

vanA 유전자를 지닌 Vancomycin 내성 장구균의 VanB 표현형 발현 기전

박일중¹ · 이위교² · 이혁민³ · 용동은⁴ · 이경원⁴ · 김의종⁵ · 정석훈⁶ · 박연준⁷ · 최태열⁸ · 어 영⁹ · 신종희¹⁰ · 이종욱¹¹ · 안지영¹²
이성희¹³ · 우건조¹⁴

아주의대 가정의학교실¹, 아주의대 진단검사의학교실², 관동의대 진단검사의학교실³, 연세의대 진단검사의학교실⁴, 서울의대 진단검사의학교실⁵,
고신의대 진단검사의학교실⁶, 가톨릭의대 진단검사의학교실⁷, 한양대의대 진단검사의학교실⁸, 원주의대 진단검사의학교실⁹, 전남의대 진단검사의학교실¹⁰,
건양대의대 진단검사의학교실¹¹, 순천향대의대 진단검사의학교실¹², 제주한마음병원 진단검사의학과¹³, 식품의약품안전청 식품안전평가부 식품미생물과¹⁴

Mechanism of VanB Phenotype in Vancomycin-Resistant Enterococci carrying *vanA* gene

Il Joong Park, M.D.¹, Wee Gyo Lee, M.D.², Hyukmin Lee, M.D.³, Dongeun Yong, M.D.⁴, Kyungwon Lee, M.D.⁴,
Eui-Chong Kim, M.D.⁵, Seok Hoon Jeong, M.D.⁶, Yeon Jun Park, M.D.⁷, Tae Yeal Choi, M.D.⁸, Young Uh, M.D.⁹,
Jong Hee Shin, M.D.¹⁰, Jongwook Lee, M.D.¹¹, Ji young Ahn, M.D.¹², Sung-Hee Lee, M.D.¹³, and Gun-Jo Woo, Ph.D.¹⁴

Departments of Family Medicine¹ and Laboratory Medicine², Ajou University School of Medicine, Suwon; Departments of Laboratory Medicine, University of Kwandong College of Medicine³, Goyang; Yonsei University College of Medicine⁴, Seoul; Seoul University College of Medicine⁵, Seoul; Kosin University College of Medicine⁶, Busan; The Catholic University of Korea College of Medicine⁷, Seoul; Hanyang University College of Medicine⁸, Seoul; Yonsei University Wonju University College of Medicine⁹, Wonju; Chonnam National University College of Medicine¹⁰, Gwangju; Keonyang University College of Medicine¹¹, Daejeon; Sooncheonhyang University College of Medicine¹², Gumi; Cheju Hanmaeum Hospital¹³, Jeju; Center for Food Safety Evaluation¹⁴, Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea

Background : Recently, vancomycin-resistant enterococci (VRE) with the *vanA* genotype that are susceptible to teicoplanin have been described in Japan, Taiwan, and Korea. The investigators suggested three point mutations in the putative sensor domain of *vanS* or impairment of accessory proteins VanY and VanZ as an explanation for the VanB phenotype-*vanA* genotype VRE. In this study, we analyzed Tn 1546-like elements to determine the molecular mechanisms responsible for the impaired glycopeptide resistance of clinical VRE isolates with VanB phenotype-*vanA* genotype from Korea.

Methods : From 2001 to 2004, 28 clinical isolates of *Enterococcus faecium* with VanB phenotype-*vanA* genotype were collected from 8 different university hospitals in diverse geographic areas in Korea. For structural analysis of Tn 1546-like elements, PCR amplifications for internal regions of Tn 1546 were performed. The purified PCR products were directly sequenced with an ABI Prism 3100 DNA sequencer.

Results : The sequence data of the *vanS* regulatory gene revealed that none of the isolates had any point mutations in this gene. All 28 isolates had a complete or incomplete deletion of *vanY* gene. Of these, 13 strains represented a complete deletion of *vanZ*, and 2 strains showed the deletion of nucleotides near the end point of *vanX*.

Conclusions : The mechanism of VanB phenotype-*vanA* genotype in VRE isolates from Korea is not point mutations of *vanS* but the rearrangements of *vanX*, *vanY* and *vanZ*. (*Korean J Lab Med* 2006;26:412-7)

Key Words : VRE, VanB, *vanA*, *vanS*, *vanX*, *vanY*, *vanZ*

접 수 : 2006년 8월 11일 접수번호 : KJLM1979
수정본접수 : 2006년 10월 11일
게재승인일 : 2006년 10월 27일
교 신 저 자 : 이 위 교
우 442-721 경기도 수원시 영통구 원천동 산5
아주대학교 의과대학 진단검사의학교실
전화 : 031-219-5785, Fax : 031-219-5778
E-mail : weegyo@ajou.ac.kr

서 론

Vancomycin 내성 장구균(vancomycin-resistant enterococci, VRE)은 1986년 영국과 프랑스에서 처음으로 보고되었고, 일년

*본 연구는 2004년 식품의약품안전청에서 주관한 용역연구개발사업의 지원으로 이루어진 것임.

후 미국에서도 보고 된 이래 발생이 급격히 증가하고 있다[1, 2]. 미국 국가 병원감염 감독위원회(National Nosocomial Infections Surveillance System, NNIS)에서는 중환자실에서 분리되는 장구균 중 VRE의 비율이 1989년에 0.4%에서 1993년에는 13.6%로 증가하였으며, 2004년까지 31.3%로 급증하였음을 보고 하였다[3, 4]. 국내에서는 1992년 박 등이 백혈병 환자의 가검물에서 vancomycin에 고도내성을 보이는 *Enterococcus durans* 1주를 보고 하였고, 이후 1997년까지 VRE의 분리빈도는 매우 낮았으나 1998년부터 경구용 vancomycin 사용의 증가와 더불어 현저하게 증가하고 있다[5, 6].

장구균의 vancomycin 내성 표현형 VanA, VanB, VanC, VanD, VanE 및 VanG 중에서 VanA와 VanB가 임상적으로 의미 있으며, 일반적으로 유전형과 표현형이 일치한다[7-12]. 즉, vancomycin과 teicoplanin에 내성을 보이는 VanA형의 경우 vanA 유전자를, vancomycin에는 내성이나 teicoplanin에 감수성인 VanB형의 경우 vanB 유전자를 보유한다. 최근 VanB 표현형을 보이거나 vanA 유전자를 갖는 VanB phenotype-vanA genotype VRE가 보고된 바 있다. Hashimoto 등[13]은 vanA 유전형 VRE에서 teicoplanin에 감수성을 보이는 것은 vanS domain의 3개의 점돌연변이가 원인인 것으로 설명하였으며, 태국 및 한국에서도 이와 같이 보고한 바 있다[14, 15]. 그러나, 이와는 다른 원인으로 vanY와 vanZ의 단백질들의 결실 혹은 변형을 생각할 수 있으며, 최근 한국에서 VanB phenotype-vanA genotype VRE 5예 중 한 균주에서 vanX의 부분 결실을, 다른 4균주에서 vanY 또는 vanZ 유전자의 결실이 있음을 보고한 바 있다[16]. 본 연구에서는 한국에서 발생하는 VanB phenotype-vanA genotype VRE의 발현 기전을 알아보기 위하여 국내 대학병원에서 분리된 VanB phenotype-vanA genotype VRE 균주의 유전자 분석 및 염기서열 분석을 통하여 분자생물학적 발현 기전을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상 및 세균 동정

2001년 1월부터 2004년 12월까지 전국 8개 대학병원에서 수집한 디스크 확산법상 표현형이 VanB 형인 VRE 28균주를 대상으로 하였다. 각 균주는 vancomycin 6 mg/L을 함유한 brain heart infusion agar를 이용하여 선택 한천 배지법으로 vancomycin 내성 여부를 검색하였고, VRE로 검색된 모든 균주에 대하여 기존의 수기법, API 20 STREP (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA) 및 Vitek system (bioMérieux)을 이용하여 동정하였다. 각 균주의 vancomycin, teicoplanin 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정을 위하여 E-test를 시행하였다[17].

2. 역학적 연관성 분석

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)는 다음과 같이 시행하였다. Murray 등[18]이 기술한 바와 같이 *Sma*I으로 25°C에서 처리한 후 ramped pulse time을 시작 1초 및 끝 20초로 하였으며, 6 V/cm, 24시간 전기영동 하였다. 이후 banding pattern은 Bio-Gene software (Vilber Lourmat, Marne la-valles, France)를 이용하여 비가중평균결합법(unweighted pair group method with arithmetic average, UPGMA) 법으로 군집 분석하여 역학적 연관성을 결정하였다.

3. 유전자 구조 분석

vanA gene cluster가 포함된 transposon Tn1546 내부를 증폭되도록 증폭한 후 표준 균주인 *E. faecium* BM4147[8]과 비교하는 PCR 지도화(mapping)를 시행하였고, 증폭산물 중 원형(prototype)과 비교하여 크게 증폭된 부분에 대하여 IS1216V 및 IS1542에 대한 PCR을 시행하여 내성유전자의 구조를 분석하였다.

4. 유전자 염기 서열 분석 및 핵산부합법(Nucleic acid hybridization)

유전자 변형이 발생한 부위 및 vanS domain에 대한 유전자 염기 서열 분석 및 핵산부합법을 시행하였다. PCR 증폭 산물을 전기 영동한 후에 한천으로부터 GENECLEAN kit (Qbiogene Inc, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출한 후, ABI Prism 3100 DNA SEQUENCER (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 염기 서열을 분석한 후, DNASIS v2.6 (Hitachi Software, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 내성 유전자의 구조를 판독하였다. 유전자 결실 부위 확인을 위하여 Tn1546 내부 증폭산물을 이용하여 핵산부합법을 시행하였다.

결 과

1. 세균 동정 및 최저발육저지농도

대상 균주 28균주 모두 *E. faecium*으로 동정되었다. E-test에 의한 MIC 검사 결과 vancomycin에 대하여는 대상 균주 모두 고도내성이었고, teicoplanin에 대하여는 감수성 혹은 중간이었다(Table 1).

2. 유전적 형별 분석

PFGE를 이용한 28균주의 유전적 형별분석 결과 역학적으로 연관성이 없었다(Fig. 1).

Isolates	Species	Vancomycin		Teicoplanin	
		MIC (mg/L)	Suscep-tibility	MIC (mg/L)	Suscep-tibility
J1	<i>E. faecium</i>	>256	R	16	I
J2	<i>E. faecium</i>	>256	R	16	I
J3	<i>E. faecium</i>	>256	R	12	I
J4	<i>E. faecium</i>	>256	R	12	I
J5	<i>E. faecium</i>	>256	R	12	I
J6	<i>E. faecium</i>	>256	R	12	I
J7	<i>E. faecium</i>	>256	R	16	I
J8	<i>E. faecium</i>	>256	R	16	I
J9	<i>E. faecium</i>	>256	R	4	S
J10	<i>E. faecium</i>	>256	R	12	I
J11	<i>E. faecium</i>	>256	R	8	S
J12	<i>E. faecium</i>	>256	R	24	I
J13	<i>E. faecium</i>	>256	R	16	I
J14	<i>E. faecium</i>	>256	R	16	I
J15	<i>E. faecium</i>	>256	R	1	S
J16	<i>E. faecium</i>	>256	R	24	I
J17	<i>E. faecium</i>	>256	R	16	I
J18	<i>E. faecium</i>	>256	R	24	I
J19	<i>E. faecium</i>	>256	R	16	I
J20	<i>E. faecium</i>	>256	R	24	I
J21	<i>E. faecium</i>	>256	R	2	S
J22	<i>E. faecium</i>	>256	R	12	I
J23	<i>E. faecium</i>	>256	R	1	S
J24	<i>E. faecium</i>	>256	R	8	S
J25	<i>E. faecium</i>	>256	R	12	I
J26	<i>E. faecium</i>	>256	R	8	S
J27	<i>E. faecium</i>	>256	R	6	S
J28	<i>E. faecium</i>	>256	R	16	I

3. 유전자 구조 및 염기서열 분석

Orf2-vanR intergenic region에 삽입된 삽입서열(insertional sequences, IS)의 종류에 따라 추가 분류하였다. 즉, IS1216v가

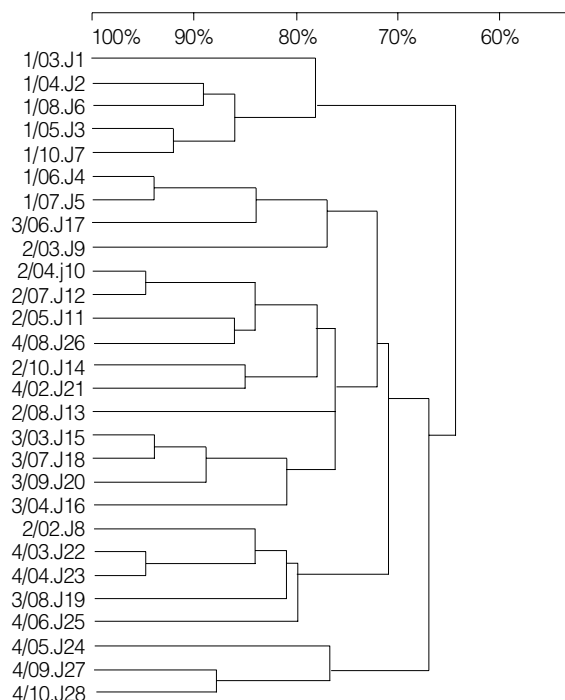


Fig. 1. Dendrogram of *E. faecium* isolates with VanB phenotype-*vanA*. To produce the dendrogram, the banding patterns of *E. faecium* isolates were interpreted by Dice analysis and analysis by the unweighted pair group method with arithmetic averages.

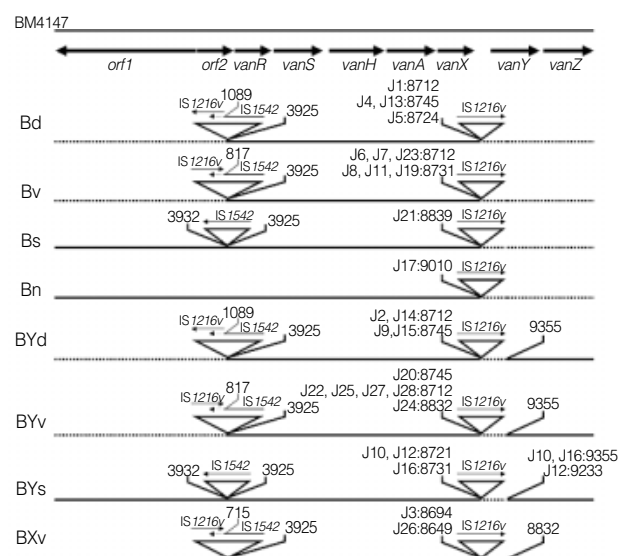


Fig. 2. The genetic maps of Tn 1546 types of *E. faecium* isolates with VanB phenotype-*vanA* genotype from Korean hospitals. The positions of genes and open reading frames (*orf1* and *orf2*) and the direction of transcription are marked by dark arrows at the top. The inverted triangles represent IS elements. The positions of the first nucleotide upstream and the first nucleotide downstream from the IS insertion sites are depicted. Solid arrows indicate the transcriptional orientation of the inserted IS elements. Deletions are indicated by dotted lines.

IS1542에 순방향으로 삽입된 균은 *d (Bd 및 BYd)로, IS1216v가 IS1542에 역방향으로 삽입된 균은 *v (Bv, BYv 및 BXv)로, IS1542만 삽입된 균은 *s (Bs 및 BYs)로, IS의 삽입이 없었던 균은 Bn으로 구분하였다(Fig. 2).

고 찰

VRE의 내성형 중 VanA형은 vancomycin (MIC, ≥ 64 mg/L)과 teicoplanin (MIC, ≥ 32 mg/L)에 획득성, 유도성 내성을 보이며[19], 많은 연구가 이루어져있다[8]. 이와 같은 glycopeptide에 대한 고도내성은 접합에 의해서 내성수여자에게 전달된다. VanA 표현형의 발현을 위한 유전정보는 Tn1546에 의하여 운반되며 이러한 전위유전단위(transposons)의 확산이 임상적으로 동정되는 장구균에서 glycopeptide에 대한 고도내성을 유발하는 것이 알려져 있다[20]. Tn1546은 10.4 kb 크기로 총 9개의 단백을 암호화하며, 4개의 기능성 그룹으로 나누어진다. 즉, 치환기능의 open reading frames (*orf1*, *orf2*), 유전발현을 조절하는 *vanR*, *vanS*, 실제 내성 발현을 유발하는 효소인 depsipeptide를 암호화하는 *vanH*, *vanA*, *vanX*, 그리고 내성에 필수적이지는 않으나 펩티도글리칸 합성에 관여하는 *vanY*와 *vanZ*로 나누어진다[8, 21, 22].

VRE의 glycopeptide에 대한 내성 기전은 다음과 같다. Glycopeptide를 protein kinase인 VanS의 막횡단 부위의 외부 고리에서 감지하고, VanS의 cytoplasmic histidine 잔류물(residue)의 자가인산화 후 phosphoryl group이 반응 조절인자(response regulator)인 VanR의 aspartate 잔류물로 전이된다. 인산화된 VanR은 *vanH*의 promotor sequence에 부착하여 전사를 일으켜 VanH를 생산한다. 이어서 VanH의 α -ketoreductase가 pyruvate를 환원하여 D-Lac을 생성한다. VanA는 변형된 특이도를 갖는 D-Ala-D-Ala ligase로서 VanH에 의하여 생성된 D-Lac에 D-Ala를 연결한다. 이후 D-Ala-D-Lac 전구체는 UDP-N-acetyl muramide tripeptide에 결합한다. 그러나, 일반적으로 장구균의 염색체에 존재하는 D-Ala-D-Ala ligase에 의하여 정상적인 D-Ala-D-Ala 전구체도 생성되는데, 이렇게 생성된 D-Ala-D-Ala 전구체는 Zn^{2+} -dependent dipeptidase인 VanX에 의하여 제거된다. 따라서 세포벽의 전구체는 대부분 내성형으로 구성된다. 또한 VanY는 accessory carboxypeptidase로서 VanX에 의하여 제거되지 않고 세포질 내에 존재하는 D-Ala-D-Ala 잔류물이 포함된 pentapeptide를 제거하는 역할을 한다. 마지막으로 VanZ는 저농도 teicoplanin 내성에 관여한다고 알려져 있으나 정확한 기능은 아직 명확히 밝혀져 있지 않다[8].

VRE의 유전형과 표현형은 일반적으로 일치한다. 즉, vancomycin과 teicoplanin에 내성을 보이는 VanA형의 경우 *vanA* 유전자를, vancomycin에는 내성이나 teicoplanin에 감수성인 VanB형의 경우 *vanB* 유전자를 보유한다. 그러나, 최근 VanB 표현형

을 보이거나 *vanA* 유전자를 가지는 경우가 일본, 태국 그리고 한국 등에서 보고되고 있다[13-16]. Hachimoto 등[13]은 VanB phenotype-*vanA* genotype VRE의 발생기전으로 내성 발현 초기 단계를 담당하는 *vanS* domain의 3점 돌연변이로 설명하고 있다. 즉, *vanA* 유전자의 발현 조절을 담당하는 VanS는 환경내 vancomycin의 존재유무를 감지하여 책임 조절자인 VanR에게 신호를 전달한다. 이후 VanR이 활성화 되어 VanHAX의 합성을 유발한다[8]. 내성 발현의 초기단계를 담당하는 *vanS*의 3점 돌연변이는 VanS의 아미노산 치환을 유발하고, 이에 따른 teicoplanin에 대한 반응의 손실이 teicoplanin에 대한 내성 감소를 유발하는 것으로 설명하고 있다. 이후 중국 및 한국에서 *vanS* domain의 3점 돌연변이에 의한 VanB phenotype-*vanA* genotype VRE 발생을 보고한 바 있다[14, 15].

본 연구의 teicoplanin에 대한 MIC 검사에서 모든 균주가 teicoplanin에 감수성 혹은 중간을 보여, 28균주 모두 VanB phenotype-*vanA* genotype VRE로 확인되었다. VanB phenotype-*vanA* genotype VRE 28균주에서 *vanS* domain의 유전자 돌연변이는 없었으며, 이를 통하여 한국에서 발생하는 VanB phenotype-*vanA* genotype VRE는 일본 및 중국과는 달리 *vanS* domain의 유전자 돌연변이가 아닌 다른 기전임을 알 수 있었다. VanB phenotype-*vanA* genotype VRE 28균주 중 26균주에서 *vanY*의 유전자 변형을 관찰할 수 있었다. 이중 13개 균주(J2, J9, J14, J15, J20, J22, J24, J25, J27, J28, J10, J12 및 J16)에서는 IS1216v가 nt8712, nt8832 및 nt8845 위치에 삽입되면서 nt9355까지 총 523-643 bp의 염기 손실이 발생하여 *vanY*의 부분 결실(220-340 bp)이 관찰되었다. 이러한 결과는 기존 한국에서 보고된 VanB phenotype-*vanA* genotype VRE 5예[16]와 유사하다. 또한, *vanY* 유전자 변형을 관찰할 수 있었던 26균주 중 13균주(J1, J4, J5, J13, J6, J7, J8, J11, J18, J19, J23, J21 및 J17)에서는 IS-1216v의 삽입에 의한 *vanY* 및 *vanZ*의 완전 결실을 발견할 수 있었다. 저농도 teicoplanin 내성에 관여하는 것으로 알려져 있는 *vanZ* 역시 teicoplanin 내성 발현에 역할을 할 수 있다는 가능성은 제시되었지만, *vanZ* 유전자만의 변형이 발생한 균주가 관찰되지 않아 *vanZ*의 손실이 VanB phenotype-*vanA* genotype VRE를 유발했는지의 여부는 확인할 수 없었다. VanB phenotype-*vanA* genotype VRE 2개 균주(J3 및 J26)에서 *vanX*의 마지막 위치인 nt8624와 인접한 nt8649와 nt8694에서 손실이 확인되었다. 이러한 손실이 *vanX* 유전자 발현에 영향을 주어 VanB 표현형 발현을 유발한 것으로 추정된다.

본 연구 결과를 통하여 한국의 VanB phenotype-*vanA* genotype VRE의 발생기전이 일본 및 중국과는 다르며, IS1216v의 삽입과정과 동반된 *vanX*, *vanY* 및 *vanZ* 유전자 손실이 주된 기전임을 확인할 수 있었다. 또한 VanB phenotype-*vanA* genotype VRE에 대한 대처는 아직 그 임상적 의의가 정확히 알려져 있지 않아, VanA형 VRE에 준한 치료가 필요하고 생각되며, 향후 teicoplanin 투여가능성 및 생체내 감수성에 대한 연구가 필요

하다고 사료된다.

요 약

배경 : 최근 일본, 중국 및 한국에서 teicoplanin에 감수성인 *vanA* 유전형 vancomycin 내성 장구균(VRE)이 보고되었다. 그 기전으로 *vanS* domain의 3점 돌연변이와 부단백인 VanY 혹은 VanZ의 결여로 보고된 바 있다. 본 연구에서는 Tn1546의 분석을 통하여 한국에서의 VanB phenotype-*vanA* genotype VRE의 분자생물학적 기전을 밝히고자 하였다.

방법 : 2001년부터 2004년까지 전국에 산재한 8개 대학병원에서 분리된 VanB phenotype-*vanA* genotype *Enterococcus faecium* 28균주를 대상으로 하였다. Tn1546의 구조 분석을 위해 PCR을 시행하였고, 정제된 PCR 산물을 이용하여 염기서열분석을 하였다.

결과 : 총 28균주의 VanB phenotype-*vanA* genotype VRE 모두에서 *vanS* domain의 점 돌연변이가 관찰되지 않았지만 *vanY* 유전자의 부분 혹은 완전 결실이 관찰되었다. 이 중 13균주에서 *vanZ* 유전자의 결실이 동반되었다. 또한 2균주에서 *vanX*의 끝 인접부분의 염기 손실이 확인되었다.

결론 : 한국에서 발생하는 VanB phenotype-*vanA* genotype VRE의 발생은 *vanS* domain의 3점 돌연변이에 의한 것이 아닌 *vanX*, *vanY* 및 *vanZ*의 재배열에 의한 것임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin & teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med 1988;319:157-61.
2. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet 1988;1:57-8.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Nosocomial enterococci resistance to vancomycin-United States, 1989-1993. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1993;42:597-9.
4. National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004;32:470-85.
5. Park JW, Kim YR, Shin WS, Kang MW, Han KJ, Shim SI. Susceptibility tests of vancomycin-resistant enterococci. Korean J Infect Dis 1992;24:133-8.(박지원, 김양리, 신완식, 강문원, 한경자, 심상인. Vancomycin내성 enterococci에 대한 감수성 검사. 감염 1992;24:133-8.)
6. Shin JW, Yong D, Kim MS, Chang KH, Lee K, Kim JM, et al. Sudden increase of vancomycin-resistant enterococcal infections in a Korean tertiary care hospital: possible consequences of increased use of oral vancomycin. J Infect Chemother 2003;9:62-7.
7. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev 2000;13:686-707.
8. Arthur M and Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:1563-71.
9. Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:2005-8.
10. Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2016-8.
11. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2161-4.
12. McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:3224-8.
13. Hashimoto Y, Tanimoto K, Ozawa Y, Murata T, Ike Y. Amino acid substitutions in the *vanS* sensor of the *vanA*-type vancomycin-resistant enterococcus strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. FEMS Microbiol Lett 2000;185:247-54.
14. Lauderdale TL, McDonald LC, Shiau YR, Chen PC, Wang HY, Lai JF et al. Vancomycin-resistant enterococci from humans and retail chickens in Taiwan with unique VanB phenotype-*vanA* genotype incongruence. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:525-7.
15. Eom JS, Hwang IS, Hwang BY, Lee JG, Lee YJ, Cheong HJ, et al. Emergence of *vanA* genotype vancomycin-resistant enterococci with low or moderate levels of teicoplanin resistance in Korea. J Clin Microbiol 2004;42:1785-6.
16. Lee WG, Huh JY, Cho SR, Lim YA. Reduction in glycopeptide resistance in vancomycin-resistant enterococci as a result of *vanA* cluster rearrangements. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1379-81.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 7th ed. Approved standard M7-A7. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
18. Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. J Clin Microbiol 1990;28:2059-63.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement, M2-A9 and M7-A7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory

Standards Institute, 2006.

20. Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvallin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. J Bacteriol 1993;175:117-27.
21. Arthur M, Molinas C, Courvalin P. Sequence of the *vanY* gene required for production of a vancomycin-inducible D,D-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium* BM4147. Gene 1992;120:111-4.
22. Arthur M, Molinas C, Courvallin P. The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. J Bacteriol 1992; 174:2582-91.