

Detection of Vancomycin-resistant Enterococci using Multiplex Real-time PCR Assay and Melting Curve Analysis

Choong-Hwan Cha, M.D., Hae Kyong An, M.T., and Jeong Uk Kim, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Gangneung Asan Hospital, University of Ulsan College of Medicine, Gangneung, Korea

Background : We developed and evaluated the utility of a multiplex real-time PCR assay that uses melting curve analysis and allows simultaneous identification of vancomycin-resistant genotypes and clinically relevant enterococci.

Methods : The specificity of the assay was tested using 4 reference strains of vancomycin-resistant enterococci (VRE) and 2 reference strains of vancomycin-susceptible enterococci. Ninety-three clinical isolates of enterococci with different glycopeptide-resistant phenotypes were genotyped and identified using a multiplex real-time PCR assay and melting curve analysis.

Results : Representative melting curves were obtained for *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *vanA*-containing *E. faecium*, *vanB*-containing *E. faecalis*, *Enterococcus gallinarum*, and *Enterococcus casseliflavus*. Phenotypic and genotypic analysis of the isolates revealed same results for 82 enterococcal isolates, while in 4 isolates, the glycopeptide-resistant phenotypes were inconsistent with the glycopeptide-resistant genotypes and in the 4 other isolates, species could not be accurately identified. Three isolates with mixed strains, which were detected by the PCR assay, could not be correctly identified using phenotypic methods.

Conclusions : VRE genotyping and identification of clinically relevant enterococci were rapidly and correctly performed using multiplex real-time PCR assay and melting curve analysis. (*Korean J Lab Med* 2010;30:138-46)

Key Words : Multiplex real-time PCR, Melting curve analysis, Vancomycin-resistant enterococci

서 론

반코마이신 내성 장구균(vancomycin-resistant enterococci, VRE)은 1987년 유럽에서 처음 출현한 이래 세계적으로 원내감염의 중요한 병원균이 되었다[1, 2]. 국내에서 1992년 처음 보고되었고 1990년대 중반부터 균주 분리가 급격히 증가하였다[3, 4]. 현재 중환자실에서 분리되는 *Enterococcus faecium*의 30-45%에서 반코마이신에 내성을 보인다[5]. VRE에 대한 적절한 감염관리가 필요한 상황이다.

신속하고 정확한 검출은 VRE의 감염관리에 매우 중요하다.

VRE 선별 고형배지에 접종하거나 선별 액체배지에 증균 후 고형배지에 접종하는 통상의 검출방법은 결과 보고까지 2-5일이 걸린다. VanB형과 VanC형 VRE는 검출이 어려운 경우도 있다[6]. 이에 중합효소연쇄반응(PCR)과 실시간-중합효소연쇄반응법(real-time PCR) 등 glycopeptides 내성유전자 검사법이 VRE 감시배양에 사용되었다[7-13]. 실시간-중합효소연쇄반응법은 중합효소연쇄반응법보다 VRE를 더 빠르게 검출하고 업무량도 적다[12]. 반응시간이 짧고 실시간으로 반응산물이 모니터링되어 전기영동이 필요하지 않기 때문이다. 하지만 염기서열에 특이한 소식자를 사용하는 경우 시약 비용이 증가하는 단점이 있다.

본 연구에서 저자들은 염기서열에 특이한 소식자를 사용하지 않고 용해곡선(melting curve) 분석을 이용하여 VRE를 검출하는 다중 실시간-중합효소연쇄반응법(multiplex real-time PCR)을 개발하여 유용성을 평가하였다.

Received : October 17, 2009

Manuscript No : KJLM09-122

Revision received : February 21, 2010

Accepted : March 10, 2010

Corresponding author : Jeong Uk Kim, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Gangneung Asan Hospital,
University of Ulsan College of Medicine, 415 Bangdong-ri,
Sacheon-myeon, Gangneung 210-711, Korea
Tel : +82-33-610-3446, Fax : +82-33-610-3449
E-mail : jukim@gnah.co.kr

재료 및 방법

1. 대상 균주

본원 진단검사의학과에 의뢰된 임상검체에서 분리된 93주의 장구균(*E. faecium* 72주, *Enterococcus faecalis* 13주, *Enterococcus avium* 3주, *Enterococcus durans* 2주, *Enterococcus gallinarum* 2주, *Enterococcus casseliflavus* 1주)을 대상으로 하였다. 표준 균주로는 *E. faecium* ATCC 700221 (*vanA*), *E. faecalis* ATCC 51299 (*vanB*), *E. gallinarum* ATCC 49573 (*vanC1*), *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*vanC2/C3*), *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 19434를 사용하였다.

2. 장구균의 동정검사 및 항균제 감수성검사

대상 균주는 반코마이신 6 $\mu\text{g/mL}$ 를 첨가하여 자가제조한 Enterococcosel agar (EA) (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)와 반코마이신을 첨가하지 않은 EA에서 선별되었다. 배양 1일과 2일째 검은색으로 변한 집락을 혈액천배지에 계대 배양하여 균 동정과 항균제 감수성검사를 시행하였다. 균 동정은 MicroScan (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA)과 API 20 STREP (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA)을 사용하였으며, 반코마이신과 타이코프라닌의 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)는 E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden)로 측정하였다. 항균제별 MIC의 해석은 CLSI의 기준[14]을 따랐다.

3. DNA 추출

중탕가열(boiling)법으로 DNA를 추출하였다. EA에서 자란 검은색 집락 적당량을 면봉에 묻혀 증류수 0.5 mL가 들어있는 1.5 mL microtube에 풀고 10분 동안 끓은 물에 중탕시켰다. 13,000 rpm으로 3분간 원심 분리한 후 상청액을 사용하였다. 상청액의 DNA 농도는 20–90 ng/ μL 가 되도록 멸균증류수로 조절하였다.

4. 다중 실시간-중합효소연쇄반응법

네 종류의 glycopeptide 내성 유전자(*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*)와 *E. faecalis*와 *E. faecium* 균종에 특이한 D-

Table 1. Multiplex real-time PCR primers for the detection of vancomycin-resistant enterococci

Amplified gene	Primer sequences (5'-3')	Size of the PCR Product product (bp)	Tm (°C)
<i>vanA</i>	TATTGACTTCGTTTCAGTACA TGTGGATATGTTTTACAAG	53	72.7±0.3
<i>vanB</i>	CAGACCCTGTATCGCACCAT AACGGCGTATGGAAGCTATG	195	83.7±0.3
<i>vanC1</i>	TGCTTGTGATGCGATTCTC ATCGCTCCTTGATTGGTGAC	204	84.1±0.4
<i>vanC2/C3</i>	GGGAAGATGGCAGTATCCAA GCAGCAGCCATTTGTTTCATA	102	80.6±0.3
<i>ddl E. faecalis</i>	GTGGCTTAAGTCGCTGTGAT AGGCATGGTGTTCATTCAT	74	74.9±0.3
<i>ddl E. faecium</i>	TTTACAAGCTGCTGGTGTGC AACCCATATTCGCAGGTTTG	140	78.1±0.3

Abbreviations: Tm, melting temperature; *ddl*, gene encoding D-alanine-D-alanine ligase; *E. faecalis*, *Enterococcus faecalis*; *E. faecium*, *Enterococcus faecium*.

alanine-D-alanine ligase 유전자(*ddl*)를 검출부위로 하는 시발체를 Primer3 프로그램을 이용하여 설계하였다[15]. 각 시발체의 염기서열, 반응산물의 크기, 온도(Tm)는 Table 1과 같다.

Type-it HRM PCR 키트(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 실시간-중합효소연쇄반응을 실시하였다. 5 μL 의 2× HRM PCR Master Mix, 0.8 μL 의 시발체 혼합액 (*E. faecalis* 시발체, 0.6 μM ; *E. faecium* 시발체, 0.3 μM ; *vanA* 시발체, 0.8 μM ; *vanB* 시발체, 0.2 μM ; *vanC1* 시발체, 0.2 μM ; *vanC2/C3* 시발체, 0.2 μM), 3.2 μL 의 증류수에 1 μL 의 DNA를 넣어 반응액 10 μL 를 제조하여 중합효소연쇄반응을 실시하였다.

중합효소연쇄반응은 Rotor-gene 6000 (QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 이용하였다. 95°C에서 5분 반응 후 95°C에서 10초, 53°C에서 30초, 63°C에서 20초의 반응을 40회 반복하였다. 마지막 PCR 반응이 끝난 후 65°C에서 89°C까지 초당 0.2°C의 속도로 온도를 증가시키면서 용해곡선을 모니터링하였다.

결 과

저자들은 용해곡선을 분석하여 네 종류의 glycopeptide 내성 유전자의 검출과 *E. faecalis*와 *E. faecium*의 동정이 가능한 다중 실시간-중합효소연쇄반응법을 개발하였다. ATCC 표준균주들의 용해곡선은 Fig. 1과 같다. 용해곡선분석이 용이하도록 반응산물 간에 Tm 차이가 나도록 시발체를 설계하였다. 가능한 2°C 이상 차이가 나도록 제작하였지만 *vanB*와 *vanC1* 반응

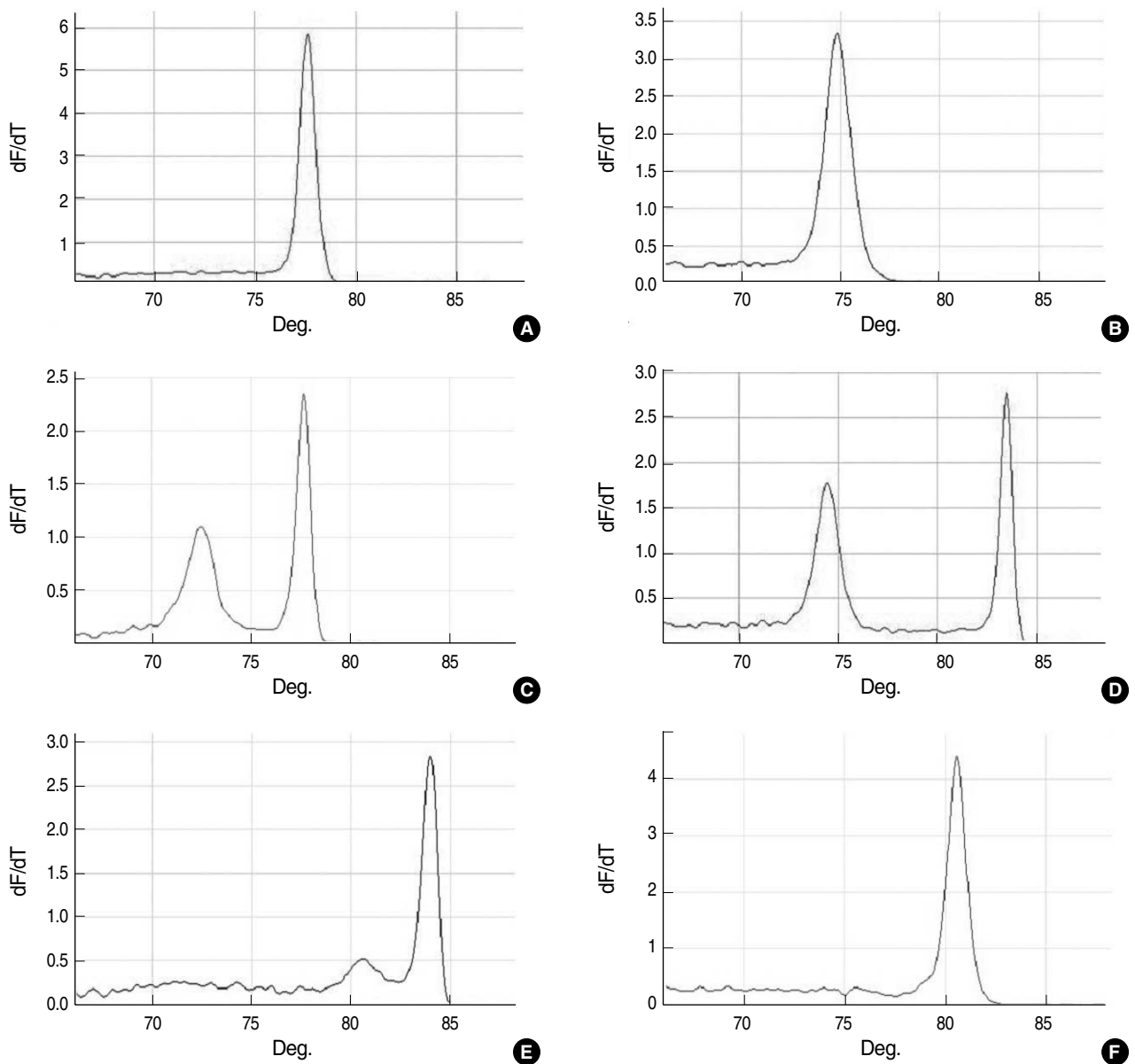


Fig. 1. Melting curve analysis of amplicons obtained from reference strains by using multiplex real-time PCR. Melting curves for *Enterococcus faecium* (A); *Enterococcus faecalis* (B); *E. faecium*/vanA (C); *E. faecalis*/vanB (D); *Enterococcus gallinarum*/vanC1 (E); and *Enterococcus casseliflavus*/vanC2/C3 (F) are shown.

산물 간에는 0.5°C 밖에 차이가 나지 않았다. 시발체에 따른 반응 정도 차이는 시발체의 농도, 불림(annealing) 및 확대(extension) 온도와 유지시간을 조절하여 6가지 검출부위 모두 반응이 잘 일어날 수 있도록 조건을 최적화하였다.

임상검체에서 분리된 장구균 93주의 항균제 감수성 결과에 따라 대상 균주들의 내성 표현형은 다음과 같았다. *E. faecium* 65주, *E. faecalis* 5주, *E. avium* 2주, *E. durans* 1주 및 *E. gallinarum* 1주는 VanA형(반코마이신 MIC, $\geq 256 \mu\text{g/mL}$;

타이코프라닌 MIC, $16- \geq 256 \mu\text{g/mL}$)이었고 *E. faecium* 4주는 VanB형(반코마이신 MIC, $16- \geq 256 \mu\text{g/mL}$; 타이코프라닌 MIC, $8- 12 \mu\text{g/mL}$)이었으며 *E. gallinarum* 1주와 *E. casseliflavus* 1주는 VanC형(반코마이신 MIC, $6-12 \mu\text{g/mL}$; 타이코프라닌 MIC, $2 \mu\text{g/mL}$)이었다. 그리고 *E. faecium* 3주, *E. faecalis* 8주, *E. avium* 1주 및 *E. durans* 1주는 감수성(반코마이신 MIC, $0.38-4 \mu\text{g/mL}$; 타이코프라닌 MIC, $0.05-4 \mu\text{g/mL}$)을 보였다.

Table 2. Genotype analysis of 93 enterococcal isolates with different glycopeptides-resistant phenotypes by using multiplex real-time PCR and melting curve analysis

Species	Resistant phenotype	No. of strains	Results obtained by multiple real-time PCR					
			<i>ddl E. faecium</i>	<i>ddl E. faecalis</i>	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC1</i>	<i>vanC2/C3</i>
<i>E. faecium</i>	VanA	65	65	-	65	-	-	-
	VanB	4	4	-	4	-	-	-
	Susceptible	3	2	-	-	-	-	1
<i>E. faecalis</i>	VanA	5	-	5	5	-	-	-
	Susceptible	8	-	8	-	-	-	-
<i>E. gallinarum</i>	VanA	1	1	1	1	-	1	-
	VanC	1	-	-	-	-	1	1
<i>E. casseliflavus</i>	VanC	1	-	-	-	-	-	1
<i>E. avium</i>	VanA	2	1	1	2	-	-	-
	Susceptible	1	-	1	-	-	-	-
<i>E. durans</i>	VanA	1	1	-	1	-	-	-
	Susceptible	1	-	1	-	-	-	-

Abbreviations: *ddl*, gene encoding D-alanine-D-alanine ligase; *E. faecium*, *Enterococcus faecium*; *E. faecalis*, *Enterococcus faecalis*; *E. gallinarum*, *Enterococcus gallinarum*; *E. casseliflavus*, *Enterococcus casseliflavus*; *E. avium*, *Enterococcus avium*; *E. durans*, *Enterococcus durans*.

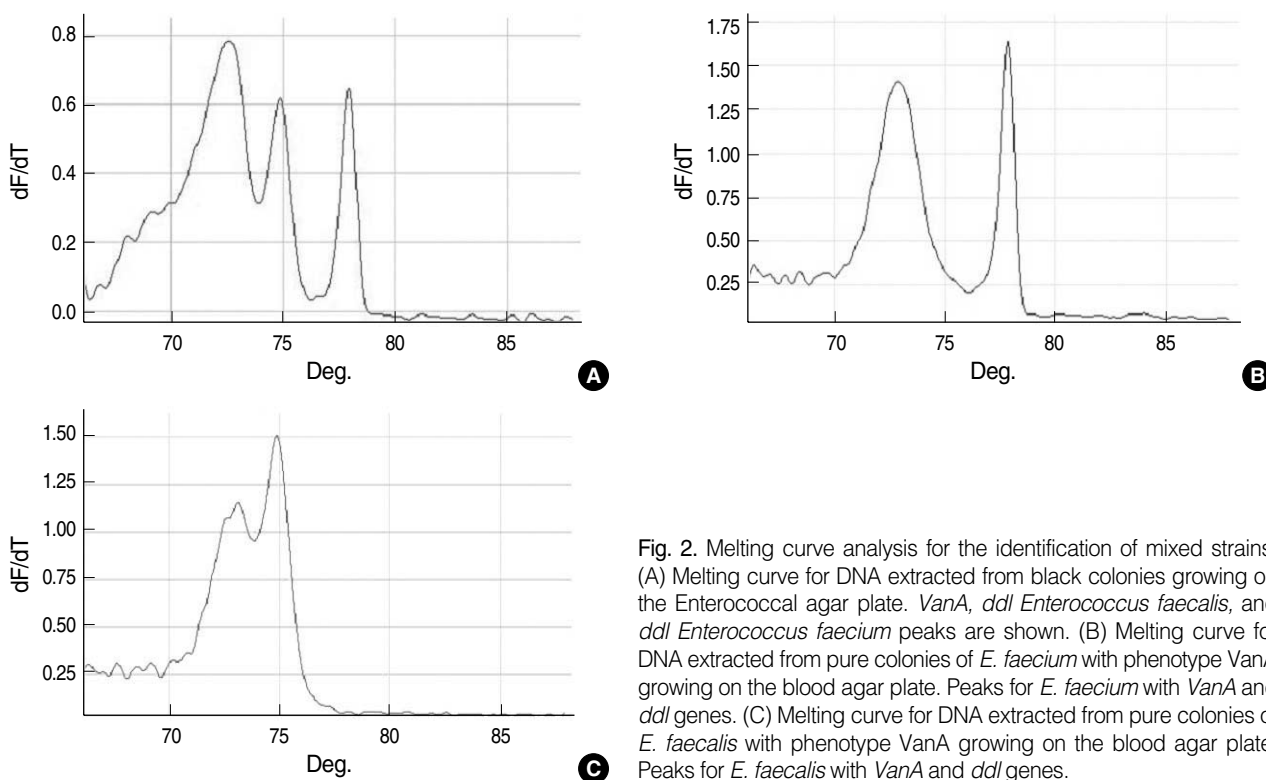


Fig. 2. Melting curve analysis for the identification of mixed strains. (A) Melting curve for DNA extracted from black colonies growing on the Enterococcal agar plate. *VanA*, *ddl* *Enterococcus faecalis*, and *ddl* *Enterococcus faecium* peaks are shown. (B) Melting curve for DNA extracted from pure colonies of *E. faecium* with phenotype VanA growing on the blood agar plate. Peaks for *E. faecium* with *VanA* and *ddl* genes. (C) Melting curve for DNA extracted from pure colonies of *E. faecalis* with phenotype VanA growing on the blood agar plate. Peaks for *E. faecalis* with *VanA* and *ddl* genes.

균종별 유전자형 분석결과는 다음과 같았다(Table 2). VanA형 *E. faecium* 65주와 VanB형 *E. faecium* 4주는 모두 *vanA* 유전자형의 *E. faecium*으로 분석하였다. Glycopeptides에 감수성을 보인 *E. faecium* 3주 중 2주는 *E. faecium*으로 동정되었으나 한 균주에서는 *vanC2/C3* (*E. casseliflavus*/*E. flavescens*) 유전자가 검출되어 생화학적 동정과 불일치하였다. VanA형 *E. faecalis* 5주는 모두 *vanA* 유전자형의 *E. faecalis*

로 분석하였고 감수성을 보인 *E. faecalis* 8주는 *E. faecalis*의 *ddl* 유전자만 검출되어 생화학적 동정과 일치하였다. VanA형 *E. avium* 1주는 *vanA* 유전자만 검출되었고 VanC형 *E. casseliflavus* 1주는 *vanC2/C3* 유전자가 검출되어 생화학적 동정과 일치하였다. VanA형 *E. durans* 1주는 *vanA* 유전자형의 *E. faecium*으로 동정되고 감수성을 보인 *E. avium* 1주와 *E. durans* 1주는 모두 *E. faecalis*로 동정되어 생화학적 동정결과

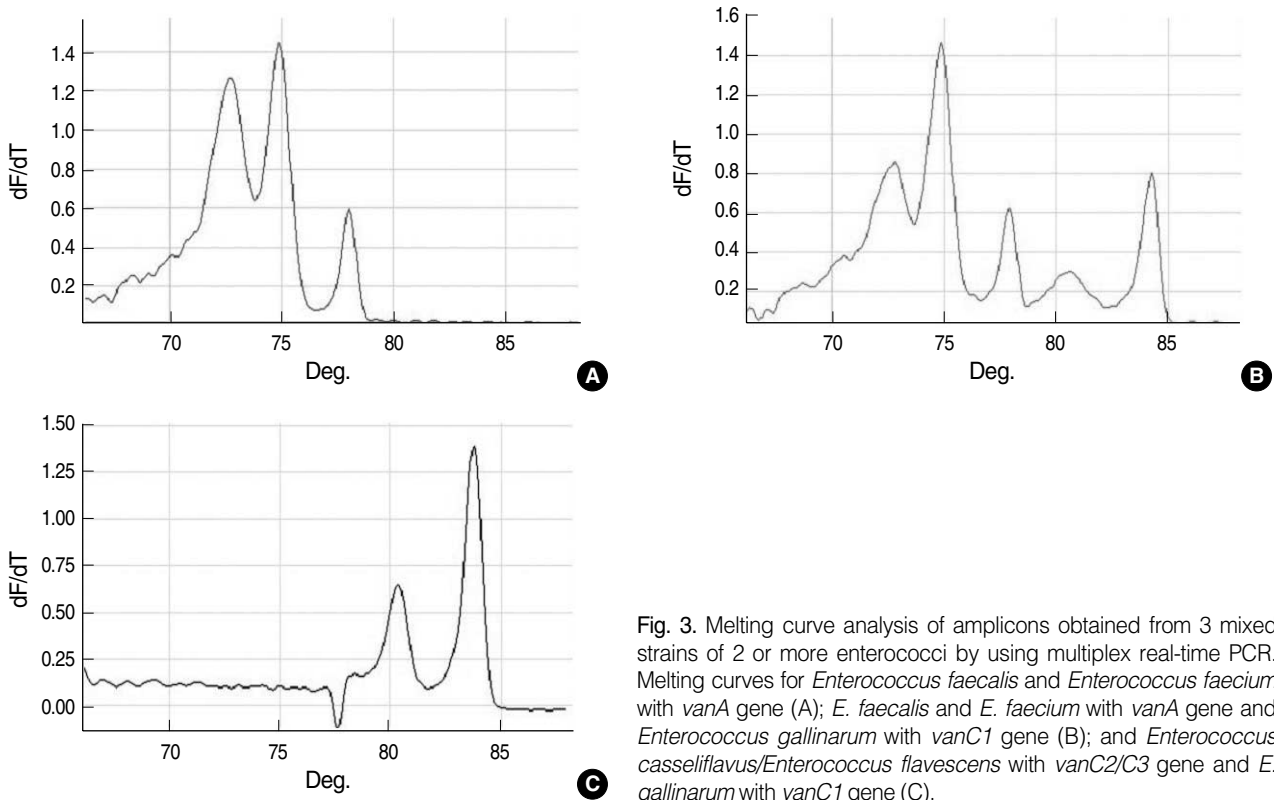


Fig. 3. Melting curve analysis of amplicons obtained from 3 mixed strains of 2 or more enterococci by using multiplex real-time PCR. Melting curves for *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* with *vanA* gene (A); *E. faecalis* and *E. faecium* with *vanA* gene and *Enterococcus gallinarum* with *vanC1* gene (B); and *Enterococcus casseliflavus*/*Enterococcus flavescens* with *vanC2/C3* gene and *E. gallinarum* with *vanC1* gene (C).

와 일치하지 않았다.

한편, 한 검체에 2종 이상의 장구균이 섞여 있는 경우도 있었다. 장구균 93주 중 VanA형 *E. faecium* 1주와 VanA형 *E. faecalis* 1주는 한 검체에서 분리된 균주로 EA 선택배지에서 자란 집락에서 *vanA* *E. faecium*과 *vanA* *E. faecalis*가 검출되었고 혈액한천배지에 계대배양했을 때 두 종류의 순수 집락으로 구분되어 분리되었다(Fig. 2). 그러나 VanA형 *E. avium* 1주, VanA형 *E. gallinarum* 1주 및 VanC형 *E. gallinarum* 1주는 2종 이상의 균주가 혼합된 것처럼 VanA형 *E. avium* 1주는 *vanA* 유전자와 *E. faecium*과 *E. faecalis*의 *ddl* 유전자가 동시에 검출되었으며 VanA형 *E. gallinarum* 1주는 *vanC1* 유전자 및 *vanA* 유전자와 *E. faecium*과 *E. faecalis*의 *ddl* 유전자가 동시에 검출되었고 VanC형 *E. gallinarum* 1주는 *vanC1* 유전자와 *vanC2/C3* 유전자가 함께 검출되었으나 EA 선택배지에 자란 집락을 계대배양하였을 때 순수 집락으로 분리할 수 없었다(Fig. 3).

고 찰

최근 국내에 실시간-중합효소연쇄반응 장비를 도입하는 검

사실이 증가하는 추세이다. 실시간-중합효소연쇄반응 장비는 고가의 기기이지만 중합효소연쇄반응보다 더 민감하고 특이적인 검사법의 개발이 가능하다. 염기서열에 특이한 소식자를 사용하고 융해곡선분석으로 특이도가 높다[16]. 융해곡선분석은 1997년 처음 소개되었다. 융해는 두 가닥 DNA가 가온되면 한 가닥 DNA로 분리되는 현상을 말한다. 두 가닥 DNA에 비특이적으로 결합하는 형광색소(fluorescent dye)인 SYBR Green을 사용하여 융해과정이 실시간으로 측정된다. 반응산물의 염기서열, 크기 및 GC 비율에 따라 특징적인 융해곡선을 보여 전기영동 없이도 융해곡선분석만으로 반응산물을 확인할 수 있었다[17]. 널리 사용되는 SYBR Green은 고농도에서 중합효소연쇄반응을 저해시키고 융해과정에서 형광색소의 재분포가 일어나 유전자형결정(genotyping)까지 가능한 고해상 융해곡선(high-resolution melting curve)분석에는 적합하지 않았다. 최근 개발된 SYTO 9, EvaGreen, LCGreen 등의 형광색소는 이러한 단점이 개선되어 고해상 융해곡선분석에 사용되고 있다[16, 18]. 본 연구에 사용된 Type-it HRM PCR 키트의 master mix에는 EvaGreen이 들어 있다.

다중 중합효소연쇄반응법은 두 쌍 이상의 시발체를 사용하여 두 가지 이상의 검출부위를 동시에 검출할 수 있게 고안된 중합

효소연쇄반응법이다. 일회 반응으로 여러 대상을 검출할 수 있어 검사 시간과 시약 비용을 줄일 수 있다. 실시간-중합효소연쇄반응 장비에서도 소식자의 형광색상과 반응산물의 T_m 차이를 이용하여 다중검사가 가능하다[19-21]. 용해곡선분석을 이용하는 다중 실시간-중합효소연쇄반응법은 다중 중합효소연쇄반응법과 달리 반응산물의 크기보다 반응산물의 T_m 에 차이가 나도록 시발체를 설계한다. 다중반응은 dNTP, Taq polymerase 등 반응 시약들의 농도가 한정된 조건하에 놓이게 되어 시발체 간에 경합 반응이 일어난다. 상대적으로 약한 반응이 일어나는 시발체는 단일반응 때보다 민감도가 저하될 가능성이 있다. Sa-take 등[9]은 다중 중합효소연쇄반응으로 VRE 유전자를 검출하는 경우 단일반응 때보다 검출률이 저하되는 것을 보고하였다. 저자들은 EA 선택배지에 자란 집락에서 DNA를 추출하도록 고안하였기에 주형 DNA의 농도를 민감도 이상으로 유지할 수 있어 다중반응에서 민감도가 저하되는 문제는 유의하지 않다고 추정하였다. 본 검사법은 DNA를 추출할 때 증류수 50 μ L를 사용하면 EA 선택배지에 자란 집락 한 개로 내성 유전자형 결정과 균 동정이 가능하였다. 과량의 주형 DNA를 사용하면 용해곡선이 오른쪽으로 이동되며 T_m 차이가 적은 *vanB*와 *vanC1* 반응산물 간의 구분이 어렵게 되었다. 그래서 중합효소연쇄반응에 사용되는 주형DNA 농도를 20-90 ng으로 조정하여 반응산물이 검출되지 않거나 T_m 값이 증가되는 현상이 일어나지 않도록 하였다.

신속하고 정확한 VRE의 검출은 적절한 감염관리를 시행하여 전파를 차단하는데 매우 중요하다[13]. 더욱이 *vanA* 유전자를 가진 반코마이신 내성 *Staphylococcus aureus*의 출현으로 VRE 감염관리의 중요성이 강조되고 있다[22]. 중합효소연쇄반응법으로 VRE 유전자를 검출하는 방법은 가장 특이도가 높은 검사법이고 저도내성을 갖는 VRE 검출에도 유용하다[6]. 실시간-중합효소연쇄반응 기기의 등장으로 중합효소연쇄반응보다 신속하게 내성 유전자의 검출이 가능하게 되었다[12]. 지금까지 여러 방식의 내성 유전자 검출법이 보고되었으나[7-13], 용해곡선분석을 이용한 방법은 없었다. 이에 저자들은 염기서열에 특이한 소식자를 사용하지 않고 용해곡선분석을 이용하여 *van* 유전자의 검출과 장구균의 동정이 동시에 가능한 다중 실시간-중합효소연쇄반응법을 개발하게 되었다. VRE는 7종류(*VanA*, *VanB*, *VanC*, *VanD*, *VanE*, *VanG*, *VanL*)의 표현형이 있으며 해당 유전자형에 의해 발현된다[6, 23]. 주로 *VanA*, *VanB*, *VanC*형이 임상검체에서 검출되며 균종으로는 *E. faecium*과 *E. faecalis*가 대부분을 차지하고 있다[4, 24-27]. *vanA*와 *vanB* 유전자와 달리 *vanC* 유전자는 내인성의 균종 특이성이

있으며 유전자형의 결정만으로 균 동정이 가능하다. *vanC1*은 *E. gallinarum*, *vanC2*는 *E. casseliflavus*, *vanC3*는 *E. flavescens*에 특이적이지만 *vanC2*와 *vanC3* 유전자는 염기서열이 98.3%가 동일하여 중합효소연쇄반응으로 구분하기 어렵다[28]. 저자들은 임상검체에서 주로 검출되는 *VanA*, *VanB*, *VanC*형의 VRE가 갖고 있는 *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* 유전자를 검출하고 *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*/*E. flavescens*의 동정이 가능하도록 시발체를 설계하였다.

유용성 평가에 사용된 장구균 93주는 2000년 2월 이후 강릉 아산병원 진단검사의학과에서 분리되어 -70°C에 보관된 균주들과 2009년 5월과 6월 두 달 동안 반코마이신 6 μ g/mL가 첨가된 EA 선택배지에 의뢰된 대변 및 직장주변도말 검체를 배양하여 분리한 균주였다. 신속하게 VRE를 검출하는 방법으로 대변이나 직장주변도말 검체에서 직접 DNA를 추출하거나[9, 13, 29-31], 선택배지로 장구균을 선별하는 방법들이 연구되었다[32-34]. 검체에서 직접 DNA를 추출하는 방법은 억제제로 인하여 VRE 검출률이 저하된다[9, 13, 34]. 이에 저자들은 6 μ g/mL가 첨가된 EA 선택배지로 장구균을 선별하여 중탕 가열법으로 DNA를 추출하는 방법을 사용하였다. 이 방법으로 중합효소연쇄반응의 저하 없이 EA 선택배지에 검은색 집락을 형성한 당일에 내성 유전자형 결정과 동정이 가능하였다. 생화학적 균 동정과 MIC의 측정은 EA 선택배지에 자란 검은 집락을 혈액천배지에 계대배양하여 실시하였으므로 실시간-중합효소연쇄반응법을 이용한 VRE 검출보다 2일 이상이 더 소요되었다.

감시배양에서는 한 검체에 두 종 이상의 장구균이 섞여 있는 경우도 있었다. EA 선택배지에 검은 집락을 형성하는 장구균들은 집락의 형태 감별만으로 2종 이상의 장구균이 섞여 있는지 알 수가 없었고 순수 집락을 분리하는데 2차 계대배양이 필요하였다. 대상 균주 중 3주는 2차 계대배양에서도 순수집락으로 분리할 수 없어 2차 계대배양의 집락으로 균 동정과 MIC를 측정하여 *VanA*형 *E. gallinarum*, *VanA*형 *E. avium*, *VanC*형 *E. gallinarum*으로 판정하였다. 본 검사법으로는 이런 경우에도 EA 선택배지에 집락을 형성한 당일에 정확하게 유전자형의 결정과 균 동정을 할 수 있었다. *VanA*형 *E. gallinarum*은 *vanA* *E. faecium*, *vanA* *E. faecalis*, *E. gallinarum*가 혼합된 경우였고, *VanA*형 *E. avium*은 *vanA* *E. faecium*과 *vanA* *E. faecalis*가 혼합된 경우였으며 *VanC*형 *E. gallinarum*은 *E. casseliflavus*/*E. flavescens*와 *E. gallinarum*이 혼합된 경우였다.

대상 균주 중 4주는 생화학적 동정결과와 분자생물학적 동정결과가 불일치하였다. *E. faecium* 1주, *E. avium* 1주, *E. dur-*

ans 2주는 실시간-중합효소연쇄반응법으로 각각 *E. casseliflavus*/*E. flavescens*, *E. faecalis*, *vanA*형 *E. faecium*, *E. faecalis*로 동정되었다. 상용화된 생화학적 동정 키트만으로 장구균을 정확하게 동정하는데 한계가 있는 것 같다. Angeletti 등[35]은 임상검체에서 분리한 장구균 279주 중에 26주에서 중합효소연쇄반응법과 16S 리보솜 DNA의 염기순서분석법을 사용한 분자생물학적 동정결과와 생화학적 동정결과가 불일치를 보고하였다. *Leuconostoc spp.*, *Aerococcus spp.*, *Streptococcus bovis* 등을 장구균으로 잘못 동정하였거나 장구균의 증명에 차이를 보였다. 한편, glycopeptides 내성유전자형과 표현형이 일치하지 않는 VRE 균주도 검출되었다. VanB형 *E. faecium* 4주는 *vanA* 유전자가 검출되었다. 최근 국내병원에서 *vanA* 유전자를 지닌 VanB형 *E. faecium*이 높은 비율로 검출되고 있는데 임상적 의미는 아직 명확하게 밝혀지지 않고 있다[36, 37]. 이런 VRE는 생체 내에서 타이코프란인에 내성을 보일 가능성이 있어 병원 검사실에서는 내성 유전자검사의 실시가 필요하다. 결론적으로 저자들의 융해곡선분석을 이용한 다중 실시간-중합효소연쇄반응법은 EA 선택배지에서 검은 집락을 형성한 당일에 유전자형의 결정과 균 동정이 가능할 뿐만 아니라 여러 *van* 유전자를 갖는 경우나 2종 이상의 장구균이 섞여 있는 경우에도 정확하고 신속하게 검출할 수 있어 VRE 감시배양에 유용할 것이다.

요 약

배경 : 저자들은 융해곡선(melting curve)분석을 이용하여 반코마이신 내성 장구균(VRE)의 유전자형 결정과 임상에서 흔히 검출되는 장구균의 동정이 동시에 가능한 다중 실시간-중합효소연쇄반응법(multiplex real-time PCR)을 개발하여 그 유용성을 평가하였다.

방법 : 검사법의 특이도는 반코마이신 내성 장구균 4개 표준균주와 반코마이신에 감수성이 있는 장구균 2개 표준균주로 평가하였고, 다양한 항균제감수성 양상을 갖는 임상 검체에서 분리된 장구균 93 균주에 대한 내성유전자와 균 동정을 실시하였다.

결과 : *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *vanA*형 *E. faecium*, *vanB*형 *E. faecalis*, *Enterococcus gallinarum* 및 *Enterococcus casseliflavus*의 대표적인 융해곡선을 얻었다. 장구균 93주 중 82주는 유전자형과 표현형이 모두 일치하였다. 4주는 glycopeptides 내성양상이 불일치하였고 다른 4주는 균 동정에 불일치를 보였다. 그리고 3주에서는 순수집락을 분리할 수 없어 glycopeptides 내성양상과 균 동정

에 불일치를 보였다.

결론 : 융해곡선분석을 이용한 다중 실시간-중합효소연쇄반응법으로 VRE 유전자 검사와 장구균 동정검사를 신속하고 정확하게 실시할 수 있었다.

참고문헌

1. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med 1988;319:157-61.
2. Willems RJ, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. Emerg Infect Dis 2005;11:821-8.
3. Park JW, Kim YR, Shin WS, Kang MW, Han KJ, Shim SI. Susceptibility tests of vancomycin-resistant enterococci. Korean J Infect Dis 1992;24:133-7. (박지원, 김양리, 신완식, 강문원, 한경원, 심상인. Vancomycin 내성 enterococci에 대한 감수성 검사. 감염 1992;24:133-7.)
4. Lee WG, Jung MK, Kwak YS. Vancomycin-resistant enterococci: incidence, antimicrobial susceptibility, and resistance genotypes. Korean J Clin Pathol 1998;18:51-6. (이위교, 정민권, 곽연식. Vancomycin 내성 장구균의 분리율, 항균제 감수성 및 내성형에 관한 연구. 대 한임상병리학회지 1998;18:51-6.)
5. Korean Society for Nosocomial Infection Control. Konis web-based reports & analysis program. http://konis.cdc.go.kr/sub/reports_icu.htm (Updated on Jun 2009).
6. Leven M. Molecular methods for the detection of antibacterial resistance genes. In: Lorian V, ed. Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005:509-31.
7. Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM, Tenover FC. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:2311-7.
8. 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.
9. Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. J Clin Microbiol 1997;35:2325-30.
10. Kariyama R, Mitsuhashi R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 2000;38:3092-5.

11. Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S, Claverie-Martin F. A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42:273-7.
12. Palladino S, Kay ID, Costa AM, Lambert EJ, Flexman JP. Real-time PCR for the rapid detection of vanA and vanB genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45:81-4.
13. Palladino S, Kay ID, Flexman JP, Boehm I, Costa AM, Lambert EJ, et al. Rapid detection of vanA and vanB genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:2483-6.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
15. Rozen S and Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S and Krawetz SA, eds. *Bioinformatics methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2000:365-86.
16. Shipley GL. An introduction to real-time PCR. In: Dorak MT, ed. *Real-time PCR*. Abingdon, Oxfordshire: Taylor & Francis, 2006:1-26.
17. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154-60.
18. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003;49:853-60.
19. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 1997;23:504-11.
20. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal* 2002;16:47-51.
21. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 2001;25:430-42.
22. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med* 2003;348:1342-7.
23. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2667-72.
24. Hong KS, Kang ES, Lee MA. Investigation of prevalence of vancomycin-resistant enterococci and genotypes of glycopeptide resistance using polymerase chain reaction. *Korean J Clin Pathol* 1998;18:372-8. (홍기숙, 강은숙, 이미애. Vancomycin 내성 Enterococci의 빈도 조사 및 중합효소연쇄반응을 이용한 유전자형의 분석. 대한임상병리학회지 1998;18:372-8.)
25. Lee SY, Park JH, Park HS, Lee MA, Kang ES, Hong KS. Comparison of antimicrobial susceptibility testing methods to detect glycopeptide resistance in enterococci: E-test, Vitek, disk diffusion and agar dilution method. *Korean J Clin Pathol* 2000;20:301-7. (이수연, 박진희, 박향숙, 이미애, 강은숙, 홍기숙. Glycopeptide 내성 장구균의 항균제 감수성 검사법 비교: E-test, Vitek, 디스크 확산법 및 한천 희석법. 대한임상병리학회지 2000;20:301-7.)
26. Park JH, Lee SY, Lee MA, Chung WS. Investigation of risk factors for vancomycin-resistant enterococci (VRE) infection and colonization. *Korean J Clin Pathol* 2000;20:308-13. (박진희, 이수연, 이미애, 정화순. 반코마이신 내성 장구균 장내 군집 및 감염의 위험인자 분석. 대한임상병리학회지 2000;20:308-13.)
27. Kwon OG, Uh Y, Jang IH, Lee MK, Yoon KJ, Kim HY. Trend of isolation and genotypes of vancomycin-resistant enterococci isolated from tertiary care hospital in Wonju area. *Korean J Clin Pathol* 2000;20:486-93. (권오건, 어영, 장인호, 이미경, 윤갑준, 김효열. 원주지역 3차 병원에서 분리된 vancomycin 내성 장구균의 분리 추이와 내성 유전자형. 대한임상병리학회지 2000;20:486-93.)
28. Navarro F and 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.
29. Paule SM, Trick WE, Tenover FC, Lankford M, Cunningham S, Stosor V, et al. Comparison of PCR assay to culture for surveillance detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2003;41:4805-7.
30. Sloan LM, Uhl JR, Vetter EA, Schleck CD, Harmsen WS, Manahan J, et al. Comparison of the Roche LightCycler vanA/vanB detection assay and culture for detection of vancomycin-resistant enterococci from perianal swabs. *J Clin Microbiol* 2004;42:2636-43.
31. Stamper PD, Cai M, Lema C, Eskey K, Carroll KC. Comparison of the BD GeneOhm VanR assay to culture for identification of vancomycin-resistant enterococci in rectal and stool specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45:3360-5.
32. Sahm DF, Free L, Smith C, Eveland M, Mundy LM. Rapid charac-

- terization schemes for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1997;35:2026-30.
33. Petrich A, Luinstra K, Page B, Callery S, Stevens D, Gafni A, et al. Effect of routine use of a multiplex PCR for detection of vanA- and vanB- mediated enterococcal resistance on accuracy, costs and earlier reporting. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;41:215-20.
34. Drews SJ, Johnson G, Gharabaghi F, Roscoe M, Matlow A, Tellier R, et al. A 24-hour screening protocol for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2006;44:1578-80.
35. Angeletti S, Lorino G, Gherardi G, Battistoni F, De Cesaris M, Diuonzo G. Routine molecular identification of enterococci by gene-specific PCR and 16S ribosomal DNA sequencing. *J Clin Microbiol* 2001;39:794-7.
36. Song JH, Ko KS, Oh WS, Park S, Heo ST, Kwon KT, et al. High frequency of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates with VanB phenotype and vanA genotype in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:401-6.
37. Park IJ, Lee WC, Shin JH, Lee KW, Woo GJ. VanB phenotype-vanA genotype *Enterococcus faecium* with heterogeneous expression of teicoplanin resistance. *J Clin Microbiol* 2008;46:3091-3.