

## 항균제가 없는 환경에서 항균제 감수성 그람음성 간균 공존이 내성 그람음성 간균에 대한 영향

연세대학교 의과대학 임상병리학교실 및 세균내성연구소, 서울대학교 약학대학 및 종합약학연구소\*

이경원 · 최응칠\* · 용동은 · 염종화 · 정윤섭

### Effect of Coexistence of Antimicrobial-susceptible Gram-negative Bacilli on the Resistant Gram-negative Bacilli in the Absence of Antimicrobial Agents

Kyungwon Lee, M.D., Eung-Chil Choi, Ph.D., Dongeun Yong, M.D.  
Jong Hwa Yum, Ph.D. and Yunsop Chong, Ph.D.

Department of Clinical Pathology and Research Institute of Bacterial Resistance,  
Yonsei University College of Medicine, and College of Pharmacy and Research Institute of  
Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, Seoul, Korea

**Background :** Carrying antimicrobial resistance genes is a burden to bacteria. Therefore, in the absence of antimicrobial selective pressure, susceptible bacteria are expected to replace resistant ones. The cost was reported to decrease with time, but the effect of different species of susceptible bacteria on extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-, AmpC  $\beta$ -lactamase-, and VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacilli are not known. The aim of this study was to determine the effect in vitro.

**Methods :** Antimicrobial-susceptible and -resistant strains of *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Acinetobacter baumannii* were subcultured daily in glucose limited minimal salt medium at 30°C and 37°C, and the numbers of cells (CFU/mL) were determined by culturing on Mueller-Hinton agar and MacConkey agar plates.

**Results :** Continued incubation without subculture of both individual and mixed cultures at 37°C showed higher counts of a ESBL-producing *K. pneumoniae*

than a susceptible *E. coli*. Daily subcultures of two strains in a tube showed the counts were : ESBL-producing *K. pneumoniae* > susceptible *E. coli*; susceptible *E. aerogenes* > ESBL-producing *K. pneumoniae*; susceptible *E. aerogenes* > VIM-2- $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*. The counts were similar for susceptible *K. pneumoniae* and AmpC  $\beta$ -lactamase-hyperproducing *E. aerogenes*. Initial low count of a susceptible *E. coli* and an ESBL-producing *K. pneumoniae* at 30°C gradually increased with continued subculture.

**Conclusion :** Growth of not all resistant bacteria are slower and the growth improves with continued subculture. Coexistence of a susceptible bacteria with resistant bacteria in GLMS medium both at 30°C and 37°C does not reduce the number of resistant bacteria. (Korean J Infect Dis 34:9~17, 2002)

**Key Words :** Antimicrobial resistance, Cost of resistance, Fitness

#### 서 론

\* 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구사업-특정기초 (R01-1999-00110) 지원으로 수행되었음.  
접수: 2001년 11월 12일, 승인: 2001년 12월 20일  
교신저자: 정윤섭. 연세대학교 의과대학 임상병리학교실  
Tel: 02)361-5866, Fax: 02)313-0908  
E-mail: whonetkor@yumc.yonsei.ac.kr

항균제 내성 세균의 증가는 감염병 환자의 치료를 어렵게 하고 있다<sup>1)</sup>. 특히 원내감염은 다제내성 세균에 의한 것이 많으므로 감염치료에 유용한 항균제가 대단히 드물어졌다<sup>2)</sup>. 내

성 세균 문제는 우리나라 뿐 아니라<sup>3,4)</sup> 다른 거의 모든 나라가 당면한 심각한 것이 되었다<sup>5,6)</sup>. 내성을 나타낼 수 있는 세균의 유전적 변화는 사람이 항균제를 임상에 사용하기 때문에 일어난 것이 아니라고 하나<sup>7)</sup>, 항균제 사용으로 인해 내성균이 선택되고 확산되며 항균제의 사용이 많을수록 내성균은 흔하게 된다. 내성 세균은 감수성 세균에 없는 내성 유전자를 추가로 가지게되므로 내성 세균에게 부담이 되며 감수성인 세균보다 증식에 불리한 조건이 된다. 이것을 내성부담(cost of resistance)이라고 한다<sup>8)</sup>. 따라서 항균제 사용의 중단으로 선택 압력이 없어지면 내성 세균은 차츰 줄고 감수성 세균으로 바뀌게 될 것이 기대된다<sup>8)</sup>. 이러한 기대 아래 항균제 사용의 제한이나, 항균제의 순환 사용제도(cycling)가 시도되기도 하며, 그 효과 있었음이 보고되기도 하였다<sup>9)</sup>. 그러나 일단 생긴 내성 세균이 감소되기에는 장기간이 걸리고, 또한 실제로는 내성인자를 보유한 세균의 부담이 차츰 감소하여서 내성균 감소 효과는 기대하기 어렵다는 상반된 보고도 있다<sup>10)</sup>.

세균의 항균제 내성 부담을 증명하기 위해서는 같은 균주로부터 내성 변이주를 만들어서 친주(parent strain)와의 증식속도를 비교한다<sup>11,12)</sup>. 그러나 실제로 생체 내에서는 같은 균종 중 감수성 균주와 내성 균주 사이의 경쟁만 있는 것이 아니고, 다른 균종 사이의 경쟁도 있다. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 등 생체 내에 다수가 존재하는 비병원성 상재 세균의 병원성 세균 억제효과가 감염증 치료를 위해서도 사용이 시도되어 온 것은 이러한 균종간의 작용을 이용한 것이라고 하겠다<sup>13)</sup>. 그러나 이러한 세균이 다수 존재하는 상기도나 장내에도 내성 그람음성 간균이 정착하여 감염원이 된다<sup>14)</sup>. 또한 병원 환경에는 병원성이 낮은 기회 감염균이 존재하는데 이들 중에도 감수성인 균주와 내성인 균주가 있어서 증식 경쟁을 하므로 내성균의 변동에 영향을 미칠 것으로 추정된다. 그럼에도 불구하고 최근 문제되는 호기성 그람음성 간균 사이의 억제 효과는 확실치 않다.

세균이 노출되는 환경인 환자의 체내나 자연환경은 영양이 충분한 시험관내 배양 조건과는 다르고 영양이 결핍된 상태이다. 따라서 세균의 내성 부담을 시험할 때는 영양분이 충분치 않은 배지를 사용하게 된다<sup>15)</sup>. 또한 환경에 있는 세균은 37°C가 아니라 25~30°C 정도의 온도에도 노출되는데 이 낮은 온도의 영향도 확실치 않다.

근래 특히 원내 및 양로원 감염균으로 문제되는 균종은 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae* 및 병원성이 낮은 기회 감염균인 *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Acinetobacter baumannii* 등이다<sup>14)</sup>.

문제되는 내성은 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 생성에 의한 제 3세대 cephalosporin 내성 및 변이에 의한 AmpC  $\beta$ -lactamase 다량 생성으로 인한 cephamycin과 제 3세대 cephalosporin 내성<sup>16)</sup>, carbapenemase 생성에 의한 모든  $\beta$ -lactamase 내성이다<sup>17-19)</sup>.

이에 이 연구에서는 염색체성 rifampin 내성 *E. coli*, ESBL 유전자를 plasmid에 가진 *K. pneumoniae*, AmpC  $\beta$ -lactamase를 다량 생성하는 *E. aerogenes* 및 VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase를 생성하여 carbapenem에 내성인 *A. baumannii* 균주가 감수성인 균주와 함께 60일간 37°C와 35°C에서 계대배양될 때 세균 수에 미치는 영향을 시험하여 항균제 사용의 제한이나 순환제도가 내성균의 감소에 영향을 줄 수 있는 지를 추정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

시험균주는 항균제에 감수성인 *E. coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13048 및 *K. pneumoniae* ATCC 13883과, 염색체 DNA의 변이로 rifampin에 내성인 *E. coli* RG488, SHV-18 ESBL 유전자를 plasmid에 가진 제 3세대 cephalosporin 내성인 *K. pneumoniae* ATCC 700603을 사용하였고, 변이성으로 AmpC  $\beta$ -lactamase를 다량 생산하여 piperacillin, cephalothin, cefotaxime, ceftazidime, aztreonam에 내성이고, gentamicin, netilmicin, tobramycin, cotrimoxazole, levofloxacin 및 tetracycline에도 다제내성인 농 검체에서 분리한 *E. aerogenes* YMC 99/3/P300, 및 VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase 유전자를 class 1 integron에 가진 carbapenem 내성이며, amikacin, gentamicin, tobramycin 및 kanamycin에도 내성인 객담 검체에서 분리한 *A. baumannii* YMC 98/7/R363를 사용하였다. 임상분리 내성균주의 변이성으로 AmpC  $\beta$ -lactamase를 다량 생산하는 균종은 cefotaxime 내성으로 추정하였으며<sup>16)</sup>, VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase 생성은 선별법<sup>20)</sup>과 PCR로 확인하였다<sup>19)</sup>.

시험세균의 증식을 비교하기 위해서는 glucose limited minimal salts (GLMS) medium<sup>15)</sup>을 사용하였다. 이 배지는 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O (sodium citrate) 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g을 증류수 1 L에 녹여 5 mL씩 시험관에 분주하고 가압 멸균하였다. 이 기초배지에 100배 농도의 supplement를 여과 멸균하여 각 시험관에 50  $\mu$ L씩 넣어서 최종농도가 배지 1 L당 proline 40 mg, methionine 40 mg, thiamine 2 mg, glucose 300 mg (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.)가 되도록 하였다.

GLMS 배지에 접종할 시험 세균은 Luria-Bertani medium (Becton Dickinson, Cockeysville, Md.)에 접종하여 24시간 배양하였고, 멸균 식염수로 희석하여 접종에 사용하였다. 세균 수 측정을 위해서는 배양액을 10 mL의 멸균식염수로 10 배수 단계 희석하여 각 희석액 100  $\mu$ L를 Mueller-Hinton II agar 및 MacConkey agar (Becton Dickinson) 평판배지에 접종하고 24시간 배양한 후 가능하면 30~300개의 집락이 생긴 평판을 택하여 집락 수를 세고 희석배수를 곱하여 액체 배지 1 mL 중의 생균수(colony-forming unit, CFU/mL)로 표시하였다. 한가지 세균이 GLMS 배지 중에서 37°C에 장기간 보존되었을 때의 수의 변화를 보기 위해서는 *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* RG488 및 *K. pneumoniae* ATCC 700603을 각각 접종하고 37°C에 보존하면서 일정 기간마다 세균 수를 측정하였다. 또한 *E. coli* RG488과 *K. pneumoniae* ATCC 700603을 동시에 한 배지에 접종하고 37°C에 보존하면서 일정 기간마다 세균 수를 측정하였다.

GLMS 배지에 감수성인 균종과 내성인 균종 두가지가 공존할 때의 세균 수의 변화를 측정하기 위해서는 한천평판상의 집락 형태로 균종을 구별할 수 있는 두 균종을 짝으로 하였다. 시험 세균 희석액을 5 mL의 GLMS배지에 접종하고 시험에 따라서 30°C 또는 37°C에 배양하면서 24시간마다 배양액 100  $\mu$ L를 새로운 GLMS 배지에 접종하여 계대 배양하고, 일정 기간마다 세균수를 측정하였다.

결 과

1. GLMS 배지에 장기간 보존시의 세균수 변화

항균제에 감수성인 *E. coli* ATCC 25922  $1.2 \times 10^2$  CFU,

rifampin 내성인 *E. coli* RG488  $3.6 \times 10^4$  CFU 및 ESBL 생성 *K. pneumoniae* ATCC 700603  $3.7 \times 10^6$  CFU를 각각 다른 GLMS 배지 5 mL에 접종하고 37°C에 보존하면서 세균 수를 측정할 바, 세균 수는 2일 후에  $>10^7$  CFU/mL로 가장 많았고 일주일 뒤부터는 감소하기 시작하였으나, 30일 후에도  $>10^5$  CFU/mL가 유지되었다(Figure 1A). 시험기간 중의 균종별 평균 균수는 *K. pneumoniae*가  $1.8 \times 10^8$  CFU/mL로 *E. coli* 보다 현저히 많았고, *E. coli* 중에서는 감수성 균주의 수가  $4.8 \times 10^7$  CFU/mL로 rifampin 내성인 균주의 수  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL 보다 많았으며, 3 균종 사이의 차이는 모두가 통계적으로 유의하였다( $P < 0.03$ ).

Rifampin 내성인 *E. coli* RG488  $2.6 \times 10^5$  CFU와 ESBL 생산 *K. pneumoniae* ATCC 700603  $3.0 \times 10^5$  CFU를 GLMS 배지 5 mL에 접종하고 37°C에 보존하면서 세균 수를 측정할 바, *K. pneumoniae*의 수는 1일 후에  $7.6 \times 10^8$  CFU/mL에 달하였고, 이어서 차츰 감소하였으나 30일 후에도  $6.7 \times 10^6$  CFU/mL이었다. *E. coli*의 수는 일주일간  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL의 수준이 유지되었고, 이어서 차츰 감소하였으나 30일 후에도  $3.0 \times 10^5$  CFU/mL의 수가 유지되었다(Figure 1B). 이 기간 중 평균 세균 수는 *K. pneumoniae*가  $2.1 \times 10^8$  CFU/mL, *E. coli*의 수가  $4.5 \times 10^6$  CFU/mL이었고 그 차이는 통계적으로 유의하였다( $P < 0.03$ ).

2. GLMS 배지에 두가지 균종을 매일 계대배양시의 세균수 변화

1) 감수성인 *E. coli* ATCC 25922와 ESBL 생성 *K. pneumoniae* ATCC 700603

각 균주  $1.3 \times 10^3$  CFU와  $5.3 \times 10^3$  CFU를 5 mL의 GLMS 배지에 함께 접종하고 37°C에서 매일 계대 배양하면서 24시

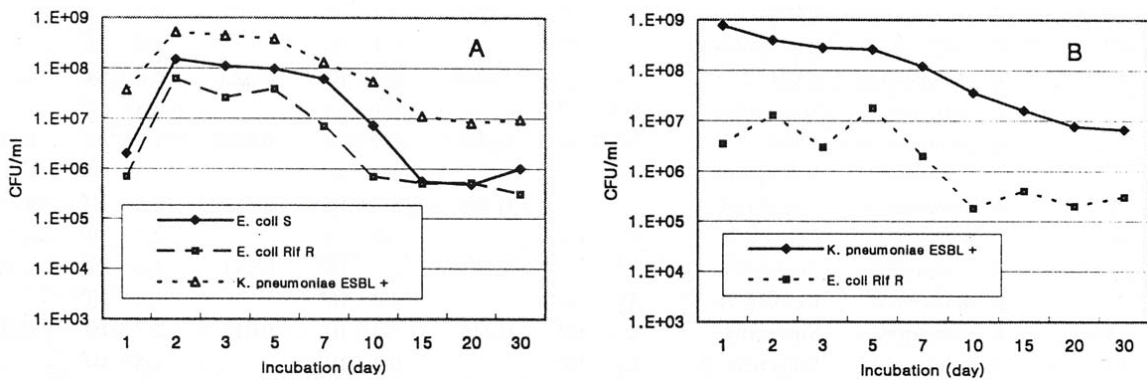


Figure 1. Change of cell number of bacteria which were inoculated into a GLMS medium and kept at 37°C without daily subculture. (A) When a antimicrobial-susceptible *E. coli*, a rifampin-resistant *E. coli* and an ESBL-producing *K. pneumoniae* strains were inoculated individually. (B) When a rifampin-resistant *E. coli*, and an ESBL-producing *K. pneumoniae* strains were inoculated together (For strains numbers see the test).

간 배양 후의 균수의 변화를 측정하였다. 평균 균수는 *K. pneumoniae*가  $3.2 \times 10^8$  CFU/mL, *E. coli*가  $2.9 \times 10^7$  CFU/mL로 전자가 유의하게 많았다(Table 1;  $P < 0.0002$ ). *E. coli*의 수는 30일 이후에 차츰 증가하는 경향을 보였다. 위의 세균 각  $1.3 \times 10^3$ 과  $5.0 \times 10^4$  CFU를 5 mL의 GLMS 배지에 접종하고 30°C에서 매일 계대 배양하면서 24시간 배양 후의 균수를 측정하였다. 평균 균수는 *K. pneumoniae*가  $2.3 \times 10^8$  CFU/mL, *E. coli*가  $6.4 \times 10^7$  CFU/mL로 전자가 유의하게 많았다 (Table 1;  $P < 0.002$ ). 평균 세균 수가 *K. pneumoniae*는 37°C 배양시에 30°C 배양시보다 약간 많았으나, *E. coli*는 30°C 배양시에 더 많았다. 그러나 계대 배양을 계속하면서 그 차이는 적어졌다(Figure 2A).

**2) 감수성인 *E. aerogenes* ATCC 13048와 ESBL 생성 *K. pneumoniae* ATCC 700603**

*E. aerogenes*  $2.2 \times 10^3$  CFU과 *K. pneumoniae*  $1.8 \times 10^3$  CFU를 5 mL의 GLMS 배지에 함께 접종하고 60일간 37°C에 계대 배양하면서 24시간 배양 후의 세균 수를 시험하였다. 세균 수는 이 기간 중 큰 변동 없이 *E. aerogenes*가 더 많았다(Figure 2B). 평균 세균 수는 *E. aerogenes*가  $2.6 \times 10^8$  CFU/mL, *K. pneumoniae*가  $7.4 \times 10^7$  CFU/mL로 전자가 유의하게 많았다(Table 1;  $P < 0.0002$ ). *E. aerogenes*  $2.9 \times 10^3$  CFU와 *K. pneumoniae*  $2.3 \times 10^5$  CFU를 5 mL의 GLMS 배지에 접종하고 30°C에 배양한 바, *E. aerogenes*는 기간 중 많은

수가 계속 유지되었으나, *K. pneumoniae*은 15일 까지 그 수가 계속 감소하다가 35일부터는 그 수가 증가하였다(Figure 2B). 평균 세균 수는 *E. aerogenes*가  $3.5 \times 10^8$  CFU/mL, *K. pneumoniae*가  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL로 전자가 유의하게 많았다 (Table 1;  $P < 0.0002$ ).

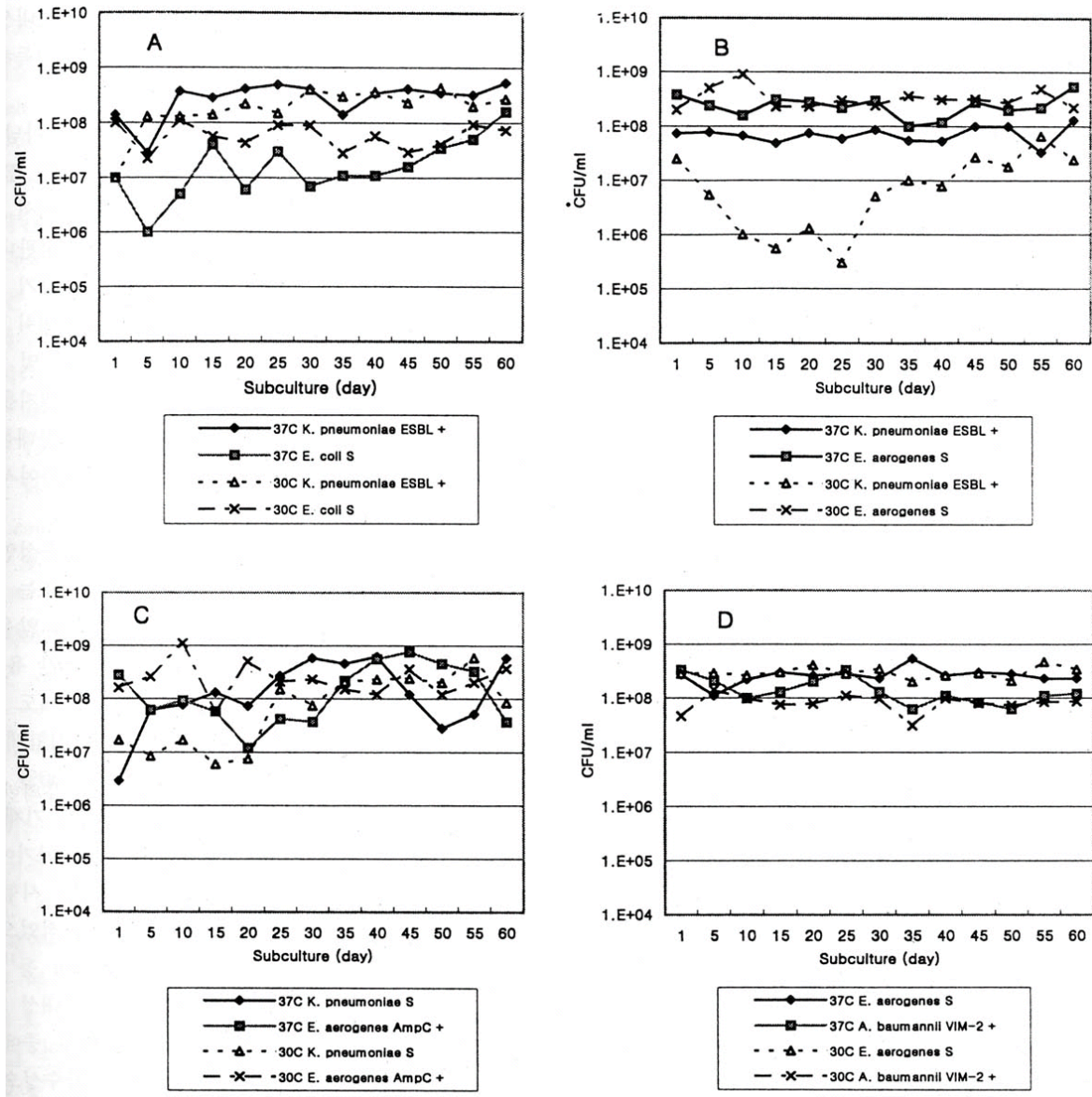
**3) 감수성인 *K. pneumoniae* ATCC 13883와 변이성 AmpC β-lactamase 다량 생산 *E. aerogenes* YMC 99/3/P300**

*K. pneumoniae*  $1.3 \times 10^3$  CFU, *E. aerogenes*  $1.7 \times 10^3$  CFU를 5 mL의 GLMS 배지에 접종하고 60일간 37°C에 계대 배양하면서 24시간 배양 후의 세균 수를 시험하였다. *K. pneumoniae*와 *E. aerogenes*는 모두 초기 보다 후기에 세균 수가 증가하는 경향을 보였고, 평균 세균 수는 두 세균 모두  $2.3 \times 10^8$  CFU/mL로 같았다(Table 1, Figure 2C). *K. pneumoniae*  $2.1 \times 10^5$  CFU과 *E. aerogenes*  $3.4 \times 10^3$  CFU를 5 mL의 GLMS 배지에 접종하고 60일간 30°C에 계대 배양하면서 24시간 배양 후의 세균 수를 시험하였다. *K. pneumoniae*는 초기에 세균수가 적었고 25일 후부터는 그 수가 증가하였으나, *E. aerogenes*는 처음부터 끝까지 많은 수를 유지하였다. 평균 세균 수는 *K. pneumoniae*가  $1.6 \times 10^8$  CFU/mL, *E. aerogenes*가  $3.5 \times 10^8$  CFU/mL로 유의한 차이가 없었다(Table 1;  $P < 0.127$ ).

**Table 1. Comparison of Mean Cell Numbers of a Susceptible and a Resistant Bacterial Strain Pairs Grown in a GLMS Medium**

Test	Incubation	Species and antimicrobial susceptibility		Mean cell number (CFU/mL) at					
				1 ~ 30 day		35 ~ 60 day		Total	
A	37°C	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL +	$3.0 \times 10^8$	0.003*	$3.5 \times 10^8$	0.0005	$3.2 \times 10^8$	0.0002
		<i>E. coli</i>	Susceptible	$1.4 \times 10^7$		$4.7 \times 10^7$		$2.9 \times 10^7$	
	30°C	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL +	$1.7 \times 10^8$	0.090	$3.0 \times 10^8$	0.001	$2.3 \times 10^8$	0.002
		<i>E. coli</i>	Susceptible	$7.3 \times 10^7$		$5.4 \times 10^7$		$6.4 \times 10^7$	
B	37°C	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL +	$7.0 \times 10^7$	0.0002	$7.9 \times 10^7$	0.029	$7.4 \times 10^7$	0.0002
		<i>E. aerogenes</i>	Susceptible	$2.7 \times 10^8$		$2.4 \times 10^8$		$2.6 \times 10^8$	
	30°C	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL +	$5.5 \times 10^6$	0.009	$2.5 \times 10^7$	0.0002	$1.5 \times 10^7$	0.0002
		<i>E. aerogenes</i>	Susceptible	$3.7 \times 10^8$		$3.3 \times 10^8$		$3.5 \times 10^8$	
C	37°C	<i>K. pneumoniae</i>	Susceptible	$1.7 \times 10^8$	0.393	$3.2 \times 10^8$	0.660	$2.3 \times 10^8$	0.909
		<i>E. aerogenes</i>	Cefoxin R	$8.3 \times 10^7$		$4.0 \times 10^8$		$2.3 \times 10^8$	
	30°C	<i>K. pneumoniae</i>	Susceptible	$4.0 \times 10^7$	0.061	$2.7 \times 10^8$	0.691	$1.6 \times 10^8$	0.127
		<i>E. aerogenes</i>	Cefoxin R	$3.6 \times 10^8$		$2.2 \times 10^8$		$3.5 \times 10^8$	
D	37°C	<i>E. aerogenes</i>	Susceptible	$2.4 \times 10^8$	0.416	$3.0 \times 10^8$	0.011	$2.7 \times 10^8$	0.006
		<i>A. baumannii</i>	Imipenem R	$2.0 \times 10^8$		$9.2 \times 10^7$		$1.5 \times 10^8$	
	30°C	<i>E. aerogenes</i>	Susceptible	$3.1 \times 10^8$	0.0001	$3.0 \times 10^8$	0.001	$3.0 \times 10^8$	0.0002
		<i>A. baumannii</i>	Imipenem R	$9.1 \times 10^7$		$7.5 \times 10^7$		$8.4 \times 10^7$	

\*P Values by t Test



**Figure 2.** Cell counts of bacteria when two strains were inoculated into a GLMS medium and subcultured daily and incubated at 30°C and 37°C. (A) An antimicrobial-susceptible *E. coli* ATCC 25922 and an ESBL-producing *K. pneumoniae* ATCC 700603. (B) An ESBL-producing *K. pneumoniae* ATCC 700603 and an antimicrobial-susceptible *E. aerogenes* ATCC 13048. (C) An antimicrobial-susceptible *K. pneumoniae* ATCC 13883 and an AmpC  $\beta$ -lactamase-hyperproducing *E. aerogenes* YMC 99/3/P300. (D) An antimicrobial-susceptible *E. aerogenes* ATCC 13048 and a VIM-2  $\beta$ -lactamase-producing *A. baumannii* YMC 98/7/R363.

**4) 감수성인 *E. aerogenes* ATCC 13048과 VIM-2  $\beta$ -lactamase 생성 *A. baumannii* YMC 98/7/R363**

*E. aerogenes*  $4.1 \times 10^3$  CFU와 *A. baumannii*  $4.0 \times 10^3$  CFU를 5 mL의 GLMS 배지에 접종하고 60일간 37°C에 계대 배양하면서 24시간 배양 후의 세균 수를 시험하였다. 시험기간 중 두 균주의 수는 변동이 적었고(Figure 2D), 평균 세균 수는 *E. aerogenes*가  $2.7 \times 10^8$  CFU/mL, *A. baumannii*가

$1.5 \times 10^8$  CFU/mL로 전자가 유의하게 많았다(Table 1;  $P < 0.006$ ). 위와 같은 수의 세균을 5 mL의 GLMS 배지에 접종하고 60일간 30°C에 계대 배양하면서 24시간 배양 후의 세균 수를 시험하였다. 시험기간 중 두 세균 모두 세균 수의 변동이 적었고(Figure 2D), 평균 세균 수는 *E. aerogenes*가  $3.0 \times 10^8$  CFU/mL, *A. baumannii*가  $8.4 \times 10^7$  CFU/mL로 전자가 유의하게 많았다(Table 1;  $P < 0.0002$ ).

## 고 찰

항균제에 내성인 세균의 출현과 증가가 항균제 사용 때 문임은 새로운 항균제의 사용에 뒤이어서 생기는 내성균이 증명하고 있다. 그러나 항균제가 없는 환경에서는 항균제 내성 유전자를 보유함이 내성균에게 부담이 되므로 감수성 균주보다 증식이 불리하게 된다. 이러한 사실을 근거로 항균제 내성 유전자와 plasmid의 출현 및 확산을 지연시키고, 이미 생긴 내성균을 줄이기 위한 목적에서 항균제의 사용 제한이나 교환사용이 시도되고 있다. 1990년대 초에 한 병원에서 ceftazidime의 사용을 제한한 바 ceftazidime 내성 *K. pneumoniae*가 1996년에는 병원 전체로는 44%가, 외과 ICU에서는 87%가 감소되었음이 보고되었다<sup>9)</sup>. Landmann 등<sup>21)</sup>도 병원에서 사용하는 항균제를 바꿈으로서 MRSA와 ceftazidime 내성 *K. pneumoniae*가 감소되었음을 보고하였다.

1990년까지는 서부 유럽에서 분리되는 MRSA는 대부분이 다제내성인 homogeneous형이었다. 즉, gentamicin, tetracycline, lincomycin 등 여러 항균제에 감수성이고 heterogeneous형인 MRSA가 1992년에는 3%뿐이었으나 1998년에는 58%로 증가하였고 한 병원에서는 80%로 증가되었는데<sup>22)</sup>, 이 균주는 시험관내 증식속도가 빨랐으며 따라서 이 변화는 빠른 증식 즉, 더 높은 fitness 때문이라고 해석하였다.

한편 Aubry-Damon 등<sup>23)</sup>은 gentamicin 감수성인 MRSA가 증가한 것은 5년 이상 gentamicin의 사용이 감소되었기 때문이라고 하였고, gentamicin 사용이 모든 병원에서 감소된 것은 아니며, 다른 항균제에도 감수성인 균주가 출현하였기 때문에 gentamicin 사용의 감소만으로 이 현상을 설명할 수는 없다고 하였다. 또 다른 문제는 항균제 사용을 완전히 중단하는 경우라도 항균제 내성이 문제되지 않을 정도로 감소되기에 얼마나 긴 기간이 걸릴지는 확실하지 않다고 하였고<sup>8)</sup>, 자유로운 국가에서는 항균제 사용의 제한으로 내성균을 감소시키기가 더욱 어려울 것이라고 하였다<sup>10)</sup>. 또한 한 가지 항균제가 다른 항균제에 대한 그람음성 간균의 내성에 영향을 미치므로 한가지 항균제의 사용제한 효과를 기대하기 어렵다고 하였다<sup>24)</sup>.

사람의 장과 상기도에는 여러 종의 상재균이 있고 그 수가 대단히 많으며<sup>25)</sup> 그 종류와 수는 보통상태에서는 크게 변하지 않는다. 따라서 상재균은 병원성 세균이 외부에서 들어올 때 정착과 침입을 억제하는 작용이 있다<sup>13)</sup>. 그러나 항균제의 사용으로 상재균이 억제되면 소수이던 *C. difficile*이 증식하여 때로는 치명적인 감염을 일으키는데 이것은 상

재균의 숙주 보호작용의 예이다<sup>26)</sup>. 한편 항균제 내성은 병원성 세균만이 획득하는 것이 아니고 상재균도 획득하며 이 내성이 병원성 세균에 전달되기도 한다.

생물의 어느 한 종이 자연서식 장소에서 살아남으려면 죽는 수만큼 증식해야 한다. 또한 자연환경에서는 많은 다른 종류의 미생물과의 경쟁이 있다<sup>27)</sup>. 시험관내에서 관찰되는 증식현상은 자연계에서와는 다른데 이는 시험관내의 영양성분, pH, 삼투압 등이 자연환경과 같을 수 없기 때문이다. 자연환경에서의 세균의 증식 상태를 실험실에서 재현하기는 어렵다. 이 연구에서는 시험 온도를 체온 및 여름철 온도와 비슷한 37°C와 30°C로 하였고, GLMS 배지를 사용함으로써 생체 내나 자연환경의 세균이 노출된 상태를 대신 하려고 하였으나 지속적인 배지 교체가 불가능하여서 매일 계대 배양하는 방법을 사용하였다.

혼합배양시의 해석을 돕기 위한 시험에서 감수성인 또는 내성인 *E. coli* 또는 *K. pneumoniae*를 단독으로 또는 두가지 균종을 동시에 접종하여 배지를 새로이 교체하지 않을 때의 세균 수는 균종에 따라서 차이가 있었으나 장기간 유지되며 그 양상은 두가지 균종을 혼합하여 배양한 경우에도 비슷하였다(Figure 1). 또한 GLMS 배지 37°C에서 시험세균들은 30일 후에도 10<sup>5</sup> CFU/mL 이상의 수를 보였고, 60일 후에도 세균 수에는 차이가 없으며 관찰되어서(시험결과 기재 없음) 자연 소실에는 장기간이 소요될 것임을 보였다. 여기에서 *E. coli*는 염색체 변이로 rifampin 내성이고 장기간 시험에 사용되어 온 균주인데도 세균수가 다른 세균보다 적었으며 따라서 그 증식 속도가 느림을 보였다. Billington 등<sup>11)</sup>은 rifampin 내성인 결핵균을 대상으로 한 연구에서 내성 변이주는 친주보다 fitness 정도가 낮지만 내성 변이주 중에는 그 차이가 적은 것이 있고, 따라서 자연적으로 감수성으로 바뀔 가능성은 적다고 하였다. 한편 rifampin 내성 *E. coli*는 termination efficiency가 향상되었음이 보고되었다<sup>28)</sup>.

감수성인 *E. coli*와 ESBL 생성 *K. pneumoniae*를 30°C에서 혼합 배양했을 때는 그 수의 차는 크지 않았으나 37°C에서 혼합 배양했을 때의 평균 균수는 *K. pneumoniae*가 *E. coli* 보다 현저히 많았는데(Figure 2A), 이러한 현상은 이들 균종을 각각 배양했을 때도 관찰되었다(Figure 1). 따라서 이 현상은 *K. pneumoniae*의 증식이 빨라서 *E. coli*의 증식을 억제한 것이 아니라 이들 각 균주의 특성 때문으로 생각된다. Laurent 등<sup>22)</sup>은 MRSA의 gentamicin 감수성인 균주와 내성인 균주의 증식곡선은 각 균주 단독 배양시나 혼합 배양시나 같았음을 보고하였고, gentamicin 감수성 균주의 세대 시간이 내성 균주보다 짧았으나, gentamicin 감수성인 균주

중에도 세대시간이 긴 것이 있어서 이들 세대시간이 다른 것은 이들 균주의 특성 때문이라고 하였다.

*E. coli*의 증식 지적온도는 37°C이고<sup>29)</sup>, *K. pneumoniae*도 비슷할 것으로 생각된다. *E. coli*는 영양 요구성이 *K. pneumoniae* 보다 더 크기 때문에 GLMS 배지에서의 수가 적다고 생각된다. *K. pneumoniae*는 ESBL 생성 유전자를 plasmid에 보유했음에도 불구하고 감수성인 *E. coli* 보다 증식이 빨랐음은 이 균주가 ESBL 유전자를 가진 plasmid를 오래 전에 획득했기 때문에 부담이 감소되었다고 추정할 수도 있을 것이다. Plasmid를 획득한 *E. coli*는 증식율이 낮다<sup>30, 31)</sup>. 그러나 배양을 계속함에 따라서 fitness가 향상되었다고 하였다<sup>12)</sup>. Lenski 등<sup>32)</sup>은 plasmid 획득이 초기에는 세균에게 부담이 되지만 수백 세대 후에는 부담이 소실된다고 하였고, *E. coli*의 streptomycin 내성 변이주의 peptide elongation 시간이 처음에는 길었지만 180세대 후에는 짧아졌음이 보고되었다<sup>33)</sup>. 한편, 본 시험에서 plasmid를 가진 *K. pneumoniae*의 증식이 빨랐던 것은 이 균주의 특성이고 따라서 ESBL 생성 *K. pneumoniae*가 임상 검체에서 흔히 분리되는 이유로 추측할 수도 있을 것으로 생각된다.

감수성인 *E. aerogenes*와 ESBL 생성 *K. pneumoniae*를 37°C에서 혼합 배양할 때는 *E. aerogenes*의 수가 더 많았으나 그 차이는 현저하지 않았다(Figure 2B). 그러나 30°C에 배양한 초기에는 *E. aerogenes*의 수가 현저히 많았다. *E. aerogenes*는 사람의 상재균으로 존재하기보다는 자연계에 존재하는 세균이고<sup>34)</sup> 증식 지적온도가 30°C이므로<sup>29)</sup> 이 온도에 배양시 세포 수가 현저히 많이 유지됨은 이해할 수 있다. 더욱이 *K. pneumoniae*는 ESBL 생성균이었으므로 부담이 있어서 그 수가 적었을 수 있다고 생각된다. 그러나 35일 이후에는 *K. pneumoniae*의 수가 차츰 증가하였음은 이 온도 또는 배양환경에 적응하였기 때문으로 생각된다. 이 시험결과로 미루어 볼 때, ESBL 생성 *K. pneumoniae*가 감수성인 *E. aerogenes*와 함께 병원환경에 존재할 때 그 수가 현저히 감소하지 않을 것으로 추정된다.

감수성인 *K. pneumoniae*와 변이성 AmpC  $\beta$ -lactamase 다량 생산 *E. aerogenes*를 혼합하여 37°C에 배양시에는 *K. pneumoniae*의 수가 다소 많았으나, 30°C에 배양 초기에는 *K. pneumoniae*의 수가 현저히 적었고 후기에는 그 수가 비슷해졌다(Figure 2C). *K. pneumoniae*는 감수성 균주임에도 불구하고 초기에 균수가 적은 것은 온도의 영향이었을 것으로 생각된다. 따라서 자연환경에서는 항균제 내성인 균주라 하더라도 *E. aerogenes*가 많은 수로 유지될 수 있을 것으로 생각된다. 변이성 AmpC  $\beta$ -lactamase 생성주는 *Enterobacter*

뿐만 아니라 *S. marcescens*와 *Citrobacter freundii* 중에도 흔한데<sup>16)</sup> 이들이 원내 감염에 흔한 것은 병원환경에 많은 수가 유지될 수 있기 때문으로 생각된다.

감수성인 *E. aerogenes*와 VIM-2  $\beta$ -lactamase 생성인 *A. baumannii*를 37°C에 배양할 때의 평균 세균 수는 두 세균이 비슷하였다(Figure 2D). 그러나 30°C에 배양할 때는 *A. baumannii*의 수가 초기에는 약간 적다가 후기에는 비슷해졌다. VIM-2  $\beta$ -lactamase를 생성하는 *A. baumannii* 균주는 보존 중에 imipenem 내성을 상실하는 것이 있었는데 시험한 균주는 계대배양 시험 후에도 내성이 유지됨이 확인되었다. VIM-2  $\beta$ -lactamase 생성균은 근래 우리나라에 퍼지기 시작하였는데 이 효소생산 세균은 기존의 모든  $\beta$ -lactam제에 내성이므로 심각한 것이다<sup>4)</sup>. 이 결과는 이 내성 유전자를 가진 세균이 감수성인 세균과 공존할 때에도 다른 세균의 영향을 받음이 없이 많은 수가 유지됨을 보인 것이라고 하겠다.

이 연구에는 소수의 균주만을 대상으로 하였고, 두 균종간의 상호관계만을 비교하였으며 비교적 단기간인 60일간만 관찰하였고, 생체 내나 자연환경의 상태를 재현하기는 불가능하였다는 여러 가지 제한점이 있다. 그러나 이 연구에서 흔히 원내감염을 흔히 일으키는 균종인 *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, 및 *A. baumannii*가 최근 문제되는 염색체 변이로 인한 cephamycin 내성, plasmid성 ESBL 생성으로 인한 제3세대 내성, blaVIM-2 gene cassette를 integron에 가진 carbapenem 내성균일지라도 항균제에 감수성인 다른 균종과 항균제의 선택압력이 없는 상태에서 공존할 때 그 수가 균종간의 경쟁으로 내성균의 자연 소멸을 기대하기는 어려울 것이라고 추정되었다.

항균제 내성에는 교차내성(cross resistance)과 coresistance가 있다<sup>35)</sup>. Cross resistance는 같은 내성기전으로 같은 계열의 여러 항균제에 내성을 나타냄을 뜻하며 ESBL 생성균이나 AmpC 다량생산균이 제3세대 cephalosporin 모두에 내성인 것이 그 예이다. Coresistance는 한 세균에 여러 가지 기전의 내성이 공존함으로써 각각 다른 계열의 항균제에 내성을 나타내고 따라서 그 세균은 다제내성을 나타내는 경우이며 metallo- $\beta$ -lactamase 유전자는 한개의 integron 중에 다른 내성 유전자와 함께 있어서 다제내성을 나타내는 것이 그 중의 한 예이다. 본 연구에서는 항균제가 없는 배지에서 배양할 때도 내성균의 수가 감수성 균보다 점차 감소하는 경향을 관찰할 수 없었다. AmpC  $\beta$ -lactamase 생성이나 ESBL 생성에 의한 여러 항균제에 대한 교차내성을 줄이기 위해 모든 3세대 cephalosporin의 사용을 제한하기도 어렵고, 또한

coresistance 유전자 모두에 연관된 항균제의 사용을 제한하기도 어려울 것으로 생각된다. 따라서 항균제의 적절한 사용과 함께 새 항균제 개발에 의한 세균과의 경쟁 노력이 지속되어야 할 것이다.

**요 약**

**목 적 :** 내성 유전자를 보유하는 것은 세균에게 부담이 된다. 따라서 항균제의 선택압력이 없을 때는 내성 세균이 감수성 세균으로 차츰 바뀔 것이 기대된다. 내성 유전자 보유로 인한 부담은 세균의 적응으로 감소된다는 보고가 있으나, 근래 문제되는 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), AmpC  $\beta$ -lactamase 및 VIM-2 methallo- $\beta$ -lactamase 생성 세균에 있어서도 그러한 지는 알 수 없다. 이 연구에서는 감수성 세균이 함께 존재할 때 상술한 내성 그람음성 간균이 어떠한 영향을 받는지 규명하고자 하였다.

**방 법 :** 항균제 감수성 및 내성인 *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, 및 *A. baumannii* 균주의 짝을 glucose limited minimal salt (GLMS) medium에 매일 계대 접종하고 30°C와 37°C에 배양하면서 Mueller-Hinton agar와 MacConkey agar 평판을 써서 세균수(CFU/mL)를 관찰하였다.

**결 과 :** 단독 또는 두가지 균종을 접종한 배지를 계대 접종없이 37°C에 배양할 때, 세균 수는 ESBL 생성 *K. pneumoniae*가 감수성 *E. coli* 보다 많았다. 매일 계대 배양한 결과에서 보인 세균 수는 ESBL 생성 *K. pneumoniae*가 감수성 *E. coli* 보다, 감수성 *E. aerogenes*가 ESBL 생성 *K. pneumoniae* 보다, 감수성 *E. aerogenes*가 VIM-2- $\beta$ -lactamase 생성 *A. baumannii* 보다 많았다. 감수성 *K. pneumoniae*와 AmpC  $\beta$ -lactamase 다량 생성 *E. aerogenes*의 세균수는 비슷하였다. 30°C에 배양한 감수성인 *E. coli*와 ESBL 생성 *K. pneumoniae*의 수가 처음에는 함께 배양한 다른 세균 보다 적었으나 계대 배양을 계속함에 따라서 그 수가 많아졌다.

**결 론 :** 내성 균주 모두의 증식이 감수성 균주보다 느리지는 않으며, 감수성 균주와 내성균주가 30°C 및 37°C인 GLMS 배지에 공존할 때, 내성 세균이 감소되지 않는다는 결론을 얻었다.

**감사의 글**

이 연구는 한국과학재단 목적기초연구사업-특정기초 연구비(R01-1999-00110)로 이루어졌음. 이 실험을 도와준 세균내

성연구소 서영희 연구원에게 감사한다.

**참 고 문 헌**

- 1) Neu HC: *The crisis in antibiotic resistance*. Science 257:1064-1073, 1992
- 2) Tenover FC: *Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview*. Clin Infect Dis 33:S108-115, 2001
- 3) Chong Y, Lee K: *Present situation of antimicrobial resistance in Korea*. J Infect Chemother 6:189-195, 2000
- 4) Lee K, Lee HS, Jang S-J, Park AJ, Lee MH, Song WK, Chong Y, KONSAR Group: *Antimicrobial resistance surveillance of bacteria in 1999 in Korea with a special reference to resistance of enterococci to vancomycin and gram-negative bacilli to third generation cephalosporin, imipenem, and to fluoroquinolone*. J Korean Med Sci 16:263-270, 2001
- 5) Schwartz B: *Preventing the spread of antimicrobial resistance among bacterial respiratory pathogens in industrialized countries: the case for judicious antimicrobial use*. Clin Infect Dis 28:211-213, 1999
- 6) William RJ: *Globalization of antimicrobial resistance: epidemiological challenges*. Clin Infect Dis 33:S116-117, 2001
- 7) Bennett PM: *The spread of drug resistance*. In: Baumberg S, Young JPW, Wellington EMH, Saunders JR. eds. *Population genetics of bacteria*. Cambridge, Cambridge University Press, 1996
- 8) Levin BR, Lipsitch M, Perrot V, Schrag S, Antia R, Simonsen L, Walker NM, Stewart FM: *Population genetics of antibiotic resistance*. Clin Infect Dis 24:S9-16, 1997
- 9) Urban C, Mariano N, Rahman N, Queenan AM, Montenegro D, Bush K, Rahal JJ: *Detection of multi-resistant ceftazidime-susceptible Klebsiella pneumoniae isolates lacking TEM-26 after class restriction of cephalosporins*. Microb Drug Resist 6:297-303, 2001
- 10) Levin BR: *Minimizing potential resistance: a population dynamics view*. Clin Infect Dis 33:S161-169, 2001
- 11) Billington OJ, McHugh TD, Gillespie SH: *Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 43: 1866-1869, 1999
- 12) Bouna JE, Lenski RE: *Evolution of a bacterial/plasmid association*. Nature 335:351-352, 1988
- 13) Hamilton-Miller JMT: *Living in the 'post-antibiotic era': could the use of probiotics be an effective strategy?* Clin Microbiol Infect 3:2-4, 1997



- 14) Nicolle LE, Strausbaugh LJ Galibaldi RA : *Infections and antibiotic resistance in nursing homes. Clin Microbiol Rev* 9:1-17, 1996
- 15) Simonsen L : *Dinamics of plasmid transfer on surfaces. J Gen Microbiol* 136:1001-1007, 1990
- 16) Livermore DM :  *$\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev* 8:557-584, 1995
- 17) Rasmussen BA, Bush K : *Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother* 41:223-232, 1997
- 18) Corbella X, Montero A, Pujol M, Dominguez MA, Ayats J, Argerich MJ, Garrigosa F, Ariza J, Gudiol F : *Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multi-resistant Acinetobacter baumannii. J Clin Microbiol* 38:4086-4095, 2001
- 19) Poirel, et al. : *Characterization of class 1 integrons from Pseudomonas aeruginosa that contain the blaVIM-2 carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. Antimicrob Agents Chemother* 45:546-552, 2001
- 20) Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH : *Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter species. Clin Microbiol Infect* 7:88-91, 2001
- 21) Landman D, Chockalingam M, Quale JM : *Reduction in the incidence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and ceftazidime-resistant Klebsiella pneumoniae following changes in a hospital antibiotic formulary. Clin Infect Dis* 28:1062-1066, 1999
- 22) Laurent F, Lelievre H, Cornu M, Vandenesch F, Carret G, Etienne J, Flandrois J-P : *Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. J Antimicrob Chemother* 47:277-283, 2001
- 23) Aubry-Damon H, Legrand P, Brun-Buisson C, Astier A, Soussy C-J, Leclercq R : *Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus : role of an infection control program and changes in aminoglycoside use. Clin Infect Dis* 25:647-653, 1997
- 24) Friedrich LV, White RL, Bosso JA : *Impact of use of multiple antimicrobials on changes in susceptibility of gram-negative aerobes. Clin Infect Dis* 28:1017-1024, 1999
- 25) Caugant DA, Levin BR, Selander RK : *Genetic diversity and temporal variation in the Escherichia coli population of a human host. Genetics* 98:467-490, 1981
- 26) Bartlett JG : *Clostridium difficile : history of its role as an enteric pathogen and the current stuuatus of knowledge about the organism. Clin Infect Dis* 18:S265-272, 1994
- 27) Brock TD : *Microbial growth rates in Nature. Bacteriol Rev* 35:39-58, 1971
- 28) Jin D, Walter WA, Gross CA : *Characterization of the termination phenotypes of rifampicin-resistant mutants. J Mol Biol* 202:245-253, 1988
- 29) Krieg NR, Holt JG : *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 1. Williams & Wilkins, Baltimore, 1984, p409*
- 30) Kyslik P, Dobisova M, Maresova H, Sobotkova L : *Plasmid burden in chemostat structure of Escherichia coli-its effect on the selection for overproducers of host enzymes. Biotechnol Bioeng* 41:325-329, 1993
- 31) Lee SW, Edlin G : *Expression of tetracycline resistance in pBR322 derivatives reductases the reproductive fitness of plasmid-containing Escherichia coli. Gene* 39:173-180, 1985
- 32) Lenski RE Simpson SC, Nguyen TT : *Genetic analysis of a plasmid-encoded, host genotype-specific enhancement of bacterial fitness. J Bacteriol* 176:3140-3147, 1994
- 33) Schrag SJ, Perrot V : *Reducing antibiotic resistance. Nature* 381:120-121, 1996
- 34) Sanders WE, Jr and Sanders SS : *Enterobacter spp. : Pathogens poised to flourish at the turn of the century. Clin Microbiol Rev* 10:220-241, 1997
- 35) Courvalin P, Trieu-Cuot P : *Minimizing potential resistance : the molecular view. Clin Infect Dis* 33:S138-146, 2001