

환자, 가축 및 하천에서 분리한 대장균의 약제내성과 전달성 R-plasmid

김현주 · 정규선

숙명여자대학교 약학대학

(Received January 29, 1991)

Drug Resistance and R-plasmid of *E. coli* Isolated from Patients, Domestic Animals and Drainages

Hyun Joo Kim and Kyu-Sun Chung

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract—These studies were made to assess the present stage of resistance to antibiotics, incidence and transferability of R-factors against *E. coli*. From March to July 1987, 59 strains of *E. coli* were isolated from specimens of patients collected at university hospitals in Seoul, 64 strains from stools of domestic animals and 66 strains from drainages in Seoul. These specimens were tested for resistance to 12 kinds of antimicrobial agents by means of agar dilution method. Using Müller-Hinton agar for the assay of drug resistance and tryptic soy broth as propagating medium for conjugation. The strains of *E. coli* were found to be resistant to one or more antibiotics and were considered to be potential donors of R-plasmid. The resistant strains of *E. coli* isolated from patients, domestic animals and drainages were found to be 55(93%), 33(52%) and 31(47%), respectively. Resistance to Tc, Ap and Cb was the highest in those isolated from patients and drainages, and resistance to Tc, Cm and Sm was the highest in those isolated from domestic animals. In the transfer test of drug resistance by conjugation method, 17 strains (47%) isolated from patients, 15(54%) isolated from domestic animals and 15(56%) isolated from drainages showed positive results, transperable resistant plasmid molecules with variable range in each strain.

Keywords □ *E. coli*, drug resistance, R-plasmid

대장균은 장내세균과에 속하는 Gram(-) 단간균으로 장내에서 상주하는 정상 세균으로 알려져 왔다. 그러나 어떤 균주는 소아에게 감염되어 설사를 유발하거나 비장관계에 감염되어 다양한 질환을 일으키는 경우가 허다하다.^{1,2,7,12,22} 이러한 대장균의 감염은 주로 음료수나 식품을 통해서 인체에 침입하여 감염증을 유발하게 된다. 따라서 대장균과 같은 세균 감염증을 치료할 목적으로 임상에서는 항균제를 사용하게 되나 치료 목적으로 남용된 항균제로 인해서 내성균이 출현하게 되자 항균제 사용에 대한 재평가가 시급하게 요구되었던 것이다.^{4,9,14,15,17}

인체가 세균 감염을 받을 경우, 치료 효과를 높이기

위하여 현재 항균제를 투여하여 큰 효과를 보고 있다. 그러나 항균제의 남용으로 급격한 내성균주가 출현하여 약제에 대한 감수성을 상실하게 된다. 이와 같은 기전은 접합에 의해서 획득한 세균 세포질내에 존재하는 전달성 R-plasmid에 의해서 감수성균이 내성을 전달받아 저항성을 발휘하게 된다.^{20,21} 이와 같은 약제 내성인자는 Watanabe 등이 이질균에 대한 약제내성을 연구하던 중 chloramphenicol에 대해 내성을 나타내는 균주를 관찰 보고하게 되었다.³¹ 그 후 이에 관심을 가지고 계속 연구한 바 다른 많은 세균 감염 중에서도 동일한 현상이 일어나 치료에 어려움을 겪게 되는 경우가 허다하다.^{6,10,11,13,18,29} 또 가축의 경우도

대장균의 감염으로 목축업자에게 많은 피해를 입혀 이득이 감소되는 등 사회적으로 물의를 일으켰다. 특히 최근에는 동물의 사료에 항균제를 첨가하므로 이를 먹는 동물에서 자연적으로 내성균이 출현하게 되어 가축질환 치료에도 어려움을 겪게 되며 같은 기전으로 내성을 획득하여 저항성을 나타내게 된다.^{3,8,23,24)}

한편 서울과 같은 대도시는 인구 밀집이 불가피하여 환경 정화에 많은 어려움이 있으며, 시내의 크고 작은 하천은 여러 경로를 거쳐서 오염되는 경우가 허다하다.¹⁰⁾

이상과 같은 사실을 고려하여 병원 환자에서 분리한 균, 가축의 대변에서 분리한 균 및 하천에서 분리한 균을 대상으로 약제 내성을 확인하고, 이들의 전달성 R-plasmid의 특성을 규명하여 인체와 가축의 질병치료와 하천 오염을 예방하는데 기여코자 본 실험을 시행하여 몇 가지 새로운 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

검사물 채취—검사물은 사람, 가축 및 하천에서 취한 검사물로부터 대장균을 분리하여 사용하였다.

환자—1987년 5월부터 동년 7월 말까지 서울 시내 종합병원(서울대학병원, 경희의료원)에 입원한 환자 및 외래 환자의 가검물에서 분리한 균을 본 실험실에서 재분리하여 총 59주를 환자에서 분리한 대장균으로 사용하였다.

가축—서울 시내 및 근교의 도살장과 양계장에서 가축의 배설물을 멸균된 면봉으로 채취하여 1% pepton수 5 ml에 가하여 실험실로 운반한 후 대장균을 분리하여 가축에서 분리한 대장균으로 사용하였다.

하천—1987년 3월부터 동년 4월 사이 서울 시내 16개 주요 하천(안양천, 반포천, 불광천, 흥은천, 홍제천, 정능천, 모래내천, 사당천, 세검천, 성북천, 석관천, 성내천, 신림천, 탄천, 연희천, 도림천)에서 분리한 총 66주를 하천에서 분리한 대장균으로 사용하였다.

검사물 채취는 멸균된 pipette을 사용하여 무균적으로 각 하수 1 ml씩을 취하여 1% pepton수 5 ml에 가하여 실험실로 운반하여 37°C에서 18시간 배양한 후 대장균을 분리하였다.

균분리—증균 배양한 가검물을 MacConkey(Difco)

Table I—Criteria of resistant strains expressed by MIC (mcg/ml)^{10,16)}

Antimicrobials	Resistant
Amikacin	>32
Ampicillin	>16
Carbenicillin	>128
Cephalothin	>16
Chloramphenicol	>16
Gentamicin	>8.0
Kanamycin	>32
Nalidixic acid	>16
Streptomycin	>64
Tetracyclin	>8.0
Tobramycin	>8.0
Rifampicin	>32

*From the national committee for clinical laboratory standards tentative recommendation (NCCL Vol. 3, No. 2, p.67)

한천 평판배지에 도말하여 37°C에서 18시간 배양하여 전형적인 대장균 집락을 취하였다. 이것을 TSI 사면 배지에 식균하여 37°C에서 18~24시간 배양한 후 Acid slant, Acid butt, gas를 생성하여 대장균 성상을 나타내는 세균을 선별하여 IMViC test 및 당 분해 시험을 실시하여 대장균을 분리 동정하였다.

항균제—본 실험에 사용한 항균제는 amikacin(Ak), ampicillin(Ap), carbenicillin(Cb), cephalothin(Cp), chloramphenicol(Cm), gentamicin(Gm), kanamycin(Km), nalidixic acid(Na), streptomycin(Sm), tetracyclin(Tc), tobramycin(Tb), rifampicin(Rp) 등의 12종을 사용하였다.

항균제는 국립보건원 역학조사과 상용 표준품을 분양받아서 사용하였다.

약제 내성 실험—약제 내성 실험은 한천 평판배지 희석법으로 하여 최저 발육억제농도(MIC)를 구하여 내성 여부를 Table I의 기준에 따라 판정하였다.^{23,24)}

실험의 정확도를 확인하기 위해 *E. coli* ATCC 25922를 병용하였으며, 배지는 Müller Hinton(Difco) agar를 사용했다.

약제 내성 전달 실험—약제 내성 전달 실험은 내성을 가진 균을 공여균(donor)으로 하고 *E. coli* K-12 ML1410(Nal)균을 수용균(recipient)으로 사용하였다. 전달방법은 액체배지교배법으로 하였다.¹⁰⁾ 공여균, 수용균을 각각 Müller Hinton broth(MHB)에

서 18~24시간 배양한 균액 0.4 ml를 취해 각각 MHB 20 ml에 접종, 37°C에서 3시간 30분 동안 진탕배양하였다. 공여균, 수용균을 1:4의 비율로 취해 37°C에서 18~24시간 배양시킨 후 이 혼합 배양액을 선택배지에 도말 배양하여 나타난 집락을 취하여 해당 종류의 항균제에 대한 내성을 검사하여 내성 전달 양상을 살펴보았다.¹⁶⁾

Plasmid DNA 분리—접합에 의해 내성이 전달된 균주와 1제 이상 내성이 확인된 대장균에 대하여 Kado & Liu(1981년) 방법에 따라 plasmid DNA를 분리하였다.²⁶⁾ 이를 요약하면 trypticane soy broth 5 ml에 균을 접종하여 18~24시간 진탕배양한 후 균액 1 ml를 취해 12000 rpm에서 2분간 원심분리한다. 상층액은 버리고 TE buffer(0.1 mM tris, 1 mM EDTA pH 8.0) 20 ml를 넣고 vortex에서 혼합하여 세균침사를 부유시키고, lysis solution(3% SDS in 50 mM tris, pH 12.6) 400 ml를 가하여 조심스럽게 혼합시킨 다음 55°C 항온 수욕상에서 45분간 반응시킨다. lysis가 끝나면 열음에서 5분간 냉각시킨 후 phenol-chloroform 800 μ l를 가하여 조심스럽게 혼합시키며 단백제거가 충분히 이루어지게 한 다음 12000 rpm에서 15분간 원심분리한다. 상층액 160 μ l를 취해 전기영동 gel-loading buffer(0.25% bromphenol, 0.25% xylene cyanol, 15% ficoll type 400)을 H₂O에 녹여 만든 액을 TBE buffer로 6배 희석한 액 200 μ l와 혼합하여 DNA 분리 확인을 위해 전기영동에 사용하였다.^{21,26)}

Plasmid DNA의 전기영동-Plasmid DNA의 전기영동은 0.7% 되게 agarose를 TBE buffer(89 mM tris base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA pH 8.0)에 녹여 제조했고, agarose gel에 sample 25 μ l를 가하여 수평장치를 이용하여 70 mA에서 4시간 정도 전기영동하였다.²⁶⁾ 영동이 끝난 gel을 0.5 μ g/ml ethidium bromid 용액에 45분간 담구어 plasmid band를 염색시킨 후 gel을 UV transilluminator 위에 두고 polaloid camera로 DNA 밴드를 촬영하였다. plasmid의 분자량은 plasmid의 이동거리를 측정된 후 분자량이 알려진 *E. coli* V-517의 plasmid 이동거리와 비교하여 산출하였다.²⁵⁾

결과 및 고찰

항균제 내성—최근 세균학, 면역학 및 분자생물학적 진단법의 획기적인 발달과 미량분석법의 발달은 장내세균 진단에 지대한 발전을 가져왔다. 따라서 종래에는 관심을 두지 않던 대장균도 이런 기법의 발달로 병원기전이 상세하게 해명되면서 그 중요성이 재인식되어 설사질환의 상당부분을 차지한다고 되어 있다. 우리나라에서도 대부분의 세균성 설사질환의 약 50% 이상이 대장균에 기인된다는 사실이 새로이 보고되고 있다.²⁾ 그리고 우리도 설사질환 및 기타 질환에 감염되면 전문가의 정확한 진단을 받고 치료하기보다는 우선 마구 항생제를 구입하여 복용하게 되어 내성균주의 출현은 물론 완치의 어려움을 겪게 되는 일이 허다하다. 이런 사실들은 정희영¹⁸⁾이 우리나라에서 1955년부터 1983년까지 약 20여년간 국내 및 병원에서 분리된 각종 세균에 대한 감수성 검사에서도 지적하였듯이 지난 세월 동안 내성균의 출현이 뚜렷함을 알 수 있다.

이상과 같이 대장균의 새로운 병원기전의 중요성과 항균제 남용으로 인한 내성균의 획득은 임상가에서 환자의 치료에 어려움이 있음은 두말할 나위가 없다고 생각된다. 그리고 가축의 치료와 사료에 포함된 항생제의 남용도 내성균 출현을 가속화시키는 현상이다.

항생제 내성인자는 Watanabe 등이 chloramphenicol에 감수성이 있던 이질균주가 높은 내성을 갖게 되어 그 기전을 연구한 바 접합에 의해서 내성인자가 전달되어 저항성을 발휘하게 된다고 했다. 이와 같은 기전은 내성인자가 숙주 염색체와 무관한 세포질내 전달성 내성인자의 획득으로 항균제에 대한 감수성을 상실하게 되는 것이다.^{19,20,30)}

접합은 주로 gram 음성 장내세균에서 보편적으로 이루어지며, 다약제에 중복내성을 고도로 나타낸다. 그러나 R-plasmid의 균체 상호간의 전달에는 여러 가지 요인이 관여하는데, R-plasmid의 종류, 균종 또는 균주에 따라서 전달 빈도와 전달 내용에 차이가 있으며 전달 여부에도 관여한다.^{10,16,21)}

이 때 R-plasmid가 접합에 의해 넘어가지 않는 (non-conjugative)plasmid일 경우에는 wide range recipient host를 이용하여 transformant를 만들어서 다음의 실험단계로 넘어가거나 아니면 mobilization plasmid(pi)를 이용하여 함께 이동시키는 방법도 있다. 이외에 transduction(형질도입), transformation

Table II—Frequency of drug resistant strains isolated from specimens¹⁾

Drug ²⁾	No. of resistant strains(%) from			Total
	Patient (59)	Domestic animal(64)	Drainage (66)	
Tc	45(76)	32(50)	24(36)	101(53)
Cm	38(64)	15(23)	11(17)	64(34)
Ap	43(73)	3(5)	17(26)	63(33)
Cb	43(73)	3(5)	17(26)	63(33)
Sm	27(46)	13(20)	12(18)	52(28)
Km	26(44)	6(9)	15(23)	47(25)
Cp	25(42)	8(13)	8(12)	41(22)
Gm	10(17)	0	1(2)	11(6)
Tb	9(15)	0	1(2)	10(5)
Rp	6(10)	0	3(5)	9(5)
Na	6(10)	0	3	6(3)
Ak	0	0	0	0
None ³⁾	4(7)	31(48)	35(53)	70(37)
Total	59(100)	64(100)	66(100)	189(100)

() - %

¹⁾ Fifty-nine strains isolated from patients, sixty-four strains isolated from domestic animals and sixty-six strains isolated from drainages.

²⁾ Abbreviation.

³⁾ Sensitive.

(형질전환), transposition 등 여러 측면에서 연구되고 있다.²¹⁾ 대장균을 포함한 장내세균은 저항력이 약화된 사람에게 기회감염을 일으킬 수 있으며, 병원내 감염의 원인균으로 알려져 있다. 이 때 R-plasmid 보유항균제 내성을 가진 균이라면 중복내성을 나타내어 치료에 어려움을 줄 것이다.

이와 같은 내성획득의 심각성을 고려하여 본 연구는 우리나라 병원환자, 가축 및 하천을 대상으로 검사를 채취하여 대장균을 분리한 후 이들 각 군간의 항균제 내성 및 전달성 R-plasmid를 추적한 바 매우 흥미있는 결과를 얻었기에 이를 보고한다.

환자에서 분리한 균 59주, 가축에서 분리한 균 64주 및 하천에서 분리한 균 66주에 대한 약제별 내성빈도를 살펴보면 Table II와 같다.

공시한 전 항균제에 대해서 감수성인 균주는 70주(37%)였다.

환제에서 분리한 균의 약제별 내성 빈도를 보면 Tc가 45주(76%)로 가장 높았으며, 그 다음이 Ap와 Cb로 각각 43주(73%)이며, Cm 38주(64%), Sm 27주(46%), Km 26주(44%), Cp 25주(42%), Gm 10주(17

%), Tb 9주(15%) Na와 Rp가 각각 6주(10%)순으로 낮았으며, Ak에 대한 내성은 없었다. 공시한 전 균주에 대한 감수성은 4주(7%)였다. 이는¹⁰⁾ Ap가 62주(86%)로 가장 높았고, Na와 Ak에는 내성이 없었으며, 조¹⁹⁾는 Sm이 86주(71%)로 가장 높고, Rf에는 내성을 나타내지 않았다. 박⁵⁾은 Sm이 33주(80%), Ap가 33주(75%)였으며, Na 내성은 없었다. 정¹⁵⁾은 Cb와 Tc에 높은 내성(66%)을 나타냈다.

가축에서 분리한 균은 Tc에 내성인 균주가 32주(50%)로 단연 높았으며 그 다음이 Cm 15주(23%), Sm 13주(20%), Cp 8주(13%), Km 6주(9%), Ap와 Cb가 각각 3주(5%)였으며, Ak와 Gm, Na, Tb, Rp에는 내성을 나타내지 않았다.

공시한 전 약제에 대하여 감수성인 균주는 31주(49%)였다.

하²⁴⁾는 Ap가 82주(37%)로 내성이 가장 높고 Km에는 내성이 없었으며 설⁸⁾은 Tc가 419주(52%)로 내성이 가장 높고 Ak와 Na, Rf에는 내성이 없는 것으로 보고하였다.

하천에서 분리한 균은 환자의 경우와 마찬가지로 Tc에 내성인 균주가 24주(36%)로 가장 높았으며 그 다음이 Ap와 Cb로 각각 17주(26%)였고, Km 15주(23%), Sm 12주(18%), Cm 11주(17%), Cp 8주(12%), Rp 3주(5%), Tb와 Gm이 각각 1주(2%)순으로 낮았으며, Ak와 Na에 대한 내성은 없었다.

공시한 전 항균제에 대해서 감수성인 균주는 35주(53%)였다.

이⁵⁾는 Tc가 21주(40%)로 내성이 가장 높고, Cm, Gm, Rf, Na, Ak에는 내성을 나타내지 않았다. 즉 Tc에 내성인 균주가 101주(53%)로 가장 높고 그 다음이 Cm으로 64주(34%), Ap와 Cb가 각각 63주(33%), Sm 52주(28%), Km 47주(25%), Cp 41주(22%), Gm 11주(6%), Tb 10주(5%), Rp 9주(5%), Na 6주(3%)순으로 낮았으며 Ak에는 내성이 없었다.

대장균의 내성전달—환자에서 분리한 대장균 36주와 동물에서 분리한 대장균 28주 하천에서 분리한 대장균 27주를 선택하여 공여균으로 하고, *E. coli* K-12 ML 1410(Nal^r)을 수용균으로 하여 내성전달 실험한 결과는 Table V, VI, VII과 같다.

환자에서 분리한 균은 내성이 모두 전달된 경우가 5주(18%) 일부가 전달된 경우는 11주(31%)로 17주(47%)가 내성을 전달하여 R-plasmid 보유율이 47%

Table III—Drug resistance of *E. coli* isolated from patients, domestic animals and drainages

Multiplicity of resistance	Resistance pattern	Patient	No. of strains(%)		Drainage
			Domestic animal		
9	Am Cb Cp Cm Gm Km Sm Tc Tb	3(5)			
8	Am Cb Cm Gm Km Sm Tc Tb	1(2)	5		
	Am Cb Cm Gm Km Sm Tc Tb	1(2)	(8)		
	Am Cb Cm Gm Km Sm Tb Na	1(2)			
	Am Cb Cp Cm Km Sm Tc Tb	1(2)			
	Am Cb Cp Cm Km Sm Tc Rp	1(2)			
7	Am Cb Cp Cm Km Sm Tc	2(3)	7		1(2) 2
	Am Cb Cp Cm Km Tc Rp	1(2)	(12)		(3)
	Am Cb Cp Gm Sm Tc Tb	1(2)			
	Am Cb Cp Gm Km Sm Tb	1(2)			
	Am Cb Cp Km Sm Tc Rp	1(2)			
	Am Cb Cm Gm Km Tc Tb				
6	Am Cb Cm Km Sm Tc Na	1(2)			
	Am Cb Cp Cm Km Tc	2(3)	11		1(2) 2
	Am Cb Cp Cm Sm Tc	1(2)	(19)	2(3)	(3)
	Am Cb Cp Km Sm Tc				1(2)
	Am Cb Cp Cm Tc Rp	1(2)			
	Am Cb Cm Gm Sm Tc	1(2)			
5	Am Cb Cm Km Sm Na	2(3)			
	Am Cb Cm Km Sm Tc	3(5)			
	Am Cb Cp Cm Km				1(2) 7
	Am Cb Cp Cm Tc	3(5)	8		2(2) (11)
	Am Cb Cp Km Tc	1(2)	(4)		
4	Am Cb Cm Km Tc	2(3)			3(5)
	Am Cb Cm Sm Tc	2(3)			2(3)
	Am Cb Cp Km	1(2)	6		1(2) 5
	Am Cb Cp Tc	1(2)	(10)		(8)
	Am Cb Cm Tc	3(5)			
	Am Cb Km Tc	1(2)		1(2) 3	1(2)
3	Am Cb Sm Tc			(5)	2(3)
	Cm Km Sm Tc				1(2)
	Cp Cm Sm Tc			2(3)	
	Am Cb Tc	2(3)	5		1(2) 5
	Am Cb Sm		(8)		1(2) (8)
	Cp Sm Tc	1(2)			
	Cp cm Tc			1(2) 8	
	Cp Km Tc			2(3) (13)	
Cm Sm Tc	1(2)		3(5)		
2	Cm Km Tc	1(2)			1(2)
	Km Sm Tc			2(3)	1(2)
	Km Tc Rp			1(2)	
	Cm Tc	1(2)	2	6(9) 10	1(2) 5
	Cm Rp	1(2)	(3)	(16)	1(2) (8)
1	Sm Tc			4(6)	1(2) 3
	Km Tc				1(2) (5)
	Cp Sm				1(2)
	Cb			1(2) 10	
	Cp	1(2)	8	2(3) (16)	
	Cm		(14)		1(2) 7
Total	Sm			1(2)	1(2) (11)
	Tc	4(5)		6(9)	4(6)
	Na	2(3)			
	Rp	1(2)			1(2)
		4(5)		31(48)	35(55)
Total		55(93)	6		

Table IV - Drug susceptibility patterns of *E. coli* isolated from patients, domestic animals and drainages

Drug	Patient												Domestic animal												Drainage											
	MIC range (mcg/ml)				MIC range (mcg/ml)				MIC range (mcg/ml)				MIC range (mcg/ml)				MIC range (mcg/ml)				MIC range (mcg/ml)				MIC range (mcg/ml)											
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		
No. of strains	3	27	15	4					4	39	20	2					5	37	19	5					5	37	19	5					8	56	28	8
Ak %	5	63	25	7					6	61	31	2					6	67	98	100					8	64	92	100					8	64	92	100
Cumulative %	5	68	93	100					6	67	98	100					6	67	98	100					8	64	92	100					8	64	92	100
No. of strains					7	9	1		42				2	45	11	3	3				4	18	26	2	3				4	18	26	2	17			
Ap %					12	15	2		71				3	70	17	5	5				6	27	39	2	6				6	27	39	2	26			
Cumulative %					12	27	29		100				3	73	90	95	100				6	33	72	74	6				6	33	72	74	100			
No. of strains					2	15			42				10	46	1	4	3				6	43			6				6	43			17			
Cb %					3	26			71				16	72	1	6	5				9	65			9				9	65			26			
Cumulative %					3	29			100				16	88	89	95	100				9	74			9				9	74			100			
No. of strains					1	6	27	11	3				2	7	33	14	8				7	6	26	19	6				7	6	26	19	6			
Cp %					2	10	45	19	5				3	11	52	22	12				11	9	39	29	9				11	9	39	29	9			
Cumulative %					2	12	57	76	81				3	14	66	88	100				11	20	59	88	97				11	20	59	88	97			
No. of strains					20	2	1		36				8	40	2	1	12				7	45	2		7				7	45	2		12			
Cm %					34	3	2		61				12	62	3	2	1	19			11	68	3		11				11	68	3		18			
Cumulative %					34	37	39		100				12	74	77	79	81	100			11	79	82		11				11	79	82		100			
No. of strains	2	38	7	2	1	2	2	1	4				2	47	15						5	34	22	4	1				5	34	22	4	1			
Gm %	3	65	12	3	2	3	3	2	7				3	73	24						8	51	33	6	2				8	51	33	6	2			
Cumulative %	3	68	80	83	85	88	91	93	100				3	76	100						8	59	92	98	100				8	59	92	98	100			
No. of strains					15	14	2	1	27				13	42	3	6				14	36	1		14				14	36	1		15				
Km %					25	24	3	2	46				20	66	5	9				21	54	2		21				21	54	2		23				
Cumulative %					25	49	52	54	100				20	86	91	100				21	75	77		21				21	75	77		100				
No. of strains					23	30			6				4	57	1	2				8	57	1		8				8	57	1		1				
Na %					39	30			10				6	89	2	3				12	86	2		12				12	86	2		2				
Cumulative %					39	90			100				6	95	97	100	12	98	100		12	86	2		12				12	86	2		100			
No. of strains	1	9	8	4	7	4			5	21			2	31	3	5	2	8	4	9	1	33	9	5	3	3	3	4	8	4	8					
Sm %	215	14	7	12	7	8	35		8	35			3	48	5	8	3	13	6	14	2	50	14	8	4	4	4	6	12	4	12					
Cumulative %	217	31	38	50	57	65	100		65	100			3	51	56	64	67	80	86	100	2	52	66	74	78	82	88	100	88	100	88	100				
No. of strains					15				9	35			1	31	1	2	7	22		3	39	1		3	39	1		9	14	9	14					
Tc %					26				15	59			2	48	2	3	11	34		4	59	2		4	59	2		14	21	14	21					
Cumulative %					26				41	100			2	50	52	55	66	100		4	63	65		4	63	65		79	100	79	100					
No. of strains	9	34	5	1	5	4			8	54	2		6	48	10	1	1			6	48	10	1	1				6	48	10	1	1				
Tp %	15	58	8	2	2	8	7		13	84	3		9	72	15	2	2			9	72	15	2	2				9	72	15	2	2				
Cumulative %	15	73	81	85	93	100			13	97	100		9	81	96	98	100			9	81	96	98	100				9	81	96	98	100				
No. of strains	26	8	19	3	3				15	17	32		7	19	6	31	3			7	19	6	31	3				7	19	6	31	3				
Rp %	44	14	32	5	5				23	27	50		11	29	9	47	4			11	29	9	47	4				11	29	9	47	4				
Cumulative %	44	58	90	95	100				23	50	100		11	40	49	96	100			11	40	49	96	100				11	40	49	96	100				

Table V—Original and transferred resistance patterns and plasmid profiles of *E. coli* isolated from patients

Multiplicity of resistance	Antibiotic resistance markers	Mass of plasmid DNA (megadalton)	Antibiotic resistance transferred	Mass of plasmid transferred (megadalton)
9	Am Cb Cp Cm Gm Km Sm Tc Tb	62 37	NT	—
	Am Cb Cp Cm Gm Km Sm Tc Tb	62 49	NT	—
	Am Cb Cp Cm Gm Km Sm Tc Tb	91 18	NT	—
8	Am Cb Cp Cm Gm Sm Tc Tb	49 6 4 3	NT	—
	Am Cb Cm Gm Km Sm Tc Tb	62 43 12 6 3	Am Cb Cm	62
	Am Cb Cm Gm Km Sm Tb Na	49 37	NE	—
	Am Cb Cp Cm Km Sm Tc Tb	91 16	Am Cb Cm Km Sm Tc	91
	Am Cb Cp Cm Km Sm Tc Rp	62 49 5 4	Am Cb Cm Km Sm Tc	62 5 4
7	Am Cb Cp Cm Km Sm Tc	77 62 6 4 4	NE	—
	Am Cb Cp Cm Km Sm Tc	71	NT	—
	Am Cb Cp Cm Km Tc Rp	62	NT	—
	Am Cb Cp Gm Sm Tc Tb	62 43	NT	—
	Am Cb Cp Gm Km Sm Tb	62	Am Cb Km	—
	Am Cb Cp Km Sm Tc Rp	49 43 37	Am Cb Km Sm	43
	Am Cb Cm Km Sm Tc Na	87 49	NE	—
6	Am Cb Cp Cm Km Tc	62 49	NT	—
	Am Cb Cp Cm Km Tc	62 18 4	NE	—
	Am Cb Cp Cm Sm Tc	66 50 36 4	Am Cb Cm Sm Tc	66 36
	Am Cb Cp Cm Tc Rp	66	NT	—
	Am Cb Cp Cm Km Sm	48	NT	—
	Am Cb Cm Km Sm Na	66 50 36 4	NE	—
	Am Cb Cm Km Sm Na	50 36 4	NE	—
	Am Cb Cm Km Sm Tc	56 3	Am Cb Cm Km Sm Tc	56
	Am Cb Cm Km Sm Tc	56	Am Cb Km Sm Tc	56
Am Cb Cm Km Sm Tc	—	NE	—	
5	Am Cb Cp Cm Tc	48 5	NT	—
	Am Cb Cp Cm Tc	62 41	Am Cb Tc	62
	Am Cb Cp Cm Tc	48 3	NE	—
	Am Cb Cp Km Tc	48 7 5 4	NT	—
	Am Cb Cm Km Tc	56 5	Am Cb Cm Km Tc	56 5
	Am Cb Cm Km Tc	56 41	NE	—
	Am Cb Sm Tc	5 5	NT	—
Am Cb Cm Sm Tc	56	Am Cb Cm Sm Tc	56	
4	Am Cb Cp Km	41	NE	—
	Am Cb Cp Tc	56 5 5 4	Am Cb	56
	Am Cb Cm Tc	5 4 4	NT	—
	Am Cb Cm Tc	81 5 4 2	Am Cb Cm Tc	81 5 4 2
	Am Cb Cm Tc	88 38	NE	—
Am Cb Km Tc	62	NT	—	
3	Am Cb Tc	24	NT	—
	Cp Sm Tc	62 12 4	Tc Sm	55
	Cm Sm Tc	55 33	Cm Sm Tc	55
	Cm Km Tc	96	Km Tc	96
2	Cm Tc	62 4 4 3	Cm Tc	62 4 4
	Cm Rp	5 2 4	NE	—
1	Cp	62	NE	—
	Tc	—	NE	—
	Tc	96	NT	—
	Tc	71	NT	—
	Na	63 19	NE	—

NT: not transferred. ME: not experiment

Table VI—Original and transferred resistance patterns and plasmid profiles of *E. coli* isolated from domestic animals

Multiplicity of resistance	Antibiotic resistance markers	Mass of plasmid DNA (megadalton)	Antibiotic resistance transferred	Mass of plasmid transferred (megadalton)
6	Am Cb Cp Cm Sm Tc	31 22 16 6 4	Am Cb Cm Sm Tc	31 22 16 6 4
	Am Cb Cp Cm Sm Tc	36 27 6	Am Cb	36
4	Am Cb Km Tc	48 8 6 5 4 2	NT	—
	Cp Cm Sm Tc	30 24 3 2	NT	—
	Cp Cm Sm Tc	30 6 3 2	Cm Sm Tc	30
3	Cp Cm Tc	67 33	Cm Tc	67
	Cp Km Tc	49	NT	—
	Cp Km Tc	49	NT	—
	Cm Sm Tc	67 49 17 6	Cm Tc	67
	Cm Sm Tc	67	Cm Sm Tc	67
	Cm Sm Tc	67 17 6	Cm Tc	67
	Km Sm Tc	55 2	Cm Tc	55
	Km Sm Tc	96 9 6 5	NT	—
	Cm Tc	4 3	NE	—
	Cm Tc	28 3	NT	—
2	Cm Tc	80 35 4 3	Cm Tc	80
	Cm Tc	80 35 4	Cm Tc	80
	Cm Tc	80 35 3	Cm Tc	80
	Cm Tc	51 3	Cm Tc	51
	Sm Tc	35 8 2	NT	—
	Sm Tc	79 55	NT	—
	Sm Tc	96 2	Tc	96
	Sm Tc	52 16 5	Tc	52
	Cb	—	NE	—
1	Cp	45 35 3 3	NE	—
	Cp	—	NE	—
	Sm	62	NE	—
	Tc	43	NT	—
	Tc	12 5 4	NT	—
	Tc	25	NT	—
	Tc	47 4	NT	—
	Tc	47 3 3	NT	—
Tc	47 36	Tc	47	

NT: Not transferred, NE: Not experiment

였으며 19주(53%)는 접합에 의해 내성을 전달하지 않았다. 이¹⁰⁾의 보고서는 R-plasmid 보유율이 62%였으며 조¹⁹⁾는 68% 박⁵⁾은 38% 설은 85%였다.

가축에서 분리한 균은 내성이 모두 전달된 경우가 5주(18%) 일부가 전달된 경우는 9주(33%) 1제 내성을 가진 균은 2주(7%)가 내성을 전달시켜 15주(56%)가 내성을 전달하여 R-plasmid 보유율이 54%였으며 12주(45%)는 접합에 의해 내성을 전달하지 않

았다. 설⁸⁾은 접합에 의해 32%가 R-plasmid를 보유한 것으로 보고하였고 하²⁴⁾는 42%로 보고하였다.

하천에서 분리한 균은 내성이 모두 전달된 경우가 4주(15%) 일부가 전달된 경우는 9주(33%) 1제 내성을 가진 균은 2주(7%)가 내성을 전달시켜 15주(56%)가 내성을 전달하여 R-plasmid 보유율이 56%였으며 12주(45%)는 접합에 의해 내성을 전달하지 않았다. 이는 R-plasmid 보유율이 32%인 것으로 보고

Table VII—Original and transferred resistance patterns and plasmid profiles *E. coli* isolated from drainages

Multiplicity of resistance	Antibiotic resistance markers	Mass of plasmid DNA (megadalton)	Antibiotic resistance transferred	Mass of plasmid transferred (megadalton)
7	Am Cb Cp Cm Km Sm Tc	62	NT	—
	Am Cb Cm Gm Km Tc Tb	49 37	Am Cb Cm	49
6	Am Cb Cp Cm Km Tc	66 4	Am Cb Cm Km	66
	Am Cb Cp Km Sm Tc	66 36	NT	—
5	Am Cb Cp Cm Km	48 31 7 5	NT	—
	Am Cb Cp Cm Tc	—	Am Cb Cm Tc	—
	Am Cb Cm Km Tc	56 41 31	Am Cb Cm Km Tc	56 41
	Am Cb Cm Km Tc	56	NT	—
	Am Cb Cm Km Tc	36 3	NT	—
	Am Cb Cm Sm Tc	47	Am Cb Tc	47
	Am Cb Cm Sm Tc	37 26 5	Ab Cb Cm Sm	37
4	Am Cb Cp Km	63 26 14	Am Cb	63 25
	Am Cb Km Tc	63 5	NT	—
	Am Cb Sm Tc	42	Am Cb	42
	AmCb Sm Tc	42	Am Cb Sm	42
	Cm Km Sm Tc	49 4 3	Cm Km Sm Tc	49 4 3
3	Am Cb Tc	55 39	NT	—
	Am Cb Sm	33	Am Cb Sm	33
	Cm Km Tc	42 17 6	Cm Km Tc	42
	Km Sm Tc	49 3	NT	—
	Km Tc Rp	59 5 4	NT	—
2	Sm Tc	96 5	Tc	96
	Km Tc	—	NT	—
	Cp Sm	3 3	NE	—
1	Cm	47 36	NE	—
	Sm	47	NE	—
	Tc	62 45 9 4	Tc	62
	Tc	77	Tc	77
	Tc	62 27 11 9 7 4	NT	—
	Tc	9	NT	—
	Rp	36 7 3 2	NE	—

NT: Not transferred, NE: Not experiment

하였다.

이상을 비교해 보면 본 실험에서는 가축과 하천에서 분리한 균에서 R-plasmid를 보유한 항균제 내성균이 증가하고 있다는 사실을 입증할 수 있었다.

Plasmid DNA의 분리 및 분자량 측정—접합에 의해 내성을 획득한 균과 1제 이상 내성이 나타난 균 주에 대하여 Kado & Liu 방법을 사용하여 plasmid를 분리하여 내성전달에 관여한 plasmid DNA 밴드를 관찰하고 plasmid 분자량을 측정하여 conjugant의 내성패턴과 plasmid 분자량을 Table V, VI 및 VII에

요약했다.

3균의 대장균을 비교해 보면 Tc에 대한 내성이 가장 높았으며, Ap와 Cb에 대해서는 동일한 내성패턴을 나타내었다.

이상을 비교해 보면 보고자에 따라서 다소의 차이는 있으나, Tc, Ap와 Sm에 대한 내성이 높은 것으로 나타나고 있다.

내성의 빈도와 MIC—Table III은 약제 내성을 내성 빈도순으로 정리한 것이다.

내성균의 빈도를 살펴보면 환자에서 분리한 균은

Table VIII—Distribution of transferred resistance of strains to drugs associated with R-plasmid

Drugs	No. of resistance strains	Patient No. of strains with transferable resistance(%)	Domestic animal		No. of resistance strains	Drainage strains with transferable resistance(%)
			No. of resistance strains	No. of strains with transferable resistance(%)		
Ap	28	13(46%)	3	2(67%)	17	10(59%)
Cb	28	13 (46%)	3	2(67%)	17	10(59%)
Cp	19	0(0%)	7	0(0%)	6	0(0%)
Cm	24	10(42%)	13	11(85%)	12	7(58%)
Gm	6	0(0%)	0	0(0%)	1	0(0%)
Km	17	8(47%)	5	0(0%)	15	4(27%)
Sm	18	9(50%)	13	3(23%)	10	4(40%)
Tc	31	13(42%)	28	14(50%)	24	8(33%)
Tb	7	0(0%)	0	0(0%)	1	0(0%)
Rp	4	0(0%)	0	0(0%)	1	0(0%)

총 59주 중 내성균이 55주(93%)이며 가축에서 분리한 균은 64주 중 33주(52%)가 내성을 나타내었으며 하천에서 분리한 균은 66주 중 31주(47%)가 내성을 나타내었다. 환자에서 분리한 균에서 다제 내성균은 9제 내성균주가 3주(5%) 8제 내성균주가 5주(9%) 7제 내성균주가 7주(12%) 6제 내성균주가 11주(19%) 5제 내성균주가 8주(14%) 4제 내성균주가 6주(10%) 3제 내성균주가 5주(9%) 2제 내성균가 2주(3%) 1제 내성균주가 8주(14%)였으며 감수성균은 4주(5%)였다.

가축에서 분리한 균의 다제 내성균은 6제 내성균주가 2주(3%) 4제 내성균주가 3주(5%) 3제 내성균주가 8주(13%) 2제 내성균주가 10주(16%) 1제 내성균주가 10주(16%)였으며 감수성균은 31주(48%)였다. 하천에서 분리한 균의 다제 내성균은 7제 내성균주가 2주(3%) 6제 내성균주가 2주(3%) 5제 내성균주가 7주(11%) 4제 내성균주가 5주(8%) 3제 내성균주가 5주(8%) 2제 내성균주가 3주(5%) 1제 내성균주가 7주(11%)였으며 감수성균은 35주(53%)였다.

4제 이상 다제 내성을 보인 균주는 환자에서 분리한 균이 37주(63%) 가축에서 분리한 균이 5주(8%) 하천에서 분리한 균이 16주(24%)로 환자에서 분리한 균이 타 균에 비해 다제 내성 경향이 뚜렷하고 빈도도 높게 나타났다. 그리고 각 균에 대한 항균제 MIC 결과를 Table IV에 표시하였다.

이상을 관찰해 보면 첫째, 동일한 내성패턴과 동

일한 plasmid 분자량을 가진 것. 둘째, 내성패턴은 동일하여도 plasmid 분자량이 서로 다른 것. 셋째, 접합에 의해 내성 획득에 관여한 plasmid 분자량은 대부분이 40 Mgd 이상이었으나 극히 소수가 10 mgd 이하인 경우도 있었다. 또한 접합에 의해 전달된 내성을 약제별로 요약하면 Table VIII과 같다. 환자 유래균에서는 접합에 의해 Sm이 50% 전달되었으며 그 다음이 Km으로 47%, Ap와 Cb가 46%, Tc 42%, Cm 42%가 전달되었으며 Cp, Gm, Tb, Rp는 전달되지 않았다. 가축 유래균은 접합에 의해 Cm이 85% 전달되어 단연 으뜸이었고 그 다음이 Ap와 Cb로 67%, Tc 50%, Sm 23%순으로 전락되었으며 Cp, Gm, Tb, Rp는 전달되지 않았다. 하천 유래균은 접합에 의해 Ap와 Cb가 각각 58.8% 전달되었으며 그 다음이 Cm 58%이며, Sm 40%, Tc 33%, Km 27%순으로 전달되었으며, Cp, Gm, Tb, Rp는 전달되지 않았다.

이상을 비교해 보면 약제내성 대장균에 있어서 전달성 R-plasmid 검출율은 보고자에 따라 다르며 실험조건이나 공시한 피전달균에 따라서도 달라 일률적으로 비교하기 어려운 점이 있고 상당수의 R-plasmid는 비전달성이었다. 비전달성인 R-plasmid는 대장균의 plasmid의 일종인 sex factor(F) 또는 그 이외의 각종 transfer plasmid에 의해 가동화될 수 있으며(Gerry *et al.*, 1974 ; Milliken & Clowes, 1973) transfer plasmid만을 보유하는 대장균도 흔히 나타나는 것으로 알 수 있다.

본 실험에서 특이한 것은 하천에서 분리한 균 No.

51은 Am, Cb, Cp, Cm, Tc 등에 내성을 나타내면서 plasmid 밴드가 나타나지 않았다. 그러나 접합에 의해 내성이 전달되어 Am, Cb, Cm, Tc에 내성을 나타내는 conjugant가 생겼고 이 conjugant 역시 plasmid 밴드가 나타나지 않았다. 이는 R-plasmid에 의하지 않고 내성이 전달된 경우로서 이것은 chromosome이 발휘하는 내성을 transposon이 자리를 옮길 때 함께 이동하여 내성이 전달된 것으로 생각되나 계속 연구되어야 한다고 생각된다.

문 헌

- 1) 강호조, 김용환 : 유아의 병원성 대장균증에 관한 연구, 2. 설사병유아에서 분리한 대장균의 R-Plasmid. 한국수의공중보건학회지 **8**, 25(1984).
- 2) 김경희 : 설사유발 *E. coli* 및 다른 Coliform들의 기준 및 새로 인식된 병독기전에 대하여. 감염 **19**, 225(1987).
- 3) 김기석, 남궁 선, 모인필, 오경록, 남기석 : 국내 시판 사료의 미생물 오염에 관한 연구, 제 1보 단미사료 및 배합사료 중 살모넬라속균 및 대장균속의 분포. 한국수의공중보건학회지 **8**, 33(1987).
- 4) 김익상, 신희섭, 이광호, 차창용, 장우현 : 일부 무의촌지역과 병원에서 분리한 *E. coli*의 항생제 감수성에 대하여. 대한미생물학회지 **12**, 1(1977).
- 5) 박광서, 이유철, 서민호, 설성용, 조동택, 전도기 : 병원재료에서 분리한 Gram 음성간균의 항생제 내성 및 R-Plasmid. 대한화학요법학회지 **1**, 83(1983).
- 6) 서민호, 설성용, 조동택, 전도기 : *Shigella*의 R-Plasmid의 특성과 항균제내성의 본태. 대한화학요법학회지 **2**, 97(1984).
- 7) 서정기 : 장 점막방어기능의 발육학적 미성숙과 영유아 설사. 감염 **19**, 219(1987).
- 8) 설성용, 조성만, 전도기 : 가축유래 대장균의 항균제 내성 및 R-Plasmid. 대한화학요법학회지 **2**, 144(1984).
- 9) 이광호, 김익상, 신희섭, 차창용, 이승훈, 장우현, 임정규 : 무의촌군주 및 병원균주의 항균제내성에 관한 연구. 대한미생물학회지 **15**, 19(1980).
- 10) 이연태, 박경란 : 대장균 및 이질균의 전달성 R-Plasmid에 관한 연구. 감염 **15**, 77(1983).
- 11) 이정상 : 항생제의 부작용. 대한의학협회지 **24**, 229(1981).
- 12) 전성숙, 서수영, 김영부, 오양효, 양학도 : 설사 환자에서의 원인균 분리동정에 관한 연구. 대한미생물학회지 **21**, 417(1986).
- 13) 정규선 : 세균의 약제 감수성에 관한 연구 II. 약학회지 **30**, 55(1986).
- 14) 정태화, 이명원, 이복권, 김기상, 김훈구, 이연태, 홍성노 : 이질균속의 항균제내성. 대한미생물학회지 **19**, 25(1984).
- 15) 정태화, 이연태, 이명원, 이복권, 김기상 : 한국에서 분리된 장내세균(*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* 균속)의 병원적 역할에 관한 연구. 대한미생물학회지 **21**, 73(1986).
- 16) 정태화, 이명원, 이복권, 김기상, 손건영, 이영희, 정윤희, 이연태, 염병운 : 장티푸스균 및 장내세균의 R-Plasmid 내성전달에 관한 연구. 국립보건원보 **23**, 263(1986).
- 17) 정희영 : 내성문제에 대한 대책과 전망. 대한화학요법학회지 **4**, 110(1986).
- 18) 정희영 : 항생 감성의 변화추세. 감염 **18**, 1(1986).
- 19) 조동택, 전도기 : 대장균의 항균제내성 및 전달성 Plasmid. 대한미생물학회지 **17**, 21(1984).
- 20) 조동택 : 항균제 내성기전. 대한화학요법학회지 **1**, 190(1983).
- 21) 조동택 : Plasmid 분석에 의한 원내감염의 역학적 조사. 대한화학요법학회지 **2**, 76(1984).
- 22) 최철순 : 자돈설사증에서 분리된 대장균의 항원과 면역원성-최근의 국내 연구. 한국수의공중보건학회지 **7**, 39(1983).
- 23) 탁연빈, 김영홍, 박창규 : 가축 장내세균의 항생물질에 대한 감수성 및 전달성 내성인자에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지 **3**, 23(1979).
- 24) 하대유, 정선식, 염병규 : 우리나라 가축에서 분리한 *Salmonella* 및 대장균의 내성인자 R의 분포. 대한미생물학회지 **6**, 21(1971).
- 25) Francis. L. Macrina, Dennis J. Kopecko, Keyin. R. Deborah. J. Ayers, and Sara. Mccowen : Short communication. A Multiple Plasmid-containing *Escherichia coli* strain ; Convenient source of size reference plasmids molecules. *Plasmid* **1**, 417(1978).
- 26) Kado, C.I. and Liu, S.T. : Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of bacteriology* **145**, 1365(1981).
- 27) Kitamoto, O.N., Fukaya, K. and kawashima, A. : Drug sensitivity of *Shigella* strains isolated in 1956. *J. Jap. Assan. Infect. Dis.* **30**, 403-405(1956).

- 28) Meynell, G.G. : Bacterial plasmides : *Conjugation colicinogeny and transmissible drug resistance*, Mac Millan Press, London(1974).
- 29) Mitsuhashi, S. : The R factor, *J. Infect. Dis.* **119**, 89(1969).
- 30) Platt, D.J., Sommervill, J.S., Kraft, C.A., and Timbury, M.C. : Antimicrobial resistance and the ecology of *Escherichia coli* plasmids. *J. Hyg., Chem.* **93**, 181(1984).
- 31) Sung Yong Seol : Drug Resistance and R plasmids of *Escherichia coli* in patients and healthy individuals in Korea. *J. Kor. Soc. Microbiol.* **12**, 11(1977).
- 32) Watanabe, T. : Infective heredilty of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriological review* **27**, 87 (1963).