

## 돼지유래 대장균의 항균제내성 분포와 R-plasmid의 성상

정 명 은 · 여 상 건

경상대학교 수의과대학  
(1994년 8월 8일 접수)

### Distribution of antimicrobial resistances and properties of R-plasmids in *E coli* isolated from pigs

Myeong-eun Chung, Sang-geon Yeo

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

(Received Aug 8, 1994)

**Abstract** : *E coli* strains isolated from pigs were investigated with respect to antimicrobial resistances and prevalence of R-plasmids. Also determined were properties of R-plasmids by plasmid conjugation, curing and southern hybridization using gene probes. All of 400 *E coli* strains were resistant to CL and SU, and 0.3% to 96.8% of the strains were resistant to most antimicrobials such as TC, PG, AM, SM, CP, GM, EM, NM, etc, while all strains were sensitive to AK. All strains were also multiply resistant to three to twelve antimicrobials. The resistances to PG, SM, TC, AM, CP, SU and ST were transferable and supposed to be mediated by R-plasmids which were opportunistic for transposition into chromosome.

Plasmids bigger in size than chromosomal DNA were considered as R-plasmids and most plasmids in small size (<4Kb) proved as cryptic plasmids or nonconjugative R-plasmids. In a strain(No 99), AM resistant property was determined from both chromosomal DNA and R-plasmid DNA which is bigger in size than chromosome.

**Key words** : *E coli*, antimicrobial resistances, R-plasmids, DNA-DNA hybridization, conjugation

## 서 론

대장균은 어린 자돈에서 실사증 또는 부종병을 유발하여 발육부진과 높은 폐사를 일으키며, 흔히 성돈이 보균동물로서 자돈에 대한 전파의 기회가 높다. 대장균 감염증을 효과적으로 치료하기 위하여는 조기에 원인 균을 분리동정하고 항균제 감수성검사를 통하여 적절한 약제를 선택함이 필수적이다. 따라서 현재까지 이 병의 치료를 위하여 많은 종류의 항균제가 사용되고 있으나, 약제의 남용과 오용에 따라 내성균의 출현이 증

가하여 치료에 많은 어려움이 있다<sup>1,5</sup>.

세균의 약제내성 획득기전으로는 형질전환에 의하여 단순히 DNA를 받아들이거나 bacteriophage의 매개에 의한 형질도입 또는 접합에 의하여 R-plasmid가 항균제내성을 갖지 않는 세균에게 전달되는 것으로 알려져 있다<sup>6,8</sup>. 특히 장내세균에 있어서는 주로 비염색체성 유전물질인 R-plasmid에 의하여 약제내성이 타균으로 전파됨이 보고되어 있다<sup>1,2,5,6,8,11</sup>

내성균의 출현을 줄이기 위하여는 항균제의 남용을 방지할 수 있는 사회제도적 보완이 요구되지만, 그에

앞서서 항균제 내성균이 가지는 R-plasmid DNA의 성상 등을 비롯한 항균제 내성기전의 분자생물학적 규명이 필요하다<sup>2</sup>. Schwarz와 Blobel<sup>7</sup>은 삼출성표피염에 이환된 돼지로부터 분리한 *Staphylococcus hyicus*에서 tetracycline내성 R-plasmid가 4.55Kb라고 하였다. 또한 이들<sup>12</sup>은 소의 폐렴 유래 *Pasteurella haemolytica*에서 2.8Md의  $\beta$ -lactamase plasmid가 ampicillin, carbenicillin, penicillin 및 ticarcillin내성을 지배한다고 하였다. 서와 서<sup>13</sup>는 *Staphylococcus aureus*에서 penicillin, erythromycin 및 streptomycin내성에 관하여는 36Md 및 47Md의 R-plasmid와 chloramphenicol내성을 가지는 2.0Md 크기의 R-plasmid를 보고하였다. 한편 하 등<sup>2</sup>은 대장균에서 63.2~79.8Md 크기의 R-plasmid들이 chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, sulfamethoxazole, ampicillin, kanamycin, cephalothin, trimethoprim, penicillin, gentamicin 및 cefamandole 등의 항균제에 대한 내성을 나타내었다고 보고하였다.

이와같이 최근에 R-plasmid의 분자생물학적 성상이 구명되고 있으나, 야외분리 세균의 항균제내성 보유상태와 R-plasmid의 특성에 관한 많은 연구가 필요한 실정이다. 본 연구에서는 돼지유래 대장균의 각종 항균제에 대한 내성보유상태 및 R-plasmid DNA의 분자생물학적 성상을 조사하여 내성균 출현에 대한 대책수립의 기본자료를 확보하고자 시도하였다.

## 재료 및 방법

균분리 및 동정 : 1992년 3월부터 5월사이엔 경남

진주근교의 3개 양돈장에서 성돈 47두와 자돈 231두로부터 직장내 분변을 무균적으로 채취하여 균분리 재료로 사용하였다. 분변재료를 MacConkey agar배지에 도말하여 37℃에서 24시간 동안 배양한 다음 nutrient 반유동 한천배지에 보존하면서 공시하였다. 분리균의 동정을 위한 생물학적 성상검사 및 당분해시험은 Edwards와 Ewing<sup>14</sup> 및 Koneman et al<sup>15</sup>의 방법에 따라 실시하였다.

항균제 감수성검사 : 분리한 대장균의 penicillin 등 23종의 항균제에 대한 내성상태를 조사하기 위하여 Steers 등<sup>16</sup>의 한천평판회색법에 준하여 항균제 감수성 검사를 실시하였다. 사용한 항균제의 종류 및 농도는 Table 1과 같으며 내성관정 한계농도는 선행 연구자들의 기준에 따랐다<sup>2,6,10,11,17,23</sup>.

공시균을 nutrient broth배지에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 균액을 BaSO<sub>4</sub> 표준탁도액의 농도(1×10<sup>8</sup>cfu/ml)로 맞추었다. 이 균액을 각 항균제가 함유되어 있는 nutrient agar와 Mueller Hinton agar배지에 multiple inoculator로써 접종하고 37℃에서 24시간 동안 배양하여 발육한 균을 각각 그 약제에 대한 내성균으로 판정하였다.

항균제내성 전달실험 : 분리균이 보유한 항균제내성의 전달성 여부를 조사하기 위하여 Lynn과 Stanley<sup>21</sup>의 방법에 따라 야외분리주를 내성전달균주로, 각 약제에는 감수성이나 nalidixic acid에 염색체 내성인 *E coli* K12(ML1410)균을 피전달균주로 하여 접합실험을 실시하였다. 즉, 내성전달균과 피전달균을 각각 5ml의 brain heart infusion broth(BHIB)배지에서 37℃, 18시간 동안 진탕배양한 후 이를 5ml의 BHIB에 1:100으

Table 1. Drugs used for antimicrobial susceptibility test

Drugs	Concentrations ( $\mu$ g/ml)	Drugs	Concentrations ( $\mu$ g/ml)
Amikacin(AK)	32.0	Kanamycin(KM)	25.0
Ampicillin(AM)	25.0	Moxalactam(MO)	64.0
Carbadox(CD)	25.0	Nalidixic acid(NA)	25.0
Cefazolin(CF)	32.0	Neomycin(NM)	50.0
Cephalexin(CX)	25.0	Penicillin G(PG)	16.0
Cephalothin(CT)	32.0	Rifampicin(RF)	50.0
Chloramphenicol(CP)	25.0	Spectinomycin(ST)	25.0
Clindamycin(CL)	2.0	Streptomycin(SM)	12.5
Colistin(CO)	12.5	sulfamethoxazole(SU)	152.0
Erythromycin(EM)	8.0	Tetracycline(TC)	25.0
Furazolidone(FU)	6.3	Tobramycin(TO)	16.0
Gentamicin(GM)	12.5		

로 회석하여 재배양하고 균수를 내성전달균은  $6 \times 10^4$ ~ $1 \times 10^8$  cfu/ml, 피전달균은  $5 \times 10^8$  cfu/ml로 되게 하였다. 각 균액 0.5ml를 혼합한 후 37°C에서 1시간 동안 배양한 다음 생리식염수로 1:10이 되게 희석한 후 0.1ml를 각 항균제 선택배지에서 37°C, 24시간 배양하였으며, 발육한 균을 다시 항균제 선택배지에 배양하여 발육유무에 따라 내성전달여부를 판정하였다.

**Plasmid 소실실험** : 항균제내성이 R-plasmid에 기인하는 것인가를 조사하기 위하여 Bouanchaud et al<sup>25</sup>의 방법에 따라 접합실험에서 약제내성을 전달받은 균주, 즉 transconjugants를 대상으로 plasmid 소실실험을 하였다. 공시균주를 5ml의 BHIB배지에서 37°C, 18시간 동안 진탕배양한 다음 이 균액 0.5ml를 ethidium bromide(10µg/ml)가 첨가된 BHIB에서 37°C, 48시간 동안 배양하였다. 이 균액을 nutrient agar배지에 도말배양한 후 colony 3개를 임의로 취하여 항균제 선택배지에서 발육여부를 조사하여 항균제내성 소실유무를 조사하였다.

**Plasmid DNA의 분리 및 전기영동** : 항균제내성 대장균이 보유하는 R-plasmid DNA의 성상을 조사하기 위하여 Birnboim과 Doly<sup>26</sup>의 alkaline lysis방법을 응용하여 다음과 같이 이들 균으로부터 plasmid DNA를 분리하였다. 37°C에서 18~20시간 동안 진탕배양한 균액 5ml를 13,000rpm으로 2분간 원침하였으며 여기에 1ml의 STE용액(0.1M NaCl, 10mM Tris · Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)을 가하여 부유시킨 후 다시 원침하였다. 침전균체에 lysozyme(10mg/ml)이 첨가된 20µl의 GET용액(50mM glucose, 25mM Tris · Cl, pH 8.0, 10mM EDTA)을 가하여 재부유시킨 다음 400µl의 lysis buffer[1% sodium dodecyl sulfate(SDS), 0.2N NaOH]를 첨가하여 -20°C에서 10분간 반응시켰다. 여기에 300µl의 7.5M ammonium acetate용액(pH 7.8)을 가하여 -20°C에서 30분~1시간 동안 반응시킨 다음 5분간 원침하여 균체단백질을 침전시켰다. 상청액에 동량의 isopropanol을 가한 후 -20°C에서 2~18시간 동안 반응시켰다. 이것을 원침한 후 100µl의 2M ammonium acetate용액(pH 7.8)을 첨가하여 -20°C에서 5분간 반응시킨 다음 원침하고 상청액에 동량의 isopropanol을 가하고 실온에서 10분간 반응시킨 후 원침하였다. 이 침전물을 건조시킨 후 RNase A(20µg/ml)를 함유하는 50µl의 TE용액(10mM Tris · Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 25µl의 7.5M ammonium acetate용액(pH 7.8)과 75µl의 isopropanol을 가한 다음 원침하여 얻은 R-plasmid DNA를 건조시켰다. 이것을 20µl의 TE용액으로 용해

시킨 후 4µl의 6X dye buffer용액(25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol)을 첨가한 후 ethidium bromide(0.05µg/ml)가 함유된 0.7% agarose gel상에서 6~7시간 동안 전기영동하였다. R-plasmid의 분자량 측정을 위하여 매 전기영동시에 HindIII로 절단된 lambda phage DNA를 marker로 사용하였고 UV transilluminator상에서 plasmid DNA를 확인한 후 polaroid film을 사용하여 촬영하였다.

**Southern blotting** : R-plasmid DNA와 항균제내성 gene probe DNA간의 hybridization 실험을 위하여 Maniatis et al<sup>27</sup>의 방법에 따라 R-plasmid DNA를 southern blotting 시켰다. 먼저 transconjugants 유래의 R-plasmid DNA를 전기영동한 후 gel을 0.2N HCl용액에서 20분간 침적한 다음 증류수로 3회 세척하였다. 이 gel을 denaturation 용액(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)에서 15분간 2회 침적하여 변성시키고 neutralization 용액(1M Tris · Cl, pH 7.4, 1.5M NaCl)으로 30분간 중화시킨 후 R-plasmid DNA를 nitrocellulose membrane에 blotting시켰다.

**Probe DNA의 생산** : DNA-DNA hybridization을 위한 probe DNA는 digoxigenin labeling Kit (Boehringer Mannheim)을 이용하여 생산하였다. 즉, plasmid vector pCM7(Pharmacia)을 HindIII효소로 절단하여 chloramphenicol 내성 gene(Cp' gene) DNA를 분리하였다. 또한 pBR322 vector(Pharmacia)를 EcoRI와 PstI 및 HindIII와 Aval효소로 절단하여 각각 ampicillin내성 gene(Am' gene) 및 tetracycline내성 gene(Tc' gene) DNA를 얻었다. 이 DNA를 100°C에서 10분간 끓여 denaturation 시킨 후 single-strand DNA로 만들었다. 여기에 2µl의 hexaprimer와 2µl dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 및 digoxigenin이 표지된 dUTP를 첨가하고 1µl의 Klenow효소를 가하여 37°C에서 18시간 동안 반응시킨 다음 2µl의 EDTA용액을 가하여 반응을 정지시켰다. 이어서 4M lithium chloride 용액과 100% ethanol을 가한 후 침전시켰으며 이것을 50µl의 TE용액(100mM Tris · Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)에 부유시킴으로서 digoxigenin이 표지된 gene probe DNA를 얻었다.

**R-plasmid의 검출을 위한 DNA-DNA hybridization 및 효소면역반응** : 특정 항균제내성을 보유하는 R-plasmid를 구명하기 위하여 다음과 같이 DNA-DNA hybridization 반응 및 DNA detection kit (Boehringer Mannheim)를 이용한 효소 면역반응을 실시하였다. Nitrocellulose membrane에 blotting된 transconjugants의 R-plasmid DNA와 40ml의 prehybrid-

zation용액(5X SSC, 1% blocking reagent, 0.1% N-lau-  
 roylsarcosine, 0.02% SDS)을 plastic bag에 넣고 밀봉한  
 후 68℃에서 24시간 동안 prehybridization 하였다. 여  
 기에 10 $\mu$ l의 digoxigenin이 표지된 probe DNA를 첨가  
 하여 68℃에서 24시간 동안 hybridization 반응을 시킨  
 다음 2X SSC 및 0.1X SSC로 각각 2회 세척하였고  
 buffer 1 용액(0.1M maleic acid, 0.15M NaCl, pH 7.5)  
 으로 1회 세척하였다. 이어서 100ml의 buffer 2 용액  
 (1% blocking solution)을 가하고 실온에서 30분간 반  
 응시킨 후 50ml의 anti-digoxigenin alkaline phosphatase  
 conjugate(1:500 희석액)를 첨가하여 실온에서  
 30분간 반응시켰다. 이것을 100ml의 buffer 1 용액으  
 로 세척한 다음 50ml의 buffer 3 용액(100mM Tris ·  
 Cl, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5)으로 평형시  
 킨 후 10ml의 chromogen용액(10ml의 buffer 3 용액에  
 45 $\mu$ l의 nitroblue tetrazolium용액과 35 $\mu$ l의 5-bromo-  
 4-chloro-3-indolyl phosphate 용액을 혼합한 것)을 첨  
 가하여 plastic bag에 넣고 봉한 후 어두운 곳에서 수분  
 내지 3일 동안 발색반응을 관찰하였다.

## 결 과

돼지분변 유래 대장균의 항균제내성 보유상태와 R-  
 plasmid의 성상을 조사하기 위하여 대장균을 분리하였  
 던 결과 Table 2와 같이 3개 농장의 성돈 47두와 자돈  
 231두로부터 총 400주를 분리하였다.

Table 2. *E. coli* strains isolated from swine fecal samples

Farms	No of Pigs		No of strains isolated
	Adults	Piglets	
A	16	71	137
B	10	90	167
C	21	70	96
Total	47	231	400

분리된 400주는 indole시험, MR시험, nitrate환원시  
 험에서 양성반응을 나타내었다. 또한 VP시험, urease시  
 험, citrate시험, KCN시험, malonate시험, phenylalan-  
 ine deaminase시험, gelatin액화시험, oxidation시험에  
 서는 음성반응을 나타내어 대장균의 생물학적 성상과  
 일치하였다(Table 3).

또한 분리균들의 당분해성상도 glucose, lactose,

sucrose, mannitol, sorbitol, salicin 분해양성 및 adoni-  
 tol, dulcitol 분해음성으로 대장균의 성상과 일치하였다  
 (Table 4).

Table 3. Biological characteristics of 400 isolates of *E. coli*

Characteristics	Reactions	No of strains(%)
Indole	+	400(100.0)
MR	+	400(100.0)
VP	-	400(100.0)
Urease	-	400(100.0)
Citrate	-	400(100.0)
KCN	-	400(100.0)
Nitrate reduction	+	400(100.0)
Malonate	-	400(100.0)
Sodium acetate	+	390( 97.5)
Phenylalanine deaminase	-	400(100.0)
Gelatin liquefaction	-	400(100.0)
Oxidation	-	400(100.0)

+, Positive reaction -; Negative reaction

Table 4. Carbohydrate fermentation properties of 400 isolates of *E. coli*

Carbohydrate	Fermentation	No of strains (%)
Glucose	AG	392( 98.0)
Lactose	+	400(100.0)
Sucrose	+	190( 47.5)
Mannitol	+	399( 99.8)
Inositol	+	379( 94.8)
Sorbitol	+	285( 72.3)
Salicin	+	113( 28.3)
Adonitol	-	369( 92.3)
Dulcitol	-	389( 97.3)

+, Positive reaction -; Negative reaction

AG; Acid and gas production

분리된 대장균 400주의 23종 항균제에 대한 감수성  
 성적은 Table 5와 같다. AK에 대하여는 전균주가 감수  
 성이었으나 CD, CX, CF, NA, CO, RE, MO에는 0.3~  
 9.8%의 균주가 내성을 나타내었다. KM, AM, CT, CP,  
 GM, FO, NM, FU에 대하여는 11.8~39.8%의 균주가  
 내성을, TC, PG, EM, SM, ST에는 63.8~96.8%의 균주  
 가 내성을, CL, SU에는 전 균주가 내성을 나타내었다.

공시균 400주는 전균주가 3~12종의 항균제에 대한

Table 5. Susceptibilities of 400 *E coli* isolates to antimicrobials

Drugs	No of resistant strains(%)
Clindamycin(CL)	400(100.0)
Sulfamethoxazole(SU)	400(100.0)
Tetracycline(TC)	387( 96.8)
Penicillin G(PG)	368( 92.0)
Erythromycin(EM)	365( 91.3)
Streptomycin(SM)	326( 81.5)
Spectinomycin(ST)	255( 63.8)
Kanamycin(KM)	159( 39.8)
Ampicillin(AM)	134( 33.5)
Cephalothin(CT)	106( 26.5)
Chloramphenicol(CP)	85( 21.3)
Gentamicin(GM)	73( 18.3)
Tobramycin(TO)	72( 18.0)
Neomycin(NM)	61( 15.3)
Furazolidone(FU)	47( 11.8)
Carbadox(CD)	39( 9.8)
Cephalexin(CX)	23( 5.8)
Cefazolin(CF)	16( 4.0)
Nalidixic acid(NA)	14( 3.5)
Colistin(CO)	4( 1.0)
Rifampicin(RF)	3( 0.8)
Moxalactam(MO)	1( 0.3)
Amikacin(AK)	0

다제내성균이었다. 다제내성을 보였던 항균제의 수 및 약제내성형별로 볼 때 12약제내성형이 24종, 11약제내성형이 34종, 10약제내성형이 26종, 9약제내성형이 27종, 8약제내성형이 24종, 7약제내성형이 17종, 6약제내성형이 15종, 5약제내성형이 7종 및 4약제와 3약제내성형이 각각 1종이었다(Table 6).

Table 6. Multiplicity of drug resistances in 400 *E coli* isolates

No of resistant antimicrobials	No of resistant patterns	No of strains	% of strains (cumulative %)
12	24	39	9.8( 9.8)
11	34	51	12.7( 22.5)
10	26	54	13.5( 36.0)
9	27	48	12.0( 48.0)
8	24	45	11.2( 59.2)
7	17	71	17.7( 76.9)
6	15	59	14.7( 91.6)
5	7	23	5.8( 97.4)
4	1	5	1.3( 98.7)
3	1	5	1.3(100.0)

Table 7. Conjugative transferability of multiple drug resistances in *E coli*

Strain No	Resistant patterns	
	Donors	Transconjugants
625	PG TC AM CP SM KM ST FU EM CT TO SU	PG TC AM CP ST EM SU
440	PG TC AM CP SM KM ST GM EM NM TO SU	PG TC AM CP SM ST EM SU
366	PG TC AM SM KM ST GM EM TO SU	PG TC AM SM ST EM SU
55	PG TC AM CP SM ST FU EM SU	AM ST EM
64	PG TC AM CP SM ST CD EM SU	PG TC AM CP SM ST EM SU
414	PG TC AM SM KM ST EM SU	TC AM ST EM SU
428	PG TC AM SM KM ST EM SU	PG TC AM ST EM SU
93	PG TC AM SM KM ST EM SU	PG TC AM SM ST EM SU
329	PG TC AM SM ST EM SU	TC AM CP SM ST EM SU
33	PG TC AM SM ST EM SU	PG EM
397	PG TC AM SM ST EM SU	PG AM ST EM SU
39	PG TC AM ST EM SU	PG TC AM SM ST EM SU
2	PG TC AM ST EM SU	PG AM SU
26	PG TC AM ST EM SU	PG AM ST EM SU
36	PG TC AM SM EM SU	TC AM SM ST EM SU
313	PG TC AM SM EM SU	PG TC AM SM ST EM
27	PG AM ST EM SU	PG TC ST EM SU
168	PG TC AM EM SU	PG AM EM
44	PG AM EM SU	TC AM SM ST EM SU
99	PG AM EM SU	PG AM EM
249	PG AM EM SU	PG AM ST EM

다제내성 대장균이 보유한 R-plasmid의 전달성여부를 조사하기 위하여 공시균 400주 중 임의로 21주를 선택하여 실시한 접합실험의 결과는 Table 7과 같다. 내성전달균으로부터 transconjugants에게 다양한 형의 약제내성이 전달되었으며, PG, TC, AM, CP, SM, ST, EM 또는 SU내성 등이 전달성이었다.

특정 항균제내성을 보유하는 R-plasmid를 구명하기 위하여 plasmid DNA의 성장조사 및 소실실험을 하였던 결과는 다음과 같다.

Transconjugant 21주를 대상으로 약제내성 plasmid 소실실험을 하였을 때 PG, EM, SU에 대한 내성은 소실되지 않았으나 TC, AM, SM 또는 ST에 대한 내성은 균주에 따라서 소실되거나 잔존하였다(Table 8).

Table 8. Drug resistant patterns of *E. coli* transconjugants after curing

Strain No	Resistant patterns	
	Before curing	After curing <sup>a</sup>
440	PG TC AM CP SM ST EM SU	PG EM SU
64	PG TC AM CP SM ST EM SU	PG TC CP SM ST EM SU
625	PG TC AM CP ST EM SU	PG EM SU
366	PG TC AM SM ST EM SU	PG AM*SM*ST*EM SU
39	PG TC AM SM ST EM SU	PG TCAM*SM*ST EM SU
313	PG TC AM SM ST EM	PG TC SM EM
93	PG TC AM ST EM SU	PG AM*EM SU
428	PG TC AM ST EM SU	PG EM*SU
27	PG TC ST EM SU	PG EM SU
397	PG AM ST EM SU	PG EM SU
26	PG AM ST EM SU	PG AM*EM SU
249	PG AM ST EM	PG AM*EM
168	PG AM EM	PG AM*EM
99	PG AM EM	PG AM*EM
2	PG AM SU	PG AM*SU
33	PG EM	PG EM
329	TC AM CP SM ST EM SU	TC*AM*CP*SM*ST*EM SU
36	TC AM SM ST EM SU	AM SM ST EM SU
44	TC AM SM ST EM SU	EM SU
414	TC AM ST EM SU	EM SU
55	AM ST EM	AM*EM

a : Results were obtained from three colonies after curing by ethidium bromide at 37°C.

\* : Resistant plasmids to these drugs were cured or not.

또한 접합실험에서 내성전달균주로 사용한 21주로부터 분리한 plasmid DNA를 전기영동하였을 때 내성 약제의 종류 및 수에 관계없이 염색체 DNA보다 크거나 1~9Kb 크기의 plasmid DNA가 다양하게 관찰되었다(Fig 1).

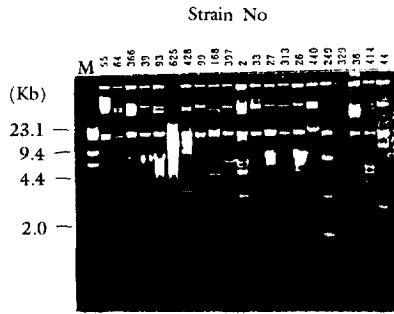


Fig 1. Plasmid DNAs in 21 *E. coli* donors used for conjugation: M, *Hind*III digested  $\lambda$  DNA marker.

한편 이들 약제내성 전달균으로부터 접합에 의하여 약제내성을 전달받은 transconjugant 21주는 대부분이 Fig 2와 같이 내성전달균에서 관찰되었던 염색체 DNA 보다 큰 plasmid들을 보유하고 있었다. 반면에 내성전달균에서 볼 수 있었던 4Kb 이하의 plasmid 중 상당수는 transconjugants에서 관찰되지 않았으며, 접합 및 소실실험으로는 특정 항균제내성 R-plasmid를 구명하기가 어려웠다. 따라서 gene probe를 이용하여 특정 R-plasmid를 확인하고자 다음과 같은 실험을 수행하였다. 공시균 중 99번 균주는 내성전달균에서 PG, AM, EM내성을 보유하는 균주로서 염색체 DNA보다 큰



Fig 2. R-plasmid DNAs in 21 *E. coli* transconjugants after conjugative transfer of drug resistances: M, *Hind*III digested  $\lambda$  DNA marker.

1개의 plasmid와 약 4.5Kb의 Plasmid 1개를 보유하고 있었다. 이 균주를 대상으로 ampicillin내성 R-plasmid의 존재유무를 규명하고자 DNA-DNA hybridization을 실시하였다.

Hybridization에 사용된 약제내성 gene probe DNA의 전기영동상은 Fig 3과 같다. Chloramphenicol내성 gene (Cp' gene)은 4060bp 크기의 plasmid vector pCM7을 HindIII효소로 절단하여 분리되는 787bp 크기의 절편이다. 또한 ampicillin과 tetracycline내성 gene(Am' gene, Tc' gene)은 4363bp 크기의 pBR322 vector를 EcoRI과 PstI 및 HindIII와 AvaI효소로 절단하여 분리되는 각각 752bp와 1396bp 크기의 절편이다.

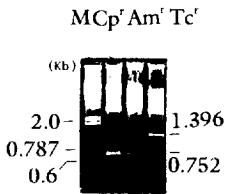


Fig 3. Plasmid DNAs used as probes for antibiotic resistance gene probes: Cp', chloramphenicol resistant DNA from pCM7 vector digested by HindIII; Am', ampicillin resistant DNA from pBR322 vector digested by EcoRI and PstI; Tc', tetracycline resistant DNA from pBR322 vector digested by HindIII and AvaI; M, HindIII digested  $\lambda$  DNA marker.

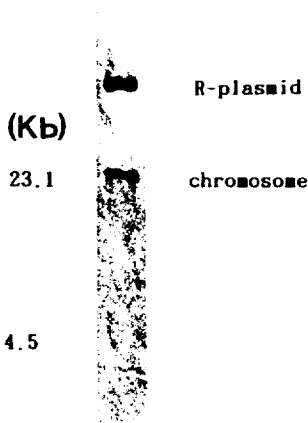


Fig 4. Southern hybridization of *E. coli*(No.99) DNA with probe DNA of ampicillin resistance.

Am' gene probe DNA와 99번 균주의 plasmid DNA간의 southern hybridization 결과 Fig 4와 같이 염색체 DNA 및 이보다 큰 plasmid DNA가 Am' gene probe와 hybridization되었다. 반면에 이 균이 보유하고 있던 약 4.5Kb의 plasmid는 hybridization 되지 않았다.

또한 99번 균주의 DNA와 Cp' gene 또는 Tc' gene probe DNA간에서는 hybridization이 되지 않았다. 따라서 99번 균주의 염색체 및 염색체보다 큰 plasmid DNA가 ampicillin 내성을 보유함을 알 수 있었다.

## 고 찰

대장균은 동물과 사람의 장내 및 자연환경에 광범위하게 분포되어 있으며 흔히 어린 자돈에서 설사병 또는 부종병의 원인이 되고 있다<sup>2,3,5,28</sup>. 많은 종류의 항균제가 대장균 감염증의 치료에 이용되고 있으나, 남용 또는 연용으로 인한 약제내성균의 출현이 가축위생 및 공중보건상 중요한 문제로 대두되고 있다<sup>1,5,11,19</sup>. 따라서 대장균 감염증에 대한 적절한 치료약제의 선택을 위하여 각종 항균성 물질에 대한 내성파악이 주기적으로 이루어져야 할 것이다.

이 실험에서는 돼지로부터 분리된 대장균의 항균제 감수성을 조사하였을 때, aminoglycoside 계열의 항균제인 AK와 최근에 개발된 cephalosporin 계열의 MO 등에는 높은 감수성을 나타내어 이들 약제의 효과가 우수함을 알 수 있었다. 또한 RF, CO, NA, CF, CX, CD 등에 대하여도 내성균의 출현율이 19.8%이하로 약효가 비교적 우수함을 알 수 있었다. 이에 비하여 임상에서 흔히 사용되고 있는 TC, PG, SM, ST, EM, CI, SU 등에는 63.8-100%의 균이 내성을 나타내어 대장균 감염증의 치료에 부적합한 약제임을 알 수 있었다. 이와 같은 성적은 하 등이 사람에서 분리한 *E. coli*의 항균제 감수성 조사 결과와 거의 일치하였다. 즉, 이들은 amikacin, moxalactam, cefamandole, nalidixic acid 및 rifampicin에는 0-38%의 균주가 내성을 나타내었고, gentamicin과 cephalothin에도 18.3%-21.2%의 균주가 내성을, kanamycin, streptomycin, chloramphenicol 및 trimethoprim에는 41.3-57.7%의 균주가 내성을 나타내었고, penicillin, ampicillin, tetracycline 및 sulfamethoxazole에는 67.6-83.7%의 균주가 내성을 나타내었다고 하였다.

한편 본 연구에서 다제내성균주 중 21주를 임의로 선정하여 접합실험을 통한 다제내성균의 내성전달성 여부를 조사하였을 때, PG, SM, TC, AM, CP, EM,

SU 및 ST에 대한 내성이 대부분 전달성 내성이었다. 따라서 이들 약제내성이 R-plasmid에 기인한 전달성내성이라고 생각되었다<sup>2,8,9,29</sup>.

이들 약제내성을 보유하는 R-plasmid를 구명하고자 transconjugant 21주를 대상으로 plasmid 소실실험을 하였던 결과, PG, EM, SU내성은 소실되지 않았으며 TC, AM, CP, SM, EM 또는 ST내성은 소실되거나 잔존함으로써 plasmid 소실실험으로는 특정 R-plasmid의 존재를 파악할 수 없었다. 한편 Rubens et al<sup>30</sup>은 약제내성 plasmid의 대부분이 transposon으로서 어떤 경로에 의하여 숙주세균의 염색체에 삽입될 수 있다고 보고한 바 있다. 이와 같은 사실로 볼 때 plasmid 소실실험에서 소실되지 않았던 PG, EM, SU내성은 원래 내성전달균으로부터 plasmid상태로 transconjugants에 전달되었으나, 이들 plasmid DNA가 transconjugants의 염색체 DNA에 삽입되어 내성을 나타낸 것으로 생각되었다. 또한 TC, AM, SM, CP 및 ST내성은 plasmid 소실실험 후에 대장균에서 소실되거나 잔존하는 것으로 볼 때 염색체 DNA에 삽입되거나 R-plasmid의 상태로 내성을 나타내었던 것으로 생각되었다.

이들 R-plasmid의 분자생물학적 특성을 조사하기 위하여 대장균으로부터 R-plasmid DNA를 분리하여 전기영동하였던 결과 내성약제의 종류 및 수에 관계없이 염색체 DNA 보다 크거나 4Kb이하인 다양한 크기와 수의 plasmid DNA가 관찰되었다. 따라서 이들 plasmid중 일부가 특정항균제에 대한 내성을 보유하는 R-plasmid인 것으로 추측되었다. 접합에 의하여 약제내성을 전달받은 transconjugants 21주로부터 분리한 plasmid DNA의 전기영동 결과로는 내성전달균에서 관찰되었던 염색체 DNA보다 큰 plasmid들의 상당수가 transconjugants에서도 관찰되었으며, 이와 같은 사실로 볼 때 염색체 DNA보다 큰 plasmid들이 대부분 접합성의 R-plasmid인 것으로 추측되었다. 반면에 내성 전달균에서 볼 수 있었던 크기가 4Kb 이하인 plasmid 중 다수는 transconjugants에서 관찰되지 않았으므로 이들은 cryptic plasmid<sup>29</sup>이거나 비접합성 R-plasmid인 것으로 생각되었다. 이와 같은 사실은 Davies et al<sup>31</sup>이 60~120Kb의 큰 plasmid들은 대부분 접합성 plasmid이고, 1.5~15Kb 정도의 작은 plasmid들은 비접합성 plasmid라고 한 것과 거의 일치함을 알 수 있었다.

공시균 중 99번 균주는 내성전달균에서 PG, AM, EM, SU내성을, transconjugants에서는 PG, AM, EM 내성을 보였던 균으로서, 이 균의 AM내성은 plasmid 소실실험에서 소실되거나 잔존하는 것으로 보아 R-plasmid 또는 염색체에서의 transposon 상태로서 내성

을 나타낸 것으로 생각되었다. 이 균주는 염색체 DNA 보다 큰 1개의 plasmid와 약 4.5Kb 크기의 plasmid 1개를 보유하고 있으며, 이 균주를 대상으로 Am<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup> 및 Cp<sup>r</sup> gene probe DNA와의 hybridization을 실시하였다. 그 결과 염색체 DNA 및 이보다 큰 plasmid DNA가 Am<sup>r</sup> gene과 hybridization됨으로서 AM내성은 transposon으로서 염색체에 삽입되거나 또는 plasmid 상태로 존재함을 알 수 있었다. 한편 이 균이 보유하고 있던 약 4.5Kb의 plasmid는 hybridization 되지 않았으므로, 이 plasmid는 AM내성과는 관련이 없음을 알 수 있었다. 또한 99번 균주의 plasmid 및 염색체 DNA는 Cp<sup>r</sup> gene 및 Tc<sup>r</sup> gene과는 hybridization이 되지 않았으며 이것은 이 균이 CP, TC내성을 보유하지 않는 사실과 일치하였다.

이와같이 항균제에 대한 내성은 R-plasmid 뿐만 아니라 염색체 DNA에도 transposon으로 존재하고 있으며<sup>1,2,9,31,32</sup>, 항균제내성을 방지하기 위하여는 항균제의 개발 및 효과적인 사용과 병행하여 특정 항균제내성과 관련된 transposon 및 R-plasmid의 성상에 관한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

## 결 론

폐지로부터 대장균을 분리하여 23종의 항균제에 대한 내성보유상태를 조사하고 특정 항균제내성 R-plasmid를 구명하기 위하여 접합실험, plasmid 소실실험 및 항균제내성 gene probe를 이용한 DNA-DNA hybridization 실험을 하였다. 그 결과 공시균 총 400주는 amikacin에 모두 감수성이었으나, clindamycin, sulfamethoxazole에 대하여는 전균주가 내성이었으며, 기타의 공시약제에 대하여도 0.3~96.8%의 균주가 내성을 나타내었다. 또한 전균주가 3~12종의 항균제에 대한 다제내성균이었으며 penicillin, streptomycin, tetracycline, arapicillin, chloramphenicol, erythromycine, sulfamethoxazole 및 spectinomycin내성은 전달성으로서 R-plasmid가 매개하는 것으로 생각되었다.

이들 R-plasmid는 대부분 염색체 DNA보다 크기가 큰 DNA로 확인되었으며, 4Kb이하의 작은 plasmid들은 cryptic plasmid 또는 비접합성 R-plasmid인 것으로 생각되었다. 99번 균주에서 ampicillin 내성인자를 염색체 및 염색체 DNA보다 큰 R-plasmid에서 확인되었다.

## 참 고 문 헌



1. Davies J. Another look at antibiotic resistance. *J Gen Microbiol* 1992; 138: 1553-1559.
2. 하경임, 서성일, 박종욱 등. 대장균의 R-plasmid의 특성과 항균제내성. *대한미생물학회지* 1990; 25(1): 19-26.
3. 정수관, 정석찬, 최원필. 돼지유래 대장균의 생물학적 특성과 plasmid profile에 대하여. *대한수의학회지* 1990; 30(3): 287-295.
4. 탁연빈, 김영홍, 박청규. 가축 장내세균의 항생물질에 대한 감수성 및 전달성 내성인자에 관한 연구. *한국수의공중보건학회지* 1979; 3(1): 23-28.
5. 여상건, 김정우. 설사자돈유래 *Escherichia coli*의 항균성물질 내성 및 R-plasmids. *경상대학교 축산진흥연구소보* 1985; 12: 45-49.
6. Sato G, Oka C, Asagi M, et al. Detection of conjugative R plasmids conferring chloramphenicol resistance in *Escherichia coli* isolated from domestic and feral pigeons and crow. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig* 1978; A241: 407-417.
7. Schwarz ST, Blobel H. Isolation and restriction endonuclease analysis of a tetracycline resistance plasmid from *Staphylococcus hyicus*. *Vet Microbiol* 1990; 24: 113-122.
8. Watanabe T. Infective heredity of mutiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol Rev* 1963; 27: 87-115.
9. Hardy KG. Plasmids. IRL Press, Oxford England. 1987; 50-74.
10. Mitsuhashi S, Hashimoto H, Suzuki K. Drug resistance of enteric bacteria. XIII. Distribution of R factors in *Escherichia coli* strains isolated from livestock, *J Bacteriol* 1967; 94(4): 1166-1169.
11. 박청규. 젖소유방염유래 장내세균의 약제내성 및 R-plasmids. *대한수의학회지* 1981; 21(1): 25-31.
12. Schwarz ST, Spies U, Reitz B, et al. Detection and interspecies-transformation of  $\beta$ -lactamase-encoding plasmid from *Pasteurella haemolytica*. *Zbl Bakt Hyg* 1989; A 270: 462-469.
13. 서성일, 서민호. 황색포도구균의 항균제내성의 유전적 특성. *대한미생물학회지* 1991; 26(1): 1-23.
14. Edwards PR, Ewing WH. Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing Co, 93-136.
15. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR Jr, et al. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 3rd ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1988; 89-156, 473-534.
16. Steers E, Plotz EL, Graves BS. Inocular replating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chemother* 1959; 9: 307-311.
17. Hanzawa Y, Oka C, Ishiguro N, et al. Incompatibility groups of R-plasmids in *Escherichia coli* isolated from animal waste. *Jpn J Vet Sci* 1984; 46(4): 453-457.
18. Ishiguro N, Gato J, Sato G. Genetical relationship between R plasmids derived from *Salmonella* and *Escherichia coli* obtained from a pig farm and its epidemiological significance. *J Hyg Camb* 1979; 34: 365-379.
19. 정유주, 탁연빈. 닭에서 분리한 *Escherichia coli*의 중금속 및 항생물질 내성에 관하여. *한국수의공중보건학회지* 1981; 5(1): 25-30.
20. Kinjo T. Drug resistant strains of bacteria isolated from domestic animals in okinawa II. Distribution of R factors in fecal *E coli* strains isolated from pigs and chickens. *Sci Bull Coll Agr Univ Ryukyus* 1974; 21: 389-402.
21. Krumperman PH. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied Environ Microbiol* 1983; 46(1): 165-170.
22. Sato G, Inchiyo S, Konishi T. Incompatibility of R plasmids derived from *Salmonella* and *Escherichia coli* strains isolated simultaneously from a bovine fecal sample. *Am Vet Med Assoc* 1980; 41(12): 1982-1986.
23. 탁연빈, 정길택. 돈유래 *Escherichia coli*의 항생물질 내성 및 전달성 내성인자에 관하여. *대한수의학회지* 1976; 16(12): 159-163.
24. Lynn PE, Stanley F. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1980; 433-453.
25. Bouanchaud DH, Scavizzi MR, Chabbert YA. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and *Staphylococci*. *J Gen Microbiol* 1969; 54: 417-425.
26. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid

- DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1513-1515.
27. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. Molecular cloning. a Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; 9.31-9.62.
28. 김봉환, 김동성, 이창구. 자돈의 병원성 대장균증에 관한 연구. I. 양돈농가 실태 및 설사자돈에서 분리한 대장균의 성장조사. *대한수의학회지* 1981; 21(2): 81-86.
29. Novick RP. Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol Rev* 1969; 33: 210-235.
30. Rubens CE, McNeil WF, Farrar WE. Evolution of multiple antibiotic plasmids mediated by transposable plasmid deoxynucleic acid sequences. *J Bacteriol* 1979; 140: 713-719.
31. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, et al. 1990. Microbiology. 4th ed. Philadelphia, Pennsylvania: JB Lippincott Co, 1990; 123-141, 220-224.
32. Foster TJ. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol Rev* 1983; 47(3): 361-409.
-