대한임상미생물학회지 1998:1;33-36

Vancomycin 내성 장구균의 분자생물학적 진단

이 위 교

아주대학교 의과대학 임상병리학교실

Molecular Biologic Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci

Wee Gyo Lee, M.D.

Department of Clinical Pathology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

서 론

최근 vancomycin 내성 장구균(vancomycin-resistant enterococci : VRE)의 급증으로 인하여 감염 질환 분야에서는 새로운 도전에 직면하고 있다. 장구균은 지난 수년간 병원감염의 주원인균이었고 또한 VRE의 경우는 대부분 다약제 내성을 나타내므로 치료에 어려움이 따르며[1-3], 아직 실험실내에서만 증명된 바 있으나 내성이 *Staphylococcus aureus*등에 전달될 수 있다는 문제가 있다[4]. 이러한 심각성으로 인하여 Hospital Infection Control Practice Advisory Committee(HICPAC)에서는 1995년 vancomycin 내성 전파 방지를 위한 권장 지침을 발표한 바 있다[5]. 병원내 VRE 전파를 예방하기 위해서는 빠르고 정확하게 VRE를 동정하고 내성형을 결정하여 VRE 발생원을 찾아내고 전파를 방지하여야 한다. 이에 저자는 분자생물학적 방법을 이용한 VRE 내성 유전자형 결정법에 관하여 알아보고, 신속하고 간단하게 미생물 검사실에서 적용할 수 있는 방법을 소개하고자 한다.

분자생물학적 방법을 이용한 장구균에서의 vancomycin 내성유전자형 결정

VRE에 대한 신속하고 정확한 진단은 환자의 치료뿐만 아니라 다른 환자에게로의 전파를 방지해야하는 병원감염관리 측면에서도 필수적이다. 장구균에서의 vancomycin 내성은 현재까지 통상적인 디스크감수성 검사나 자동화기기를 이용한 방법에서 정확하게 검출되기 힘들다[6]. 특히 중등도나 저도 내성의 검출은 그 민감도가 현저히 떨어지기 때문에 vancomycin 6 ug/mL 함유한 brain heart infusion 배지를 이용한 VRE 검색을 통해 VRE를 검출하여야 한다[7]. 이 방법은 정확하고 신뢰도가 높은 반면 내성 유전자형 결정은 할 수 없는 단점이 있다. 그래서 검색 배지에서 검출된 VRE는 분자생물학적 방법을 이용하여 내성 유전자형을 결정하여야 한다. *van* 유전자는 세포벽 합성에 필수적인 D-alanine:D-alanine ligases와 유사한 역할을 단백을 코드화하는 유전자로, 지금까지 알려진 바로는 *vanA, vanB, vanB2, vanC1, vanC2,* 및 *vanC3*가 있고 최근 Perichon 등[8]에 의해 *vanD*형까지 밝혀져 있다. *vanA*형은 vancomycin과 teicoplanin에 대해 고도 내성이며 유도성이고 내성 전달은 plasmid(pIP816) 매개에 의한 conjugation을 통한다[10]. *vanB*형은 vancomycin에 대해서는 다양한 내성 정도를 보이며 teicoplanin에는 감수성을 보인다. 대부분 유도성이나 최근 구성적 mutants가 있음이 보고된 바 있다. 유전자는 염색체내에 위치하며 내성 전달은 conjugation에 의한다[11]. *vanB2*형은 *vanB* 균주와는 달리 vancomycin에 대한 MIC가 64 μg/mL이상의 고도 내성을 보이면서 teicoplanin에는 감수성을 보인다[12]. *vanC*형은 vancomycin에 대해 구성적으로 저도 내성을 보이고 유전자는 염색체내에 존재하며 *vanC1, C2,* 및 *C3* 3종류의 유전자형이 있는데 균종 특이성을 보여 *vanC1*은 *E. gallinarum*에서, *vanC2*는 *E. casseliflavus, vanC3*는 *E. flavescens*에서 표현되나[13] *vanC2*와 *vanC3* 유전자는 98% 동일성을 보여 구분은 불가능하다[14]. 현재까지는 전달성 *vanC*에 대한 보고는 없었으나 최근 *E. faecium*와 *E. faecalis* 각각 1주에서 *vanC1* 유전자가 검출되었다는 보고가 있었다[15]. *vanD*형은 1997년 Perichon 등[8]에 의해 명명되었는데 vancomycin에 대한 MIC가 64 ug/mL, teicoplanin MIC 4

교신저자 : 이 위 교
(442-749)
아주대학교 의과대학 임상병리과학교실
전화 : 062-220-3259, 3272 Fax : 062-232-2063

Table 1. PCR primers for detection of vanA, vanB, vanB2, vanC1, vanC2, vanC3, and vanD in VRE

Gene	Primers (5' to 3')	Product size(bp)	Reference
vanA		1,030	16
	CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	732	17
	GGGAAAACGACAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	356	18
	GCGGTATTGGGAAACAGTGCC GCGGTCAATCAGTTCGGGAAGTGC	433	16
vanB	ACCGGGCAGRGTATTGAC GTGACAAACCGGAGGCGAGGA	635	17
	CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA ATGGGAAGCCGATAGTC	741	18
	GATTTCGTTCCTCGACC GGAATGGGAAGCCGATAGTCTCC	528	19
vanB2	GTTTAGAACGATGCCGCCATCC ATTGTCTGGATCCCCTATG	822	17
vanC1	GCAAGCCCTCTGCATCAAG GGTATCAAGGAAACCTC	429	18
	CTTCCGCCATCATAGCT CCCACTTTGCTTTTATCCCGC	796	20
	GAAAGACAACAGGAAGACCGC ATCGCATCACAAGCACCAATC	439	17
vanC2/3	ACCCGTCAATCCCAAGTTTCG CTCCTACGATTCTCTTG	322	18
	CGAGCAAGACCTTTAAG CCTCTCTTTGATCGGGATCGCC	484	20
vanC2	CGGGGAAGATGGCAGTAT CGCAGGGACGGTGATTTT	224	20
vanC3	GCCTTTACTTATTGTTCC GCTTGTTCTTTGACCTTA	461	8
vanD	TAAGGCGCTTGCATATACCG TGCAGCCAAGTATCCGGTAA		

ug/mL이고 구성적이며 기존의 어떠한 내성형도 나타내지 않으며 *vanA*와 *vanB* 유전자와는 69%의 동일성을, *vanC* 유전자와는 43%의 동일성을 나타내고 conjugation에 의해 전달되지 않는다. 내성 유전자형 결정은 환자의 치료와 감염관리 시행에 있어서 중요하다. *vanA*와 *vanB*형의 경우 vancomycin MIC가 가능한 치료 농도이상인(>32 ug/mL) 경우가 흔하고, 내성 전달이 가능하여 접촉격리를 시행하여야 한다. 반면 *vanC*형은 저도 내성을 나타내므로 치료 농도를 높인다면 vancomycin 치료가 가능하고, 내성 전달이 되지 않으므로 감염관리 차원에서는 중요성이 *vanA*나 *vanB*형에 비하여 덜 하다.

1. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction： PCR)

내성형 결정에 가장 많이 이용되며 대개 PCR후 특이 소식자와 교잡반응하여 확인한다. 각 내성 유전자형을 검출하기 위한 다수의 시발체 종류들이 보고되어 있다

(Table 1)[8, 16-20]. VRE 중에는 유전자 표현이 비전형적인 경우가 있는데 이 경우 표현형 검사만으로는 불충분하고 반드시 PCR을 이용하여 내성 유전자형을 규명하여야 한다. 예를 들어 구성적 mutant인 *vanB*형 VRE는 vancomycin과 teicoplanin 모두에 내성을 보이므로 표현형을 이용한 검사법으로는 *vanA*형과 구별이 어렵다[21]. Clark 등[22]은 vancomycin에 중등도 내성(MIC, 16 ug/ml)을 보이고 teicoplanin에 감수성(MIC, 1 ug/ml)을 보인 *E. raffinosus*를 보고하였는데 이 균주는 PCR 분석에서 *vanA*형을 나타냈고 34-kb plasmid에 의해 전달되었다. 이 plasmid는 동일 병원에서 분리된 *E. faecalis*와 *E. faecium*의 *vanA* 유전자를 전달하는 plasmid와 크기가 유사하였지만 이들 *E. faecalis/ E. faecium* 균주는 모두 전형적인 *VanA*형 표현형을 나타냄으로 미루어 *E. raffinosus*에서 *vanA* 유전자의 통제 기능에 이상이 있었음으로 추정된다. *vanC* 형은 구성적, 내인성 내성으로 *vanC1, vanC2, vanC3* 형이 각각 *E. gallinarum, E. casseliflavus* 및 *E. flavescens*에 특이하므로 동정 검사로도 사용된다. 이 중 *vanC2*와 *vanC3*는 DNA 동일성이 거의 유사하여(98.3%) 구분이 가지않고 생화학적으로 *E. flavescens*는 ribose로부터 산을 생성하지 못한다는 차이만이 있어 일부에서는 *E. flavescens*가 *E. casseliflavus*의 음성변이형이라는 주장도 있다[23]. Clark 등[20]의 보고에 의하면 *vanC1, vanC2,* 및 *vanC3* 특이 시발체를 이용하여 PCR을 시행한 결과 *vanC2(+)/vanC 3(-)*의 결과를 보인 균주는 모두 *E. casseliflavus*였고

*vanC2(+)/vanC3(+)*인 균주 중 일부는 *E. flavescens*였다고 보고하면서 *vanC2*에만 양성일 경우 *E. casseliflavus*로 보고하고 *vanC2(+)/vanC3(+)*인 경우는 *E. casseliflavus-E. flavescens*로 보고하였다. *E. gallinarum*과 *E. casseliflavus*에서 *vanA* 유전자가 발견된 보고가 있는데 이는 *vanA*와 함께 각각 자신의 고유한 *vanC1*과 *vanC2*를 동시에 가지고 있는 경우였다. 또한 이 보고에서는 *vanC1* 양성인 *E. faecalis*와 *E. faecium* 각각 1주씩 보고하였는데 아직까지 전달성인 *vanC1*은 확인된 바 없음으로 미루어 표현형 변이주인 *E. gallinarum*으로 생각된다. 저자 등의 경우에서도 비운동성이면서 자동동정기기상 *E. faecium*으로 동정된 균주를 *vanC1* PCR과 *E. faecium* 특이 ligase PCR을 통하여 *E. gallinarum*으로 동정한 바 있다.

2. Multiplex PCR

vanA, B 및 *C* 시발체를 각각 약 10pmol정도 반응액에 한꺼번에 넣고 PCR을 시행하는 방법으로 여러번 PCR을 해야하는 번거로움을 피할 수 있으나 증폭반응 후 소식자로 확인하지 않을 경우는 되도록이면 반응산물의 크기 차이가 많이 나는 시발체의 조합으로 선택하는 것이 편리하다. 또한 3쌍 이상의 시발체를 사용하여 multiplex PCR 시행시 결과가 제대로 나오지 않는 경우가 있으므로 임상적으로 긴급한 *vanA/vanB*를 먼저 multiplex PCR로 시행하고, 이후에 *vanC1/vanC2*를 multiplex PCR 하는 것이 바람직하다.

3. PCR from colony

원하는 시발체쌍을 각각 약 10pmol정도 넣은 PCR 반응액을 먼저 준비한 후 하룻밤 배양한 혈액한천배지로부터 백금이를 이용하여 집락을 취하여 바로 PCR 반응액에 접종한 후, 증폭반응전에 95℃, 10분간 가열하는 cycle을 추가하여 세포를 용해시킨 후 PCR반응을 시행하는 방법으로 DNA 추출로 인한 인력과 시간 소모를 줄일 수 있고 DNA 추출 과정에서 plasmid를 소실하여 위음성 결과가 나오는 것을 막을 수 있다.

4. Multiplex PCR-RFLP

Multiplex PCR은 여러 번 PCR을 시행해야하는 번거러움을 덜어주기는 하나 반응 산물의 크기 차이가 명확한 시발체의 조합이 필요하고 오염이나 amplicon carryover등의 문제점이 있다. Multiplex PCR-RFLP는 이러한 단점의 보완을 위한 방법으로 각 시발체쌍을 함께 넣어 multiplex PCR을 통한 증폭후 증폭산물을 제한효소(MspI)로 37℃ 하룻밤 처리한 후 전기영동하여 각 내성형에 따른 일정한 제한띠를 보고 내성형을 결정하는 방법이다. 이 방법 역시 집락을 바로 취하여 시행하여도 무방하고 저자 등의 경험에 의하면 제한효소 처리 시간을 1시간 정도만 하여도 충분하였으므로 시간도 단축하면서 특이도를 높일 수 있어 임상검사실에서 적용하기에 유용하다고 사료된다. 제한점은 *van* 유전자의 서열 다양성인데 이는 *vanB*에서 보고되어있고[24] 이 경우 *vanB* PCR을 다시 시행하여 확인한다.

참 고 문 헌

1. Centers for Disease Control and Prevention. *Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-United States, 1989-1993. Morbid Mortal Weekly Rep 1993;42:597-9.*
2. Myrray BE, Singh KV, Markowitz SM. *Evidence for clonal spread of a single strain of β-lactamase-producing Enterococcus faecalis to six hospitals in five states. J Infect Dis 1991;163:780-5.*
3. Murray BE, Lopardo HA, Rubeglio EA. *Intrahospital spread of a single gentamicin-resistant, β-lactamase-producing strain of Enterococcus faecalis in Argentina. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:230-2.*
4. Noble WC, Virani Z, Cree RGA. *Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus. FEMS microbiol lett 1992;72:195-8*
5. *Centers for Disease Control and Prevention:Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance:recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee(HICPAC). Morbid Mortal Weekly 199;44:1-20,*
6. Tenover FC, Swenson JM, O'Hara CM, Stocker SA. *Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. J Clin Microbiol 1995;33: 1524-7*
7. Swenson JM, Clark NC, Ferraro MJ, Sahm DF, Doern G, Pfaller MA, et al. *Development of a standard screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1994;32:1700-4*
8. Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. *VanD-type glycopeptide-resistant Enterococcus faecium BM4339. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2016-8*
9. Hall LMC, Chen HY, Williams RJ. *Vancomycin resistant Enterococcus durans. Lancet 1992;340:1105.*
10. Uttley AH, Georges RC, Naidoo J, Woodford N, Johnson AP, Collins CH. *High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. Epidemiol Infect 1989;103:173-81.*
11. Courvalin P. *Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:1447-51.*
12. Gold HS. A *gene conferring resistance to vancomycin but not teicoplanin in isolates of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium demonstrates homology with vanB, vanA and vanC genes of enterococci. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:1604-9.*
13. Shlaes DM, Etter L, *Guttman L. Synergistic killing of vancomycin-resistant enterococci of classes A, B, and C*

by combinations of vancomycin, penicillin, and gentamicin. Antimicrob Agents Chemother 1991;35: 776-9.

14. Navarro F, Courvalin P. *Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in Enterococcus casseliflavus and Enterococcus flavescens. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:1788-93.*
15. Patel R, UHL JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerrill FR III. *Multiplex PCR detection of vanA, vanB, vanC-1 and vanC-2/3 genes in enterococci. J Clin Microbiol 1997;35:703-7.*
16. Clark CC, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM, Tenover FC. *Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:2311-7.*
17. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. *Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol 1995;33:24-7.*
18. **이위교**, **정민권**, **곽연식**. *Vancomycin* **내성 장구균의 분리율**, **항균제 감수성 및 내성형에 관한 연구**. **대한임상병리학회지** *1998;8:51-6.*
19. Plessis P, Lamy T, Donnio PY, Autuly F, Grulois I, Le Prise PY, Avril JL. *Epidemiologic analysis of glycopeptide-resistant Enterococcus strains in neutropenic patients receiving prolonged vancomycin administration. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14:959-63.*
20. Clark NC, Teixeira LM, Facklam RR, Tenover FC. *Detection and differentiation of vanC-1, vanC-2, and vanC-3 glycopeptide resistance genes in enterococci. J Clin Microbiol 1998;36:2294-7.*
21. Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE, Sahm DF. *In vivo development of teicoplanin resistance in a VanB Enterococcus faecium isolate. J Infect Dis 1993; 167:1224-7*
22. Clark NC, Hill BC, Tenover FC. *Characterization of an Enterococcus raffinosus isolate with a VanB phenotype and vanA genotype. abstr. A-111. In Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology 1994. American Society for Microbiology. Washington, D.C.*
23. Teuxeira LM, Carvalho MGS, Merquior VLC, Steigerwalt AG, Teixeira MGM, Brenner DJ, Facklam RR. *Recent approaches on the taxonomy of the enterococci and some related microorganisms. Adv Exp Med Biol 1997;418:397-400.*
24. Bartkus JM, Besser JM, Boxrud D, Hunt JM. *Heterogeneity of vanB genes in Minnesota VRE isolates. abstr. C-11. In Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology 1997. American Society for Microbiology. Washington, D.C.*