

## Specific Detection of *Serratia marcescens* Based on a PCR Assay and Antimicrobial Susceptibility of *S. marcescens* Isolated from Boar Semen

Ji-A Jung<sup>1</sup>, Aeran Kim<sup>1</sup>, Byoung Joo Seo<sup>1</sup>, Suk Chan Jung<sup>1</sup>, In Cheul Kim<sup>2</sup>, Ki Hwa Chung<sup>3</sup> and Byeong Yeal Jung<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Bacteriology Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 430-757, Korea

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

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

Received July 10, 2013 / Revised September 6, 2013 / Accepted September 9, 2013

During the collection of boar semen, bacterial contamination usually occurs. The contamination has deleterious effects both on semen quality and on sow fertility. The majority of contaminants are gram-negative bacteria, especially *Serratia marcescens*. In this study, we developed a PCR assay for the identification of *S. marcescens* targeting the *luxS* gene (GenBank no. EF164926). *S. marcescens* yielded a specific 306 bp PCR product. However, no amplification was observed in the other strains tested. The detection limit of PCR was 50 pg/ $\mu$ l of template DNA of *S. marcescens*. The antimicrobial susceptibility patterns of *S. marcescens* isolated from boar semen were tested using the disk diffusion method. Gentamicin, ceftiofur, florfenicol, and neomycin showed high sensitivity in this test. The minimum inhibitory concentration (MIC) was also determined by the broth microdilution method. The MIC<sub>90</sub> values of ceftiofur, enrofloxacin, gentamicin, and neomycin were 8, 8, 8, and 16  $\mu$ g/ml, respectively. These results indicate that PCR amplification of the *luxS* gene is a reliable and effective method for the identification of *S. marcescens* and that ceftiofur, enrofloxacin, gentamicin, and neomycin are effective semen extenders for controlling *S. marcescens*.

**Key words** : *Serratia marcescens*, boar semen, PCR assay, *luxS* gene, antimicrobials

### 서 론

국내 돼지 인공수정 보급률은 1994년 이후 급속히 확산되어, 현재 50여개 인공수정센터가 분포하며 인공수정에 의한 돼지 생산은 약 90%에 이른다. 이처럼 우리나라도 유럽의 양돈 선진국 수준으로 돼지 인공수정 보급률이 상승함에 따라 종축개량과 산자수 향상 등의 측면에서 국내 양돈산업 발전에 이바지한 바가 크다. 그러나 정액을 채취하는 작업환경, 비위생적인 제조환경 등 다양한 외부 요인으로 인해 제품정액 내 세균오염이 다발하고 있다[1]. 이러한 세균오염은 정자의 품질 저하, 생존기간 단축뿐 아니라 세균오염 정액이 자궁 내로 유입되면 암태지의 생식기 질환, 수태율 저하 등을 유발하기도 한다[2].

인공수정을 위한 돼지정액 제품에서 주로 분리되는 세균으로 외국에서는 *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.,

*Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. 등이 보고되어 있으며[21, 22], 국내에서는 *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *Bacillus* spp., *Pasteurella* spp., *Acinetobacter* spp., *Serratia* spp., *E. coli* 등의 보고와[18], *Stenotrophomonas maltophilia*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Myroides* spp., *Ochrobactrum anthropi* 등의 보고가 있다[12]. 인공수정용 정액제품 내 세균오염 원인은 종모돈의 질병감염과 같은 내부 요인보다 정액채취 및 제조환경 등 외부 요인에 의한 것으로 알려져 있다. 특히 *Serratia marcescens*는 토양, 물 등 환경에 널리 분포하고 있으며, 다양한 경로를 통해 돼지정액에 오염되는 주요 오염균으로 알려져 있다[2, 10].

일반적으로 세균동정은 생화학적인 성상 차이에 근거한 동정법과 특정 유전자를 검출하여 확인하는 방법 등이 있다. 그러나 생화학적인 성상에 의한 동정법은 시간이 많이 소모될 뿐 아니라 다른 균종들과의 감별이 쉽지 않아 최근에는 PCR에 기초한 유전자 검출법이 유용하게 사용되고 있다. Liu 등이 ERIC-PCR을 이용하여 *S. marcescens*의 역학 연구를 수행하였으나[15], 현재까지 *S. marcescens*를 특이적으로 검출할 수 있는 PCR용 특정 primers는 개발되지 않은 실정이다.

*S. marcescens*는 그람음성 간균으로서 최근에는 폐렴, 패혈증, 뇌수막염, 창상감염, 요로감염 등을 유발하는 심각한 원내

#### \*Corresponding author

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

E-mail : jungby@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Reference strains used in this study

Genus	Species	Strain	
<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonii</i>	ATCC <sup>1</sup>	17909
<i>Acinetobacter</i>	<i>haemolyticus</i>	ATCC	17906
<i>Acinetobacter</i>	<i>junii</i>	ATCC	17908
<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	ATCC	15309
<i>Alcaligenes</i>	<i>xylosoxidans</i>	ATCC	15173
<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>	ATCC	25285
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	ATCC	25416
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	ATCC	8090
<i>Comamonas</i>	<i>testosteroni</i>	ATCC	11996
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	ATCC	13047
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	ATCC	13883
<i>Kocuria</i>	<i>rosea</i>	ATCC	186
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	ATCC	4698
<i>Ochrobactrum</i>	<i>anthropi</i>	ATCC	49188
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	ATCC	29906
<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	ATCC	13525
<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	ATCC	12633
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	ATCC	13637
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	ATCC	13880
<i>Serratia</i>	<i>liquefaciens</i>	ATCC	27592
<i>Serratia</i>	<i>odorifera</i>	ATCC	33077
<i>Serratia</i>	<i>plymuthica</i>	KCTC <sup>2</sup>	2924
<i>Serratia</i>	<i>rubicida</i>	KCTC	2927

<sup>1</sup>ATCC; American Type Culture Collection

<sup>2</sup>KCTC; Korean Collection for Type Cultures

감염균으로 인식되고 있으며[11, 19], aminoglycosides와 β-lactams계열의 항생제에 높은 내성률을 나타내고 있다[7].

이러한 내용을 배경으로, 본 연구에서는 *S. marcescens*에 특이적인 PCR기법을 개발하고, 아울러 국내 돼지정액 유래주의 항생제 감수성 양상, 최소생육억제농도, 최소살균농도 등을 조사하여 정액 희석제에 활용될 수 있도록 유효 항생제를 선별하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### *Serratia marcescens* 분리법

국내 인공수정센터에서 생산된 돼지 원정액 100 μl를 5% sheep blood agar plate (Asan pharmaceutical, Korea)와 MacConkey agar (Difco, USA)에 접종하여 37°C, 18~24시간, 호기 배양하였다. 비용혈성이며 lactose 음성인 유사 집락을 순수분리하여 VITEK 2 Compact (bioMérieux, France)로 분리균주의 동정을 실시하였다.

#### 사용균주 및 primers 제작

본 연구에 사용된 균주는 돼지정액에서 분리빈도가 높다고 보고된 균종과(Table 1) 국내 돼지정액에서 분리된 *S. marcescens*를 사용하였다. Zhu 등은 *luxS* 유전자를 이용하여 *Serratia*에 대한 genus-specific PCR 기법을 보고한 바 있다[23]. 본 실험에서는 *Serratia marcescens*에 대한 species-specific PCR을 개발하기 위하여 quorum-sensing gene으로 알려진 *luxS* 유전자를 대상으로 primers를 제작하였으며, 그 염기서열은 Table 2에 나타난 바와 같다.

#### DNA 추출 및 PCR 조건

면양혈액배지에서 24~48시간 배양된 균을 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, USA)로 DNA를 추출하여 template DNA 용액으로 사용하였다. PCR은 Maxime PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 사용하였으며, 10 pmoles/μl로 희석된 forward, reverse primers (Table 2) 각각 1 μl와 template DNA 용액 1 μl를 첨가한 후 멸균증류수로 최종 20 μl 되도록 조정하여 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)를 이용하여 PCR을 실시하였다. 반응조건은 initial denaturation (94°C, 5분) 후, denaturation (94°C, 30 초), annealing (56°C, 30 초), extension (72°C, 30 초)을 30회 반복하고, final extension (72°C, 5 분)을 실시하였다. PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel, 145 V, 45분 전기영동하여 특이 유전자 증폭유무를 관찰하였다.

#### PCR 특이도 및 민감도 검사

*S. marcescens* ATCC 13880을 포함하여 돼지정액에서 분리 보고된 19종의 표준균주를 개발된 PCR기법에 적용하여 특이도를 관찰하였으며, 5종의 *Serratia* spp.를 사용하여 중간 교차 반응 유무를 조사하였다. 또한 개발 PCR기법이 국내 돼지정액에서 분리된 *S. marcescens*에 적용이 가능한지 알아보기 위하여 돼지정액 유래의 *S. marcescens* 분리균주 6주를 PCR에 적용하였다.

민감도 측정은 순수 배양된 *S. marcescens* ATCC 13880을 QIAamp DNA Mini Kit로 DNA를 추출하여 50 ng/μl로 조정 한 후 이를 멸균 증류수로 5 fg/μl까지 10진 단계희석하여 개발 PCR기법의 검출민감도를 조사하였다.

#### 항생제 감수성 검사

국내 돼지정액에서 분리된 *S. marcescens*의 항생제 감수성 검사는 Bauer 등의 방법에 따라 실시하였다[4]. 간략히 설명하면, 신선하게 배양된 *S. marcescens*를 멸균 PBS (Difco, USA)에

Table 2. Nucleotide sequences of primers developed in this study

Primer	Nucleotide sequences (5' to 3')	GenBank no.	Product size (bp)
luxS-F	GAAAACGCCTCATGGCGATA	EF164926	306
luxS-R	TGGTACTCGTTCAGCTCAGG		

부유시킨 후 McFarland 탁도계로 0.6~0.9되도록 조절하여 Mueller Hinton Agar (Difco, USA)에 도말하였다. 15분 이내에 항생제 디스크를 배지 위에 배치한 후 37°C, 24시간 배양하여 억제환을 측정하였다. 사용된 항생제(농도)는 총 12종으로서 ampicillin (10 µg), bacitracin (10 µg), colistin (10 µg), gentamicin (10 µg), neomycin (30 µg), penicillin (10 µg)(이상 6종; BD, USA)과 apramycin (15 µg), ceftiofur (30 µg), enrofloxacin (5 µg), florfenicol (30 µg), oxytetracycline (30 µg), spectinomycin (100 µg)(이상 6종; Oxoid, UK)을 사용하였다. 감수성 유무는 제조사의 판독 기준에 따라 판정하였다.

#### 최소생육억제농도(MIC)와 최소살균농도(MBC) 측정

항생제에 대한 MIC 측정은 CLSI guideline에 따라 micro-broth dilution 방법으로 다음과 같이 실시하였다[6]. 배양균액을 McFarland No. 0.5~0.6으로 조절한 후 Mueller Hinton broth로 다시 1:100 (v/v) 희석하였다. 희석된 배양균액은 항생제가 단계희석된 96 well microplate (SPL, Korea)에 동량 접종하여 37°C, 24시간 배양하였다. 사용한 항생제 및 농도 범위는 spectinomycin (1~1,024 µg/ml), apramycin (0.5~512 µg/ml), colistin, florfenicol, neomycin (0.25~256 µg/ml), bacitracin, gentamicin (0.13~128 µg/ml), ampicillin, ceftiofur, enrofloxacin, penicillin (0.06~64 µg/ml), oxytetracycline (0.03~32 µg/ml)이었다. 항생제가 첨가되지 않은 growth control을 설정하였으며, MIC 판독은 배양액이 생육하지 않은 농도 중 항생제가 최소 첨가된 농도로 결정하였으며, 대조균주로 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

한편, MBC 측정은 확인된 MIC 농도를 포함하여 균 생육이

억제된 배양액을 면양혈액배지에 접종하여 37°C, 24시간 배양한 후 면양혈액배지에서 접종액의 균 생육이 나타나지 않는 최소농도로 판정하였다[14].

## 결 과

#### PCR의 특이도 및 민감도

본 연구에서 개발된 PCR 기법의 특이도를 확인한 결과, *S. marcescens* ATCC 13880에서만 306 bp의 특이 유전자 증폭산물이 확인되었으며, 그 외 돼지정액에서 많이 분리되는 *Pseudomonas* spp.를 비롯한 18균종에서는 전혀 유전자 증폭산물이 관찰되지 않았다(Fig. 1). 또한 검사한 *Serratia* spp. 5종에 대해서도 *S. marcescens*를 제외한 나머지 4종(*S. liquefaciens*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. rubidaea*)에서는 음성으로 확인되었다(Fig. 2). 한편 국내 돼지정액에서 분리된 6주의 *S. marcescens*에서 특이 유전자 증폭산물이 확인되어(Fig. 3), 본 연구에서 개발한 PCR 기법이 *S. marcescens*를 특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

개발 PCR 기법의 민감도를 확인한 결과, *S. marcescens*에서 추출한 DNA 용액 50 pg/µl까지 검출이 가능하였다(Fig. 4).

#### 항생제 감수성 검사

국내 돼지정액에서 분리된 *S. marcescens*를 대상으로 항생제 디스크로 감수성 시험을 실시한 결과, gentamicin (100%), ceftiofur (83.3%), florfenicol (83.3%), neomycin (83.3%)에서는 높은 감수성을 나타냈으며, apramycin (66.7%), enrofloxacin (66.7%), oxytetracycline (50.0%), spectinomycin

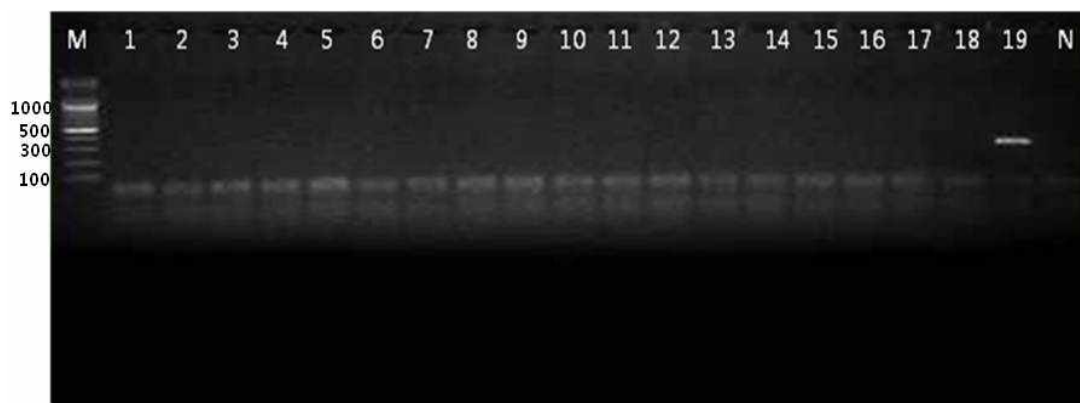


Fig. 1. Specificity test of PCR for the detection of *Serratia marcescens*. The PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. Lane 1; *Acinetobacter johnsonii* ATCC 17909, 2; *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 17906, 3; *Acinetobacter junii* ATCC 17908, 4; *Acinetobacter Iwoffii* ATCC 15309, 5; *Alcaligenes xylosoxidans* ATCC 15173, 6; *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, 7; *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, 8; *Citrobacter freundii* ATCC 8090, 9; *Comamonas testosteroni* ATCC 11996, 10; *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, 11; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, 12; *Kocuria rosea* ATCC 186, 13; *Micrococcus luteus* ATCC 4698, 14; *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188, 15; *Proteus mirabilis* ATCC 29906, 16; *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, 17; *Pseudomonas putida* ATCC 12633, 18; *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637, 19; *Serratia marcescens* ATCC 13880, N; negative control, M; 100 bp DNA ladder.

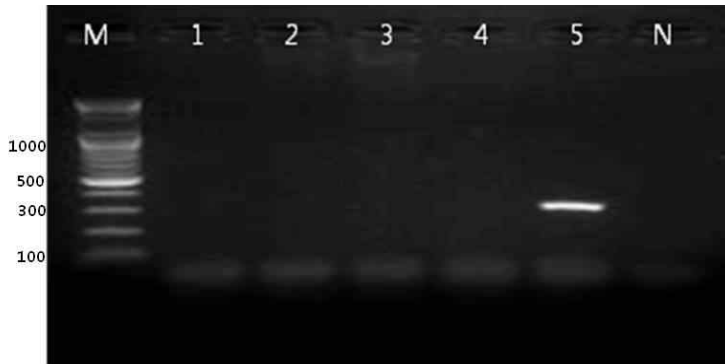


Fig. 2. PCR results of specific detection with *Serratia marcescens* among the tested *Serratia* species. Lane 1; *Serratia liquefaciens* ATCC 27592, 2; *Serratia odorifera* ATCC 33077, 3; *Serratia plymuthica* KCTC 2924, 4; *Serratia rubidaea* KCTC 2927, 5; *Serratia marcescens* ATCC 13880, N; negative control, M; 100 bp DNA ladder

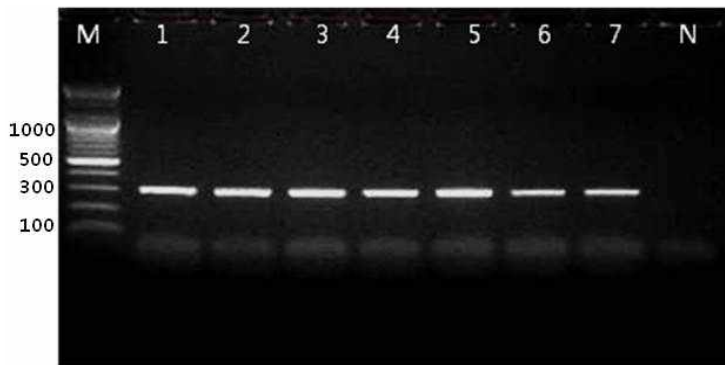


Fig. 3. PCR results for the detection of *Serratia marcescens* isolated from boar semen using *luxS* primers. Lane 1 to 6; *Serratia marcescens* field isolates. 7; *Serratia marcescens* ATCC 13880, N; negative control, M; 100 bp DNA ladder.

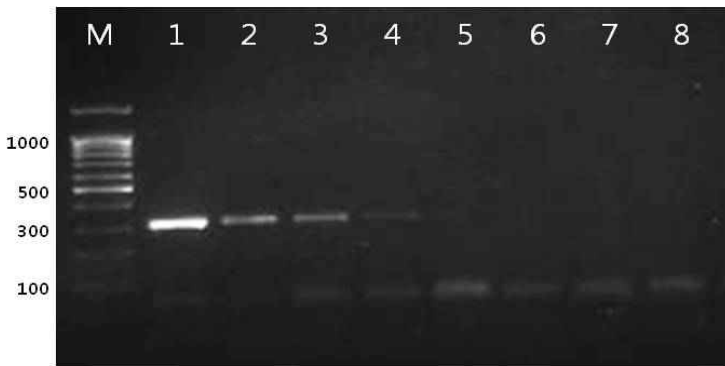


Fig. 4. Sensitivity of PCR using 10-fold dilution of DNA solution with *Serratia marcescens*. Detection limit of the PCR was 50 pg/μl. Lane 1 to 8; 10-fold diluted DNA solution from 50 ng/μl to 5 fg/μl, respectively. M; 100 bp DNA ladder.

(50.0%), colistin (33.3%) 순으로 감수성이 나타났다. 하지만 ampicillin, bacitracin, penicillin에서는 모든 분리균주가 100% 내성율을 나타내었다(Table 3).

MIC 및 MBC

돼지정액 유래 *S. marcescens*의 항생제 MIC를 조사한 결과, bacitracin, colistin, oxytetracycline, penicillin의 경우 사용된 항생제 농도범위 중 최고농도에서도 균이 생육하였으며, florfenicol과 spectinomycin의 MIC<sub>50</sub>은 각각 64 μg/ml와 16 μg/ml로 나타났다. 한편 apramycin과 ampicillin의 MIC<sub>50</sub>은 각각 16 μg/ml과 32 μg/ml이었으며, ceftiofur, enrofloxacin, gentamicin, neomycin의 MIC<sub>50</sub>는 각각 2 μg/ml, 1 μg/ml, 4 μg/ml, 2 μg/ml로 나타났다(Table 4).

검사한 대부분의 항생제에서 MIC와 MBC의 결과가 유사하

였으며, bacitracin, colistin, florfenicol, oxytetracycline, penicillin, spectinomycin의 경우에는 사용한 최고 농도의 항생제에서도 분리주가 살균되지 않았다. 한편 gentamicin, neomycin, spectinomycin의 MBC<sub>90</sub>은 MIC<sub>90</sub>보다 2~3단계 높은 항생제 농도에서 분리주가 살균되었다.

고 찰

본 연구에서는 돼지정액에 빈번히 오염되지만 PCR진단법이 확립되어 있지 않은 *S. marcescens*에 대한 PCR 진단법을 개발하였고, 돼지정액 희석체에 활용도를 높이기 위하여 항생제 감수성, MIC 및 MBC실험을 통하여 유효 항생제 농도를 알아보고자 하였다.

*luxS*유전자를 이용한 개발 PCR 기법은 돼지정액 내 오염빈

Table 3. Antimicrobial susceptibility results of *Serratia marcescens* (n=6) isolated from boar semen in Korea by disk diffusion method

Antimicrobial agent	No. of susceptible isolates (%)
Ampicillin	0
Apramycin	4 (66.7)
Bacitracin	0
Ceftiofur	5 (83.3)
Colistin	2 (33.3)
Enrofloxacin	4 (66.7)
Florfenicol	5 (83.3)
Gentamicin	6 (100)
Neomycin	5 (83.3)
Oxytetracycline	3 (50.0)
Penicillin	0
Spectinomycin	3 (50.0)

Table 4. MIC and MBC results of *Serratia marcescens* isolated from boar semen

Antimicrobial agent	Range (μg/ml)	MIC		MBC	
		50%	90%	50%	90%
Ampicillin	6-64	32	32	32	32
Apramycin	0.5-512	16	32	16	32
Bacitracin	0.13-128	>128	>128	>128	>128
Ceftiofur	0.06-64	2	8	4	8
Colistin	0.25-256	>256	>256	>256	>256
Enrofloxacin	0.06-64	1	8	1	8
Florfenicol	0.25-256	64	128	>256	>256
Gentamicin	0.13-128	4	8	4	32
Neomycin	0.25-256	2	16	4	128
Oxytetracycline	0.03-32	>32	>32	>32	>32
Penicillin	0.06-64	>64	>64	>64	>64
Spectinomycin	1-1024	16	256	16	>1024

도가 높은 균종들에 대해서 유전자 증폭산물을 형성하지 않았으며 *S. marcescens*만 특이적으로 검출할 수 있었다. 한편 개발 PCR 기법은 *S. marcescens* DNA를 50 pg/μl까지 검출이 가능하였다. *S. marcescens*의 역학연구를 위하여 RAPD, ERIC-PCR, REP-PCR 등이 이용되었고[20], Patton 등은 환자에서 분리한 62주의 *S. marcescens* 분석을 위하여 RAPD, REP-PCR 등을 활용하였다[17]. 한편 Zhu 등은 *ptsA*와 *luxS* 유전자를 이용하여 *Serratia* spp.에 대한 PCR 기법을 보고하였지만[23], *S. marcescens*를 특이적으로 검출할 수 있는 기법은 아직 개발되지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서 개발된 PCR기법은 돼지정액의 주요 오염세균 중 하나인 *S. marcescens*를 특이적으로 검출할 수 있을 것으로 생각된다.

오염세균에 의한 돼지정액의 품질저하를 최소화하기 위해 희석제에는 spectinomycin, gentamicin, neomycin, ampicillin, enrofloxacin 등 다양한 항생제를 사용하고 있다[1, 3]. 그러나 *S. marcescens*에 대해서 plasmid 매개성 extended-

spectrum β-lactamases뿐 아니라 다양한 내성기전과 항생제 감수성 결과가 보고되어 있다[5, 9, 16].

Cooksey 등은 병원에서 분리한 *S. marcescens*를 이용하여 감수성시험을 실시한 결과, gentamicin, nalidixic acid, chloramphenicol, sulfisoxazole에서는 80% 이상의 높은 감수성을, 반면에 cephalothin, ampicillin, tetracycline에서는 90% 이상의 내성을 보고하였다[7]. 한편 Kim은 병원 유래 *S. marcescens*는 cephalothin, sulfamethoxazole, ampicillin, tetracycline에서 90% 이상의 내성을 보고하였다[13]. 본 연구에서는 국내 돼지정액에서 분리된 *S. marcescens*를 대상으로 12종의 수용성 항생제로 감수성 시험을 실시한 결과, gentamicin, ceftiofur, florfenicol, neomycin에서 80% 이상의 높은 감수성을 나타내었으며(Table 3), 이러한 결과는 gentamicin에 감수성이 높다는 Cooksey 등의 결과와 유사하였다[7].

Sone 등은 돼지정액에서 분리한 11종의 세균으로 MIC 실험을 실시하였으며, dibekacin, amikacin, gentamicin (MIC, <6.25 μg/ml)이 검사한 다른 항생제에 비하여 효과가 우수하다고 보고하였다[21]. 그러나 Shin은 환자 유래주를 대상으로 MIC를 측정된 결과, amikacin과 gentamicin의 MIC가 512 μg/ml 이상이었으며[20], Fritsche 등은 aminoglycoside 계열 항생제 9종으로 *S. marcescens*에 대한 MIC를 측정된 결과, apramycin과 neomycin을 제외하고 나머지 7종의 MIC가 128 μg/ml 이상으로 높게 나타났다[8].

본 연구에서는 돼지정액 유래 *S. marcescens*의 MIC를 조사한 결과, gentamicin의 MIC<sub>50</sub>과 MIC<sub>90</sub>은 각각 4 μg/ml과 8 μg/ml이었는데(Table 4), 이는 gentamicin이 *S. marcescens*에 유효하다는 Sone 등[21]의 결과와 유사하였지만 Fritsche 등 [8], Shin [20]의 보고와는 차이가 있었다. 이러한 차이는 검사균주의 분리재료, 축종, 국가별 항생제 사용현황 등에 따라 내성률의 차이가 나타난 것으로 추정되었다. 따라서 돼지 정액제품에서 분리된 세균의 항생제 내성을 변화를 주기적으로 조사하여 국내 돼지 정액 희석제용으로 적합한 항생제 선발이 필요할 것으로 판단된다.

항생제는 다양한 작용기전으로 세균의 증식을 억제시키지만 과용량 사용 시에는 오히려 숙주세포변성을 초래할 수 있다. 자료로 제시되지 않았지만, 본 연구에서는 동물세포주 (vero cell)를 이용하여 사용한 항생제의 세포변성 유무를 조사하였는데, 검사한 항생제 12종(Table 4)을 최고농도로 동물세포주 적용하여도 세포변성효과는 나타나지 않았다.

본 연구에서 개발된 PCR기법을 사용하면 돼지정액에 빈번히 오염되는 *S. marcescens*를 효율적으로 검출할 수 있을 것으로 판단되었다. 한편, MIC 시험으로 선발된 ceftiofur, enrofloxacin, gentamicin은 희석액 ml당 8 μg을 첨가하여 사용하는 것이 권장되며, neomycin은 희석액 ml당 16 μg이 권장되었다. 이러한 항생제는 국내 돼지정액의 주요 오염세균인 *S. marcescens* 관리에 적합한 희석제용 항생제로 판단되며, 위생

적인 정액 공급으로 돼지 번식효율 상승 및 생산성 향상에 이바지할 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구개발과제인 「양돈 생산성 향상을 위한 인공수정용 정액 관리체계 구축(20110401-086-510-001-05-00)」과 농림축산검역본부의 농림축산검역검사기술개발사업(AD005-12-21)의 지원에 의해 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

### References

1. 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.
2. Althouse, G. C. and Lu, K. G. 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* **63**, 573-584.
3. 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.
4. 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.
5. Bennett, P. M. and Chopra, I. 1993. Molecular basis of beta-lactamases induction in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 153-158.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; CLSI document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania, USA.
7. Cooksey, R. C., Bannister, E. R. and Farrar, W. E. Jr. 1975. Antibiotic resistance patterns of clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* **7**, 396-399.
8. Fritsche, T. R., Castangeira, M., Miller, G. H., Jones, R. N. and Armstrong, E. S. 2008. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1843-1845.
9. Garcia, D. C., Woloj, G. M., Pineiro, S., Sordelli, D. O. and Kaufman, S. 1995. An 8-year study of resistance to amikacin in gram-negative bacilli isolates from patients with nosocomial infections at one hospital in Argentina. *J Med Microbiol* **42**, 283-290.
10. Grimont, F. and Grimont, P. A. D. 2006. The Genus *Serratia*, pp. 219-244. In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E. (eds.),

*The Prokaryotes*. Springer: New York, USA.

11. Kappstein, I., Schneider, C. M., Grundmann, H., Scholz, R. and Janknecht, P. 1999. Long-lasting contamination of a vitrectomy apparatus with *Serratia marcescens*. *Infect Control Hosp Epidemiol* **20**, 192-195.
12. 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* **50**, 125-131.
13. Kim, K. H. 1994. Studies on drug resistance and R-plasmid of enteric pathogenic (*E. coli*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*) isolated from patients. MS Dissertation. Dankook University, Cheonan, Korea.
14. Kim, S. T., Hwang, J. Y., Sung, M. S., Je, S. Y., Bae, D. R., Han, S. M. and Lee, S. H. 2006. The minimum inhibitory concentration (MIC) of bee venom against bacteria isolated from pigs and chickens. *Korean J Vet Serv* **29**, 19-26.
15. Liu, P. Y., Lau, Y. J., Hu, B. S., Shir, J. M., Cheung, M. H., Shi, Z. Y. and Tsai, W. S. 1994. Use of PCR to epidemiology of *Serratia marcescens* isolates in nosocomial infection. *J Clin Microbiol* **32**, 1935-1938.
16. Nass, T., Vandel, L., Sougakoff, W., Livermore, D. M. and Nordmann, P. 1994. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 1262-1270.
17. Patton, T. G., Katz, S., Sobieski, R. J. and Crupper, S. S. 2001. Genotyping of clinical *Serratia marcescens* isolates: a comparison of PCR-based methods. *FEMS Microbiol Lett* **194**, 19-25.
18. Ryu, J. W., Cho, K. H., Hong, J. K., Kim, M. J., Park, J. C., Jung, I. B. and Kim, I. C. 2008. Characterization of bacteria and their antibiotic sensitivities in porcine liquid semen. *J Anim Sci Technol* **50**, 793-798.
19. Sartor, C., Jacomo, V., Duvivier, C., Tissot-Dupont, H., Sambuc, R. and Drancourt, M. 2000. Nosocomial *Serratia marcescens* infections associated with extrinsic contamination of a liquid nonmedicated soap. *Infect Control Hosp Epidemiol* **21**, 196-199.
20. Shin, K. S. 2003. Molecular typing of *Serratia marcescens* by RAPD, ERIC-PCR and REP-PCR. *Korean J Lab Med* **23**, 119-125.
21. Sone, M., Ohmura, K. and Bamba, K. 1982. Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. *Vet Rec* **111**, 11-14.
22. Tamuli, M. K., Sharma, D. K. and Rajkonwar, C. K. 1984. Studies on the microbial flora of boar semen. *Indian Vet J* **61**, 858-861.
23. Zhu, H., Sun, S. J. and Dang, H. Y. 2008. PCR detection of *Serratia* spp. using primers targeting *pts* and *luxS* genes involved in AI-2-dependent quorum sensing. *Curr Microbiol* **57**, 326-330.

초록 : *Serratia marcescens* 검출을 위한 PCR 기법 개발 및 돼지정액 유래균주에 대한 항생제 감수성  
양상

정지아<sup>1</sup> · 김애란<sup>1</sup> · 서병주<sup>1</sup> · 정석찬<sup>1</sup> · 김인철<sup>2</sup> · 정기환<sup>3</sup> · 정병열<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>농림축산검역본부 세균질병과, <sup>2</sup>국립축산과학원 양돈과, <sup>3</sup>경남과학기술대학교 동물소재공학과)

돼지 원정액의 채취나 희석정액의 제조과정 중 세균오염이 많이 발생하는데, 이는 정자활력의 감소뿐 아니라 모든의 수태율 저하 등을 유발한다. 특히 *Serratia marcescens*는 환경에 널리 존재하며 비위생적으로 제조된 정액에 많이 분리되고 있다. 본 연구에서는 *S. marcescens*의 신속한 동정을 위하여 PCR 기법을 개발하였으며, 국내 돼지정액 유래 *S. marcescens*를 이용하여 최소생육억제농도(MIC) 등을 조사하고 유효 항생제를 선발하고자 하였다. 개발된 PCR 기법은 *S. marcescens*에서만 306 bp의 특이 유전자 증폭산물을 형성하였으며, 기타 돼지정액에서 분리 보고된 균주나 *Serratia* 속군에서는 유전자 증폭 산물이 형성되지 않아 특이성이 인정되었다. PCR 기법의 민감도는 *S. marcescens*에서 추출된 DNA 50 pg/ $\mu$ l까지 검출이 가능하였다. 디스크확산법에 의한 국내 돼지정액 유래 *S. marcescens*의 항생제 감수성을 조사한 결과, gentamicin, ceftiofur, neomycin 등에서 80% 이상의 높은 감수성을 보였다. 한편 ceftiofur, enrofloxacin, gentamicin, neomycin의 MIC<sub>90</sub>는 각각 8, 8, 8, 16  $\mu$ g/ml로 나타났다. 따라서 개발된 PCR 기법은 *S. marcescens*를 동정하는 유용한 방법이며, gentamicin 등 선발된 항생제는 *S. marcescens*에 의한 정액 내 세균오염을 관리하기 위한 희석제용 항생제로 추천된다.