

Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Stools and Their Acquisition of Vancomycin Resistance

Hee Jeong Kim[†], Heun Young Kwon[†], Kang Lim Kim, Hyo Jin Lee,
Hyun Jung Jo, Soo Myung Hwang and Kyung Soo Chang^{*}

Department of Clinical Laboratory Science, Catholic University of Pusan, Busan, Korea

We have isolated 6 vancomycin resistant (VR) *Enterococcus faecium* and 5 VR-*E. gallinarum*. Vancomycin resistant enterococcus (VRE) isolates were resistant to multi-drugs, but susceptible to linezolid and quinupristin/dalfopristin. VRE isolates showed 10 VanA phenotypes and 1 VanB phenotype (*E. gallinarum*). However, all of them showed *vanA* genotype. *vanA* gene was detected on both genomic and plasmid DNA from all VRE isolates. Almost of VR-*E. faecium* had IS1216V which is worldwide type and almost of VR-*E. gallinarum* had IS1542 which is European type. IS1216V and IS1542 genes were not related with antibiotic types of VRE. Copy numbers of *vanA* were decreased in VRE with IS1216V or IS1542 but not in VRE with both ISs in broth without vancomycin. The copy numbers of *vanA* were significantly decreased in VanB phenotype of VRE with IS1542 in broth without vancomycin. Copy numbers of *vanA* were recovered in the presence of vancomycin. Growth time of reference *E. faecium* is faster than that of reference *E. faecalis* when cultured in the broth containing vancomycin. Reference strains cultured in the broth containing vancomycin showed intermediate resistance or resistance to antibiotics without acquisition of *van* genes. Naturally, multidrug-resistant *E. faecium* might be fast adapted in the presence of vancomycin compared to *E. faecalis*. Taken together, VanA phenotype *E. gallinarum* as well as *E. faecium* have been increasing in nosocomial infection and showed acquired inducible resistance. *E. faecium* and *E. faecalis* showed intermediate resistance in long exposure of vancomycin without acquisition of *vanA*.

Key Words: Vancomycin resistant enterococci (VRE), *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. faecalis*, *van* gene, IS gene

서 론

장알균 (*Enterococcus*)은 Gram 양성, 통성혐기성 알균으로 주로 쌍알균으로 관찰되며, 장내세균총의 일부를 구성하는 위장관의 정상 상재균으로 *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*를 포함하여 17종이 존재하며,

임상에서는 *E. faecalis*와 *E. faecium*이 대부분 분리되고 있다 (1). 십여 년 전부터 미국의 대형 병원을 중심으로 여러 항균제에 내성을 보이는 *E. faecium*이 등장해 새로운 중요한 병원 감염 균으로 대두되고 있으며, 미국의 질병 관리본부 (CDC)의 자료에 의하면 1990년과 1992년 사이에 네 번째로 많은 원내 병원균으로 인식되었지만, 근래 들어 두, 세 번째로 많은 원내 병원균으로 보고되고 있다 (2). *Enterococcus* 감염증은 상당수가 입원 중에 발생하며 의료인의 손이나 의료기구 및 병원 내 환경과 환자 간에 의한 전파가 가능하고, 면역력이 약한 환자에게서 쉽게 감염되며, 과도한 항생제 사용으로 내성균의 증가를 야기시키고 있다 (3~6). 1986년 프랑스와 영국에서 반코마이신 (vancomycin)에 내성을 나타내는 *vanA*를 가진 *E. faecium*, vancomycin-resistant enterococci (VRE)가 보고된

Received: September 3, 2010/ Revised: October 28, 2010

Accepted: November 2, 2010

[†]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author: Kyung Soo Chang. Department of Clinical Laboratory Science, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea. Phone: +82-51-510-0565, Fax: +82-51-510-0568

e-mail: kschang@cup.ac.kr

^{**}This research was supported by the research fund of the Catholic University of Pusan.

이래 (7) 1987년 *vanB*를 가진 *E. faecalis*가 보고되면서 VRE는 각 병원의 면적이 저하된 중환자실 환자들을 중심으로 급증하고 있다. 또한 임상에서의 vancomycin 사용량의 증가는 다제약제내성을 가진 VRE를 출현시켰으며, 이러한 VRE에 의한 균혈증은 70%의 치사율을 보이고 있다.

VRE는 유전자 pattern에 따라 표현형이 다르며, VanA, VanB, VanC, VanD, VanE 등이 있는데 (8), VanA 표현형은 vancomycin과 teicoplanin에 내성을 보이며, 주로 *E. faecalis*와 *E. faecium*으로 세포벽의 peptidoglycan 기질 (matrix)의 말단을 D-Ala-D-Ala에서 D-Ala-D-Lac으로 변화시켜 vancomycin의 말단 결합력을 낮추거나 chromosome에 위치된 D-Ala-D-Ala 전구체를 생산하는 *ddl* ligase의 변형을 통해 항생제의 결합을 감소시켜 높은 농도의 vancomycin과 teicoplanin 내성을 가지도록 하며, *vanA* glycopeptide 내성은 Tn1546 또는 transposon에 의해 매개된다. VanB 표현형은 vancomycin에 다양한 수준의 내성을 나타내지만, teicoplanin에는 감수성이며, VanA와 마찬가지로 *van* 유전자 획득과 vancomycin의 유도에 의한 항생제 내성을 나타내며, 주로 *E. faecalis*와 *E. faecium*에서 발견된다. VanC 표현형은 vancomycin에 약하게 내성을 보이며, teicoplanin에는 감수성으로, 내성유전자 획득에 의하지 않고 내재성 내성을 나타내며 다른 균으로 전이는 없다. 주로 *E. gallinarum*과 *E. casseliflavus*에서 발견된다. 장알균은 스스로의 내성기전과 더불어 다른 세균으로부터 내성유전자를 가진 plasmid를 획득할 수 있는 능력이 있고, 이런 plasmid는 접합에 의해 장알균간에 옮겨질 수 있으며, 다른 세균과 plasmid를 교환할 수 있어서 내성 확산을 초래한다 (2, 9). 실제 실험에서 VRE의 내성유전자를 *in vitro*상에서 *Staphylococcus aureus*에 전이시켜 vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA)로 만들어 유전자 전이를 증명하였다 (10). 그리고 VRE 내성유전자의 현재까지 알려진 삽입서열 (insertional sequence; IS)은 IS1216V, IS1251, IS1542, IS1476, IS19 등이 있으며 이들은 대륙별 차이를 보이는데, IS1216V는 전 세계적으로 널리 분포하고, IS1542의 경우 대부분 유럽 분리주에서, IS1251은 미국에서 보고되었다. 국내에서 분리된 VRE의 대부분은 지역이나 병원의 차이가 없이 IS1542와 IS1216V가 삽입되어 있어 유럽 분리주와 유사하다 (11~16). 일본, 대만 및 국내 검사실에서 드물지 않게 분리되고 있는 VanB-phenotype *vanA* genotype VRE의 유래는 *vanS*의 점돌연변

이거나 *vanY*나 *vanZ* 유전자의 부분결실 또는 완전결실 등으로 밝혀져 있다 (17). 요즘 발견되는 VanB-phenotype *vanA* genotype VRE는 *vanS*의 점돌연변이보다는 *vanY*나 *vanZ* 유전자 재조합에 의한 것으로 보고되었다 (18, 19).

본 연구에서는 최근 환자에서 검출된 VRE의 항생제 pattern과 어떠한 항생제 내성유전자를 가지고 있는지를 분석하였으며, 삽입된 IS 유전자 type과 항생제 내성형의 상관성을 분석하고자 하였다. 환경적 요인을 알아보기 위해 표준균주 *E. faecalis*와 *E. faecium*을 vancomycin 존재 하에서 계대배양하여 내성유전자의 획득이 가능한지와 VRE를 vancomycin이 존재하지 않는 환경에서 내성유전자의 자연적 소실이 가능한 지를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

대상균주

2008년 6월부터 2009년 1월까지 부산지역 종합병원의 집중치료실에 입원한 환자 100명의 분변으로부터 분리된 *Enterococcus* 균주를 대상으로, CHROM ID™ VRE agar (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France), Methyl-Alpha-D-Glucopyranoside Medium (MGP, Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA, USA), 운동성 시험법, potassium tellurite 시험법, bile-esculin 시험법, 그리고 자동동정기기인 Vitek의 GPI와 GPS-451kit (BioMerieux)를 이용하여 11주 VRE에 대한 species를 동정하였고, 각 VRE에 대한 항생제 감수성 profile을 작성하여 분석하였으며, 표준균주로는 *E. faecalis* (ATCC 19433)와 *E. faecium* (ATCC 19434)을 사용하였다. 표준균주 및 VRE 분리주는 brain heart infusion (BHI) broth에서 증식시켰으며, 실험목적에 따라 vancomycin을 첨가하였다.

Genomic DNA 추출

Genomic DNA 분리는 AccuPrep genomic DNA extraction kit (Bioneer, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. BHI broth에 37℃에서 24시간 배양된 균을 E-tube에 1.5 ml 옮기고 8,000 rpm에서 2분간 원심한 후 상층액을 제거한 다음, pellet에 TE buffer 200 µl, proteinase K (250 mg/ml) 10 µl, binding buffer 200 µl를 첨가하여 60℃ heat block에서 10분간 처리한 다음 isopropanol 100 µl를 첨가하여 혼합 후 column에 적용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 spectrophotometer (Jas, Tokyo, Japan)를

이용하여 농도를 측정하였으며 PCR 분석용 template로 사용하였다.

Plasmid 추출

Plasmid는 boiling법과 Labopass plasmid mini purification kit (Cosmo Genetech, Seoul, Korea)를 사용하였다. Boiling 법은 DW 100 µl에 1 colony를 잘 혼합한 다음 5분간 boiling한 후 ice에서 2분간 방치하고, 12,000 rpm에서 5분간 원심하여 상층액을 회수하여 농도를 측정 후 PCR template로 사용하였다. Labopass plasmid mini purification kit법은 배양한 균을 2,000 rpm에서 10분간 원심하여 상층액을 제거한 후 kit에 포함되어 있는 resuspension buffer, denaturation buffer, neutralization buffer를 단계적으로 첨가하여 혼합한 다음 column에 적용하여 plasmid DNA를 추출한 후 spectrophotometer를 이용하여 농도를 측정하였으며 PCR 분석용 template로 사용하였다.

PCR

VRE 내성유전자인 *vanA*, *vanB*, *vanC*, *IS1216V*, *IS1542* 유전자를 증폭하기 위한 primer는 GenBank의 염기서열을 이용하여 Bio ToolKit 320의 Primo DOP 3.4 (Chang Bioscience, Castro Valley, CA, USA)를 이용하여 설계하였으며, Table 1과 같이 primer를 합성하였다. PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR premix kit (Bioneer)를 사용하여, DNA 시료 (25 ng) 0.5 µl, primer (10 pM)를 각각 1 µl 넣고 증류수로 총 용액이 20 µl되게 하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 초기 반응, 94°C 30초, 51.3°C 30초, 72°C 2분의 과정으로 30회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 7분 연장으로 PCR 반응을 종결하였다. 증폭된 DNA 시료는 1.0% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였고, 각 증폭산물의 크기와 염기서열분석을 통하여 *vanA* 유전자가 증폭되었음을 확인하였다.

무항생제 배지에서 vancomycin 내성유전자의 변화 시험

VRE로 판명된 분리주 중 *E. faecium* (VRE-2, 4)과 *E. gallinarum* (VRE-10, 11)을 vancomycin이 첨가되지 않은 BHI broth에 37°C에서 24시간 배양 후 10 µl씩 20일 연속 계대배양 하였으며 항생제 감수성의 변화 및 항생제 내성유전자 손실여부를 분석하였다.

Table 1. Sequences of primers used for determination of genotypes of vancomycin-resistant enterococci

Genotypes	Primer sequence	Product length (bp)
<i>vanA</i>	S : TAGCGTCCCAACGAACAC	1164
	AS: GCAAGCGTTGCGTGATAC	
<i>vanB</i>	S : TGGCATCCCAACGAACAC	1155
	AS: GCTGCGAGATACCACAGA	
<i>vanC</i>	S : GACAACAGGAAGACCGCA	1104
	AS: TCGTACGAGTCGTTCCTCA	
<i>IS1216V</i>	S : GATGAACGCTCTCATCATGC	689
	AS: CCTGAGAAAACAGTGCTTCA	
<i>IS1542</i>	S : ACTGTAATGGCTGGTGTAAAC	462
	AS: CATAGTTATCACCCCTTTCAC	

항생제에 의한 vancomycin 내성유전자 획득유도 시험

*Enterococcus*가 내성유전자의 전이에 의한 획득이 아닌 항생제에 의한 내성유전자의 획득이 가능한지 알아보기 위해 표준균주 *E. faecalis*와 *E. faecium*을 BHI broth에 37°C에서 24시간 증균배양을 한 후 vancomycin이 1 µg/ml과 2 µg/ml 농도로 들어있는 BHI broth에 각각 10 µl씩 접종하여 37°C에서 배양하였으며, 증균한 경우 10 µl씩 같은 항생제 농도가 들어있는 BHI broth에 접종하여 10번 계대배양하였다. Vancomycin 4 µg/ml가 함유된 BHI broth에 표준균주 *E. faecalis*와 *E. faecium*을 10 µl씩 접종하여 37°C 배양 후 증식한 경우 10 µl씩 20번 계대배양하였고, 20번째 배양된 *E. faecalis*와 *E. faecium*을 vancomycin 10 µg/ml가 들어있는 BHI broth에 각각 10 µl씩 넣고 37°C에서 자랄 때까지 배양 후 동일하게 10 µl씩 20번 계대배양하였다. 최종 계대배양된 표준균주는 항생제 감수성 검사를 실시하였다.

항생제 감수성 시험

저농도 (1 µg/ml와 2 µg/ml)와 중등도 (4 µg/ml와 10 µg/ml) vancomycin이 첨가된 BHI broth에서 증식한 표준균주 *E. faecalis*와 *E. faecium*을 저농도에서 10번째에서 배양된 균주와 중등도에서 20번째 배양된 균주를 3,500 rpm에서 원심한 뒤 0.45% NaCl을 사용하여 McFarland #0.5 (1.5×10^8 CFU/ml)에 맞추고 100 µl을 Muller-Hinton agar에 spread하여 37°C에서 24시간 또는 48시간 배양하

Table 2. Difference of antimicrobial susceptibility among six isolated VR-*E. faecium*

Antibiotics	VR- <i>E. faecium</i> isolate types			
	1	2, 5	3, 4	6
Chloramphenicol	I	S	S	S
Gentamicin	R	R	S	R
Nitrofurantoin	R	R	I	I
Streptomycin	S	S	S	R
Tetracycline	S	R	S	S
Teicoplanin	R	R	R	R
Vancomycin	R	R	R	R
Van phenotype	VanA	VanA	VanA	VanA
van genotype	vanA	vanA	vanA	vanA

Antibiotic resistant range in CLSI guidelines: $\geq 15 \sim 16$ mm to vanomycin and $\geq 11 \sim 13$ mm to teicoplanin.

R; resistant, S; susceptible, I; intermediate

여 disk diffusion법과 Vitek GPS 451 kit를 사용하여 항생제 감수성 검사를 실시하였다.

결 과

VRE 유행형 군주동정

임상가검물인 분변에서 분리된 vancomycin 내성균주에 대한 항생제 내성 profile을 작성하기 위해 CHROM ID™ VRE agar, MGP, 운동성 시험법, potassium tellurite 시험법, bile-esculin 시험법 및 Vitek의 GPI, GPS-451, disk diffusion법을 이용하여 VRE 동정과 항생제 검사를 실시한 바, VRE 균주는 *E. faecium*과 *E. gallinarum*으로 동정되었으며, 임상에서 가장 분리율이 높은 *E. faecalis*는 분리되지 않았다. *E. faecium*은 총 6주가 분리되었으며, *E. gallinarum*은 5주가 분리되었다 (Table 2, 3). VRE 11주 중 VanA 표현형은 10주에서 나타났으며 VanB 표현형은 1주에서 나타났었다.

VRE 항생제 pattern 및 phenotypes

Vancomycin resistant *E. faecium* (VR-*E. faecium*) 6주 (VRE 1-6)에 대한 항생제 내성 pattern은 크게 4개로 분류되었으며, 분리주 모두 vancomycin과 teicoplanin에 내성을 보여 VanA phenotype을 나타내었다 (Table 2). VR-*E. faecium* 분리주에 대한 항생제 내성 pattern은 chloramphenicol,

Table 3. Difference of antimicrobial susceptibility among five isolated VR-*E. gallinarum*

Antibiotics	VR- <i>E. gallinarum</i> isolate types		
	7, 9, 10	8	11
Chloramphenicol	S	S	I
Streptomycin	S	R	S
Tetracycline	S	R	S
Teicoplanin	R	R	S
Vancomycin	R	R	R
Van phenotype	VanA	VanA	VanB
van genotype	vanA	vanA	vanA

Antibiotic resistant range in CLSI guidelines: $\geq 15 \sim 16$ mm to vanomycin and $\geq 11 \sim 13$ mm to teicoplanin.

R; resistant, S; susceptible, I; intermediate

gentamicin, nitrofurantoin, streptomycin, tetracycline에 각기 다른 내성에 의해 분류하였다. VR-*E. faecium* 분리주 모두 linezolid와 quinupristin/dalfopristin에는 표준 *E. faecium*과 마찬가지로 감수성을 나타내었으며, ciprofloxacin과 nitrofurantoin에는 모두 내성을 나타내어 VanA 표현형을 획득하면서 다른 항생제에도 내성을 보이는 다약제내성을 나타내었다.

Vancomycin resistant *E. gallinarum* (VR-*E. gallinarum*) 5주 (VRE7-11)에 대한 항생제 내성 pattern은 크게 3개로 분류되었으며, 분리주 모두 vancomycin에 내성을 보였으나 VRE11만 teicoplanin에 감수성을 보여 네 개의 VanA 표현형과 한 개의 VanB 표현형을 나타내었다 (Table 3). VR-*E. faecium* 분리주에 대한 항생제 내성 pattern은 chloramphenicol, streptomycin, tetracycline에 각기 다른 내성에 의해 분류하였다. VanB phenotype VR-*E. gallinarum* (VRE11)은 teicoplanin에 대하여 Vitek GPS-451에서 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MIC를 보였으며, disk diffusion법에서는 억제존이 17 mm로 나타나 감수성을 보여 VanA phenotype VR-*E. gallinarum*과 특이한 차이는 나타내지 않았다. VRE9와 10은 Vitek GPS-451에서 teicoplanin에 내성을 보였지만 disk diffusion법에서는 억제존이 11 mm로 나와 중간내성을 보였다.

VRE 분리주의 vanA 유전자 검출 및 genotype

분리된 VRE에 대한 항생제 내성유전자형을 알아보기 위해 vanA, vanB, vanC primer set를 이용하여 PCR을 수행

하여 *van* 유전자형을 결정하였다. 모든 VRE에서 *vanA* 유전자가 검출되었으나, *vanB* 및 *vanC* 유전자는 검출되지 않았다 (Fig. 1). 특히 VanB phenotype을 나타내는 VR-

*E. gallinarum*도 *vanA* 유전자가 검출되어 *vanA* 유전형을 나타내었다. 또한 *vanA* 내성유전자는 genomic DNA와 plasmid DNA에서 모두 검출되었다 (Fig. 1).

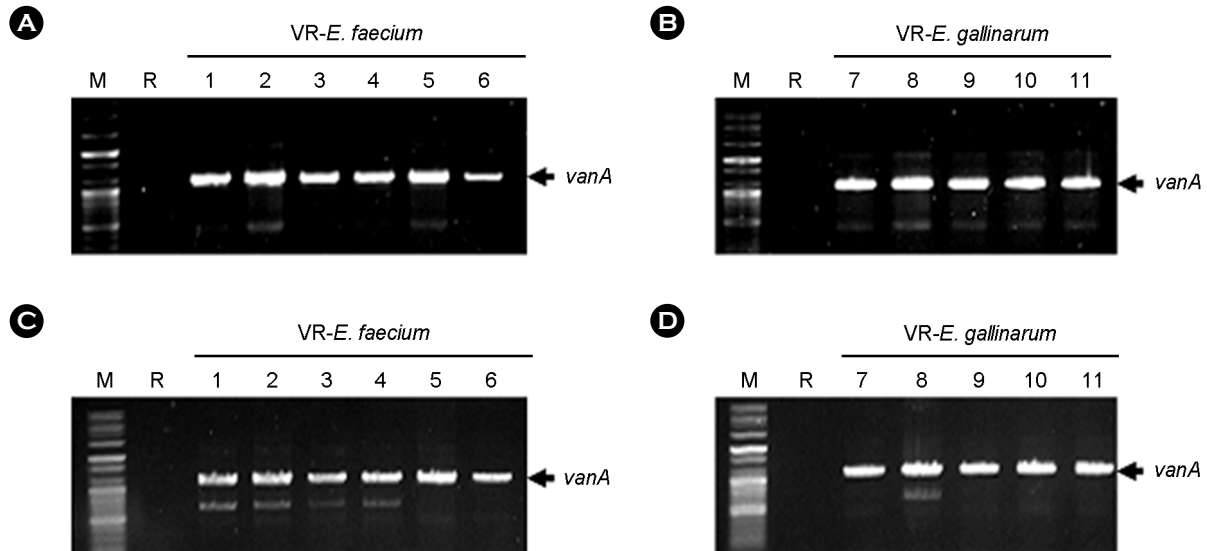


Figure 1. Detection of *vanA* gene in genomic and plasmid DNA of VRE isolates from patients by PCR using *vanA* primer set. Amplified PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. A, B: Genomic DNA, C, D: plasmid DNA. *vanA* was detected in both genomic and plasmid DNA from all of VRE isolates except for reference *Enterococcus faecium* (R; ATCC 19434). M: 100 bp plus ladder DNA molecular size marker, R: reference *Enterococcus faecium* (ATCC 19434).

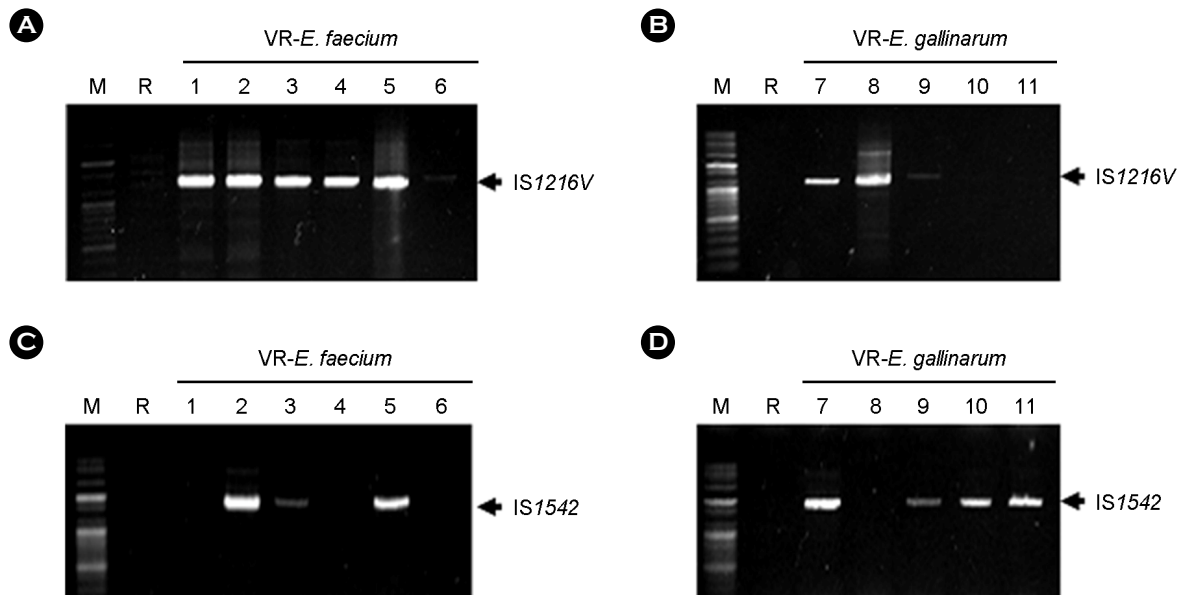


Figure 2. Detection of *IS1216V* and *IS1542* gene in plasmid DNA of VRE isolates from patients by PCR using specific primer set. The amplified PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. Plasmid DNA was extracted by using LaboPass Plasmid Mini Purification kit. *IS1216V* was detected strongly in plasmids from VRE1-5 and 7-8 except for reference *Enterococcus faecium* (ATCC 19434), 6, 10-11. The gene was weakly amplified in those from VRE9. *IS1542* was detected in VRE2, 3, 5, 7 and 9-11. M: 100 bp plus ladder DNA molecular size marker, R: reference *Enterococcus faecium* (ATCC 19434), VRE, vancomycin-resistant enterococci.

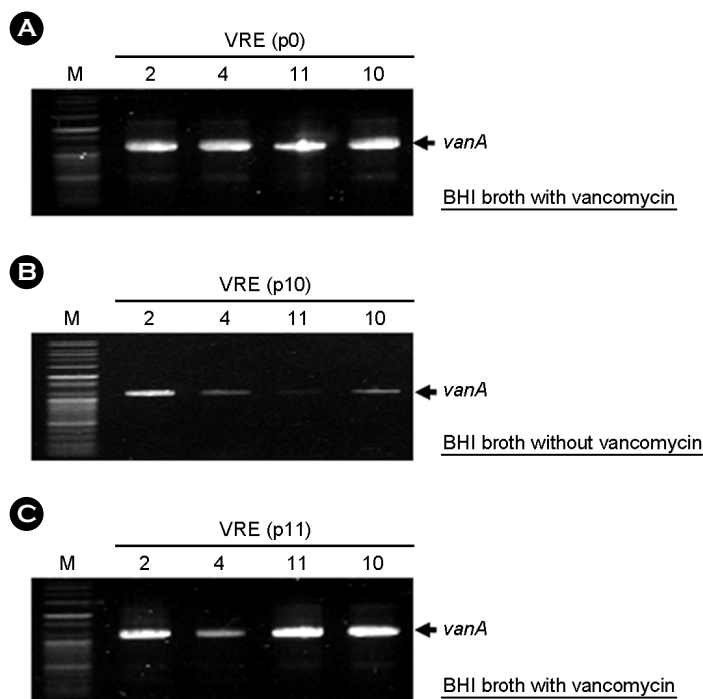


Figure 3. Change of *vanA* gene in plasmid of VRE isolates through serial passage using BHI broth without vancomycin. *vanA* was detected weakly in plasmids from VRE 7 and 9, which are *E. gallinarum* isolates, but not changed in those from VRE 4 and 11, *Enterococcus faecium* isolates. VRE 2 & 4: VR-*E. faecium*, VRE10 & 11: VR-*E. gallinarum*, VRE2: *vanA* phenotype with IS1216V and IS1542, VRE4: *vanA* phenotype with only IS1216V, VRE10: *vanA* phenotype with only IS1542, VRE11: *vanB* phenotype with only IS1542. M: 100 bp plus ladder DNA molecular size marker, VRE, vancomycin-resistant enterococci. p10: 10th passaged VRE in normal growth media. p11: changed media to broth with 10 µg/ml of vancomycin

VRE 분리주의 IS1216V와 IS1542 삽입유전자 분석 및 teicoplanin의 항생제 감수성 비교

내성유전자 전이에 관여하는 삽입서열 중 IS1216V와 IS1542 유전자를 검출하기 위해 PCR을 수행한 바, IS1216V는 VR-*E. faecium* 분리주 중 5주에서 검출되었으며, VR-*E. gallinarum* 분리주에서는 2주에서 강하게 검출되었고, 1주에서 약하게 검출되었다. IS1542는 VR-*E. faecium* 분리주 중 2주에서 강하게 검출되었으며, 1주에서 약하게 검출되었고, VR-*E. gallinarum* 분리주 중 4주에서 강하게 검출되어 80%의 보유율을 나타내었다. 이런 결과는 한국에서 유행하는 VR-*E. faecium*은 전세계적으로 널리 유행하는 VRE이며, VR-*E. gallinarum*은 유럽에서 유행하는 VRE로 판단된다. 특히 VR-*E. gallinarum* 분리주 중 teicoplanin에 감수성을 보이는 주들은 IS1216V 유전자가 검출되지 않았으며, 중간내성을 보이는 주들은 검출되지 않거나 약하게 검출되었다. VR-*E. faecium* 분리주 중 IS1216V와 IS1542 유전자가 강하게 검출되는 VRE는 2주이며, 두 유전자를 가지고 있지 않는 VRE도 1주가 검출되었다. VR-*E. gallinarum* 분리주 중 IS1216V와 IS1542 유전자를 가지고 있는 VRE는 1주이며, 두 유전자를 가지고 있지 않는 VRE는 검출되지 않았다 (Fig. 2). IS1251 유전자는 VRE 분리주 모두에서 검출되지 않았다 (data

not shown).

Vancomycin이 없는 조건하에서 VRE의 유전자 변화 및 항생제 감수성 변화

*vanA*가 vancomycin이 존재하지 않는 경우 자연적 소실이 되는지를 알아보기 위해 VRE로 동정된 VR-*E. faecium*과 VR-*E. gallinarum*을 vancomycin이 없는 조건에서 10일간 계대배양한 후 항생제 감수성을 실시한 바, vancomycin과 teicoplanin에 지속적인 내성을 보였으며 유전자 소실도 없었다. 하지만 IS1216V와 IS1542을 둘 다 가지고 있는 VRE2는 vancomycin이 없는 조건하에서도 *vanA* 유전자 copy number가 감소되지 않았으나, IS1216V나 IS1542 유전자 중 한 유전자만을 보유하고 있는 VRE4, 10, 11은 *vanA* 유전자 copy number가 감소되었으며, 특히 teicoplanin에 감수성을 보인 VRE11은 현저한 *vanA* 유전자 copy number의 감소가 관찰되었다 (Fig. 3B). 그리고 vancomycin를 처리하자 *vanA* 유전자 copy number는 바로 복귀되었다 (Fig. 3C). 항생제 검사 결과 vancomycin이 첨가되지 않은 VRE는 다소 억제대가 증가 하였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Table 4. Changes of growth time of reference *E. faecalis* and *E. faecium* in BHI broth with different concentration of vancomycin

Enterococci	Concentration of vancomycin (μg/ml)	Passage number							
		1	2	3	4	5	6	16	20
<i>E. faecalis</i>	4	72 ^a	72	48	48	24	24	24	24
<i>E. faecium</i>	4	144	48	24	24	24	24	24	24
<i>E. faecalis</i>	10	240	360	144	72	72	72	48	48
<i>E. faecium</i>	10	312	96	96	96	72	72	48	48

^a hours taken to grow up to McFarland #2

Vancomycin 존재 하에서 *E. faecalis*와 *E. faecium* 표준균주의 growth 양상 및 항생제 내성 획득

vanA 유전자를 획득하지 않아도 항생제 내성을 획득할 수 있는 지를 알아보기 위해 표준 *E. faecalis*와 *E. faecium*은 vancomycin 1 μg/ml과 2 μg/ml이 함유된 BHI broth에서 24시간 안에 증식하였다. 저농도의 vancomycin의 존재는 균이 증식하는데 아무런 영향을 미치지 않았다 (data not shown). 하지만 중농도인 4 μg/ml의 vancomycin이 함유된 BHI broth에서 표준균주가 최초로 증식하기까지 도달한 시간은 *E. faecalis*가 72시간, *E. faecium*은 144시간이었으며, 두 번째 계대배양 후 *E. faecalis*는 72시간, *E. faecium*은 48시간으로 *E. faecalis*는 증식시간에 변화가 없었지만, *E. faecium*은 96시간이 단축되어 *E. faecalis*보다 빠른 항생제 적응을 나타내었다. 다섯 번째 계대 후부터는 두 균 모두 24시간 안에 증식하였다. Vancomycin이 10 μg/ml 함유된 BHI broth로 계대배양 시 최초 증식시간은 *E. faecalis*가 240시간, *E. faecium*은 312시간이었으며, 두 번째 계대배양 후 *E. faecalis*는 240시간으로 변화가 없었으나, *E. faecium*은 96시간으로 216시간이 단축되었다. 16번째 계대 후부터는 모두 48시간 안에 증식하였다 (Table 4). 각 단계별로 *vanA* 유전자를 검출하기 위해 PCR을 수행한 바, 모두 음성이었다 (data not shown). VRE의 대부분은 *E. faecium*이 차지하는데 vancomycin이 있는 환경에서 유전자 발현이나 *van* 유전자의 획득이 없어도 *E. faecium*이 *E. faecalis*보다 빨리 적응하여 증식하는 것을 확인할 수 있었다.

Vancomycin 농도에 따른 항생제 감수성 검사

저농도 vancomycin (1 또는 2 μg/ml)에서 10번째 계대된 표준균주에 대하여 항생제 disk diffusion 검사를 실시한 결과, 표준균주 모두가 vancomycin disk에 의한 억제

대가 1번째 보다 10번째에서 줄어들었으나, 현저한 감수성 변화는 없었다. Teicoplanin disk에 대한 억제대는 계대된 *E. faecium*에서는 조금 줄어들었으나, *E. faecalis*에서는 변화가 없었다. 중농도 농도 vancomycin (4 또는 10 μg/ml)에서 20번째 계대된 표준균주에 대하여 disk diffusion 시험을 실시한 결과, 표준균주 모두가 vancomycin에 대한 억제대가 1번째 보다 20번째에서 줄어들었다. 저농도 vancomycin에서 마지막으로 증식한 *E. faecalis*와 *E. faecium*의 억제대 평균값은 17.25 mm이고 중농도 vancomycin의 억제대 평균값은 15.25 mm로 높은 항생제 농도에서 생존할 경우 항생제에 대한 저항성이 증가됨이 확인되었다. Teicoplanin의 경우 저농도 vancomycin에서 계대된 *E. faecalis*와 *E. faecium*에 대한 teicoplanin의 최종 억제대 평균값은 17.25 mm이고, 중농도 vancomycin에서 계대된 표준균주의 teicoplanin의 최종 억제대의 평균값은 17.0 mm로 별 차이를 보이지 않았다. 즉, vancomycin에 대한 자연내성을 획득하여도 teicoplanin에 대한 항생제 감수성엔 변화가 없음이 확인되었다. Vancomycin에서 마지막으로 증식한 표준균주를 Vitek GPI와 GPS-451로 항생제 감수성 시험을 수행한 결과, vancomycin에는 내성을 보였으나, teicoplanin에는 감수성을 나타내었다. Disk diffusion의 경우 4 μg/ml vancomycin에서 증식한 *E. faecium*이 내성을 나타내었고 나머지 균들은 중간내성을 나타내었다 (Table 5). Vancomycin 농도에 따른 환경 변화는 vancomycin 내성에 영향을 미쳐 VRE 또는 vancomycin-intermediate enterococci (VIE)가 되는 것을 확인할 수 있었고, teicoplanin에는 여전히 감수성을 보였다. 이와 같은 결과는 항생제 내성유전자를 획득하지 않아도 vancomycin 존재 하에서 장알균들이 내성을 획득할 수 있다는 것이 확인되었으며, 특히 *E. faecium*이 *E. faecalis*에 비해 항생제 존재 하에서 생존율이 높아 항생제 내성 유전자 획득이 더욱 용이할 것으로 생각된다.

Table 5. Results by GPI, GPS-451 and disk diffusion test to final passaged reference *E. faecalis* and *E. faecium* in broth with 4 and 10 µg/ml of vancomycin

Antibiotics	Concentration (µg/ml)	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>	
		Vitek GPS-451	Disk diffusion (mm)	Vitek GPS-451	Disk diffusion (mm)
Vancomycin	0	S	S (19)	S	S (22)
	4	R	I (15)	R	R (14)
	10	R	I (16)	R	R (14)
Teicoplanin	0	S	S (23)	S	S (23)
	4	S	S (15)	S	S (15)
	10	S	S (17)	S	S (20)

Vancomycin resistant and sensitive in CLSI Guidelines: ≥ 32 µg/mL and ≤ 2 µg/mL of MIC to vancomycin and teicoplanin in Vitek GPS-451 is resistant, respectively, Antibiotic resistant range in CLSI Guidelines: $\geq 15\sim 16$ mm to vancomycin and $\geq 11\sim 13$ mm to teicoplanin.

Table 6. Comparison of antimicrobial susceptibility between reference *E. faecium* and *E. faecalis*

Antibiotics	Reference <i>Enterococcus</i> spp	
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Ampicillin	R	S
Chloramphenicol	R	S
Gentamicin	R	S
Imipenem	R	S
Penicillin-G	R	S
Streptomycin	R	S
Teicoplanin	S	S
Vancomycin	S	S

R; resistant, S; sensitive, I; intermediate

표준 *E. faecium*과 *E. faecalis*의 항생제 내성 차이

표준 *E. faecium*과 *E. faecalis*의 항생제 감수성 검사 결과 *E. faecium*이 *E. faecalis*에 비해 다약제내성을 나타낸 것으로 확인되었다. 표준 *E. faecium*은 β -lactam계 항생제인 penicillin과 ampicillin, quinolones계 항생제인 imipenem, aminoglycosides계인 streptomycin 및 chloramphenicol과 gentamicin에 내성을 가지고 있음이 확인되었으나, *E. faecalis*는 이런 항생제에 감수성을 가지고 있어 항생제에 의해 보다 쉽게 치료될 수 있으나, *E. faecium*은 항생제가 존재하는 환경에서 더욱 생존율이 높아 항생제 내성유전자 획득력이 더욱 높을 것으로 확인되었다 (Table 6).

고 찰

VRE는 vancomycin의 내성을 가진 장알균으로 임상에서 지속적으로 문제가 되고 있다. 이러한 균은 대부분 다약제내성을 가지고 있어 환자의 치료에 어려움을 주고 있다. 최근 병원에서 vancomycin의 다량 사용과 VRE의 van 내성유전자 전이를 보여주고 있어 심각한 문제가 되고 있다. 병원 내 VRE의 검출은 지속적으로 증가하고 있으며 상재화되고 있다 (1, 7, 14). 병원에서는 VRE가 다른 환자에게 전이되는 것을 막기 위해 중환자실을 중심으로 모든 환자들에게 정기적으로 rectal swab을 하여 VRE 검사를 실시하고 있으며 VRE가 검출될 시 바로 격리하며 일주일에 한번씩 rectal swab을 하여 VRE가 검출되지 않을 때까지 계속 격리하며 환자를 대할 시 장갑과 가운을 입고 들어가 감염 예방에 철저히 신경을 쓰고 있다. 1996년 일본에서 처음으로 vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA)가 보고됨에 따라 영국, 프랑스, 미국, 아시아, 브라질 등에서도 vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA)가 보고되어 항생제 내성과 관련하여 심각한 문제가 되고 있다 (1, 2, 5).

본 연구에서 임상 분변에서 분리된 VRE는 총 11균주이며, 동정된 결과 VanA형 10개와 VanB형 1개로 분리되었고, 유전자는 모두 vanA를 가지고 있었다. 국내에서 분리된 VRE는 대부분 vanA genotype으로 VanA와 VanB 표현형으로 판명되었다. vanA 유전자는 genomic DNA와 plasmid DNA에서 검출되어 vancomycin에 내성이 vanA 유전자에 의한 것으로 판명되어 vanA 유전자가 chro-

mosome과 plasmid에 거대한 mobile element로 이행될 수 있음이 확인되었다 (20). 1개의 VanB형은 *vanB*-phenotype *vanA* genotype의 VRE가 나왔고 VRE로 동정된 균주 중 2개는 teicoplanin에 대하여 Vitek GPS-451에서 내성으로 나왔지만 disk diffusion법에서 억제대가 11로 중간내성을 보였다. 일반적인 *vanA* 유전자는 teicoplanin에 대하여 내성을 나타내지만, teicoplanin에 감수성을 보인 VanB 표현형 한 균주와 중간내성을 보인 2개의 균주를 보면 보통 vancomycin에 내성을 유도하는 *vanHAX* operon이 아닌 다른 유전자에서 VRE의 변이가 일어났을 것으로 보인다. 최근 국내에서도 6개의 VanB 표현형-*vanA* 유전형을 나타내는 *E. faecium*이 분리되었으며, IS1216V가 *vanS* 유전자에 삽입되어 있으며 teicoplanin 내성에 대한 이중 발현을 나타내는 것으로 확인되었다. 즉, *vanS* 유전자에 IS1216V가 삽입된 VRE 6주는 teicoplanin에 내성, 중간내성, 감수성을 보였다 (21, 22). 이는 *vanHAX* gene cluster의 전사를 조절하는 VanR과 VanS 단백질이 관여하나, VanS 단백질이 VanR 단백질보다 vancomycin 존재 하에 VanH, VanA와 VanX 단백질의 활성화, 발현, 합성에 초기감지 및 반응조절장치의 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (23).

삽입유전자의 종류와 삽입위치 또는 teicoplanin에 내성을 만드는 유전자에서 일어날 것으로 추정된다. VRE를 IS1216V와 IS1542 primer로 PCR한 결과 teicoplanin에 중간내성이나 감수성을 보인 VRE는 IS1216V는 없거나 희미하게 나오는 것을 발견할 수 있었고, IS1542의 경우 차이를 보이지 않았다. IS1216V와 IS1542는 국내 VRE에서 흔하게 분리되는 삽입유전자로, IS1216V와 vancomycin 내성유전자와 항생제 표현형에 대한 더 깊은 연구가 필요하다. VRE의 항생제 감수성은 표준균주 *E. faecalis*와 *E. faecium*에 비해 ciprofloxacin, nitrofurantoin에서도 내성을 보이면서 다약제내성을 보였고, 세균의 리보솜에 작용하여 필수단백질 합성을 저해하는 quinupristin/dalfopristin과 linezolid에는 모두 감수성을 보여 다약제 VRE에 대한 새로운 치료지침의 확립이 필요하다. VRE의 환경적 영향을 연구한 결과 vancomycin이 없는 환경에서는 항생제 내성의 변화와 유전자 소실은 없었지만, *vanA*양이 줄어든 것을 볼 수 있었다. 이것은 유전적 요인이 바뀌지 않더라도 vancomycin의 존재여부에 따라 *vanA*의 활성화가 강해질 수도 약해질 수도 있다는 것을 볼 수 있었다. 반대로 표준균주 *E. faecalis*와 *E. faecium*을 대상으로 vancomycin 농도 차이를 두어 배양한 결과 vancomycin 저농도에서는

잘 자라는 것을 확인할 수 있었고, 중등도 농도에서 배양 시간이 초대배양 시는 3일에서 13일까지 소요되었지만, 이것을 같은 농도에서 계대배양한 결과 1일에서 2일만에 증식하여 배양시간이 단축되었다. 처음 배양 시에는 *E. faecalis*가 *E. faecium*보다 일찍 증식하였지만, 같은 농도에서의 지속적인 배양은 *E. faecium*이 *E. faecalis*보다 더 짧은 시간 안에 증식하였다. VRE의 대부분은 *E. faecium*이 차지하고 있어 vancomycin 존재 하에서의 빠른 적응력은 *van* 유전자와 상관없이 *E. faecium*이 *E. faecalis*보다 더 높은 생존율을 나타내며, 이것은 *van* 유전자 전이에 더욱 효과적일 것으로 추정된다. 즉 *E. faecium*은 *vanA* 유전자 획득 없이도 일정 농도에서는 vancomycin에 내성을 강하게 나타내어 자연적으로 생존율이 높아 VRE로부터 *vanA* 유전자의 획득이 용이하며, teicoplanin에도 내성을 나타내는 VanA 표현형을 나타내기 위해서도 *vanA* 유전자의 획득이 필요한 것으로 확인되었으며, 이에 대한 심도 깊은 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것이다. 마지막으로 중등도 농도에서 배양된 *E. faecalis*와 *E. faecium*은 vancomycin에 모두 내성을 나타내어 VRE로 동정되었고, teicoplanin에는 모두 감수성을 보였다. 이처럼 VSE는 vancomycin 환경에서 유전적 획득은 아니지만 환경에 의해 내성을 나타낼 수 있음이 확인되었다. 대부분의 *E. faecium*은 6' acetyltransferase-acetylase를 생산하며 amikacin, kanamycin, netilmicin과 tobramycin 등에 자연내성을 나타낸다. Cephalosporin과 같은 β -lactam 항균제의 사용은 vancomycin resistant *E. faecium*의 출현을 용이하게 하며 ampicillin, PBP-5와 vancomycin과의 유전적 연계성이 있음이 밝혀졌다 (24). *E. faecium*이 내성은 60~80%로 매우 높는데 이는 pheromone responsive plasmid 또는 conjugative transposons에 의하여 쉽게 내성을 획득한다고 한다 (25). 운동성 장알균인 *E. gallinarum*과 *E. casseliflavus*는 2%보다도 낮은 비율로 검출되는데 저농도의 vancomycin에 대하여 내재성 내성을 가지고 있다 (25). *E. faecium*의 vancomycin에 대한 내재성 내성에 대한 연구는 아직 불투명하나 가능성이 높은 것으로 추정된다.

본 연구를 통해 통계적 유의성은 없으나 국내에서 원내 감염 및 지역공동체에서 감염에서 VanA 표현형 VR-*E. faecium*은 물론 VR-*E. gallinarum*이 계속적으로 증가되고 있음이 확인되었으며, VR-*E. faecium*과 VR-*E. gallinarum*도 *van* 유전자의 습득과 vancomycin에 의한 유도도 더욱 강한 항생제 내성을 나타내고 있음이 확인되었고, IS1216V

나 IS1542를 하나만 가지고 있는 것보다는 IS1216V와 IS1542 두 유전자를 모두 가지고 있는 내성균이 vancomycin에 덜 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 또한 *E. faecium*은 물론 *E. faecalis* 모두 내성유전자를 획득하지 않아도 장기간 vancomycin에 노출하면 강한 내성은 나타내지 못하지만 자연적으로 중등도의 항생제 내성을 나타냄이 확인되었다.

참 고 문 헌

- 1) Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. Indian J Med Res 2008;128:111-21.
- 2) Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Am J Med 1991; 91:72S-5S.
- 3) Livornese LL Jr, Drus S, Samel C. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. Ann Intern Med 1992;117:112-6.
- 4) Murray BE, Singh KV, Lopardo HA, Patterson JE, Zervos MJ, et al. 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.
- 5) Murray BE, Lopardo HA, Rubeglio EA, Frosolono M, Singh KV. Intrahospital spread of single gentamicin-resistant, β -lactamase-producing strain of *Enterococcus faecalis* in Argentina. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:230-2.
- 6) Porwancher R, Sheth A, Remphrey S, Taylor E, Hinkle C, Zervos M. Epidemiological study of hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: possible transmission by an electronic ear-probe thermometer. Infect Control Hosp Epidemiol 1997;18:771-3.
- 7) 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.
- 8) Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:1563-71.
- 9) Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, Courvalin P. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:10-5.
- 10) Noble WC, Virani Z, Cree RGA. Co-transfer of vancomycin and other resistance gens from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1992; 72:195-8.
- 11) Brown AR, Townsley AC, Amyes SG. Diversity of Tn1546 elements in clinical isolates of glycopeptide-resistant enterococci from Scottish hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1309-11.
- 12) Darini AL, Palepou MF, Woodford N. Nucleotide sequence of IS1542, an insertion sequence identified within VanA glycopeptide resistance elements of enterococci. FEMS Microbiol Lett 1999;173:341-6.
- 13) Handwerger S, Skoble J, Discotto LF, Pucci MJ. Heterogeneity of the *vanA* gene cluster in clinical isolates of enterococci from the Northeastern United States. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:362-8.
- 14) Huh JY, Lee WG, Lee K, Shin WS, Yoo JH. Distribution of insertion sequences associated with Tn1546-like elements among *Enterococcus faecium* isolates from patients in Korea. J Clin Microbiol 2004;42:1897-902.
- 15) Jensen LB, Ahrens P, Dons L, Jones RN, Hammerum AM, Aarestrup FM. Molecular analysis of Tn1546 in *Enterococcus faecium* isolated from animals & humans. J Clin Microbiol 1998;36:437-42.
- 16) Simonsen GS, Myhre MR, Dahl KH, Olsvik O, Sundsfjord A. Type ability of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant enterococci using long-range PCRs and specific analysis of polymorphic regions. Microb Drug Resist 2000;6:49-57.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Arias CA, Martín-Martínez M, Blundell TL, Arthur M, Courvalin P, Reynolds PE. Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. Mol

- Microbiol 1999;31:1653-64.
- 21) Park IJ, Lee WG, 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.
- 22) Henrique PM, Palazzo IC, Zanella RC, Darini AL. Molecular characterization of enterococci harboring genotype and phenotype incongruence related to glycopeptide resistance isolated in Brazilian hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103:301-5.
- 23) Baptista M, Depardieu F, Courvalin P, Arthur M. Specificity of induction of glycopeptide resistance genes in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2291-5.
- 24) Loeb M, Salama S, Armstrong-Evans M, Capretta G, Olde J. A case-control study to detect modifiable risk factors for colonization with vancomycin-resistant enterococci. Infect Control Hosp Epidemiol 1999;20:760-3.
- 25) Ratanasuwan W, Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Bacteremia due to motile *Enterococcus* species: clinical features and outcomes. Clin Infect Dis 1999;28:1175-7.
-