

Establishment of PCR Conditions for the Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolated from Boar Semen and Antimicrobial Susceptibility Patterns of the Isolates

Byeong Yeal Jung^{1*}, Bum Soo Park¹, Ha-Young Kim¹, Jae Won Byun¹, Aeran Kim¹, Albert Byungyun Jeon¹, In Cheul Kim² and Ki Hwa Chung³

¹Bacteriology and Parasitology Division, Animal Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang 430-757, Korea

²Swine Science Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Cheonan 331-801, Korea

³Department of Animal Resources Technology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

Received July 8, 2012 / Revised August 16, 2012 / Accepted August 22, 2012

Bacteria are frequently contaminated during the collection and processing procedures of boar semen. Of the contaminants, *Stenotrophomonas (S.) maltophilia* is a Gram-negative bacterium that is widely distributed in a variety of habitats. Although PCR assays have been developed for the detection of *S. maltophilia*, they cross-react with some species of *Xanthomonas*. In this study, we designed a primer set for the detection of *S. maltophilia* in order to target the *chiA* (GenBank accession no. NC_010943) gene. The specific PCR products were amplified from *S. maltophilia* only, not from other tested strains that are frequently found in semen. The detection limit of the PCR was 1.5×10^3 CFU/ml with pure-cultured *S. maltophilia* and 1.5×10^4 CFU/ml with *S. maltophilia* spiked in semen. Twenty-six (5.9%) *S. maltophilia* were isolated from 440 semen samples. The PCR results exhibited 98.9% agreement with a comparison of *S. maltophilia* isolation. Also, the sensitivity and specificity of the PCR were 100% and 98.7%, respectively. In the antimicrobial susceptibility test, *S. maltophilia* isolates were highly susceptible to enrofloxacin and florfenicol, while the majority of them were resistant to amoxicillin/clavulanic acid, apramycin, ceftiofur, penicillin, and spectinomycin. These results indicated that the PCR using the *chiA* gene was proven to be reliable and effective for the detection of *S. maltophilia* with high levels of sensitivity and specificity.

Key words : *Stenotrophomonas maltophilia*, boar semen, PCR, *chiA*, antimicrobial

서 론

돼지 인공수정은 우수한 유전자 형질도입과 질병 최소화를 위하여 전 세계적으로 널리 사용되고 있으며, 우리나라에서도 현재 인공수정 보급율이 약 90%에 도달하였다[17]. 그러나 돼지 정액 내 세균오염은 정자의 구조를 변형시켜 정자 운동력 감소, 생존기간 단축 및 수태율 저하 등 막대한 경제적 손실을 유발한다. 더욱이, 오염된 정액이 암태지에 주입되면 질 분비물 증가와 자궁내막염 등 생식기 질환을 유발할 수 있으므로 인공수정용 돼지 정액의 세균오염은 최소화시키는 것이 중요하다[5].

일반적으로 돼지 정액에 오염되는 균종이나 오염수준은 계절적인 요인과 정액 채취 환경에 따라 많은 차이가 있지만, 대표적인 오염균으로는 *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Serratia*

spp., *Stenotrophomonas (S.) maltophilia* 등이 보고되어 있다[13]. 특히 *S. maltophilia*는 물과 토양 등 자연환경에 널리 존재하며 비위생적으로 채취된 돼지 정액에 약 2.0-15.5% 오염되어 있다 [14,13].

*S. maltophilia*의 동정은 생화학 성상에 근거한 균분리법과 특이 유전자를 확인하는 유전자 검사법 등이 사용되고 있다. 그러나, 균분리법은 정확도가 낮고 검사 시간이 오래 소요되며 유사 균종과의 감별 등이 요구되어 최근에는 유전자 검사법이 많이 사용되고 있다[11,18,20]. 유전자 검사법은 *gyrB*, *xylE*, *copA* 및 *dfiA15* gene 등을 이용하지만 *S. maltophilia*가 *Xanthomonas* spp. 또는 *Pseudomonas* spp.와 유전적 상동성이 높기 때문에 비특이 반응이 나타나는 단점이 있다[10].

한편, *S. maltophilia*에 의한 인체 감염증을 살펴보면 주로 면역이 저하된 환자나 항생제의 장기간 사용 시에 감염되며 [1], 창상감염, 심내막염, 균혈증, 요로감염 등을 유발할 수 있다고 보고되어 있다[14,15,23]. *S. maltophilia*는 aminoglycosides 뿐만 아니라 광범위 β -lactam 계열의 항생제에도 높은 내성률을 나타내고 있으며, 최근에는 퀴놀론계 항생제에도 점

*Corresponding author

Tel : +82-31-467-1768, Fax : +82-31-467-1778

E-mail : jungby@korea.kr

차 내성이 증가하여 공중보건학적으로 문제가 되고 있다 [12,16].

따라서 본 연구에서는 *S. maltophilia*에 대한 검사 시간의 단축과 정확도를 높이고자 PCR 진단법을 개발하여 국내 돼지 원정액에 대한 *S. maltophilia* 오염을 조사하고, 분리균주에 대해 항생제 감수성 시험을 실시하여 유효 항생제를 선별하고자 하였다.

재료 및 방법

S. maltophilia 분리

S. maltophilia 분리를 위하여 2009년 10-12월에 8개 인공수정센터에서 생산된 돼지 원정액 116건과 2011년 3-12월에 20개 인공수정센터에서 생산된 돼지 원정액 324건 등 총 440건의 원정액을 검사하였다. 채취 후 2-3일 이내의 원정액 100 μ l를 5% sheep blood agar plate (Asan Pharmaceutical, Korea)와 MacConkey agar (Difco, USA)에 각각 도말하여 37°C, 18-24시간 호기배양하였다. 용혈성이 없으면서 lactose를 분해하지 못하는 유사 집락을 순수 분리하여 VITEK 2 Compact (BioMérieux, France)로 분리균을 동정하였다.

Primers 제작

*S. maltophilia*를 특이적으로 검출하기 위하여 *S. maltophilia*의 chitinase 생성에 관여하는 *chiA* 유전자를 primer 작성부위로 선정하였다. 본 연구에서 제작된 primers의 염기서열은 Table 1에 나타난 바와 같다.

PCR 조건

PCR은 AccuPower HotStart PCR Premix (Bioneer, Korea)를 사용하였으며, 10 pmoles/ μ l로 희석된 forward 및 reverse primers 각각 1 μ l와 template DNA 용액 5 μ l를 첨가한 후 DW로 최종 20 μ l 되게 조정하였으며, DNA thermal cycler (TaKaRa, Japan)로 PCR을 실시하였다. 반응조건은 initial denaturation (94°C, 5분) 후, denaturation (94°C, 30초), annealing (56°C, 30초), extension (72°C, 30초)을 30회 반복하고 final extension (72°C, 5분)하였다. PCR 증폭산물은 2% agarose gel에서 100 V, 30분 전기영동한 후 유전자 증폭 유무를 관찰하였다.

특이도 검사

개발된 PCR의 특이도 검사는 *S. maltophilia* ATCC 13637을

비롯하여 돼지 정액 내 오염 빈도가 높거나 *S. maltophilia*와 유전적 상동성이 높다고 알려진 18종의 표준균주에서 DNA를 추출하여 관찰하였다.

민감도 검사

민감도는 순수 배양된 균액을 멸균식염수로 단계 희석하는 방법과 또는 원정액으로 단계 희석하는 방법 등 2가지로 측정하였다. *S. maltophilia* ATCC 13637을 nutrient broth에 접종하여 37°C, 24시간 배양한 후 멸균식염수로 십진 단계희석하여 1.5×10^7 - 1.5×10^1 CFU/ml까지 제작하였다. 각 희석단계별로 800 μ l씩 수거한 후 pellet을 멸균식염수로 원심 수세하여 DNA mini kit로 추출한 후 PCR의 민감도를 측정하였다. 상기 조건으로 순수 배양된 *S. maltophilia* 균액(1.5×10^8 CFU/ml)을 원정액으로 십진 단계희석하여 1.5×10^7 - 1.5×10^1 CFU/ml까지 제작하였다. 각 희석단계별로 1 ml씩 수거하여 3,000 rpm, 1분간 원심분리하여 정자를 침전시키고 상층액 800 μ l에서 pellet을 수거하였다. 이를 멸균식염수로 수세한 후 DNA mini kit로 DNA를 추출한 후 PCR을 실시하였다. 단, 원정액은 *S. maltophilia* 음성으로 확인된 것을 사용하였다.

PCR 기법과 균분리법의 비교

*S. maltophilia*에 대한 PCR기법의 검출 효율성을 평가하기 위하여 균분리법과 비교실험을 실시하였다. 즉, 원정액 440건을 대상으로 앞서 기술한 균분리법과 PCR 기법에 따라 검출 결과를 상호 비교하여 두 진단법간의 일치율, kappa value와 PCR 기법의 민감도, 특이도 등을 조사하였다.

항생제 감수성 검사

항생제 감수성 검사는 Kirby-Bauer disk diffusion 방법에 따라 실시하였다[7]. 항생제 disk는 amoxicillin/clavulanic acid (30 μ g), bacitracin (10 μ g), colistin (10 μ g), gentamicin (10 μ g), neomycin (30 μ g), oxytetracycline (30 μ g), penicillin (10 μ g), spectinomycin (100 μ g)(이상 8종; BD, USA)과 apramycin (15 μ g), ceftiofur (30 μ g), enrofloxacin (5 μ g), florfenicol (30 μ g)(이상 4종; Oxoid, UK) 등 총 12종을 사용하였다. 순수배양된 *S. maltophilia*를 멸균 PBS에 부유시켜 McFarland 탁도계로 0.6으로 농도를 조절하여 Muller Hinton agar (Difco, USA)에 접종하였다. 15분 이내에 항생제 disk를 배지 위에 배치한 후 37°C, 16-24시간 배양하여 억제환을 측정하였으며 제조사의 판독기준에 따라 판정하였다.

Table 1. Nucleotide sequences of primer developed in this study

| Primers | Nucleotide sequences (5' to 3') | GenBank No. | Product size (bp) |
|----------------|---------------------------------|-------------|-------------------|
| <i>chiA</i> -F | TGAAGGTGCTGATCTCGCTG | NC_010943 | 445 |
| <i>chiA</i> -R | GCCGACTGGTGATTGGTCTT | | |

결과 및 고찰

*S. maltophilia*에 대한 PCR 특이도 조사

S. maltophilia 검출을 위한 PCR 기법들은 높은 유전적 상동성으로 인하여 *Xanthomonas* spp. 또는 *Pseudomonas* spp.에 비특이 반응을 나타내는 단점이 있다[10]. 그러나 본 연구에서 개발된 PCR 기법의 특이도는 Fig. 1에 나타난 바와 같이, 돼지 원정액에서 분리 된도가 높다고 보고된 14종과 *S. maltophilia*와 유전적 상동성이 높다고 알려진 4종의 균주(*Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Pseudomonas fluorescens* 및 *Pseudomonas putida*)를 이용하여 조사하였으며, 그 결과 *S. maltophilia*에서만 445 bp의 특이 유전자 증폭산물이 확인되었다.

Whitby 등[21]은 *S. maltophilia*의 23S rRNA를 이용하여 종 특이 PCR을 보고하였으나, Foster 등[10]은 *Stenotrophomonas* spp.가 *Xanthomonas* spp.와 교차반응이 일어나며, *Pseudomonas* spp.와도 유전적 상동성이 높다고 보고하였다. 본 연구에서는 *S. maltophilia*의 *chiA* 유전자를 이용하여 primer를 작성하였으며, 교차반응이 유발된다고 보고된 균주에서는 PCR 증폭 산물이 검출되지 않아 본 PCR 기법이 *S. maltophilia* 검출에 매우 유용함을 알 수 있었다.

개발 PCR 기법의 민감도 조사

PCR 기법은 민감도가 높을수록 원정액에 오염된 극소량의 균수 검출에 유리하기 때문에 높은 민감도는 진단상 매우 중요하다. 본 연구에서 개발된 PCR 기법의 민감도는 순

수 배양된 *S. maltophilia* 균액에 대해서는 1.5×10^3 CFU/ml 까지 증폭산물이 확인되었으나(Fig. 2A), 원정액에 혼합된 *S. maltophilia*에 대해서는 1.5×10^4 CFU/ml까지 검출되어(Fig. 2B), 순수 배양균액보다 원정액 혼합균액에서 민감도가 약 10배정도 감소하였다. 세균은 정자에 부착하여 정자의 응집을 유발할 수 있는데, 이는 정자의 외막과 세균의 협막에 존재하는 mannose binding structure에 의한 것으로 알려져 있다[6,9,22]. 따라서 순수 배양균액보다 원정액 혼합균액에서 PCR 민감도가 약 10배 감소한 것은 세균이 정자에 부착하여 함께 침강하므로 원정액 혼합균액의 원심 상층액에는 순수 배양균액보다 균수의 감소가 유발되었기 때문인 것으로 추정되었다.

원정액의 *S. maltophilia* 오염을 조사 및 진단법간 비교

돼지 정액은 채취 과정을 고려할 때 무균적인 채취가 불가능하며, 웅돈이나 환경유래 세균의 오염 가능성이 매우 크다[3,4,5]. 이러한 오염세균 중 *S. maltophilia*는 물, 토양 등에 널리 존재할 뿐만 아니라 비위생적으로 채취된 돼지 정액에서 자주 검출되는 세균이다[13].

총 440건의 원정액에 대해 *S. maltophilia* 분리를 실시한 결과, 26건에서 분리되어 국내 원정액의 *S. maltophilia* 평균 오염율은 5.9%로 나타났으며, 봄이나 겨울철보다는 여름과 가을철에 *S. maltophilia* 오염율이 상대적으로 높게 나타났다(Table 2). 이러한 성적은 돼지 정액의 *S. maltophilia* 분리율이 2.0-15.5% 이었다는 보고와 유사하였으나[1,4,13], 인공수정선

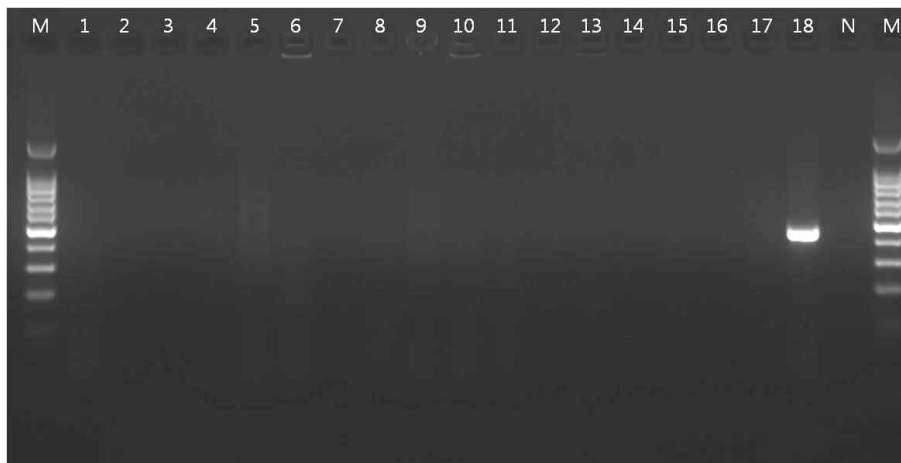


Fig. 1. Specificity of the PCR assays for the detection of *S. maltophilia*. The PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. Lane 1; *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 17906, lane 2; *Acinetobacter junii* ATCC 17908, lane 3; *Acinetobacter Iwoffii* ATCC 15309, lane 4; *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, lane 5; *Citrobacter freundii* ATCC 8090, lane 6; *Comamonas testosteroni* ATCC 11996, lane 7; *Enterobacter cloacae* ATCC 13535, lane 8; *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, lane 9; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, lane 10; *Myxococcus xanthus* ATCC 25232, lane 11; *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188, lane 12; *Proteus mirabilis* ATCC 29906, lane 13; *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, lane 14; *Pseudomonas putida* ATCC 12633, lane 15; *Serratia marcescens* ATCC 13880, lane 16; *Xanthomonas campestris* ATCC 13951, lane 17; *Xanthomonas oryzae* KCCM 11217, and lane 18; *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637, N; negative control, M; 100 bp DNA ladder (TaKaRa)

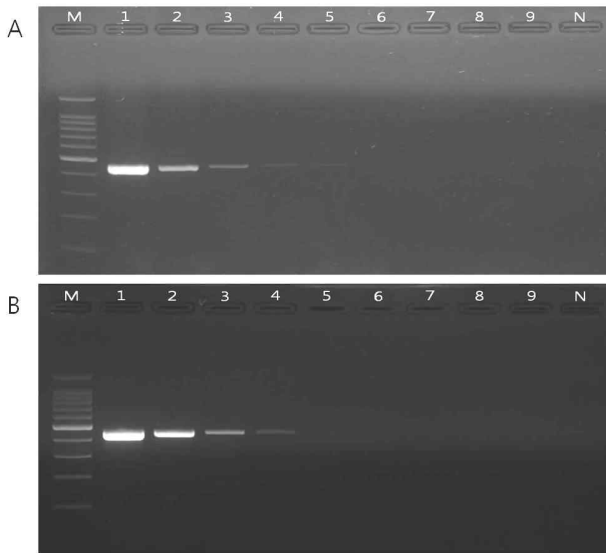


Fig. 2. Sensitivity test of PCR with 10-fold diluted samples; pure-cultured *S. maltophilia* was diluted with sterile saline and boar semen, respectively. Detection limit of the PCR was 1.5×10^3 CFU/ml with pure-cultured *S. maltophilia* (panel A) and 1.5×10^4 CFU/ml with *S. maltophilia* spiked in semen (panel B). Lane 1 to 9; serial 10-fold dilution of *S. maltophilia* (1.5×10^7 to 1.5×10^{-1} CFU/ml), N; negative control, M; 100 bp DNA ladder (GenDEPOT)

Table 2. Seasonal prevalence of *S. maltophilia* in unextended boar semen

| Year | Season | No. of <i>S. maltophilia</i> isolate/ tested semen (%) |
|-------|--------|---|
| 2009 | Fall | 19/116 (16.4) |
| 2011 | Spring | 0/58 (0) |
| | Summer | 4/76 (5.3) |
| | Fall | 3/100 (3.0) |
| | Winter | 0/90 (0) |
| Total | | 26/440 (5.9) |

터의 관리상태 및 정액 채취자의 위생수준에 따라 많은 차이가 있을 것으로 추측된다. 특히 *S. maltophilia*는 여름, 가을에 채취된 원정액에서 분리율이 높았는데 이러한 성적은 정액 내 세균오염 수준이 계절에 따라 차이가 있다는 Althouse 등의 보고와 유사하였다[5].

개발된 PCR기법을 *S. maltophilia* 균분리법과 비교한 결과, 비록 *S. maltophilia* 분리는 음성이었지만 PCR에서 양성인 시료가 5건(1.1%)으로 나타나 개발된 PCR기법이 균분리법보다 민감함을 알 수 있었다. 한편 나머지 435건(98.9%)의 시료는 모두 균분리법과 PCR 기법의 결과가 일치하였다. 따라서 두 진단법간의 일치율은 98.9%, kappa value는 0.906이었으며, PCR의 민감도와 특이도는 각각 100%, 98.7%로 나타나(Table

Table 3. Comparison of *S. maltophilia* PCR with *S. maltophilia* isolation

| PCR | <i>S. maltophilia</i> isolation | | Total |
|----------|---------------------------------|----------|-------|
| | Positive | Negative | |
| Positive | 26 | 5 | 31 |
| Negative | 0 | 409 | 409 |
| Total | 26 | 414 | 440 |

Sensitivity=100%, specificity=98.7%, agreement=98.9%, kappa value=0.906

Table 4. Antimicrobial susceptibility of *S. maltophilia* (n=26) isolated from boar semen

| Antimicrobial agents | No. of susceptible isolates (%) |
|-----------------------------|---------------------------------|
| amoxicillin/clavulanic acid | 0 (0) |
| apramycin | 0 (0) |
| bacitracin | 6 (23.1) |
| ceftiofur | 0 (0) |
| colistin | 16 (61.5) |
| enrofloxacin | 26 (100) |
| florfenicol | 24 (92.3) |
| gentamicin | 5 (19.2) |
| neomycin | 5 (19.2) |
| oxytetracycline | 11 (42.3) |
| penicillin | 0 (0) |
| spectinomycin | 0 (0) |

3), 본 연구에서 개발된 PCR기법이 균분리법을 보조하는 유용한 검사법으로 생각되었다.

분리균주의 항생제 감수성 검사

정액 희석제에는 glucose 등이 함유되어 있어 세균 발육이 용이하며, 더욱이 제품정액의 보관온도인 17°C에서도 다양한 세균들이 발육할 수 있다. 이러한 세균오염 정액은 생식기 질환과 산자수 감소 등의 경제적 손실을 유발할 수 있으므로, 정액채취 및 제조과정 중 세균오염 수준을 최대한 줄이도록 노력하여야 한다[5]. 특히 정액 내의 항생제 첨가는 정자의 수명 또는 운동성 등에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 소량 사용해야 하므로 다양한 오염균을 억제시킬 수 있는 유효 항생제를 선별하기란 매우 어렵다[4,8]. 과거 인공수정센터에서 널리 사용하였던 penicillin, streptomycin은 점차 내성율이 증가하기 때문에 최근에는 spectinomycin, gentamicin, neomycin, ampicillin, lincomycin, tylosin, polymyxin, enrofloxacin 등이 권장되고 있다[2,3,4,5].

국내 원정액에서 분리된 *S. maltophilia*의 항생제 감수성 검사 결과, enrofloxacin (100%), florfenicol (92.3%), colistin (61.5%)에 높은 감수성을 보였으며, 그 외 oxytetracycline (42.3%), bacitracin (23.1%), gentamicin (19.2%), neomycin (19.2%) 순으로 감수성이 나타났다. 그러나 amoxicillin/clavulanic acid, apramycin, ceftiofur, penicillin, spectinomycin에

서는 100%의 높은 내성율을 나타내었다(Table 4). 이러한 결과는 정액유래 세균들이 gentamicin에 내성율이 점차 증가한다는 Althouse 등의 보고와 유사하였으며[3], 만약 *S. maltophilia*에 오염이 심한 인공수정센터이라면 gentamicin의 교체를 고려해야 할 것으로 생각되었다.

*S. maltophilia*는 사람에 병원성이 높을 뿐만 아니라 돼지 정액에서도 빈번히 분리되는 균종이다. 따라서 본 연구에서는 돼지 정액에 *S. maltophilia*의 오염 유무를 신속히 파악하기 위해 PCR기법을 개발하였다. 개발된 PCR기법은 민감도, 특이도, 일치율이 높아 균분리법을 보조할 수 있을 것으로 생각되며, 신속·정확한 세균검사로 효율적인 정액관리 및 양돈 생산성 향상에 기여할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구개발과제인 「양돈 생산성 향상을 위한 인공수정용 정액 관리 체계 구축(20110401-086-510-001-05-00)」 과 농림수산검역검사본부 수의과학기술개발 연구사업(B-1541778-2012-13-01)의 지원에 의해 수행되었으며, 지원에 감사 드립니다.

References

- Ahn, G. Y., Yu, F. N., Jang, S. J., Kim, D. M., Park, G., Moon, D. S. and Park, Y. J. 2007. Pseudo-outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* due to contamination of bronchoscope. *Korean J. Lab. Med.* **27**, 205-209.
- Althouse, G. C. 2008. Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reprod. Domest. Anim.* **2**, 374-378.
- Althouse, G. C., Kuster, C. E., Clark, S. G. and Weisiger, R. M. 2000. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* **53**, 1167-1176.
- Althouse, G. C. and Lu, K. G. 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* **63**, 573-584.
- Althouse, G. C., Pierdon, M. S. and Lu, K. G. 2008. Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology* **70**, 1317-1323.
- Auroux, M. R., Jacques, L., Mathieu, D. and Auer, J. 1991. Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an *in-vitro* study in man with *Escherichia coli*. *Int. J. Andrology* **14**, 264-270.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**, 493-496.
- Bielanski, A. 2007. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology* **68**, 1-22.
- Diemer, T., Weidner, W., Michelmann, H. W., Schiefer, H. G., Rován, E. and Mayer, F. 1996. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. *Int. J. Andrology* **19**, 271-277.
- Foster, N. F., Harnett, G. B., Riley, T. V. and Chang, B. J. 2008. Cross-reaction of *Stenotrophomonas* and *Xanthomonas* species in a 23S rRNA gene-directed PCR for detection of *S. maltophilia*. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 4111-4113.
- Giordano, A., Magni, A., Trancassini, M., Varesi, P., Turner, R. and Mancini, C. 2006. Identification of respiratory isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* by commercial biochemical systems and species-specific PCR. *J. Microbiol. Methods* **64**, 135-138.
- Jang, K. S., Oh, J. Y., Kang, H. Y., Jin, J. S., Seol, S. Y., Kim, J., Lee, J. C., Cho, D. T. and Lee, Y. C. 2007. Genetic diversity of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens. *J. Bacteriol. Virol.* **37**, 79-89.
- Kim, H. Y., Byun, J. W., Shin, D. H., Kim, H. S., Yoon, H., Park, C. K., Lee, O. S. and Jung, B. Y. 2010. Bacterial contaminants in extended boar semen and selection of effective antimicrobials. *Korean J. Vet. Res.* **50**, 125-131.
- Laing, F. P., Ramotar, K., Read, R. R., Alfieri, N., Kureishi, A., Henderson, E. A. and Louie, T. J. 1995. Molecular epidemiology of *Xanthomonas maltophilia* colonization and infection in the hospital environment. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 513-518.
- Muder, R. R., Harris, A. P., Muller, S., Edmond, M., Chow, J. W., Papadakis, K., Wagener, M. W., Bodey, G. P. and Steckelberg, J. M. 1996. Bacteremia due to *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*: a prospective, multicenter study of 91 episodes. *Clin. Infect. Dis.* **22**, 508-512.
- Pankuch, G. A., Jacobs, M. R. and Appelbaum, P. C. 1994. Susceptibilities of 123 *Xanthomonas maltophilia* strains to ciprofloxacin, PD 131628, PD 138312, PD 140248, ciprofloxacin, and ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 369-370.
- Park, C. K., Hong, K. H., Son, S. J., Lee, Y. S. and Hahn, T. W. 2008. Identification of bacterial contaminants in porcine semen and its removal. *Korean J. Vet. Serv.* **31**, 547-554.
- Pinot, C., Deredjian, A., Nazaret, S., Brothier, E., Courmoyer, B., Segonds, C. and Favre-Bonté, S. 2011. Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from environmental and clinical samples: a rapid and efficient procedure. *J. Appl. Microbiol.* **111**, 1185-1193.
- Senol, E. 2004. *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. *J. Hosp. Infect.* **57**, 1-7.
- van Pelt, C., Verduin, C. M., Goessens, W. H., Vos, M. C., Tümmeler, B., Segonds, C., Reubsæet, F., Verbrugh, H. and van Belkum, A. 1999. Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2158-2164.
- Whitby, P. W., Carter, K. B., Burns, J. L., Royall, J. A., LiPuma, J. J. and Stull, T. L. 2000. Identification and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-directed PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 4305-4309.
- Wolff, H., Panhans, A., Stolz, W. and Meurer, M. 1993.

Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*. *Fertil. Steril.* **60**, 154-158.

23. You, I. C., Lee, S. H., Park, Y. G. and Yoon, K. C. 2007.

Clinical aspect and prognosis of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* keratitis. *J. Korean Ophthalmol.* **48**, 889-897.

초록 : 돼지 정액에서 분리된 *Stenotrophomonas maltophilia* 확인을 위한 PCR 기법 개발 및 분리 균주의 항생제 감수성 양상

정병열^{1*} · 박범수¹ · 김하영¹ · 변재원¹ · 김애란¹ · 전병운¹ · 김인철² · 정기화³

(¹농림수산검역검사본부 세균질병과, ²국립축산과학원 양돈과, ³경남과학기술대학교 동물소재공학과)

돼지 정액의 세균오염은 정자활력 감소나 수태율 저하 등을 유발하는데, 특히 *Stenotrophomonas maltophilia*는 자연환경에 널리 존재하여 비위생적으로 채취된 정액에 많이 오염될 뿐 아니라 사람에게도 병원성을 일으킨다. 본 연구에서는 *S. maltophilia*의 검사 시간 단축과 정확도를 높이고자 PCR 기법을 개발하였으며, 돼지 원정액에서 이들 세균의 오염을 조사하고 유효 항생제를 선별하고자 하였다. 돼지 원정액에서 분리 빈도가 높은 18 균종을 대상으로 PCR을 적용한 결과, *S. maltophilia*에서만 445 bp의 특이 유전자 증폭산물이 확인되었다. 또한 순수 배양된 *S. maltophilia*는 1.5×10^3 CFU/ml까지, 원정액에 혼합된 *S. maltophilia*에 대해서는 1.5×10^4 CFU/ml까지 검출이 가능하였다. 2009년에 116건과 2011년 324건 등 총 440건의 원정액 중 26건(5.9%)에서 *S. maltophilia*가 분리되었으며, 여름과 가을철에 오염율이 상대적으로 높게 나타났다. 균분리법과 PCR간의 일치율은 98.9%, kappa value는 0.906이었으며, PCR의 민감도와 특이도는 각각 100%, 98.7%로 나타났다. 분리균주의 항생제 감수성 시험 결과, enrofloxacin (100%)과 florfenicol (92.3%)에 높은 감수성을 보였으나 amoxicillin/clavulanic acid, apramycin, cef-tiofur, penicillin, spectinomycin에는 내성율이 높게 나타났다. 결론적으로 개발된 PCR기법은 민감도, 특이도, 일치율이 높아 균분리법을 보조하고 신속·정확하게 정액 내 오염세균을 확인할 수 있어 효율적인 정액관리가 가능할 것으로 기대된다.