

# Comparison of Multilocus Sequence Typing Change Patterns of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* from 2015 to 2017

Joon Kim<sup>1</sup>, Young Ihn Kwon<sup>2</sup>, Wee Gyo Lee<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Sciences, The Graduate School, Ajou University, Suwon, Korea, <sup>2</sup>Undergraduate Statistics, Indiana University, Bloomington, USA, <sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine, Ajou University College of Medicine, Suwon, Korea

**Background:** Multilocus sequence typing (MLST) is useful in determining the long-term evolutionary process and minimizes differences in experimental results across individuals and laboratories. It is also useful in determining evolutionary origins and backgrounds of bacterial species. This study carries out MLST analysis on VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from patient specimens in a single university hospital over nine years in order to observe changes in genetic evolution over time.

**Methods:** During the years from 2007 to 2015, 44 clinical isolates of vanA-containing *E. faecium* were collected from Ajou University Hospital in Korea. Species were identified by the VitekII system (bio-Merieux, USA), and antibiotic susceptibility testing was performed by disk diffusion and E-test according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. To determine genetic relatedness, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF M/S) was employed. To characterize clonal diversity, MLST analysis was

used.

**Results:** All isolates were highly resistant to ampicillin, ciprofloxacin, and vancomycin but showed variable levels of resistance to teicoplanin. The 44 clinical isolates were genetically unrelated according to MALDI-TOF M/S analysis. MLST showed that the clinical isolates harbored 6 sequence types (ST), with ST17 (n=19) being the most common, followed by ST78 (n=13), ST192 (n=6), ST64 (n=4), ST262 (n=1), and ST414 (n=1).

**Conclusion:** The MLST analysis showed that the sequence types of most isolates belonged to clonal complex 17. This is consistent with outbreaks in hospitals. We had single observations for ST262 and ST414, suggesting that they were random occurrences. MLST can be useful for speculating the genetic evolution of VanA-containing *E. faecium* isolates. (*Ann Clin Microbiol* 2017;20:67-73)

**Key Words:** MALDI-TOF M/S, MLST, ST

## INTRODUCTION

반코마이신 내성 장알균(vancomycin-resistant enterococci, VRE)은 1986년 유럽에서 처음 보고된 이후 현재까지 전 세계적으로 분리빈도가 증가하여 거의 모든 의료기관에 토착화되어 있는 실정이다. 국내에서도 백혈병 환자의 가검물에서 반코마이신에 고도내성을 보이는 *Enterococcus durans*가 1992년 Park 등[1]에 의해 보고된 뒤 현재까지 계속 증가 추세이다. 현재까지 알려진 VRE 내성형은 VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM 및 VanN이며 이 중 VanA와 VanB

형이 전 세계 유행의 대부분을 차지하고 있다[2-5]. 국내에서의 VRE 발생은 병원감염으로 전파되는 미국의 경우와 유사하여 처음 대형 병원을 중심으로 발생하기 시작하여 최근에는 중소 병원까지 토착화의 양상을 보이고 있다[6].

병원 감염관리 대상이 되는 VRE는 내성전달이 증명된 VanA형과 VanB형이며, VanC형 중 vanA나 vanB 유전자가 전달되어서 내성이 동시에 존재하는 VRE도 감염관리대상에 포함된다[7]. 분자유전학적 역학 분석도 대부분 VanA형 *E. faecium*을 대상으로 하고 있다. VRE 전파 양상을 분석하기 위하여 전통적으로는 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 법을

Received 15 June, 2017, Revised 25 July, 2017, Accepted 9 August, 2017

Correspondence: Wee Gyo Lee, Department of Laboratory Medicine, Ajou University College of Medicine, 164 Worldcup-ro, Yeongtong-gu, Suwon 16499, Korea. (Tel) 82-31-219-5785, 5781, (Fax) 82-31-219-5778, (E-mail) weegyoo@ajou.ac.kr

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

많이 이용하여 왔으나 이는 단기간의 유전적 상관관계만을 반영하고, 검사법의 표준화가 정립되어 있지 않아 검사실간 비교가 힘들며, 장기간 유전적 상관관계나 유전자 진화 등을 알아낼 수 없는 단점이 있어 PFGE 이외의 분자유전학적 역학 분석법이 도입되었다. Multilocus sequence typing (MLST)은 균주 내 multiple housekeeping genes의 유전적 다양성을 분석하는 방법으로 house-keeping gene (450-500 bp)의 염기서열을 분석하여 MLST website (<http://www.mlst.net>)을 이용하여 유형(ST)을 결정하고 분석한다. *E. faecium*의 경우는 *adk* (adenylate kinase), *atpA* (ATP synthase, alpha subunit), *ddl* (D-alanine:D-alanine ligase), *gyd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), *purK* (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit), *pstS* (phosphate ATP-binding cassette transporter) 등 7개의 유전자를 이용한다. MLST법은 유전자의 장기적 역학 변동을 반영하고 실험자와 실험실 간의 오차 없이 동일 균종들의 역학적 기원 및 진화적 배경들을 추정할 수 있는 방법이다[8]. 이에 본 연구는 국내 일개 대학병원에서 9년간 분리된 VanA형 반코마이신 내성 *E. faecium*을 대상으로 MLST 분석을 시행하여 기간에 따른 유전자 변이를 알아보고자 하였다.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. 연구 대상

2007년부터 2015년까지 9년간 아주대학교 병원 진단검사의학과에 의뢰된 소변배양검사서에서 분리된 VanA형 반코마이신 내성 *E. faecium* 중에서 2007년부터 2014년까지는 매년 5균주씩, 2015년은 4균주를 수집하여, 총 44균주(균주 기호명 vanA01-vanA44)를 실험대상으로 하였다. 대상 유전자의 장기간 역학 변이를 알아보기 위하여 대상 균주들은 가능하면 유사한 조건을 맞춰서 선별하였다. 비교적 구하기 쉬운 소변 검체에서 분리된 균주를 수집하였고 2007년부터 2015년까지 1년에 2-3개월 간격으로 분리된 VanA형 반코마이신 내성 *E. faecium* 44개 균주를 수집하였다. 각각의 균주는 반코마이신 6  $\mu\text{g/mL}$ 를 함유한 Brain heart infusion (BHI) agar를 이용하여 반코마이신 내성여부를 확인하였고, VRE로 확인된 모든 균주에 대하여 자동동정 기기인 VitekII system (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA)과 생화학적 수기법을 이용하여 동정 하였다. 양성대조균주로는 *E. faecium* BM4147, 음성대조균주로는 반코마이신 감수성 *E. faecalis* (ATCC 29212)를 사용하였다.

### 2. 항균제 감수성 검사 및 내성형 검사

대상 균주에 대한 항균제 감수성 검사는 Clinical and laboratory standards institute M100-S26에서 제시하는 방법에 따라 반코마이신, ampicillin, tetracycline, teicoplanin, ciprofloxacin,

linezolid, quinupristin-dalfopristin을 대상으로 디스크 확산법을 실시하였다. 반코마이신과 teicoplanin에 대한 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)는 E-test (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)를 사용하여 측정하였다. 검사의 기준으로 사용한 각 항균제별 내성기준은 CLSI 기준을 참고로 하였다.

대상 균주에 대한 반코마이신 내성 유전형질을 확인하기 위하여 Anyplex TM VanR Real-time Detection kit (Seegene, Sankt Ingbert, Germany)를 이용하여 제조사에서 제공하는 방법에 따라 real-time PCR을 실시하였다.

### 3. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

대상 균주들의 유전적 연관성을 알아보기 위하여 MALDI-TOF MS를 이용하여 분석하였다. 37°C에서 24시간 동안 배양한 혈액 한천배지(KOMED, Seoul, Korea)에서 단일 콜로니를 선택하여 타겟 슬라이드 위에 얇게 도말한 후, 1  $\mu\text{L}$ 의  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) 매트릭스(bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France)를 떨어뜨려 실온에서 건조한 샘플 슬라이드를 준비한다. 준비된 샘플 슬라이드를 VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) 시스템에 로딩한 후 RUO (Research Use Only Mode) 소프트웨어 Lanchpad V2.84를 사용하여 2,000-20,000 Da 질량 분석 범위에서 스펙트리를 획득하였다. 장비에서 획득된 각각의 스펙트리는 클러스터 분석을 위해 SARAMIS database에서 서로 비교하여 dendrogram으로 표시하였다.

### 4. MLST

MLST는 mlst.net에 제시된 방법에 따라 시행하였다. PCR 반응 총액은 50  $\mu\text{L}$ 로 하였으며, 1.25 U의 TaKaRa Ex TaqTM, 2 $\times$ buffer (25 mM TAPS, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-mercaptoethanol), 0.4 mM의 dNTPs mixture, 10 pM의 primer 1  $\mu\text{L}$ 와 순수 분리된 염색체 DNA 10 ng을 넣어 반응액을 구성하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 15분간 첫 번째 변성을 시키고 35번 회전수로 94°C 30초, 52°C 30초, 72°C 30초로 반응하였고, 마지막 합성 반응은 72°C에서 5분으로 실행하였다. PCR 산물은 PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제 후 1.2%의 agarose gel에서 140 V로 20분간 영동하였다. Sequence type (ST)을 확인하기 위하여 7개의 house-keeping 유전자들에 대한 염기서열을 분석하였고, 각각의 분석된 염기서열들에서 *E. faecium*에 대한 ST를 확인하였다. 각 유전자들의 염기서열과 그에 따른 ST를 대상으로 BioNumerics version 7.6.2 (Applied Maths, Belgium)을 이용하여 Minimum spanning tree를 작성하였다.

**Table 1.** Characteristics of 44 vancomycin-resistant *E. faecium* isolates based on MLST, MALDI-TOF M/S analysis and antimicrobial susceptibility test

| Dendrogram based MALDI-TOF M/S analysis |    |      |        | MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) |    | Resistance to antibiotics |    |     |     |     | ST  | Year |
|---|----|------|--------|--------------------------|----|---------------------------|----|-----|-----|-----|-----|------|
| 80                                      | 90 | 100% | STRAIN | VA                       | TP | AM                        | TE | CIP | LZD | SYN |     |      |
|   |    |      | vanA38 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 64  | 2014 |
|   |    |      | vanA42 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 64  | 2015 |
|   |    |      | vanA08 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 78  | 2008 |
|   |    |      | vanA41 | >256                     | 32 | R                         | S  | R   | S   | S   | 192 | 2015 |
|   |    |      | vanA05 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 78  | 2007 |
|   |    |      | vanA06 | >256                     | 32 | R                         | S  | R   | S   | S   | 78  | 2008 |
|   |    |      | vanA17 | >256                     | 8  | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2014 |
|   |    |      | vanA15 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 78  | 2009 |
|   |    |      | vanA21 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 78  | 2011 |
|   |    |      | vanA28 | >256                     | 64 | R                         | R  | R   | S   | S   | 17  | 2012 |
|   |    |      | vanA36 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2009 |
|   |    |      | vanA12 | >256                     | 32 | R                         | I  | R   | S   | S   | 78  | 2009 |
|   |    |      | vanA18 | >256                     | 4  | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2010 |
|   |    |      | vanA37 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2014 |
|   |    |      | vanA39 | >256                     | 8  | R                         | R  | R   | S   | S   | 17  | 2014 |
|   |    |      | vanA13 | >256                     | 64 | R                         | R  | R   | S   | S   | 17  | 2009 |
|   |    |      | vanA30 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2012 |
|   |    |      | vanA25 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2011 |
|   |    |      | vanA14 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2009 |
|   |    |      | vanA03 | >256                     | 16 | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2007 |
|   |    |      | vanA11 | >256                     | 32 | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2009 |
|   |    |      | vanA29 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 192 | 2012 |
|   |    |      | vanA35 | >256                     | 16 | R                         | S  | R   | S   | S   | 78  | 2013 |
|   |    |      | vanA43 | >256                     | 64 | R                         | R  | R   | S   | S   | 17  | 2015 |
|   |    |      | vanA01 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 192 | 2007 |
|   |    |      | vanA20 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2010 |
|   |    |      | vanA31 | >256                     | 32 | R                         | R  | R   | S   | S   | 17  | 2013 |
|   |    |      | vanA34 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 64  | 2013 |
|   |    |      | vanA04 | >256                     | 8  | R                         | R  | R   | S   | S   | 17  | 2007 |
|   |    |      | vanA16 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 78  | 2010 |
|   |    |      | vanA33 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 78  | 2013 |
|   |    |      | vanA19 | >256                     | 64 | R                         | R  | R   | S   | S   | 17  | 2010 |
|   |    |      | vanA10 | >256                     | 8  | R                         | R  | R   | S   | S   | 78  | 2008 |
|   |    |      | vanA22 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 78  | 2011 |
|   |    |      | vanA23 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 414 | 2011 |
|   |    |      | vanA26 | >256                     | 64 | R                         | R  | R   | S   | S   | 192 | 2012 |
|   |    |      | vanA24 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 192 | 2011 |
|   |    |      | vanA40 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 64  | 2014 |
|   |    |      | vanA44 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 78  | 2015 |
|   |    |      | vanA02 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2007 |
|   |    |      | vanA09 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2008 |
|   |    |      | vanA32 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 17  | 2013 |
|   |    |      | vanA07 | >256                     | 64 | R                         | S  | R   | S   | S   | 78  | 2008 |
|   |    |      | vanA27 | >256                     | 64 | R                         | R  | R   | S   | S   | 262 | 2012 |

Abbreviations: VA, vancomycin; TP, teicoplanin; AM, ampicillin; TE, tetracyclin; CIP, ciprofloxacin; LZD, linezolid; SYN, quinupristin-dalfopristin; ST, sequence type.

**RESULTS**

**1. 항균제 감수성검사 및 내성 유전자형**

44개 균주를 대상으로 CLSI 기준에 따라 시행한 항균제 감수성 검사는 반코마이신 MIC값이 모두  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ 로 고도 내성을 나타내었다. Teicoplanin MIC값은 vanA03, 35번 균주가  $16 \mu\text{g/mL}$ 로 중등도 내성을 보였고 vanA04, 10, 17, 39번 균주가  $8 \mu\text{g/mL}$ , vanA18번 균주가  $4 \mu\text{g/mL}$ 로 각각 감수성을 보였다. Ampicillin  $10 \mu\text{g/mL}$ 와 ciprofloxacin  $5 \mu\text{g/mL}$ 에는 모든 균주가 내성을 보였고 linezolid  $30 \mu\text{g/mL}$ 와 quinupristin-dalfopristin  $15 \mu\text{g/mL}$ 에는 모든 균주가 감수성을 보였으며 tetracyclin  $30 \mu\text{g/mL}$ 에는 33개의 균주가 감수성을 보였고 10개의 균주가 내성, 1개의 균주가 중등도 내성을 보였다 (Table 1).

내성유전자형을 확인하기 위한 real-time PCR 결과에서 44개 대상균주 모두 vanA 내성유전자를 가지고 있었고 그 외에 vanB나 vanC 유전자는 음성이었다.

**2. MALDI-TOF MS**

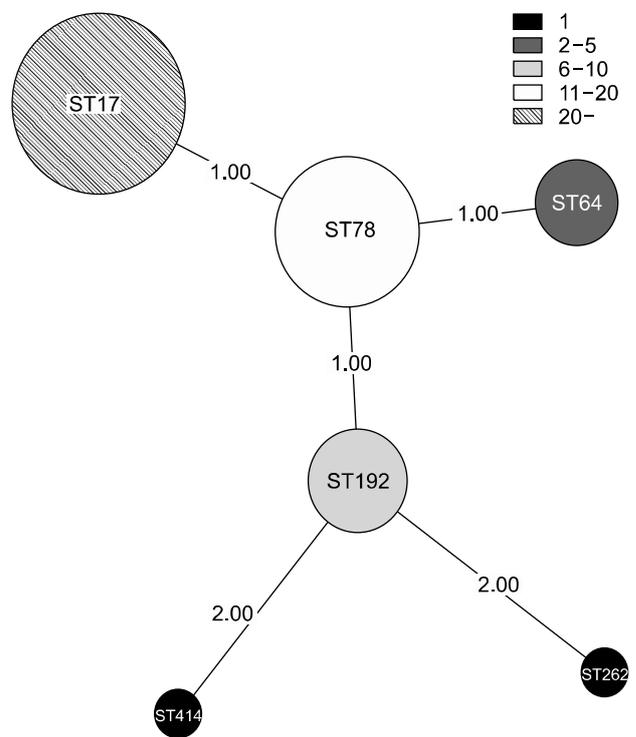
MALDI-TOF MS를 이용한 44균주의 유전적 형질분석 결과 유전적 다양성을 보여 균주 간 연관성이 없는 것으로 나타났다 [9-11].

**3. MLST 분석**

MLST 분석상 모두 6개의 ST를 보였다. 이들은 모두 clonal complex 17 (CC17)에 속하였다. 6개의 ST에서 ST17형 19주, ST78형 13주, ST192형 6주가 흔한 유형이었다. 가장 흔한 ST17형은 9년간 고르게 분포하고 있었고 ST78형과 ST192형 역시 9년간의 기간에 고르게 분포함을 알 수 있었다. ST64형은 최근에 많이 분리되는 양상을 보였다(Table 2, Fig. 1).

**DISCUSSION**

*E. faecium* 대상균주 중 44주 모두에서 반코마이신에 대한 MIC가  $256 \mu\text{g/mL}$  이상으로 고도내성 균주였으며 반면 teicoplanin MIC는 vanA04, 10, 17, 39번 균주가  $8 \mu\text{g/mL}$  그리고 vanA18번 균주가  $4 \mu\text{g/mL}$ 로 각각 감수성인 VanB phenotype-vanA genotype이었다. vanA03, 35번 균주는  $16 \mu\text{g/mL}$ 로 중등도 내성을 보였고 그 외 나머지 균주들은 모두 teicoplanin에 내성인 VanA phenotype-vanA genotype이었다. Ampicillin  $10 \mu\text{g/mL}$ 와 ciprofloxacin  $5 \mu\text{g/mL}$ 에는 모든 균주가 내성을



**Fig. 1.** Minimum spanning tree from 44 strains after MLST analysis. Thick solid lines indicate the single locus variation. Thin solid lines indicate the double locus variation.

**Table 2.** Distribution of sequence types of 44 strains

| ST (allelic profile)<br>( <i>atpA-ddl-gdh-gyd-psiS-purK-adk</i> ) | No. of isolates |      |      |      |      |      |      |      |      |              |
|---|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------|
|   | 2007            | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | Total (n=44) |
| 17 (1-1-1-1-1-1-1)  | 3               | 1    | 3    | 3    | 1    | 2    | 2    | 3    | 1    | 19           |
| 78 (15-1-1-1-1-1-1)   | 1               | 4    | 2    | 1    | 2    | 0    | 2    | 0    | 1    | 13           |
| 192 (15-1-1-1-7-1-1)  | 1               | 0    | 0    | 1    | 1    | 2    | 0    | 0    | 1    | 6            |
| 64 (7-1-1-1-1-1-1)  | 0               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 2    | 1    | 4            |
| 262 (7-1-1-5-7-1-1)   | 0               | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1            |
| 414 (15-5-1-1-20-1-1)   | 0               | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1            |

Abbreviation: ST, sequence type.

보였다. Linezolid 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 quinupristin-dalfopristin 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에는 모든 균주가 감수성을 보였다. Linezolid에 내성을 보이는 장알균이 2000년대 초부터 발견되어 보고되고 있지만, 본 연구에서는 발견되지 않았다[12].

MALDI-TOF MS를 이용한 44균주의 유전적 형질분석 결과 유전적 다양성을 보여 균주 간 연관성은 없는 것으로 나타났다. VRE 감염의 전형적인 패턴인 숙주 자신이 보유하고 있던 장알균에 반코마이신 내성 유전자가 수평전이 되었음을 추정할 수 있었다.

MLST 분석은 세균의 7개의 house-keeping 유전자의 allele형을 비교 분석하여 sequence type을 결정하는 방법이다. House-keeping 유전자의 유전자 서열의 변이를 반영하므로 장기적인 진화를 나타낸다[13]. MLST는 장기적인 유전자의 변동을 반영함으로써 단기적인 유전자 변이만을 반영하는 PFGE의 단점을 보완할 수 있다. 장기적인 유전자 진화를 반영하므로 여러 국가에서 발생한 유행이 어떠한 클론인지를 유추할 수 있으므로 수년간 세균 감염의 유행 발생 흐름을 가늠할 수 있게 해 준다. 이러한 특성은 특히 VRE 유행의 연구에서 중요하다. MLST 분석을 VRE에 처음 적용한 것은 Homan 등[8]이다. 이후 VRE에 대한 장기적인 유전자 변동 양상을 알아보기 위하여 MLST 분석이 널리 이용되고 있다. Homan의 보고 이후 10년간 VRE에 대한 많은 MLST 분석 연구가 시행되었다[14-17]. CC17은 ampicillin 내성을 보이는 *E. faecium*으로 전 세계 6개 대륙에서 유행을 일으키고 있다. CC17에 속하는 *E. faecium*은 ampicillin과 fluoroquinolone에 고도 내성을 보이고 novel putative pathogenicity island를 가짐으로써 오랜 기간 병원 내에 토착화되어 있다가 반코마이신 내성을 획득한 것으로 추정하고 있다. 이러한 전 세계적인 유행주의 발견은 MLST 분석이 가능해지면서 밝혀졌다. CC17의 primary founder는 ST22형이었으나 ST22형보다는 secondary founder인 ST17형을 중심으로 유행의 분포를 이루고 있다. CC17에 속하는 대표적인 형은 ST78형, ST17형, ST64형 등이고 이들로부터 single locus variation (SLV)이 있는 형과 double locus variation (DLV)이 있는 형들이 전 세계적 유행의 대부분을 차지하고 있다. 특히 CC17에 속하는 장알균은 반코마이신 내성 transposon 획득율이 높다고 알려져 있다. 이러한 이유로 전 세계적으로 CC17 반코마이신 내성 장알균이 병원 감염 유행의 대부분을 차지하고 있다[14-16].

본 연구에서는 MLST 결과 19주(42%)가 ST17형으로 가장 많았고 13주(29%)가 ST78형, 6주(14%) ST192형, 4주(9%) ST64형, 그리고 ST262형(2%)과 ST414형(2%)이 각각 1주씩이었다. 가장 흔한 ST17형은 9년간 고르게 분포하고 있었고 ST192형과 ST78형 역시 9년간의 기간에 고르게 분포함을 알 수 있었다. 그 외에 ST64형, ST262형, ST414형이 확인되었는데 ST64형은 최근 들어 많이 분리되는 양상을 확인할 수 있었는데 일시적인 유행에 의한 것인지에 대한 지속적인 관찰이 필

요하다고 생각한다. 본 연구에서 나타난 6개의 유형은 모두 CC17에 속하였다. 이들 중 ST17형, ST64형, ST78형은 주된 유형이고 ST192형은 ST78형의 SLV이며, ST262형과 ST414형은 ST192형의 DLV이다. 본 연구의 균주들도 9년간의 기간이 경과하였어도 CC17 lineage가 대부분을 이루는 것으로 보아 CC17이 병원 환경에서 우세하게 장기간 생존함을 알 수 있었다.

국내에서 분리된 VRE에 대한 MLST 유형은 ST17, ST18, ST32, ST78, ST64, ST117, ST132, ST192, ST202, ST203, ST204, ST205, ST206, ST207, ST233, ST262, ST414형 등으로 본 연구에서 발견된 유형도 모두 기존에 보고된 바 있는 ST형이었다[14]. 하지만 저자 등이 동일 병원에서 2002-2004년 사이에 분리된 VRE를 대상으로 했던 연구에서는 ST78형 43%, ST203형 26%, ST205형 5%, ST17형 3%, ST117형 3% 그 외 ST18형과 ST32형이 각각 1주였는데 비하여 2007-2015년 사이에 분리된 VRE를 대상으로 한 이번 연구에서는 ST17형 43%, ST78형 29%, ST192형 14%, ST64형 9% 그 외 ST262형과 ST414형이 각각 1주로 기간에 따른 변화가 일어났음을 알 수 있었다[18]. 가장 흔하게 분리되는 유형이 ST78형에서 ST17형으로 바뀌었고, 26%를 차지했던 ST203형이 사라졌으며 그 자리를 ST192형이 차지하고 있음을 알 수 있었다. 또한 산발적 발생을 보이는 ST형도 변화하는 양상을 보임을 알 수 있었다. 이상의 결과로 볼 때 MLST 분석을 통해 병원 내 토착화되어있는 ampicillin 내성 VRE도 MLST형은 기간에 따라 우세형이 변화하는 것을 알 수 있었다. 또한 본 연구에서 분리된 ST17형은 유럽과 미국을 포함한 대부분의 국가에서 흔히 분리되는 유형으로 이 유형은 전 세계적 유행의 대부분을 차지하고 있다. ST78형 및 ST64형은 유럽 국가에서 대부분 보고되었다. 1주가 분리된 ST262형과 ST414형은 타이완, 중국 및 호주에서 보고된 바 있어 이 유형은 대륙별로 산발적으로 분포함을 추정할 수 있었다[19].

본 연구를 통하여 MLST 분석을 이용하면 병원 내 토착화된 VRE의 장기적인 균주 변이를 추정할 수 있음을 알 수 있었다. 앞으로도 MLST를 이용하여 병원 내 균주의 변이 양상 및 대륙간 유행주의 비교 등을 지속적으로 시행하는 것이 필요하다고 사료된다. 1986년 VRE가 최초로 발견된 이후 현재까지의 양상을 보면 이제 병원 내에서 근절되기는 어려워 보이며 향후 MLST를 이용한 분석과 조기 검사를 통하여 CC17에 속하는 균주의 유행을 미리 발견하고 이를 감소시키기 위한 노력을 기울여야 할 것으로 사료된다.

## REFERENCES

1. 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.
2. 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.
- 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.
  - Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, et al. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4643-7.
  - Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, et al. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4606-12.
  - Lee WG, Jernigan JA, Rasheed JK, Anderson GJ, Tenover FC. Possible horizontal transfer of the *vanB2* gene among genetically diverse strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a Korean hospital. *J Clin Microbiol* 2001;39:1165-8.
  - Lee WG. Resistance mechanism and epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. *Korean J Clin Microbiol* 2008;11:71-7.
  - Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2002;40:1963-71.
  - Schlebusch S, Price GR, Gallagher RL, Horton-Szar V, Elbourne LD, Griffin P, et al. MALDI-TOF MS meets WGS in a VRE outbreak investigation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;36:495-9.
  - Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Zięba P, Gnat S, Trościańczyk A, Adaszek Ł. Characterization of multidrug resistant *E. faecalis* strains from pigs of local origin by ADSRRS-fingerprinting and MALDI-TOF MS; Evaluation of the compatibility of methods employed for multidrug resistance analysis. *PLoS One* 2017;12:e0171160.
  - McCarthy KL, Kidd TJ, Paterson DL. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection isolates in a non-outbreak setting. *J Med Microbiol* 2017;66:154-9.
  - Kainer MA, Devasia RA, Jones TF, Simmons BP, Melton K, Chow S, et al. Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1024-30.
  - Enright MC and Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* 1999;7:482-7.
  - Galloway-Peña JR, Nallapareddy SR, Arias CA, Eliopoulos GM, Murray BE. Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J Infect Dis* 2009;200:1566-73.
  - Gordts B, Van Landuyt H, Ieven M, Vandamme P, Goossens H. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:2842-6.
  - Mato R, de Lencastre H, Roberts RB, Tomasz A. Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York City hospital. *Microb Drug Resist* 1996;2:309-17.
  - Oh JY, Her SH, Seo SY, Lee YC, Lee JC, Kim J, et al. Antimicrobial resistance and multilocus sequence typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens. *J Bacteriol Virol* 2008;38:19-27.
  - Lee WG, Lee SM, Kim YS. Molecular characterization of *Enterococcus faecium* isolated from hospitalized patients in Korea. *Lett Appl Microbiol* 2006;43:274-9.
  - Yang JX, Li T, Ning YZ, Shao DH, Liu J, Wang SQ, et al. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: a hospital-based study in Beijing, China. *Infect Genet Evol* 2015;33:253-60.

=국문초록=

## 2007년부터 2015년까지 분리된 반코마이신 내성 *Enterococcus faecium*의 MLST 변화 추세

<sup>1</sup>아주대학교 의과대학 대학원 의학과, <sup>2</sup>인디애나 주립대학교 통계학부, <sup>3</sup>아주대학교 의과대학 진단검사의학교실  
김 준<sup>1</sup>, 권영인<sup>2</sup>, 이위교<sup>3</sup>

**배경:** Multilocus sequence typing (MLST) 분석은 유전자의 장기적 역학 변동을 반영하고 실험자와 실험실 간의 오차 없이 동일 균주들의 역학적 기원 및 진화적 배경들을 추정할 수 있는 방법이다. 이에 본 연구는 국내 일개 대학병원에서 9년간 분리된 VanA형 반코마이신 내성 *Enterococcus faecium*을 대상으로 MLST 분석을 시행하여 시간에 따른 유전자 변이를 알아보고자 하였다.

**방법:** 2007년부터 2015년까지 아주대학교병원에서 수집된 *vanA* 유전자를 지닌 *E. faecium* 44주를 대상으로 하였다. 수집된 균주는 VitekII system (bioMerieux, USA)을 이용하여 동정하였고, CLSI 기준에 따라 디스크확산법과 E-test 방법으로 항균제 감수성 검사를 실시하였다. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF M/S) 분석법과 MLST 분석을 이용하여 이들 균주의 유전적 연관성과 시간에 따른 진화에 대한 분석을 실시하였다.

**결과:** 모든 균주는 ampicillin, ciprofloxacin과 반코마이신에 대해 고도내성을 보였고, teicoplanin에 대해서는 내성, 중등도 내성 및 감수성 등 다양한 내성양상을 보였다. MALDI-TOF M/S를 이용한 44균주의 유전적 형별분석 결과에서는 유전적 다양성을 보여 균주 간 연관성은 없는 것으로 나타났다. MLST 분석상 6개의 sequence type (ST)을 보였다. ST17형이 19주로 가장 많았고 ST78형 13주, ST192형 6주, ST64형 4주, ST262형과 ST414형이 각각 1주였다.

**결론:** MLST 분석에서 모든 균주는 clonal complex 17에 속하였다. 이는 대형 병원 유행에서 흔히 관찰되는 결과이다. 본 연구에서 각각 1주씩 분리된 ST292형과 ST414형은 산발적 발생임을 알 수 있었다. MLST 분석은 VanA형 VRE의 유전자의 진화 양상을 추정할 수 있는 효과적인 방법이라 사료된다. [Ann Clin Microbiol 2017;20:67-73]

교신저자 : 이위교, 16499, 경기도 수원시 영통구 월드컵로 164  
아주대학교 의과대학 진단검사의학교실  
Tel: 031-219-5785, 5781, Fax: 031-219-5778  
E-mail: weegyo@ajou.ac.kr