

## Analysis of Acquired Resistance Genes in *Stenotrophomonas maltophilia*

Jeong Hoon Song, M.D.<sup>1</sup>, Ji Youn Sung, Ph.D.<sup>1</sup>, Kye Chul Kwon, M.D.<sup>1</sup>, Jong Woo Park, M.D.<sup>1</sup>, Hye Hyun Cho, B.S.<sup>1</sup>,  
So Yeon Shin, M.D.<sup>1</sup>, Young Hyun Ko, M.D.<sup>1</sup>, Ji Myung Kim, M.D.<sup>2</sup>, Kyeong Seob Shin, M.D.<sup>3</sup>, and Sun Hoe Koo, M.D.<sup>1</sup>

Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon; Department of Laboratory Medicine<sup>2</sup>, Eulji University Hospital, Daejeon; Department of Laboratory Medicine<sup>3</sup>, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

**Background :** *Stenotrophomonas maltophilia* is a gram-negative bacillus and a nosocomial pathogen in immunocompromised patients. Trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX) is the drug of choice for treating *S. maltophilia* infection; however, resistance to TMP/SMX is increasing. In this study, we investigated the relationship between the incidence of TMP/SMX resistance and the presence of *sul* genes and mobile elements.

**Methods :** A total of 120 *S. maltophilia* isolates were collected from 3 university hospitals between April 2007 and April 2009. Antimicrobial susceptibilities were determined using the disk diffusion method. PCR and DNA sequencing were conducted for the detection of *sul1*, *sul2*, class 1 integron, and *ISCR2* element. Repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) was carried out to evaluate the genetic relatedness.

**Results :** The TMP/SMX-resistant (R) isolates harbored a significantly higher proportion of *sul1* gene and class 1 integron than TMP/SMX-susceptible (S) isolates ( $P<0.001$ ). Seventeen of 28 isolates with *sul1* also had a class 1 integron, but none of the isolates without *sul1* had a class 1 integron. The identified gene cassettes within class 1 integrons include *aacA4*, *aadA1*, *aac6'-II*, and *qac*. None of the 120 isolates carried *sul2*, *glmM*, or *ISCR2* element. REP-PCR did not show any genetic relatedness among the isolates.

**Conclusions :** In Korea, the resistance of *S. maltophilia* isolates to TMP/SMX is due to *sul1* within a class 1 integron rather than to *sul2*. The class 1 integron also harbors multiple antibiotic resistance genes in addition to *sul1*, and therefore it could mediate multidrug resistance in *S. maltophilia*. (*Korean J Lab Med* 2010;30:295-300)

**Key Words :** *Stenotrophomonas maltophilia*, Trimethoprim/sulfamethoxazole, *sul1* gene, Class 1 integron

### 서 론

*Stenotrophomonas maltophilia*는 포도당 비발효 그람 음성 막대균으로, 자연계나 병원환경, 환자의 인공호흡기 등에서 자주 분리되어 부패균이나 오염균으로 오인되기 쉽다. 병원성이 약하여 건강인의 감염은 흔하지 않으나, 면역력이 약한 악성종

양, 백혈병 및 림프종 환자에서는 감염률이 높으며, 집중치료실의 입원 환자 등에게 자주 감염을 일으키는 원내감염균의 하나이다[1-8]. 또한 임상미생물 검사실에서 분리되는 포도당 비발효 그람 음성 간균 중에 세 번째로 흔한 균으로 보고되고 있다[1-3].

원내감염을 일으키는 *S. maltophilia*는  $\beta$ -lactam,  $\beta$ -lactamase 억제제 및 aminoglycoside 등 많은 항균제에 자연내성을 갖는다. *S. maltophilia*의 자연내성은 L1과 L2  $\beta$ -lactamases 생산에 의한  $\beta$ -lactam 항균제 내성, aminoglycoside-modifying 효소 등에 의한 aminoglycoside 항균제 내성, 그리고 SmeDEF 다약제 유출펌프발현에 의한 다약제내성 등에 의해 나타난다[9, 10]. 이는 *S. maltophilia* 감염증 치료 시 항균제 선택을 어렵게 만드는 요인이 된다.

Received : March 8, 2010

Manuscript No : KJLM10-046

Revision received : April 29, 2010

Accepted : April 30, 2010

Corresponding author : Sun Hoe Koo, M.D.

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine,  
Chungnam National University, 640 Daesa-dong, Jung-gu, Daejeon  
301-747, Korea  
Tel : +82-42-280-7798, Fax : +82-42-257-5365  
E-mail : shkoo@cnu.ac.kr

*S. maltophilia* 감염증 치료에는 낮은 항균제 내성률을 보이는 trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX)이 일차 치료제로 사용되고 있으며, quinolone, moxalactam, 그리고 ticarcillin-clavulanic acid 등도 사용되고 있다[11]. 그런데 최근 이 항균제들에 대해 내성을 보이는 *S. maltophilia*가 증가하고 있어 많은 문제가 되고 있다[9].

TMP/SMX 중 한 성분인 sulfamethoxazole에 대한 세균의 내성은 염색체의 dihydropteroate synthase (DHPS) 유전자(*folP*)의 돌연변이나 대체 DHPS 유전자(*sulI*)의 획득을 통하여 일어나는데, 두 가지 내성기전 중에서 *sulI* 유전자의 획득에 의한 내성의 빈도가 높은 것으로 알려져 있다[12]. 특히 *sulI* 유전자는 class 1 integron의 3' 말단에 위치하여 쉽게 다른 균주로 전달되는 특징이 있어 TMP/SMX 내성 확산의 우려를 낳고 있다. *sulI* 유전자 이외에 *sul2* 유전자가 TMP/SMX 내성과 연관이 있는 것으로 알려져 있는데, 이 유전자는 insertion element common region (ISCR2) element에 의하여 전파될 수 있음이 밝혀졌다[13]. ISCR2 element에는 *sul2* 유전자 이외에 phosphoglucosamine mutase를 encoding하는 *glmM* 유전자와 florfenicol/chloramphenicol 내성 단백질을 encoding하는 *floR* 유전자 등 여러 유전자와 연결되어 이들 유전자의 전파에도 관여하는 것으로 알려져 있다[13]. 이러한 TMP/SMX에 대한 내성확산은 *S. maltophilia* 감염증 치료에 많은 어려움을 야기할 수 있으므로 TMP/SMX내성에 관한 연구는 중요하지만 국내에서는 아직 이에 대한 연구가 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 충청지역 3곳의 대학병원 진단검사의학과에 의뢰된 임상검체에서 분리된 *S. maltophilia*균에 대해서 TMP/SMX에 대한 획득내성과 이에 관련한 내성유전자에 대해서 분석하고자 하였다. 또한 내성유전자의 균주 간 전파에 관련된 것으로 알려진 integrons과 mobile element인 ISCR element의 TMP/SMX 내성 유전자와의 연관성을 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 수집

2007년 4월부터 2009년 4월까지 충청지역의 3개 의과대학 병원 진단검사의학과에 의뢰된 임상검체에서 분리된 총 120균주의 *S. maltophilia*를 대상으로 하였다. 항균제 내성에 상관없이 분리된 순서대로 균주를 수집하였으며, 동일 환자에서 반복 분리된 균주는 수집대상에서 제외하였다. 분리된 균주의 동정은 집락의 형태, oxidase 및 Vitek GNI card (bioMerieux Vitek

Inc., Hazelwood, MO, USA)를 이용한 생화학적 방법으로 확인하였다.

### 2. 항균제 감수성 시험

TMP/SMX에 대한 감수성을 디스크 확산법으로 확인하였고 미국의 CLSI 지침에 따라 억제대의 지름이 10 mm 이하인 경우 내성으로 판단하였다[8, 14]. 항균제 감수성 시험에 대한 정도 관리를 위해서 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 동시에 시험하여 허용범위 내에 있는지를 확인하였다[14].

### 3. 분자생물학적 방법에 의한 유전형 확인

#### 1) *sul1* 및 *sul2*의 검출

중합효소연쇄반응(PCR)과 염기서열분석을 통하여 *sul1*과 *sul2* 유전자를 검출하였다. 시발체로는 이미 보고된 바 있는 *sul1*과 *sul2* 유전자로 명명된 염기서열을 이용하였다(Table 1)[1]. 대상 균주를 brain heart infusion broth (Difco, Cockeysville, MD, USA)에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕 배양한 후 배양액으로부터 DNA purification kit (SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 염색체 DNA를 추출하였다. DNA 추출액 (5 µL), 10×Taq buffer (2.5 µL), 10 mM dNTP mix (0.5 µL), primer 각 10 pmol, 0.7 U Taq DNA polymerase (SolGent) 및 증류수

**Table 1.** Oligonucleotide primers used for PCR amplification and sequencing

Primer pairs	Target	Sequence (5'-3')	Reference
<i>Int1</i> F	<i>int1</i>	CAGTGGACATAAGCCTGTTC	[15]
<i>Int1</i> R		CCCGAGGCATAGACTGTA	
<i>Int2</i> F	<i>int2</i>	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	[15]
<i>Int2</i> R		CACGGATATGCGACAAAAAGGT	
<i>Int3</i> F	<i>int3</i>	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG	[15]
<i>Int3</i> R		ACGGATCTGCCAAACCTGACT	
LECR2	ISCR2	CACTGGCTGGCAATGTCTAG	[13]
RECR2		CTTTGGACCGCAGTTGACTC	
<i>glmR</i>	<i>glmM</i>	GAGTCAACTGCGGTCCAAAC	[13]
<i>glmF</i>		ACGGTATTCGTGGCAAAGCC	
<i>FloF</i>	<i>floR</i>	TCGACATCCTGGCTTCACTG	[13]
<i>FloR</i>		ATTACAAGCGCGACAGTGCG	
<i>Sul1</i> F	<i>sul1</i>	GGATTTTCTTGAGCCCCGC	[1]
<i>Sul1</i> R		CATTGCCGATCGCGTGAAGT	
<i>Sul2</i> F	<i>sul2</i>	CCTGTTTCGTCCGACACAGA	[1]
<i>Sul2</i> R		GAAGCGCAGCCGCAATTCAT	

Abbreviations: F, forward; R, reverse.

를 혼합하여 총 부피 25  $\mu$ L의 반응용액을 만들었다. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, CT, USA)으로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 95°C에서 20초, 59°C에서 40초, 72°C에서 30초씩 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다. 각각의 PCR 생산물을 ethidium bromide가 포함된 1% 우무겔에서 40분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 증폭산물을 DNA extraction kit (SolGent)로 분리 후, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 3730xl DNA analyzer (PE Applied Biosystems)를 이용하여 염기 서열을 분석하였다.

## 2) ISCR2 element의 검출

*sul2* 유전자의 존재가 확인된 균주를 대상으로 ISCR2, *glmM* 그리고 *Flo*를 검출하기 위해 기존의 시발체를 이용하여 *sul* 유전자 분석 때와 동일한 반응용액과 조건으로 PCR을 수행하였다 (Table 1)[13].

## 3) Integron의 검출

Class 1, 2 및 3에 속하는 integron을 검출하기 위해 다중 PCR을 수행하였다(Table 1)[15]. *sul* 유전자 분석 때와 동일한 반응용액을 사용하였으며 반응조건만 다르게 하여 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 5분간 연장 반응시켰다. 각각의 PCR 생산물을 ethidium bromide가 포함된 1.5% 우무겔에서 40분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. PCR 생산물 밴드의 위치가 약 160 bp, 788 bp 및 979 bp인 것을 각각 class 1, 2 및 3 integron으로 간주하였다[15].

## 4) Class 1 integron의 유전자 카세트 유전형 확인

Class 1 integron 내에 존재하는 유전자 카세트의 유전형을 확인하기 위해 5' 보존영역(GGCATCCAAGCAGCAAG)과 3' 보존영역의 분절(AAGCAGACTTGACCTGA)을 시발체로 하여 PCR을 수행하였다[16]. *sul1* 유전자 분석 때와 같은 조성의 반응용액 25  $\mu$ L를 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 4분씩 30회 증폭 반응시키고, 72°C에서 10분간 연장 반응시켰다. 각각의 PCR 생산물을 ethidium bromide가 포함된 1% 우무겔에서 40분간 전기영동하여 밴드를 확인한 후 염기서열 분석을 수행하였다. 5' 보존영역과 3' 보존영역의 분절을 시발체로 하여 얻어진 각각의 PCR 생산물을 염기서열 분석한 뒤, 말단 부분에서 다시 새로운 시발체를

디자인하여 PCR을 수행하고 염기서열 분석을 하는 일련의 과정을 되풀이하는 primer walking 방법으로 전체 염기서열을 분석하여 *sul1* 이외의 유전자 카세트의 존재를 확인하였다.

## 4. Repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR)을 이용한 분자역학조사

기존에 보고된 시발체(5'-IIICGICGICATCIGGC-3' and 5'-ICGICTTATC IGGCCTAC-3')를 사용하여 REP-PCR을 시행하였다[17]. 증폭반응은 DNA 추출액(5.0  $\mu$ L), 10×Taq buffer (5.0  $\mu$ L), 10 mM dNTP mix (1.0  $\mu$ L), primer 각 20 pmol, 1.4 U Taq DNA polymerase (SolGent) 및 증류수를 혼합하여 50  $\mu$ L의 혼합액으로 시행하였다. Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp)으로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 90°C에서 40초, 42°C에서 1분, 68°C에서 7분씩 35회 증폭 반응시키고, 68°C에서 15분간 연장 반응시켰다. 증폭산물(10  $\mu$ L)은 ethidium bromide가 포함된 2% 우무겔에 전기영동한 후 BioDoc-14™ Imaging system (UVP, Cambridge, UK)을 이용하여 분석하였다.

## 5. 통계

SPSS ver 12.0 (SPSS inc., Chicago, IL, USA)을 사용했고, Fisher의 정확한 검증을 이용하여  $P < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

## 결 과

### 1. 항균제 감수성 양상

환자의 임상검체에서 분리된 *S. maltophilia* 120 균주를 대상으로 TMP/SMX에 대한 항균제 감수성 시험을 한 결과, 내성률은 16% (19/120)이었고 감수성률은 84% (101/120)이었다.

### 2. *sul1*과 *sul2* 유전자 및 ISCR2 element 검출

항균제 감수성 시험에서 TMP/SMX에 내성을 보인 19균주 중 13균주(68.4%)에서 *sul1* 유전자가 검출되었다. 반면, TMP/SMX에 감수성을 보인 101균주 중에서는 15균주(14.7%)만이 *sul1* 유전자를 가지고 있는 것으로 나타났다. *sul1* 양성률은 TMP/SMX에 내성인 균주가 감수성인 균주보다 월등히 높아 *sul1*과 TMP/

**Table 2.** Incidence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *S. maltophilia* and relation to *sul1*, *sul2*, *glmM*, class 1 integron, and *ISCR2* element

	Trimethoprim/sulfamethoxazole		P value*
	Resistant	Susceptible	
N of isolates	19	101	
N of isolates with <i>sul1</i>	13	15	<0.001
N of isolates with <i>sul2</i>	0	0	
N of isolates with class 1 integrons	10	7	<0.001
N of isolates with <i>ISCR2</i>	0	0	
N of isolates with <i>glmM</i>	0	0	

\*Fisher's exact test.

SMX 내성이 서로 상관관계가 있음이 확인되었다( $P<0.001$ ).

한편, *sul2*는 120균주 중 단 한 주에서도 검출되지 않았고 *ISCR2* element도 관찰되지 않았다(Table 2).

### 3. Class 1 integron 검출

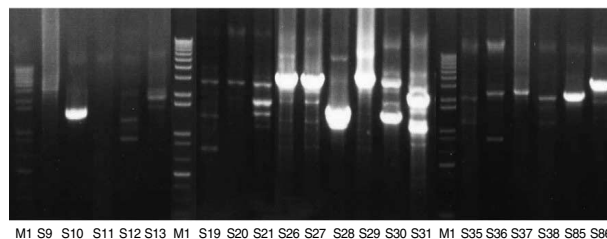
다중 PCR을 이용하여 integron을 검출한 결과, 대상균주 120균주 중 17균주에서 class 1 integron에 해당하는 PCR 산물이 얻어졌다. 이들을 대상으로 class 1 integron 검출을 위한 PCR과 염기서열분석을 수행한 결과 17균주 모두가 class 1 integron을 가지고 있는 것이 확인되었다. 이 중 10주는 TMP/SMX 내성균주였고 7주는 TMP/SMX 감수성균주로 내성균주에서의 class 1 integron의 보유율(52.6%, 10/19)이 감수성균주에서의 보유율(6.9%, 7/101)보다 높은 것으로 나타났다( $P<0.001$ ; Table 2). 이들 class 1 integron이 검출된 17균주 모두 *sul1* 유전자를 가지고 있었다. 그리고 검출된 class 1 integron 내에는 *aacA4*, *qac*, *aac6'*-II 및 *aadA1* 유전자 카세트들이 포함되어 있었다. 한편 class 2와 class 3 integron은 검출되지 않았다(Table 2).

### 4. REP-PCR

시험기간 중 총 120주의 *S. maltophilia*를 대상으로 이들이 같은 clone에서 유래되었는지를 확인하기 위하여 REP-PCR을 수행한 결과 서로 다른 band 패턴을 보여 서로 다른 클론에서 유래되었음이 확인되었다(Fig. 1).

## 고 찰

*S. maltophilia*는 주요 치료제인 TMP/SMX에 아직까지는 비교적 낮은 내성률을 보이고 있으나 점차 내성률이 증가하는



**Fig. 1.** Repetitive extragenic palindromic-PCR (REP-PCR) fingerprints of *S. maltophilia* isolates. Lanes M1 are 1-kb DNA size markers.

추세에 있다[1, 18]. 본 연구에서 분리된 *S. maltophilia*의 TMP/SMX 내성률은 16%로 2003년 대만에서 분리된 *S. maltophilia*의 내성률인 25%보다는 낮았으나 2004년 아메리카와 유럽에서 분리된 *S. maltophilia*의 내성률인 3.8%보다는 4배 이상 높은 것으로 나타났다. 이는 지역에 따라 TMP/SMX 내성률에 큰 차이가 있으며, 특히 아시아에서의 내성률이 높음을 의미한다[1, 19].

TMP/SMX에 내성을 나타내는 기전은 다양하나 그 중 *sul1* 유전자의 획득에 의한 내성의 빈도가 높은 것으로 알려져 있다[12]. 본 연구에서 분리된 TMP/SMX 내성 *S. maltophilia* 균주는 TMP/SMX 감수성균주보다 4배 이상 많은 균주에서 (68.4%, 13/19)가 *sul1* 유전자를 가지고 있는 것으로 나타났다( $P<0.001$ ). 대만에서 분리된 *S. maltophilia*도 TMP/SMX 내성균주 중 81% (21/26)에 해당하는 균주가 *sul1* 유전자를 가지고 있음이 확인되었다[1]. 이는 TMP/SMX 내성에 *sul1* 유전자가 관여함을 의미한다. 그러나 본 연구에서 *sul1* 양성을 보였으나 TMP/SMX에 감수성을 보인 15균주가 관찰되었고, 대만의 연구에서도 8균주가 관찰되었는데[1], 이러한 균주에서의 TMP/SMX의 치료 효과 등에 관한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

한편, *sul1* 유전자는 염색체 DNA상에 존재하기도 하지만 주로 class 1 integron의 3' 말단에 포함되어 존재한다. 따라서 class 1 integron의 존재가 균주의 TMP/SMX 내성에 중요한 역할을 한다고 할 수 있다. 아르헨티나에서의 보고에서도 *S. maltophilia*에서 class 1 integron의 존재가 TMP/SMX에 대한 minimal inhibitory concentration (MIC) 증가와 상관관계가 있다는 것이 밝혀졌다[20]. 본 연구에서도 TMP/SMX 내성 균주 중 52.6% (10균주)가 class 1 integron을 가지고 있는 것으로 나타났으며, 이는 감수성균주에서의 양성률(6.9%)보다 7배 이상 높은 수치였다( $P<0.001$ ). 또한 TMP/SMX 내성을 보인 *sul1* 양성 균주 중 76.9% (10/13)에서 class 1 integron 양성을 보였고, class 1 integron을 가지고 있는 균주는 모두 *sul1* 유전자를 가지고 있어서 *sul1* 유전자의 전파가 class 1 integron과 높은 연관성이 있음을 확인하였다.

본 연구에서 검출된 class 1 integron들은 700 bp에서 2,500 bp까지 크기가 다양했으며 3' 말단에 *sul1* 유전자를 가지고 있었다. 뿐만 아니라 aminoglycoside 내성 유전자인 *aacA4*, *aac6'*-II 및 *aadA1*과 quaternary ammonium compound 내성에 관여하는 *qac* 유전자 카세트들이 포함되어 있어 *S. maltophilia*의 다약제내성에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 대만에서 분리된 *S. maltophilia*에서 검출된 class 1 integron에서도 aminoglycoside 내성 유전자인 *aadA2*, *aacA4*, *aadB* 및 *aac6'*-Ib와 chloramphenicol 내성유전자인 *cmlA*과 quaternary ammonium compound 내성에 관여하는 *qac* 등이 포함되어 있음이 확인된 바 있다[1, 20].

Class 1 integron뿐만 아니라 다른 mobile elements도 *sul* 유전자와 연관 있는 것으로 알려져 있다. Toleman 등[13]의 연구에 의하면 ISCR2 element에 의해서 *sul2* 유전자가 *S. maltophilia*로 전파될 수 있다는 것이 보고된 바 있다. 그러나 본 연구에서는 120균주 중 한 주도 *sul2* 유전자를 가지고 있지 않는 것으로 나타났으며 아울러 ISCR2 element와 *glmM* 유전자도 검출되지 않았다. TMP/SMX 내성균주에서 *sul2* 유전자가 검출되지 않고 주로 *sul1* 유전자가 검출된 것으로 보아 우리나라의 *S. maltophilia* 임상균주의 TMP/SMX 내성은 주로 *sul1* 유전자에 의한 것으로 생각된다. 그러나, *sul2* 유전자와 ISCR2 element의 TMP/SMX 내성 연관성을 정확히 알기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

*S. maltophilia*의 역학은 아직 완전히 규명되지 않아서, 임상균주 간의 유전적 연관성을 밝힐 수 있는 여러 가지 신속하고 신뢰할 수 있는 기술들이 필요하게 되었다. Pulsed-field gel electrophoresis는 이러한 목적으로 흔히 사용되는 방법이지만, 특수한 장비가 필요하고, 검사시간이 오래 걸리며, 숙련자가 필요하다는 단점이 있다. 그래서 PCR을 이용한 많은 기술들이 사용되기 시작하였고, 그 중 하나가 repetitive-sequence PCR이고 여기에는 enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR, BOX-PCR, REP-PCR 등이 있다. REP-PCR을 이용하여 *S. maltophilia*의 유전적 연관성을 검사한 것은 Lin 등[17]에 의해서 처음 시도된 바 있다. 본 실험에서 총 120균주를 대상으로 REP-PCR을 시행한 결과 높은 유전적 다양성을 보이고 있었고, 유전적 연관성은 없어서 병원 내 환자 간 감염은 없었던 것으로 생각되었다.

## 요 약

**배경 :** *Stenotrophomonas maltophilia*는 그람 음성 간균

으로 면역이 저하된 환자에게 기회감염을 일으키는 것으로 알려져 있다. Trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX)은 *S. maltophilia* 감염의 최우선 치료약제이지만 점차 내성률이 증가하고 있다. 이번 연구에서는 3곳의 대학병원에 의뢰된 임상검체에서 분리된 *S. maltophilia*를 대상으로 TMP/SMX 내성률과 *sul* 유전자, 그리고 이들 유전자의 전파와 연관된 것으로 알려진 integrons, ISCR2 element 등의 연관성에 관하여 조사하였다.

**방법 :** 2007년 4월부터 2009년 4월까지 충청지역 3곳의 대학병원 진단검사의학과에 의뢰된 임상검체에서 분리된 총 120균주의 *S. maltophilia*균을 대상으로 실험하였다. 디스크 확산법에 의하여 항균제 감수성 검사를 하였고, PCR과 DNA 염기서열분석을 통하여 *sul1* 유전자, *sul2* 유전자, integrons 그리고 ISCR2 element를 검출하고자 하였고, REP-PCR을 통해서 이들 임상균주사이의 유전적 연관성을 조사하였다.

**결과 :** 총 120균주 중에서 19균주가 TMP/SMX에 내성을 보이고 있었다. TMP/SMX 내성균주는 감수성균주에 비해서 높은 비율로 *sul1* 유전자와 class 1 integron을 가지고 있었다( $P < 0.001$ ). *sul1* 유전자를 가진 28균주 중 17균주가 class 1 integron을 가지고 있었고, *sul1* 유전자를 가지지 않은 균주는 class 1 integron을 한 균주도 가지고 있지 않아서 *sul1* 양성균주에서 class 1 integron의 양성률이 높았다( $P < 0.001$ ). Class 1 integron의 DNA 염기서열을 분석한 결과 *sul1* 유전자 이외에 *aacA4*, *aadA1*, *aac6'*-II 그리고 *qac* 등 여러 내성유전자가 발견되었다.

**결론 :** 충청지역 3곳의 대학병원의 임상검체에서 분리된 *S. maltophilia*의 TMP/SMX 내성은 외국과 다르게 *sul2* 유전자에 의한 경우는 발견되지 않았고, 주로 *sul1* 유전자에 의해서 발생한다는 것을 확인하였다. 또한 *sul1* 유전자는 class 1 integron에 의해서 전파되며, class 1 integron은 여러 내성유전자를 함유하고 있어, *S. maltophilia*의 다제내성을 유발할 수 있음을 확인하였다.

## 참고문헌

1. Chang LL, Lin HH, Chang CY, Lu PL. Increased incidence of class 1 integrons in trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 2007; 59:1038-9.
2. Valdezate S, Vindel A, Loza E, Baquero F, Canton R. Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains.



- Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1581-4.
3. Ahn GY, Yu FN, Jang SJ, Kim DM, Park G, Moon DS, et al. Pseudo-outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* due to contamination of bronchoscope. Korean J Lab Med 2007;27:205-9. (안균열, 유봉남, 장숙진, 김동민, 박 건, 문대수 등. 기관지 내시경 오염에 기인한 *Stenotrophomonas maltophilia*의 가유행 발생. 대한진단검사의학회지 2007;27:205-9.)
  4. Harlowe HD. Acute mastoiditis following *pseudomonas maltophilia* infection: case report. Laryngoscope 1972;82:882-3.
  5. Sutter VL. Identification of *Pseudomonas* species isolated from hospital environment and human sources. Appl Microbiol 1968;16:1532-8.
  6. Ben-Tovim T, Eylan E, Romano A, Stein R. Gram-negative bacteria isolated from external eye infections. Infection 1974;2:162-5.
  7. Gardner P, Griffin WB, Swartz MN, Kunz LJ. Nonfermentative gram-negative bacilli of nosocomial interest. Am J Med 1970;48:735-49.
  8. Seol SY, Jang KS, Jeong OG, Cho ER, Kim NH, Yu HS, et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiologic characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimen. J Korean Soc Microbiol 2000;35:239-50. (설성용, 장경수, 정웅기, 조응래, 김능희, 유학선 등. 병원 재료에서 분리한 *Stenotrophomonas maltophilia*의 항균제 내성 및 분자역학적 특성. 대한미생물학회지 2000;35:239-50.)
  9. Chang LL, Chen HF, Chang CY, Lee TM, Wu WJ. Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 2004;53:518-21.
  10. Zhang L, Li XZ, Poole K. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:3497-503.
  11. Sader HS and Jones RN. Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. Int J Antimicrob Agents 2005;25:95-109.
  12. Perreten V and Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:1169-72.
  13. Toleman MA, Bennett PM, Bennett DM, Jones RN, Walsh TR. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes. Emerg Infect Dis 2007;13:559-65.
  14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. M100-S18 (M2). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
  15. Dillon B, Thomas L, Mohmand G, Zelynski A, Iredell J. Multiplex PCR for screening of integrons in bacterial lysates. J Microbiol Methods 2005;62:221-32.
  16. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:185-91.
  17. Lin CW, Chiou CS, Chang YC, Yang TC. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and three rep-PCR methods for evaluating the genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Lett Appl Microbiol 2008;47:393-8.
  18. Garrison MW, Anderson DE, Campbell DM, Carroll KC, Malone CL, Anderson JD, et al. *Stenotrophomonas maltophilia*: emergence of multidrug-resistant strains during therapy and in an in vitro pharmacodynamic chamber model. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2859-64.
  19. Fedler KA, Biedenbach DJ, Jones RN. Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among pediatric patient isolates: report from the 2004 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program on 3 continents. Diagn Microbiol Infect Dis 2006;56:427-36.
  20. Barbolla R, Catalano M, Orman BE, Famiglietti A, Vay C, Smayevsky J, et al. Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:666-9.