

Salmonella 菌屬의 抗菌劑 耐性 및 R-plasmid

李明遠* · 鄭泰華* · 李淵台 · 姜正福

國立保健院 疫學調查科*
檀國大學校 理工大學 微生物學科

Antimicrobial Drug Resistance and R-plasmid of *Salmonella* species

Myung-Won. Lee* · Tae-Wha Chung* Yun-Tai Lee. · Jeung-bok. Kang

*Department of microbiology. National Institute of Health**
Department of microbiology Dankuk University.

Abstract

Two hundred and eighty-six strains of *Salmonella* species were isolated from the twelve provincial institutes of health and 19 general hospitals of urban and rural areas in Korea from January to December in 1986. The antimicrobial susceptibility test of these cultures was done by the method of agar diluton.

The resistance frequency of *Salmonella* cultures was 29.7%. Among these resistant cultures, the most prevalent resistance pattern of *Salmonella* was ampicillin, carbenicillin, chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, and its resistance frequency was 15%.

In plasmid profile of resistance strains, average number of plasmid harboring in *Salmonella* was 1-4 and molecular weight of plasmid ranged 1.6 to 70 megadalton (Md.). Plasmid pattern of strains isolated from Seoul and Kang-won showed the same or similar profiles. Plasmid pattern was identical in the same resistance pattern.

I. 서 론

Salmonella 는 장내세균군에 속하는 그람 음성 간균으로 병원성 이질, 병원성 대장균, 장염 비브리오 균속등과 함께 장관계 전염병을 일으키는 주요한 장내 세균이며, somatic 항원인 O항원, flagella 항원인 H항원 및 envelope 항원인 Vi 항원에 의해 2,000여 혈청형으로 구분되고 있다.(Ewing, 1986).

이들 가운데에는 *Salmonell typhi*, *S. paratyphi* A, B 등 사람에게만 질병을 일으키는 것, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. senftenberg* 등 사람과 동물에 공통으로 질병을 일으키는 것으로 구분할 수 있는 것도 있으나 일반적으로 많은 종이 사람과 동물에 공통으로 질병을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다 (손준용등, 1971).

또한 사람이나 동물 이외에 간혹 식물이나 토양 및 파충류에서 분리되기도 하며 (Krieg and Holt, 1984), 국내에서도 자연환경 및 하수에서 (이중훈등, 1979; 이연태와 이중훈, 1981), 그리고 가축 (하유대등, 1971) 등에서 분리되고 있다.

Salmonellosis는 흔히 *S. typhi* 가 원인이 되어 왔으나 타 혈청형의 *Salmonella* 감염이 점차 증가하고 있고, 우리나라에서는 여름철에 특히 많이 발생하고 있으나 사계절에 걸쳐 발생하고 있어서 풍토병의 성격을 나타내고 있다 (정윤섭등, 1979; 이연태와 이중훈, 1981; 서민호등, 1983; 정태화등, 1986a, b, c)

일반적으로 *Salmonella* 는 항균제에 대해 내성을 쉽게 가지지 않는 것으로 알려져 있으나 (전도기와 설성용, 1979), 정윤섭등 (1987)의 보고에 의하면 *S. typhi* 의 내성 균주는 감

소하는 반면 타 혈청 형의 *Salmonella* 에서 내성균주가 증가하고 있다.

이러한 내성균주의 증가 요인으로는 여러 가지가 있으나, 항균제의 광범위한 사용과 남용으로 인하여 장기간에 걸쳐 항균제에 접촉함으로써 내성을 획득할 뿐만 아니라 접합에 의하여 전달성 R-plasmid를 다른 세균으로부터 전달 받음으로써 쉽게 내성을 획득할 수 있음은 잘 알려진 사실이다 (조동택, 1983; 홍성노와 이연태, 1986; Watanabe, 1963).

전달성 내성인자인 R-plasmid에 관해서는 국내외에서 많은 연구가 이루어져 있으며 (이유철등, 1987; Watanabe, 1963; Mitsuhashi et al., 1967), 종래의 생화학적, 혈청학적 제성상외에 항균제 내성패턴 및 plasmid 패턴 조사, plasmid의 분자적 특성 분석등이 내성균주의 유래를 추적하는데 중요한 단서가 되고 있다 (조동택, 1984; Farrar, 1981; Brunner et al., 1983).

저자는 1986년도에 분리된 *Salmonella* 균속 286주에 대하여 생화학적 및 혈청학적 동정실험으로 균분리 현황을 알아보고자 하였고, 항균제 감수성 검사를 실시하여 내성의 정도와 그 패턴을 알아보고자 하였다. 아울러 내성인 균주를 선택하여 접합에 의한 내성전달과 plasmid 패턴과의 관계를 조사하였다.

II. 재료 및 연구

가. 실험균주

전국 시·도 보건 연구소 및 주요 종합병원에서 1986년 1월에서 12월 사이에 분리 수집된 *Salmonella* 균속 286주를 실험균주로 사용하였다.

나. 사용배지, 항혈청 및 항균제

본 실험에서 사용한 Müller Hinton agar, Müller Hinton broth, MacConkey agar 및 tripticase soy broth 등의 배지와 항혈청은 Difco(USA) 제품을 사용하였으며, 그 방법은 Difco manual에 따라 제조하여 사용하였다. 항균제 감수성 검사에 사용한 항균제는 WHO 표준품을 국립보건원 약품부 생물물질과에서 분양받아 사용하였다.

다. 생화학적 실험

수집된 균주를 MacConkey agar 평판배지에 선상도말 배양하여 재 분리시킨 후, Lennette et al. (1985) 및 Ewing(1986)의 방법에 따라 확인 동정한 후, *Salmonella* 균으로 확인된 균주는 혈청학적 실험을 실시하였다.

라. 혈청학적 실험

O항원 실험은 slide 응집 방법으로 실시하였고, H항원 실험은 시험관법으로 실시하여 각 *Salmonella* 균 혈청형을 결정하였다.

마. 항균제 감수성 조사

본 실험에 사용한 항균제는 ampicillin (이하 Am), amikacin(Ak), carbenicillin(Cb), cephalothin(Cp), chloramphenicol(Cm), gentamicin(Gm), Kana - mycin(Km), nalidixic acid(Na), streptomycin(Sm), tetracycline(Tc), tobramycin(Tb), co-trimoxazole [trimethoprim:sulfamethoxazole(1:19)](Ts) 등, 12종류 (Thornsberry et al., 1983)를 사용하였다. 각 항균제를 적당한 용매에 녹여

-20 °C 냉동고에 보관하면서 사용하였다 (Table 1).

항균제 감수성 검사는 한천평판희석법(Lennette et al., 1985; Thornsberry et al., 1983)으로 실시하였으며, 배지는 Müller Hinton broth(MHB) 및 Müller Hinton agar(MHA)를 사용하였다. 항균제를 녹여 2배수로 순차적으로 희석하여 MHA배지에 포함시켜 한천 평판배지를 만들어 4°C 냉장고에 보관 하였다가 다음날 무균상자 안에서 자연 건조 시켜 배지표면의 습기를 제거한 후 바로 사용하였다. 준비된 항균제 배지에 MHB에서 18시간 (37 °C) 배양된 실험균주를 식염수로 100배 희석하여 식균한 후 37°C에서 18시간 배양한 후 식균 부위를 육안으로 관찰하여 최소발육억제 농도(MIC, minimal inhibitory concentration)를 결정하였다.

매 실험마다 항균제가 포함된 배지의 항균제 적정농도를 확인하기 위하여 *E. coli* ATCC 25922와 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213을 함께 식균하여 Table 2와 같을 때 적정 농도로 확인하였다. 감수성 검사 결과 MIC가 Table 3과 같을때 내성으로 판정 하였고, NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards, Thornsberry et al., 1983)에 기준이 정하여져 있지 않은 streptomycin은 64 µg/ml이상을 내성으로 판정하였다.

바. 접합에 의한 내성전달 시험

항균제 감수성 검사결과 1제 혹은 그 이상의 항균제에 내성을 가지는 균주를 공여균으로 사용하였고 피전달균으로는 *E. coli* K-12 ML 1410을 사용하였다. *E. coli* K-12 ML

Table 1. Solvent and diluents for stock solutions of antimicrobial agents

Antimicrobial Agents	Solvent	Diluent
Amikacin	Water	Water
Ampicillin	Phosphate buffer pH 8.0, 0.1M	Phosphate buffer pH 8.0, 0.1M
Carbenicillin	Water	Water
Cephalothin	Phosphate buffer pH 6.0, 0.1M	Water
Chloramphenicol	Ethanol	Water
Gentamicin	Phosphate buffer pH 8.0, 0.1M	Water
Kanamycin	Phosphate buffer pH 8.0, 0.1M	Water
Nalidixic acid	NAOH 1N	Water
Streptomycin	Water	Water
Tetracycline	Water	Water
Tobramycin	Phosphate buffer pH 8.0, 0.1M	Phosphate buffer pH 8.0, 0.1M
Sulfonamides	1/2 volum hot water and minimal amount of 2.5M	Water
Trimethoprim	NAOH to dissolve 0.05 N latic or hydrochloric acid, 10 % of final volume	Water (may require heat)

Table 2. Range of MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) for standard strains

Antimicrobial	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>E. coli</i> ATCC25922
Amikacin	1.0 -4.0	0.5 -4.0
Ampicillin	0.25-1.0	2.0 -8.0
Carbenicillin	2.0 -8.0	4.0 -1.6
Cephalothin	0.12-0.5	4.0 -1.6
Chloramphenicol	2.0 -8.0	2.0 -8.0
Gentamicin	0.25-1.0	0.25-1.0
Kanamycin	1.0 -4.0	1.0 -4.0
Nalidixic acid	---	1.0 -4.0
Tetracycline	0.25-1.0	1.0 -4.0
Tobramycin	0.25-1.0	0.25-1.0
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole (1/19)	<0.5/9.5	<0.5-9.5

Table 3. Criteria of resistant strains expressed by MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Antimicrobials	Resistant
Amikacin	>16
Ampicillin	>16
Carbenicillin	>128
Cephalothin	>16
Chloramphenicol	>16
Gentamicin	>8
Kanamycin	>32
Nalidixic acid	>16
Tetracycline	>8
Tobramycin	>8
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole(1/19)	>2/38

1410 은 nalidixic acid 에 내성을 가지고 있다 (홍성노와 이연태, 1986 ; 이유철등, 1987).

MHB 에 식균하여 37 °C 에서 18 시간 배양된 공여균과 피전달균을 각각 5 ml 의 MHB 에 접종하여 37 °C 항온조 내에서 3 ~ 4 시간 진탕 배양한 후, 공여균과 피전달균을 1:4로 혼합하여 37 °C 에서 18 시간 배양하였다. 이 혼합 배양액을 적당한 선택배지에 도말하여 37 °C 에서 18 시간 배양시킨 다음 균이 발육하였으면 공여균의 내성이 피전달균으로 전달된 것으로 판정하였다. 선택배지는 적당한 농도의 nalidixic acid 와 공여균이 내성을 가지는 항균제를 함께 포함하는 MHA 평판배지를 사용하여 내성을 전달받은 피전달균만이 발육할 수 있게 하였다. 매 실험마다 공여균과 피전달균을 같은 조건 하에서 함께 배양하여 각각 해당 배지에서 발육할 수 없음을 확인하였다. 내성을 전달받은 것으로 보이는 선택배지에서 자란 집락을 임의로 4 ~ 5 개씩 선택하여 MacConkey agar 평판 배지에 분리 배양하여 피전달균인 *E. coli* 임을 확인한 후 항균제 디스크 확산법으로 내성전달을 확인하였다.

사. Plasmid DNA 분리

Plasmid DNA 분리는 Kado 와 Liu (1981) 의 방법을 변형하여 사용하였다. Trypticase soy broth (TSB) 5 ml 에 실험균주를 식균하여 37 °C, 200rpm 으로 24 시간 진탕배양한 후 500 µl 를 취하여 12,000 rpm 에서 2 분간 원침시켰다. 상청액을 버리고 TE buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) 200 µl 를 넣어 세균침사를 부유시키고 값, lysis 용액 (3% SDS in 50mM Tris, pH 12.6) 400 µl 을

가하여 잘 혼합하여 세포를 파쇄하였다. 55 °C 항온 수조에서 45 분간 반응시킨 후 얼음에서 5 분간 냉각시켰다.

Phenol-chloroform (1 : 1 / V : V) 용액 800 µl 를 가하여 단백질이 충분히 제거되도록 잘 혼합한 후 12,000 rpm 에서 15 분간 원심분리 시켰다. Pasteur 피펫을 사용하여 상청액을 조심스럽게 깨끗한 micro-centrifuge tube 에 회수하여 gel-loading buffer (0.25 % bromophenol, 0.25 % xylene cyanol, 15 % Ficoll type 400 을 증류수에 녹여 만든 액을 TBE buffer 로 6 배 희석한 액) 와 8 : 1 이 되게 혼합하여 전기영동에 사용하였다.

TBE buffer (89mM Tris base, 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH 8.0) 에 0.7 % 되게 agarose 를 녹여서 겔을 만들고 수평 전기영동 장치에서 TBE buffer 를 사용하여 60mA 에서 3 시간 정도 전기영동을 하였다. 영동이 끝난 겔은 0.5 µg/ml ethidium bromide 용액에 30 분간 염색시킨 후 UV . transilluminator 상에서 polaroid camera 로 polaroid 667 film 을 사용하여 plasmid DNA 밴드를 촬영하였다. 매 실험마다 이미 그 분자량이 알려져 있는 *E. coli* V 517 (Francis et al., 1978) 균주의 plasmid 를 함께 영동으로 plasmid DNA 의 크기를 계산하였다. (Maniatis et al., 1982).

III 결 과

가. 균주분리

분리된 균주의 월별 분포, 지역별 분포, 성별 분포, 연령별 분포, 및 가검물별 분포는

각각 Figure 1, 2, 3, 4 및 5와 같다. 월별 분포에서는 5월에서 7월 사이에서 많이 분리되었으며 9월에 50주 (17.5%)로 가장 많이 분리되었다. 성별 분포에서는 남성이 119주 (41.6%)로 여성 82주 (28.7%)보다 많이 분리되었다. 연령별 분포에서는 1세에서 60세 까지 고른 분포로 분리되었다.

혈청학적 실험결과는 Table 4와 같으며 *Salmonella typhimurium*이 92주 (32.2%)로 가장 많이 분리됐고, *S. paratyphi-A* 45주 (15.7%), *S. enteritidis* 41주 (14.3%), *S. paratyphi-B* 27주 (9.4%) 순으로 분리되었다.

Sero-group 별로 살펴보면 B group이 158주로 55.2%를 차지하여 가장 많이 분리되었으며, A group이 45주 (15.7%), C group이 22주 (7.7%), D group이 43주 (15%), E group이 14주 (4.9%), G group이 3주 (1.2%) 및 K group이 1주 (0.3%)로 분리되었다.

나. 항균제 감수성 검사

항균제 감수성 검사의 결과는 Table 5에 제시된 바와 같이 Ak, Cp, Gm, Na에서는 286주 모두가 감수성으로 나타났다. 반면에 Tc에서 80주 (28%)가 내성을 보여 가장 높은 내성빈도를 나타냈으며, Sm 65주 (22.7%), Am 54주 (18.8%), Cb 54주 (18.8%), Cm 51주 (17.8%), Km 7주 (2.4%), Ts 2주 (0.7%), 및 Tb 1주 (0.3%)가 내성으로 나타났다.

각 항균제에 내성인 균주는 Table 6에서와 같이 한가지 이상의 항균제에 내성을 가지는 균주가 총 85주 (29.7%)로 나타났다. 1

제에 내성인 균주는 23주 (전체실험 균주 286주 대비 % : 8%) [내성인 균주 85주 대비 % : 27%]로 나타났으며, 2제에 내성인 균주가 7주 (2.4%) [8.2%], 4제에 내성인 균주는 5주 (1.8%) [5.9%], 5제에 내성인 균주가 44주 (15.4%) [51.8%], 6제에 내성인 균주는 5주 (1.8%), [5.9%], 7제 내성균주 1주 (0.3%) [1.2%]로 나타나 5제에 내성인 균주가 가장 많았으며 그 중에서도 AmCbCmSmTc에 동시 내성을 보이는 균주가 43주로 가장 많았다.

Sero-group 별 내성분포는 B group이 76주 (26.6%) [89.4%]로 가장 높았고 C group이 7주 (2.4%) [8.2%]로, D와 E group이 1주 (0.3%) [1.2%]로 각각 나타났다.

혈청형별 내성은 *S. typhimurium*이 66주 (23.1%) [77.6%], *S. paratyphi-B*가 7주 (2.4%) [8.2%], *S. muenchen*이 6주 (2.1%), [7.1%], *S. stanley*가 2주 (0.7%) [2.4%], *S. derby*, *S. newport*, *S. enteritidis*, *S. senftenberg*가 각각 1주 (1.2%) [0.3%]로 나타났다 (Table 7).

다. 접합에 의한 내성전달

Table 8과 같이 다양한 내성 패턴에서 내성이 전달되었다. 도표 이외의 결과에서 AmCbCmSmTc의 5제에 동시내성을 갖는 21주에서도 *E. coli* ML1410에 내성이 전달됨을 확인하였다. 그러나 Tc에 내성인 14주와 SmTc에 내성인 7주는 내성을 전달하지 못하였다. 내성을 전달 받은 것으로 확인된 피전달균을 선택하여 plasmid DNA를 분리하여 plasmid가 전달된 것을 확인하였다.

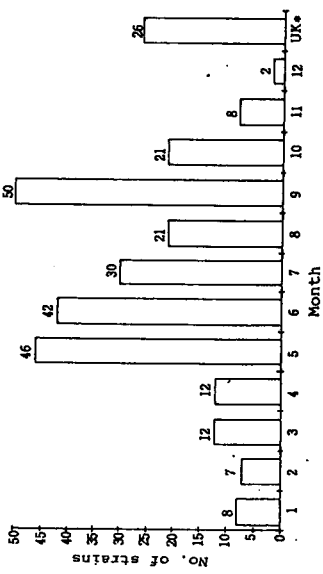
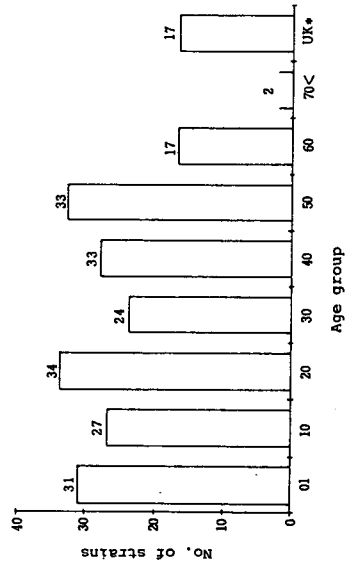


Fig. 1. Seasonal distribution of Salmonella species isolated in Korea.

Fig. 4. Age group distribution of Salmonella species isolated in Korea



* 01(0-9) year-old), 10(10-19), 20(20-29), 30(30-39), 40(40-49) 50(50-59), 60(60-69) UK : Unknown

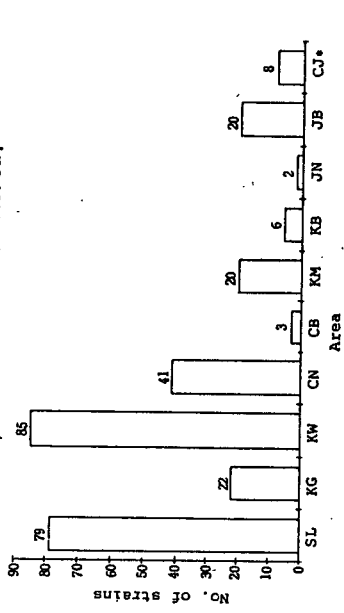


Fig. 2. Geographical distribution of Salmonella species isolated in Korea.

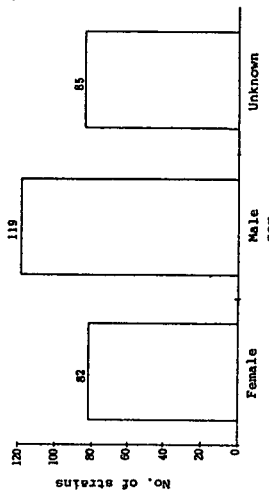


Fig. 3. Sex distribution of Salmonella species isolated in Korea.

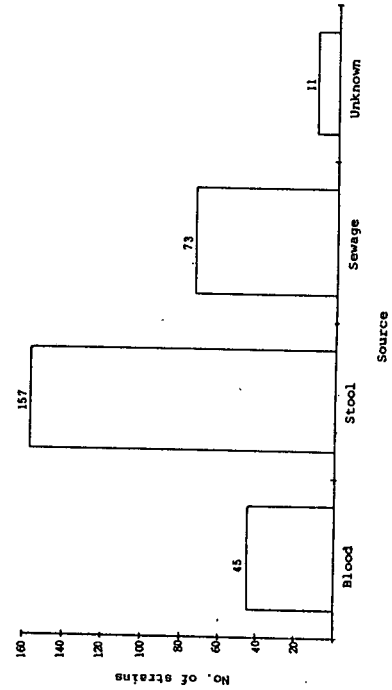


Fig. 5. Source distribution of Salmonella species isolated in Korea

Table 4. Number of culture and serover of *Salmonella* species isolated in 1986.

Sero-group	Serovar	Somatic(O) antigen	Flagella(H) Phase I	antigen Phase II	No. of strains (%)
A	<i>paratyphi - A</i>	<u>1</u> , 2, 12	a	[1, 5]	45 (15.7)
subtotal					45 (15.7)
B	<i>agona</i>	4, 12	f, g, s	-	7 (2.4)
B	<i>bredeney</i>	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	l, v	1, 7	2 (0.7)
B	<i>derby</i>	<u>1</u> , 4, [5], <u>12</u>	f, g	[1, 2]	3 (1.0)
B	<i>heidelberg</i>	<u>1</u> , 4, [5], <u>12</u>	r	1, 2	6 (2.1)
B	<i>paratyphi - B</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	b	1, 2	27 (9.4)
B	<i>saintpaul</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	e, h	1, 2	1 (0.3)
B	<i>schwarzengrund</i>	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	d	1, 7	12 (4.2)
B	<i>stanley</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12, <u>27</u>	r	1, 2	8 (2.8)
B	<i>typhimurium</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	i	1, 2	92 (32.2)
subtotal					158 (55.2)
C1	<i>braenderup</i>	6, 7, <u>14</u>	e, h	e, n, z15	1 (0.3)
C1	<i>infantis</i>	6, 7, <u>14</u>	r	1, 5	8 (2.8)
C1	<i>larochelle</i>	6, 7	e, h	1, 2	1 (0.3)
C1	<i>oranienburg</i>	6, 7	m, t	-	1 (0.3)
C1	<i>tennessee</i>	6, 7, <u>14</u>	z29	[1, 2, 7]	2 (0.7)
C2	<i>muenchen</i>	6, 8	d	1, 2	7 (2.4)
C2	<i>newport</i>	6, 8	e, h	1, 2	2 (0.7)
subtotal					22 (7.7)
D1	<i>dublin</i>	<u>1</u> , 9, 12, [Vi]	g, p	-	2 (0.7)
D1	<i>enteritidis</i>	<u>1</u> , 9, 12	g, m	[1, 7]	41 (14.3)
subtotal					43 (15.0)
E1	<i>london</i>	3, 10	l, v	1, 6	5 (1.7)
E2	<i>newington</i>	3, <u>15</u>	e, h	1, 6	1 (0.3)
E4	<i>senftenberg</i>	1, 3, 19	g, [s], t	-	8 (2.8)
subtotal					14 (4.9)
G2	<i>havana</i>	<u>1</u> , 13, 23	f, g, [s]	-	1 (0.3)
G2	<i>kedougou</i>	<u>1</u> , 13, 23	i	1, w	2 (0.7)
subtotal					3 (1.2)
K	<i>cerro</i>	<u>6</u> , <u>14</u> , 18	z4, z23	[1, 5]	1 (0.3)
Total					286

1) An underscore beneath the designation for an O antigen indicates that the bacterial strain has been lysogenized.

2) Brackets [] indicate that the antigen may be absent.

Table 5. Drug susceptibility pattern of *Salmonella* cultures(1986)

MIC* Drug	1/8	1/4	1/2	1	2	4	8	16	32	64	128	256	256<
AK No. (**)			22	18	68	173	5						
% (***)			7.7	6.3	23.8	60.5	1.7						
Cu% (****)			7.7	14.0	37.8	98.3	100						
AM No.			4	15	131	78	4						54
%			1.4	5.2	45.8	27.4	1.4						18.8
Cu %			1.4	6.6	52.4	79.8	80.1						100
CB No.					2	97	61	39	27	6			54
%					0.7	33.9	21.3	13.7	9.5	2.1			18.8
Cu %					0.7	34.6	55.9	69.6	79.1	81.2			100
CM No.				1		40	190	4					
%				0.3		14.0	66.4	1.4					
Cu %				0.3		14.3	80.8	82.2					
CP No.					22	161	56	47					
%					7.7	56.3	19.6	16.4					
Cu %					7.7	64.0	83.6	100					
GM No.	4	30	15	115	119		3						
%	1.4	10.5	5.2	40.3	41.6		1.0						
Cu %	1.4	11.9	17.1	57.4	99.0		100						
Km No.			3	33	26	162	55						7
%			1.0	11.5	9.2	56.6	19.2						2.4
Cu %			1.0	12.5	21.7	78.3	97.5						100
NA No.					1	248	37						
%					0.3	86.7	13.0						
Cu %					0.3	87.0	100						
SM No.						16	73	126	6	1		1	63
%						5.6	25.5	44.1	2.1	0.3		0.3	22.1
Cu %						5.6	31.1	75.2	77.3	77.6		77.9	100
TB No.		29	40	173	42	1				1			
%		10.1	14.0	60.5	14	0.3				0.3			
Cu %		10.1	24.1	84.6	99.4	99.7				100			
Tc No.					9	155	42			1	18	59	2
%					3.1	54.3	14.7			0.3	6.3	20.6	0.7
Cu %					3.1	57.4	72.1			72.4	78.7	99.3	100
TS No.	1	74	90	42	77	2							
%	0.3	25.9	31.5	14.7	26.9	0.7							
Cu %	0.3	26.2	57.7	72.4	99.3	100							

Total number of strains is 286

(*) ; ug/ml (**); Number of strains, (***) ; %, (****); Cumulative %
 AK(Amikacin), AM(Ampicillin), CB(Carbenicillin), CM(Chloramphenicol),
 CP(Cephalothin), GM(Gentamicin), KM(Kanamycin), NA(Nalidixic acid),
 SM(Streptomycin), TB(Tobramycin), TC(Tetracycline), TS(Co-trimoxazole).

Table 6. Drug resistance pattern of *Salmonella* culturess(1986)

No. of drugs Multiply Resistant to	R-pattern	No. of strains (*%) [**%]
1	Tc	19 (22.4) [6.6]
	Sm	4 (4.7) [1.4]
subtotal		23 (27.0) [8.0]
2	SmTc	7 (8.2) [2.4]
subtotal		7 (8.2) [2.4]
4	AmCbSmTc	4 (4.7) [1.4]
	CmKmSmTc	1 (1.2) [0.3]
subtotal		5 (5.9) [1.8]
5	AmCbCmKmTc	1 (1.2) [0.3]
	AmCbCmSmTc	43 (50.6) [15.0]
subtotal		44 (51.8) [15.4]
6	AmCbCmKmSmTc	4 (4.7) [1.4]
	AmCbCmSmTcTs	1 (1.2) [0.3]
subtotal		5 (5.9) [1.8]
7	AmCbCmKmSmTbTs	1 (1.2) [0.3]
TOTAL		85 (100) [29.7]

(*%) : Percentage of 85 resistant strains

[**%]: Percentage of total 286 strains

Table 7. Drug resistance pattern of *Salmonella* serovar isolated in 1986

Sero-group	Serovar	Resistance pattern	No. of strains	Percentage	
				*	**
B	<i>derby</i>	T	1	1.2	0.3
	<i>stanley</i>	Sm	2	2.4	0.7
	<i>paratyphi</i> -B	SmTc	6	7.1	2.1
		AmCbCmSmTc	1	1.2	0.3
	<i>typhimurium</i>	Sm	1	1.2	0.3
		Tc	17	20.0	5.9
		SmTc	1	1.2	0.3
		AmCbSmTc	4	4.7	1.4
		AmCbCmSmTc	41	48.2	14.3
		AmCbCmSmTcTs	1	1.2	0.3
	AmCbCmKmSmTbTs	1	1.2	0.2	
subtotal			76	89.4	26.2
C2	<i>newport</i>	AmCbCmKmTc	1	1.2	0.3
	<i>muenchen</i>	CmKmSmTc	1	1.2	0.3
		AmCbCmSmTc	1	1.2	0.3
		AmCbCmKmSmTc	4	4.7	1.4
subtotal			7	8.2	2.4
D1	<i>enteritidis</i>	Tc	1	1.2	0.3
E4	<i>senftenberg</i>	Sm	1	1.2	0.3
Total			85	100	29.7

* Percentage of 85 resistant strains

** Percentage of total 286 strains

Table 8. Drug resistance pattern and transferable drug resistance of *Salmonella* strains isolated in 1986

Resistance pattern	serovar	No. of strains	Resistance pattern transferred
AmCbCmKmSmTbTs	<i>typhimurium</i>	1	AmCbCmKmSmTbTs
AmCbCmSmTcTs	<i>typhimurium</i>	1	AmCbCmSmTcTs
AmCbCmSmTc	<i>typhimurium</i>	12	AmCbCmSmTc
AmCbSmTc	<i>typhimurium</i>	4	AmCbSmTc
Sm	<i>stanley</i>	1	Sm
Total		19	

Table 9. Plasmid and drug resistance patterns of *Salmonella* isolated from various area

Drug resistance	Serovar	Area	No. of strains	Mass of plasmids(Md.)	No. of plasmids
Tc	<i>typhimurium</i>	chung-nam	14	42,3, 2.4, 2.2	3
	<i>enteritidis</i>	seoul	1	48	1
	<i>typhimurium</i>	seoul	1	48	1
	<i>derby</i>	Kyong-nam	1	48	1
Sm	<i>typhimurium</i>	seoul	1	48	1
	<i>stanley</i>	kang-won	1	37, 5	2
	<i>stanley</i>	cheon-nam	1	13, 4.7, 3.4	3
	<i>senftenberg</i>	kang-won	1	3.4	1
SmTc	<i>typhimurium</i>	seoul	1	5.8, 3.5, 2.4, 1.8	4
	<i>paratyphi - B</i>	seoul	6	5.8, 3.5, 2.4, 1.8	4
AmCbSmTc	<i>typhimurium</i>	kang-won	4	48, 6.2, 2.3	3
AmKmSmTc	<i>muenchen</i>	kang-won	1	49, 5	2
CmCbCmSmTc	<i>typhimurium</i>	seoul	15	57	1
	<i>typhimurium</i>	seoul	2	57, 2	2
	<i>typhimurium</i>	kang-won	0	53	1
	<i>typhimurium</i>	kang-won	1	53, 40	2
	<i>muenchen</i>	kang-won	1	53, 32, 5	3
	<i>typhimurium</i>	kang-won	1	48	1
	<i>paratyphi - B</i>	kyong-gi	1	40, 1.6	2
	<i>typhimurium</i>	kyong-gi	9	40	1
	<i>typhimurium</i>	kyong-gi	3	37, 2.4, 2.1	3
AmCbCmKmSmTc	<i>muenchen</i>	kaong-won	2	49, 5, 2.9, 2.2	4
	<i>muenchen</i>	kaong-won	1	49, 5, 2.2	3
	<i>muenchen</i>	kyong-gi	1	40, 4.7, 2.1	3
AmCbCmSmTcTs	<i>typhimurium</i>	kyong-nam	1	48	1
AmCbCmKmSmTbTs	<i>typhimurium</i>	kang-won	1	70	1

라. Plasmid DNA 분리

Table 9에 제시된 바와 같이 내성인 85 균주 전체적으로 한개에서 네개의 plasmid를 가지고 있었으며, 그 크기는 1.6에서 70 megadalton(Md.) 사이에 있었다.

서울에서 분리되고 AmCbCmSmTc에 내성을 가지는 *S. typhimurium*의 경우 57Md.의 plasmid를 가지고 있었으며 2균주에서 2Md.의 plasmid를 하나 더 가지고 있었다 (Figure 6).

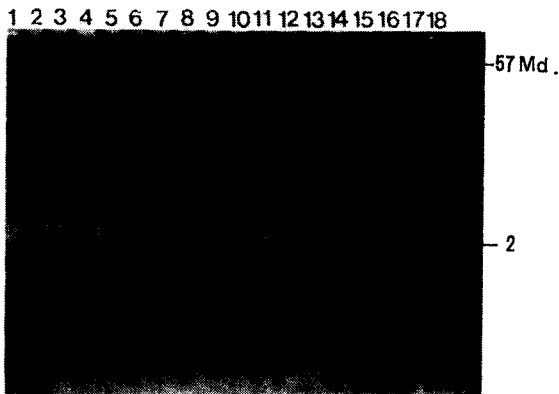


Fig.6. Plasmid profile of *Salmonella typhimurium* isolated in Seoul(0.7% horizontal agarose gel electrophoresis, 60 mA, and 180min. electrophoresis). Lysate were prepared by the method of Kado and Liu, 1-10, and 12-18 : *Salmonella typhimurium*(AmCbCmSmTc) 11 : *E. coli* strain which carries 8 plasmid of known molecular weight.

충남에서 분리되고 Tc에 내성을 가지는 *S. typhimurium*의 경우에는 모든 균주가 42.3, 2.4, 2.2Md.의 plasmid세개를 가지고 있었다 (Figure 7).

공여균과 내성을 전달받은 피전달균의 plasmid 분리 결과 Fig.8과 9에 나타난 바와 같이 공여균의 plasmid중 42-57Md.의 plasmid가 전달되었음을 볼 수 있다.

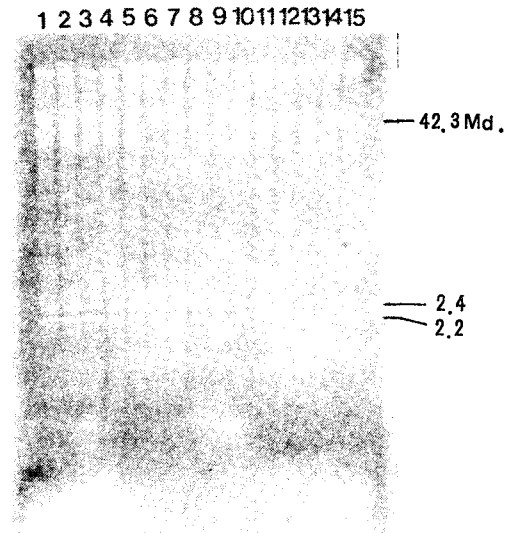


Fig.7. Plasmid profile of *Salmonella typhimurium* isolated in Chung-nam (0.7% horizontal agarose gel electrophoresis, 60 mA, and 180min. electrophoresis). Lysate were prepared by the method of Kado and Liu, 1-8, and 10-15 : *Salmonella typhimurium*(Tc) 9 : *E. coli* strain which carries 8 plasmid of known molecular weight.

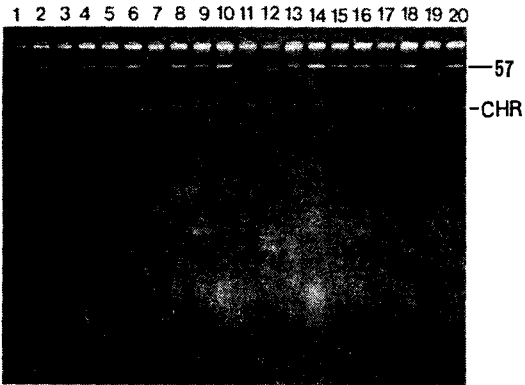


Fig.8. Plasmid profile of *Salmonella* strains and their transconjugant *E. coli*. (0.7% horizontal agarose gel electrophoresis, 60 mA, and 180 min. electrophoresis). Lysate were prepared by the method of Kado and Liu.

Lane	Strains	R-pattern
1,3,5,7,9	<i>typhimurium</i>	AmCbCmSmTc
2,4,6,8,10	transconjugant of <i>E. coli</i> lane 1, 3,5,7,9 strain	
11	<i>E. coli</i> K-12 ML 1410	
12	<i>E. coli</i> V 517	
13,15,17,19	<i>typhimurium</i>	AmCbCmSmTc
14,16,18,20	transconjugant of <i>E. coli</i> lane 13, 15,17,19 strain	

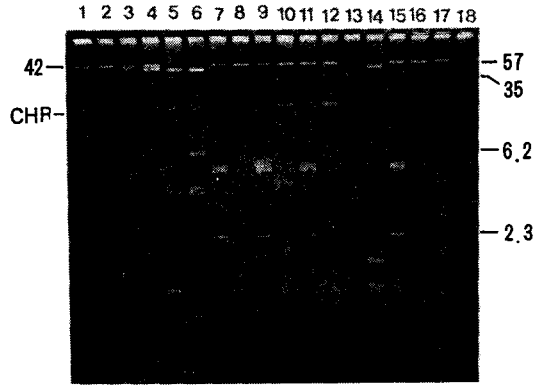


Fig.9. Plasmid profile of *Salmonella* strains and their transconjugant *E. coli*. (0.7% horizontal agarose gel electrophoresis, 60 mA, and 180 min. electrophoresis). Lysate were prepared by the method of Kado and Liu.

Lane	Strains	R-pattern
1,3,2,4	<i>typhimurium</i> transconjugant of <i>E. coli</i> lane 1, 3 strain	AmCbCmSmTc of
5	stanley	Sm
6	transconjugant of <i>E. coli</i> lane 5 strain	of
7,9,11	<i>typhimurium</i>	AmCbSmTc
8,10,12	transconjugant of <i>E. coli</i> lane 7, 9,11 strain	of
13	<i>E. coli</i> K-12 ML 1410	
14	<i>E. coli</i> V 517	
15,17	<i>typhimurium</i>	AmCbCmSmTc
16,18	transconjugant of <i>E. coli</i> lane 15,17 strain	Ts of

IV. 고찰

*Salmonella*를 비롯한 기타의 장내 세균에 의한 감염질환은 선진국에서는 식생활 문화의 발달과 위생환경의 발전에 따라 점차 감소하는 추세에 있으나, 우리나라에서는 아직도 풍토병적 성격을 띠고 있고, 사계절에 걸쳐 빈번히 발생하고 있으며, 특히 여름철에 폭발적으로 발생하고 있다 (정태화등, 1986a; 김중명등, 1987).

음식물에 의한 이들의 감염은 식생활 습관이나 식품 제조상의 위생 상태등에 따라 국가나 지역에 따라 그 발생 빈도가 다르게 나타날 수 있다 (이복권등, 1984). 과거 우리나라에서 *Salmonella* 균종의 분리 현황을 보면 대부분이 장티프스균이었다 (이연태와 이중훈, 1981). 김영자등 (1970)은 1967년 부터 1969년까지 전국 보건망을 통하여 *Salmonella* 균속을 분리하였는데 장티프스와 파라티프스가 많았다. 그후 점차 분리현황이 변화하여, 정윤섭등 (1987)의 보고에서는 1970년대 후반 부터는 *S. typhi*의 분리수가 줄고 타 혈청형의 *Salmonella* 분리수가 증가하고 있고, 그 중에서도 B군과 D군에 속하는 것이 대부분이었다. 그후 1984년부터는 B군의 분리수가 더 많아졌고, 1986년에는 B군의 분리수가 D군의 9배에 이르렀다. 본 실험에서도 B군이 158주 (55.2%), A군이 45주 (15.7%), D군이 43주 (15%) 및 C군이 22주 (7.7%) 순으로 B군이 많이 분리된 것으로 나타났다.

항균제는 세균세포에 작용하여 균을 사멸시키거나 발육을 억제시킨다. Penicillin 계열 (penicillin G, ampicillin, carbe-

nicillin, methicillin 등)과 cephalosporin 계열은 세포막 합성을 억제 하므로써 세균을 사멸시키며 sulphonamide 계열은 dihydrofolate의 합성에 필요한 효소인 dihydropteroate synthetase에 경쟁적으로 작용하여 균의 발육을 억제시킨다. Tetracyclin 계열과 aminoglycoside 계열은 세균 세포내에 축적된 후 단백질 합성을 저해 하므로써 세균을 사멸시킨다 (Davies and Smith, 1978; Hardy, 1981). 본 실험에 사용한 항균제는 위의 기작을 고려하여 NCCLS (Thornsberry et al., 1983)에서 추천하는 것을 선택하여 사용하였다.

Plasmid는 세균 세포 내에 존재하는 염색체의 DNA 입자로 double strand circular form으로 존재하며, 항생제 및 중금속등의 내성에 관여하는 plasmid, 각종 효소 생산에 관여하는 plasmid, antibacterial protein 합성에 관여하는 plasmid 및 세균의 병원성에 관여하는 plasmid 등이 있다 (Hardy, 1981). 항균제 내성에 관여하는 plasmid를 R-plasmid라고 하며 1950년대 일본에서 *Shigella*로부터 최초로 보고된 후 많은 연구가 이루어져왔다 (Watanabe, 1963; Davies and Smith, 1978; Farrar, 1983). R-plasmid에 의한 내성기전에는, penicillin 계열과 cephalosporin 계열에 대하여는 β -lactamase를 생산하여 β -lactam ring을 가수분해 하므로써 내성을 나타내며, tetracycline 계열에 대하여는 세포내에 축적되는 것을 방해 함으로써, aminoglycoside 계열에 대하여는 세포내로의 흡수를 억제 함으로써 내성을 나타낸다 (Benveniste and Davies, 1973; Davies

and Smith, 1978; Hardy, 1981).

본 실험의 감수성 검사결과 aminoglycoside 계열인 amikacin, gentamicin 및 kanamycin은 100% 감수성이거나 낮은 빈도의 내성(Km 2.4%)을 나타냈다. 또한 cephalothin(100%), nalidixic acid (100%) 및 co-trimoxazole(99.3%)에서도 높은 감수성을 나타냈다. 반면에 penicillin 계열인 ampicillin(18.8%) 및 carbenicillin(18.8%)은 다소 높은 내성을 나타냈다. 또한 tetracycline(28%), chloramphenicol(17.8%) 및 streptomycin(22.7%)에서도 높은 내성을 나타냈다. 정태화등(1984)은 1983년도에 분리된 타 혈청형의 *Salmonella*에서 Cp(0.7%), Cm(1.4%), Km(0.7%), Na(0.7%), Sm(4.3%) 및 Tc(9.9%)의 내성균주를 보고하였으며, 정윤섭등(1987)은 1984년에 분리된 B군에서 Am, Cm 및 Tc에 내성을 보이는 균주가 많았다고 보고하였다. 또한 정태화등(1986b)은 1985년도에 분리된 타 혈청형의 173주에서 Am, Cb, Cm, Km, Sm 및 Tc에서 각각 4.6, 5.1, 4.6, 4.6, 4.6 및 10.9%의 내성균을 보고하였다. 본 실험에서는 Am, Cb, Cm, Km, Sm 및 Tc에서 각각 18.8, 18.8, 18.5, 2.4, 22.7 및 27.9%로 나타나 정태화 등(1984, 1986b)의 보고 보다는 다소 높게 나타났다.

위의 결과를 종합하여 보면 Am, Cb, Cm, Km, Sm 및 Tc에 내성인 균주의 빈도가 점차 높아가고 있음을 시사하고 있으며, 비록 1주 이기는 하나 7제 다제내성 균주의 발생은 *Salmonella*에서도 다약제 내성의 가능성을 보여준다고 하겠다. 이는 홍성노와 이연태

(1986) 및 이유철등(1987)의 보고에서 보여지는 다약제 동시내성인 *Shigella*의 고도의 높은 내성 빈도와 무관하지 않은 것 같다.

대부분의 R-plasmid는 RTF(resistance transfer factor)와 resistance determinant factor 두 부분으로 구분되며, RTF는 복제에 관여하고 resistance determinant factor는 항균제의 내성에 관여한다. RTF를 보유함으로써 접합에 의하여 다른 세균으로 전달이 가능한 plasmid를 conjugative plasmid라고 한다(Hardy, 1981). Ochiai 등(1959)에 의해 *Shigella*와 *E.coli* 사이에서 내성 전달이 보고된 후 국내외에서 많은 연구가 이루어져 왔다(전도기와 설상용, 1979; 이유철등, 1987; Brunner et al., 1983; Farrar, 1983).

본 실험에서도 1제로부터 7제에 이르기까지 다양한 내성 패턴에서 내성이 전달되었으며, 이는 정태화등(1986b), 홍성노와 이연태(1986) 및 Nakamura 등(1986)의 보고와 유사하였다. Transconjugant *E. coli*의 plasmid를 분리하여 본 결과 공여균의 plasmid가 전달 되었음을 확인할 수 있었다.

요 약

1986년 1월부터 12월 사이에 전국 시·도 보건연구소 및 주요종합 병원으로부터 일차 분리 수집된 *Salmonella* 균속 286주를 실험 균주로 하여 확인동정 실험, 항균제 감수성 검사, plasmid DNA 분리 및 접합에 의한 내성전달 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 분리된 균주를 sero-group 별로 보면

B group이 158 주 (55.2%) 로 가장 많이 분리되었고, A group이 45 주 (15.7%), D1 group이 43 주 (15%), C1, C2 group이 22 주 (7.7%) 등의 순으로 분리되었다. serovar별 분리수는 *Salmonella typhimurium*이 92 주 (32.2%) 로 가장 많이 분리되었고, *S. paratyphi* -A 45 주 (15.7%), *S. enteritidis* 41 주 (14.3%), *S. paratyphi* -B 27주(9.4%) 등의 순으로 분리되었다. 분리균주의 월별 분포를 보면 9월 (17.5%), 5월 (16%), 6월 (14.7%), 7월 (10.5%), 8월과 10월(7.3%) 등의 순으로 분리되었으며 5월에서 10월 사이에 73.4%인 210 주가 분리되었다. 분리균주의 지역별 분포는 강원(29.7%), 서울(27.6%), 충남(14.3%) 등으로 분리되었고, 성별 분포에서는 남성이 41.6%로 여성 (28.6%)에서 보다 많이 분리되었으며, 연령별 분리분포는 1세에서 60세까지 고르게 나타났다.

2. 항균제 감수성 검사에서는 1제 이상의 항균제에 내성을 나타내는 균주가 85주(29.7%)로 나타났다. 각 항균제별 내성균주는 tetracycline에서 80 주 (28%)가 내성을 보여 가장 많은 내성을 나타냈으며, streptomycin 65 주 (22.7%), ampicillin, carbenicillin 54 주 (18.8%), chloramphenicol 51주(17.8%), kanamycin 7 주 (2.4%), co-trimoxazole 2 주 (0.7%), tobramycin 1 주 (0.3%) 로 나타났다. 또한 1제내성균이 8%, 2제 내성균이 2.4%, 4제 내성균이 1.8%, 5제 내성균이 15.4%, 6제 내성균이 1.8%, 7제 내성균이 0.3%로 나타났으며, 그 중에서도 AmCbCmSmTc에 동시 내성인 균주가 15%로 가장 많이 나타났다. Sero-group별 내성 양상은 B group에서 26.2%로 가장 많았고,

C2 group(2.4%), D1, E4 group(0.3%)로 나타났다.

3. 접합에 의한 내성전달 결과 1제에서 7제까지 다양한 내성패턴에서 내성전달이 일어나며, 내성전달은 전달성 R-plasmid에 의한 것이었다.

4. Plasmid DNA 분리 결과 내성균주 전체에서 한개에서 네개의 plasmid를 가지고 있었으며, 그 분자량은 1.6에서 70 megadalton 사이에 있었다. 같은 도에서 분리된 균주들중 내성패턴이 같은 균주들의 plasmid 패턴은 유사하였다. 접합에 의해 전달된 plasmid의 분자량은 42-57 megadalton 이었다.

참 고 문 헌

1. 김종명, 김재식, 이원길, 전효진, 서장수, 송도용, 송경은, 김경숙 (1987); *Salmonella* 균과 그 항생제에 대한 감수성, 경북의대지, 28:1-6.
2. 김영자, 조민기, 유혜영 (1970) : 우리나라에서 분리된 살모넬라균의 동정에 관한 보고 (1967-1969), 국립보건원보, 7:115-121.
3. 서민호, 이유철, 조동택 (1983) : 1982년에 대구지방에서 분리된 *Salmonella*의 항균제 감수성, 대한화학요법학회지, 1: 95-101.
4. 손준용, 유재근, 김영환, 김배원, 이명원, 민창홍, 서인주 (1971) : 인수공통 전염병 중 *Salmonella* 균속의 분리 동정에 관한 연구, 국립보건원보, 8:49-54.
5. 이복권, 김기상, 이명원, 정태화 (1984):

- 소아 설사 환자에서 분리한 *Salmonella*, *Shigella* 에 관하여, 대한미생물학회지, 19: 55-64.
6. 이연태, 이종훈 (1981): 자연환경내에 오염된 식중독 원인균의 분포, 대한미생물학회지, 16: 13-18.
 7. 이유철, 설상용, 조동택, 전도기 (1987): *Shigella* R Plasmid의 분자적 특성, 대한미생물학회지, 22: 35-53.
 8. 이종훈, 고광균, 임병옥, 문기성 (1979): 서울시내 자연환경 내에 있어서의 병원성 장내세균 분포에 관한 연구, 대한미생물학회지, 14: 1-9.
 9. 전도기, 설상용 (1979): 이질균 및 살모넬라의 약제내성, 내성화 방지 및 제거, 대한미생물학회지, 14: 27-37.
 10. 정윤섭, 송경순, 이귀녕, 이삼열 (1979): 최근 5년간 분리된 enteropathogenic bacteria, 대한미생물학회지, 14: 17-25.
 11. 정윤섭, 한상순, 권오현, 이삼열, 정태화, (1987): Ampicillin과 Chloramphenicol 내성 *Salmonella typhimurium* 분리의 증가, 대한미생물학회지, 22: 55-59.
 12. 정태화 최재두, 이명원, 윤승기 (1984): 한국에서 분리된 *Salmonella* 균속에 대하여 (1983), 대한임상병리사회지, 16: 86-92.
 13. 정태화, 이연태, 이명원, 이복권, 김기상, (1986a): 한국에서 분리된 장내세균 (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* 균속)의 병원적 역할에 관한 연구, 대한미생물학회지, 21: 73-95.
 14. 정태화, 이명원, 이복권, 김기상, 손건영, 이영희, 정윤희, 이연태, 염병진 (1986b): 장티프스균 및 장내세균의 R-plasmid 내성전달에 관한 연구, 국립보건원보, 23: 263-279.
 15. 정태화, 이영희, 이명원, 김기상, 이복권, 오윤희, 유천권 (1986c): 한국에서 분리된 *Salmonella* 및 *Shigella* 균속에 대한 세균학적 조사연구, 국립보건원보, 23: 335-345.
 16. 조동택 (1983): 항균제 내성기전, 대한화학요법학회지, 1: 190-198.
 17. 조동택 (1984): Plasmid 분석에 의한 원내감염의 역학적 조사, 대한화학요법학회지, 2: 76-86.
 18. 하대유, 정선식, 강병규 (1971): 우리나라 가축에서 분리한 *Salmonella* 및 대장균의 내성인자 R의 분포, 대한미생물학회지, 6: 21-28.
 19. 홍성노, 이연태 (1986): *Shigella* 균속의 항균제내성, 전달성 R-plasmid 및 제거에 관한 연구, 대한미생물학회지, 21: 33-45.
 20. Benveniste, R. and Davies, J. (1973); Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria, Ann. Rev. Biochem., 43: 471-478.
 21. Brunner, F., Margadant, A., Pedazzi, R. and Piffaretti, J.C. (1983): The plasmid pattern as an epidemiological tool for *Salmonella typhimurium* epidemics; comparison with the lyotype, J. Infect. dis., 148: 7-11.
 22. Davies, J. and Smith D.I. (1978); Plasmid-determined resistance to antimicrobial agent, Annu. Rev.

- Microbiol., 32:469-477.
23. Ewing, W.H., (1986): Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th. ed., Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, pp.181-318.
 24. Farrar, W.E.Jr.(1983): Investigation of nosocomial infection by plasmid analysis, Clin. Investigative Med., 6:213-220.
 25. Francis, L.M., Dennis, J.K., Kevin, R.J., Deborah, J.A., and Sara, M. M.(1978): A Multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules, plasmid, 1:417-420.
 26. Hardy, K(1981): Bacterial plasmids, Thomas Nelson Ltd., Hong Kong, pp.104.
 27. Kado, C.I. and Liu, S.T.(1981): Rapid procedure for detection and isolation of larger and small plasmids, J. Bacteriol., 145: 1365-1373.
 28. Krieg, N.R. and Holt, J.G(1984): Bergy's manual of Systematic Bacteriology, Vol.1, Williams and Wilkins, Baltimore.
 29. Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. Jr. and Shadomy, H.J. (1985): Manual of Clinical Microbiology, 4th. ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 30. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J.(1982): Molecular Cloning a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, pp.150-185.
 31. Mitsunashi, S., Hashimoto, H. and Suzuki, K.(1967): Drug resistance of enteric bacteria, J. Bacteriol., 94:1166-9.
 32. Nakamura, M., Sato, S., Ohya, T., Suzuki, S. and Ikeda, S.(1986); Plasmid profile analysis in epidemiological studies of animal *Salmonella typhimurium* infection in Japan, J. Clin. Microbiol., 23:360-365.
 33. Ochiai, K., Kimura, K. and Sawada, O. (1959); Studies on the inheritance of drug resistance between *Shigella* strains and *Escherichia coli*.(in Japanese), Nippon. Iji. Shimpo., No 1861, p.34-46.
 34. Thornsberry, C. et.al.,(1983): Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, NCCLS., Villanova.
 35. Watanabe, T.(1963): Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria, Bacteriol. Rev., 27:87-115.