

Gentamicin 고도내성 *Enterococcus faecalis* 균주의 항균제감수성, R-플라스미드 및 항원의 특성연구

건국대학교 유전공학연구소

강 현

국문초록: 임상거체에서 분리 동정한 *E. faecalis* 균주에 대하여 gentamicin 및 타 항균제에 대한 감수성을 조사했고, R-플라스미드 DNA 패턴 및 제한효소에 의한 DNA 단편분석, filter-mating에 의한 gentamicin 플라스미드 DNA 전이, R-플라스미드 DNA 제거, tetracycline 내성 유전자 확인, 항원분석을 실시하였다. 분리된 40주 *E. faecalis* 모두가 gentamicin에는 내성이었고, 25주는 요 검체에서 분리되었으며, 이 40균주들 중 95%가 입원환자에서 분리되어 중요한 원내감염균임을 알 수 있었다. Gentamicin 고도내성 *E. faecalis*는 24주(60%)이었고, 최소억제농도의 범위는 ampicillin이 1~64µg/ml, Chloramphenicol 이 8~128 µg/ml 과 erythromycin 128 µg/ml, vancomycinol 1~2 µg/ml이었다. 분리한 Gentamicin 고도내성 *E. faecalis* HL-1은 4가지 항균제에 모두 내성이었고, 7종류의 플라스미드가 있었다. HL-2와 HL-3은 모두 6종류, HL-4는 7종류, HL-5는 4종류 그리고 HL-6은 5종류의 플라스미드가 있었다. *E. faecalis* HL-1과 HL-6의 내성전달 빈도는 6.3×10^{-4} 과 3.7×10^{-5} 이었으며, *E. faecalis* HL-1의 내성전달 빈도가 높았다. 접합에 의해 *E. faecalis* HL-1과 HL-6의 플라스미드 중 51.7 Kb 크기의 전이된 DNA가 확인되어 gentamicin 내성이 플라스미드 전이에 의한 것임을 알 수 있었다. Tetracycline 유전자는 *E. faecalis* transconjugants R-1의 2.15 Kb 플라스미드에 있었다. 공여균주 및 transconjugants균주의 항원성을 Immunoblotting으로 분석한 결과 *E. faecalis* HL-1과 *E. faecalis* transconjugants R-1균주는 97.8, 46.8 Kd의 분자량을 갖는 단백질과 공통적으로 반응하였고, *E. faecalis* HL-6와 *E. faecalis* transconjugants R-6균주는 46.8 Kd의 분자량을 갖는 단백질과 공통적으로 반응하였다. 그 반응의 강도는 85.8, 97.8, 46.8, 33.7, 63.5와 74.8 Kd 순이었다. 공여균주 *E. faecalis* HL-6에서는 반응하지 않았던 97.8, 95.8, 74.8와 63.5 Kd의 단백질이 *E. faecalis* transconjugants R-6균주에서 반응하였다. 이들 중 특이성 단백질을 *Invitro*에서는 배양되지 않는 *E. faecalis*에 대한 혈청학적 진단의 항원으로 이용한다면 유용할 것이다.

서 론

임상검체에서 가장 흔히 분리되는 균주의 하나가 *E. faecalis*이며, 또한 가장 많은 각종 감염증을 일으키는 것으로 보고되었다²⁰. *E. faecalis*는 장내의 상재균이지만, 심내막염, 요로감염, 창상감염, 복부와 골반 염증성질환 등을 일으키며, 드물게는 뇌막염도 일으킬 수 있다는 보고가 있었다^{15,25,30}.

*Enterococcus*는 전 세계적으로 병원내 감염을 일으키는 빈도가 증가하고 있다^{5,25,34,35,38}. 다제내성의 증가로 인하여 그 치료에 대해 관심이 집중되고 있는 바, 국내에서도 병원균으로서 분리가 증가하는 추세이며, 여러 약제에 대한 내성율의 증가가 보고되고 있다^{23,24,38}. *Enterococcus*의 glycopeptide 내성 균주는 1986년 프랑스에서 처음 분리되었다. 최근에는 *Enterococcus* 중에 aminoglycoside계열 항균제에 대해서 뿐만 아니라 vancomycin에 내성이며 β -lactamase를 생성하는 균주도 있어서 감염환자의 치료가 점점 어려워지고 있다. 근년에 *Enterococcus*는 항균제 다

*논문접수 1995년 10월 30일, 수정재접수 1995년 11월 25일.

*별책요청 저자

제내성 뿐만 아니라 고농도의 항균제에 의해서도 억제되지 않기 때문에 문제가 되고 있다²⁵⁾.

Streptomycin은 Enterococcus의 50%이상 균주가 이 약제에 고도내성(MIC, $\geq 2.000 \mu\text{g/ml}$)이었던 1970년대 까지 임상에서 사용하였던 aminoglycoside제제이다¹³⁾. Gentamicin에 대한 *E. faecalis* 고도내성은 1979년 프랑스에서 처음 보고되었다. 이러한 감염질환에는 penicillin G와 streptomycin 혹은 kanamycin과의 병합요법으로는 치료가 되지 않았다. 이러한 내성은 플라스미드에 의해 나타나며, 근년에는 이러한 고도내성균주들이 미국 및 여러나라 등에서 분리되었으나^{7, 9, 15, 17, 23, 24, 25, 29, 31, 38)}, 국내에서는 아직 Enterococcus의 gentamicin에 대한 고도내성율이 보고된 바 없을 뿐 아니라, 항균제 감수성시험도 몇가지 항균제에 대해서만 디스크법으로 시험하고 있는 것이 현재의 실정이라서 임상검체에서 분리된 Enterococcus에 대한 gentamicin에 대한 고도내성을 조사하는 것이 필요하다. 고도내성균에 대한 빈도는 점차 증가하여 지역에 따라 차이가 있지만 1980년대 이후 streptomycin, kanamycin과 gentamicin 각각에 대해 50%가 넘는 고도내성이 보고되어 지난 10년간 혈액이나 기타 정상적으로는 무균상태인 검체에서 Enterococcus가 분리되는 경우는 aminoglycoside에 대한 고도내성을 선별해 줄 필요성이 크게 증가하였다¹³⁾. Enterococcus에 있어서 항균제 내성은 염색체에 유전자가 있는 경우와 플라스미드에 존재하는 유전자에 의하여 일어난다²⁹⁾. 특히 Gentamicin 고도내성균주는 플라스미드 전이와 aminoglycoside modifying 효소에 의하여 발현된다³⁸⁾. 또한 이 균주들은 penicillin과 aminoglycoside제제와 병합치료에 상승작용하는 살균능력이 소실된다는 것이 보고되었으며, 고도내성의 주요기전은 플라스미드에 의해 전이되는 aminoglycoside를 불활성화 하는 3가지 효소가^{2, 14, 23, 24)} 대표적으로 streptomycin 내성은 streptomycin에 특이적인 adenylyltransferase에 의해 고도내성이 발생하며^{7, 18)}, gentamicin에 고도내성을 유발하는 2'-phosphotransferase와 6'-acetyltransferase는 tobramycin, sisomicin, netilmycin, kanamycin과 amikacin까지 불활성화 시키므로 대부분의 aminoglycoside류에 고도내성을 일으킨다고 한다¹⁸⁾. 또한 gentamicin에 대한 고도내성 없이도 kanamycin과 amikacin은 3'-phosphotransferase에 의해 불활성화되어 내성을 유발

한다. 그람양성균이 갖는 플라스미드에 관한 연구는 주로 Staphylococcus, Streptococcus 및 Bacillus에 대해 이루어지고 있으며, Enterococcus균종에 관한 항균제 내성 플라스미드에 대한 연구는 외국에서도 드물고, 국내에서의 보고는 아직 없다. 1964년 Raycroft와 Zimmerman이 Enterococcus간의 내성이 전달되는 것을 처음으로 입증하였으며, chloramphenicol 내성인 *E. faecalis*에서 다른 균주로 전달될 수 있음을 보고하였다⁴⁰⁾. Sharberg와 Zervos는 gentamicin 내성 *E. faecalis*와 같은 내성을 나타내는 Staphylococcus의 플라스미드를 Southern 혼성화의 probe로 사용하여 동일한 유전자임을 입증하여 Enterococcus의 gentamicin에 대한 획득내성은 Streptococcus로부터 유전자 물질의 교환이라고 하였고, 공여균주와 수용균주가 응집될 때 플라스미드 DNA의 접합전이를 유도하는 낮은 분자량을 갖는 펩티드 페로몬(Clumping inducing agent)을 생성하므로 다른 원내감염균 특히 *S. aureus*균과의 접합전이 기작에 대한 연구의 필요성이 요구된다^{3, 25)}.

*E. faecalis*는 세 종류의 종 특이성(species-specific) 표면 폴리펩티드항원이 발현됨이 심내막염환자에게서 밝혀졌으나, *E. faecalis* 감염에 대한 다른 중증환자의 폴리펩티드항원에 대한 분석은 드물다¹⁾. 이러한 실험은 특히 *in vitro*에서 배양되지 않는 *E. faecalis*감염에 대해서는 혈청학적 진단이 유용하므로 종 특이성 폴리펩티드항원을 사용하여 특이성이 높은 효소결합면역측정법 등에 이용될 수 있다.

본 연구에서는 최근 병원 임상검체에서 분리된 *E. faecalis*의 gentamicin 고도내성 및 타 항균제에 대한 감수성을 디스크 확산법과 한천 회석법을 이용하여 조사하였고, 전기영동에 의한 R-플라스미드 패턴 및 제한효소에 의한 DNA 단편 분석과 *S. aureus* SK-982균과의 filter mating에 의한 플라스미드 DNA의 전이를 연구하여 gentamicin유전자의 위치를 확인했고, tetracycline 항균제 내성유전자를 확인하기 위하여 DNA probe를 사용하여 Southern 혼성화를 실시하였으며, Enterococcus와 플라스미드 전이균주의 폴리펩티드항원을 SDS-PAGE로 분석하였고, immunoblotting에 의한 항원분석을 실시하여 분자세균학적 및 유전학적 특성을 국내에서는 처음으로 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

1) 균주

실험에 사용된 *E. faecalis* 균주는 1991년 10월부터 1992년 1월 사이에 연세대학교 의과대학 영동세브란스병원의 입원 및 외래환자에서 분리한 40주 이었다. 분리된 균주는 실험에 사용할 때까지 10% 탈지분유 부유액에 넣어 냉동보존하였다. 항균제 감수성 실험을 위한 대조균주로는 *E. faecalis* ATCC 29212를, filter mating에 의한 유전자 전이 연구를 위한 균주로는 *Staphylococcus aureus* SK 982를 사용하였다.

2) 배지

*E. faecalis*를 분리하기 위해 5% 사람혈액을 넣어서 만든 혈액한천에 검체를 접종하여 37°C에서 18~24시간 배양하였다. *E. faecalis*를 감별하기 위한 배지로는 bile esculin azide agar(BEAA, BBL, Cockeysville, MD) *Streptococcus faecalis* broth(SF, BBL), 6.5% 식염함유 brain heart infusion broth(BHI, DIFCO, Detroit, MI), 1% arabinose 혹은 sorbitol 함유 cystine tryptic agar(CTA, DIFCO), arginine 함유 moeller decarboxylase base(DIFCO)를 사용하였다. 디스크확산법 항균제 감수성 실험을 위해서는 Mueller-Hinton medium(DIFCO)을 4 mm 두께로 부어서 평판을 만들었다. 한천회석법 감수성 실험을 위해서는 원하는 항균제의 농도가 되도록 Mueller-Hinton medium에 항균제의 용액을 섞고 평판을 만들었다. 플라스미드 DNA 분리용 균주를 증식시키기 위한 배지로는 BHI broth를 사용하였으며, 유전자 전이 실험을 위한 filter mating에는 BHI에 novobiocin과 gentamicin을 배지 1 ml 당 각각 20 µg과 500 µg 되도록 넣어 사용하였다. Gentamicin 내성 플라스미드 DNA 제거 실험을 위해서는 BHI와 Nutrient broth(NB, DIFCO)에 Ethidium bromide(EtBr)를 NB에 농도별로 계단회석한 후 사용하였다.

3) 항균제

디스크 확산법 실험을 위해서는 ampicillin 10 µg, chloramphenicol 30 µg, erythromycin 15 µg, vancomycin 30 µg과 novobiocin 5 µg을 각각 사용하였고, 한천회석법을 위한 항균제 분말은 정확히 무게를 달고 규정된 용매에 녹인 후 감수성 배지를 만들 때까지 -20°C에 냉동보존하였다.

4) 항원제조

SDS-PAGE 및 immunoblotting을 하기 위한 항원시료 제조과정은 각 균주를 BHI배지 3 ml에서 배양한 후 BHI배지 20 ml에 배양액을 20:1의 비율로 배양을 하였다. 배양 후 각 균주를 4°C에서 3,000×g로 15분간 원심분리하여 균체를 모은 후 상층액을 버리고 GET완충액을 넣고 현탁한 후 각 세척액을 에펜도르프 튜브로 옮기고 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 1 ml 당 20 mg의 lysozyme이 첨가된 용액을 넣고 37°C 항온기에서 1시간 반응시켰다. 이 반응용액을 5,000×g로 5분간 원심분리하여 얻은 원형질체에 탈이온 증류수 200 µl와 250 µl의 SDS완충액(0.125 mol Tris-base, pH 6.8, 4% SDS, 10% glycerol, 0.02% bromophenol-blue, 4% β-mercaptoethanol)을 넣은 후 95°C에서 5분간 열처리하였다. 분자량 측정을 위한 표준 marker도 위와 같은조건으로 사용하였다. 시료의 불순물을 제거하기 위하여 원심분리한 후 상층액을 다른 튜브로 옮겨 -20°C 냉동고에 보관하면서 전기영동용 항원시료로 사용하였다.

방법

1) 세균의 분리 및 동정

*Enterococcus*의 분리를 위해서는 검체를 혈액한천에 접종하여 35°C, 5% CO₂ 배양기에서 18~24시간 배양하였으며, 그람양성 구균이고 쌍이나 사슬로 배열되었으며, BEAA에서 증식하여 esculine을 가수분해하며, SF broth에서 양성반응, 6.5% NaCl broth에서 자라는 세균을 분리하여 다시 mannitol, sorbitol, arabinose, raffinose, sucrose, lactose에서의 산생성시험, 색소생성, 운동성, arginine dehydrogelase 시험을 하였다. 당발효 시험의 결과는 24시간, 48시간, 1주일까지 관찰하였으며 그외의 실험은 24시간과 48시간 두번 판독하였다. 균동정은 Facklam과 Collins의 방법을 수정하여 동정하였다⁹⁾.

2) 항균제에 대한 감수성 실험

디스크확산법 감수성 검사는 NCCLS법에 규정된 농도의 항균제 디스크(BBL)와 Mueller Hinton medium(DIFCO)을 써서 실험하였다²⁶⁾. 한천회석법 감수성 검사는 Mueller Hinton medium에 항균제를 넣어서 원하는 농도의 항균제가 든 배지를 만들었다²⁷⁾. 실험세균을 BHI broth에 접종하여 배양한 후, McFarland nephrometer의 0.5판

(10⁸ CFU/ml)타도로 맞추고, 이것을 다시 식염수로 1:10으로 희석한 후 Steers inoculator를 써서 항균제가 든 배지에 접종하였다. 접종된 배지를 35℃에 18시간 배양한 후에 규정된 방법에 따라 판독하였고, 실험세균을 억제시킨 최소의 항균제 농도를 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)로 하였다. 감수성 실험의 정도관리를 위해서는 표준균주인 *E. faecalis* ATCC 29212 및 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213을 동시에 실험하였다.

3) β -lactamase 실험

Iodometric법을 사용하였으며 penicillin G를 6000 µg/ml 되도록 0.1 mol 인산염 완충액(pH 6.0)에 녹이고, 1 g의 가용성 진분을 100 ml의 증류수에 넣고 끓는 수욕에 넣어서 녹였다. Iodine 시약은 2.03 g의 iodine과 53.2 g의 potassium iodide를 100 ml의 증류수에 녹이고 실온암소에 보관하였고, 0.1 ml의 penicillin G 용액을 작은 시험관에 넣고, 시험세균을 진하게 풀고 실온에 30분간 놓아둔 다음 진분용액 2 방울을 넣고 섞은 후 iodine 시약을 한방울 넣고 실온에서 1분간 쉬었다. 자색이 무색으로 10분 이내에 변하면 양성으로 판독하였다. 대조균주로는 β -lactamase 양성의 *E. faecalis* HH22균주를 사용하였다²⁴⁾.

4) 플라스미드 DNA 분리, 정제 및 회수

플라스미드 DNA분리는 Maniatis법을 수정하여 분리하였으며²²⁾, 실험균주를 500 ml BHI broth에 접종하여 37℃에서 18시간 100 r.p.m.으로 진탕 배양한 후 3,000×g로 15분간 원심분리(Centricon H401)하여 균체를 모으고 GET 완충액으로 현탁하였다. 이 균체를 GET완충액 15 ml에 부유시킨 후 1 ml 당 20 mg되게 lysozyme을 가하고 37℃항온기에서 1시간 반응시켰다. 이어서 0.2 N NaOH와 1% SDS 혼합액 20 ml을 흔들어서 섞은 후 얼음속에서 30분간 반응시키고, 5 M K-acetate완충액을 15 ml첨가하고 얼음에 30분간 방치한 다음 3,000×g로 20분간 원심분리하였다. 이어서 상층액을 회수한 다음 0.6배의 iso-propanol을 첨가하여 3,500×g로 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 생긴 DNA 침전물을 70% ethanol로 처리한 다음 3 ml의 TE완충액에 현탁시켰다. 전기영동은 1% agarose gel에 40% sucrose가 첨가된 0.25% bromophenol-blue 염색액 5 µl(pH 8.0)와 완충액에 부유된 플라스미드 DNA 20 µl를 혼합한 것을 loading 한 후 50 volt에

서 4시간 전개시켜 EtBr용액(0.53 µg/ml)으로 30분간 염색하여 Short wave transilluminator(Ultraviolet product Co.)로 플라스미드 DNA밴드를 확인하였고, filter가 부착된 Polaroid UV 55 mm(Universal Maniya, USA)로 촬영하였다.

5) 제한효소에 의한 플라스미드 DNA 단편절단

제한효소는 Boehringer Mannheim사에서 구입한 *EcoRI*과 *HindIII*제한효소를 사용하였다. 반응액, 온도 및 기타 조건 등은 제조원의 방법에 의하여 사용하였고, 각 단편들의 분자크기는 λ 과지 DNA/*HindIII* 단편들을 표지 DNA로 사용하였고, 1% agarose gel에서 100 volt로 2시간 전개시킨 후 분자크기를 구하였다.

6) Filter mating에 의한 플라스미드 DNA 전이

Gentamicin에 고도내성인 *E. faecalis* HL-1과 HL-6이 포함하는 플라스미드 DNA를 *S. aureus* SK-982로 전이시키기 위하여 각 균주를 20 ml BHI배지에 접종하여 37℃ 18시간 배양한 후 4 ml BHI에서 1:40으로 희석하여 접종하였고, 대수기까지 배양한 후 1 ml를 *S. aureus* SK-982의 정지배 배양액 3 ml과 섞어 0.45 µm 여과지(Millipore Corp. Bedford, Mass)로 통과시켜 균이 묻은 여과지를 BHI배지위에 올려 놓고 37℃ 항온기에 18시간 배양하였다. 이어서 여과지를 1 ml BHI 액체배지에 넣어 균액을 부유시킨 후 novobiocin 20 µg/ml과 gentamicin 500 µg/ml이 포함된 배지에 도말하여 48시간 배양하여 형성된 transconjugants집락을 항균제가 포함된 배지에 각각 옮겨 다시 내성을 확인하였다. Filter mating한 균배양액을 항균제가 포함되지 않은 BHI배지에 도말하고 형성된 집락을 계산한 후 전달빈도를 산출하였다^{28,29)}. 각각의 transconjugants포함하는 플라스미드 DNA는 앞의 플라스미드 분리방법을 사용하여 확인하였다.

$$\text{Percentage of transfer frequency} = \frac{\text{No. of transconjugant cell}}{\text{Total No. of recipient cell}} \times 100$$

7) Gentamicin 내성 플라스미드 DNA 제거 및 제거빈도

EtBr에 의한 R-플라스미드 제거실험은 Forbes와 Sharberg 등의 방법을 사용하였다¹²⁾. *E. faecalis* transconjugants R-1과 R-6균주를 Nutrient broth 5 ml에 접종하여 18시간 배양한 후 이 균액에 EtBr을 농도별로 계단희석한 후 각각 0.1 ml씩을

BHI broth에 1 ml을 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 이어서 48시간 배양하였다. EtBr의 subinhibitory 농도에서 증식한 균액 0.1 ml을 BHI평판배지에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하고 이때 형성된 집락을 항균제 감수성검사에 사용하였던 같은 농도의 항균제가 든 BHI평판배지에 replica를 써서 옮긴 후 37°C에서 18시간 배양하여 나타난 집락수를 산출하여 R-플라스미드 제거빈도를 계산하였다. 그리고 자연적인 R-플라스미드의 소실을 관찰하기 위하여 EtBr이 첨가 되지 않은 BHI액체배지에 증균시킨 각 균주를 위와 실험과 같은 조건으로 대조실험하였다. 선별한 내성 소실 균주는 플라스미드 분리를 시도하여 플라스미드가 제거되었는지를 확인하였다.

$$\text{Percent elimination} = \frac{\text{No. of curing agent susceptible colonies}}{\text{No. of colonies tested}} \times 100$$

8) Southern hybridization에 의한 tetracycline 유전자의 좌위확인

플라스미드 DNA blotting은 Southern의 방법에 의해 agarose gel에서 Nylon sheets로 전이시켰다³³⁾. DNA를 전기영동 시킨 gel을 0.25 N HCl 500 ml에 담귀 10분간 흔들여 준 후 증류수로 세척하고 1.5 M NaCl/0.5 M NaOH용액 500 ml을 가하여 15분 동안 3회 반응시켜 중화시켰다. 플라스미드 DNA hybridization은 enhanced chemiluminescence (ECL) directed system(Amersam.RPN 3000,UK)을 사용하였다. 요약하면 Nylon sheets를 Hybridization용액이 든 heatseal plastic bag(Seal-Ameal, Dazey,Co)에 넣어 42°C에서 15분 반응시킨 후 heat denatured horseradish peroxidase(HRP)-labelled probe DNA를 가하고 42°C에서 18시간 반응시켰다. Hybridization결과는 nylon sheets에 제조원의 detection reagent I, II를 가하여 반응시킨 다음 Hyper film(Amersam.RPN 2103, UK)에 노출시켜 현상하여 얻었다.

9) SDS-PAGE에 의한 단백질 패턴

Laemmli의 방법으로 단백질을 정량하여 시료의 단백질 농도가 10 ml 당 25 mg 되도록 하였고²⁷⁾, 10% acrylamide gel과 4% stacking gel을 만든 후 각 well에 10 µl 씩 *E. faecalis* HL-1, 2, 3, 4, 5, 6, *E. faecalis* transconjugants R-1과 R-6균주의 항원시료를 넣어 표준분자량 marker(BIO-RAD)와

함께 20 mA에서 8시간 전기영동을 시행하였다. *E. faecalis* HL-1, HL-6과 *E. faecalis* transconjugants R-1과 R-6균주의 항원시료를 muramidase(SIGMA)로 처리하였고(Fig. 9 B, C, D, F), E, H, I, J는 mutanolysin(SIGMA)을 처리하여 전기영동을 시행하였다. 폴리펩티드 밴드를 관찰하기 위해서는 0.05% coomassie blue로 염색한 후 10% acetic acid와 30% methanol이 함유된 용액으로 탈색하였다.

11) Immunoblotting에 의한 항원성 조사

Transblot은 Towbin방법을 이용하여 gel내의 단백질을 400-500 mA에서 12시간 전기영동하여 nitrocellulose sheets(Schleicher & Schull, BA 85 Co, pore size 450 nm)으로 옮긴 후 1% gelatin이 함유된 Tris-buffered saline(TBS, pH 7.4)용액으로 blocking한 후 세척하고, *E. faecalis*감염에 의한 복막염 환자혈청과 3% gelatin이 함유된 TTBS (TBS+0.05% Tween 20)를 1:100으로 희석한 용액을 첨가하고 4°C에서 3시간 반응시킨 후 세척하였다. 이어서 HRP conjugate antihuman Ig G (Sigma)를 3% gelatin이 함유된 TTBS과 1:3,000으로 희석하여 넣어준 후 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 다음 4-chloro-1-naphthol을 methanol에 녹인 후 TBS와 H₂O₂를 첨가하여 반응시킨 후 세척하여 발색반응을 유도하였다.

결 과

1) 검체에서 분리한 *E. faecalis*의 분리동정 및 비율

분리한 *E. faecalis*균주들을 HL-1에서 부터 HL-40까지로 명명을 하였다(HL은 Hospital Line의 약자임). 40균주 모두가 그람염색 표본에서 양성 있었고 쌍이나 사슬로 배열되었으며, BEAA에서 증식하여 esculine을 가수분해하며, SF broth에서 양성반응을 보였고, arginine dehydrolase 양성, arabinose에서 산생성은 음성, sorbitol에서 산생성 양성이었다고 이러한 특징들은 *E. faecalis* ATCC 29212 특성과 공통점이 있어서 *E. faecalis*로 동정하였다. 검체에서 분리한 40주의 *E. faecalis* 중 25주는 요 검체에서, 3주는 각종 농성 검체에서, 2주는 혈액에서 분리되었다. 이 균주들 중 95%는 입원환자에서 분리되었다(Table 1).

2) *E. faecalis* 분리균의 항균제 내성패턴 및 MIC

40주의 *E. faecalis* 디스크 확산 실험으로 항균제 내성을 검사한 결과는 40균주 모두가 gentamicin에는 내성이었고, 1주(2.5%)가 ampicillin에 내성이었으며, chloramphenicol에는 10주(25%)가 그리고 erythromycin에는 25주(62.5%)내성이었다. vancomycin에 대해서는 실험세균 모두가 감수성을 보였다(Table 2). 시험균주들의 다제내성 양상을 보인 40주의 *E. faecalis* 중 12주는(30%)는 1가지 항균제에, 18주는(45%)는 2가지 항균제에, 9주는(22.5%)는 3가지 항균제에, 1주는(2.5%)는 4가지 항균제에 대해 내성이었다(Table 3).

한천희석법으로 실험한 *E. faecalis* 분리균주들에 대한 최소억제농도의 범위는 gentamicin이 128~≥2048 µg/ml ampicillin이 0.5~64 µg/ml,

chloramphenicol이 1~128 µg/ml과 erythromycin이 4~256 µg/ml, vancomycin이 0.5~4 µg/ml이었다. 50%의 균주를 억제시킨 MIC(MIC₅₀)와 90%의 균주를 억제시킨 최소억제농도 MIC(MIC₉₀)는 gentamicin이 각각 2048 µg/ml와 ≥2048 µg/ml, ampicillin이 1 µg/ml와 1 µg/ml, chloramphenicol이 2 µg/ml와 8 µg/ml, erythromycin이 32 µg/ml와 256 µg/ml, vancomycin이 1 µg/ml와 2 µg/ml이었다 (Table 4, 5). Gentamicin의 MIC가 2000 µg/ml이상인 균주를 고도내성균으로 해석할 때, gentamicin 고도내성 *E. faecalis*는 24주(60%)가 있었다. 한천 희석법으로 시험한 *E. faecalis*에 대한 최소억제농도의 범위는 gentamicin이 ≥2048 µg/ml, ampicillin이 1~64 µg/ml, chloramphenicol이 8~128 µg/ml, erythromycin이 ≥128 µg/ml 그리고

Table 1. Sources and number of *E. faecalis* isolates

Source	No. of isolates
Blood	2
Wound	3
Fluid/abscess	2
Urine	25
Miscellaneous	8
Total	40

Table 2. Antimicrobial susceptibility of *E. faecalis* isolates by disk diffusion test

Antimicrobial agent	No. (%) of resistant strains of <i>E. faecalis</i> (n=40)
Gentamicin	40 (100)
Ampicillin	1 (2.5)
Chloramphenicol	10 (25)
Erythromycin	25 (62.5)
Vancomycin	0 (0)

n=total number of the isolates

Table 3. Antimicrobial resistance pattern of *E. faecalis*

Number of antimicrobial agents	Kinds of antimicrobial agents	No. of the resistant	Percentage
4	GM EM CM AM	1	2.5
3	GM EM CM	9	22.5
2	GM EM	18	45.0
1	GM	12	30.0
Total		40	100

Gm; Gentamicin, Am; Ampicillin, Cm; Chloramphenicol, Em; Erythromycin, Vm; Vancomycin

Table 4. Antimicrobial susceptibility of *E. faecalis*

Antimicrobial agents	No. of the isolates isolates tested	MIC(µg/ml)		
		Range	50%	90%
Gentamicin	40	128-≥2048	2048	≥2048
Ampicillin	40	0.5 - 64	1	1
	40	1 - 128	2	8
Erythromycin	40	4 - 256	32	256
Vancomycin	40	0.5 - 4	1	2

Table 5. Minimum inhibitory concentration of antibiotics against the 40 isolates of *E. faecalis*

Antimicrobial agents	No.(%) of the isolates inhibited at concentrations($\mu\text{g/ml}$)														
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	>2048
Gentamicin										16 (40)				5 (52.5)	19 (100)
Ampicillin		5 (12.5)	32 (92.5)		1 (95)	1 (97.5)			1						
Chloramphenicol			1 (2.5)	16 (42.5)	2	5 (47.5)	60		4 (70)	2 (100)					
Erythromycin					7 (17.5)	12 (47.5)		6 (62.5)	5 (75)	2 (80)	8 (100)				
Vancomycin		2 (5)	32 (85)		6 (100)										

Table 6. Antimicrobial susceptibility of high-level gentamicin resistant *E. faecalis*

Antimicrobial agents	No. of the isolates tested	MIC($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	50%	90%
Gentamicin	24	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048
Ampicillin	24	1 - 64	1	1
Chloramphenicol	24	8 - 128	8	128
Erythromycin	24	≥ 128	32	256
Vancomycin	24	1 - 2	1	2

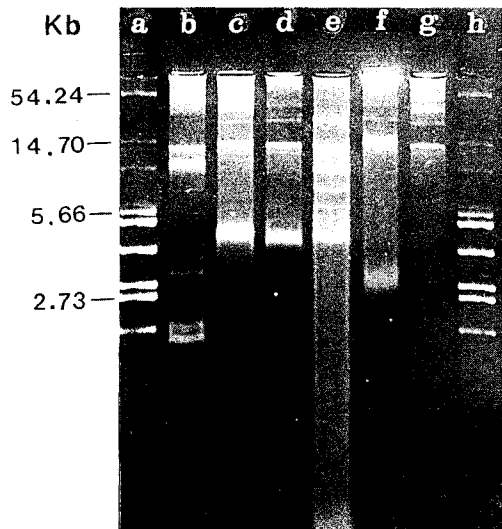


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis patterns of plasmids of high-level resistant *E. faecalis* to gentamicin. Lanes a and h, Standard plasmids of *E. coli* V517. The other lanes are *E. faecalis* strains; b, HL-1; c, HL-2; d, HL-3; e, HL-4; f, HL-5 and g, HL-6.

최소억제농도(MIC₉₀)는 gentamicin이 모두 ≥ 2048 $\mu\text{g/ml}$, ampicillin이 1 $\mu\text{g/ml}$, chloramphenicol이 8 $\mu\text{g/ml}$ 와 128 $\mu\text{g/ml}$, erythromycin이 32 $\mu\text{g/ml}$ 와 256 $\mu\text{g/ml}$, 그리고 vancomycin은 각각 1 $\mu\text{g/ml}$ 와 2 $\mu\text{g/ml}$ 이었다(Table 6).

3) *E. faecalis* 균주의 플라스미드 DNA 패턴과 제한효소 패턴

Gentamicin 고도내성 *E. faecalis* HL-1, 2, 3, 4, 5, 6로부터 분리한 플라스미드 DNA를 1% agarose gel을 이용하여 전기영동한 결과는 Fig. 1과 같다. Gentamicin 고도내성 *E. faecalis* HL-1은 실험한 4가지 항균제에 모두 내성이 있는 균주이었으며, 7종류의 플라스미드가 존재하였고, 그 크기는 1.97~51.7 Kb이었다. *E. faecalis* HL-2와 HL-3은 모두 6종류의 플라스미드가 존재하였고, 그 크기는 4.65~38 Kb이었다. HL-4는 7종류 플라스미드가 존재하였고, 그 크기는 4.65~23.7 Kb이었다. HL-5는 4종류 플라스미드가 존재하였고, 그 크기는 3.25~23.7 Kb이었으며, HL-6은 5종류의 플라스미드가 존재하였고, 그 크기는 12~51.7 Kb이었다. 각 분자크기는 Table 7에 제

vancomycin이 1~2 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 50%의 균주를 억제시킨 MIC(MIC₅₀)와 90%의 균주를 억제시킨

Table 7. Antimicrobial resistance and plasmid patterns of high-level resistant *E. faecalis* to gentamicin

Strains	Resistance patterns	No. of plasmids	Molecular sizes(kilo base)
<i>E. faecalis</i> HL-1	GM EM CM AM	8	51.7, 38, 12.7, 9.3, 3.7, 3.3, 2.15, 1.97
<i>E. faecalis</i> HL-2	GM EM CM	6	38, 32.7, 23.7, 12.7, 10.2, 4.65
<i>E. faecalis</i> HL-3	GM EM CM	6	38, 23.7, 12.7, 10.2, 5.65, 4.65
<i>E. faecalis</i> HL-4	GM EM CM	7	23.7, 12.7, 8.2, 6.49, 6.37, 5.65, 4.65
<i>E. faecalis</i> HL-5	GM EM CM	4	23.7, 12.7, 13.6, 3.25
<i>E. faecalis</i> HL-6	GM EM CM	5	51.7, 38, 29, 22.6, 12

Gm; Gentamicin, Am; Ampicillin, Cm; Chloramphenicol, Em; Erythromycin, Vm; Vancomycin

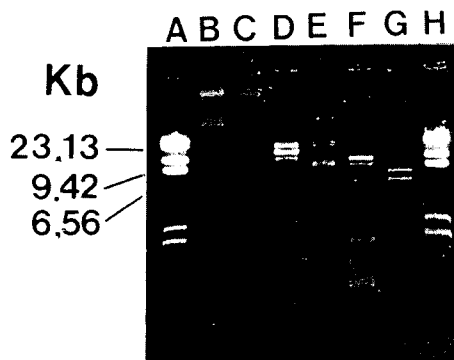


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis patterns of plasmids of *E. faecalis* HL-1 and HL-6 strains digested with restriction enzymes. Lanes A and H, Standard λ DNA digested with *Hind*III. The other lanes are *E. faecalis* strains; B, HL-1; C, HL-6; D and E, HL-1 and HL-6 plasmids digested with *Eco*RI; F and G, HL-1 and HL-6 plasmids digested with *Hind*III.

시 된것과 같다. 내성유형과 플라스미드 패턴을 보면 3가지 이상의 항균제에 내성인 균주들은 대부분 51.7 Kb이상의 플라스미드를 보유하는데 비해, 2가지 항균제에 내성인 균주들은 플라스미드가 없거나 1개만 보유하고 있었다. 특히 *E. faecalis* 내성유형 중 가장 많은 빈도를 나타낸 GM과 EM 내성유형을 가진 18주 중 6주에서만 플라스미드가 관찰되었다. 그리고 내성유형은 같아도 플라스미드의 크기는 다른경우가 있었다.

λ DNA *Hind*III 를 표지 DNA로 사용하여 1% agarose gel전기영동으로 단편의 수와 크기를 확인하였다. *E. faecalis* HL-1과 HL-6을 *Eco*RI과 *Hind*III제한효소로 절단한 결과 분자량의 크기는 *Eco*RI단편은 7종류와 6종류의 플라스미드가 존재하였고, 그 크기는 1.2 Kb~29.5 Kb이었다. *Hind*III단편은 8종류와 5종류의 플라스미드가 존

재하였고, 그 크기는 1.5 Kb~20.7 Kb이었다(Fig. 2). 제한효소 패턴은 내성유형과는 무관하였고, 단편상의 차이를 발견할 수 있었는데 *E. faecalis* HL-1과 HL-6의 플라스미드에서는 관찰 할 수 없는 단편이었다.

4) Filter mating에 의한 플라스미드 DNA전이와 빈도

Gentamicin에 고도내성인 *E. faecalis* HL-1은 GM, AM, EM, CM의 내성형을, 그리고 HL-6은 GM, EM, CM의 내성형을 가지고 있는 균주로서 이 균주에 있는 gentamicin 플라스미드 DNA를 *S. aureus* SK-982로 전이시키기 위하여 filter mating법을 이용하여 전이시켰다. Gentamicin에 고도내성인 *E. faecalis* HL-1과 HL-6의 내성전달 빈도는 6.3×10^{-4} 과 3.7×10^{-5} 이었으며, *E. faecalis* HL-1의 내성전달 빈도가 높았다(Table 8). 수용균주 *S. aureus* SK-982를 이용한 전이실험에서 48시간 배양하여 형성된 transconjugants집락을 분리하고 전기영동하여 플라스미드 DNA를 확인한 결과 공여균주인 *E. faecalis* HL-1과 HL-6의 플라스미드 중 51.7 Kb의 플라스미드 DNA가 전이된것을 확인하였다(Fig. 3). λ DNA *Hind*III 단편을 표지 DNA로 사용하여 1% agarose gel전기영동으로 *E. faecalis* trans-conjugants R-1과 R-6의 제한효소 단편 수와 크기를 확인하였다. *Eco*RI과 *Hind*III로 절단한 결과 각각 heterogeneous하게 나타났다(Fig. 4와 Fig. 5). *E. faecalis* transconjugants R-1과 R-6의 분자량의 크기는 *Eco*RI단편은 1.5~29.5 Kb이었고, *Hind*III단편은 0.6~29.2 Kb이었다.

5) Gentamicin 내성 플라스미드 DNA 제거 및 제거빈도

Transconjugants인 *E. faecalis* R-1과 R-6균주를 Nutrient broth 5 ml에 접종하여 18시간 배양한 후

Table 8. Plasmid transfer frequency from *E. faecalis* to *S. aureus*

Donor progeny	Recipient	Selective donor marker	^a Transfer frequency	No. fo doubly resistant progeny/Total No. of
<i>E. faecalis</i> HL-1 X	<i>S. aureus</i> SK-982	GM ^b	6.3×10^{-4}	26/165
<i>E. faecalis</i> HL-6 X	<i>S. aureus</i> SK-982	GM	3.7×10^{-5}	141/529

^aTransfer frequency is expressed as the number of transconjugants per total progeny cell; GM^b, gentamicin

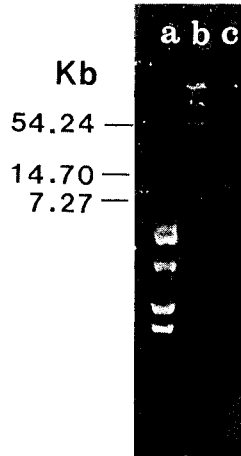


Fig. 3. agarose gel electrophoresis patterns of plasmids of *E. faecalis* transconjugant R-1 and R-6 strains. Lanes a, Standard plasmids of *E. coli* V517; b, *E. faecalis* transconjugant R-1 and c, R-6.

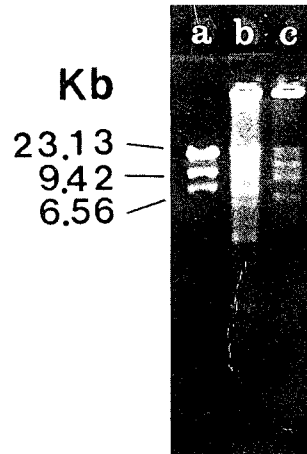


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis patterns of plasmids of *E. faecalis* transconjugants R-1 and R-6 strains digested with *Hind*III. Lanes a, Standard λ DNA digested with *Hind*III; b, DNA fragments of *E. faecalis* transconjugant R-1 and c, those of R-6.

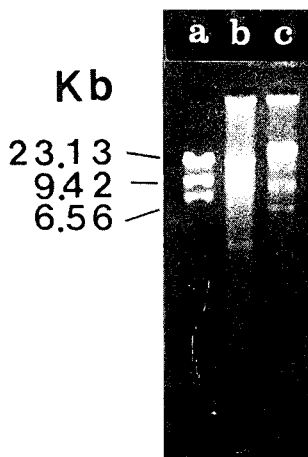


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis patterns of plasmids of *E. faecalis* transconjugants R-1 and R-6 strains digested with *Eco*RI. Lanes a, Standard λ DNA digested with *Hind*III; b, DNA fragments of *E. faecalis* transconjugant R-1 and c, those of R-6.

이 균액에 EtBr을 농도별로 계단희석한 후 각각 0.1 ml씩을 BHI broth에 1 ml점종하여 37 °C에서

24시간 배양 후 이어서 48시간 배양하였다. EtBr의 subinhibitory 농도에서 증식한 균액 0.1 ml을 BHI평판배지에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하고 이 때 형성된 집락을 항균제 감수성검사에 사용하였던 같은 농도의 항균제가 든 BHI평판배지에 replica를 써서 옮긴 후 37°C에서 18시간 배양하여 나타난 집락수를 산출하여 R-플라스미드 제거빈도를 계산하였다⁴¹⁾. NB 1 ml 당 30 μ g EtBr을 처리한 배지에서는 성장이 되지 못했고, 10 μ g과 20 μ g EtBr을 처리한 NB에서만 성장되었다. 10 μ g의 EtBr을 처리한 경우 R-1균주 413개의 균락을 조사했을 때에는 51%의 제거율을 나타냈고, R-6균주 507개의 균락을 조사했을 때에는 67%의 제거율을 나타냈다. EtBr을 사용하여 R-1과 R-6균주의 플라스미드를 제거했을 때 없어진 내성인자는 공여균주인 *E. faecalis* HL-1과 HL-6에 있는 플라스미드 중 51.7 Kb의 플라스미드 DNA이었다(Fig. 6).

6) Tetracycline 내성 유전자의 확인

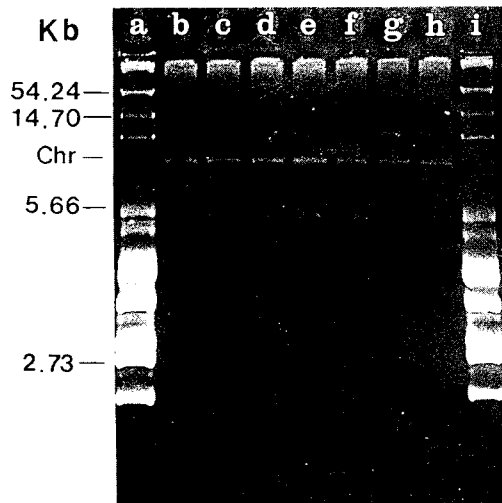


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis patterns of plasmids from *E. faecalis* transconjugants R-1 and R-6 strains cured with ethidium bromide. Lanes a and i, Standard plasmids of *E. coli* V517; b, c, d and e, *E. faecalis* transconjugant R-1; f, g and h, *E. faecalis* transconjugant R-6.

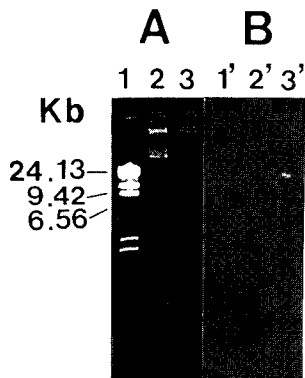


Fig. 7. Southern blot analysis of *E. faecalis* HL-1 and HL-6 plasmids with a tetracycline gene probe. Lanes 1, Standard λ DNA digested with *Hind*III; 2, *E. faecalis* HL-1 plasmids; 3, *E. faecalis* HL-6 plasmids; panel B, autoradiogram of panel A. Arrow indicates the hybrid plasmid.

Transconjugants인 *E. faecalis* R-1과 R-6균주의 플라스미드를 정제하여 전기영동을 한 후에 Hybond-N membran에 옮기어 혼성화실험을 하였다. Tetracycline probe DNA는 pBR322을 *Eco*RI과 *Hind*III로 이중절단한 단편을 사용하였으며, hybridization결과를 보면 2.15 Kb플라스미드에 반응하였다(Fig. 7). 2.15 Kb플라스미드가 없는 *E. faecalis* transconjugants R-6에는 반응하지 않았다.

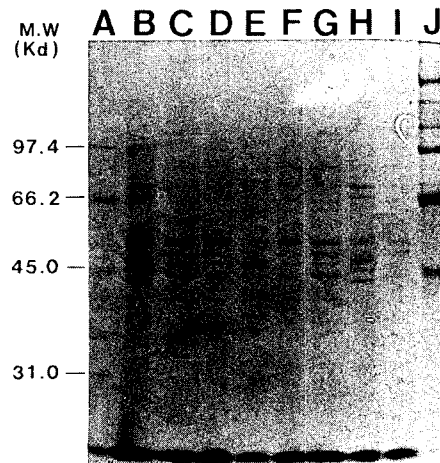


Fig. 8. Comparison of antigenic polypeptide patterns of *E. faecalis* strains. Lanes A, Low standard molecule; The other lanes are *E. faecalis* strains; B, HL-1; C, HL-2; D, HL-3; E, HL-4; F, HL-5; G, HL-6; H, R-1; I, R-6 and J, High standard molecule.

7) 플라스미드 전이균주의 폴리펩티드항원 패턴

공여균주와 *E. faecalis* transconjugants R-1과 R-6 균주에서 대부분 공통적인 단백질을 가지고 있었으며, 단백질의 이동거리는 균주별로 차이가 없었다(Fig. 8). *E. faecalis* HL-1, HL-6, *E. faecalis* transconjugants R-1과 R-6균주의 항원시료를 muramidase로 처리(Fig. 9 lanes B, C, D, F)한 그룹과, mutanolycin(Fig. 9 lanes E, H, I, J)을 처리한 그룹을 전기영동을 시행한 결과 그 중 97.8, 95.8, 74.8과 63.5 Kd의 주요 폴리펩티드 밴드가 나타났으며, 특히 95.8 Kd의 단백질은 강하게 반응하였다.

8) Enterococcus 플라스미드 전이균주의 항원

*E. faecalis*로 복막에 감염된 환자혈청을 이용하여 SDS-PAGE에 의해 공여균주 및 transconjugants 균주의 항원성을 immunoblotting으로 분석하였다. *E. faecalis* HL-1과 *E. faecalis* transconjugants R-1균주는 97.8 Kd, 46.8 Kd의 분자량을 갖는 단백질과 공통적으로 반응하였고, *E. faecalis* HL-6와 *E. faecalis* transconjugants R-6균주는 46.8 Kd의 분자량을 갖는 단백질과 공통적으로 반응하였다. 그 반응강도의 순위는 95.8, 97.8, 46.8, 33.7, 63.5와 74.8 Kd 이었다(Fig. 10). 공여균주 *E. faecalis* HL-3의 단백질에는 반응하지 않

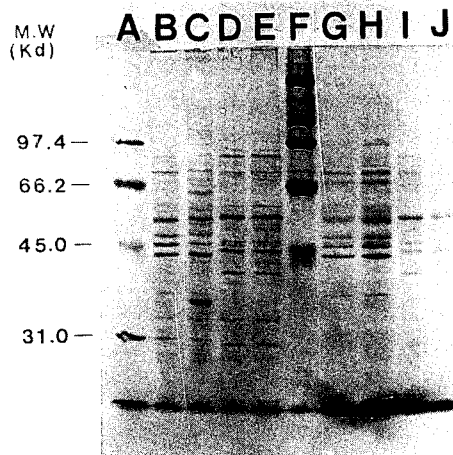


Fig. 9. Comparison of antigenic polypeptide patterns of *E. faecalis* strains treated with muramidase and mutanolysin. Lanes A, Low standard molecule and F, High standard molecule; The other lanes are *E. faecalis* strains; B, HL-1; C, R-1; D, HL-6; E, R-6; G, HL-1; H, R-1; I, HL-6 and J, R-6.

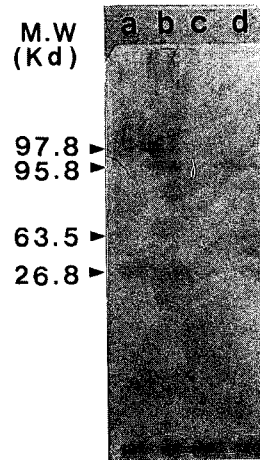


Fig. 10. Immunoblotting profiles of *E. faecalis* strains using intra abdominally infected patient's serum. Lanes a, HL-1; b, R-1; c, HL-6; d, R-6.

왔던 97.8, 95.8, 74.8와 63.5 Kd의 단백질이 transconjugant 균주인 *E. faecalis* transconjugants R-6균주에서 반응을 보였다.

고 찰

Enterococcus는 그람양성구균이고, 길거나 짧은 사슬모양 또는 쌍으로 배열된다. 배양조건에 따라서는 간균 같은 모양을 보인다. Enteric Streptococcus는 새로운 균속인 Enterococcus로 변경되었다⁸⁾. 용혈성은 일정치 않으며, Lancefield group D 항원을 가지고 있다. 1989년 Facklam과 Collins는 노랑색소와 운동성은 음성, manitol, sorbitol, lactose에서의 산생성은 음성, arginine dehydrogenase음성인 균을 *E. faecalis*로 분류하였다. 1990년 Ruoff 등에 따르면 ribose에서 산을 생성하며 tellulite를 환원 시키는 lactose반응이 음성인 *E. faecalis*를 보고하였다. 본실험에서는 Facklam과 Collins의 방법에 따라 균종을 동정하였다⁹⁾. Enterococcus의 감염은 주로 원내감염이고 전병원내 획득감염의 10%를 차지한다¹⁾. Center for Disease Control(CDC)로 부터 1986년에 Enterococcus는 *E. coli*와 *S. aureus*다음의 원내감염균으로 세번째로 분리되는 균이다. 비록 Enterococci는 원내감염균으로 만연하지만 Enterococcus감염은 전통적으로 환자자신에서 생기는 endoge-

neous한 것이었다^{25,38)}. Zervos 등에 의한 최근 연구는 이러한 균주에는 환자대 환자와 병원간 전파를 일으킬 수 있다고 보고하였다. 본 실험에서의 gentamicin에 내성을 보이는 경우가 실험한 균주 전부 내성이었고, 고도내성은 24균주로 전체의 62%이었다(Table 4). Gentamicin에 대한 고도내성은 1979년에 *E. faecalis*에서 처음 보고하였다. Aminoglycoside 고도내성은 $\geq 2000 \mu\text{g/ml}$ 의 약제농도에서 세균이 억제될 때 나타나는 것으로 정의된다. 처음 1979년에 보고된 이후 gentamicin 고도내성균(HLGR)은 전 세계에 만연되고 있어 심각한 감염증을 초래한다^{10,15,17,23,24,28,29,38)}. 내성기전은 플라스미드 전달과 aminoglycoside modifying효소이다 대부분 gentamicin 내성 분리균은 보다 더 높은 농도에서 실험할 때 milliliter 당 gentamicin의 수천 μg 의 농도에서 내성이었다. 각각의 aminoglycoside에 대한 내성빈도는 지역적 위치와 병원유형에 따라서 다양하였다^{15,25,38)}. 미국병원에서는 gentamicin 고도내성균에 대한 빈도는 0%에서 55%로 분포하였다. 1983년에 Merderski와 Mur-ray가 미국에서 이균주를 처음 보고한 Houston병원에서 gentamicin 고도내성균 발생빈도가 4.5%임을 보고하였다. 더우기 최근에 미국에서의 분리내성균은 3차 진료기관 뿐 아니라 지역의 군소병원 등 다양한 지역에서 까지 보고되었다^{7,15,24,25,34)}. 특히 gentamicin에 *E. faecalis* 분리균의 50% 이상의 높은 유행율은 Connecticut과 Michigan주에서도 보고하였다²⁹⁾.

1983년 이후 이 분리균은 또한 아프리카, 캐나다, 칠레, 일본 태국 및 영국 등 여러나라에서 분리보고되었다^{23,29,32}. 본 연구에서 *E. faecalis* 40주를 디스크 확산 실험으로 항균제 내성을 검사한 결과는 40균주 모두가 gentamicin에는 내성이었다. Gentamicin의 MIC가 2000($\mu\text{g/ml}$)이상인 균주를 고도내성으로 해석할 때, Gentamicin 고도내성 *E. faecalis*는 24주(60%) 이었다. 한천 희석법으로 시험한 *E. faecalis*에 대한 최소억제농도의 범위는 gentamicin이 $\geq 2048 \mu\text{g/ml}$, ampicillin이 1~64 $\mu\text{g/ml}$, chloramphenicol이 8~128 $\mu\text{g/ml}$, erythromycin이 $\geq 128\mu\text{g/ml}$ 그리고 vancomycin이 1~2 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 50%의 균주를 억제시킨 MIC (MIC_{50})와 90%의 균주를 억제시킨 최소억제농도 (MIC_{90})는 gentamicin이 모두 $\geq 2048\mu\text{g/ml}$, ampicillin이 1 $\mu\text{g/ml}$, chloramphenicol이 8 $\mu\text{g/ml}$ 와 128 $\mu\text{g/ml}$, erythromycin이 32 $\mu\text{g/ml}$ 와 256 $\mu\text{g/ml}$, 그리고 vancomycin은 각각 1 $\mu\text{g/ml}$ 와 2 $\mu\text{g/ml}$ 이었다 (Table 6). 이는 강 등(1990)의 연구와 비슷한 결과이다.

Gentamicin 고도내성균은 gentamicin이 세포벽 활성 항균제와 함께 병합치료에 사용할 때 살균능력이 없는 것으로 알려져 있다. 상승작용의 상실은 모든 실험된 세포벽 약제와 aminoglycoside의 병합에서도 나타났다²⁵. Daptomycin과 fosfomycin살균에도 같은 상승작용을 나타내었다. Penicillin과 streptomycin의 병합 치료와 함께 상승작용은 streptomycin에 고도내성이 없는 gentamicin 내성 분리균주에서도 증명되었다³⁰.

임상검체와 보균자는 Enterococcus의 전파에 중요한 역할을 한다. Nachamkin 등은 Enterococci의 내성획득은 감염의 7%가 보균자로서 밝혀졌다. 플라스미드를 이용한 분석에서도 Enterococci의 전파에 보균자의 역할의 중요함이 확인되었다²³. Gentamicin 내성 Enterococcus는 요와 직장에서 47%의 발생율이 보고되었고, 36%는 급성환자에서 발생됨이 보고되었다¹⁵. 본 연구에서는 *E. faecalis* 40주 중 25주는 요 검체에서, 3주는 각종 농성 검체에서, 2주는 혈액에서 분리되었다(Table 1). 이 균주들 중 95%는 입원환자에서 분리되었다.

Gentamicin에 대한 고도내성과 Enterococci에 대한 약제 상승효과는 플라스미드 전달 및 aminoglycoside modifying 효소때문이다. Enterococci에 대해 생화학적 연구에서 이 효소는 다양

성을 보여주었다. Courvalin 등은 *E. faecalis*(BM 4100)의 균주는 Streptomycin에 고도 내성이 없는 gentamicin과 kanamycin과 구조적으로 관련된 항균제에 고도내성이었다⁶. 이 균주에 대한 aminoglycosides에 대한 내성에 관계하는 유전자는 다른 *E. faecalis*에 자가전이 할 수 있는 플라스미드는 pIP800이었다. Aminoglycosides의 내성은 본질적으로 합성된 phosphotransferase와 acetyltransferase 역할에 의해 전달된다. Merderski-samoraj와 Murray는 4개의 amino-glycoside modifying 효소의 암호화된 HLGR *E. faecalis*의 세균주에서 자가 전이요인(self transferable element)은 즉 3'-phosphotrasferase(ADH-3') 2균주로 전이되었고²³, 2"-phospho-transferase와 6'-acetyltransferase 3균주 모두에서 전이되고 streptomycin adenytransferase는 2균주로 부터 전이된다는 것이었다. Combes 등은 임상에서 분리한 *E. faecalis* 균주가 aminoglycosides 항균제에 고도내성이었다는 것을 보고하였다⁴. 이 균주에서 amin-oglycoside 내성은 본래 합성된 phosphotransferase, acetyltransferase와 adeny-ltransferase에 의하여 전달된다. *E. faecium*에 내성이 제거된 균주와 transconjugants균주에서 amino-glycoside substrate 분석에서 streptomycin adeny-l-transferse(ANT-SM), APH-2", APH-3', AAC-6'의 역할을 보고하였다¹². 최근에 Ubukata 등은 *S. aureus*로 부터 6'-acetyltransferase뿐만 아니라 2"-phosphotransferase 역할을 갖는 이중적인 역할을 하는 내성효소를 분리하였다⁵⁸. 이러한 효소는 Enterococci에서도 발견되었다³⁸. Ferretti 등은 유전자를 특이화하는 이 효소는 플라스미드 전이와 유전자 융합의 결과로서 기인한다고 보고하였다¹⁶. 이 효소에 의해 촉매된 효소의 변형은 tobramycin, kanamycin, amikacin 및 gentamicin 내성 균주에서도 나타났다²³.

Enterococcus에서 플라스미드는 서로 다른 기능을 갖는 다양성에서 결정되며, 임상분리균 중 6개의 플라스미드를 갖는 균주가 보고되었다^{14,23,25,29,38}. Gentamicin 내성 분리균은 0에서 5개의 플라스미드를 보유하는 것으로 보고되었다. Gentamicin 고도내성 균주의 플라스미드 전이특성, 공여균주와 transconjugants 항균제 내성 및 제한효소 분석에 의해 heterogeneous임이 결정되었고, Gentamicin 내성 균주의 플라스미드는 자가전이 할 수 있다는 것이 보고되어졌다³⁸. 플라스

미드가 없는 *enterococcus* 수용균주 안에 내성 전달의 빈도는 10^{-1} 부터 10^{-8} 까지 다양했다³⁸⁾. pAM 866과 pAM864 같은 플라스미드는 접합에 있어서 broth와 일반적으로 filter membrane에 의해 빈약히 전달되는 pAMb1과 pIP501 같은 플라스미드와 유사했다. pAM862는 비접합성이나 pAD 1과 pAM1에 대한 성질이 유사한 접합성 플라스미드에 의해 이동된다^{14,26,29,34)}.

pAM862, pAM863 및 pBEM10 같은 gentamicin 내성 플라스미드들은 filter와 broth 법으로 수행하였을 때 높은 빈도로 전이되었다³⁴⁾. Clewell 등은 세포와 세포간의 이러한 플라스미드의 접촉은 sex pheromon이라는 기질에 대하여 공여균주의 반응을 이용하는 hemolysin 플라스미드인 pAD1에 의해 증명하였다³⁾. Pheromon은 수용균주와 응집과 접촉하기 위하여 어떤 공여균주를 유도하는 수용균주에 의해 분비되는 기질이다. 임상에서 *Enterococcus*균이 포함하는 pBEM10은 β -lactamase, gentamicin 내성과 peptide pheromon에 대해 반응하는 *E. faecalis* HH2에서 분리하였다. 본 연구에서 Gentamicin 고도내성 *E. faecalis* HL-1, 2, 3, 4, 5, 6으로 부터 분리한 플라스미드 DNA를 1% agarose gel을 이용하여 전기영동한 결과는 Fig 1과 같다. Gentamicin 고도내성 *E. faecalis* HL-1은 실험한 4가지 항균제에 모두 내성이 있는 균주이며 7종류의 플라스미드가 존재하였고 플라스미드의 크기는 1.97~51.7 Kb이었다. *E. faecalis* HL-2와 HL-3은 모두 6종류의 플라스미드가 존재하였고, 플라스미드의 크기는 4.65~38 Kb이었으며, HL-4는 7종류 플라스미드가 존재하였고, 플라스미드의 크기는 4.65~23.7 Kb이었고, HL-5는 4종류 플라스미드가 존재하였고, 플라스미드의 크기는 3.25~23.7 Kb이었으며, HL-6은 5종류의 플라스미드가 존재하였고, 플라스미드의 크기는 12~51.7 Kb이었다. 각 분자크기는 Table 7과 같다. 내성유형과 플라스미드 profile을 보면 3가지 이상의 항균제에 내성인 균주들은 대부분 51.7 Kb이상의 플라스미드를 보유하는데 비해, 2가지 항균제에 내성인 균주들은 플라스미드가 없거나 1개만 보유하고 있었다. 특히 *E. faecalis* 내성유형 중 가장 많은 빈도를 나타낸 GM EM 내성유형을 가진 18주 중 6주에서만 플라스미드가 관찰되었다. 그리고 내성유형은 같아도 플라스미드의 크기는 다른경우가 있었다. *E. faecalis* HL-1과 HL-6을 *EcoRI*과 *HindIII*

제한효소로 절단한 결과 분자량의 크기는 *EcoRI*단편은 7종류와 6종류의 플라스미드가 존재하였고, 플라스미드의 크기는 1.2 Kb~29.5 Kb이었다. *HindIII*단편은 8종류와 5종류의 플라스미드가 존재하였고, 플라스미드의 크기는 1.5 Kb~20.7 Kb이었다(Fig. 2). 제한효소 패턴은 내성유형과는 무관하였고, 분획상의 차이를 발견할 수 있었는데 *E. faecalis* HL-1과 HL-6의 플라스미드에는 없는 분획이었다. Aminoglycoside 내성 플라스미드들은 15에서 124 Kb범위내로 존재했으며, 제한효소 분석로 되었다. 제한효소 절단 패턴은 보통 제한효소 절편이 약간의 플라스미드 안에서 발견되는 것과 함께 heterogeneous 하다²⁹⁾. 본 연구에서 분리한 균주간의 전이실험에서 1% agarose gel 전기영동으로 단편의 수와 크기를 확인하였다. *E. faecalis* transconjugants HL-7과 HL-8을 *EcoRI*과 *HindIII*로 절단한 결과 각각 3개로 동일하게 나타났다(Fig. 3, 4). *E. faecalis* transconjugants HL-7과 8의 분자크기는 *EcoRI*은 29.5 Kb, 18.7 Kb, 7.5 Kb이었고, *HindIII*는 29.2 Kb, 15.9 Kb, 10.6 Kb이었다. 비록 플라스미드가 물리적으로 다르다 할지라도 DNA hybridization으로부터 gentamicin내성의 유전적 관련성은 시사된다. pSF815로 부터 enterococcal 내성 probe 연구에서 다양한 지역으로부터 임상에서 Enterococcal 분리균이 갖는 다섯개의 gentamicin 내성 플라스미드에서 hybridization은 보통 약 2 Kb의 *HaeIII*와 *MSPI* 단편에서 발견되었다⁷⁾.

Enterococci는 고도내성이 되기 위한 것과 접합과 transposition에 의한 유전적 정보전달에 잠재적이다. *In vitro*에서 Enterococci는 streptococci 종과 *S. aureus* 및 *S. epidermidis*와 접합할 수 있다³⁴⁾.

Wager 등은 또한 enterococci와 포도상구균 gentamicin 내성 유전자의 hybridization을 하였을 때 *S. aureus*와 *E. faecalis*의 임상 분리균으로부터 gentamicin 내성 플라스미드는 관련된 내성 유전인자에서 나타났다³⁷⁾. 이러한 발견은 직접적인 유전자교환 또는 보통의 이러한 내성에 대한 것은 원래균주로부터 제공되었다. 대부분 균주는 6 시간 후 filter membrane에서 gentamicin 유전자를 전이했다. 다른균주는 24시간 filter mating 후 gentamicin 고도내성이 전이되었으나, 이러한 사실의 근본적인 기작은 알려져 있지 않다. 분리균은 단지 gentamicin 내성, 다양한 다른 항균제 내성의 조합에서 hemolysin생성과 함께 전이된다.

본 연구에서 Gentamicin에 코도내성인 *E. faecalis* HL-1과 HL-6의 내성전달 빈도는 6.3×10^4 과 3.7×10^5 이었으며, *E. faecalis* HL-1의 내성전달 빈도가 높았다(Table 8). 수용균주 *S. aureus* SK-982를 이용한 전이실험에서 48시간 배양하여 형성된 transconjugants 집락을 분리하고 전기영동하여 플라스미드 DNA를 확인한 결과 공여균주인 *E. faecalis* HL-1과 HL-6의 플라스미드 중 51.7 Kb의 플라스미드 DNA가 확인되었다(Fig. 3) *E. faecalis* transconjugants R-1과 R-6의 제한효소 단편 수와 크기를 확인하였다. *EcoRI*과 *HindIII*로 절단한 결과 각각 heterogeneous하게 나타났다(Fig. 4, 5). *E. faecalis* transconjugants R-1과 R-6의 분자량의 크기는 *EcoRI*단편은 1.5~29.5 Kb이었고, *HindIII*단편은 0.6~29.2 Kb이었다. 이들 플라스미드를 제거했을 때 없어진 내성인자는 플라스미드를 분리하여 전기영동상의 비교로 확인하였다(Fig. 6). 접합은 획득, 전이 및 Enterococci의 gentamicin 내성 전파를 잘 묘사한 작용기전이다. 과거의 실험은 형질도입 및 transposition이 Enterococci 중에 gentamicin 내성을 중재하는 extrachromosomal DNA의 전파에 대한 기전일 것이라고 제시 되었다³⁵⁾. Zigelboim-Daum 등은 mitomicin C 및 단일 플라크, 박테리오파아지(OCH-19)로부터 형질도입을 경유 gentamicin 내성이 전이됨을 밝혔었다³⁹⁾. Gentamicin 내성인자의 transposition은 몇가지 증거에 의해 밝혀졌다. Gentamicin 내성 빈도는 1979년에 처음 보고된 이래 대단히 증가하게 되었다. Transposition은 그람양성 및 그람 음성 세균에서 광범위하게 작용하고 있고, tetracycline과 erythromycin처럼 다른 내성에 신속히 영향을 끼친다³⁾. 덧붙여 Enterococcus의 gentamicin 내성 플라스미드는 heterogeneous하다는 내성 유전자에 대한 관련성은 혼성화실험에 의하여 보여주었다. Aminoglycoside 내성은 Transposon에 다른 내성을 갖음으로써 플라스미드 DNA를 검출할 수 없을 때에도 전이된다. 더구나 *E. faecium*균주의 gentamicin 내성 플라스미드로부터 10 Md 단편을 결실시킴으로서 내성이 소실되었다^{21,28)}. 이러한 연구는 Enterococcus에 대한 gentamicin 내성에 대한 영향은 복잡하나 이해의 폭을 넓힐 수 있다. Tetracyclin probe DNA는 pBR322을 *EcoRI*과 *HindIII*로 이중절단하여 사용하였으며, 혼성화 결과 2.15 Kb단편에 반응하였다(Fig. 7).

SDS-PAGE를 시행한 후 Coomassie blue로 염색한 결과 약 7~16개의 단백질이 관찰되었다. 공여균주와 *E. faecalis* transconjugants R-1과 R-6 모두에서 대부분 공통적인 단백질로 나타났으며, 단백질의 이동속도는 균주별로 차이가 없었다(Fig. 8). *E. faecalis* HL-1, HL-6과 *E. faecalis* transconjugants R-1과 R-6균주의 항원시료를 muramidase로 처리하고(Fig. B, C, D, F), E, H, I, J는 mutanolysin을 처리하여 전기영동을 시행한 결과 그 중 97.8 Kd, 95.8 Kd, 74.8 Kd, 63.5 Kd의 주요 폴리펩티드 밴드가 있었으며 특히 95.8 Kd의 단백질은 아주 강하게 반응하였으며, 낮은 분자량에서도 단백질이 나타났다.복막감염 환자혈청을 이용하여 SDS-PAGE에 의해 공여균주 및 transconjugants균주의 항원성을 immunoblotting으로 분석하였다. *E. faecalis* HL-1과 *E. faecalis* transconjugants R-1균주는 97.8, 46.8 Kd의 분자량을 갖는 단백질과 공통적으로 반응하였고, *E. faecalis* HL-6와 *E. faecalis* transconjugants R-6균주는 46.8 Kd의 분자량을 갖는 단백질과 공통적으로 반응하였다. 그 반응의 강도는 95.8 Kd > 97.8 Kd > 46.8 Kd > 33.7 Kd > 63.5 Kd > 74.8 Kd 순이었다(Fig. 12). 공여균주 *E. faecalis* HL-3에서는 반응하지 않았던 97.8, 95.8, 74.8, 63.5 Kd의 단백질이 transconjugant 균주인 *E. faecalis* transconjugants R-6균주에서 반응하였다.

Enterococcus의 원내전파 방지를 위해서는 methicillin 내성 Staphylococcus와 다약제 내성 그람 음성 간균의 것과 같다. *E. faecalis*는 73,000, 40,000 그리고 37,000 daltons 분자량의 중특이성 표면 단백질 항원을 발현했다. Immunoblotting에서 *E. faecalis*감염에 의한 복막염 환자에서 97.8, 95.8, 74.8, 63.5, 33.7, 26.8 Kd의 항원을 검출하였고 이러한 실험은 배양되지 않은 *E. faecalis* 감염 환자 진단에 유용할 것이다¹⁾.

참 고 문 헌

1. Aitichison EJ, Lambegrt PA, Smith, EG and Farrel ID(1987): Serodiagnosis of *Streptococcus faecalis* endocarditis by immunoblotting of surface protein antigens. *J. Clin. Microbiol*, **25**: 211-215.
2. Calderwood SB, Wennersten C and Moellering RC(1981): Resistance to antibiotic synergism in

- Streptococcus faecalis*: further studies with amikacin and with a new amikacin derivative, 4'-deoxy, 6'-N-methylamikacin. *Antimicrob Agents Chemother* **19**: 549-555.
3. Clewell DB, Ehrenfeld EE, Kessler RE, Wirth M, Mori C, Kitada M, Fujino Y, and Suzuki A (1987): Sex pheromones and plasmid-related conjugation phenomena in *Streptococcus faecalis*, p.2-7. In J.J. Ferretti and R. Curtiss III (ed), Streptococcal genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 4. Combes T, Carlier C and Courvalin P (1983): Aminoglycoside-modifying enzyme content of a multiply resistant strain *Streptococcus faecalis*. *Antimicrob Agent Chemother*, **11**: 41-7.
 5. Coudron PE, Mayhall CG, Facklam RR, Spadora AC, Lamb VA, Lybrand MR and Dalton HP (1984): *Streptococcus faecium* outbreak in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*, **20**: 1044-1048.
 6. Courvalin P, Carlier C and Collatz E (1980): Plasmid-mediated resistance to aminocyclitol antibiotics in group D streptococci. *J Bacteriol*, **143**: 541-51.
 7. Eliopoulos GM, Wennersten C, Zigelboim-Daum S, Reiszner E, Goldmann D and Moellering RC (1988) High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus (Enterococcus) faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, **32**: 1528-1532.
 8. Facklam RR and Collins MD (1989): Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol*, **27**: 731-734.
 9. Farrow JAE, Jones D, Phillips BA and Collins MD (1983): Taxonomic studies on some group D streptococci. *J Gen Microbiol*, **129**: 1423-1432.
 10. Fernandez-Guerrero ML, Barros C, Rodriguez Tudela JL, Roblas RF and Soriano F (1988): Aortic endocarditis caused by gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **7**: 525-527.
 11. Ferretti JJ, Gilmore KS and Courvalin P (1986): Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2"-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *J Bacteriol*, **167**: 631-638.
 12. Forbes BA and Sharberg DR (1983): Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: Evidence for conjugative exchange of resistance. *J Bacteriol*, **153**: 627-634.
 13. Hoffmann SA and Moellering RC (1987): The enterococcus: "putting the bug in our ears." *Ann Intern Med*, **106**: 756-761.
 14. Horodniceanu T, Bougueleret T, El-solh N, Bieth G and Delbos F (1979): High-level, plasmid-borne resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, **16**: 686-689.
 15. Ikeda DP, Barry AL and Andersen SG (1984): Emergence of *Streptococcus faecalis* isolates with high-level resistance to multiple aminocyclitol aminoglycosides. *Diagn. Microbiol Infect Dis*, **2**: 171-177.
 16. Kang H, Yuk DI, Kwak YJ, Kang YS, Song KS and Lee HH (1990): Susceptibility of *Enterococcus* to Ampicillin and other Antimicrobial Agents. *J Kor Sor Microb*, **25**: 393-398.
 17. Kathalia S, Lolans V, Levandowski R and Jackson GG (1984) Resistance to all aminoglycoside antibiotics in enterococcal endocarditis. *Clin Res*, **32**: 372.
 18. Krogstad DJ and Parquette AR (1980): Defective killing of enterococci: a common property of antimicrobial agents acting on the cell wall. *Antimicrob, Agents Chemother*, **17**: 965-968.
 19. Laemmli UK (1970): Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
 20. LeBlanc DJ, See LN, Titmas BM, Smith CJ, and Tenover FD (1988): Nucleotide sequence analysis of tetracycline resistance gene *tetO* from *Streptococcus mutans* DL5. *J Bacteriol*,

- 170: 3618-3626.
21. Loewe L, Candel S and Eiber HB(1951): Therapy of subacute enterococcus (*Streptococcus faecalis*) endocarditis. *Ann Intern Med*, **34**: 717-736.
 22. Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J(1982): Molecular cloning. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor laboratory.
 23. Mederski-Samoraj BD and Murray BE(1983): High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. *J Infect Dis*, **147**: 751-757.
 24. Moellering RC and Weneersten C (1983): Therapeutic potential of rifampin in enterococcal infections. *Rev Infect Dis*, **5**(Suppl.): 528-532.
 25. Murray BE, An FY and Clewell DB(1988): Plasmids and pheromone response of the β -lactamase producer *Streptococcus*(*Enterococcus*) *faecalis* HH22. *Antimicrob Agents Chemother*, **32**: 547-551.
 26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1988a. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 4th ed. Tentative standard. NCCLS document M2-T4. National Committee for Clinical laboratory Standards, Villanove, Pa.
 27. National Committee for Clinical laboratory Standards (1988b). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 2nd ed. Tentative standard. NCCLS document M7-T2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
 28. Neu HC(1985): Penicillins, p.116-180. In G.L. Mandell, R.G. Douglas, and J.R.Bennett(ed), Principles and practice of infectious disease. John Wiley & Sons, Inc., New York.
 29. Patterson JE, Colodny SM and Zervos MJ (1988): Serious infection due to β -lactamase-producing *Streptococcus faecalis* with high-level resistance to gentamicin. *J Infect Dis*, **158**: 1144-1145.
 30. Rice LB, Eliopoulous GM and Moellering RC (1989): *In vitro* synergism between daptomycin and fosfomycin against high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **33**: 470-473.
 31. Smith SM and Eng RHK(1988): Interaction of ciprofloxacin with ampicillin and vancomycin for *Streptococcus faecalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **9**: 239-243.
 32. Smyth CJ, Docent MA, Halpenny MK and Ballagh SJ(1987): Carriage rates of enterococci in the dental plaque of haemodialysis patients in Dublin. *Br J Oral Maxillofacial Surg*, **25**: 21-33.
 33. Southern EM(1975): Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Molec Biol*, **98**: 503-517.
 34. Toala P, McDonald A, Wilcox C and Finland M(1969): Susceptibility of group D *Streptococcus* (*Enterococcus*) to 21 antibiotics in vitro, with special reference to species differences. *Am J Med Sci*, **258**: 416-430.
 35. Tofte RW, Solliday J and Crossley KB(1984): Susceptibilities of enterococci to twelve antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, **25**: 532-533.
 36. Ubukata K, Yamashita Gotoh N and Konno M (1984): Purification and Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **25**: 754-759.
 37. Wager AR, Zscheck KK and Murray BE(1988): Comparison of β -lactamase and gentamicin plasmids from enterococci and staphylococci. In: Proceedings of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology. Washington, DC:American Society for Microbiology.
 38. Zervos MJ, Bacon AE, Patterson JE, Schaberg DR and Kauffman CA(1988): Enterococcal superinfection in patients treated with ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*, **21**: 113-115.
 39. Zighelboim-Daum S, Wennersten C, Elipoulous GM and Moellering RC (1988): Transfer of gentamicin among enterococci by transduction. In: Program of abstracts of the Interscience

Conference Antimicrobial agent and Chemotherapy. Washington DC:American Society for Microbiology.

40. Zimmerman RA, Moellering RC and Weinberg AN(1971): Mechanism of resistance to antibiotic synergism in enterococci. *J Bacteriol*, **105**: 873-879.

= Abstract =

Studies on Antimicrobial Susceptibility and Characteristics of R-plasmids and Antigens of High-level Gentamicin Resistant *Enterococcus faecalis*

Hyun Kang

Institute for Genetic Engineering Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

Forty gentamicin-resistant isolates of *Enterococcus faecalis* were selected from various clinical materials, determined their antimicrobial susceptibility, and studied their R-plasmid characteristics and polypeptide patterns. All of the isolates were susceptible to vancomycin. The MICs($\mu\text{g/ml}$) of antimicrobial agents to the isolates were as follows; the MIC of gentamicin was 128 and ≥ 2040 , ampicillin 1 and 1, chloramphenicol 2 and 8, erythromycin 32 and 256, and vancomycin 1 and 2. *E. faecalis* HL-1 strain had 8 plasmid DNA elements, HL-2 and HL-3 strains had 6, HL-4 had 7, HL-5 had 4, and HL-6 had 5. The 51.7 Kb of gentamicin resistance plasmid DNA was conjugally transferred from two strains of *E. faecalis* HL-1 and HL-6 to *S. aureus* SK 982. The plasmid transfer frequency between *S. aureus* SK 982 and *E. faecalis* HL-1 or *E. faecalis* HL-6 was 6.3×10^{-4} and 3.7×10^{-5} , respectively. Plasmid curing ratio after the treatment of ethidium bromide($10 \mu\text{g/ml}$) to *E. faecalis* transconjugants R-1 and R-6 were about 51% and 67%, respectively. The tetracycline gene was located in 2.15 Kb plasmid of *E. faecalis* HL-1, but it was not found in the *E. faecalis* HL-6 by Southern blot analyses.

The antigenic components of *E. faecalis* HL-1, HL-6, R-1 and R-6 strains were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. The *E. faecalis* strains had 7 to 16 polypeptide bands, however their major proteins were 97.8 and 26.8 Kd. At the Immunoblotting, 97.8, 95.8, 74.8, 63.5, 33.7 and 26.8 Kd polypeptides of the strains showed major antigenic activities with patient's sera infected intra-abdominally with an *E. faecalis* strain.

Key Word: *Enterococcus faecalis*, high-level resistant, gentamicin.

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 1(1): 55-72, December 1995]

* Corresponding author