	-	5(5)	27(27)
50-<60	16(16)	-	2(2)	18(18)
40-<50	6(6)	-	6(5)	12(11)
30-<40	3(3)	-	3(3)	6(6)
20-<30	2(2)	-	2(2)	4(4)
10-<20	2(2)	-	1(1)	3(3)
8-<10	-	-	-	-
7-<8	-	-	1(1)	1(1)
6-<7	-	-	1(1)	1(1)
5-<6	1(1)	-	3(3)	4(4)
4-<5	4(3)	1(1)	-	5(4)
3-<4	15(13)	-	15(12)	30(25)
2-<3	77(58)	2(1)	9(9)	88(68)
1-<2	46(42)	1(1)	5(5)	52(48)

<sup>a</sup>A total of 78 strains of *Shigella*; 63 of *S. flexneri*, 1 of *S. boydii*, and 14 of *S. sonnei* were tested.

**Table 4.** Drug resistance patterns and plasmid profiles of *Shigella*

Resistance pattern	Species	No. of strains	No. of plasmids		Range of molecular weight of plasmids
			Mean	Range	
CmTcSmSuApTpKm <sup>a</sup>	B	12	4.3	3-6	126 <sup>b</sup> -1.4
	D	4	7	6-8	94-1.6
CmTcSmSuApTp	B	25	4.3	2-7	134-1.5
	D	2	4	3-5	92-1.8
CmTcSmSuTpKm CmTcSmSuAp	B	1	4		117-1.8
	B	7	3.3	2-4	100-1.4
	C	1	5		99-1.4
CmTcSmSuTp	D	1	4		106-2.7
	B	1	3		113-2.3
	D	7	3.3	2-4	97-1.5
CmTcSmAp	B	11	3.4	2-5	113-1.6
CmTcSu	B	5	4	4	100-1.3
CmSmAp	B	1	3		2.9-2.0
Total	B	63	3.9	2-7	134-1.3
	C	1	5		99-1.4
	D	14	4.5	2-8	106-1.5

<sup>a</sup>Abbreviations: see text

<sup>b</sup>Megadalton

있었다.

Su에 대한 내성빈도는 *S. flexneri* 중 72%가 내성이었고, *S. sonnei*는 전 균주가 내성이었으며 Tp에 대해서도 *S. flexneri* 중 47.7%가 내성인 반면

*S. sonnei*는 93.8%가 내성으로 sulfa제에 대해서는 *S. sonnei*가 *S. flexneri*보다 내성빈도가 높았다. Rf에 대한 내성빈도는 *S. flexneri*가 1.9%, *S. sonnei*가 3.1%로써 비교적 낮았으며, MIC<sub>50</sub>도 ami-

noglycoside계 항균제와 Cl과도 비슷한 수준으로 낮았다.

Table 2는 분리된 *Shigella*의 항균제 내성양상과 접합에 의해 전달된 내성양상 및 plasmid의 비적합성군 분류성적을 정리한 것이다.

항균제 내성유형을 보면 *S. flexneri*는 CmTcSmSuApTpNa, CmTcSmSuApTp, CmTcSmSuAp 및 CmTcSmAp 내성형이 각 20~27주로서 이들 4가지 내성유형을 합한 것이 *S. flexneri*의 85%를 차지한다. 반면 *S. sonnei*는 CmTcSmSuTp 내성형이 24주(75%)로 대부분을 차지하였다.

접합에 의한 내성전달빈도를 보면 *S. flexneri*는 내성주 106주중 50주(47%)로서 *S. sonnei*의 32주중 24주(75%)보다 내성전달빈도가 낮았는데, *S. flexneri*중 CmTcSmSuApTpNa 내성형은 전 균주에서 내성전달을 볼 수 있었는데 CmTcSmAp 내성형은 내성이 전달되지 않았다. 전달된 내성의 유형은 원래 *Shigella*가 지닌 내성의 전부 또는 일부로 다양하였는데 Na와 Rf의 내성은 전달이 되지 않으므로 염색체성 내성이었다.

비적합성군 분류성적을 보면 비적합성군 분류가

가능하였던 84년 및 85년도 분리주 유래의 plasmid는 전부가 FII였으며, Km내성이 있는 plasmid 6개는 전부가 분류불능에 속하였다.

Table 3에는 *Shigella*에서 분리된 plasmid의 크기를 균종별로 정리하였으며, Table 4에는 *Shigella*가 보유한 plasmid의 수 및 크기를 항균제 내성 유형별로 정리하였다.

*Shigella*는 1.3~134 Mdal 크기의 plasmid를 2~8개 보유하고 있었는데 8개의 plasmid를 보유한 균주는 CmTcSmSuApTpKm 내성의 *S. sonnei*였다. 보유한 plasmid의 수는 균종별로는 큰 차이가 없었는데 *S. flexneri*는 평균 3.9개, *S. sonnei*는 평균 4.5개였다.

Plasmid의 크기를 보면 *S. flexneri*는 27주(43%)가 100 Mdal 이상의 거대 plasmid를 보유하고 있었으며, 58주(92%)가 2.0~2.9 Mdal의 plasmid를 1개 이상 보유한 반면 *S. sonnei*는 실험한 14주중 9주가 80~100 Mdal의 plasmid를 보유하고 있었다. *S. sonnei*는 실험한 14주중 12주(86%)가 3.0~3.9 Mdal의 plasmid를 보유하고 있었으며, 9주가 2.0~2.9 Mdal plasmid를 보유하고 있었다.

Table 5. Conjugally transferable plasmids of *Shigella*

Resistance pattern	Inc group	Molecular weight	Species	No. of plasmids identified
CmTcSmSuApTpKm	FI <sup>a</sup>	87 <sup>b</sup>	B	1
	FI <sup>c</sup>	87	D	4
TcSuSmApTpKm	UC <sup>c</sup>	63	B	1
CmTcSmSuApTp	FII	54	B	6
	FII	59	A	1
CmTcSmSuAp	FII	59	B	2
	FII	59	B	6
CmTcSmSuTp	FII	59	B	6
	FII	59	D	1
CmTcSmSuKm	UC	120	B	1
	UC	68	B	1
SmSuApTp	UC	68	B	1
	UC	68	B	1
SmSuTpKm	UC	54	B	1
	UC	40	D	3
SmSuApKm	UC	68	B	1
	UC	68	D	1
CmTcSmSu	FII	55	B	2
	B <sup>a</sup>	60	B	3
	FII	55	D	2
TcSmSu	UC	64	B	1
ApKm	UC	55	B	2
Km	UC	48	B	1
	UC	48	D	3

<sup>a</sup>Strains harboring Inc FI plasmid were isolated in 1983 and Inc B plasmids in 1979 and 1980.

<sup>b</sup>Megadalton.

<sup>c</sup>Unclassified.

**Fig. 1.** Restriction endonuclease analysis profile of plasmid of *Shigella* (digested with EcoRI, 0.8% agarose gel electrophoresis, 35mA, 60V, 10 hours).

Lane	Plasmid	Inc group	Origin	Resistance marker
1	pKY5209	FII	<i>S. flexneri</i>	CmTcSmSuApTp
2	pKY5205	FII	<i>S. flexneri</i>	CmTcSmSuApTp
3	pKY9203	FII	<i>S. flexneri</i>	CmTcSmSuTp
4	pKY9405	FII	<i>S. sonnei</i>	CmTcSmSuTp
5	pKY10201	FII	<i>S. flexneri</i>	CmTcSmSuAp
6	pKY17205	B	<i>S. flexneri</i>	CmTcSmSu
7	pKY17206	FII	<i>S. flexneri</i>	CmTcSmSu
8	pKY17411	FII	<i>S. sonnei</i>	CmTcSmSu
C	control, lambda DNA.			

내성유형과 plasmid profile 과의 관계를 보면 (Table 4) 5가지 이상의 항균제에 내성인 균주들은 대부분 30 Mdal 이상의 plasmid 들을 2개이상 보유하고 있는데 비해, 4가지 또는 3가지 항균제에 내성인 균주들은 대부분이 저대 plasmid 들이 없거나 1개만을 보유하고 있었다. 특히 *S. flexneri*의 내성유형 중 가장 많은 빈도를 나타낸 CmTcSmAp 내성형 11주 중 4주에서만 30 Mdal 이상의 plasmid 가 있었으나 나머지 7주는 모두 2.4 Mdal, 2.0 Mdal 및 1.8 Mdal 의 3개가 적은 크기의 plasmid 를 가진 동일한 plasmid profile 을 나타내었다.

Table 5는 피전달균 *E. coli* K-12인 ML1410 및 RG 488로 접합에 의해 전달된 plasmid 들을 내성유

형별로 비적합성균과 분자량의 성적을 정리하였다.

접합에 의해 전달된 plasmid 들의 내성유형은 Km 단제 내성인 것부터 CmTcSmSuApTpKm 의 7개의 항균제에 중복내성인 것 등으로 내성양상이 다양하였다. R plasmid 들의 크기는 대부분 40~70 Mdal 이었으나 예외로 120 Mdal, 87 Mdal 의 저대 plasmid 도 있었는데 120 Mdal 은 비적합성균 분류불능이었다.

*Shigella*에서 유래된 plasmid 의 비적합성균의 종류는 FI, FII 및 B군등이었는데 대부분의 plasmid 가 FII 비적합성균이었으며 그 크기는 54~59 Mdal 이었다. B 비적합성균으로 분류된 plasmid 는 1979년 및 1980년에 분리된 *S. flexneri* 유래로서 Cm



**Table 6.** Characteristics of plasmids transferred by transformation<sup>a</sup>

Phenotypes	Molecular weight (megadalton)	Species	No. of plasmids identified
TcSmSuApTpKm	27 and 20 <sup>b</sup>	B	1
CmSmSuTp	54	D	1
SmSuTpKm	16, 18	D	2
SmSuTp Col	13 and 3.7	D	1
TcApKm	22 and 14	B	1
SmSuAp Col	7.2 and 3.9	D	1
SmSuAp	7.2	D	1
ApKm	14	B	1
SmSu Col	3.9 and 3.7	D	1
SmSu	3.9	B	1
	3.9	C	1
	3.9	D	3
	10	D	1
SmAp	7.2	B	1
Sm	3.9	B	1
Km Col	13	D	1
Km	11, 41, 48 <sup>c</sup>	D	3
Ap Col	4.6 and 3.7	D	1
	7.2	D	1
Ap	5.5	B	1
	6.4	D	2

<sup>a</sup>Host strain was *E. coli* C, r<sup>-</sup>, m<sup>-</sup>, lac<sup>+</sup>, and rifampin<sup>r</sup>.

<sup>b</sup>Transformation *E. coli* C carried two plasmids.

<sup>c</sup>Forty-eight megadalton plasmid was also transferred by conjugation.

TcSmSu 내성이었다. *S. dysenteriae* 유래의 CmTc SmSuAp 내성인 plasmid 역시 59 Mdal 으로 FII 비적합성군이였다. Km 내성을 띤 plasmid 들은 87 Mdal 의 CmTcSmSuApTpKm 이 FI 비적합성군으로 분류되었을 뿐 나머지는 모두 비적합성군 분류불능이였다.

FII 비적합성군은 CmTc 어느 하나의 내성과 밀접한 관계가 있다. 단 2개의 FII 군 plasmid 를 제외하고는 CmTc 동시내성과 비적합성군 분류성적이 일치하므로 비적합성군 유전자(*Inc locus*)는 CmTc 내성결정유전자(resistant determinant)와 인접해 있는 것으로 나타났다.

Fig. 1 은 restriction endonuclease analysis 성적을 정리한 것이다. 비적합성군이 확인된 plasmid 를 EcoRI 제한효소로 처리하여 agarose gel electrophoresis 를 실시한 결과 plasmid 가 유래한 균종이나 내성형과는 무관하였고, 단지 비적합성군에 따른 분획상의 차이를 발견할 수 있었다. 비적합성군 FII 와 B 군의 plasmid 의 분획상은 현저하게 다르지만 같은 FII 군에 속하는 plasmid 들은 분획상이 유사 내지 동일함을 발견할 수 있었다. 비적합성군 B

plasmid 에는 없는 14 kilobase (kb) 및 9.4 kb 크기의 분획이 FII 비적합성군의 plasmid 에서는 발견되었다.

Table 6 은 *E. coli* C 군으로 transformation 에 의해 전달된 plasmid 들을 내성유형별로 plasmid 의 분자량과 그 유래균종을 나타낸 것이다.

Transformation 으로 전달된 대부분의 plasmid 들은 Ap, Km 또는 Sm 등의 단약제내성 및 SmAp, SmSu, ApKm 등 2제 내성을 나타내었다. SmSu 내성의 plasmid 는 *S. flexneri*, *S. boydii* 및 *S. sonnei* 에서 공통적으로 발견되었으며 그 크기는 3.9 Mdal 이었다.

Km 내성 plasmid 는 11~48 Mdal 이었는데 48 Mdal 의 plasmid 는 접합에 의해서도 전달가능한 것이었다. 내성유형은 같아도 plasmid 의 크기가 다른 경우가 있었다. SmSu 내성의 plasmid 는 크기가 3.9 Mdal 인 것과 10 Mdal 인 것으로 크기가 서로 다른 두 가지 plasmid 였다. 크기가 각각 다른 16 또는 18 Mdal 의 두개의 plasmid 들은 SmSuTpKm 의 동일한 내성을 가지고 있었다. Ap 내성 plasmid 는 *S. flexneri* 에서는 5.5 Mdal, *S. sonnei* 에서는 6.4 Mdal 으

**Table 7.** Spontaneous loss of resistance marker of transformant *E. coli* C<sup>a</sup>

Origin		Resistance pattern of transformant	Resistance marker lost <sup>b</sup>
<i>Shigella flexneri</i>	84DH80	Tc Sm Su Ap Km Tp <sup>c</sup>	Tc(200/200) Sm(200/200) Su(200/200) Ap(200/200) Km(200/200) Tp(200/200)
		Tc Ap Km	Tc(216/258) Ap(192/258) Km(193/258)
		Ap	None(0/200)
<i>Shigella sonnei</i>	83DH128	Sm Su Ap	None(0/200)
		SmSu	None(0/200)
		Ap	None(0/200)
		Km	None(0/200)
<i>Shigella sonnei</i>	83DH138	Sm Su Km Tp	Sm(3/200) Su(3/200) Km(3/200) Tp(3/200)
		Sm Su	None(0/200)
		Ap	None(0/200)
		Km	None(0/200)

<sup>a</sup>Subcultured daily during 5 days.

<sup>b</sup>Number of susceptible colonies per number of colonies tested.

<sup>c</sup>Abbreviations: see text.

**Table 8.** Restriction endonuclease analysis of ampicillin resistant plasmids

Plasmid No.	Origin	Molecular weight	Fragments generated by <sup>a</sup>	
			Pst 1	Pst 1 and EcoRI
pKY 9201	<i>S. flexneri</i>	8.4	4.9	4.9
			2.8	2.8
			0.7	0.7
pKY 9402	<i>S. sonnei</i>	9.8	6.3	5.3
			2.8	2.8
			0.7	0.9
				0.7
				(0.1)
pKY 9052	<i>E. coli</i>	7.5	4.0	4.0
			2.8	2.8
			0.7	0.7

<sup>a</sup>Relative molecular size of fragments was determined by lambda Pst 1 fragments. Fragments smaller than 0.5 kilobase were unable to detect. No site for Bam HI and Hind III.

<sup>b</sup>Kilobase.

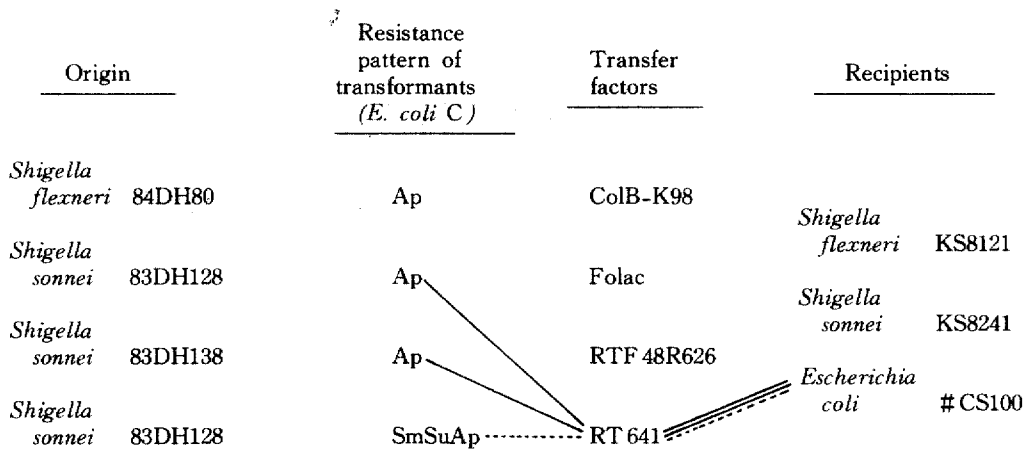
로 내성 양상은 같으나 유래균종에 따라서 크기가 달랐다.

Colicin 산생능이 있는 plasmid들은 *S. sonnei*에서만 발견되었다. Km내성을 가지고 있으면서 colicin 산생능이 있는 13 Mdal의 plasmid를 제외하고는 colicin 산생능이 있는 plasmid들은 크기가 3.9M dal이나 3.7 Mdal으로서 이들 plasmid가 colicin 산생 plasmid(Col plasmid)임이 transformation으로 확인되었다.

Table 7은 transformation에 의해 전달된 *Shig-*

*ella* 유래의 plasmid들이 대장균에서 안정하게 유지되는가를 내성의 지속여부로서 조사하였다. *S. flexneri* 유래의 TcSmSuApKmTp내성의 plasmid는 피 전달균인 *E. coli* C에서 안정하게 유지되지 못하고 모두 소실되었다. 그러나 Ap내성의 plasmid는 균종에 관계없이 모두 안정하게 유지되었으며, *S. sonnei* 유래의 Km이나 SmSu내성 plasmid 역시 대장균에서 안정하게 유지되었다.

Fig. 2는 transformation에 의해 전달된 plasmid 중에서 집합에 의해서는 전달이 불가능한 plasmid



**Fig. 2.** Mobilization of nonconjugative plasmid of transformants by using various transfer factors and recipients. Solid line, mobilized; broken line, only ampicillin-resistance marker was mobilized.

**Table 9.** Restriction endonuclease analysis of streptomycin and sulfisomidine resistant plasmids

Plasmid No.	Origin	Molecular weight	Fragments generated by	
			Pst 1	EcoRI
pKY 9225	<i>S. flexneri</i>	6.0 <sup>b</sup>	3.1 2.9	6.0
pKY 9327	<i>S. boydii</i>	6.0	3.1 2.9	6.0
pKY 9437	<i>S. sonnei</i>	6.0	3.1 2.9	6.0
pKY 9417	<i>S. sonnei</i>	6.0	3.1 2.9	6.0

<sup>a</sup>Relative molecular size of fragments was determined by lambda Pst 1 fragments. No. site for Bam HI and Hind III.

<sup>b</sup>Kilobase.

를 선택하여 각종의 transfer factor를 사용하여 가동화시킨 성적이다. *S. flexneri* 유래의 plasmid는 가동화 되지 않았으며, *S. sonnei* 유래의 plasmid만이 가동화되었는데 이때 전달된 것은 Ap내성 뿐이었고, SmSu내성은 탈락되었다.

가동화에 사용된 plasmid는 F III 비적합성균의 Col B-K98, F IV 균의 Folac 및 transfer factor인 RTF 48 R 626과 RT641 등이었는데 RT641에 의해서만 가동화되었다. 이때도 피전달균은 *E. coli* #CS100일때만 가능하였고, 피전달균이 *Shigella*였을 때는 가동화되지 않았다.

Table 8은 *Shigella* 및 대장균유래의 Ap 내성인 3개의 plasmid에 제한효소를 처리한 성적이다.

3개의 plasmid 모두 Pst 1에 의해 3개의 분획으로 전달되었으며 2.8kb, 0.7kb의 분획은 3개의 plasmid에서의 공통소절이었다. Pst 1과 EcoRI를 같이 처리한 결과 *S. flexneri* 및 대장균 유래의 plasmid는 Pst 1으로 처리했을 때와 같았으나 *S. son-*

*nei* 유래의 pKY9402는 6.3kb의 분획에 EcoRI의 인식부위가 있어 5.3kb 및 0.9kb의 두개의 분획으로 전달되었는데 부족한 0.1kb의 절편은 영동시 확인할 수 없었다.

3개의 plasmid 모두 BamHI 및 HindIII의 인식부위는 없었다.

Table 9는 *S. flexneri*, *S. boydii* 및 *S. sonnei* 유래의 plasmid들로서 SmSu에 동일한 내성을 가지고 있으며, 크기 역시 6.0kb로 같은 4개의 plasmid를 제한효소 처리한 성적이다.

Pst I에는 3.1kb 및 2.9kb의 2개의 분획을 나타내었으며 EcoRI의 인식부위는 1개 뿐이었다. Ap내성의 plasmid와 마찬가지로 BamHI 및 Hind III 인식부위는 없었다.

Table 10에서는 colicin 산생능과 내성양상도 Cm TcSmSuApTpKm에 내성을 나타내는, 즉 유전적 표현형이 동일한 3주의 *S. sonnei*의 plasmid profile 성적을 비교하였고, 접합 혹은 transformation

**Table 10.** Original and transferred resistance pattern and plasmid profiles of *Shigella sonnei*<sup>a</sup>

Strain No.	No. (MW) of plasmid	No. (MW) of plasmids transferred	Plasmid No.	Resistance pattern transferred	Inc group
83DH 110	6 (87, 45, 40, 3.9, 3.7, 1.6) <sup>b</sup>	1 (87)	pKY 0142	CmTcSmSuApTpKm	F I
		1 (40)	pKY 1442	SmSuTpKm	UC
		1 (49)	pKY 0142S2	SmSuApTpKm	UC
		1* (3.9)	pKY 9431	SmSu	UC
83DH 128	7 (87, 48, 38, 5.7, 3.9, 3.7, 1.6)	1 (87)	pKY 0144	CmTcSmSuApTpKm	F I
		1 (38)	pKY 1443	SmSuTpKm	UC
		1 (48)	pKY 2347	Km	UC
		1 (87)	pKY 0144S1	CmSmSuApTpKm	F I
		1 (69)	pKY 0144S2	SmSuApTpKm	UC
		1 (57)	pKY 0144S4	Ap	F I
		1 (57)	pKY 0144S5	Tc	F I
		1* (3.9)	pKY 9405	SmSu	UC
		1* (48)	pKY 9408	Km	UC
		1* (7.2)	pKY 9409	Ap Col	UC
		1* (6.4)	pKY 9402	Ap	UC
83DH 138	8 (94, 87, 48, 38, 5.7, 3.9, 3.7, 1.6)	1 (87)	pKY 0145	CmTcSmSuApTpKm	F I
		1 (38)	pKY 1444	SmSuTpKm	UC
		1 (48)	pKY 2348	Km	UC
		1 (38)	pKY 0145S1	SmSuTp	UC
		1 (87)	pKY 0145S2	CmSmSuApTpKm	F I
		1 (70)	pKY 0145S3	Tc	F I
		1 (70)	pKY 0145S4	Ap	F I
		1* (16)	pKY 9415	SmSuTpKm	UC
		1* (18)	pKY 9416	SmSuTpKm	UC
		1* (13)	pKY 9410	Km Col	UC
		2* (3.9, 3.7)	pKY 9406	SmSu Col	UC
		1* (3.9)	pKY 9417	SmSu	UC
		2* (4.6, 3.7)	pKY 9407	Ap Col	UC
		1* (6.4)	pKY 9404	Ap	UC

<sup>a</sup>Characteristics of strains: CmTcSmSuApTpKm Col.

<sup>b</sup>Megadalton.

\* Transferred by transformation.

으로 내성전달이 가능하였던 plasmid들의 비적합성군을 정리하였다.

83DH 110은 6개의 plasmid를 보유하고 있었는데 83DH 128은 이것 외에 5.7 Mdal의 plasmid를, 83DH 138은 5.7 Mdal 및 9.4 Mdal의 plasmid를 보유하고 있었다.

87 Mdal의 plasmid는 접합에 의해 전달가능한 것으로 CmTcSmSuApTpKm내성이었으며 FI 비적합성군으로 분류되었고, 3주 모두에서 발견되었다. SmSuTpKm내성의 plasmid는 83DH 110에서는 40 Mdal이었고, 83DH 128 및 83DH 138에서는 38 Mdal이었다.

48 Mdal의 Km내성 plasmid는 83DH 128 및 83DH 138에서 발견되었는데 비적합성군은 분류불능이었다. 83DH 128에서는 transformation에 의해서도 동일한 크기(48 Mdal)의 plasmid 전달이 확인되

었다. 3.9 Mdal의 SmSu내성 plasmid는 3주 모두에서 transformation에 의해서만 전달되었으며, 역시 transformation에 의해서만 전달되는 6.4 Mdal의 Ap내성 plasmid는 83DH 128과 83DH 138 2주에서 관찰되었다.

Fig. 3은 83DH 110, 83DH 128 및 83DH 138 유래의 plasmid에 EcoRI를 처리한 다음 agarose 전기영동을 실시한 결과를 나타낸 것이다. 32~87 Mdal의 plasmid들은 4~17개의 분획으로 절단되었다. 87 Mdal의 pKY 0142, pKY 0144 및 pKY 0145는 17개의 분획으로 동일한 절단양상이었으며, 같은 크기의 FI 비적합성군으로 분류된 pKY 0144 S2와 pKY 0145 S2도 유사한 절단양상을 나타내었다. 40 Mdal의 pKY 1442, 38 Mdal의 pKY 1443 및 pKY 1444 그리고 38 Mdal의 pKY 0145 S1은 4개의 분획을 보인 비슷한 절단양상이었다.

**Fig. 3.** Restriction endonuclease analysis profile of *Shigella sonnei* (digested with EcoRI, 0.8% agarose gel electrophoresis, 35mA, 60V, 10 hours). 1. pKY0145S4, 2. pKY0145S3, 3. pKY0145S2, 4. pKY2348, 5. pKY0145S1, 6. pKY1444, 7. pKY0145, 8. pKY0144, 9. pKY1443, 10. pKY2347, 11. pKY0144S1, 12. pKY0144S2, 13. pKY0144S3, 14. pKY0144S4, 15. pKY0144S5, 16. pKY0142, 17. pKY1442. C. control, lambda DNA.

비적합성균의 분류성적과 절단양상을 보면 FI 비적합성균으로 분류된 plasmid들에서는 12kb, 11kb 및 9.5kb의 3개의 분획과 10kb 근처의 2개의 분획 등 도합 5개의 분획이 있었으나 비적합성균 분류불능의 plasmid에서는 관찰되지 않았다.

## 고 찰

중남미지역에서 1970년대 초에 이질의 대유행이 발생<sup>55, 60</sup> 하여 수만명이 사망한 이후 최근까지 이질의 집단발생은 Bangladesh<sup>60</sup> 나, Central Africa<sup>23, 26, 29</sup>에서 토착화된 양상으로 일어나며 그 규모도 작고 산발적이다. 아직도 개도국에서는 이질이 심각한 장내 전염병이나<sup>61</sup>, 선진국에서는 발병빈도가 감소하였고 그 원인균도 *Shigella dysenteriae* type 1에 의한 보고는 없고 *S. flexneri*가 소수를 차지하며 *S. sonnei*가 상대적으로 증가하고 있다<sup>13, 15, 70</sup>. 우리나라에서는 아직 *S. flexneri*가 주종을 이루고 있으나 점차 *S. sonnei*가 증가하고 있다<sup>2, 9</sup>.

일반적으로 균의 항균제에 대한 내성은 항균제의 사용빈도를 반영하므로<sup>62</sup> *Shigella*의 내성양상도 지역적으로나 년도별로 차이가 있게 마련이다. 내성균의 만연은 전 세계적인 문제이지만 우리나라는 특히 항균제 남·오용의 정도가 크므로 더욱 심각한 문제를 야기시키고 있다<sup>3</sup>.

영국의 England 및 Wales 지방의 예<sup>32</sup>에서 *S. dysenteriae*, *S. flexneri* 및 *S. boydii*의 1974년에서

1982년까지 분리된 균주의 내성양상을 보면 Ap 내성균의 빈도가 1974년 2%에서 1982년에는 51%로 Cm 내성균은 2.6%에서 48%로, Tc 내성균은 15%에서 63%로 증가하였는데 Ap 내성균에 유효한 것으로 알려진 Tp에도 내성균이 0.3%에서 9.9%로 증가하였다. 기타 지역에서도 다약제 내성 *Shigella*에 대한 보고<sup>34, 44, 60</sup>가 있었다. Bangladesh의 경우<sup>61</sup> Ap 및 Tp-sulfamethoxazole 사용량의 증가와 비례한 내성균의 발생빈도는 항균제 남용의 좋은 예가 된다.

국내의 경우도 설등<sup>5</sup>의 보고에 의하면 90% 이상의 균주가 CmTcSmSu 등에 중복내성이며, 대부분이 다제 내성균이었다. 84년 및 85년 분리주의 Tp 내성빈도는 57%로서 81년 및 82년의 90% 이상의 내성빈도<sup>2, 5, 10</sup> 보다 많이 감소된 경향을 보였다. Su에 대해서도 84년 및 85년 분리주는 77%가 내성으로서 그 빈도가 감소되었으며 이러한 현상은 sulfonamide계 항균제의 사용감소에 기인된 것이라 생각된다.

Meyers 등<sup>49</sup>은 70년대 미국 Omaha에서 분리된 *Shigella*는 Ap에 대한 내성빈도가 처음에는 증가되었다가 감소하는 현상을 보고한 바 있는데 같은 기간동안 Ap 사용량에는 큰 변화가 없었다고 한다. 이것은 특정의 항균제 사용이 일시적으로 증가나 감소되었다고 해서 내성빈도가 민감하게 일치하지는 않는다는 견해이다.

Ap에 대해서 *S. flexneri*는 93.5%가 내성이나

*S. sonnei*는 6.3%가 내성으로 *S. flexneri*가 Ap에 월등히 높은 내성을 나타내었는데 이것은 국내의 여러 보고들<sup>2, 6, 10</sup>과는 일치하나, 외국의 보고들<sup>15, 16, 44</sup>과는 상반된 결과이다. Neu 등<sup>52</sup>은 특히 Ap에 대한 내성은 지역적인 차이가 크다고 보고하였다.

1940년대 *Shigella*에 유효한 항균제로 사용되기 시작한 sulfonamide계 항균제는 내성균의 출현으로 1950년대에는 사용되지 않았으며 Cm, Tc, Sm 등이 등장하게 되었다. 1952년에 들어 TcSmSu에 내성을 띤 다약제 내성균이 출현하게 되었으며, 1960년대에 분리된 내성균중 90% 이상이 다약제 내성균이었다<sup>50</sup>. 1984년과 1985년에 분리한 균주중 감수성균주는 1주 뿐이었으며 내성균주들도 Su 단약제 내성인 균주는 1주 있었을 뿐 모두가 3가지 이상의 항균제에 내성이었다.

전달성 R plasmid 보유주는 전체의 53%였는데 Chun 등<sup>19</sup>, 설 등<sup>5</sup>, 서 등<sup>2</sup>의 성적인 71~75% 보다는 낮았다.

*Shigella*의 내성의 특징은 R plasmid에 의한 전달성 내성이다<sup>18, 19</sup>. R plasmid의 내성양상도 *Shigella*는 기타의 장내세균과는 달리 소수 종류의 유형으로 대별된다. 예를 들어 *S. flexneri*의 R plasmid는 CmTcSmSuApTp 내성이 대부분이고 *S. sonnei*는 CmTcSmSuTp 내성형이 가장 많다. 84년 및 85년 분리주에서 빈도가 증가한 CmTcSmAp 내성의 *Shigella*는 그 내성이 접합에 의해 전달되는 것이 아니며, 균체로부터 plasmid를 추출하여 영동해 본 결과 대부분의 균주가 작은 크기의 2.4Mdal 이하의 plasmid만을 보유하고 있음이 확인되었다. 이 작은 plasmid는 접합에 의한 자가전달능력이 없는 종류들이다.

구미제국에서 발생한 이질은 원인균이 자국에 토착화 되어있는 것이 아니고 외국, 특히 이질이 빈번히 발생하는 개도국에 다녀온 여행객이 전파시킨, 즉 유입된 *Shigella*가 원인균이라고 대체로 보고하고 있다<sup>32</sup>. 선진국이라는 체면이 이러한 견해의 근거를 이루고 있기 때문이다. 따라서 이질의 원인균을 종래의 방법인 혈청학적, 생물학적으로 균종을 규명한다는 것은 결정적인 역학자료가 되지 못한다. 최근에는 첨단기술인 분자생물학적 방법으로 조사하는 molecular epidemiology가 소개되어 있다<sup>37</sup>. *Shigella*가 가지고 있는 plasmid의 분자적 특성이나 유전적내용을 조사하면 같은 균종이라도 상이한 다양한 양상으로 나타난다. 이 점을 이용한 것이 전술한 분자생물학적 역학이다. 우선 plasmid의 유전적내용을 조사하는 방법과 분자적 특성을 규명하는 두가지로 대별할 수 있다<sup>8</sup>.

Plasmid들은 phylogenetic relationship이 동일하면 두개의 plasmid가 같은 균체내에서 안정된 공존을 할 수가 없어서 상호 배제하는 현상이 비적합성이다. 이를 이용하여 plasmid를 여러 종류의 비적합성군으로 분류할 수 있다. 같은 서식환경에서 유래된 균들은 균종이 달라도 균체로부터 plasmid를 추출하여 전기영동하면 유사한 양상으로 나타나기 때문에 이질균의 유래를 추적하는데 편리한 finger printing이 될 수 있다. 본 실험의 Table 10의 성적을 예를 들면 같은 해에 분리된 동종의 *Shigella*로서 내성양상이 같고, colicin 산생등 유전적 특성도 동일하지만 plasmid profile을 비교하여서 각각의 균주의 특성을 파악해 두면 역학적인 중요단서가 된다.

이질이 발생한 지역에서 분리된 *Shigella* R plasmid의 비적합성군 분류에 관한 보고를 보면 1970년대 초 미주지역에서 대유행한 *Shigella*의 plasmid는 B군이었으며<sup>21, 46</sup>, 아시아나 중앙아프리카 등지에서 분리된 *Shigella* plasmid는 F군 및 B군등인데<sup>8, 21</sup>, 아시아 지역에서는 FII군이 가장 많다<sup>43</sup>. 우리나라에서 분리된 *Shigella* plasmid의 비적합성군은 FII군 이외에 1979년 및 1980년에는 B군이 확인되었고, 1983년에는 FI군이 발견되었으나 84년 이후 전부가 FII군이였다.

Plasmid는 비적합성군에 따라 다른 숙주역을 가지는데<sup>22</sup> *Salmonella*의 경우 H 비적합성군이 많으며<sup>1, 21</sup>, N군, P군등은 기타의 장내세균에 나타날 수 있는데 설 등<sup>5</sup>, 이 등<sup>7</sup>은 대장균 및 *Enterobacter*에서 N군의 plasmid를 보고한 바 있다.

CmTcSmSuApTpKm 내성인 plasmid만이 FI 비적합성군으로 분류되었는데, 설 등<sup>5</sup>은 돼지에서 분리된 대장균이 가지고 있는 CmTcSmSuApTpKm 내성의 plasmid가 사람 유래균과 동일한 FI군이였다고 보고한적이 있다. Km 내성이 포함된 plasmid는 FI군을 제외하고는 모두 형별불능이었는데 Km 내성만이 한개의 약제로 독립해서 존재하는 경우가 많아 transposon과 유사하였다.

*Shigella*의 plasmid profile을 보면 2~8개의 plasmid가 관찰되는데 Crosa 등<sup>20</sup>은 5~7개, Jamieson 등<sup>37</sup>은 6~10개, Tacket 등<sup>45</sup>은 1~8개 등으로 지역에 따라 다소 차이가 있었다. 그러나 균종별 차이는 확인할 수 없었다. Plasmid의 크기는 대부분 1~4Mdal의 작은 plasmid와 40~120Mdal의 큰 plasmid의 2군으로 분류되었는데 Kopecko 등<sup>41</sup>은 100Mdal 이상의 plasmid가 virulence에 관여한다고 보고하였다. 본 실험에서는 *S. flexneri*의 43%인 27주가 100Mdal 이상의 큰 plasmid를 보유하고 있

있으며 비적합성군 분류가 불가능하였다.

비적합성군 분류가 가능하였던 plasmid는 대부분이 40~70 Mdal의 크기였으며, FI군으로 분류된 plasmid는 87 Mdal이었다.

Jamieson 등<sup>37)</sup>은 *S. sonnei*는 접합에 의해 전달되지 않는(이하 비전달성) 작은 크기의 plasmid들을 가지고 있으며, 유전내용은 미상이라고 보고하였다. 이러한 plasmid들은 *Bacillus*, *Neisseria*<sup>47)</sup>, *Pseudomonas*<sup>48)</sup> 및 기타 장내세균에서도 발견된다<sup>49)</sup>고 하는데 본 실험에 사용한 거의 대부분의 균주가 5 Mdal 이하의 plasmid를 보유하고 있었는데, *S. flexneri*는 92%의 균주가 2~3 Mdal의 plasmid를 보유하고 있었으며, *S. sonnei*는 대부분 3~4 Mdal의 plasmid를 보유하고 있었다.

작은 크기의 plasmid 중에서도 R plasmid가 있는지를 확인하기 위해 transformation을 실시한 결과 3.7~54 Mdal의 plasmid가 R plasmid였는데 transformation으로 전달된 plasmid들의 크기는 대부분 10 Mdal 미만이었다. Hanahan<sup>23)</sup>은 1.3~44 Mdal의 크기를 지닌 DNA의 transformation의 빈도를 관찰한 결과 transformation이 불가능한 결정적인 크기는 없으나 plasmid의 크기가 클수록 빈도는 낮아진다고 하였다. Transformation으로 전달된 내성양상은 다양하였으며, colicin 생성능의 전달도 관찰되었다.

SmSu 내성의 비전달성 plasmid들은 장내 세균의 여러종에 존재하며 3.5~9.5 Mdal의 크기를 가지는 것으로 보고되어 있는데<sup>11, 37, 39, 51, 53)</sup> 본 실험에서는 3.9~10 Mdal 크기의 SmSu 내성 plasmid를 확인할 수 있었는데 *S. flexneri*, *S. boydii* 및 *S. sonnei*의 3군 모두에서 발견되었고 동일한 제한효소절단분획을 나타내었다.

Crosa 등<sup>20)</sup>은 집단적으로 발생한 *S. dysenteriae* type 1에서 공통적으로 5.5 Mdal의 plasmid가 존재하며, 다른 장내세균에서 발견되는 Ap 내성 plasmid들과 유사성이 있다고 보고하였는데 본 실험에서는 *S. flexneri* 및 *S. sonnei* 유래의 Ap 내성 plasmid와 대장균유래의 plasmid에 Pst I 제한효소처리한 결과 3개의 분획중 2개는 같은 것이었다.

Transformation으로 전달된 Ap 내성 plasmid는 접합에 의해 전달되지 않아 transfer factor를 써서 가동화를 시도하였는데 *S. sonnei* 유래의 Ap 내성만이 RT 641에 의해 *E. coli* # CS 100으로 전달되었다. 이들은 RT 641과 재결합하지 않고 피전달균에서 독립적으로 존재하였다. 이와같이 내성결정기와 transfer factor가 독립적으로 존재하면서 재결합하지 않고 전달되는 plasmid를 Anderson 등<sup>11)</sup>은 class

2로 분류하였는데 한개의 복잡한 형태로 전달되는 class 1으로 합쳐질 가능성도 있으므로 새로운 내성을 획득하는데 또 다른 기전이 될 수 있다. 따라서 작은 크기의 plasmid들도 내성의 확산에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 작은 크기의 plasmid가 transfer factor에 의하여 가동화되기 위해서는 transfer factor와 plasmid가 전달촉진단백을 만드는 유전자를 가지고 있어야 하며 origin of transfer가 요구되는데<sup>25)</sup>, *S. flexneri* 유래의 Ap 내성 plasmid가 가동화 되지 않는 이유를 규명하기 위해서는 더 많은 종류의 transfer factor 및 피전달균을 이용하여야 하겠다.

Frederieq는 12종의 colicin형을 보고하였는데 *S. higella*는 E, B, D, I 및 K형등 균종별로 다양한 colicin 생성능을 나타낸다<sup>37)</sup>. *S. sonnei*는 상당수(50~100%)가 colicin을 생성하며 대부분 E형인 반면 *S. flexneri*는 3~30%의 균주가 colicin을 생성하는 것으로 보고되어 있다<sup>37)</sup>. Colicin 생성은 접합에 의한 유전물질의 전달시 영향을 미치게 되며 plasmid에 의해 생성능이 결정되는데<sup>38)</sup>, colicin B, V 및 I 등의 유전자는 65~85 Mdal으로 전달성이며<sup>38)</sup>, 대장균유래의 Co1E1-K 30 및 Co1E3-CA 38 등은 3.4~4.3 Mdal, *S. sonnei* 유래의 ColE2-P9은 4.6 Mdal으로 비전달성이다<sup>63)</sup>. Transformation으로 얻을 수 있었던 plasmid 가운데 3.7 Mdal 및 3.9 Mdal의 plasmid는 colicin 생성 plasmid인 것으로 나타났다. *S. sonnei*는 *S. flexneri*와는 달리 86%의 균주가 3~4 Mdal의 plasmid를 보유하고 있었다. 따라서 plasmid profile을 분석하여 이질균을 일차적으로 검색할 때 본 실험의 결과처럼 3.7, 3.9 혹은 13 Mdal의 plasmid가 발견되면 colicin 생성여부를 확인할 필요가 있으며 접합에 의한 내성전달 실험에서 피전달균으로 colicin 내성주를 이용하여야 한다.

제한효소 처리에 의해 나타나는 plasmid 분획의 양상은 분자량이 같거나 유사한 plasmid들의 특성 규명에는 필수적이다<sup>6, 27)</sup>. 전달성 plasmid를 EcoR1으로 처리한 결과 유래된 균종이나 내성형에 따른 특이한 차이는 없었지만 비적합성군에 따른 분획의 차이는 현저하였다.

CmTcSmSuApTpKm 내성의 *S. sonnei* 3주는 plasmid profile이 비슷하였으며 접합에 의한 전달성 plasmid 및 transformation으로 얻을 수 있었던 plasmid들도 유사하였고, 전달성 plasmid들의 일부는 FI 비적합성군으로 분류되었다. 이들 plasmid들을 제한효소로 처리한 결과 비적합성군 분류성적과 제한효소 처리된 plasmid 분획양상과는 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 이들 3주가 지닌 plas-

mid들의 제한효소 처리된 분획 가운데 동일한 절편이 있고, 비적합성군이 같으므로 이들 plasmid들은 동일계통에서 발생되었다고 할 수 있다.

## 결 론

*Shigella*가 보유한 항균제내성과 관련된 plasmid들의 특성을 조사하기 위해 대구지방에서 분리된 균주들을 대상으로 12종의 항균제에 대한 감수성검사를 실시한 결과, 1984년 및 1985년에 분리된 *S. shigella*는 gentamicin, amikacin 및 cephalothin 등에는 전균주가 감수성이었고, kanamycin(Km) 및 rifampin 등에는 대부분의 균주가 감수성이었다.

*S. flexneri*는 *S. sonnei*보다 ampicillin(Ap)에 *S. sonnei*는 *S. flexneri*보다 sulfisomidine(Su) 및 trimethoprim(Tp)에 내성빈도가 높았다. 내성유형을 보면 *S. flexneri*는 chloramphenicol(Cm), tetracycline(Tc), streptomycin(Sm) 및 Ap내성형이 가장 많았으며 기타 CmTcSmSuApTp, CmTcSmSuApTp nalidixic acid 및 CmTcSmSuAp 내성형들이었으나 *S. sonnei*는 대부분이 CmTcSmSuTp내성형이었다. 접합에 의한 내성전달의 빈도는 *S. flexneri*는 47%였으며, *S. sonnei*는 75%였다.

*Shigella*의 plasmid profile을 관찰한 결과 *Shigella*는 평균 4개의 plasmid를 보유하고 있었으며 그 크기는 1.3~134 megadalton(Mdal)이었다. *S. flexneri*가 대부분이 2~3 Mdal의 plasmid를 보유한 반면 *S. sonnei*는 3~4 Mdal의 plasmid를 보유하고 있었다.

접합에 의해 전달되는 plasmid들은 대부분 40~90 Mdal이었다. 비적합성군 분류결과 대부분의 plasmid는 FII 비적합성군으로 54~59 Mdal이었으나 1979년 및 1980년 분리주에서 60 Mdal의 B비적합성군 plasmid를, 1983년 분리주에서는 87 Mdal의 FI 비적합성군의 plasmid가 발견되었다. 이들 R plasmid에 EcoR I을 처리한 결과 비적합성군에 따른 분획상의 차이는 있었으나 유래된 균종이나 내성유형에 따른 차이는 없었다.

접합에 의해 전달되지 않는 plasmid들의 특성을 조사하기 위해 transformation을 실시한 결과 단약제 및 2제내성의 plasmid들이 주로 전달되었으며, colicin 생성 plasmid도 전달되었는데 그 크기는 3.7 Mdal 및 3.9 Mdal이었다.

Transformation으로 전달된 plasmid중 *S. sonnei* 유래의 Ap내성 plasmid는 transfer factor RT 641에 의해 *E. coli* # CS100으로 가동화되었다. *S. flexneri*, *S. sonnei* 및 *E. coli* 유래의 Ap내성 plasmid

는 Pst I 처리결과 2.8 kilobase(kb) 및 0.7 kb의 공통적인 2개의 분획이 있었으며, *S. flexneri*, *S. boydii* 및 *S. sonnei* 유래의 SmSu내성 plasmid는 Pst I에 동일한 3.1 kb 및 2.9 kb의 2개의 분획을 나타내었다.

CmTcSmSuApTpKm내성인 균주로서 colicin을 산생하며 유사한 plasmid profile을 나타낸 3주의 *S. sonnei*는 접합 및 transformation으로 전달되는 plasmid들도 유사하였는데 EcoR I에 의해서도 비슷한 절단분획상을 나타내었다. FI 비적합성군으로 분류된 것과 분류불능인 plasmid들 사이에는 절단양상의 차이가 있었다.

## 참 고 문 헌

- 1) 서민호: *Salmonella typhi*의 R plasmid의 비적합성. 경북의대잡지, 22:356, 1981.
- 2) 서민호, 설성용, 조동택, 전도기: *Shigella*의 R plasmid의 특성과 항균제내성의 본태. 대한화학요법학회지, 2:97, 1984.
- 3) 서민호, 이유철, 조동택: 1982년에 대구지방에서 분리된 *Salmonella*의 항균제 감수성. 대한화학요법학회지, 1:95, 1983.
- 4) 설성용: 1980년 대구지방에서 분리한 *Shigella*의 균형 및 항균제내성. 경북의대잡지, 21:527, 1980.
- 5) 설성용, 서민호, 이유철: 1982년 대구지방에서 분리한 *Shigella*의 항균제내성 및 R plasmid. 대한화학요법학회지, 1:249, 1983.
- 6) 설성용, 조성만, 전도기: 가축유래대장균의 항균제 내성 및 R plasmid. 대한화학요법학회지, 2:144, 1984.
- 7) 이유철, 조동택: N 비적합성군 plasmid의  $\beta$ -lactamase 활성. 대한화학요법학회지, 1:255, 1983.
- 8) 조동택: Plasmid 분석에 의한 원내감염의 역학적 조사. 대한화학요법학회지, 2:76, 1984.
- 9) 조동택, 전도기: 대장균의 항균제 내성 및 전달성 plasmid. 대한미생물학회지, 17:21, 1982.
- 10) Anderson ES: A rapid screening test for transfer factors in drug-sensitive *Enterobacteriaceae*. *Nature*. 208:1016, 1965.
- 11) Anderson ES and Natkin E: Transduction of resistance determinants and R factors of the transfer systems by phage. *Plk. Molec. Gen. Genet.* 114:261, 1972.
- 12) Birnboim IC and Doly J: A rapid alkaline



- extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Reser.* **7**:1513, 1979.
- 13) Black RE, Craun GF and Blake PA: Epidemiology of common-source outbreaks of *Shigellosis* in the United States, 1961-1975. *Am. J. Epidemiol.* **108**:47, 1978.
  - 14) Braude AI: Infectious Diseases and Medical Microbiology, p. 292. 2nd ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1986.
  - 15) Byers PA, Dupont HL and Goldschmidt MC: Antimicrobial susceptibility of *Shigellae* isolated in Houston, Texas, in 1974. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**:288, 1976.
  - 16) Chatterjee BD and Sanyal SN: Is it all shigellosis? *Lancet* **1**:574, 1984.
  - 17) Chugh TD, Suheir A, Mahboob AG, Neil L and El-Bishbishi E: Plasmid-mediated drug resistance of *Shigellae* isolated in Kuwait. *Antonie van Leeuwenhoek.* **51**:241, 1985.
  - 18) Chun D, Cho DT, Seol SY, Suh MH and Lee YC: R plasmids conferring multiple drug resistance from *Shigella* isolated in Korea. *J. Hyg.(Camb.)* **92**:153, 1984.
  - 19) Chun, D, Seol SY and Suh MH: Transferable resistance to trimethoprim in *Shigella*. *J. Infect. Dis.* **143**:742, 1981.
  - 20) Crosa JH, Olarte J, Mata LJ, Luttrupp LK and Penaranda ME: Characterization of an R plasmid associated with ampicillin resistance in *Shigella dysenteriae* type 1 isolated from epidemics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**:553, 1977.
  - 21) 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, 1974.
  - 22) Datta N and Hedges RW: Host range of R factors. *J. Gen. Microbiol.* **70**:453, 1972.
  - 23) Ebright JR, Moore EC, Sanborn WR, Schaberg D, Kyle J and Ishida K: Epidemic shiga bacillus dysentery in Central Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**:1192, 1984.
  - 24) Edwards PR and Ewing WH: Identification of *Enterobacteriaceae*, p.108. 3rd ed., Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1972.
  - 25) Falkow S: Infectious Multiple Drug Resistance, p.144. *Methuen, Inc., New York*, 1975.
  - 26) Farrar WE Jr: Molecular analysis of plasmids in epidemiologic investigation. *J. Infect. Dis.* **148**:1, 1983.
  - 27) Farrar WE Jr: Investigation of nosocomial infection by plasmid analysis. *Clin. Invest. Med.* **6**:213, 1983.
  - 28) Frost JA, Willshaw GA, Barclay EA, Rowe B, Lemmens P and Vandepitte J: Plasmid characterization of drug-resistant *Shigella dysenteriae* 1 from an epidemic in Africa. *J. Hyg. (Camb)* **94**:163, 1985.
  - 29) Georges MC, Wachsmuth IK, Meunier DMV, Nebout N, Dadier F, Siopathis MR and Georges AJ: Parasitic, bacterial, and viral enteric pathogens associated with diarrhea in the Central African republic. *J. Clin. Microbiol.* **19**:571, 1984.
  - 30) Germanier R: Bacterial Vaccines, p.167. Academic Press, Orlando, 1984.
  - 31) Grinter NJ and Barth PT: Characterization of SmSu plasmids by restriction endonuclease cleavage and compatibility testing. *J. Bacteriol.* **128**:394, 1976.
  - 32) Gross RJ, Threlfall EJ, Ward LR and Rowe B.: Drug resistance in *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri* and *S. boydii* in England and Wales: increasing incidence of resistance to trimethoprim. *Br. Med. J.* **288**:784, 1984.
  - 33) Hanahan D: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557, 1983.
  - 34) Hansoon HB, Walder M and Juhlin I: Susceptibility of *Shigellae* to mecillinam, nalidixic acid, trimethoprim, and five other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**:271, 1981.
  - 35) Hardy K: Bacterial Plasmids, p.100. Thomas Nelson Ltd., Hong Kong, 1981.
  - 36) Hardy KG: Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.* **39**:464, 1975.
  - 37) Jamieson AF, Bremner DA, Berquist PL and Lane HED: Characterization of plasmids from antibiotic-resistant *Shigella* isolates by agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* **113**:73, 1979.

- 38) Kado CI and Liu ST: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**:1365, 1981.
- 39) Kawabe H, Tanaka T and Mitsuhash S: Streptomycin and spectinomycin resistance mediated by plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**:1031, 1978.
- 40) Lederberg EM and Cohen SN: Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **119**:1072, 1974.
- 41) Lennett EH, Balows A, Hausler WJ Jr. and Shadomy HJ: Manual of Clinical Microbiology, p.263. 4th ed., ASM, Washington, D. C., 1985.
- 42) Levy SB, Clowes RC and Koenig EL: Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids, p. 111. Plenum Press, New York, 1981.
- 43) Levy SB, Hedges RW, Sullivan F, Medeiros AA and Sosroseputro: H: Multiple antibiotic resistance plasmid in *Enterobacteriaceae* isolated from diarrhoeal specimens of hospitalized children in Indonesia. *J. Antimicrob. Chemother.* **16**:7, 1985.
- 44) Macaden R and Bhat P: The changing pattern of resistance to ampicillin and cotrimoxazole in *Shigella* serotypes in Bangalore, Southern India. *J. Infect. Dis.* **152**:1348, 1985.
- 45) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J: Molecular Cloning, p. 98. CSH, New York, 1982.
- 46) Marranzano M, Giammanco G, d'Hauteville H and Sansonetti P: Epidemiological markers of *Shigella sonnei* infections: R plasmid fingerprinting, phage-typing and biotyping. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **136**:339, 1985.
- 47) Mayer LW, Holmes KK and Falkow S: Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Imm.* **10**:712, 1974.
- 48) McGown JE Jr: Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use. *Rev. Infect. Dis.* **5**:1033, 1983.
- 49) Meyer PW and Lerman SJ: Rise and fall of *Shigella* antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**:101, 1980.
- 50) Mitsuhashi S and Hashimoto H: Microbial Drug Resistance, p.187. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1975.
- 51) Mitsuhashi S, Inoue K and Inoue M: Non-conjugative plasmids encoding sulfanilamide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **12**:418, 1977.
- 52) Neu HC, Cherubin CE, Longo ED and Winter J: Antimicrobial resistance of *Shigella* isolated in New York city in 1973. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**:833, 1975.
- 53) Olarte J, Filloy L and Galindo E: 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, 1976.
- 54) Orskov F and Orskov I: Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the *Enterobacteriaceae* and other bacteria. *J. Infect. Dis.* **148**:346, 1983.
- 55) Pemberton JM and Clark AJ: Detection and characterization of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa* strain P.A.O. *J. Bacteriol.* **114**:422, 1973.
- 56) Rahaman MM, Hug I, Dey CR, Kibriya AK MG and Curlin G: Ampicillin-resistant *Shigella bacillus* in Bangladesh. *Lancet* **1**:406, 1974.
- 57) Reeves P: The Bacteriocin, p.87. Springer-Verlag, Berlin, 1972.
- 58) Rubinstein E and Shainberg B: In vitro activity of cinoxacin, ampicillin, and chloramphenicol against *Shigella* and nontyphoid *Salmonella*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**:577, 1977.
- 59) Schaberg DR, Tompkins LS and Falkow S: Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **13**:1105, 1981.
- 60) Schlessinger D: Microbiology, p.257, ASM, Washington, D.C., 1978.
- 61) Shabid NS, Rahaman MM, Haider K, Banu H and Rahman N: Changing pattern of resistant *Shigella bacillus* (*Shigella dysenteriae* type 1) and *Shigella flexneri* in Bangladesh. *J. Infect. Dis.* **152**:1114, 1985.
- 62) Shaw DR and Cabelli VJ: R-plasmid transfer frequencies from environmental isolates of *E. coli* to laboratory and fecal strains. *Appl. E-*

- nvirion. Microbiol.* **40**:756, 1980.
- 63) Smith HR, Humphreys GO and Anderson E S: Genetic and molecular characterization of some non-transferring plasmids. *Molec. Gen. Genet.* **129**:229, 1974.
- 64) Smith JT, Bremmer DA and Datta N: Ampicillin resistance of *Shigella sonnei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**:418, 1974.
- 65) Tacket CO, Shahid N, Hug MI, Alim ARM A and Cohen ML: Usefulness of plasmid profiles for differentiation of *Shigella* isolates in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* **20**:300, 1984.
- 66) Thorne GM and Farrar WE Jr: Superinfection compatibility of R factors in *Shigella dysenteriae* type 1 from Central America and *Salmonella typhi* from Mexico. *J. Infect. Dis.* **130**:284, 1974.
- 67) Thornsberry C: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, p.31. NCCLS, Villanova. 1983.
- 68) Tietze E and Tschäpe H: Plasmid pattern analysis of natural bacterial isolates and its epidemiological implication. *J. Hyg. (Camb).* **90**:475, 1983.
- 69) Tietze E, Tschäpe H, Horn G and Laue F: Clonal distribution of multiple drug resistant *Shigella sonnei* strains: identification by means of plasmid pattern analysis. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **135**:155, 1984.
- 70) Velasco AC, Mateos ML, Mas G, Pedraza A, Diez M and Gutierrez A: Three year prospective study of intestinal pathogens in Madrid, Spain. *J. Clin. Microbiol.* **20**:290, 1984.