

국내에서 분리된 Vancomycin 내성 장구균에 대한 분자역학적 연구

성균관대학교 의과대학 임상병리학과교실, 감염내과학교실¹, 서울대학교 의과대학 미생물학교실²,
임상병리학과교실³, 아주대학교 의과대학 임상병리학과교실⁴, 연세대학교 의과대학 임상병리학과교실⁵,
서울중앙병원 임상병리과⁶

김수정 · 이남용 · 송재훈¹ · 김성민¹ · 백경란¹ · 최명식² · 김의종³ · 이위교⁴ · 이경원⁵ · 배직현⁶

A Study on Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Hospitals in Korea

Su-Jeong Kim, M.D., Nam Yong Lee, M.D., Jae-Hoon Song, M.D.¹, Sungmin Kim, M.D.¹
Kyong Ran Peck, M.D.¹, Myoung Sik Choi, M.D.², Eui Chong Kim, M.D.³
Wee Gyo Lee, M.D.⁴, Kyungwon Lee, M.D.⁵ and Chik Hyun Pai, M.D.⁶

Department of Clinical Pathology and Division of Infectious Diseases¹, Sung Kyun Kwan University,
College of Medicine, Seoul, Korea

Departments of Microbiology² and Clinical Pathology³, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Department of Clinical Pathology, Ajou University School of Medicine⁴, Suwon, Korea

Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine⁵, Seoul, Korea

Department of Clinical Pathology, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center⁶, Seoul, Korea

Background : Enterococci have emerged in recent years as a frequent cause of life-threatening nosocomial infections. The emergence of vancomycin-resistant enterococci(VRE) presents as an increasingly important problem particularly in the treatment and the potential dissemination of vancomycin-resistance. The purpose of this study is to determine the phenotypes and genotypes of VRE isolated from five hospitals and to study the genetic relatedness among them.

Methods : Antimicrobial susceptibility patterns and amplification of vancomycin resistance genes were used for phenotyping and genotyping of 42 VRE isolates respectively. For 21 isolates with *vanA* or *vanB* gene, plasmid profiles and pulsed field gel electrophoresis(PFGE) patterns were analyzed for molecular epidemiologic study.

Results : Out of 42 isolates, 21 were identified as *E. faecium*, 6 as *E. faecalis*, 2 as *E. avium*, and 13 as *E. casseliflavus*. Phenotyping showed 14 isolates as

VanA(33%), 7 as VanB(17%) and 21 as VanC(50 %). Genotyping resulted in 12 isolates as *vanA*(5 of *E. faecalis* and 7 of *E. faecium*) and 9 as *vanB*(all *E. faecium*). Genotyping results were concordant with phenotyping results except for the two *E. faecium* isolates of VanA which had *vanB* genotype. Intra-hospital spread of the same strains was proven in three hospitals by plasmid profiles and PFGE analysis.

Conclusion : The study demonstrated a considerable number of VRE isolates in Korea and intra-hospital spread proven by molecular epidemiologic methods. Although VRE infection has been considered very rare in Korea, practical guidelines including restriction of vancomycin usage and surveillance, are warranted to prevent infection and dissemination of VRE.

Key Words : Vancomycin-resistant enterococci, Genotype, Phenotype, Molecular epidemiology

서 론

접수 : 1997년 11월 24일, 승인 : 1998년 1월 15일
교신저자 : 이남용. 성균관대학교 삼성의료원 임상병리과
Tel : 02)3410-2808 ~ 8
Fax : 02)3410-2719

장구균(*Enterococcus*)은 위장관과 여성 생식기의 정상 상재균으로 병독성이 약한 병원균이나, 최근 병원 감염의

원인균으로서의 빈도와 중요성이 증가하고 있다. 1992년 미국의 National Nosocomial Infection Surveys를 근거로 한 보고에 의하면 병원 감염 원인균중 장구균의 발생 빈도가 12%로 *Escherichia coli*(16%) 다음으로 높은 빈도를 보인다고 하였다¹⁾. 이러한 높은 빈도의 장구균 감염증은 cephalosporin, aminoglycoside 등의 항균제에 대한 고유 내성과 aminoglycoside에 대한 고도내성율의 증가로 치료 약제가 매우 제한되어 그 중요성을 더하고 있다. 더우기 1988년 vancomycin에 내성을 보이는 장구균(vancomycin-resistant enterococci, VRE)이 처음으로 보고된 후²⁾ 분리 빈도가 빠른 속도로 증가하여, 미국에서는 원내 감염을 일으킨 장구균중 VRE의 비율이 1989년에는 0.3%였으나 1993년에는 7.9%로 증가하였으며 중환자실 환자에서는 1989년의 0.4%에서 1993년에는 13.6%로 급격히 증가하였다³⁾. VRE는 beta-lactam 항균제나 aminoglycoside 제제에도 대개 내성을 보이므로 효과적인 치료약제가 드물고, 환자간 또는 오염된 환경이나 기구, 의료진으로부터 다른 환자에게 전파될 수 있다. 또한 내성 유전자가 vancomycin에 감수성을 보이는 다른 장구균이나 그람양성 구균에 전달될 수 있어 임상적인 중요도가 더욱 크다고 할 수 있다.

외국의 경우 입원환자에서의 VRE 집락율이 20%까지 보고된 바 있고⁴⁾, VRE에 의한 병원내 유행감염 또한 수차례 발생하여 이미 많은 관심을 모으고 있다⁵⁻⁸⁾. 특히 병원 감염 관리의 측면에서 내성균주의 발생기전이나 전파양상을 밝히기 위한 연구들로부터 VRE 균주의 유전적 다양성과 내성의 균주간 수평전파, 동일 균주의 병원내 또는 병원간의 전파 등이 확인된 바 있다⁹⁻¹⁴⁾.

국내에서는 1992년 vancomycin에 내성인 *E. durans* 1주가 처음으로 보고된 이후¹⁵⁾, 몇몇 병원에서 VRE 집락화를 보고하였는데 이러한 3차 의료기관에서의 병동환자의 VRE 보균율은 2~8%, 중환자실 환자의 보균율은 6.6~11%로 조사되었다¹⁶⁻¹⁸⁾. 그러나 아직 실제 환자에서 발생된 감염증이 적고¹⁹⁾, 대개의 균주가 각 병원에서 산발적으로 분리되고 있어 국내 VRE에 대한 역학적 연구는 시행된바 없다. 따라서 국내 분리 균주의 분자생물학적 특성이나 다양성, 전파양상 등에 대해서는 잘 알려지지 않다. 하지만 타 항균제에 대한 내성 균주가 결코 적지 않은 국내 실정을 고려하면 VRE 빈도 또한 빠르게 증가할 것으로 예상되며, 향후 VRE에 대한 병원 감

염 관리에 있어 내성 전파 양상의 이해는 효율적인 감염 관리에 매우 큰 도움을 줄수 있을 것이다.

본 연구에서는 국내 5개 대학 병원에서 분리된 VRE를 대상으로 항균제 감수성 양상 분석을 통한 표현형 및 polymerase chain reaction(PCR)으로 vancomycin 내성 유전자를 증폭하여 유전형을 결정하고, 플라스미드(plasmid) 분석과 pulsed field gel electrophoresis(PFGE) 등의 분자역학적 연구를 통해 국내 VRE 균주의 분리 현황과 다양성, 병원간 또는 병원내 전파양상 등을 규명하여 향후의 VRE 감염 관리에 도움을 주고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상균주

국내 5개 대학병원에서 수집되어 VRE로 최종 판명된 42균주를 대상으로 하였다. 균주들은 각 병원에서 VRE의 위장관 집락형성에 대한 선별검사에서 검출되거나 임상검체에서 분리된 것이었다. 이들 중 소변에서 분리된 *E. faecium* 4주와 농에서 분리된 *E. faecium* 1주를 제외하고는 모두 대변에서 분리된 집락(colonized) 균주였다. 각 균주의 동정은 미국 bioMerieux사 Vitek 장비의 GPI(gram positive identification) 카드와 API 20 STREP 키트(bioMerieux, USA)를 이용하였다.

2. 항균제 감수성 검사

항균제 감수성 검사는 Vitek 장비와 한천희석법을 이용하여 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다. Vitek은 GPS-IZ 카드를 사용하여 ampicillin, penicillin G, vancomycin, teicoplanin의 MIC와 고농도 gentamicin(500 μ g/mL)과 streptomycin(2000 μ g/mL)에 대한 감수성 여부를 검사하였다. 한천희석법을 이용한 MIC 측정은 vancomycin(Sigma, USA)과 teicoplanin(Marion Merrel Dow Inc., USA)에 대하여 시행하였으며²⁰⁾, DrySlide™ β -lactamase(Difco, USA) 카드로 β -lactamase 생성 여부를 검사하였다. 감수성 검사의 대조균주로 *E. faecalis* ATCC 29212를 이용하였고, vancomycin 내성 균주로는 *E. faecalis* A256 균주와 *E. faecalis* V583 균주를 이용하였다¹⁰⁾. 균주의 MIC 결과에 따른 항균제 감수성 판단은 NCCLS의 기준에 따라 해석하였고²⁰⁾, 항생제 감수성 결과에 의해 Table 1과 같

Table 1. Phenotypes of Vancomycin-resistant Enterococci

Phenotype	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	Vancomycin	Teicoplanin
VanA	64~1,000	16~512
VanB	4~1,000	0.5~1
VanC	2~32	0.5~1

이 표현형을 결정하였다²¹⁾.

3. PCR에 의한 vancomycin 내성 유전자의 증폭

Vancomycin 내성 유전자 *vanA*, *vanB*, *vanC*의 증폭을 위한 시발체의 선정은 Clark 등¹⁰⁾의 논문을 참고하였으며, 최종 산물의 크기는 각각 1030, 433, 796 bp였다. PCR은 주형 DNA 1 μL 에 10 \times 반응완충액 5 μL , dNTP (200 μM) 4 μL , 각 primer쌍(10mM) 2.5 μL 을 넣고 Taq DNA polymerase(5U/ μL , Boehringer Mannheim, Germany) 0.5 μL , 증류수 35 μL 를 넣어 총 PCR 혼합액이 50 μL 되도록 한 후 Gene Amp^R PCR System 2400 (Perkin-Elmer, USA)를 사용하였다. 반응조건은 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 변성(denaturation)시키고 58 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 결합(annealing)시킨후 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 증합(elongation)시키는 cycle을 30회 반복하여 DNA를 증폭시켰다. 반응 처음의 용해(lysis)와 변성 과정은 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 실시하였고 마지막 증합은 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 실시하였다. 최종 확인은 1.8% agarose gel에서 150 volt의 조건으로 1시간 전기영동후 UV를 이용하여 밴드를 확인하였다. 대조균주로는 *E. faecalis* A256(*vanA*), *E. faecalis* V583 (*vanB*), *E. gallinarum* VR-42(*vanC*)을 사용하였다.

4. 플라스미드 양성 분석

PCR결과 *vanA*와 *vanB*로 결정된 21균주를 대상으로 플라스미드 분석을 시행하였다. 플라스미드 DNA의 분리 는 alkaline lysis 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. Vancomycin(4 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 brain heart infusion broth에 단일 집락을 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 약 16시간 진탕하여 배양후 원침하여 TE 완충액으로 세척하였다. 10 mg/mL의 lysozyme이 포함된 STE용액(10mM Tris, 1 mM EDTA, 25% Sucrose) 100 μL 를 더하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 정치후, 2 M NaOH-10% SDS 용액 200 μL 와 3

M potassium acetate(pH 4.8) 300 μL 를 차례로 넣은후 얼음속에 10분간 방치하였다. 원심분리후 상층액을 새 시험관에 옮기고 phenol 추출을 시행한후, 상층액에 ethanol을 가하고 원심하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 실온에서 완전히 건조시킨후 TE 완충액 20 μL 를 가하여 DNA를 용해시켰다. 최종 확인을 위하여 0.8% agarose gel에 10 μL 의 DNA 용액을 가한후 90 volt에서 90분간 전기영동시켰다. Size marker는 1-12 kilobase pair구간의 1kb DNA Extension Ladder(KDR, USA)를 사용하였다.

5. PFGE(Pulsed Field Gel Electrophoresis)

PCR결과 *vanA*와 *vanB*로 결정된 21균주를 대상으로 PFGE를 시행하였다. Plug 제작을 위하여 균을 혈액한천 배지에서 하루밤 배양한후 집락 하나를 따서 4mL의 brain heart infusion broth에서 2~3 시간 배양한후 균 침사를 차가운 PIV 완충액[10mM Tris(pH 7.6), 1M NaCl] 으로 세척하였다. 준비된 1.3% molding agar(In-Cert Agar: low melting temperature agar)에 동량의 균액을 넣고 혼합하여 즉시 mold에 분주후, 얼음통에 넣어 식혔다. 균은 plug를 준비된 lysis 용액에 넣어 잘 잠기도록 하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 수조에 하루밤 방치하여 세균을 용해하였다. Lysis 용액은 lysis 완충액[6mM Tris(pH 7.6), 1M NaCl, 100 mM EDTA(pH 7.6), 0.5% Brij-58, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium lauroyl sarcosine] 4mL에 lysozyme stock solution 80 μL (1mg/20 μL)과 lysostaphin stock solution 40 μL (5U/10 μL)를 넣어 최종 농도가 lysozyme 1mg/mL, lysostaphin 5U/mL가 되도록 만들었다. 용해후 plug를 TE 완충액[10mM Tris(pH 7.6), 1mM EDTA(pH 8.0)] 으로 37 $^{\circ}\text{C}$ 항온수조에서 세척하고, *Sma* I 으로 enzyme digestion을 시행하였다. 전기영동은 0.8% SeaKem agarose(high melting temperature agarose) gel을 만들어 시행하였고, size marker로는 48~1018 kb구간의 340 Lambda Ladder PFG Marker (BioLabs, USA)를 사용하였다. PFGE는 contour-clamped homogeneous electric field apparatus(CHEF-DR II System, BioRad Lab., USA)을 이용하여 5.4volt/cm로 23시간 시행하였다. Pulse time은 5초에서 30초로 하였다. 전기영동후 gel을 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ethidium bromide로 2시간 염색후, 증류수

Table 2. Antimicrobial Susceptibilities of VanA Isolates

	MIC ^a (μg/mL)		Susceptibility ^b			
	VAN	TEI	PPCG	AMC	SM-HLR	GM-HLR
<i>E. faecium</i>	512	128	R	R	R	S
<i>E. faecium</i>	256	64	R	R	R	S
<i>E. faecium</i>	256	>256	S	S	R	S
<i>E. faecium</i>	256	128	R	R	R	R
<i>E. faecium</i>	256	64	R	R	R	R
<i>E. faecium</i>	256	64	NT	NT	NT	NT
<i>E. faecium</i>	256	32	S	S	S	S
<i>E. faecium</i> *	>512	128	R	R	R	S
<i>E. faecium</i> *	512	64	R	R	R	R
<i>E. faecalis</i>	>512	128	R	R	R	S
<i>E. faecalis</i>	>512	128	S	S	S	S
<i>E. faecalis</i>	>512	128	S	S	R	R
<i>E. faecalis</i>	512	128	R	R	R	R
<i>E. faecalis</i>	512	64	S	S	R	R

^a: MIC (μg/mL) tested by agar dilution method

^b: antimicrobial susceptibility results by Vitek

*: isolates which showed amplification of *vanB* gene by PCR

Abbreviations: AMC, ampicillin; PPCG, penicillin G; TEI, teicoplanin; VAN, vancomycin; GM-HLR, gentamicin-high level resistance; SM-HLR, streptomycin-high level resistance; R, resistant; S, susceptible; NT, not tested

Table 3. Antimicrobial Susceptibilities of VanB Isolates

Species	MIC(μg/mL) ^a		Susceptibility ^b			
	VAN	TEI	PPCG	AMC	SM-HLR	GM-HLR
<i>E. faecium</i>	64	<4	R	R	R	R
<i>E. faecium</i>	512	<4	R	R	R	R
<i>E. faecium</i>	512	<4	R	R	R	R
<i>E. faecium</i>	512	<4	R	R	R	R
<i>E. faecium</i>	512	<4	R	R	R	R
<i>E. faecium</i>	256	<4	R	R	R	R
<i>E. faecium</i>	512	<4	NT	NT	NT	NT

^a: MIC (μg/mL) tested by agar dilution method

^b: antimicrobial susceptibility results by Vitek

Abbreviations: AMC, ampicillin; PPCG, penicillin G; TEI, teicoplanin; VAN, vancomycin; GM-HLR, gentamicin-high level resistance; SM-HLR, streptomycin-high level resistance; R, resistant; S, susceptible; NT, not tested

Table 4. Antimicrobial Resistance of VanA, VanB and VanC Isolates

Phenotype	No. tested	No. (%) of resistant strain			
		AMC	PPCG	GM-HLR	SM-HLR
VanA	13	8(61)	8(61)	6(46)	11(84)
VanB	6	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)
VanC	21	0(0)	0(0)	6(28)	2(9)

Abbreviations: GM-HLR, gentamicin-high level resistance; SM-HLR, streptomycin-high level resistance

로 탈염색하고 UV로 밴드를 확인하였다.

결 과

1. 항생제 감수성 양상에 의한 표현형

Vancomycin과 teicoplanin의 MIC로 결정한 표현형은 VanA 14주(*E. faecalis* 5주, *E. faecium* 9주), VanB 7주(모두 *E. faecium*), VanC 21주(*E. casseliflavus* 13주, *E. faecium* 5주, *E. avium* 2주, *E. faecalis* 1주)였으며, VanA와 VanB 균주의 항균제 감수성 양상은 Table 2, 3과 같다. 자동화 장비인 Vitek에서 VanA, VanB, VanC 균주의 검출율은 각각 100%(13/13), 67%(4/6), 95%(20/21)이었으며, 각 표현형에 따른, penicillin, ampicillin, 고농도 gentamicin 및 streptomycin에 대한 내성율은 Table 4과 같다. 42균주중 β-lactamase를 생성하는 균주는 한 균주도 없었다.

2. PCR에 의한 유전형 결정

PCR 결과 *vanA* 12주(*E. faecalis* 5주, *E. faecium* 7주), *vanB* 9주(모두 *E. faecium*), *vanC* 16주(*E. casseliflavus* 13주, *E. faecium* 3주)였으며, 5주(*E. faecium* 2주, *E. faecalis* 1주, *E. avium* 2주)가 음성을 보였다.

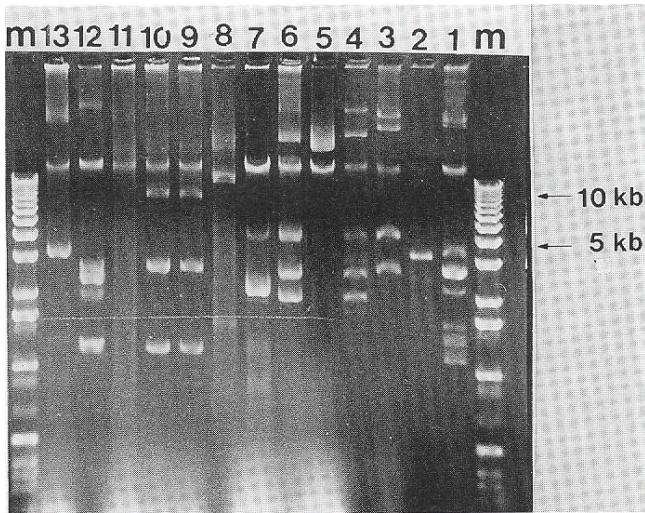


Fig. 1. Plasmid patterns of vanA isolates. Five *E. faecalis* isolates were from hospital A(lane 1 and 2) and hospital B(lane 3, 4 and 6). Seven *E. faecium* isolates were from hospital A(lane 5), hospital C (lane 7), hospital D(lane 8 to 11), and hospital E (lane 12). The hospital B isolates in lane 4 and 6 had identical plasmid pattern as well as PFGE pattern. The hospital D isolates in lane 9 and 10 also shared the same plasmid and PFGE patterns. Lane 13 is the plasmid pattern of *E. faecalis* A256(vanA control strain). m, the molecular size marker(1~12 kb).

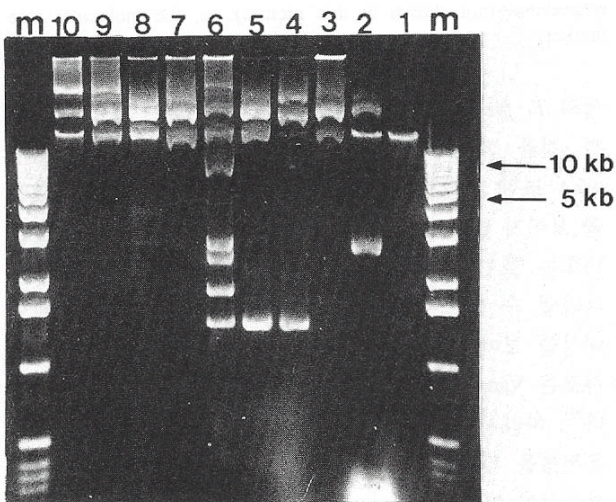


Fig. 2. Plasmid patterns of vanB isolates all isolates were *E. faecium* from hospital B(lane 1 and 2) and hospital C(lane 3 to 9). Some isolates from hospital C(lane 3, 7 and 8) shared the same plasmid pattern. Lane 10 is the plasmid pattern of *E. faecalis* V583(vanB control strain). m, the molecular size marker(1~12kb).

VanA의 표현형을 보인 *E. faecium* 2주가 vanB의 유전형으로 판명된 것(Table 2)을 제외하면, 표현형과 유전형은 모두 일치하였다. PCR에서 음성을 보인 5균주는 모두 VanC의 표현형이었다.

3. 플라스미드 양상 및 PFGE 결과 분석

플라스미드 양상은 vanA와 vanB 유전형의 21균주 모두 1개 이상의 플라스미드를 갖고 있었다(Fig. 1, 2). 특히 vanA 균주의 경우 1kb에서 20kb이상까지 분포하는 다양한 크기의 플라스미드를 갖고 있었으나, 반면 vanB 균주는 대부분 20kb 이상의 크기가 큰 플라스미드만을 가지고 있었다. 플라스미드 갯수에 있어 균종간(*E. faecium*과 *E. faecalis*)간의 차이는 없었으나 유전형에 따라 차이가 있어, vanA는 평균 5.1개, vanB는 평균 2.9개의 플라스미드를 가지고 있었다. vanA 균주중 B병원에서 분리된 *E. faecalis* 2균주와 D병원에서 분리된 *E. faecium* 2균주는 각각 서로 동일한 플라스미드 양상을 보였다(Fig. 1). vanB 균주는 9균주 모두 *E. faecium*으로 C병원에서만 7균주가 분리되었는데, 이중 3균주가 서로 동일한 플라스미드 양상을 보였다(Fig. 2).

PFGE 분석은 Tenover 등²²⁾이 제시한 기준에 따라 2~3개의 밴드차이를 보일 경우 근접하게 연관된(closely related) 균주로, 4~6개의 차이가 있을 경우 연관 가능성(possibly related)이 있는 균주로, 7개 이상의 차이를 보일 경우 유전적 연관성이 없는 균주로 판정하였다. vanA 유전형의 *E. faecium* 7주중 4균주는 서로 다른 양상을 보였으나, D병원에서 분리된 3균주중 2균주는 동일한 양상을 보였고 나머지 1균주도 4개 밴드차이를 보여 연관 가능성이 있는 균주로 판명되었다(Fig. 3). 더욱이 이들 3균주는 플라스미드 양상에 있어서도 동일하거나 매우 유사하여(Fig. 1) 유전적 연관성을 강력히 시사하였다. vanA 유전형의 *E. faecalis* 경우 B병원에서 분리된 3균주중 2균주가 동일한 PFGE와 플라스미드 양상을 보여동일 균주임을 확인할수 있었다(Fig. 1, 3). vanB 유전형의 균주는 9균주 모두 *E. faecium*으로 2주는 B병원, 7주는 C병원에서 분리되었다. B병원의 2균주는 서로 다른 PFGE 양상을 보였으나, C병원에서 분리된 7주는 모두 antibiogram이 같고 그중 6균주의 PFGE 양상이 동일하거나 또는 유전적 연관성이 있었다(Fig. 4).

항생제 감수성 양상이나 유전형별, 플라스미드 양상, PFGE 등의 결과로 볼 때 유전적으로 연관된 유행균주 인 것으로 추정되었다.

실제로 미생물검사실에서 VRE 검출시 VanB나 VanC 와 같은 낮은 정도의 내성균주가 문제가 되는데 이는 자동화장비나 디스크 확산법 등의 방법으로 내성 검출이 어렵고, 특히 자동화 장비로 VanC형의 자연내성을 갖는 균 동정이 쉽지않기 때문이다²⁴). 최근 보고에서 자동화 장비의 예민도와 특이도가 95%이상으로 평가된 바 있으나, 대상균주의 87%가 VanA형의 고도내성 균주이기 때문에 그 해석에 제한이 있다²⁵). 미국내의 93개의 검사실을 대상으로 시행한 조사에서는 vancomycin에 대한 내성을 옳게 검출한 기관은 VanA, VanB, VanC 균주 각각에 대해 96%, 27%, 74%였으며 Vitek 장비의 경우 특히 VanB형 검출율이 낮은 것으로 밝혀진 바 있다²⁴). 본 연구에서도 VanB형의 검출율이 67%(4/6)로 가장 낮았으며 재현성 또한 낮아 VanC형보다 오히려 문제가 될 것으로 판단되었다.

VanC형은 vancomycin에 낮은 내성을 보이고 teicoplanin에는 감수성을 나타내는 표현형으로 *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens* 등에서 고유 내성으로 나타나며 각각의 내성 유전자도 *vanC-1*, *vanC-2*, *vanC-3* 등으로 알려져 있다^{26, 27}). 본 연구에서 사용한 *vanC* 시발체는 *E. gallinarum*에 대한 것이었으나²⁶) *E. casseliflavus*와 *E. faecium*으로 동정된 균주가 PCR에서 양성을 보여 이 균주들은 *E. gallinarum*일수 있으며 따라서 장구균의 동정이 쉽지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 PCR 결과 음성을 보인 5균주는 모두 VanC형으로 *E. casseliflavus*나 *E. flavescens*에 대한 시발체(*vanC-2/3*)로 확인해야할 필요가 있을 것으로 생각된다. 실제 VanC형의 장구균을 동정하기 위하여 *vanC* 유전자들을 시발체로 하는 PCR을 이용하기도 한다²³). 그러나 최근 보고에서 *E. faecalis*와 *E. faecium* 균주에서 *vanC-1*을 시발체로한 PCR이 양성을 보인 예도 있었다²⁸). 한편 임상검사실에서 보조 동정용으로 흔히 사용하는 API 20 STREP으로는 *E. gallinarum*과 *E. casseliflavus*의 구별이 매우 어려움을 확인할 수 있었으나, 실제 임상적으로 이들을 구별해야 할 필요는 적어 문제가 되지 않는 것으로 사료되었다. 하지만 VanC형 균주의 동정과는 대조적으로 Vitek 장비의 vancomycin에 대한 내성 검출에 있어서는 검출율이 95%(20/21)로

매우 우수하였다.

본 연구에서 각 균주의 유전적 연관성을 알아보기 위해 사용한 플라스미드 분석은 방법이 간단하지만 대상균주가 플라스미드를 가지고 있어야 하고 그 양상이 불안정한 단점을 가지고 있다. 본 연구에서 *vanA* 균주의 경우 다수의 플라스미드를 갖고 있어 플라스미드 분석이 유용할 것으로 판단되었으나, *vanA* 내성유전자가 특정 크기의 플라스미드에 위치하는지에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각되었다. 미국의 경우 34-kb나 60-kb크기의 플라스미드에 *vanA* 유전자가 위치한다고 보고된 바 있으며¹⁰), *E. faecium*의 경우 플라스미드에, *E. faecalis*는 염색체에 내성 유전자가 존재하는 경향이 있다는 알려져 있다⁷). 또한 플라스미드 분석 결과와 PFGE 결과가 완전히 일치되지 않고 플라스미드 양상이 달라도 동일한 PFGE 양상을 보이는 경우가 있어 플라스미드 분석만으로는 유전적 연관성 연구에 부족한 것으로 판단되며 이는 이제까지의 여러 연구 결과와 일치한다¹⁰).

본 연구 결과 병원간의 내성균의 전파는 아직 없는 것으로 밝혀졌으나, 병원내 동일 균주의 전파 가능성이 3개 병원에서 증명되었다. 이와 같은 내성균의 발생이나 확산을 억제하기 위해서는 vancomycin의 사용절제 등의 구체적인 내용을 설정하여 실천해야 할 것이다. 미국의 경우 장구균의 vancomycin에 대한 내성의 급격한 증가에 따라 질병관리국(CDC)의 Hospital Infection Control Practices Advisory Committee(HICPAC)에서 VRE의 확산 예방 및 조절 방안을 제시한 바 있다²⁹).

본 연구는 1995년에서 1996년까지 서울 경기 지역의 5개 대학병원에서 분리된 VRE 균주를 대상으로 하였으며, 대상 균주의 대부분이 장내 집락균으로 분리되었다. 하지만 장구균은 하부 위장관과 여성생식기에 정상 상재균으로 존재하므로 VRE의 하부위장관 집락형성 여부로 감염증의 본격적인 출현 및 전파를 예측할 수 있다. 따라서 본 연구결과가 현재는 물론 추후 국내의 VRE 실태를 잘 반영할 수 있을 것으로 생각된다. 아직까지 국내에서 VRE로 인한 감염 보고는 적지만 위장관에서 VRE 집락이 발견되는 보균자 존재로 인하여 이들 균주에 의한 감염은 곧 임상적으로 문제가 될 것으로 판단되며, 이미 국내에서도 VanA, VanB, VanC 형이 모두 다수 분리되었음을 본 연구에서 밝혔다. 또한 동일 균주의 병원내 전파 가능성이 증명되었으므로 내성균의 발생이

나 확산을 억제하기 위한 노력과 감시가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

목 적 : 장구균은 병원 감염의 원인균으로서 최근 그 빈도와 중요성이 증가하고 있다. 특히 vancomycin에 내성을 보이는 장구균(VRE)은 효과적인 치료약제가 드물고, 그 내성 유전자가 vancomycin에 감수성을 보이는 다른 장구균이나 그람양성 구균에 전달될 수 있어 임상적인 중요도가 더욱 크다. 본 연구에서는 국내 5개 병원에서 분리된 VRE 균주의 표현형과 유전형을 결정하고, 분자역학적 방법을 이용하여 유전적 연관성 여부를 밝히 고자 하였다.

방 법 : 각 병원에서 수집된 균주는 환자의 임상 검체에서 또는 VRE 집락화에 대한 선별검사서에서 분리된 균주였다. 이들을 대상으로 vancomycin과 teicoplanin의 MIC를 측정하여 표현형을 결정하였으며, PCR로 vancomycin 내성 유전자를 증폭하여 유전형을 결정하였다. 또한 이들중 *vanA*와 *vanB* 유전자를 갖는 균주들을 대상으로 플라스미드 분석과 PFGE를 시행하였다.

결 과 : VRE로 최종 동정된 균주들은 42균주(*E. faecium* 21주, *E. faecalis* 6주, *E. avium* 2주, *E. casseliflavus* 13주)였으며, 항균제 감수성 양상으로 결정한 표현형은 VanA, VanB, VanC형이 각각 14주(33%), 7주(17%), 21주(50%)였다. PCR로 결정한 유전형은 *vanA* 12주(*E. faecalis* 5주, *E. faecium* 7주), *vanB* 9주(모두 *E. faecium*), *vanC* 16주 였으며, 이중 VanA의 표현형을 보인 *E. faecium* 2주가 *vanB*의 유전형으로 판명된 것을 제외하면 표현형과 유전형은 모두 일치하였다. 플라스미드 분석과 PFGE 결과, 병원내 동일 균주의 전파 가능성이 5개 병원중 3병원에서 증명되었다.

결 론 : 국내 병원에서도 vancomycin 내성 유전자를 갖는 VRE가 다수 분리되고 있음을 확인할 수 있었으며, 연구 결과 일부 병원에서 내성균주의 병원내 전파 가능성을 시사하였다. 아직까지 국내에서 VRE로 인한 감염 보고는 적지만 곧 임상적으로 문제가 될 것으로 판단되며, 따라서 내성균의 발생이나 확산을 억제하기 위한 노력과 감시가 필요할 것으로 생각된다.

감사문

이 논문은 1997년도 삼성서울병원 임상연구비의 지원을 받아 이루어 졌음.

참 고 문 헌

- 1) Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP: *Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Am J Med* 91:3B72S-75S, 1991
- 2) Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC: *Vancomycin-resistant enterococci. Lancet* 1:57-58, 1988
- 3) CDC: *Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-United States, 1989-1993. MMWR* 42:597-599, 1993
- 4) Morris JG, Shay DK, Hebden JN, McCarter RJ, Perdue BD, Jarvis W *et al.*: *Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Ann Intern Med* 123:250-259, 1995
- 5) Livornese LL, Dias S, Samel C, Romanowski B, Taylor S, May P *et al.*: *Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant Enterococcus faecium transmitted by electronic thermometers. Ann Intern Med* 117:112-116, 1992
- 6) Handwerker S, Raucher B, Altarac D, Monka J, Marchione S, Singh KV *et al.*: *Nosocomial outbreak due to Enterococcus faecium highly resistant to vancomycin, penicillin and gentamicin. Clin Infect Dis* 16: 750-755, 1992
- 7) Woodford N, Morrison D, Johnson AP, Briant V, George RC, Cookson B: *Application of DNA probes for rRNA and vanA genes to investigation of a nosocomial cluster of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol* 31:653-657, 1993
- 8) Boyce JM, Opal SM, Chow JW, Zervos MJ, Potter-Byone G, Sherman CB *et al.*: *Outbreak of multidrug-resistant Enterococcus faecium with transferable vanB class vancomycin resistance. J Clin Microbiol* 32:1148-1153, 1994
- 9) Chow JW, Kuritza A, Shlaes DM, Green M, Sahn DF, Zervos MJ: *Clonal spread of vancomycin-resistant Enterococcus faecium between patients in three hospitals in two states. J Clin Microbiol* 31:1609-1611, 1993
- 10) Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM,

- Tenover FC: *Characterization of glycopeptide-resistant Enterococci from U.S. hospitals. Antimicrob Agents Chemother* 37:2311-2317, 1993
- 11) Friden TR, Munsiff SS, Low DE, Willey BM, Williams G, Faur Y et al.: *Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. Lancet* 342:76-79, 1993
 - 12) Sader HS, Pfaller MA, Tenover FC, Hollis RJ, Jones RN: *Evaluation and characterization of multiresistant Enterococcus faecium from 12 U.S. medical centers. J Clin Microbiol* 32:2840-2842, 1994
 - 13) Moreno F, Grotta P, Crisp C, Magnon K, Melcher GP, Jorgensen JH et al.: *Clinical and molecular epidemiology of vancomycin-resistant Enterococcus faecium during its emergence in a city in southern Texas. Clin Infect Dis* 21:1234-1237, 1995
 - 14) Dunne WM, Wang W: *Clonal dissemination and colony morphotype variation of vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates in Metropolitan Detroit, Michigan. J Clin Microbiol* 35:388-392, 1997
 - 15) 박지원, 김양리, 신완식, 강문원, 한경자, 심상인: *Vancomycin 내성 Enterococci에 대한 감수성 검사. 감염* 24:133-137, 1992
 - 16) 백경란, 김성민, 이남용, 송재훈: *Vancomycin 내성 장구균의 소화관 집락 양상. 감염* 28:245-251, 1996
 - 17) 이위교, 곽연식, 김재중, 박한오: *Vancomycin 내성 장구균의 소화관내 보균율 및 PCR과 AFLP를 이용한 분자생물학적 분류. 대한임상병리학회지* 16:S69, 1996
 - 18) 장윤환, 최혜심, 김의중, 김남중, 신형식, 최강원: *중환자실 입원 환자에서 vancomycin 내성 enterococci에 관한 감시. 대한임상병리학회지* 16:S127, 1996
 - 19) 정석훈, 김문정, 이경원, 정윤섭, 권오현, 김준명 등: *요와 농검체에서의 vancomycin 내성 장구균 분리 2예. 감염* 28:373-377, 1996
 - 20) National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M7-A4. Villanova, Pa, 1997*
 - 21) Arthus M, Courvalin P: *Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother* 37:1563-1571, 1993
 - 22) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et al.: *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol* 33:2233-2239, 1995
 - 23) Woodford N, Johnson AP, Morrison D, Speller DCE: *Current perspectives on glycopeptide resistance. Clin Microbiol Rev* 8:585-615, 1995
 - 24) Tenover FC, Tokars J, Swenson J, Paul S, Spitalny K, Jarvis W: *Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant enterococci. J Clin Microbiol* 31:1695-1699, 1993
 - 25) Willey BM, Kreiswirth BN, Simor AE, Faur Y, Patel M, Williams G, Low DE: *Identification and characterization of multiple species of vancomycin-resistant enterococci, including an evaluation of Vitek software version 7.1. J Clin Microbiol* 31:2777-2779, 1993
 - 26) Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P: *Sequence of the vanC gene of Enterococcus gallinarum BM4174 encoding a D-alanine-D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. Gene* 112: 53-58, 1991
 - 27) Navarro F, Courvalin P: *Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in Enterococcus flavescens. Antimicrob Agents Chemother* 38: 1788-1793, 1994
 - 28) Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR: *Multiplex PCR detection of vanA, vanB, vanC-1, and vanC-2/3 genes in enterococci. J Clin Microbiol* 35:703-707, 1997
 - 29) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee(HICPAC): *Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. Infect Control Hosp Epidemiol* 16:105-113, 1995