

이학석사 학위논문

β -lactamase 유전자 조사에 의한
해양환경세균의 항생제 내성 특성 분석



2005년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

김 재 훈

김재훈의 이학석사 학위논문을 인준함

2004년 12월 23일

주 심 이 학 박 사 강 주 찬



위 원 약 학 박 사 정 준 기



위 원 이 학 박 사 정 현 도



목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 실험 균주	7
2. 약제 감수성 실험	12
3. β -lactamase 생성확인	13
4. PCR	13
4-1. Total nucleic acid 분리	13
4-2. primer 제작	14
4-3. PCR	16
4-4. Gel elution	16
4-5. Cloning	17
4-6. Plasmid 분리	17
5. 염기 서열 분석	18
6. <i>Vibrio</i> spp.에서의 β -lactamase gene cloning	19
6-1. 제한 효소의 처리	19
6-2. DNA fragment의 ligation	19
6-3. Transformation	20
7. Conjugation	20
8. 이중디스크 확산법 (Double disk synergy test)	21

9. VAK-1 β -lactamase gene의 Isoelectric focusing (IEF)와 SDS PAGE	21
10. <i>Vibrio</i> spp. 에서의 VAK-1 β -lactamase gene의 분포 확인	22
III. 결 과	24
1. <i>Edwardsiella tarda</i>	24
1-1. 내성 균주의 분리	24
1-2. <i>Edwardsiella tarda</i> 의 β -lactamase gene 확인	29
2. 연쇄상구균	33
2-1. 연쇄상구균에서의 β -lactam 계열 항생제의 MIC와 다른 계열 항생제의 약제 감수성 실험	33
2-2. 연쇄상구균에서의 β -lactamase gene 생성 확인	37
3. <i>Vibrio</i> spp.	38
3-1. <i>Vibrio</i> spp.에서의 β -lactam 계열 항생제 내성	38
3-2. <i>Vibrio</i> spp.에서의 β -lactamase gene detection	40
3-3. KV3 β -lactamase gene의 distribution	50
3-4. KV3 β -lactamase gene의 IEF, SDS-PAGE	50
IV. 고 찰	55
V. 요 약	68
VI. 감사의 글	70
VII. 참고 문헌	71

Survey of antibiotics resistance through the characterization of β -lactamase genes in microorganism of marine environment.

Jae Hoon Kim

Department of Fish Pathology, Graduate School

Pukyong National University

Abstract

Ampicillin resistant *Edwardsiella tarda* isolated from the various marine environments produced β -lactamase and showed positive result in nitrocefin test. These isolates were also appeared to be resistant to variable antibiotics, including trimethoprim sulfamethoxazole, tetracycline, chloramphenicol, gentamicin, amikacin. Interestingly, six out of 12 ampicillin resistant *E. tarda* showed resistance to ceftiofur. Ten of 12 *E. tarda* isolates of ampicillin resistant carried TEM-1 gene in the nucleotide sequence comparison, and did not show any evidence involving of the SHV, OXA β -lactamase genes for resistance to ampicillin and cephalosporins in the isolates of this study. These results suggested that distribution of TEM-1 β -lactamase genes in the ampicillin resistant *E. tarda* isolated from the diseased fish in aquatic farms of Korea might be highly restricted. In transformation experiments, eight out of 12 *E. tarda* carried TEM gene on the mobile plasmids. Interestingly, two isolates resistant to ampicillin and positive result in the analysis of nitrocefin test did not carry any genes analyzed in this study.

Ampicillin resistant *Streptococcus* sp. showed negative result in nitrocefin test and did not contain bla_{TEM}, bla_{PC1} in PCR analysis. It suggested that resistant of ampicillin in *Streptococcus* sp. might not depend on the production of β -lactamases, but by modified PBP (penicillin binding proteins).

In this study, 120 *Vibrio* spp. were obtained from different parts areas of Korea from 1993 to 2004. Additionally 50, 30 *Vibrio* spp. were obtained from seaperchs imported from China and seabreams imported from Japan respectively. More than 80% of *Vibrio* spp. isolates were appeared to be resistant to ampicillin and 40% *Vibrio* spp. isolates showed positive results in nitrocefin test. PCR was also performed to analyze the β -lactamase genes contained in ampicillin resistant *Vibrio* spp. using the primers designed from the sequences of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CARB} and *bla*_{XTII} genes. Unfortunately all strains showed negative results in PCR. It pushed us to screen the gene of β -lactamase in ampicillin resistant *Vibrio* spp. that had not been reported. From the *Vibrio* KV3 isolated from the coastal waters of the Korea island of keoje, novel β -lactamase gene was cloned and determined nucleotide sequence. It was revealed an ORF(open reading frame) of 861 bp encoding a protein of 257 amino acidsfor the *bla* gene of strain KV3. The deduced amino acid sequences of these β -lactamases were compared to those of other class A β -lactamases. The deduced amino acid sequence was found to be as a member of class A β -lactamases and showed low levels of homology ($\leq 53\%$) to other β -lactamases of the same class. The genomic locations and distribution of the β -lactamase gene in othere *Vibrio* spp. isolates were also investigated and concluded that *Vibrio* KV3 possess a β -lactamase in chromosomal DNA or non-mobile plasmid. And three ampicillin-resistant isolates out of 200 *Vibrio* spp., RV16, JDV11, YV1, were detected VAK-1 β -lactamase gene in PCR test.

Further studies will be needed to determine the genetic characteristics of these ampicillin resistant isolates, flanking sequences of the β -lactamase gene, distribution of ampicillin resistance, as well as the biochemical characterization of the protein.

I. 서 론

β -lactam 항균제는 크게 penicillins 과 cephalosporins 로 나누어지며 β -lactam ring 을 기본 구조 핵으로 가지고 있다. β -lactam 항균제의 β -lactam ring 이 세균의 세포벽 합성에 관여하는 transcarboxylase 와 transpeptidase 와 같은 PBP(penicillin binding protein)에 결합하여 세균의 세포벽 합성을 억제 함으로써 항균력을 갖게 된다 (Jet et al., 1995; Pitout et al., 1997).

세균의 β -lactam 항균제에 대한 내성 기전에는 (1) β -lactamase 의 생성, (2)PBPs 의 변화, (3)약물의 세균 내 투과 억제 (4)약물의 세포 외 배출 증가 등을 들 수 있다. 이 중 그람 음성 세균에서는 β -lactamase 생성에 의한 항균제 불활화가 가장 빈번하게 나타나고 있으며 질병 치료에 있어서 가장 문제가 되고 있다 (Mabilat and Gaussard, 1993; Pai, 1998). β -lactamase 는 β -lactam ring 의 amide bond 를 끊음으로써 세균에 대한 항균력을 불활성화 시키는 효소이다 (Bush et al., 1995).

Plasmid mediated β -lactamas 에 안정적이고 그람 음성균과 양성균 모두에게 폭 넓게 작용하여 임상적으로 많이 사용되었던 광범위 β -lactam 항균제를 분해하는 β -lactamase 를 특히 ESBL(extended-spectrum β -lactamase) 이라고 하며 이것에 의한 문제가 최근 크게 부각되고 있다 (Bradford, 2001). 양식 산업에서는 광범위 β -lactam 항균제를 사용하지 않지만 육지에서 흔히 들어온 세균에 의해 plasmid 매개로 ESBL 을 습득할 가능성이 있다 (이, 2003).

ESBL 은 TEM-1, TEM-2, SHV-1 의 β -lactamase 에서 점변이(point mutation)에 의한 amino acid 변화에 의해서 광범위 β -lactam 항균제에 내성을 나타낼 수 있게 하는 효소로써 대부분의 β -lactam 항균제를 분해하지만 cefoxitin 과 같은 cephamycin 에 불활성이며, clavulanic acid 와 같은 β -lactamase 억제제에 의해 효소의 활성이 억제되는 특성을 가지고 있다 (Brinas et al., 2002). TEM type 의 ESBL 은 Enterobacteriaceae 에 속하는 *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Salmonella* spp. 등의 Enterobacteriaceae 에 보고 되어져 있으며 또한 SHV type 의 ESBL 은 *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter diversus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 등에 보고 되어져 있다 (Bradford, 2001).

β -lactamase 의 분류 체계는 여러 가지가 있지만 크게 2 가지로 나눌 수 있다. 우선 분자 구조에 근거하여 amino acid sequence 의 상동성에 따라 분류를 한 Ambler 체계와 효소의 기질과 β -lactamase inhibitor 와의 관계등에 따라 분류를 한 Bush 체계로 나눌 수 있다 (Bush, 1995). 하지만 최근에 들어서는 점변이(point mutation) 에 의한 기질 특이성 변화 등으로 인한 분체점과 amino acid sequence 로만 분류하기에는 분체점이 제기되어 Bush 분류 체계와 Ambler 분류체계를 상호 보완해서 사용하기도 한다 (Bradford, 2001).

Ambler 는 β -lactamase 를 serine 형인 class A, C, D 와 zinc 형인 class B 4 가지로 분류하였다. 이중 class A, C 가 모든 세균에 가장 많이 나타나며 1980 년대 초반부터 그람 음성 세균에 감염된 환자들에게서 class A, C, D 의 β -lactamase 가 많이 나타난다고 한다 (Bonnet, 2004).

많은 그람 음성 세균의 β -lactamase 는 chromosomal 에 자연적으로 존재한다고 알려져 있고 이들 β -lactamase 는 PBP(penicillin binding protein) 의 amino acid sequence 와 유사한 부위가 존재하기 때문에 PBP 에서 과생되었을 것이라 생각되어지고 있다 (Bradford, 2001).

우리나라 양식 산업에 있어서 생산성 향상을 위한 밀식, 과다한 사료 투여 등으로 양식 환경의 악화, 내병성의 저하 및 감염기회의 증대로 인해서 다양한 질병이 발생하고 이러한 질병들로 인한 생산력의 저하, 품질 하락 등의 원인으로 막대한 경제적 손실을 가져오고 있다. 특히 세균에 의한 피해가 총생산량의 55%라는 높은 비율을 나타낸다는 보고가 있고 (우, 2002), 이들 세균성 질병 중에서 특히 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp., 연쇄상구균, *Aeromonas* spp. 등에 의해서 질병이 많이 발생한다 (심 등, 1995; Oh et al., 1998). *Edwardsiella tarda* 는 Enterobacteriaceae 과에 속하는 그람 음성 간균으로서 담수어인 뱀장어, 잉어, 틸라피아 등과 해수어인 감성돔, 참돔, 님치등 여러가지 경골어류에서 edwardsiellosis 을 일으키는 원인균으로 알려져 있다 (Baxa et al., 1985; Chen et al., 1996; Nakatsugawa et al., 1983; Kubota et al., 1981; Herman and Bullock, 1986).

감염시 증상으로는 체색흑화, 탈장, 안구백탁, 항문 주위의 출혈, 복수에 의한 복부팽만, 그리고 간, 비장, 신장이나 아가미에 작은 흰색 질점 형성 등으로 알려져 있다 (전과 오, 1988).

Edwardsiella tarda 에서의 항생제 내성과 R-plasmid 와의 관계 등은 밝혀져 있지만 (김, 1999; 최 등, 1996), β -lactam 계열 항생제의 내성과 내성기전에 대한

연구들은 아직 미비한 편이다 (Waltman and Shotts, 1986; Clark et al., 1991; Reger et al., 1993; Stock and Wiedemann, 2001). 그람 음성 세균에서의 β -lactamase 는 TEM-1, TEM-2, SHV-1 이 주로 나타나는 것으로 보고되어 있다 (Jeong et al., 2003; Bonnet et al., 1999; Brinas et al., 2002; Colom et al., 2003).

TEM type 의 β -lactamase 는 4 가지 형태의 promoter 가 존재하는데 (Lartigue et al., 2002) 이 중 장내 세균에서는 주로 P3 형태가 자주 보고 되어진다 (Brinas et al., 2002).

이번 연구에서는 *Edwardsiella tarda* 의 β -lactam 계열 항생제의 약제 감수성과 β -lactamase 와의 관계를 알아보았다.

연쇄상구균은 Streptococcus의 원인균으로서 1957년 일본의 시즈오카현의 부지개 송이에서 처음 발견된 후 (Hoshina et al., 1958) 여러 어류에서 질병을 일으킨다고 알려지 있으며 특히 *E. tarda* 등과 혼합 감염이 빈번하게 일어나며 우리나라에서도 뱀치, 방어, 조피볼락 등에 패사를 일으켜 막대한 경제적 피해를 일으키고 있다 (Chun, 1989; Oh et al., 1998).

연쇄상구균의 β -lactam 계열 항균제의 내성 정도와 내성기전에 대한 연구는 많이 이루어져 있는데 특히 PBP(penicillin binding protein) 의 변화에 의한 β -lactam 계열 항균제의 내성에 대해서 연구가 많이 되어져 있다 (Chesnel et al., 2002; Nakayama and Takao, 2003; Smith et al., 2000; 김 등, 2003). 내성 가진 중 β -lactamase 관계에 있어서는 class A β -lactamase gene인 PC1, TEM-1, TEM-129 등이 알려져 있다 (McLaughlin et al., 1981; NCBI access NO. AY452662, AY392531).

본 연구는, 2003부터 2004년까지 제주도에서 분리한 30개의 연쇄상구균에서 β -lactam 내성균을 확인하고 β -lactamase gene과의 관계에 대해서 알아보았다. 그리고 또한 여러 계열 항균제에 대한 약제 감수성 경향을 알아보았다.

마지막으로 *Vibrio* spp.는 vibriaceae 과에 속하며 이 과에는 *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium* 속들이 있다 (Keabra, 1972). *Vibrio* 속은 여러 종이 보고 되어 있지만 이중 병원성을 나타내는 균은 *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* 등 약 11 종 정도가 알려져 있다 (Edward, 1995). 이 중에서 *Vibrio alginolyticus* 는 수중 환경에 널리 분포하는 그람음성 간균으로 saprophytic microbiota 로 알려져 있지만 gilt-head sea bream 양식 어장 뿐만 아니라 여러 어류와 패류에 병원성을 나타내어 많은 피해를 주는 것으로 알려져 있다 (Balebona et al., 1998; Lee, 1995; Rikelme et al., 1996).

Vibrio spp.의 β -lactam 계열의 항생제 내성에 대한 연구는 많이 이루어져 있으며 (Ottaviani et al., 2001; Zanetti et al., 2001), 특히 ampicilin 에 대해서 30-98% 정도의 내성을 보인다고 알려져 있다. 또한 *Vibrio alginolyticus* 에서의 ampicillin 내성은 90% 정도로 매우 높았다 (Molina-Aja et al., 2002; Ottaviani et al., 2001).

Vibrio spp. 의 β -lactam 계열 항균제 내성 기전에 있어서 β -lactamase 에 대한 연구는 *Vibrio cholerae* 에 편향 되어 있고 Non-cholera vibrios(NCV) 에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 현재 NCV 에서 알려져 있는 β -lactamase 는 *Vibrio harveyi* 의 VIII-1, VIIW-1 과 *Vibrio fischeri* 의 β -lactamase, *Vibrio parahaemolyticus* 의 β -lactamase 가 알려져 있다 (Teo et al., 2000; Weng et al.,

2004; NCBI access No. NC004605). Zanetti et al. (2001) 의 보고에 의하면 *Vibrio* spp. 에서 90% 이상이 ampicillin 에 MIC 값이 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 나타내었으며 *Vibrio* spp.의 β -lactamase 를 확인하기 위하여 그람 음성 세균에 많이 분포되어 있는 β -lactamase 인 TEM, SHV gene 을 PCR 방법으로 확인하여 보았지만 β -lactamase 를 확인하지 못하였다.

따라서 본 연구는 NCV 에 어떤 β -lactamase 가 존재하고 있어서, β -lactam 항균제에 내성을 나타내는지, 여러 방법으로 알아보고 확인된 β -lactamase 를 *Vibrio* spp. 에서 알려진 다른 β -lactamase 와 비교해 보았다. 또한 *Vibrio* spp. 에서의 ESBL 생성 가능성에 대해서도 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 균주

본 연구에 사용된 균주들은 우리나라 여러 지역의 해수, 병어와 정장어류의 여러 장기를 무균적으로 적출하여 1.0% NaCl 첨가 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco), Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Difco) 배지에 직접 도말 하였으며 28℃에서 24~48시간 배양하여 분리한 균을 다시 *Edwardsiella tarda*의 선택 배지인 Salmonella-Shigella Agar(SS, Difco), 와 *Vibrio* spp. 의 선택 배지인 Thiosulphate-Citrate-Bile-Sucrose Agar (TCBS, Difco) 에 도말 한 후 각각 SS에서 검은색, TCBS에서 노랑색 혹은 초록색의 집락을 형성 하는 것을 1993년부터 2004년에 걸쳐서 분리하였다. 연쇄상구균은 이창훈 박사님에게서 2003년부터 2004년까지 분양 받아 사용하였다 (Table 1.2,3).

증균을 위하여 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) 및 TSA에 NaCl을 1% 첨가하여 25℃에서 배양하였다.

세부적인 균의 동정을 위하여 생화학적 방법인 API 20E, API 20NE system (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) , Vitek GNI+ CARDS (Biomérieux Inc.) 을 사용하였고 연쇄상 구균의 동정을 위해서 Mata et al. (2004) 의 방법을 인용하여 분자생물학적으로 연쇄상구균을 동정하였다. 실험 균의 보존을 위해 배양액에 20% Glycerol (Sigma, USA) 를 첨가한 후, -70℃에서 사용 전까지 보관하였다.

Table 1. Used ampicillin resistant *E. tarda* in this study.

Strains	Source	Area	Year
<i>E. tarda</i> RE17	Flounder	Yousu	1994
<i>E. tarda</i> RE21	Flounder	Yousu	1994
<i>E. tarda</i> YE1	flounder	Yousu	1994
<i>E. tarda</i> YE2	flounder	Yousu	1994
<i>E. tarda</i> YE3	flounder	Yousu	1994
<i>E. tarda</i> JDE17	flounder	Yousu	1996
<i>E. tarda</i> JDE18	flounder	Yousu	1996
<i>E. tarda</i> JDE20	flounder	Yousu	1997
<i>E. tarda</i> JDE41	flounder	Yousu	2002
<i>E. tarda</i> JDE46	flounder	Yousu	2002
<i>E. tarda</i> CJE10	flounder	Jejudo	2003
<i>E. tarda</i> CJE14	flounder	Jejudo	2003

Table 2. Used *Vibrio* spp. in this study

Strains	Source	Area	Year
RV2	flounder	Namhae	1993
RV11	flounder	Namhae	1993
RV16	flounder	Pohang	1993
JDV2	flounder	Kampo	1994
JDV3	flounder	Kampo	1994
JDV4	flounder	Keoje	1994
JDV6	flounder	Daebyon	1994
JDV9	flounder	Pohang	1996
JDV11	flounder	Pohang	1998
JDV13	flounder	Namhae	2001
JD7	flounder	Kampo	1998
M1	flounder	Namhae	2002
M5	flounder	Namhae	2002
YV1	flounder	Yosu	1994
C35	flounder	Namhae	2002
JV1	rockfish	Namhae	2004
JV2	flounder	Namhae	2004
JV3	flounder	Namhae	2004
JV5	flounder	Namhae	2004
JV7	sea cucumber	Namhae	2004
JV8	sea cucumber	Namhae	2004
JV9	sea cucumber	Namhae	2004
JV10	sea water	Kosung	2004
JV11	sea water	Kosung	2004

Table 2. continue

Strains	Source	Area	Year
JV12	sea water	Kosung	2004
JV13	sea water	Kosung	2004
JV14	sea water	Kouje	2004
JV15	sea water	Kouje	2004
JV16	flounder	Ulsan	2004
DV3	rock bream	Kouje	2004
BV1	flounder	Pohang	2004
PV1	flounder	Pohang	2004
CV12	sea perch	China	2003
CA2	sea perch	China	2003
CA25	sea perch	China	2003
CA49	sea perch	China	2003
CV2-5	sea perch	China	2003
JRV1	red sea bream	Japan	2003
JRV2	red sea bream	Japan	2003
JRV3	red sea bream	Japan	2003
JRV4	red sea bream	Japan	2003
JRV5	red sea bream	Japan	2003
JRV6	red sea bream	Japan	2003
JV27	mullet	Hadong	2004
JV28	sea water	Hadong	2004
KV3	sea water	Keoje	2004
CSV9 (6-2)	sea perch	China	2003
CSV26 (6-2)	sea perch	China	2003

Table 3. Used *Streptococcus* sp. in this study.

Strains	Source	Area	Year
CJS1-14	flounder	Jejudo	2003
CJV23	flounder	Jejudo	2003
CJS30-46	flounder	Jejudo	2004

2. 약제 감수성 실험

실험 균주가 지니고 있는 항생제에 대한 내성의 정도를 알아보기 위하여, Ciprofloxacin (CIP), Chloramphenicol (C), Gentamicin (GM), Oxolinic Acid (OA), Tetracycline (Tc), Streptomycin (S) Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Amikacin(An) 을 사용하여 약제 감수성 시험을 실시하였으며, 사용된 항생제는 모두 Sigma 에서 구입하여 사용하였다.

채집 균주에 대한 최소 증식 지지 농도 (Minimal Inhibition Concentrations, MICs) 값은 Broth dilution method 에 의하여 측정되었고 (김, 1997) 사용된 β -lactam 계열 항균제는 ampicillin (AMP, Sigma), penicillin (P, Sigma), cefoxitin (FOX, Sigma), cephalexin (CPL, Sigma), cefamandole (CFM, Sigma), cefadroxil (CFD, Sigma), ceftriaxone (CFA, Sigma), piperacillin (PIP, 유한양행), amoxycillin/clavulanic acid (AMC, 유한양행), amoxycillin (AMO, 다원케미컬), cefotaxime (CFX, 한미약품), ceftazidime (CAZ, GSK), cefuroxime (CFM, GSK) 을 사용하였다. 먼저, 96 wells plate 에 멸균된 Mueller Hinton Broth (MH broth, Difco)를 160 μ l 넣고, 각 농도로 1:2 씩 여러 단계로 희석된 항생제 20 μ l와, MH broth 에 10^7 cells/ml로 현탁된 균액을 20 μ l 넣었다. Positive control 로는, MH broth 180 μ l와 현탁된 균액 20 μ l을, negative control 로는 MH broth 만 200 μ l를 넣어주었다. 각 균의 적온에서 18 시간 배양한 후, MIC 값은 세균의 증식에 따른 액체 배지의 혼탁도를 관찰하여, 육안적으로 세균의 증식이 억제되는 항생제의 가장 낮은 농도로 결정되었다.

3. β -lactamase 생성 확인

β -lactamase 생성 확인은 Nitrocefin test 를 실시하여 판정하였다 (Livermore and Brown., 2001).

Nitrocefin test 는 β -lactamase 에 의해서 nitrocefin 의 β -lactam ring 이 분해할 때 cephalosporinic acid 가 생성되어 색깔이 노랑에서 붉은색으로 바뀌는 것을 확인함으로써 β -lactamase 의 존재를 알 수 있게 한다.

TSB 에 균주를 접종하여 27 °C에서 18 시간 배양한 후 배양액을 plate 위에 20 μ l 떨어뜨리고 nitrocefin (Oxoid) 용액을 동량 떨어뜨린다. 10 분 이내에 붉은 색으로 발색되는 균주를 β -lactamase 양성으로 판정하였다.

4. PCR

4. 1. Total nucleic acid 분리

Total nucleic acid 의 분리는, Phenol/Chloroform 법을 사용하였다. 먼저 실험에 사용할 균을 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) 에 접종하여, 25°C 18 시간 배양시킨다. 배양 후, 배양액 1.5 ml을 취하여 microtube 에 분주하고, 12000rpm 에서 10 분 동안 원심 분리하여 균을 모았다. TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) 600 μ l에 현탁시킨 후, 20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, USB) 20 μ l 및 20 mg/ml의 proteinase K 5 μ l를 첨가하여 37°C에서 1 시간동안 lysis 시켜 세포벽을 제거시킨다. 반응 후 lysates 에, 5M Sodium Chloride (NaCl)를 100 μ l 첨가한 후 잘 섞어주었다. 종 혼합액에 동량의 Phenol :

Chloroform : Isoamylalcohol (25 : 24 : 1, Sigma, USA)을 넣어준 후, vortexing 하여 층이 없도록 조심스럽게 섞은 후, 12,000 rpm, 10 분 동안 원심분리하였다. 상정액을 새 microtube 로 옮기고, 이와 같이 2 번 더 추출하여, DNA 가 녹아있는 수용액 층을 단백질 성분으로부터 분리하였다.

위의 수용액 층에, 2 배 volume 의 99.99% ethanol (Sigma) 및 0.3M Sodium Acetate 를 넣고, inverting 하여 혼합한 후, -70℃에서 1 시간동안 침전하였다. 12000rpm, 4℃, 10 분 동안 원심 분리하여 상정액을 제거하고, 70% ethanol 로 다시 12000rpm, 4℃, 10 분간 원심 분리하는 washing 과정을 거친다. 상정액을 완전히 제거한 후, 10 분간 자연 건조시켜, 50 μ l의 distilled water 에 재현탁시켰다 (Chen and Kuo, 1993). 현탁시킨 DNA 는 분광 광도계 (spectrophotometer, UVIKON, KONTRON INSTRUMENTS, S.P.A., Milan, Italy)를 사용하여 $A_{260/280nm}$ 값을 구하여 DNA 양을 측정한 후 실험에 사용하였다.

4.2. Primer 제작

TEM, SHV gene에 특이적인 primer는 여러 논문에서 인용 되어 있는 것을 사용하였다 (Lee et al., 2001; 이, 2003). OXA gene은 Bert et al. (2002)이 사용한 것을 인용하였다. *Vibrio cholerae*에서 알려진 β -lactamase 인 PSE type과 CARB type의 nucleic acid sequence를 Genbank (NCBI) 에서 얻고 (access No. AJ784256, AY008290, Z22590, J03427, AF409092, AF030945, AY248038), Bioedit (Version 5.0.9., Department of Microbiology North Carolina State University) 를 이용하여 비교한 후 conserve 한 부위에서 primer를 제작하였다. 또한 *Vibrio* spp. 에서 알려

져 있는 β -lactamase 인 VIII-1, VIH-1, *Vibrio parahaemolyticus* β -lactamase
 도 Genebank (NCBI) 에서 nucleic acid sequence를 얻은 후 각각의 gene을 확인
 할 수 있는 특이적인 primer를 제작하였다 (access No. AF217648, AF217649,
 NC004605).

사용된 primers 의 염기 시열과 예상되는 증폭 산물의 크기를 다음의 Table 4 에
 나타내었다.

Table 4. Primers and expected sizes of PCR amplicons for various β -lactamase
 genes

Primer	β -lactamase	Oligonucleic sequence (5'-3')	Expected sizes(bp)
TEM O	TEM	ATAAAATTCTTGAAGACGA	1080
TEM G2		CTGACAGTTACCAATGCTTA	
SHV F	SHV	GGTTATGCGTTATATTCGCC	866
SHV R		TTCAGCGTTGCCAGTGCTCG	
OXA F	OXA	TCAACAAAATCGCCAGAGAAG	276
OXA R		TCCCACACCAGAAAAACCAG	
PSE F	PSE, CARB	GATTACAAATGGCAATCAGCG	550
PSE R		GCTGTAATACTCCGAGCAC	
VIII F	VIII, VIH	TCACCTGAGTGTGAACCGA	981
VIII R		GGATAGTCCTGCTTACTGG	
RIMD F	※	CCTGTTGGTTGGGCTGATG	810
RIMD R		CAGTTGGCTGATTTGCGCG	

※: *Vibrio parahaemolyticus* RIMD β -lactamase

4.3. PCR

PCR 을 위하여, 0.2 ml microtube 에, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% w/v gelatin, 0.5% Tween-20, 200μM 의 각각의 dNTP, 1μM 의 각각의 primer, 1.25U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 및 template DNA 로써 추출한 세균의 total nucleic acid 를 1ng 을 첨가한 후, 증류수로 최종액의 volume 이 50 μl 가 되게 하였다.

PCR 혼합물은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여, 95℃에서 3 분간 pre-denaturation 시킨 후, 95℃에서 30 초 denaturation, 55℃에서 30 초 annealing, 72℃에서 30 초 extension 의 반응을 1cycle 로 하여, 30cycle 을 반응시켰다. 그리고, 72℃에서 7 분간 post-extension 시켰다.

PCR 후 증폭 산물은 0.5×TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 μg/μl EtBr (Ethinium Bromide)가 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기 영동 한 후, UV 검출기 (Seoulin Scientific Co., Ltd.)를 이용하여, ultraviolet 상에서 검출되는 band 와 그 크기를 관찰하여 증폭 여부와 β-lactamase gene 을 확인하였다.

4.4. Gel elution

PCR 생성물을, Prep-A-Gene DNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 agarose gel로부터 분리 정제하였다.

먼저, 전기영동으로 확인된 DNA 가 포함된 gel 의 band 를 절단하여 새 microtube 에 옮긴 후, binding buffer 500 μl를 첨가하여 37℃에서 10 분간 반응시켜 PCR 생성물이 들어있는 gel 을 녹인다. 그리고 matrix 15 μl를 첨가하고, 실온에서 5 분간 반응시킨 후, 12,000 rpm, 1 분간 원심 분리한다. Gel 성분이 포함된 상정액을 모두 제거하고, 다시 binding buffer 375 μl를 첨가하여, 같은 방법으로 원심분리하고, 상정액을 제거한다. 침전된 matrix 에 washing buffer

375 μl 를 첨가하여, 같은 방법으로 원심 분리하고 상정액을 제거하는 과정을 2 회
기전 후, pellet 을 실온에서 10 분간 자연 건조 시킨다. 건조 시킨 침전물에 elution
buffer 20 μl 를 첨가하여 현탁 시킨 후, 37℃에서 10 분간 반응시켰다. 12,000
rpm 에서 10 분간 원심 분리한 후, DNA 가 녹아 있는 상정액을 새 microtube 로
옮기, 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

4.5. Cloning

정제한 DNA 를, TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 를
사용하여 cloning 시켰다. Elution 과정을 통해서 정제된 DNA 4 μl 를 새
microtube 로 옮긴 후, salt solution 1 μl , TOPO vector 1 μl , distilled water 4 μl 를
첨가하여 상온에서 30 분간 반응시켰다. 다음에, competent cell (*E. coli* DH5 α -T1)
50 μl 를 첨가하여 ice 내에서 20 분간 반응시키고, 42℃에서 30 초간 heat-shock
시켰다. 바로 ice 에 2~3 분간 두었다가, SOC 배지 250 μl 첨가하고, 37℃에서
90 분간 진탕 배양시켰다. 배양액을 X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-
galactopyranoside, Sigma, USA) 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 Ampicillin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 첨가된 Luria-
Bertani 평판배지 (LB, Difco)에 도말하여, 37℃에서 24 시간동안 배양시킨 후,
파란색과 흰색의 집락이 증식하는 것을 확인하고 흰색으로 나타나는 집락을
선택하였다.

4.6. Plasmid 분리

배양된 집락을 취하여, Ampicillin 이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가된 LB broth (Difco)에 접종한 후
24 시간동안 37℃에서 배양하였다. 배양액 1.5 ml을 microtube 에 옮기고, 12,000
rpm, 4℃, 10 분간 원심 분리하여 균을 모은 후, 상층의 배지 성분을 제거하였다.
균의 침전물에, 100 μl ice-cold solution I (50mM glucose, 25mM Tris/Cl, pH 8.0,
10mM EDTA, pH 8.0)을 넣고, vortex 를 사용하여 완전히 현탁 시켰다. 현탁액에

200 μl 의 solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS)를 넣고, 5 회 inverting 하여 혼합한 후, ice 에서 5 분 동안 반응시켰다. 150 μl ice-cold solution III (60 ml 5M potassium acetate, 11.5 ml glacial acetic acid, 28.5 ml distilled water)를 첨가하고, 5 회 inverting 하여 혼합한 후, ice 에서 5 분간 반응시켰다. 반응액을 12,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 분간 원심 분리하여 상층의 plasmid 가 포함된 용액을 새 microtube 에 옮겼다. Plasmid 용액에 동량의 Phenol : Chloroform : isoamylalcohol (24 : 25 : 1)을 넣고, vortex 한 후, 12,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 분간 원심 분리하여, 상층의 DNA 용액을 새 microtube 로 옮겼다. 2 배 volume 의 Ethanol 과 0.3M Sodium acetate 를 넣고, vortex 로 혼합하여, -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간동안 침전시켰다. 12,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 분간 원심 분리하여 상정액을 완전히 제거한 후, washing 과정으로 70% Ethanol 1 ml을 첨가하고 12,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 분 동안 원심 분리하여, 상정액을 완전히 제거한 후, 실온에서 10 분간 자연 건조시켰다. 건조된 plasmid 에 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase 가 첨가된 TE buffer 50 μl 를 넣어주어 pellet 을 녹인 후, 사용 전까지 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

5. 염기 서열 분석

Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 분리된 plasmid 내에 insertion 된 염기서열을 밝힌 후, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 에서 blasting 하여 알려진 다른 β -lactamase gene 과 비교해 보았다.

6. *Vibrio* spp.에서의 β -lactamase gene cloning

6.1. 제한 효소의 처리

1 μ g의 DNA 를 10x restriction enzyme buffer 2 μ l와 잘 섞어준 뒤 여기에 3 차 증류수를 가하여 최종 부피가 20 μ l가 되게 하였다. 여기에 1unit 이상의 Sal I (Takara)을 가하고 잘 섞어준 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 3 시간 반응 시켰다. 동량의 Phenol/Chloroform 을 1 회 처리함으로써 반응을 정지시키고 후에 2 배 volume 의 99% ethanol 을 넣고 inverting 하여 혼합한 후, -70 $^{\circ}$ C에서 1 시간동안 침전하였다. 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 분 동안 원심 분리하여 상등액을 제거하고, 70% ethanol 로 다시 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 분간 원심 분리하는 washing 과정을 거친다. 상등액을 완전히 제거한 후, 10 분간 자연 건조시켜, 10 μ l의 distilled water 에 재현탁시켰다 (전, 2003).

6.2. DNA fragment 의 ligation

Sal I 으로 처리한 KV3 DNA fragment 를 pHSG398 vector(Takara, CM^r)에 삽입하기 위하여 Sal I 처리한 KV3 DNA fragment, 10x ligation buffer 2 μ l, Sal I 처리한 pHSG398 vector, 1 μ l의 T4 DNA ligase (Promega) 를 넣고 distilled water 를 가하여 최종 부피가 20 μ l가 되게 한 후 잘 섞어주고 12 $^{\circ}$ C에서 16 시간동안 반응 시켰다.

6.3. Transformation

Ligation mixture 20 μl 를 calcium chloride 법을 사용하여 제작한 *E. coli* DH5 α competent cell 100 μl 에 넣고 가볍게 섞어준 후에 ice 에 30 분간 방치한다. 그 다음 42 $^{\circ}\text{C}$ water bath 에 1 분간 처리해주고 ice 에 다시 3 분간 방치한다. 그리고 SOC broth 600 μl 를 가하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 30 분 진탕 배양 시킨 다음 ampicillin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 chloramphenicol (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 들어 있는 LB agar 배지에 200 μl 도말하였다. 18 시간 배양하여 transformant 를 선별하였다.

7. Conjugation

E. coli DH5 α 를 recipient 균주로 사용하였으며, 제집 균주들을 donor 균주로 사용하였다. 또한 이 실험의 결과를 확인하기 위해 *E. coli* 선택 배지인 chromocult agar (Merck)에 항생제를 첨가하여 확인 하였다 (유, 2000; 전,2004).

본 실험에서는 시험 균주들을 Tryptic Soy Broth (TSB)에 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양한 후 그 배양액을 새로운 TSB에 50 μl 접종하고 4시간 동안 진탕 배양 시켰다. 전달균주 배양액과 피전달균주 배양액을 1:10의 비율로 새로운 TSB에 혼합하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 정지 배양 시켰다. 이 배양액을 멸균된 면봉을 이용하여 ampicillin이 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 들어가 있는 chromocult agar에 도말하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 배양하여 특이적인 균집락 생성 여부를 조사하였다 (Pai et al., 1999; 이, 2003).

8. 이중디스크 확산법 (Double disk synergy test)

시험 균주를 TSB에 접종하여 27 °C에서 18시간 배양한 후 10^7 cells/ml로 현탁해서 미리 멸균된 변방을 이용하여 Muller-Hinton Agar (MH, Difco) 에 고르게 도말하였다. 이 평판의 중앙에 amoxycillin/clavulanate (20/10 µg, Oxoid) disk를 놓고 디스크의 가장자리 사이의 간격이 10mm가 되도록 cefotaxime (30 µg, Oxoid), ceftazidime (30 µg, Oxoid), ceftriaxone (30 µg, Oxoid) disk를 놓고 다시 똑 같은 과정으로 20mm가 되도록 각각의 disk를 놓았다. 27 °C에서 18시간 배양한 후에 두 disk 사이에서 나타나는 억제대의 양상을 가지고 상승효과를 판정하였다 (이, 2003).

9. VAK-1 β-lactamase gene의 Isoelectric focusing (IEF)와 SDS-PAGE

시험 균주를 20ml의 TSB에 접종하여 각각의 적온에서 18시간 진탕 배양하였다. 이를 12,000 rpm, 10분 동안 원심 분리하여 균체를 얻고 다시 PBS (Phosphate Buffered Saline) 에 3회 세척한 후, 다시 12,000 rpm, 10분 동안 원심 분리하여 그 침사를 3차 증류수 750µl에 재부유하였다. 재부유물이 담긴 시험관을 얼음에 꽂은 채 초음파 파쇄기 (Ultrasonic homogenizer 4710, Cole-Palmer Instrument) 를 이용하여 1분간 2회 분쇄 하였다. 이를 12,000 rpm, 4 °C에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 시험관에 옮긴 후 시험 전까지 -70 °C에 보관하였다 (이, 2003).

분자량을 알기 위해서 Bollag and Edelstein 의 방법을 인용하여 SDS-PAGE를 실시 하였다. IEF는 native isoelectric focusing gel 을 제조하여 실시하였다. H₂O 4.85 ml, solution A 1 ml, pH 3.5-10 ampholyte solution(Bio-Rad) 24µl, , pH 4-6 ampholyte solution(Bio-Rad) 120µl, 10% ammonium persulfate 25µl,

TEMED(Sigma) 10 μ l를 잘 혼합하여 제조하였으며 solution A는 acrylamide 24.5g과 bis 0.75 g을 혼합하여 증류수 100ml에 녹인 후 0.45 μ m filter를 이용하여 여과시킨 후 갈색병에 넣어 4 °C에서 보관하여 사용하였다. 제조한 gel을 casting tray에 넣고 평광등 아래에서 2시간 동안 중합 시킨다.

IEF는 Mini IEF cell system (Bio-Rad)을 이용하여 실시하였다. 먼저 lower chamber에 lower buffer (H₃PO₄ 1.36ml, H₂O 2l)를 적당량 채우고 gel을 고정한 upper chamber를 넣어준다. 후에 upper buffer (100mM NaOH) 를 적당량 채워준다. sample template 20 μ l를 넣고 isoelectric focusing chamber의 흑연전극을 습윤한 상태로 유지시키고 유리판의 gel 부분이 흑연전극에 닿도록 하여 200 V에서 3시간 전기 영동 하였다.

전기 영동이 끝난 glass plate로부터 gel을 분리하여 nitrocefin (Oxoid) 용액에 적신 이파지 (Whatman No. 54 paper)를 gel 위에 덮어서 특이적으로 나타나는 band를 확인 하였다. pI 판독을 위해서 PBR322, SHV-2a, PSE-1, CTX-M-14를 사용하였다.

10. VAK-1 β -lactamase gene의 *Vibrio* spp. 에서의 분포

VAK-1 β -lactamase 단백 detection하기 위하여 *Vibrio* spp. 에서 확인된 여러 β -lactamase와 VAK-1 β -lactamase nucleic sequence를 sequence 비교 program인 Bioedit (Version 5.0.9., Department of Microbiology North Carolina State University) 를 이용하여 비교한 후 VAK-1 β -lactamase 의 특징적인 부분을 선택하여 primer를 제작하였다 (Table 5, Fig. 5).

Table 5. Primers and expected sizes of PCR amplicons for VAK-1 gene

Primer	β -lactamase	Oligonucleic sequence (5'-3')	Expected sizes(bp)
KV F	VAK-1	GTCGTCACACACGGTTGCAG	567
KV R	β -lactamase	CAAGTCAGCAGAGTCTG	

III. 결 과

1. *Edwardsiella tarda*

1.1. 내성 균주의 분리

1993년부터 2003년까지 동해안, 남해안, 제주 등지에 위치한 양어장의 병어에서 115개의 *Edwardsiella tarda*를 분리 하였고 이 중 12개의 균주가 ampicillin에 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC 값을 나타내었다. NCCLS (1993)의 장내 세균 내성 기준에 따라 ampicillin에 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC 값을 가지는 것을 내성균으로 결정했다. 본 실험에서 *Edwardsiella tarda*의 ampicillin에 대한 내성은 10%로 β -lactams 계열 약물에 대해서 내성율이 매우 낮았다 (Fig. 1). 또한 JDE41, JDE46, CJE10, CJE14 균주를 제외한 8개 균주는 transformation에 의해서 ampicillin 내성이 *E. coli* DH5 α 로 옮기었다 (Table. 6, 7). *Edwardsiella tarda*의 β -lactams계열 MIC에서 penicillin 계열은 높은 MIC 값을 나타내었고 또한 amoxycillin/clavulanic acid에서도 256-512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 높은 MIC 값을 나타내는데 β -lactamase inhibitor에 내성을 나타내는 기전에는 Inhibitor resistant TEM(IRT), ampC gene과 TEM-1 gene의 hyperproduction 3가지가 있다. 3세대 cephalosporin 계열에서는 낮은 MIC 값을 나타내고 있지만 cephamycin의 일종인 cefoxitin에는 50% 가 내성을 나타내고 있었다. Cefoxitin에서의 내성은 ampC gene에 의해서 일어난다고 알려져 있다 (Lee et al., 2003). 따라서 이번에 분리한 ampicillin 내성 *E. tarda*에서의 cefoxitin 내성은 *E. tarda*에서의 ampC gene의 존재를 간접적으로 확인할 수 있게 한다. 또한 여

이 계열의 항균제에 내성을 가지고 있지만 transformant에서는 RE17, JDE17, JDE18을 제외한 전체 균주에서 ampicillin 내성 gene만이 단독으로 남아있을 것을 확인할 수 있다 (Table. 6, 7). 전 (2003)의 연구에서 ampicillin과 tetracycline에 내성을 나타내는 균주에서 tetracycline 내성 유전자의 transformation 실험을 실시하였다. 선택 항생제로 tetracycline을 사용하였을 때 donor cell에서 tetracycline에는 내성을 보였지만 ampicillin에는 내성을 나타내지 않았다. 따라서 ampicillin 내성 유전자는 *tet* gene이 존재하는 plasmid와 다른 plasmid에 존재하는 것 같다.

*Edwardsiella tarda*는 benzylpenicillin에 선천적으로 내성을 나타낸다고 알려져 있다 (Stock and Wiedemann, 2001) NCCLS(2000)는 *E. tarda*의 penicillin 내성 기준을 $0.25\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 이상이라고 보고하였다. Ampicillin에 감수성이 있는 *E. tarda*에서 penicillin에 대한 MIC 실험 결과 $16\text{--}256\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 의 높은 MIC 값을 나타내고 있었다 (data not shown).

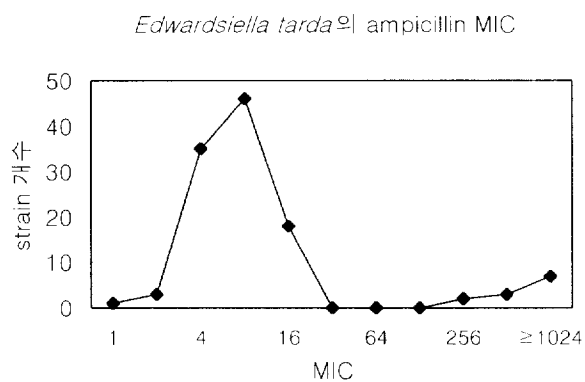


Fig. 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of ampicillin for *Edwardsiella tarda* isolates from Korea.(n=115)

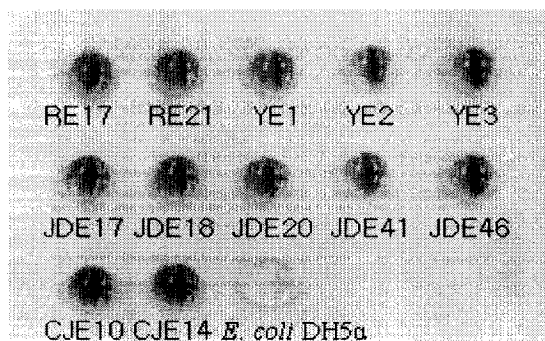


Fig. 2. Nitrocefin test

Nitrocefin is chromogenic cepharosporin that changed from yellow to red on hydrolysis.

Table 6. MIC of ampicillin resistant *Edwardsiella tarda* and transformants to β -lactam antibiotics.

	P	AMP	PIP	AMC	CPL	CFA	CFR	CFM	CAZ	FOX	CFD	CFX
RE17	512	1024	2048	512	16	2	8	2	4	16	16	1
transformant	8	1024	32	256	32	≤ 0.06	8	4	8	1	32	0.25
RE21	64	512	512	512	16	4	8	2	4	1	16	1
transformant	8	1024	32	256	32	≤ 0.06	16	4	8	1	32	0.25
JDE17	512	2048	2048	512	16	2	8	2	4	1	16	2
transformant	8	1024	32	256	32	≤ 0.06	8	4	8	1	32	0.25
JDE18	256	2048	2048	512	16	0.5	8	2	4	1	128	1
transformant	8	1024	32	512	32	≤ 0.06	4	4	8	1	32	0.25
JDE20	512	1024	1024	512	16	1	8	2	4	64	16	0.5
transformant	8	1024	32	256	32	≤ 0.06	4	4	8	1	32	0.25
YE1	512	2048	2048	512	16	1	8	16	4	32	16	2
transformant	8	2048	512	512	32	≤ 0.06	8	8	8	1	32	0.25
YE2	1024	2048	2048	512	16	2	8	16	4	32	16	2
transformant	8	2048	128	256	32	≤ 0.06	8	4	8	1	32	0.25
YE3	512	2048	2048	512	16	2	8	4	4	1	16	2
transformant	8	1024	32	256	32	≤ 0.06	4	4	8	1	32	0.5
CJE10	8	256	64	512	128	0.25	8	2	4	32	16	0.5
CJE14	256	512	512	512	64	2	8	2	4	64	16	2
JDE41	128	256	512	512	16	1	8	2	4	32	16	1
JDE46	512	512	512	512	16	1	8	4	4	1	16	1
E. coli DH5a	≤ 4	≤ 8	≤ 8	< 4	16	≤ 0.06	8	≤ 1	1	4	16	≤ 0.03

Table 7. Antimicrobial susceptibility of *E.tarda* isolates and transformants

Strains	Antibiotics				
	TC	AN	Gm	CM	SXT
RE17	S	R	I	S	R
RE17 transformant	S	S	S	S	R
RE21	S	S	S	S	R
RE21 transformant	S	S	S	S	S
JDE17	R	I	I	R	R
JDE17 transformant	S	S	S	S	R
JDE18	R	S	S	R	R
JDE18 transformant	S	S	S	S	R
JDE20	S	I	I	R	R
JDE20 transformant	S	S	S	S	S
YE1	S	S	S	I	R
YE1 transformant	S	S	S	S	S
YE2	S	I	S	S	R
YE2 transformant	S	S	S	S	S
YE3	S	S	I	R	R
YE3 transformant	S	S	S	S	S

S: susceptible I: intermediate R: resistant

TC: tetracycline AN: amikacin Gm: gentamicin CM: chloramphenicol SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole

1.2. *Edwardsiella tarda*의 β -lactamase 확인

*Edwardsiella tarda*의 β -lactamase 생성을 알아보기 위하여 nitrocefin test를 실시하였다. Ampicillin에 내성을 보이는 모든 *Edwardsiella tarda*는 nitrocefin test에서 positive 결과가 나왔고 따라서 β -lactamase 생성이 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2). 이전까지 *Edwardsiella tarda*의 β -lactamase에 대한 연구는 체계적으로 되어있지 않았으며 단지 β -lactamase가 있을 것이라 여겨지고 있었다 (Clark et al., 1991).

따라서 어떤 유형의 β -lactamase가 *Edwardsiella tarda*에 존재하는지를 알아보기 위하여 그람 음성 세균에서 자주 확인되는 *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} gene을 특이 primer를 사용하여 PCR 방법으로 확인 해 보았다. 그 결과 12개 실험 균주 중 10개에서 TEM 유형의 특이적인 PCR 산물을 얻었다 (Fig. 3). TEM 유형의 PCR 산물에 대한 sequencing 결과 TEM-1a와 TEM-1b가 각각 확인 되었다 (Table 8). 또한 각각의 transformant에서도 같은 β -lactamase가 확인 되었다 (data not shown). TEM gene의 promoter에는 *P3*, *Pa/Pb*, *P4*, *P5* 등 4가지 형태가 있다고 알려져 있다 (Lartigue et al., 2002). 이들 promoter는 promoter 부위의 nucleotide가 한 개 내지 두개가 변화 하여 생긴 것으로 *P3*가 가장 약하고 *P5*가 가장 강력한 promoter로 알려져 있다. 본 실험에서는 모두 *P3*의 약한 형태가 나왔다. 모든 *Edwardsiella tarda*에서 SHV와 OXA gene은 확인 하지 못하였고 (Fig. 3), 또한 2개의 균에서는 확인한 모든

β -lactamase 대한 특이적인 PCR 산물이 없었다 (Table 8, Fig. 3).

아무런 β -lactamase gene이 나오지 않은 2개의 ampicillin 내성 균주는 cefoxitin에도 내성을 나타내므로 AmpC gene에 의해서 ampicillin에 내성을 나타낸다고 여겨진다.

Table 8. *Edwardsiella tarda* β -lactamase promoter

Strain	β -lactamase	Promoter
<i>E. tarda</i> RE17	TEM-1b	<i>P3</i>
<i>E. tarda</i> RE21	TEM-1b	<i>P3</i>
<i>E. tarda</i> YE1	TEM-1b	<i>P3</i>
<i>E. tarda</i> YE2	TEM-1b	<i>P3</i>
<i>E. tarda</i> YE3	TEM-1b	<i>P3</i>
<i>E. tarda</i> JDE17	TEM-1b	<i>P3</i>
<i>E. tarda</i> JDE18	TEM-1b	<i>P3</i>
<i>E. tarda</i> JDE20	TEM-1b	<i>P3</i>
<i>E. tarda</i> JDE41	TEM-1a	<i>P3</i>
<i>E. tarda</i> JDE46	TEM-1a	<i>P3</i>
<i>E. tarda</i> CJE10	ND ^a	–
<i>E. tarda</i> CJE14	ND	–

^a: not determined

No reaction result was PCR amplification for TEM, SHV, OXA β -lactamase gene to CJE10, CJE14.

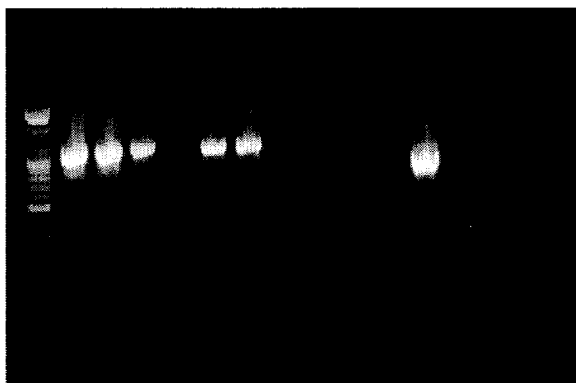


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of products obtained by PCR with the primers for TEM, SHIV and OXA genes. Lanes: M, molecular mass marker(Bioneer) ; 1, RE17 ; 2, YE1 ; 3, JDE17 ; 4, CJE10 ; 5, RE17 transformant ; 6, YE1 transformant; 7, Empty ; 8, RE21 ; 9, CJE14 ; 10, YE1 ; 11, *E. coli* SHIV2a , positive control ; 12, Empty ; 13, RE17 ; 14, RE21 ; 15, JDE17

2. 연쇄상 구균

2.1. 연쇄상 구균에서의 β -lactam 계열 항균제의 MIC와 다른 계열의 약제 감수성 실험

제주도 뱃치에서 분리한 30개의 연쇄상구균에서 β -lactam 계열 항균제에 대한 MIC 값을 알아보고 여러 계열의 항균제에 대한 약제 감수성을 알아 보았다. Fig. 4의 분포도를 기초로 하여 *Streptococcus* sp. 의 ampicillin 에 대한 내성 기준을 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC값이라 정의 하였을 때 내성율이 40%가 나왔다 (Table 9, Fig. 4).

다른 계열의 항균제에 있어서 oxolinic acid, erythromycin, oxytetracycline 각각의 항생제 있어서 69%, 31%, 52%의 내성 비율을 나타내고 있으며 aminoglycoside계열인 gentamicin과 streptomycin에 있어서 93%의 매우 높은 내성을 나타내고 있다. Ciprofloxacin과 chloramphenicol에서는 약제 감수성이 매우 높은 것으로 나타났다 (Table 10).

Table 9. MIC of *Streptococcus* sp. to β -lactam antibiotics

Strains	β -lactams ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	P	AMP	AMO	AMC	CPL	CFR
CJS1	0.5	0.5	0.5	0.5	8	0.25
CJS2	0.5	0.5	0.5	0.5	8	0.25
CJS3	2	1	1	1	16	16
CJS4	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.125
CJS5	0.125	0.25	0.25	0.25	16	4
CJS6	0.25	0.25	0.25	0.25	16	4
CJS8	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.5	≤ 0.06
CJS9	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.5	≤ 0.06
CJS10	4	2	2	2	2	2
CJS12	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.5	≤ 0.06
CJS13	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.5	≤ 0.06
CJS14	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06
CJV23	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06
CJS30	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.5	≤ 0.06
CJS31	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	4	16
CJS32	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.5	≤ 0.06

Table 9. continue

Strains	β -lactams ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	P	AMP	AMO	AMC	CPL	CFR
CJS33	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.5	≤ 0.06
CJS34	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.25	≤ 0.06
CJS35	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.25	≤ 0.06
CJS36	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.25	≤ 0.06
CJS37	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.5	≤ 0.06
CJS38	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.25	≤ 0.06
CJS39	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	1	≤ 0.06
CJS40	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.5	≤ 0.06
CJS41	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.5	≤ 0.06
CJS42	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.25
CJS43	0.5	0.5	0.5	0.5	4	0.25
CJS44	0.25	0.25	0.25	0.25	1	0.25
CJS45	0.5	1	1	0.5	8	0.5
CJS46	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	0.5	≤ 0.06

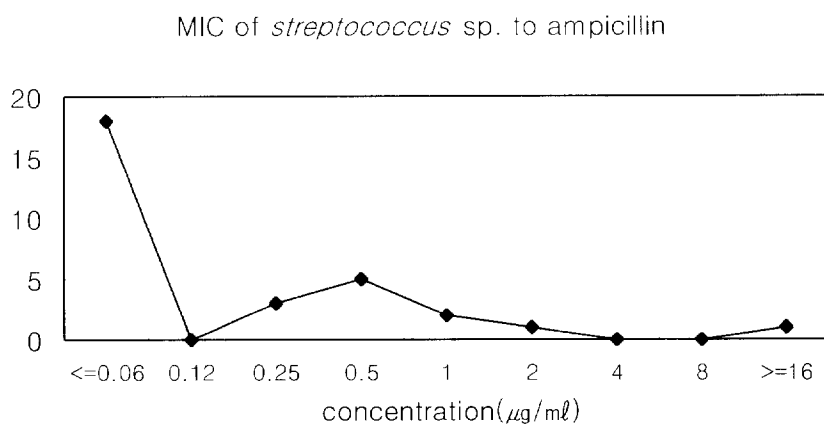


Fig. 4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *Streptococcus* sp. isolates from Jeju (n=30).

Table. 10. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* sp.

	Tc	S	CIP	OA	E	C	GM
S	12	0	30	9	18	26	1
I	3	2	0	0	3	1	1
R	15	28	0	21	9	3	28
Rate of resistance	50%	93%	0%	70%	30%	10%	93%

S: susceptible I: intermediate R: resistant

TC: tetracycline S: streptomycin CIP: ciprofloxacin OA: oxolinic acid

E: erythromycin CM: chloramphenicol GM: gentamicin

2. 2. 연쇄상구균에서의 β -lactamase production 확인

연쇄상구균에서의 β -lactamase gene 생성을 확인하기 위하여 ampicillin에 내성을 나타내는 균주들에 대해서 nitrocefin test를 실시하였다. 하지만 실험에 사용한 모든 균주에서 negative 결과를 보였다 (data not shown).

또한 연쇄상구균에서 알려진 β -lactamase 인 PC1, TEM gene을 확인하기 위하여 각각의 gene에 특이적인 primer를 제작하여 ampicillin에 내성을 나타내는 연쇄상구균에 대해서 PCR을 실시하였지만 특이적인 PCR 산물을 얻을 수 없었다 (data not shown).

Table 9의 β -lactam 계열 MIC 실험에서 β -lactamase inhibitor인 clavulanic acid를 넣어 준 것과 amoxycillin 사이의 MIC 값의 차이가 없고 nitrocefin test에서의 negative 반응 그리고 PCR 결과로 유추하여 볼 때 이번에 분리한 연쇄상구균에서는 β -lactamase gene의 생성보다는 PBP의 변성에 의해서 ampicillin 내성을 나타내는 것 같다. 앞으로 연쇄상구균에서 PBP 변성에 의한 ampicillin 내성에 대한 연구가 더 필요하다.

3. *Vibrio* spp.

3.1. *Vibrio* spp.에서의 β -lactam 계열 항생제 내성

동해안, 남해안의 여러 양식 어장의 어류와 해수에서 120개의 *Vibrio* spp. 를 분리하였고 일본에서 수입한 참돔, 중국에서 수입한 농어에서 각각 30개와 50개의 *Vibrio* spp.를 분리하였다. 이 중 무작위적으로 61개를 선정해 β -lactam 계열 항생제에 대한 MIC를 측정 하였다. NCCLS의 *Vibrio* spp. ampicillin 내성 기준인 $32\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 적용하여 본 ampicillin에 대한 MIC 실험 결과 *Vibrio* spp.의 80%가 내성을 나타내고 있었다 (Table 11). 이전에 보고된 *Vibrio* spp. 에서의 ampicillin 내성 비율은 30-98%라고 알려져 있다 (Ottaviani et al., 2001; Molina-Aja et al., 2002). 본 연구에서도 ampicillin에 높은 내성 비율 나타냈다. 3세대 cephalosporins인 cefotaxime과 ceftriaxone에 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC 값을 보이는 6 균주가 있었는데 특히 그 중 1균주는 clavulanic acid에 억제되면서 cephalosporins에 내성을 나타내어 ESBL이 의심되었다. 하지만 이중 디스크 확산법 (Double disk synergy test)에서 특이적인 synerism 이 나타나지 않았다 (data not shown). 따라서 *Vibrio* spp. 에서의 ESBL 은 확인하지 못하였다.

Table 11. MIC of *Vibrio* spp. to β -lactam antibiotics

$\frac{\mu\text{g}}{\text{mℓ}}$	β -lactams									
	AMP	AMC	CPL	CFR	CFM	CFD	FOX	CAZ	CFX	CFA
0.03									11	1
0.06									2	24
0.12									4	9
0.25								1	9	4
0.5								6	12	6
1			3	5	13	3	1	5	2	4
2				6	4	1	1	3	8	5
4		15		1	9	10	5	3	5	0
8	5	7	5	8	18	7	4	5	8	2
16		9	4	2	2	1	5	37		6
32	2	4	6	11	1	7	4			
64	3	6	6	15	3	11	25			
128	8	5	18	2	11	6	11			
256	8	1	19	11		15	5			
512	10	3								
1024	12	11								
2048	13									

3.2. *Vibrio* spp.에서의 β -lactamase gene detection

Nitrocefin test에 있어서 40% 정도가 positive 반응을 나타내었다 (data not shown). 하지만 이들 균주들에서 그림 음성 균에 존재하거나 NCVs에 존재한다고 알려진 β -lactamase를 확인하기 위해서 특이적인 primer를 제작하여 PCR을 해 본 결과 특이적인 PCR 산물을 얻지 못하였다. 따라서 *Vibrio* spp.에서는 지금까지 알려지지 않은 β -lactamase gene이 존재할 가능성이 매우 크므로 어떤 β -lactamase gene을 가지고 있는지 알아보기 위하여 *Vibrio* spp.의 total DNA를 제한 효소 처리하여 β -lactamase gene을 cloning 하였다. 그 결과 *Vibrio alginolyticus* KV3 균주에서 지금까지 보고된 적이 없는 β -lactamase를 cloning 했다 (Fig. 5). 이 β -lactamase gene은 class A β -lactamase의 특징인 여러 motif를 가지고 있다. 이들 motif에는 먼저 amino acid 시열 62번째에서 66번째에 위치한 Ser - X - X - Lys 가 있는데 이것은 PB(Penicillin Binding Protein)와 serine β -lactamase의 중요한 특징으로 알려져 있다 (Jois, et al. 1991). 다음으로 122-124번째에 위치한 SDN loop와 158번째에 위치한 Glu 또한 class A β -lactamase의 중요한 특징이다 (Jois, et al. 1991). Promoter 부위의 -10, -35 promoter는 각각 TATAAT, CTCAGA로 나왔다 (Fig. 6). 이번에 밝혀낸 β -lactamase는 지금까지 알려진 *Vibrio* spp.의 β -lactamase와는

amino acid sequence 상으로 상당히 다른 형태를 나타냄을 알 수 있었으며 NCVs 의 β -lactamase와 밀접한 관계임을 알 수 있었다 (Table 14, Fig. 7, 8, 9). 또한 Bush (1995)의 분류법을 적용하여 보았을 때 VAK-1 β -lactamase gene은 clavulanic acid에 억제되지 않으므로 group1에 속하였다 (Table 14).

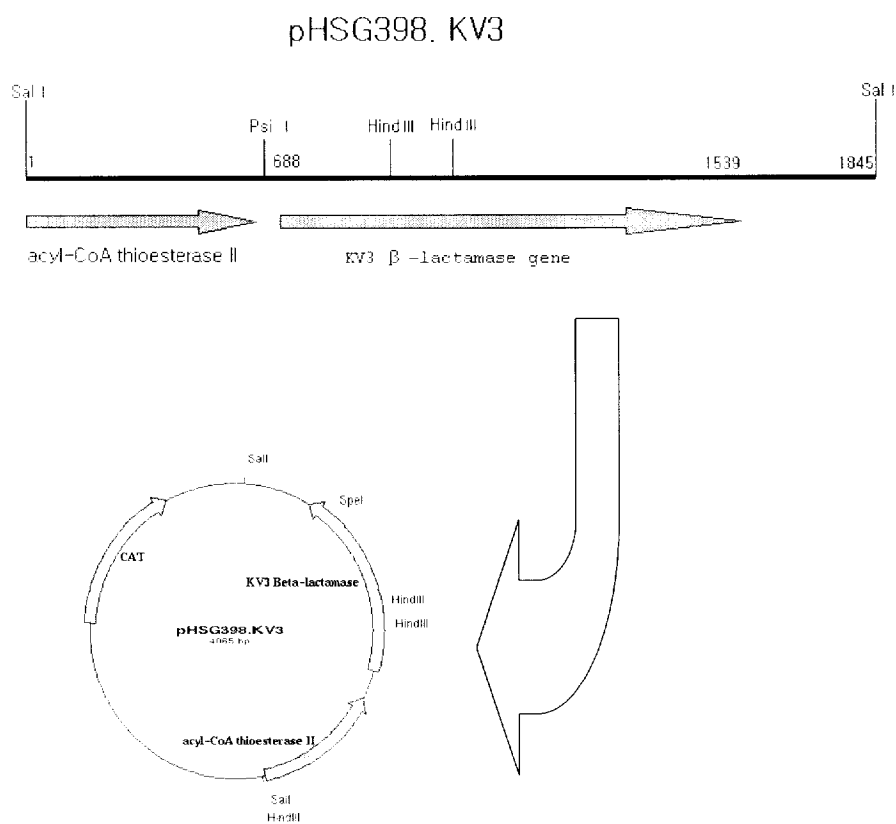


Fig 5. Construction of pHSG398.KV3

An ORF(open reading frame) of 861 bp encoding a deduced protein of 257 amino acids was revealed for the bla gene of strain KV3.

```

acyl-CoA thioesterase II  →
1   GTC GAC CGA TTT TTT ATC TCA CCG CTT CTT ACC ATG GTG AGG CCC  45
46  CAG GTT TTG AGC ATC AAA ACG CCA TGC CAG ACA TTC CAG GCC CTG  90
91  AGA ATT ACG CTT CTG AAT CAG AGC TTG CTG AAC AGA TAG CAG ACT  135
136 TTT TAC CAG AGG AAA TCA AAG TGG CAT TTT GTG GTG AGA AAC CCA  180
181 TTG AAA CTC GCC CTG TAA CAG TGG TAA ACC CAC TAA AAC CCC ACA  225
226 AAG AAG AAG CAA AGC AAT ATC TGT GGA TTA AGG CCA ACG GAG CCA  270
271 TGC CGG ACA ACC AAC TCA TTC ATC AAT ATC TTC TCG GCT ACG CTT  315
316 CAG ACT GGG GTT TTC TGG TCA CCG CAT TGC ATC CAC ATG GCG TAT  360
361 CAC TGA TGA CGC CTA ATT TCC AAG TCG CCA CCA TCG ACC ATT CAA  405
406 TAT GGT TCC ATC GAC CTT TTA AGA TGG ATG AGT GGT TGC TCT ACG  450
451 TGA TTG AAA GCC CGA CGG CCA GTA ACA CGC GTG GCT TAG TAC GTG  495
496 GTG AGA TCT ATA ACC GTC AGG GTC ATC TGG TGG CTT CTG CCG TTC  540

acyl-CoA thioesterase II stop codon
541 AGG AAG GTG TGA TGC GGT TTA CCA AAT AAC CGT TCC CAA AAA AGA  585
586 GAC CGA ATG TCA GAA TTA TGT ATA CTC TAA ACC CAT CGG GTT TAC  630

-35                                     -10
631 TCA GGA CAT GAC CTC AGA TTA GGA TGC AAA GCC ACG TAT AAT ATT  675

VAK-1 β-lactamase gene  →
676 TGG CTT ATC TTA ATG AAA AAT ATA CTT ATA ACT CTG ACC TGT CTC  720

1           M   K   N   I   L   I   T   L   T   C   L   11

```

Fig 6. Nucleotide sequence of the β -lactamase and related genes from *V. alginolyticus*. Possible promoter sequences (-35, -10) can be found upstream of the start codon. Arrows indicate the direction of DNA sequencing. The β -lactamase active site (STFK), typical class A motif (SDN, E), and conserved triad (RTG) are boxed. Ω mark is terminal hairpin following the stop codon. The primers used to detect the gene are underline.

KV Foward primer

```

721  TTT TTG TCG TCA CAC ACG GTT GCA GAC ACA CTC ACA CAA CAA GTC 765
12   F   L   S   S   H   T   V   A   D   T   L   T   Q   Q   V   26
766  GCT CAG TTA GAG AGT CAA TCT GGT GGT CGT CTC GGT GTC GCC GTT 810
27   A   Q   L   E   S   Q   S   G   G   R   L   G   V   A   V   41
811  TTG GAT ACC CAA AAT AAT CAT CAG TGG CAA TAT CGT GGC GAT GAG 855
42   L   D   T   Q   N   N   H   Q   W   Q   Y   R   G   D   E   56
856  CGC TTC CCT ATG ATG AGT ACC TTT AAA GCA CTG ATG TGT GCC AGC 900
57   R   F   P   M   M   S   T   F   K   A   L   M   C   A   S   71
901  GCA CTC GAC CTT GCT GAC CAA AAC AAG CTT AGC TTA AAC GAC ACG 945
72   A   L   D   L   A   D   Q   N   K   L   S   L   N   D   T   86
946  ACC ACG ATT AAA GAA AGC GAT CTG GTG ACT TGG TCT CCG GTT ACT 990
87   T   T   I   K   E   S   D   L   V   T   W   S   P   V   T   101
991  GAA AAA TTG ATT GGT CAA GAC ATG ACA ACT CAA CAA GCT TGC GAA 1035
102  E   K   L   I   G   Q   D   M   T   I   Q   Q   A   C   E   116
1036 GCG ACG ATG CTG ATG AGC GAT AAC ACG GCG GCC AAT ATC GTA TTG 1080
117  A   T   M   L   M   S   D   N   T   A   A   N   I   V   L   131
1081 CAT CAA ATT GGC GGC CCG CAG CAA GTG ACA CAA TTT GTC CGA ACT 1125
132  H   Q   I   G   G   P   Q   Q   V   T   Q   F   V   R   T   146
1126 CTC GAT GAT AAA GTC ACT CGC CTT GAC CGC TAT GAA CCG GAA CTG 1170
147  L   D   D   K   V   T   R   L   D   R   Y   E   P   E   L   161
1171 AAT CAA GCC ACT CCA GGT GAT AAA CGC GAT ACC ACC TCT CCT CAT 1215
162  N   Q   A   T   P   G   D   K   R   D   T   T   S   P   H   176
1216 GCG ATG GTC ACG TCT CTC AAC ACC ATT TTG CTT CAA GAC GGG TTG 1260
177  A   M   V   T   S   I   N   T   I   L   L   Q   D   G   L   191

```

« KV Revers primer

```

1261 AGC GAA AAA AAC CAA CAG ACT CTG CTG ACT TGG ATG AAA AAC AAT 1305
192  S   E   K   N   Q   Q   T   L   L   T   W   M   K   N   N   206

```

Fig. 6. continue

1306 AAA ATT TCA GAT TCT CTG ATC CGC TCT ATT TTA CCC CAA GGT TGG 1350
207 K I S D S L I R S I L P Q G W 221
1351 TCC ATT GCT GAT CGC ACC GGC GCT GGT GAG CAA GGT TCA AGA GCG 1395
222 S I A D **R T G** A G E Q G S R A 236
1396 ATC AAC GCA CTA GTA TGG AAC GAG CAA CAT AAA CCG ATC ATT ATC 1440
237 I N A L V W N E Q H K P I I I 251
1441 AGT CTT TAT TTG ACC CAC ACA GAG CTT GAT ATA GCG CAG CGC AAT 1485
252 S L Y L T H T E L D I A Q R N 266
1486 CAA ACG CTC AAC CAA GTA GCA AAA CTG GTA CTT GAA CAT TTT TCA 1530
267 Q T L N Q V A K L V L E H F S 281

1531 GTG GAG **TAG** AAA CGA **CAA AGA AGC CAT** CGC **TGG CTT CTT TGC** GTG 1575
282 V E * 285
1576 TCC AAT GCA TGA TCA ATG TGA ATG CCC ATG TGA ACG CTC GGC ACT 1620
1621 GTA GCC GCT GAA ACT CGA ATC TAC GGT GCC TTT AAA ACA GTT GAG 1665
1666 AAC CCA AGG AAA AGA GTC AGT GAT ATA GTA AGC ATA CTG GCC ATT 1710
1711 TAC TGT CAT ACC ATT GCA TTC ATC GAG ATC CCC TAA GCC AAC TGT 1755
1756 GTA TTC CCA ATC CCC ACG GAA CTG TCC ATC GTA GTT GCT ACT GAC 1800
1801 GAC ATT ACC TCC CAC AAC AGG AGC GGT ATA GCT GCC TTC GTC GAC 1845

Fig. 6. continue

Table 12. Amino acid identity of VAK-1 β -lactamase with several related class A β -lactamase

	V. fischeri	VHW	VHH	RIMD	AER-1	CARB-2	CARB-5	PSE-1	TEM-1	SHV-1	CTX-M-1
VHW	51										
VHH	53	90									
RIMD	54	79	80								
AER-1	37	39	40	40							
CARB-2	52	46	47	48	41						
CARB-5	43	42	42	44	43	45					
PSE-1	49	44	44	45	42	95	43				
TEM-1	39	34	36	39	40	39	44	37			
SHV-1	37	37	38	40	40	42	43	40	40		
CTX-M-1	30	29	30	30	33	32	35	31	33	34	
<u>VAK-1</u>	52	50	53	52	38	46	43	43	38	40	36

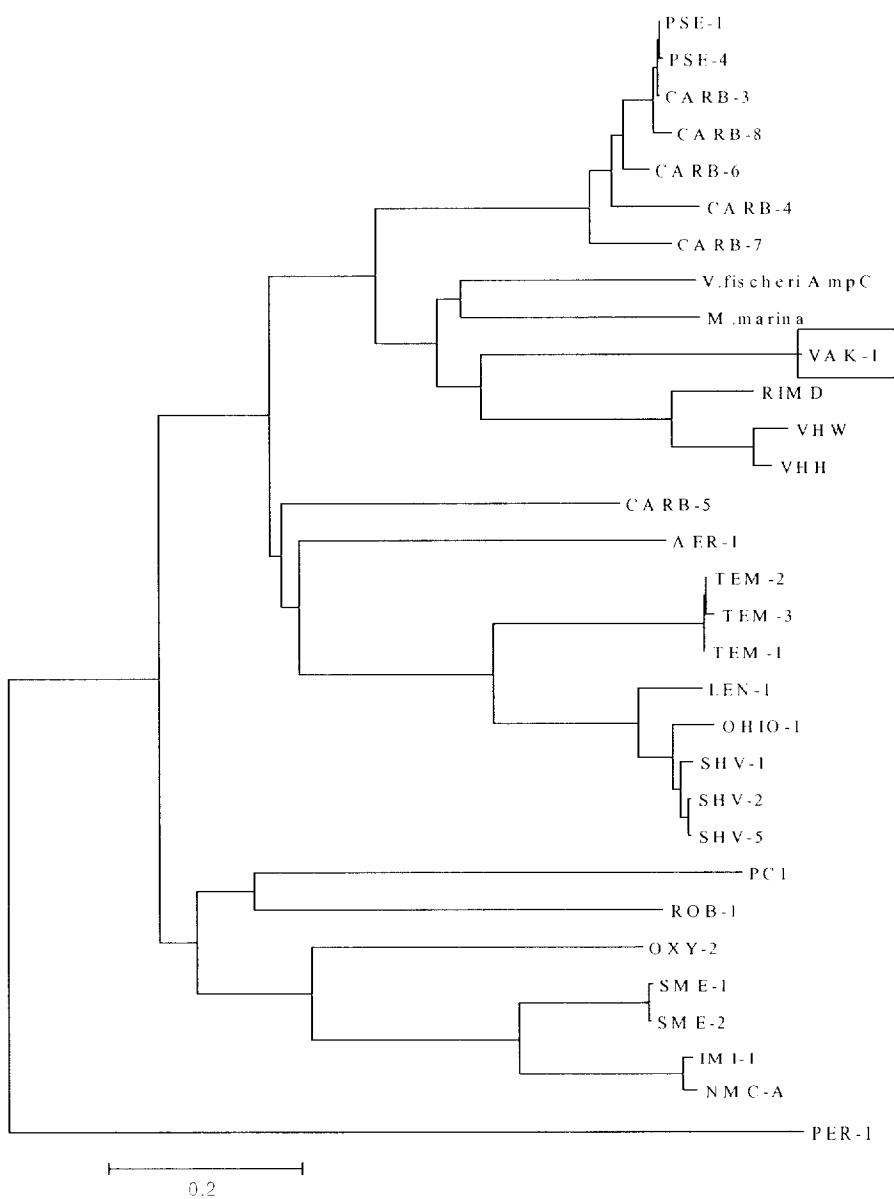


Fig 7. Dendrogram of 30 class A β-lactamases, according to the neighbor-joining method.

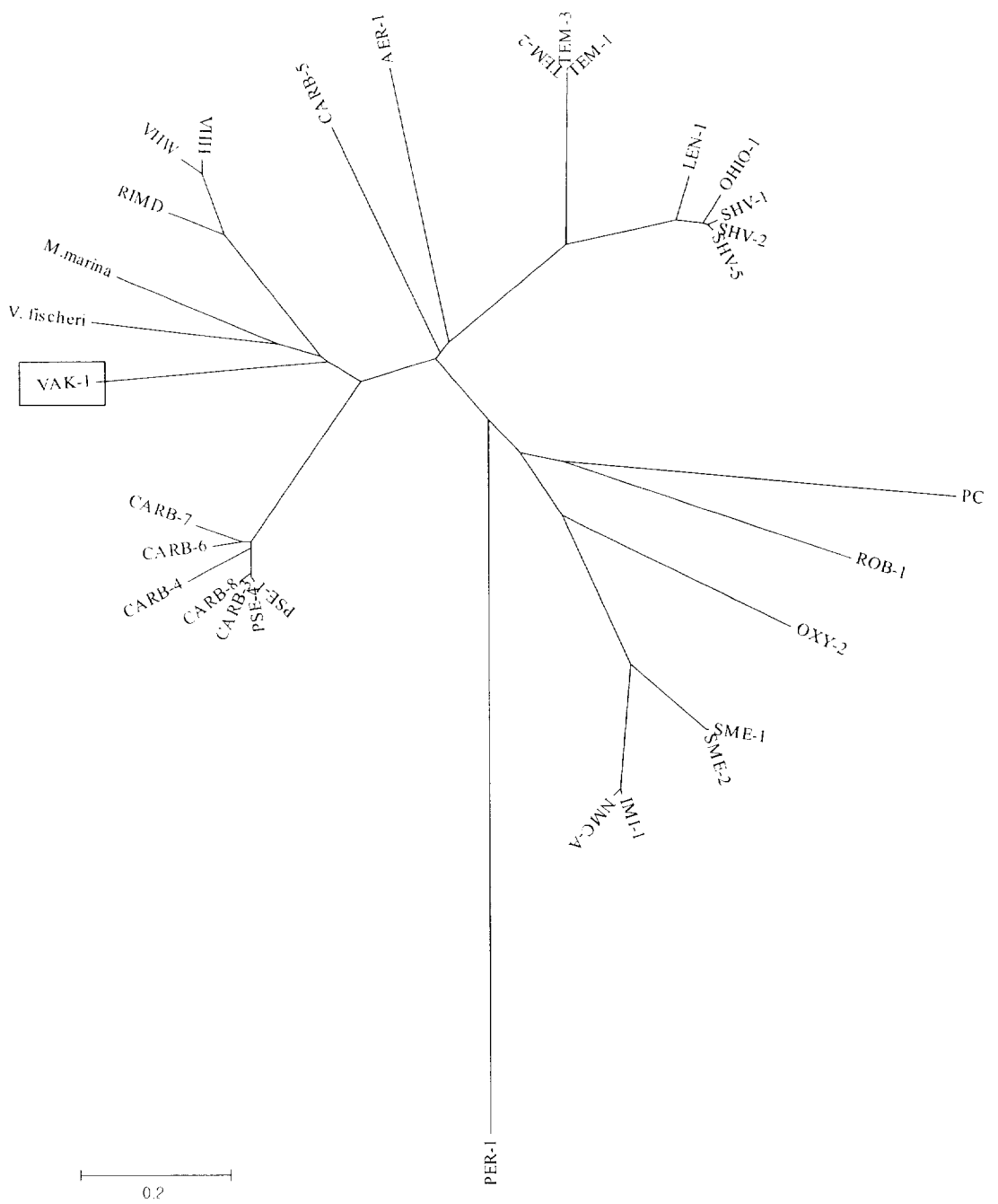


Fig. 8. Evolutionary representation of unrooted phylogenetic tree.

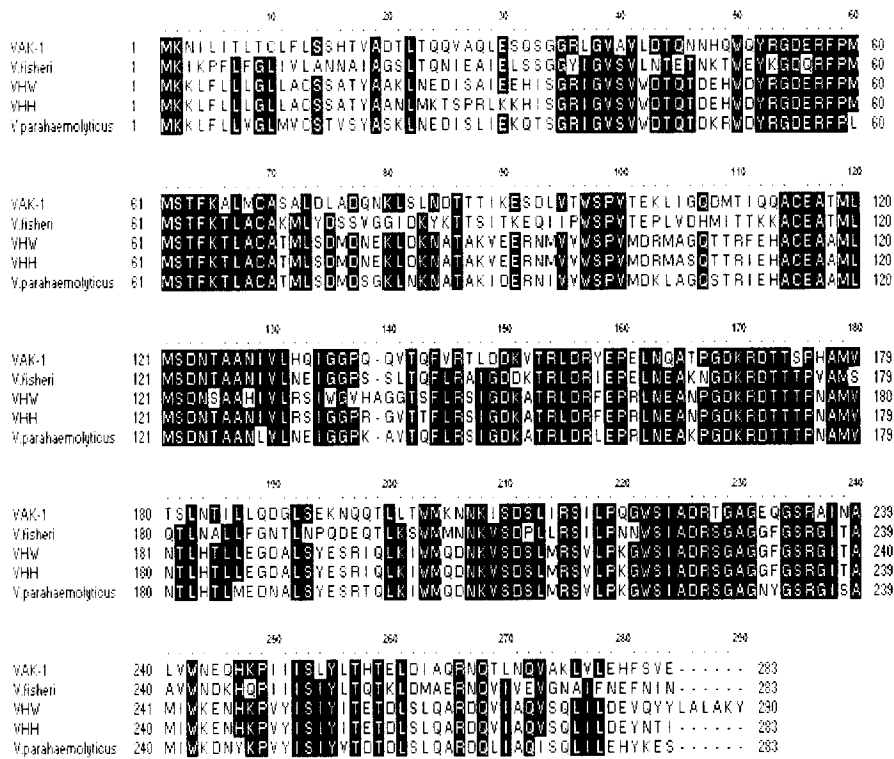


Fig. 9. Alignment and comparison of the β -lactamases family proteins from *V. alginolyticus* KV3 and various NCV β -lactamases.

3.3. VAK-1 β -lactamase gene의 distribution.

VAK-1 β -lactamase gene이 한국의 여러 지역의 해수와 어류에서 분리한 *Vibrio* spp. 일본과 중국에서 각각 수입한 참돔, 농어에서 분리한 *Vibrio* spp.에 얼마나 분포하는지를 알아보기 위하여 VAK-1 β -lactamase gene을 특이적으로 검출하는 primer를 제작하여 PCR 방법으로 알아보았다. 한국, 일본, 중국에서 각각 100개, 30개, 50개의 *Vibrio* spp.를 분리하였고 이를 실험에 사용하였다. 그 결과 넙치에서 분리한 3개의 *Vibrio* spp.에서 특이적인 PCR 산물을 얻을 수 있었다 (Fig. 9.). 또한 이들의 β -lactam 항균제에 대한 MIC 값을 비교해 본 결과 penicillin 계열에만 내성을 나타내었고 cephalosporins에는 감수성이 있는 것으로 나타났다 (Table 13).

3.4. SDS-PAGE and IEF

VAK-1 β -lactamase gene에 대해서 SDS-PAGE와 IEF를 실시하였다. 그 결과 wild type에서는 β -lactamase 성상을 확인할 수 없었지만 VAK-1 gene을 cloning한 *E. coli* DH5 α (pHSG398.KV3)에서는 β -lactamase의 특징을 알 수 있었다. 결과 분자량은 34-35kDa이었고 pI치는 4.9-5.1으로 나타났다 (Fig. 11, 12).

Table 13. MICs of β -lactams for *E. coli* DH5 α cells harboring recombinant plasmid pHSG398.KV3 and environmental *Vibrio* spp.

β -lactam	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of drug						
	<i>E. coli</i>			<i>Vibrio</i> spp.			
	DH5 α	pHSG398	pHSG398. KV3	YV1	RV16	JDV11	KV3
AMP	≤ 8	≤ 8	1024	≥ 2048	> 2048	> 2048	≥ 2048
PIP	≤ 8	≤ 8	256	≥ 2018	> 2048	> 2048	> 2048
AMC	≤ 4	≤ 4	64	128	128	128	64
CPL	16	32	16	≥ 256	128	128	128
CFR	8	16	8	64	64	64	64
CFM	≤ 1	≤ 1	32	8	16	8	16
CFD	16	8	16	32	32	32	64
FOX	4	8	8	128	128	128	128
CFX	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	2	0.5	0.25	0.5
CAZ	1	1	4	> 16	≥ 16	> 16	> 16
CFA	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	2	0.5	0.5	1

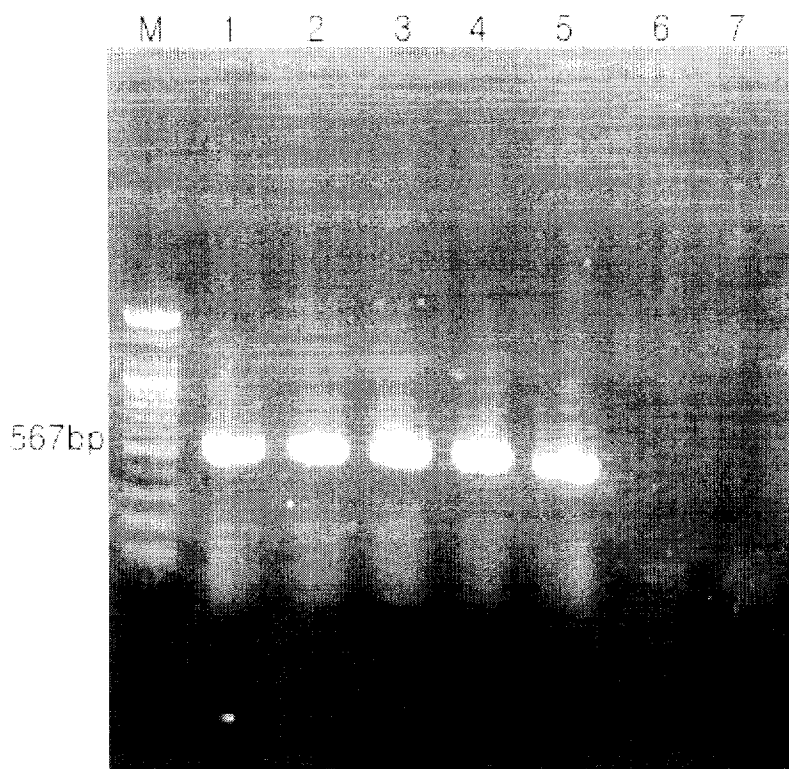


Fig. 10. Agarose gel electrophoresis of products obtained by PCR with the primer for KV3 β -lactamase gene. Lanes: M, molecular mass marker(Bioneer), 1, KV3; 2.RV16; 3.YV1; 4. JDV11; 5, *E. coli* DH5 α (pHSG398.KV3); 6, YV1 Conjugant; 7, RV16 Conjugant

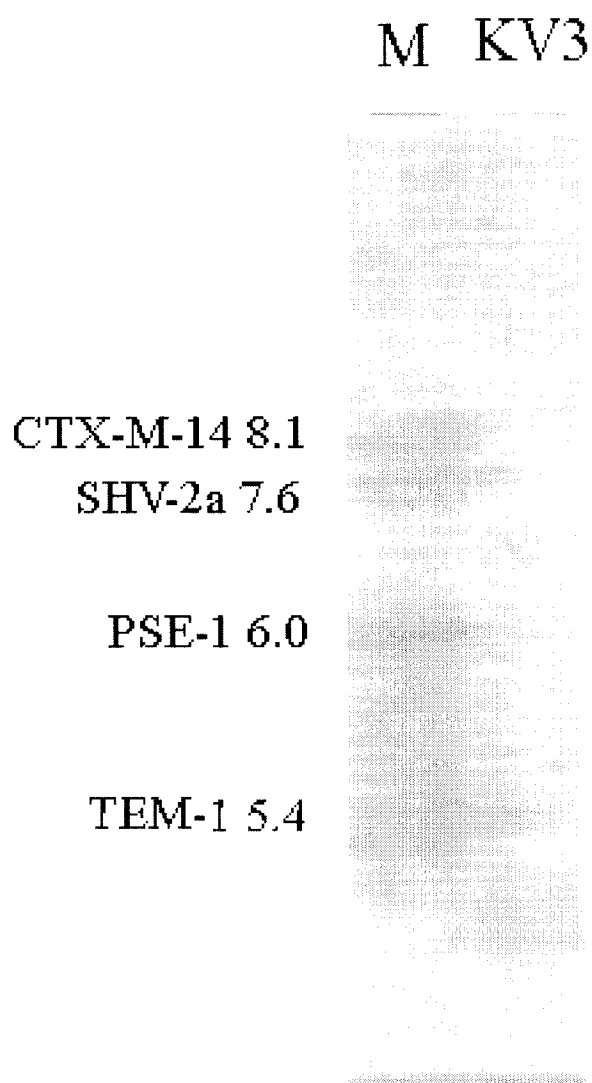


Fig. 11. IEF(Isoelectric Focusing) of VAK-1 β -lactamase gene

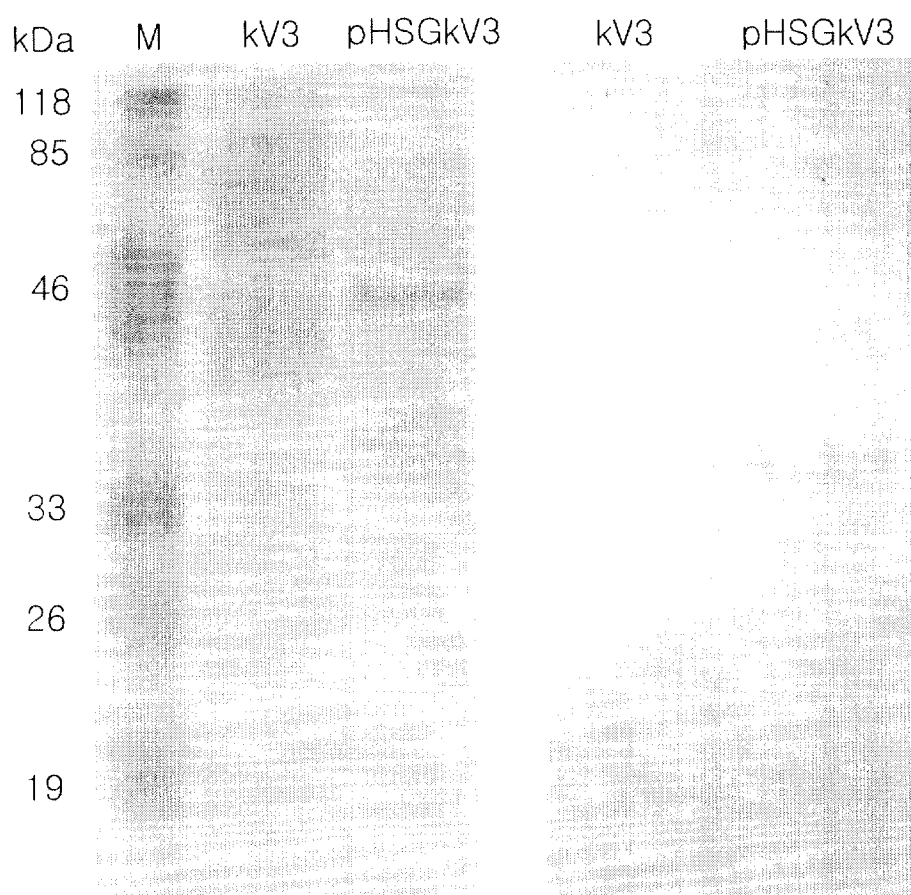


Fig. 12. SDS-PAGE of VAK-1 β -lactamase gene

IV. 고 찰

세계 보건 기구 (World Health Organization, WHO)는 2003 년에 여러 항생제에 대한 저항성을 지니는 슈퍼박테리아의 출현과 그에 따른 문제점들을 막기 위해, 질병 치료의 목적 뿐 아니라 가축 및 어류의 사료에 동물 성장 촉진 등의 목적으로 사용되는 항생제일지라도 그 사용을 자제해 줄 것을 권고한 바 있다 하지만 우리 나라에서는 수산용 항생제 사용에 대한 규제 및 항생제 사용자에 대한 전문적인 교육이 선진국에 비해 많이 부족하며, 여러 종류의 항생제가 다량으로 사용되고 있다 (김, 2004).

β -lactam 항균제는 크게 penicillins과 cephalosporins로 나누어지며 β -lactam ring을 기본 구조 핵으로 가지고 있다. β -lactam 항균제의 β -lactam ring이 세균의 세포벽 합성에 관여하는 transcarboxylase와 transpeptidase와 같은 PBP(penicillin binding protein)에 결합하여 세균의 세포벽 합성을 억제 함으로써 항균력을 갖게 된다 (Jet et al., 1995; Pitout et al., 1997). 이들 β -lactam 항균제의 사용에 있어서 생성되는 여러 내성 기전 중에서 특히 β -lactamase가 큰 문제점으로 작용한다. β -lactamase는 β -lactam ring의 amide bond를 끊음으로써 세균에 대한 항균력을 불활성화 시키는 효소이다 (Bush et al., 1995).

세균성 질병에 의한 양식 사업의 피해는 매우 심각하며 특히 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp., 연쇄상 구균 등에 의한 어류의 질병 피해가 많이 발생하고 있다 (심 등, 1995; Oh et al., 1998). 이에 따른 어류 질병 치료를 위해 항생제에 많이 의존하고 있으며 그 사용량이 증가하고 있다. 하지만 현재 항생제의 남용과 오용에 의한 약제 내성균의 발생과 분포가 확대되는 추세이며 또한 어체 내의 약제의 잔류와 세균간 교차내성의 발생 등 많은 문제점이 발생하고 있다. 어병 세균에 있어서 약제 내성 전달 plasmid와 내성 유전자에 관한 연구는 많이 되어 있지만 (유, 2000; 전, 2003; Aoki, 1988,1993) β -lactam 계열 항균제에서의 내성 유전자에 대한 정보는 많이 부족한 편이다. 이에 본 연구에서는 어류에 질병을 일으킨다고 알려진 *Edwardsiella tarda* 와 연쇄상 구균 그리고 수중 환경에 널리 분포하고 있는 *Vibrio* spp. 에서 β -lactam 계열 항균제들의 MIC 값을 측정해 보았고 β -lactam 계열 항균제에 내성을 보이는 여러 어병 세균에 있어서 어떤 β -lactamase가 존재하며 그 β -lactamase의 기능에 대해서도 알아보았다. 또한 다른 계열 항생제의 약제 감수성 실험을 실시하여 이전 어병 세균에서의 연구와 비교해 보았다.

먼저 남해안과 제주에서 양식되는 넙치와 뱀장어에서 분리한 115개의 *Edwardsiella tarda*에서 ampicillin에 높은 내성을 나타내는 12개의 균을 분리하였다. *Edwardsiella tarda*에 있어서 ampicillin 내성비율이 10%

정도로 매우 낮게 나타나는데 (Fig. 1) 이것은 김(1999), Stock and Widemann(2001) 의 연구 결과와 유사하다. 하지만 뱀장어 양만장에서 분리한 *Edwardsiella tarda*에서의 ampicillin 내성이 90%가 나타난다는 보고와는 차이가 크게 났다 (김 과 최, 1994; 최 등, 1996). 이 차이는 1990년대 중반에 뱀장어 양만장에서 ampicillin을 과다 투여하여 *Edwardsiella tarda*에서 ampicillin에 대한 내성이 증가 했다고 여겨진다. Stamm et al. (1989)은 항생제에 노출되는 시간이 길수록 각종 질병 원인균의 MIC 값이 증가한다고 하였다. 또한 넙치 양식에서는 ampicillin을 잘 사용하지 않는다. 그러므로 넙치에서 *Edwardsiella tarda*를 분리한 김(1999)의 보고와 이번 연구에서 나온 결과는 김 과 최(1994)의 결과와 차이가 날 수 있다고 여겨진다.

한편 Stock and Widemann(2001)는 미국, 독일, 일본 등에서 *Edwardsiella tarda*를 얻어서 다양한 계열의 항균제에 대한 *E. tarada*의 약제 감수성을 보고 하였는데 이들의 연구결과에 의하면 *E. tarada*는 ampicillin에 2.5%만이 내성을 나타내었으며 benzylpenicillin을 제외한 모든 β -lactam 계열 항균제에 감수성이 있다고 보고 하였다.

본 연구에서 ampicillin에 내성을 나타내는 *Edwardsiella tarda*에서의 β -lactam 계열 항균제 MIC 값은 penicillin 계열에서는 매우 높게 나타났지만 cephalosporins 계열에서는 상대적으로 낮은 MIC 값을 나타내었다. 이것은 *E. tarda*에서의 ESBL gene은 아직 존재하지

않는다는 것을 의미하며 광범위 β -lactam 항균제가 훌륭한 치료제가 될 수 있음을 암시한다. 그리고 AMC에 높은 MIC 값을 나타내는데 이것은 IRT (Inhibitor Resistant TEM), AmpC gene 등에 나타날 수도 있지만 TEM-1의 과다생성에 의한 것일 수도 있다 (Brinas et al., 2002). *E. coli* DH5 α transformants에서 AMC 에 대한 MIC 값이 높으면서 TEM-1 gene이 detection 되는 것으로 볼 때 *E. tarda*는 TEM-1의 과다생성에 의해서 AMC에 높은 MIC 값을 나타내는 것 같다. 그리고 또한 50%의 균주에서 cefoxitin에 내성을 보이는데 이것은 *E. tarda*에서의 ampC gene의 존재를 간접적으로 알 수 있다. AmpC gene은 대부분 chromosomal에 위치하지만 근래 plasmid mediated ampC gene이 β -lactams 항균제의 내성에 많은 문제가 되고 있다 (Lee et al., 2002). 하지만 *E. tarda* transformants의 cefoxitin에 대한 MIC 값을 보았을 때 *E. tarda*의 ampC gene은 chromosomal에 위치한 것으로 여겨진다. 이번 실험에서 12개의 ampicillin 내성 *E. tarda*에서 β -lactamase gene을 확인 하여 보았다.

첫번째 실험으로 nitrocefin test를 실시하였다. 12개의 ampicillin 내성 *E. tarda* 모두에서 nitrocefin test positive 반응이 나왔다. *E. tarda*에서의 β -lactamase gene의 존재는 알려져 있지만 어떠한 β -lactamase gene이 β -lactam 항균제 내성에 관여하는지는 알려져 있지 않다. 어떤 유형의 β -lactamase gene이 *E. tarda*에 존재하는지를 알아보기 위하여 그림

음성 세균에 널리 분포되어 있다고 알려진 *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTXA} gene에 대한 primer를 제작하여 PCR 방법으로 *E. tarda*에서의 β -lactamase gene를 확인 하여 보았다. 그 결과 12개의 ampicillin 내성 *E. tarda* 중에서 10개에서 TEM-1 gene이 확인 되었다. TEM-1 gene이 확인된 10개 균주 중 8개 균주에서 transformant가 확인 되었다. 이것으로 TEM-1 gene이 이동성이 있는 plasmid에 존재 하는 것을 알 수 있으며 양식 여장에서 ampicillin에 내성을 나타내는 *E. tarda*가 발생 할 때 빠른 시간 내에 내성 균의 비율이 증가 될 수 있음을 예상 할 수 있다.

TEM gene의 promoter에는 *P3*, *Pa/Pb*, *P4*, *P5* 등 4가지 형태가 있다고 알려져 있다 (Lartigue MF et al., 2002). 이것은 promoter 부위의 nucleotide가 한 개 내지 두개가 변화 하여 생긴 것으로 *P3*가 가장 약하고 *P5*가 가장 강력한 promoter로 알려져 있다. 본 연구에서 *E. tarda*에 확인된 TEM-1 gene은 모두 *P3*의 약한 promoter를 가지고 있었다. TEM-1 gene을 가지는 대부분의 장내 세균에 있어서 *P3* promoter를 가지는 것으로 보고되어져 있다 (Brinas et al., 2002).

다음으로 제주도 탑치에서 분리한 연쇄상 구균에 있어서 β -lactam 계열 항균제들의 MIC 값과 다른 계열의 항균제에 있어서의 억제 감수성 실험을 실시 하였다. β -lactam 계열의 항균제에 있어서 58%가 0.06 μ g/ml의 낮은 MIC 값을 나타내고 있다. 이 결과는 김 등 (2003) 이 여러 지역에서 분리한 연쇄상 구균의 80%가 ampicillin에 대한 MIC 값이

0.05 μ g/ml를 나타낸다는 보고와 유사하다. Fig. 4. 를 참고로 하여 연쇄상구균의 ampicillin 내성 기준을 0.25 μ g/ml로 볼 때 내성 비율이 40%가 나오는데 이것은 연쇄상구균의 치료에 있어서 β -lactam 계열의 항생제를 사용할 때 약제 감수성 실험이 필요함을 의미한다. Lim et al. (2003)은 β -lactam의 일종인 cephalixin 과 gentamicin을 병용 하였을 때 *E. tarda*와 *Streptococcus iniae*에 효과적이라 보고 하였다. 김 등 (2003)의 보고에 의하면 연쇄상구균의 90%, 18%, 25%가 oxonic acid, erythromycin, oxytetracycline에 내성을 나타낸다고 보고하였다. 이번 실험에서는 각각의 항생제 있어서 69%, 31%, 52%의 내성 비율을 나타내는데 erythromycin과 tetracycline의 내성 비율이 조금 올라 간 것을 확인 할 수 있다 (Table 10). 그리고 연쇄상구균에 감수성이 떨어진다고 알려진 aminoglycoside 계열의 gentamicin과 streptomycin에서 93%의 매우 높은 내성을 나타내고 있다. 한편 ciprofloxacin과 chloramphenicol에서는 감수성이 매우 높은 것으로 나타났다 (Table 10).

연쇄상구균의 β -lactam 계열 항생제 MIC값에 있어서 특이적인 점은 amoxycillin에 β -lactamase inhibitor라고 알려진 clavulanic acid을 넣은 MIC 값과 amoxycillin 단독 MIC 값이 비슷한 결과를 나타내는 것이다. 이 결과로 β -lactamase가 이번에 분리한 연쇄상구균에서는 없다는 것을 간접적으로 알 수 있었다.. 이 MIC 값 비교에서 β -

lactamase가 없음을 간접적으로 확인 할 수 있지만 좀 더 확실한 결과를 알아보기 위해서 β -lactam계열의 항생제에 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC값을 나타내는 연쇄상구균에 대해서 nitrocefin test를 실시하였다. 예상대로 nitrocefin test에서 모든 연쇄상구균은 negative 결과가 나왔다. 대부분의 nitrocefin test에 있어서 반응 시간을 10분 이내로 하지만 일부의 Staphylococci는 1시간의 반응 시간이 필요하다고 알려져 있다. 따라서 1시간의 반응 시간을 더 두었지만 역시 negative 결과가 나왔다. 그리고 또한 PCR 방법으로 연쇄상구균에 존재한다고 알려진 TEM, PC1 gene을 (McLaughlin et al., 1981; NCBI access NO. AY452662, AY392531) 확인 할 수 있는 특이적인 primer를 제작하여 확인하여 보았다. 실험 결과 이번에 분리한 연쇄상구균에서는 TEM, PC1 gene이 검출되지 않았다. 따라서 MIC, Nitrocefin test, PCR 모든 결과에서 2003년에서 2004년까지 제주도에서 분리한 연쇄상 구균에서는 β -lactamase를 확인하지 못하였다. 연쇄상 구균에 있어서 β -lactam 계열의 항균제 내성은 β -lactamase 뿐만 아니라 PBP(penicillin binding protein)의 변화에 의해서 일어난다고 알려져 있다. 따라서 이번에 제주도에서 분리한 연쇄상 구균의 β -lactam 항균제 내성은 PBP의 변화에 기인한 것이라고 여기진다.

마지막으로 *Vibrio* spp.의 β -lactam 계열 항균제 MIC 값과 β -lactamase을 확인 해 보았다. 먼저 동해안, 남해안, 제주도의 해수와

병어의 환부, 그리고 정상어의 장에서 TCBS 한천 배지를 이용하여 120개의 *Vibrio* spp.를 분리하였다. 그리고 일본과 중국에서 수입된 참돔과 농어의 장에서 *Vibrio* spp.를 각각 30개와 50개를 분리하였다. *Vibrio* spp.에 있어서 ampicillin 내성 비율은 30-98%라고 알려져 있다 (Ottaviani, et al. 2001; Molina-Aja, et al. 2002). 본 연구에서도 ampicillin에 대해서 80%의 내성 비율이 나타났으며 광범위 β -lactam 항생제에도 높은 MIC를 나타내는 6개의 *Vibrio* spp.도 존재하였다. 미브리오에시의 β -lactamase에 대한 연구는 주로 *Vibrio cholerae*에 연구되어지고 있다. 특히 미브리오 과에 속하는 어병 세균에 있어서는 *Vibrio harveyi*에서 확인된 VHH-1, VHW-1 gene만이 보고 되어 있다 (Teo et al., 2000). *Vibrio* spp.에서 PCR방법으로 TEM, SHV gene을 확인하려는 방법은 시도되었으나 gene의 존재를 확인하지 못하였다 (Zanetti et al., 2000). 본 연구에서도 한국의 여러 지역과 중국, 일본에서 수입한 어류에서 분리한 *Vibrio* spp.에 있어서 *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} gene에 대해서 조사하여 보았다. 하지만 Zanetti et al. (2000)와 마찬가지로 *Vibrio* spp.에서 TEM, SHV gene을 확인하지 못하였다. 그리고 또한 *Vibrio harveyi*와 *Vibrio fischeri*, *Vibrio parahaemolyticus*에서 확인된 β -lactamase gene을 기초로 각각의 gene에 대한 특이적인 primer를 제작하여 확인하여 보았지만 그 어떤 gene도 *Vibrio* spp.에서 확인하지 못하였다 (data not shown). 따라서 본 연구에서 사용된 *Vibrio* spp.가

어떠한 β -lactamase를 갖는지를 확인하기 위해서 *Vibrio* spp. 의 β -lactamase gene을 제한 효소 처리하여 cloning 하였다. 그 결과 KV3 균주에서 현재까지 알려지지 않은 새로운 β -lactamase gene이 cloning 되었다 (Fig. 5, 6). *Vibrio* KV3은 Vitek GNI+ CARDS (Biomérieux Inc.) 에서 *Vibrio alginolyticus*로 동정 되었다. *Vibrio alginolyticus*는 수중 환경에 널리 분포하는 그람음성 간균으로 saprophytic microbiota로 알려져 있다 (Carli et al., 1993). 그리고 또한 어류 및 패류, 갑각류에 병원성을 나타낸다고 알려져 있다 (Lee, 1995; Rikelm et al., 1996). 또한 *Vibrio alginolyticus*는 ampicillin에 대해서 높은 내성율을 나타낸다고 보고 되어져 있다 (Zanetti et al., 2001; Ottaviani et al., 2001). KV3의 β -lactamase gene은 class A β -lactamase의 특징이 되는 몇 가지 중요한 motif를 가지는데 (Fig.6. box), 62번째에서 66번째에 위치한 Ser - X - X - Lys 은 PBP(Penicillin Binding Protein) 와 serine β -lactamase 의 중요한 특징이다 (Jois et al., 1991). 다음으로 122-124번째에 위치한 SDN loop와 158번째에 위치한 Glu 또한 class A β -lactamase의 중요한 특징이다 (Jois et al., 1991). 마지막으로 VIII-1, VIIW-1, 그리고 *Vibrio fischeri*에서는 226-228번째 RSG가 나온다고 알려져 있지만 본 연구에서 확인된 β -lactamase에서는 RTG가 나왔다. *Acinetobacter calcoaceticus*, *Proteus mirabilis* 에서 확인된 β -lactamase에서 RTG가 나왔지만 (Choury et al., 2000) RTG 부분을

제외하고는 43%의 identity를 나타내었다 (Table 12).

현재 까지 알려진 β -lactamase는 200여가지가 넘는다. 이 중 class A에 속하는 β -lactamase이면서 그람 음성 균에 보편적으로 많이 존재하는 TEM, SHV와 *Vibrio* spp. 에서 확인된 여러 β -lactamase를 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 에서 찾아 VAK-1 β -lactamase와 비교해 보았다. 그 결과 TEM, SHV와 각각 38%, 36%의 낮은 amino acid identity를 나타냈다 (Table 12). 그리고 또한 *Vibrio* spp.에서 확인된 여러 β -lactamase와도 낮은 identity를 보여주었다 (Table 12). 여러 β -lactamase와 계통수를 비교해 보았을 때 KV3 β -lactamase gene은 vibrionaceae 과의 β -lactamase 에 속했지만 *Vibrio cholerae*의 β -lactamase 보다는 NCV에 속하는 β -lactamase와 가까웠으며 계통 발생학적으로 보았을 때 NCV의 β -lactamase 중에서 조기의 gene이라 여겨진다 (Fig. 7, 8) Weng et al. (2004) 은 이런 계통수 관계가 육상세균과 해양세균에 있어서 오랜 기간 동안 다른 계통 발생의 증거라고 보고했다.

VAK-1 β -lactamase gene의 promoter는 -10 부위가 TATAAT -35 부위가 CTCAGA로 *Vibrio fischeri* β -lactamase gene 과 -10 부위는 일치하지만 -35부위는 TTGACT인 *Vibrio fischeri* 와 완전히 달랐다. 그리고 여러 다른 β -lactamase gene의 promoter와 비교해 보았을 때 다른 promoter sequence를 가지고 있었다 (data not shown). VAK-1 β

-lactamase gene과 다른 *Vibrio* spp.에서의 β -lactamase gene을 비교하여 VAK-1 β -lactamase gene에 특이적인 primer를 제작하여 VAK-1 β -lactamase gene이 *Vibrio* spp.에 얼마나 분포하는지 알아보았다. 200개의 *Vibrio* spp. 중 3개에서 특이적인 PCR band가 확인되었다 (Fig. 10). 이들 균주는 *Vibrio alginolyticus*와 *Photobactrium damsella*로 동정되었다. 따라서 VAK-1 β -lactamase gene은 *Vibrio alginolyticus*에만 존재하는 것이 아니라 다른 *Vibrio* spp.에서도 존재함을 알 수 있었지만 이 gene의 분포는 매우 낮다는 것을 또한 확인하였다. VAK-1 β -lactamase gene의 위치에 있어서 RV16과 YV1의 conjugant에서 특이 primer로 PCR을 하였을 때 이 gene을 확인하지 못하였다 (Fig. 10). 이 결과는 이 gene이 chromosomal이나 이동성이 없는 DNA에 위치함을 암시하며 그리고 또한 KV3 β -lactamase gene 이외의 다른 β -lactamase gene이 R-plasmid에 존재함을 의미한다. VAK-1 β -lactamase gene에서의 IEF 결과 wild type에서는 nitrocefin에 반응하지 못했고 VAK-1 β -lactamase gene을 cloning한 *E. coli*에서 insert β -lactamase를 확인 할 수 있었다. 이 결과의 차이는 각각의 균에서 gene의 위치가 서로 다르고 그 결과로 gene copy 수에 차이가 생겨서 나온 결과로 여겨진다.

Vibrio spp. 에서의 β -lactam 항생제 MIC 결과에서 3세대 cephalosporins인 cefotaxime과 ceftriaxone에 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC 값을

보이면서 clavulanic acid에 억제가 되는 1 균주를 찾아냈다. ESBL이 의심되어 ESBL test를 이중디스크 확산법 (Double disk synergy test)으로 실험 하였는데 특이적인 synerism을 확인하지 못하였다. 이것은 이 균주가 ESBL이 아니거나 혹은 실험 방법에 있어서 ESBL 검출법이 대부분 *E. coli*나 *Klebsiella* sp. 에 적용하는 방법이기 때문에 *Vibrio* spp.에서는 다른 변형 된 방법이 필요할 수도 있다. 한편 *Enterobacter cloacae* 의 ESBL 검출에는 *E. coli*나 *klebsiella* sp. 의 ESBL test를 약간 변형 해서 하기도 한다 (Sturenburg, 2004; Schwaber et al., 2004). 따라서 *Vibrio* spp. 에서의 ESBL 검출법에 대해서도 앞으로 연구가 더 필요하다.

본 연구에서는 어병 세균인 *E. tarda*, 연쇄상 구균과 수중 환경에 널리 분포하고 있는 *Vibrio* spp. 에서 여러 계열의 항균제 감수성과 β -lactam 계열에 있어서의 MIC 값을 측정하여 보았다. 그리고 β -lactam 계열의 내성기전 중 β -lactamase에 대해서 조사 하여 보았다. 하지만 아직 어병 세균에서의 β -lactamase에 대한 연구는 많이 부족하고 앞으로 좀 더 다양한 어병 세균에서의 β -lactam 계열의 항균제 내성과 β -lactamase 연구가 필요하겠다. 그리고 이번에 밝혀낸 *Vibrio* spp. 에서의 β -lactamase gene의 생화학적 특성과 flanking region의 sequence등에 대한 연구가 더 필요하다. 그리고 본 실험에서는 *Vibrio* spp. 에서 만 시도해 보았지만 한국, 중국, 일본에 있어서의 다양한 어병

세균에서의 네성 유전자의 분포와 그 자이에 대해서도 좀 더 많은 연구가 필요하다.

V.요 약

이번 연구에서는 이명 세균인 *E. tarda* 와 *Streptococcus* sp. 그리고 수중 환경에 널리 분포하고 있는 *Vibrio* spp. 에서의 β -lactam 항균제 감수성과 β -lactamase와의 관계에 대해서 알아보았다.

Ampicillin에 대한 약제 감수성 실험에서 *E. tarda*, *Streptococcus* sp., *Vibrio* spp. 각각 10%, 40%, 80%의 내성을 보였다.

*E. tarda*에서는 ampicillin에 내성을 나타내는 모든 균주에 nitrocefin test를 실시하였고 모두 positive 결과를 나타냈다. 그람 음성 세균의 ampicillin 내성에 관여하면서 또한 널리 분포되어 있는 β -lactamase gene인 *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, 그리고 *bla*_{OXA} gene 을 확인할 수 있는 primer로 PCR을 하였을 때 TEM gene에 특이적으로 반응하였다. 이 TEM gene은 이동 가능한 plasmid에 위치하고 있었으며 sequencing 결과 TEM-1 gene으로 확인 되었다.

Streptococcus sp.에서 ampicillin에 내성을 나타내는 모든 균주는 nitrocefin test에 negative 결과를 나타내었다. 그리고 또한 β -lactamase inhibitor인 clavulanic acid가 작용을 하지 않는 것을 여러 β -lactam 계열 항균제 MIC 실험에서 확인할 수 있었으며 *Streptococcus* sp.에 알려진 β -lactamase 인 *bla*_{TEM}, *bla*_{PC1}을 PCR로 확인 해 보았지만 확인할 수 없었다. 따라서 이번에 분리한 *Streptococcus* sp.에서는 β -lactamase를 확인 할 수 없었고 이들 균의 ampicillin 내성은 PBP(penicillin binding protein)의 변화에 의한 것으로 여겨진다.

Vibrio spp. 에서 알려진 β -lactamase gene 을 PCR 로 알아보려고 하였지만 확인 할 수 없었다. *Vibrio* spp. 에서의 β -lactamase gene 을 확인 하기 위하여 제한 효소를 처리하여 *Vibrio* spp.에서 β -lactamase gene 을 cloning 하였다. 그 결과 *Vibrio* KV3 에서 지금까지 알려지지 않은 새로운 β -lactamase gene 을 확인하였다. 이 gene 의 ORF(open reading frame)는 861 bp, 257 개의 amino acid 로 구성되어 있다. Class A β -lactamase gene 의 특징적인 motif 인 STFK, SDN, E,

KTG 가 존재 하였고 알려진 다른 class A β -lactamase gene 들과 비교해 보았을 때 최고 53% 이하의 상동성을 나타냈다. 계통 발생학적으로 보았을 때 *Vibrio* spp. 중 NCV(non-cholera vibrios) 의 β -lactamase 에 속하였다. 또한 Bush (1995)의 분류 방법을 적용하였을 때는 group1 에 속함을 확인 할 수 있었다. 한국, 중국, 일본에서 분리한 *Vibrio* spp. 에서의 VAK-1 β -lactamase gene 의 분포를 PCR 방법으로 보았을 때 3 개의 균(2%) 에서 특이적인 PCR 산물을 확인 할 수 있었으며 conjugation 실험을 통해서 이 gene 은 chromosomal DNA 나 이동성이 없는 plasmid DNA 에 속해 있다는 것을 확인 할 수 있었다.

VI. 감사의 글

지난 2 년간의 식사 생활이 정말 한 순간에 지나갔습니다. 제가 많이 부족해서 주위 분들에게 많은 도움을 받다 보니 감사해야 될 분들이 많습니다. 먼저 부족한 저를 지난 2 년간 보살펴 주시고 제가 어려울 때 따뜻한 격려의 말씀으로 저를 지도 해주신 정현도 지도 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 또한 부족한 제 논문을 심사 해 주신 강주찬 교수님, 정준기 교수님께도 진심으로 감사 드립니다. 그리고 제 곁에서 저를 아껴주시고 지도해주신 박수일 교수님, 김기홍 교수님, 허민도 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

2000 년 학부 2 학년 때 진단 생화학 실험실에 처음 들어와서 지금까지 저를 아껴주신 진단방 family 병석이 형, 은아 누나, 준효 형, 민호 형, 종영이 형, 우열이 형, 준범이 형, 영재 형, 영이 누나, 주영이 누나에게 감사드리며 멀리서 저를 성원해주시고 아껴주신 수희 누나, 광규 형, 남실이 누나, 강업이 형, 강현이 형 모두 감사 드립니다. 그리고 지보다 학번은 후배이지만 실험실 생활과 실험 방법들에 대해서 열심히 가르쳐 준 실험실 선배 러진, 영화, 태심이 에게도 감사를 표합니다. 이 논문이 나오기까지 제 실험을 자기 실험같이 도와 주었던 윤경, 영아, 민수, 영수, 상훈, 혜진, 소혜 그리고 지금 제 뒤를 이어서 식사의 길을 걷고 있는 지효, 현정이에게도 감사 합니다.

학교에서 같이 지내면서 부족한 저에게 항상 힘이 되어준 96 학번 동기들인 세련, 상환이형, 희정, 은영, 효주, 어쎄, 영주, 현자, 은미와 밤에 있으면서도 저를 항상 챙겨준 도원, 정희, 희원, 은임, 이희정, 민아, 성애, 안은 에게도 감사 드립니다. 그리고 부족한 제 실험을 위해서 애써 주신 정수 형님께 진심으로 감사 드립니다. 또한 제 대학생활에 큰 힘이 되어준 영욱이형, 부근이 형께도 감사 드립니다. 무엇보다도 지난 2 년간 실험실에서 동거 동락한 호열, 순범, 신후에게 정말 감사 드립니다. 그리고 2 년간의 식사 생활에 힘이 되어 준 성미, 은혜, 유화, 혜정, 나영, 장호형 께도 감사의 말을 드립니다. 그리고 제 실험을 위해서 모든 것을 양해해 주신 9 호관 2 층 전 실험실 선배님, 후배님들에게도 감사 드립니다. 마지막으로 저를 지금까지 이끌어주시고 이 논문이 나오기 까지 많은 힘이 되어 준 부모님과 동생 재학이, 진척 형, 누나에게도 감사 드립니다. 이 책을 제가 사랑하는 모든 소중한 사람들에게 바칩니다.

VII. 참고 문헌

- Aoki, T. (1988). Drug resistant plasmids from fish pathogen. *Microbiology Science.*, 5, 219-223.
- Aoki, T. (1992). Chemotherapy and drug resistance in fish farms in Japan. *Diseases in Asian Aquaculture.*, 1, 519-529.
- Baxa DV, K kawai, H Ando, R Kusuda. (1985). *Edwardsiella tarda* and *Staphylococcus aureus* isolated from cultured red sea bream. Rep. Biol. Inst.. 7, 1-8.
- Bert. F., Branger. C. and Lambert-Zechovsky. N. (2002). Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 50, 11-18.
- Brinas L, Zarazaga M, Saenz Y, Ruiz-Larrea F, Torres C. (2002). Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46, 3156-63.
- Buck JD, NA Overdrom, GW patton, HF Anderson, JG Gorzelany. (1991). Bacteria associated with stranded cetaceans from the northeast USA and southwest Florida Gulf coasts. *Dis. Aquat. Org.*, 10, 147-152.
- Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros. (1995). A functional

classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.*, **39**, 1211-1233.

Carli, A., L. Pane, L. Casareto, S. Bertone, and C. Pruzzo. (1993). Occurrence of *Vibrio alginolyticus* in Ligurian coast rock pools (Tyrrhenian Sea, Italy) and its association with the copepod *Tigriopus fulvus* (Fisher 1860)., *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1960-1962.

Chanoine MH. (2002). Promoters *P3*, *Pa/Pb*, *P4*, and *P5* upstream from bla(TEM) genes and their relationship to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, **46**, 4035-4042.

Chen JD, SL Huang. (1996) Hemoysin from *Edwardsiella tarda* strain ET-16 isolated from eel *Anguilla japonica* identified as an hole-forming toxin. *Fish. Sci.*, **62**, 538-542.

Chen, W. & T. Kuo, 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, **21**, 2260.

Chesnel L, Zapun A, Mouz N, Dideberg O, Vernet T. (2002). Increase of the deacylation rate of PBP2x from *Streptococcus pneumoniae* by single point mutations mimicking the class A beta-lactamases. *Eur J Biochem.*, **269**, 1678-1683.

Choury D, Szajnert MF, Joly-Guillou ML, Azibi K, Delpech M, Paul G. (2000). Nucleotide sequence of the bla(RTG-2) (CARB-5) gene and phylogeny of a new group of carbenicillinases. *Antimicrob Agents Chemother.*, **44**, 1070-1074.

Clark RB, Lister PD, Janda JM. (1991). In vitro susceptibilities of *Edwardsiella tarda* to 22 antibiotics and antibiotic-beta-lactamase-inhibitor agents. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **14**, 173-175.

Donatella Ottaviani, Isidoro Bacchiocchi, Laura Masini, Francesca Leoni, Antonio Carraturo, Monica Giammarioli, Giovanni Sbaraglia. (2001). Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. *International Journal of Antimicrobial Agents.*, **18**, 135-140.

Edward, J. N. (1995). Fish disease diagnosis and treatment, Moshy., 149-151.

Herman RL and GL Bullock. (1986). Pathology caused by the bacterium *Edwardsilla tarda* in stripped bass. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **115**, 232-235.

Hoshina, T., T. Sano and . morimoto. (1958). A *streptococcus* pathogenic to fish. *Journal. of Tokyo University of Fisheries*, **16**, 201-206.

Jet, B.B., D.J. Ritchie, R. Reichley, T.C. Baily, and D.F. Sahm. (1995) In vitro activities of various β -lactam antimicrobial agents against clinical isolates of *Escherichia coli* and *klebsiella* spp. resistant to oxyimino cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.*, **39**, 1187-1190.

J.D.D. Pitout, E.S. Moland, C.C. Sanders, K.S. Thomson, and S.R. Fitzsimmons. (1997). β -lactamases and detection of β -lactam

resistance in *Enterobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.*, **41**, 35–39.

Joris, B., P. Ledent, O. Dideberg, E. Fonzé, J. Lamotte-Brasseur, J. A. Kelly, J. M. Ghuysen, and J. M. Frère. (1991). Comparison of the sequences of class A β -lactamases and of the secondary structure elements of penicillin-recognizing proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 2294–2301.

Jun An, Seok Hoon Jeong and Kye Joon Lee. (2002). Characterization of *bla_{cmv-11}*, an AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase gene in Korean clinical isolate of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, **49**, 269–273.

Keabra, J. J. (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2**, 19–25.

Kubota SS, N Kaige, T Miyazaki, T Miyashita 1981 Histopathological studies on edwardsiellosis of tilapia. *Bull. Fac. Fish. Mie Univ.* **9** , 155–165.

Laura Brinas, Myriam Zarazaga, Yolanda Saenz, Fernanda Ruiz-Larrea, and Carmen Torres., 2002. β -lactamase in Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Foods, Human, and Healthy Animals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3156–3163.

Lartigue MF, Leflon-Guibout V, Poiriel L, Nordmann P, Nicolas-Chanoine MH. (2002). Promoters P3, Pa/Pb, P4, and P5 upstream from *bla*(TEM) genes and their relationship to beta-lactam resistance.

Antimicrob Agents Chemother., **46**, 4035-4037.

Lee, K. K. (1995). Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus* Bloch et Schneider. *Microb. Pathog.*, **19**, 39-48.

Lee SH, Jeong SH, Park YM. (2003). Characterization of bla_{CMY-10} a novel, plasmid-encoded AmpC-type β -lactamase gene in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Applied Microbiology.*, **95**, 744-752.

Lim JH, Hwang YH, Park BK, Yun HL. (2003). Combination effects of cephalexin and gentamicin on *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents.*, **22**, 67-69.

Livermore DM, Brown DF. (2001). Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, **48**, 59-64.

Mabilat, C., Goussard, S., Sougakoff, W., Spencer, R. C., and Courvalin, P. (1990) Direct sequencing of the amplified structural gene and promoter for the extended broad-spectrum β -lactamase TEM-9(RHH-1) of *Klebsiella pneumoniae*. *Plasmid* **23**, 27-34.

Mabiat, C., and S. Goussard. (1993). PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases, p.553-559. In D.H. Persing (ed.), *Diagnostic molecular microbiology principles and application*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

McLaughlin JR, Murray CL, Rabinowitz JC. (1981). Unique features in

the ribosome binding site sequence of the gram-positive *Staphylococcus aureus* beta-lactamase gene. *J Biol Chem.*, **21**, 11283–11291.

Nakatsugawa T. 1983 *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. *Fish Pathol.* **18**, 99–101.

Nakayama A, Takao A. (2003). Beta-lactam resistance in *Streptococcus mitis* isolated from saliva of healthy subjects. *J Infect Chemother.*, 321–327.

Oh, S. P., Kim, D. W, Lee, J. J. and Lee, C. H. (1998). Bacterial disease in flounder farms of cheju island. *J. Fish Pathol.*, **11**; 23–27.

Ottaviani D, Bacchiocchi I, Masini L, Leoni F, Carraturo A, Giammarioli M, Sbaraglia G. (2001). Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic *vibrios* isolated from seafood. *Int J Antimicrob Agents.*, **18**, 135–140.

Pai, H.J, S. Lyu, J.H. Lee, J. Kim and Y. Kwon. (1999). Survey of Extended-spectrum β -lactamase in KOREA isolates of Enterobacteriaceae. *Yonsei Medical Journal* , **39**; 514–519.

Patricia, A. Bradford. (2001). Extended-Spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Review.*, **14**, 933–951.

R. Bonnet. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β – lactamase; the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.*, **48**,

1-14.

Reger PJ, Mockler DF, Miller MA. (1993). Comparison of antimicrobial susceptibility, beta-lactamase production, plasmid analysis and serum bactericidal activity in *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri* and *E. hoshinae*. *J Med Microbiol.*, **39**, 273-281.

Rikelme, C., A. E. Toranzo, J. L. Barja, N. Vergara, and R. Araya. (1996). Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). *J. Invert. Pathol.*, **67**, 213-218.

Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, McGowan JE Jr, Tenover FC. (2004). Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum beta-lactamases in non-*Escherichia coli* and Non-*Klebsiella* spp. of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.*, **42**, 294-298.

Shu-Fen Weng, Yuh-Fen Chao, and Juey-Wen Lin. (2004). Identification and characteristic analysis of the *ampC* gene encoding β -lactamase from *Vibrio fischeri*. Biochemical and Biophysical Research Communications., **314**, 838-843.

Smith AM, Klugman KP. (2000). Non-Penicillin-Binding protein mediated high-level penicillin and cephalosporin resistance in a Hungarian clone of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.*, **6**, 105-110.

Stock I, Wiedemann B. (2001). Natural antibiotic susceptibilities of *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, and *E. hoshinae*. *Antimicrob Agents*

Chemother., 45, 2245-2255.

Sturenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. (2004). Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum beta-lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 54, 134-138.

Teo JW, Suwanto A, Poh CL. (2000). Novel beta-lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 44, 1309-1314.

Waltman WD, Shotts EB. (1986). Antimicrobial susceptibility of *Edwardsiella tarda* from the United States and Taiwan. *Vet Microbiol.*, 12, 277-282.

Zanetti S, Spanu T, Deriu A, Romano L, Sechi LA, Fadda G. (2001). In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. *Int J Antimicrob Agents.*, 17, 407-409.

김영화 : 해수 어류에서 분리된 *Vibrio* 균의 tetracycline 내성 유전자 특성, 무경대학교 어병학과 석사논문, 2004.

김은희, ;1999. 넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda* 의 약제내성 전달성 R plasmid. *한국어병학회지*, 제 12 권, 115-122.

김종훈, 임대환, 이창훈, 이수정, 이월라, 황미혜, 김은희. (2003). 연쇄상구균의 약제내성과 진이성 R-plasmid의 특성. *한국어병학회지*, 제 16 권, 61-68.

.

심두생, 이주석, 허분수, 김진우. : 양식 생물 질병 진단 연구, 국립수산

진흥원 사업보고서, 405-423, 1995.

이종호 : 부산 도축장에서 분리된 *E. coli*의 ESBL(Extended-spectrum β -lactamase)성상 연구, 부경대학교 미생물학과 석사논문, 2003.

우승호 : 해수 양식 어류에서 분리된 연쇄상구균의 종류와 병원성, 부경대학교 어병학과 석사논문, 2002.

유민호 : 어병 세균에서 Chloramphenicol 내성 유전자 분포와 R plasmid, 부경대학교 어병학과 석사논문, 2000.

전려진 : 우리 나라 어병세균이 갖는 *tet* 유전자의 특성 분석, 부경대학교 어병학과 석사논문, 2003.

전세규, 오명주, (1988). 텔리피아에서 분리한 *Edwardsia tarda* 의 성상과 항원성에 대하여, 한국어병학회지, 제 1 권, 77-86.

전세규, :1988. 양식어류의 세균성 질병의 진단과 대책, 한국어병학회지, 제 1 권, 5-30.

정현도, 전세규 : 항생제 사용과 세균성 어류질병의 치료, 한국어병학회지, 제 5 권, 37-48, 1992.

최민순, 김영길, 1994. 양반장 사육조에서 분리한 *Edwardsiella tarda* 의 약제 내성과 R-plasmid, 한국어병학회지, 제 7 권, 37-46.

최민준, 최상훈, 박관하. 1996. 뱀장어 병어로부터 분리한 *Edwardsiella tarda* 의 약제 내성. 한국어병학회지, 제 9 권, 195-201.