

의학 박사학위 논문

반코마이신 내성장구균의
임상 분리주와 장내 보균주의
비교분석

아주대학교 대학원

의 학 과

허 지 영

반코마이신 내성장구균의
임상 분리주와 장내 보균주의
비교분석

지도교수 이 위 교

이 논문을 의학 박사학위 논문으로 제출함.

2005년 2월

아주대학교 대학원

의학과

허 지 영

허지영의 의학박사학위 논문을 인준함

심사위원장 이 기 범 인

심 사 위 원 최 태 열 인

심 사 위 원 이 위 교 인

심 사 위 원 임 영 애 인

심 사 위 원 조 성 란 인

아주대학교 대학원

2004년 12 월 22 일

감 사 의 글

이 논문을 완성할 수 있도록 지도해 주신 이위교 선생님과 좋은 조언을 아끼지 않고 해주신 임영애 선생님, 조성란 선생님께 감사드립니다. 실험을 도와 준 김영선 선생님, 김채영 선생님께도 감사드립니다.

먼 곳에 있지만 항상 저를 걱정해주시고, 어려울 때 힘이 되어 주시는 부모님께 감사드립니다.

반코마이신 내성장구균의 임상 분리주와 장내 보균주의 비교분석

배경 : 1986년 영국과 프랑스에서 반코마이신 내성 장구균 (vancomycin-resistant enterococci, VRE)이 처음 보고 된 이후 VRE의 분리빈도는 전세계적으로 증가하였다. 이 중 가장 흔히 분리되는 VanA형 VRE는 내성 획득형으로 반코마이신과 teicoplanin에 고도내성을 보여 병원감염에서 감염관리의 주된 대상이다. 이에 저자는 동일 환자의 분변과 임상검체에서 분리된 VanA VRE 균주들을 대상으로 유전적 관련성과 함께 *vanA* 내성 유전자의 구조 및 병독성 인자인 *esp* 유전자의 유무를 분석하여 향후 VRE의 감염 관리 대책수립의 기초 자료로 이용하고자 하였다.

대상 및 방법 : 2002년 1월부터 2004년 5월까지 아주대학 병원 진단검사의학과에 세균검사가 의뢰된 임상 검체 중에서 동일 환자의 분변배양에서도 VRE가 분리된 30쌍의 VRE 균주를 대상으로 하였다. 기초 대조균 비교를 위하여 같은 기간 동안 임상검체에서 분리된 반코마이신 감수성 장구균(vancomycin-susceptible enterococci, VSE) 15주와 닭에서 분리된 VRE 15주를 대상으로 *vanA* 내성 유전자 구조분석과 *esp* 유전자 유무 검색을 시행하였다.

1. 내성 유전자형 확인

: *vanA*, *vanB*, *vanC1/C2* 내성유전자의 시발체를 이용한 multiplex PCR을 시행하여 내성 유전자형을 확인하였다.

2. *vanA* 내성 유전자 구조 분석 - Transposon typing

: *vanA* 유전자 집단(*vanA* gene cluster; Tn1546)의 내부를 대상으로 부분별 PCR을 시행하여 구조를 분석하고, 유전자의 삽입이 의심되는 부분에 대해 국내 VRE균주에서 흔히 발견되는 삽입서열(insertion sequence, IS), 즉 IS1216V와

IS1542에 대한 시발체와 Tn1546 내부의 시발체를 이용해 내성 유전자에 삽입된 IS를 확인하였다.

3. 유전적 형별 분석 - Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)

: *Sma*I으로 균의 DNA를 절단한 후 CHEF-DR II를 이용하여 전기영동시킨 후 동일 환자에서 분리된 VanA VRE 균주들 간의 유전적 연관성을 Tenover 등이 제시한 기준에 따라 분석하였다.

4. 병독성 인자 검색

: 장구균의 병독성 인자로 알려진 *esp* 유전자의 N-말단에 대한 시발체를 이용하여 *esp*의 유무를 검색하고 양성으로 나오는 균주에 대해 A-및 C-반복서열의 구조를 분석하기 위해 PCR을 시행하였다.

결과 : *vanA* 내성 유전자 구조분석 결과 4가지 유형으로 구별되었다. Prototype과 동일한 I형에는 가축 분리주만 속하였고, II, III, IV형에 속하는 환자 분리주에는 모두 IS1542와 IS1216V가 삽입되어 있었다. 동일 환자의 임상 분리주와 장내 보균주는 19쌍(63%)에서 서로 유전적으로 근접한 균주였고, 5쌍(17%)은 서로 유전적 연관성이 없었으며, 내성 유전자 구조도 일치하지 않았다. 6쌍(20%)의 균주들은 서로 유전적 연관성이 없었으나 동일한 내성 유전자의 구조를 가져 인체 내에서 내성 유전자의 수평 전이를 시사하였다. *Esp* 유전자는 VRE 임상 분리주 26주(87%), VRE 장내 보균주 25주(83%), VSE 임상 분리주 10주(67%)에서 양성 이었고, 가축 분리주는 1주(7%)에서만 양성이었다.

결론 : 동일 환자에서 분리된 VRE 장내 보균주는 임상 분리주와 63%에서 내성 유전자의 구조, 균주의 유전형 및 *esp* 유전자의 유무가 일치하여, 병독성이 강한 균주로 나타났다. 따라서 VRE 감염증이 발병하기 전 장내 보균시기부터 감염관리 대상으로 포함시켜야 하며, 이를 위해 병원에서는 적극적으로 VRE에 대한 감시배양을 시행하고 VRE 장내 보균자들에 대해서도 VRE 감염증 환자들과 동일한 관리를 시행해야 할 것이다.

핵심되는 말 : VRE, Tn1546, *vanA*, *esp*

차 례

국문요약	-----	i
차례	-----	iv
그림차례	-----	v
표차례	-----	vi
I. 서론	-----	1
II. 대상 및 방법	-----	5
A. 대상균주	-----	5
B. 내성 유전자형 결정	-----	6
C. 내성 유전자 구조 분석	-----	7
D. 유전적 형별 분석	-----	11
E. 병독성 인자 검색	-----	12
III. 결과	-----	14
A. 대상균주	-----	14
B. 내성 유전자형 결정	-----	14
C. 내성 유전자 구조 분석	-----	14
D. 유전적 형별 분석	-----	20
E. 병독성 인자 검색	-----	27
IV. 고찰	-----	32
V. 결론	-----	38
참고문헌	-----	39
영문요약	-----	46

그림 차례

Fig. 1. Genetic map and PCR amplification position of <i>Tn1546</i> . -----	8
Fig. 2. Schematic of the <i>esp</i> protein. -----	13
Fig. 3. Genetic maps of <i>Tn1546</i> types of isolates from admitted patients in Ajou University Hospital and from chickens. -----	19
Fig. 4. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) of <i>SmaI</i> -retricted genomic DNA of VRE isolates from admitted patients in Ajou University Hospital. -----	21

표 차례

Table 1. Sequence of PCR primers used in the study.	-----	6
Table 2. Sequence of PCR primers used in the study.	-----	9
Table 3. Sequence of PCR primers used in the study.	-----	12
Table 4. Structural analysis of <i>vanA</i> gene cluster.	-----	16
Table 5. <i>Esp</i> profile of VRE from admitted patients in Ajou University Hospital.	-----	28
Table 6. <i>Esp</i> profile of VSE from admitted patients in Ajou University Hospital.	-----	30
Table 7. <i>Esp</i> profile of VSE isolated from chickens.	-----	31

I. 서론

장구균(enterococci)는 통성 혐기성 그람양성구균으로 사람과 동물의 장내 정상 상재균으로 존재하며, 병독성은 약해 건강인에서의 임상적 의의는 크지 않다. 장구균은 전통적으로 기저 질환이 있는 사람들에게 심내막염을 일으키는 원인균으로 알려져 있다. 그러나, 최근에는 오히려 요로감염, 카테터 관련 균혈증 등을 흔히 일으키는 병원 감염균으로써의 임상적 중요성이 더 강조되고 있다(Malathum 과 Murray, 1999). 미국 국가 병원 감염 감독위원회(National Nosocomial Infections Surveillance System, NNIS)는 1992년부터 1998년까지의 병원감염 통계에서 장구균이 중환자실 환자들의 병원감염의 4번째로 흔한 원인균임을 보고하였다(Chavers 등, 2003). 이와 같이 병원감염에서 장구균이 중요한 위치를 차지하게 된 것은 장구균이 나타내는 다제내성과 관련이 있다.

장구균은 cephalosporin제제, clindamycin, 저농도의 aminoglycoside 제제 등의 여러 항균제에 내인성 다제내성을 가지고 있어 효과적인 치료를 위해서 단일 약제보다 β -lactam제제와 aminoglycoside 제제의 병합요법이 사용되어 왔다. 상기의 내인성 내성 외에도 장구균은 접합(conjugation)을 통해 conjugative transposon, pheromone-responsive plasmid 등을 전달 또는 획득할 수 있는 능력이 있어 항균제 사용의 증가에 따라 여러 항균제에 대한 내성유전자는 널리 전파되었다. 그 결과 장구균은 내인성 다제내성 이외에도 내성 유전정보의 전달을 통해 chloramphenicol, tetracycline, erythromycin 등의 항균제에 대한 내성까지 획득하게 되었고, 최근에는 aminoglycoside 제제 고도내성균주나, 반코마이신 내성 균주가 출현함에 따라 장구균 감염증에 대한 치료약제의 선택은 극도로 제약을 받게 되었다(Gold, 2001; Chavers 등, 2003).

1986년 영국과 프랑스에서는 반코마이신 내성 장구균(vancomycin-resistant enterococci, VRE)이 처음으로 보고 되었고(Uttley 등, 1988; Leclercq 등, 1988),

이후 VRE의 분리율은 전세계적으로 지속적인 증가추세를 보여 왔다. NNIS에 의하면 미국의 중환자실 환자들에서 분리되는 장구균 중 VRE의 분리율은 1989년 0.4%에서 10년 뒤인 1999년에는 25.2%로 급증하였다(Chavers 등, 2003; Patel, 2003).

국내에서는 1992년에 박 등이 백혈병 환자의 가검물에서 반코마이신에 고도 내성을 보이는 *Enterococcus durans* 1예를 처음으로 보고하였다(박 등, 1992). 처음 보고 된 이후 1997년까지 국내에서 VRE의 분리빈도는 매우 낮았으나, 1998년 이후 경구용 반코마이신 사용 증가와 더불어 VRE 분리는 현저하게 증가하였다. 신 등은 1995년에서 1997년 사이에 분리된 장구균의 1% 미만(8/5275)이 VRE였으나, 1998년부터 2000년 사이에 분리된 장구균에서는 5.7%(325/5705)가 VRE였다고 보고하였다(Shin 등 2003).

VRE의 전파역학은 미국과 유럽에서 차이를 보인다. 미국에서 VRE가 대형병원의 중환자실을 중심으로 하여 주로 항균제 치료를 받은 입원환자의 임상 검체에서 분리되는 것에 비해 유럽은 입원환자 외에 건강인의 분변 및 가축에서도 VRE가 분리되고 있다. 이처럼 미국과 유럽이 차이를 보이는 이유는 미국과 달리 유럽에서는 오랜 기간 동안 가축 사료에 glycopeptide 제제를 첨가해왔기 때문인 것으로 추정된다. 성장촉진제로 glycopeptide 제제인 avoparcin이 포함된 가축 사료를 사용해왔던 유럽의 농가에서는 가축과 사람에서 같은 유전형의 VRE가 분리되거나, 동일한 구조의 *vanA* 내성 유전자가 발견되어 먹이사슬 등을 통한 가축에서 사람으로의 VRE 전파가능성을 제시하였다(Simonsen 등, 1998; van den Bogaard 등, 2002). 하지만, 유럽에서는 건강인의 장내에 VRE가 상재하여 일반사회에서 병원으로의 유입이 우려됨에도 불구하고 병원감염에서의 VRE 분리율은 미국에 비해 현저히 낮다(Schouten 등, 2000).

국내에서 VRE는 주로 병원감염의 원인균으로 보고 되었고 이는 대형병원을 중심으로 VRE가 전파되는 미국의 경우와 유사하다. 그러나, 유럽의 예과 같이 국내에서도 avoparcin을 가축의 배합사료 제조 시 사용하여 왔으며, 가축에서의 VRE 분리예도 이미 보고 된 바 있다(Park 등, 1999; 최연화 등, 2000; Huh 등,

2003).

VRE가 병원감염의 주요 원인균으로 부각되면서 VRE의 전파역학을 이해하여 반코마이신 내성 균주의 확산을 줄이려는 노력과, glycopeptide 제제 대신 사용할 수 있는 linezolid, quinupristin/dalfopristin 등의 대체 항균제의 개발이 지속되고 있다. 그러나, 이미 VRE가 토착화 된 일부병원들에서는 VRE가 근절되지 않을 뿐 아니라, 대체 항균제에 대한 내성도 드물게 보고 되고 있다(Burleson 등, 2004; Baysallar 등, 2004). 최근 미국에서는 *vanA* 내성 유전자를 가진 포도상구균에 의한 감염이 보고 되어 반코마이신 내성 세균에 대한 관리는 더욱 중요하게 되었다(Tenover 등, 2004; Appelbaum과 Bozdogan, 2004).

현재까지 알려진 장구균의 병독성 인자는 cytolysin, aggregation substance, hyaluronidase, 특히 표면 단백(specific surface protein) 등이 있으며, 대부분의 병독성 인자는 *E. faecium*보다 *E. faecalis*에서 더 빈번하게 검색된다. 특히 표면 단백질 중 Enterococcal surface protein(esp)는 1,873 개의 아미노산으로 구성된 표면단백으로 구조는 중앙부분에 A-구조와 C-구조의 반복과 좌측의 N-말단, 우측의 C-말단으로 구성되어 있다. Esp는 *E. faecalis*에서 먼저 발견되었는데, 장구균이 biofilm을 형성하도록 하여 요로 감염이나, 카테터 관련 감염에서 중요한 역할을 하며, 항균제에 대한 저항성을 높여준다(Toledo-Arana 등, 2001; Oancea 등, 2004). Esp 유전자는 입원 환자에서 분리된 VRE 또는 반코마이신 감수성 장구균(vancomycin-susceptible enterococci, VSE)에서 흔히 검색되며, 건강인의 장내 보균주나 동물, 식품, 환경 등에서 분리된 VRE 분리주에는 거의 발견되지 않아 esp 유전자를 가진 균주는 병독성이 강한 균주로 여겨지고 있다(Eaton과 Gasson, 2002).

유럽에서 시행된 건강인의 감시배양에서 분리된 VRE 균주들은 비록 *vanA* 내성 유전자를 가지고 있었지만 실제로 감염증을 일으킨 예는 보고 된 바 없고, 병독성 인자인 esp의 유무 검색에도 낮은 빈도의 양성율을 보여 감염증을 일으키는 균주에 비해 병독성이 약하다고 여겨져 왔다(Willems 등, 2001). 그러나, 동일인에서 분리된 장내 보균주와 임상 분리주를 대상으로 병독성 및 내성 유전자

구조를 비교한 결과는 현재까지 보고 된 바 없다. 유럽과 달리 병원감염 형태의 양상으로 VRE 감염이 전파되는 국내에서는 장내에 VRE를 보유하는 것이 감염과 연관성이 있는지를 검토할 필요성이 요구된다. 이에 저자들은 동일 환자의 임상검체와 분변에서 분리된 VRE를 대상으로 내성 유전자 구조분석, 균주의 유전적 형질분석 및 병독성 인자의 유무를 비교하여 VRE 장내 보균주를 보유한 환자의 관리에 도움이 되고자 하였다.

II. 대상 및 방법

A. 대상균주

2002년 1월부터 2004년 5월까지 아주대학 병원 진단검사의학과에 세균검사가 의뢰된 임상검체 중에서 동일 환자에서 분변 배양에서도 VRE가 분리된 30쌍의 임상 분리주와 장내 보균주를 대상으로 하였다. 기초 대조군 비교를 위하여 같은 기간 동안 임상검체에서 분리된 반코마이신 감수성 장구균 (vancomycin-susceptible enterococci, VSE) 15주와 닭에서 분리된 VRE 15주를 사용하였다. 정도관리균주로는 반코마이신 내성 *E. faecium* BM4147을 사용하였다. 각 균주는 반코마이신 6 μ g/mL을 함유한 Brain Heart Infusion agar를 이용한 agar screening method로 반코마이신 내성여부를 검색하였고, VRE로 검색된 모든 균주에 대하여 기존의 수기법, API20 STREP (bioMerieux, Hazelwood, MO, U.S.A) strip 및 자동동정기인 Vitek system (bioMerieux)을 이용하여 동정하였다.

B. 내성 유전자 형 결정

혈액한천배지에 배양한 2-3개의 집락을 TSB broth 10mL에 접종하여 24시간 배양한 후 Qiagen DNeasy Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였고, 전반응액인 동결건조액 PreMix-Top (Bioneer, Korea: Taq polymerase 1 unit, dNTP 250 μ M, 10mM Tris (pH 9.0), 40mM KCl, 1.5mM MgCl₂)이 들어 있는 0.5mL 시험관에 대상균주 DNA 1 μ l와 시발체 1.5 μ l씩을 넣었다. GeneAmp PCR System 480 (Applied Biosystems, Foster city, CA, U.S.A)을 이용하여 PCR을 시행(94 $^{\circ}$ C 5분; 1 cycle / 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분; 30 cycle / 72 $^{\circ}$ C 5분; 1 cycle)한 후 증폭산물을 10 μ l 취해 1.2% agarose gel에 120V, 30분간 전기영동하여 UV하에서 관찰하였다.

사용되었던 시발체는 표 1. 과 같다.

Table 1. Sequence of PCR primers[†] used in this study.

Gene	Sequences(5'→3')	Size(bp)
<i>vanA</i>	CCC ACT TTG CTT TTA TCC CGC	356
	ACC CGT CAA TCC CAA GTT TCG	
<i>vanB</i>	CGC CAT ATT CTC CCC GGA TAG	667
	AAG CCC TCT GCA TCC AAG CAC	
<i>vanC1</i>	GCG GTA TTG GGA AAC AGT GCC	429
	GCG GTC AAT CAG TTC GGG AAG TGC	
<i>vanC2</i>	CGG GGA AGA TGG CAG TAT	484
	CGC AGG GAC GGT GAT TTT	

[†] , Arthur et al., 1993

C. 내성 유전자 구조 분석 : Transposon typing

vanA 유전자 집단(*vanA* gene cluster; Tn1546)의 구조를 분석하기 위해 내성 유전자 전체에 대해 15쌍의 시발체를 이용해 중복되게 부분별 PCR을 시행하여 prototype인 *E. faecium* BM4147의 증폭산물과 비교하였다(Fig. 1). Prototype과 비교하여 증폭산물이 크게 나오는 부분에 대해서는 Tn1546 내부의 시발체와 국내 균주에서 흔히 발견되는 삽입서열(insertion sequence, IS)인 IS1542와 IS1216V에 대한 시발체로 PCR을 시행하여 IS의 삽입유무를 확인하였다. 사용되었던 시발체는 표 2. 와 같고 DNA의 추출과 PCR의 조건은 ‘방법 B.의 내성 유전자형의 결정’ 과 동일하였다.

E. Faecium
BM4147

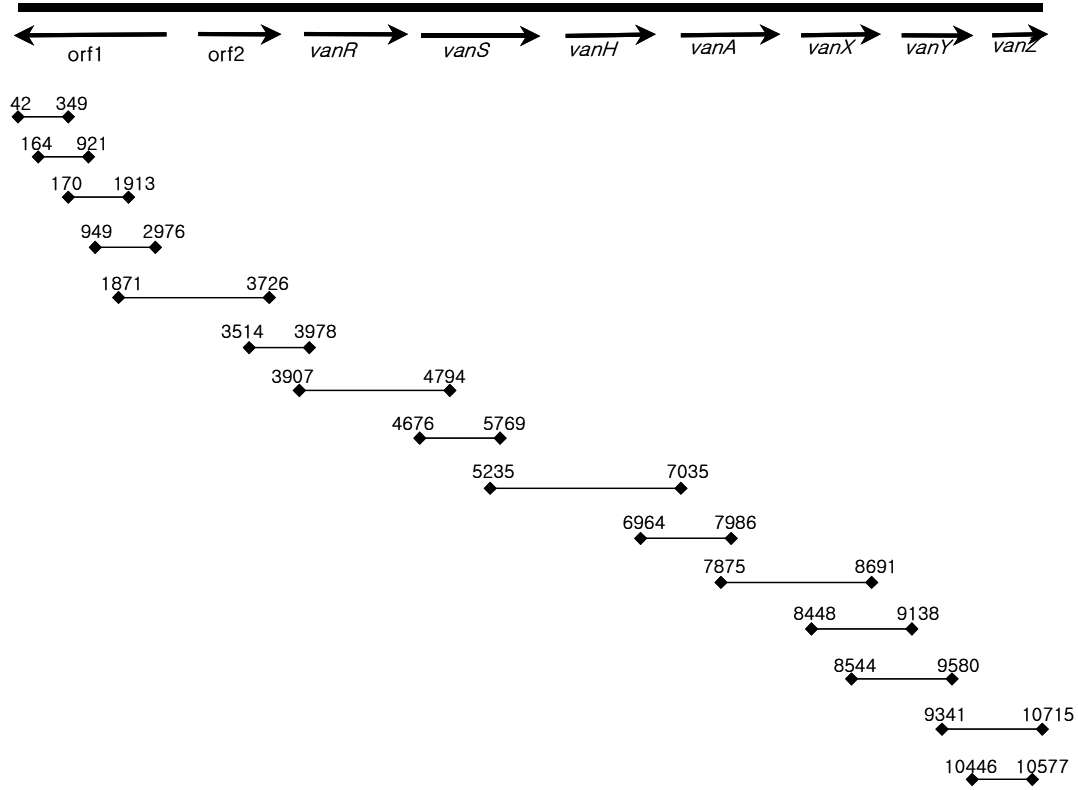


Fig. 1. Genetic map and PCR amplification position of Tn1546.

Table 2. Sequence of PCR primers used in this study.

Gene	Sequences(5'→3')	Location	Size (bp)	Reference
<i>Tn1546</i> primers				
42F	ATT TTC CTG ACG AAT CCC TCG	42-62	308	Simonsen et al., 2001
349R	TCG GAA AAC AAG GTG AGC TTA GA	349-327		Simonsen et al., 2001
164F	AAC CTA AGG GCG ACA TAT GGT G	164-185	758	Simonsen et al., 2001
921R	AAA AGG AGC CAC CAT CTA CCG	921-901		Simonsen et al., 2001
170F	AGG GCG ACA TAT GGT GTA ACA	170-190	1744	Hashimoto et al., 2000
1913R	CGT CCT GCC GAC TAT GAT TAT TT	1913-1891		Hashimoto et al., 2000
949F	GCA TGT AGT GAT GAA ACA CCT AGC TGC	949-975	2028	Simonsen et al., 2001
2976R	TCA AGA TGA ATG GAT ACT GGG GAC C	2976-2952		Simonsen et al., 2001
1871F	ACC GTT TTT GCA GTA AGT CTA AAT	1871-1894	1856	Hashimoto et al., 2000
3726R	AGC CCT AGA TAC ATT AGT AAT T	3726-3705		Hashimoto et al., 2000
3514F	ACT GTA ATG GCT GGT GTT AAC	3514-3534	465	Stobberingh et al., 1999
3978R	CAT AGT TAT CAC CCC TTT CAC TAT	3978-3956		Hashimoto et al., 2000
3907F	ATG CTT ATA AAT TCG GCC C	3907-3925	888	Hashimoto et al., 2000
4794R	ATC CAA TCC CCA AGT TTC CC	4794-4775		Hashimoto et al., 2000
4676F	AAC GAC TAT TCC AAA CTA GAA C	4676-4697	1094	Hashimoto et al., 2000
5769R	GCT GGA AGC TCT ACC CTA AA	5769-5749		Hashimoto et al., 2000
5235F	ATA TCA CGT TGG ACA AAG C	5235-5253	1801	Stobberingh et al., 1999
7035R	TTA CGT CAT GCT CCT CTG AG	7035-7017		Stobberingh et al., 1999
6964F	AAA GGA GAC AGG AGC ATG	6964-6981	1023	Stobberingh et al., 1999
7986R	CAA GCG GTC AAT CAG TTC	7986-7969		Stobberingh et al., 1999
7875F	CCG CAT TGT ACT GAA CG	7875-7891	817	Stobberingh et al., 1999
8691R	CAA GCG GTC AAT CAG TTC	8691-8673		Stobberingh et al., 1999
8448F	GAT GAA CGC TCT CAT CAT GC	8448-8467	691	Brown et al., 2001
9138R	TTC CTG AGA AAA CAG TGC TTC A	9138-9117		Brown et al., 2001
8544F	GCA TAT AGC CTC GAA TGG	8544-8561	1037	Stobberingh et al., 1999
9580R	TCG TCA AGC TTG ATC CTA C	9580-9562		Stobberingh et al., 1999
9341F	ATG GAT ACG GGT TGC TTG ATA T	9341-9362	132	Simonsen et al., 2001
10715R	TTT CCC CTC ACT TCA CAC CTA C	10715-10694		Simonsen et al., 2001

Table 2. (continued)

Gene	Sequences(5'→3')	Location	Size (bp)	Reference
<i>Tn1546</i> primers				
10446F	AAT ACT GTT GGA GGC TTT CTT GG	10446-10468	132	Simonsen et al., 2001
10577R	GGT ACG GTA AAC GAG CAA TAA TAC G	10577-10553		Simonsen et al., 2001
<i>IS1216V</i> primers				
650F	ACC TTC ACG ATA GCT AAG GTT	650-670		Huh et al., 2004
132R	AGG ATT ATA TAA GAA AAC CCG	744-725		Huh et al., 2004
<i>IS1542</i> primers				
1542F	TCA AGC CGA TGA CTA TGA	245-263		Lee et al., 2003
1542R	CTA TTT CCG ATA ACC GTG TAT	1076-1056		Lee et al., 2003

D. 유전적 형별분석

균주의 유전적 형별 분석을 위한 pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)는 Murray 등의 방법을 이용하였다(Murray 등, 1990). 대상 균주를 혈액한천배지에 접종하여 24시간 배양한 다음 면봉으로 집락을 취해 TE buffer (10mM Tris Cl, 5mM EDTA)에 부유시켰다. 균 부유액 500 μ l와 동량의 1.5% 저융점한천겔(FMC Corp., Rockland, ME, U.S.A)을 혼합하여 고형틀에 부어 냉각시켜 고형화 한 후 1mg/mL lysozyme (Applied Microbiology, Inc, Brooklyn, NY, U.S.A)이 들어 있는 3mL lysis buffer (6mM Tris Cl, 1.0M NaCl, 0.1M EDTA, 0.5% Brij 58, 0.2% Deoxycholate, 0.5% Sarkosyl)에 넣어서 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하여 세포를 용해하였다. 1mg/mL protein kinase가 들어 있는 ES buffer (10mM Tris Cl, 0.1M EDTA, 1% Sarkosyl) 3mL로 완충액을 교환하고 55 $^{\circ}$ C에서 3시간 배양한 후 새로운 TE buffer로 세척하여 고형화된 세균의 DNA를 20 units *Sma*I (Gibco BRL, Gaithersbrug, MD, U.S.A.)으로 25 $^{\circ}$ C에서 처리하였다. PFGE는 CHEF-DR II system을 이용하여 ramped pulse time을 시작 5초, 끝 30초로 하고 6V/cm, 19시간 전기영동하였다. 전기영동후 UV하에서 gel의 형광띠를 관찰하고 사진촬영하였다. PFGE의 판독은 Tenover 등의 방법에 따라서 유전적 연관성을 결정하였다(Tenover 등, 1995).

E. 병독성 인자 분석

장구균의 병독성 인자 중 biofilm 형성에 관여하는 *esp* 유전자의 N-말단에 대한 PCR을 시행하여 *esp* 유전자를 검색하고, *esp* 유전자의 구조 중 A- 및 C-반복서열의 구조를 PCR 증폭산물의 크기의 차이로 추정하여 유전자의 구조를 분석하였다(Fig. 2). 사용되었던 시발체는 표 3.와 같고 DNA의 추출은 방법 B.의 내성 유전자형의 결정과 동일하였다. GeneAmp PCR System 480 (Applied Biosystems)을 이용하여 PCR을 시행(94°C 5분; 1 cycle / 94°C 30초, 52°C 30초, 72°C 1분; 30 cycle / 72°C, 5분, 1 cycle)한 후 증폭산물을 10 μ l 취해 1.2% agarose gel에 120V, 30분간 전기영동하여 UV하에서 관찰하였다. A-반복과 C-반복의 구조는 증폭산물의 크기를 각각 252 bp(A-반복), 246 bp(C-반복)로 나누어서 결정하였다(Leavis 등, 2004).

Table 3. Sequence of PCR primers used in this study.

Gene	Sequences(5'→3')	target or function	Reference
esp34	TTG CTA ATG CTA GTC CAC GAC C	N-terminal	Eaton and Gasson, 2002
esp36	GCG TCA ACA CTT GCA TTG CCG AA	N-terminal	Eaton and Gasson, 2002
esp _m 5R	CAG CTG CGC TAA CAT CTA C	amplification of	Leavis et al., 2004
esp _s 7F	CGA CCG ATT TAG CAG TAA C	A-repeat region	Leavis et al., 2004
esp _m 5F	AAA GAA GAT TTA CCA AAA GAT ACT AAG	amplification of	Leavis et al., 2004
esp _s 3R	TTC GGC GCT TTT TTA TC	C-repeat region	Leavis et al., 2004

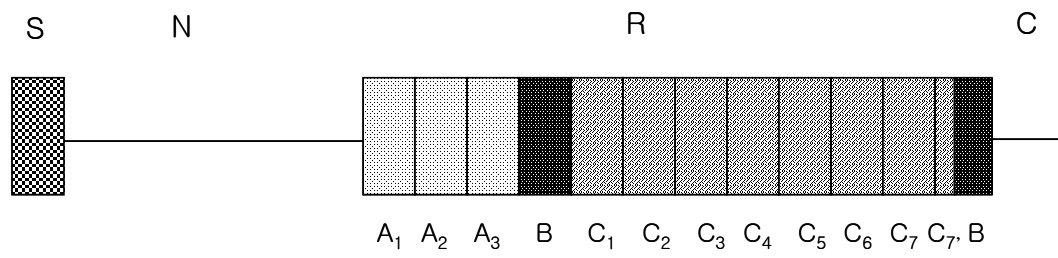


Fig. 2. Schematic of the esp protein. signal(S), N-terminal(N), repeat(R) and C-terminal(C) regions.

III. 결과

A. 대상균주

30쌍의 VRE 임상 분리주와 장내 보균주 중 25쌍의 균주는 *E. faecium*, 4쌍의 균주는 *E. faecalis* 였고, 1쌍의 경우(AJ23/AJ23r) 임상 분리주는 *E. faecalis*, 장내 보균주는 *E. faecium*으로 동정되었다. 대조균인 VRE 가축 분리주와 VSE 임상 분리주는 각각의 15균주 모두 *E. faecium*이었다.

B. 내성유전자형 결정

Multiplex PCR을 이용하여 30쌍의 대상 균주와 VRE 가축 분리주 15균주에서 356 bp 크기의 *vanA* 내성 유전자를 확인하였고, VSE 임상 분리주 15균주에서는 반코마이신 내성 유전자가 검색되지 않았다.

C. 내성 유전자 구조 분석 : Transposon typing

내성 유전자의 구조분석 결과 4가지 유형으로 구별되었으며, 모든 임상 분리주와 장내 보균주에는 IS1542와 IS1216V가 삽입되어 있었다. I형은 prototype과 동일한 구조로 환자 분리주에서는 I형은 관찰되지 않았으나, 가축 분리주는 15주 모두 I형의 내성 유전자를 가지고 있었다. II형은 환자 분리주의 7주(12%)에서 관찰되었는데 *orf2-vanR* intergenic region에 IS1542 삽입, *vanX-vanY* intergenic region에 표적 유전자의 염기서열 결실이 동반되면서 IS1216V가 삽입된 형이다. III형은 환자 분리주에서 가장 흔한 형으로(41주, 68%) Tn1546의 좌측말단에 *orf1* 유전자 결실과 함께 IS1216V가 삽입되고, *orf2-vanR* intergenic region에 IS1542 삽입, *vanX-vanY* intergenic region에 표적 유전자의 염기서열 결실이 동반되면서 IS1216V가 삽입된 형이다. IV형은 나머지 12주(20%)에서 관찰되었는데 Tn1546의 *orf2-vanR* intergenic region에 먼저 삽입된 IS1542와 Tn1546의 좌측말단이 동시에 결실되면서 IS1216V가 삽입되고 *vanX-vanY* intergenic region에는 III형과 동일하게 IS1216V가 삽입된 형이다. Prototype인 I

형은 가축 분리주에서만 관찰되었고, 환자 분리주들의 반코마이신 내성 유전자는 II, III, IV형에 속하였다. 동일 환자에게 분리된 균주들은 25쌍(83%)에서 내성 유전자 구조도 일치하였다(Table 4., Fig 3.).

Table 4. Structural analysis of *vanA* gene cluster.

Strain No.	Specimen	42-	164-	170-	949-	1871-	3514-	3992-	4676-	5235-	6964-	7875-	8448-	8544-	9341-	10446-	Tn1546
		349	921	1913	2976	3726	3978	4511	5769	7035	7986	8691	9580	9580	10715	10577	type
BM4147		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	I
AJC1-15		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	I
AJ1	urine	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	IIIa
AJ1r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	-	-	IIIa
AJ2	urine	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	-	+	+	+	IIIb
AJ2r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	-	+	+	+	IIIb
AJ3	wound	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	IVb
AJ3r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	+	+	+	IIIb
AJ4	wound	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ4r	stool	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	IVb
AJ5	catheter	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	IVb
AJ5r	stool	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	IVb
AJ6	wound	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	IVb
AJ6r	stool	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	IVb
AJ7	urine	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	-	-	-	+	IIIb
AJ7r	stool	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	IVb
AJ8	bile	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	-	+	+	+	IIIb
AJ8r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	-	+	+	+	IIIb
AJ9	pus	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ9r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ10	wound	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	-	-	-	+	IIIb
AJ10r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	-	-	-	+	IIIb
AJ12	urine	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ12r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ14	urine	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ14r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ15	urine	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ15r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ16	urine	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	IVa
AJ16r	stool	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	IVa
AJ17	urine	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	IVb
AJ17r	stool	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	IVb

Table 4. (continued)

Strain No.	Specimen	42-	164-	170-	949-	1871-	3514-	3992-	4676-	5235-	6964-	7875-	8448-	8544-	9341-	10446-	Tn1546
		349	921	1913	2976	3726	3978	4511	5769	7035	7986	8691	9580	9580	10715	10577	type
AJ21	blood	-	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	II
AJ21r	stool	-	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	II
AJ22	urine	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ22r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ23	wound	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	IVb
AJ23r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ24	urine	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ24r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ25	lung aspirate	-	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	II
AJ25r	stool	-	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	II
AJ26	catheter	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ26r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ27	urine	-	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	II
AJ27r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ28	wound	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ28r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ29	wound	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ29r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ30	catheter	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ30r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ31	urine	-	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	II
AJ31r	stool	-	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	II
AJ32	urine	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ32r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ33	urine	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ33r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ34	sputum	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ34r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ35	urine	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb
AJ35r	stool	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	++	++	+	+	IIIb

AJC1-15, VRE isolates from chicken; AJ1-35, clinical VRE isolates; AJ1r-35r, intestinal VRE

isolates; +, ++, amplicons the same size as and larger than those obtained for *E. faecium* BM4147, respectively; -, absence of an amplicon with the particular pair of primers.

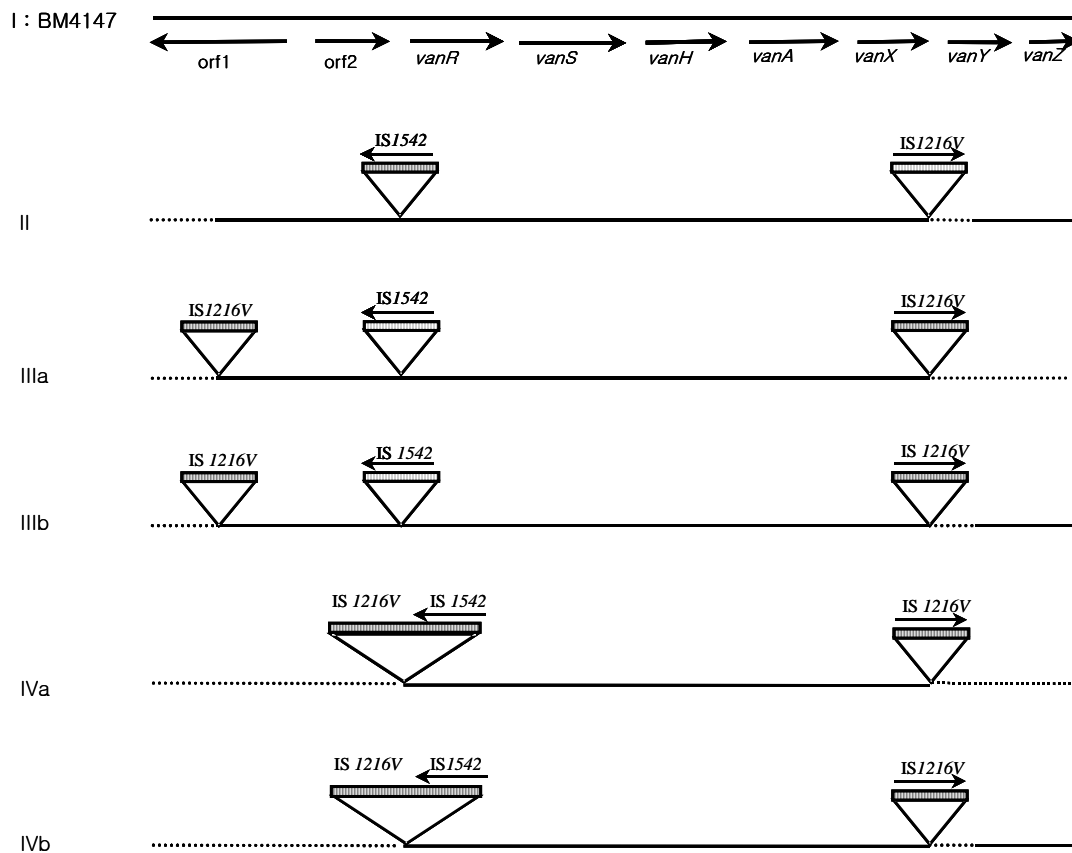


Fig. 3. Genetic maps of Tn1546 types of isolates from admitted patients in Ajou University Hospital and from chickens. The positions of genes and open reading frames (*orf1* and *orf2*) and the direction of transcription are marked by solid arrows at the top. Boxes with vertical lines represent IS elements. Solid arrows indicate the transcriptional orientations of the inserted IS elements. Deletions are indicated by dotted lines.

D. 유전적 형별 분석 : Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)

PFGE 분석은 Tenover 등이 제시한 기준에 따라 2-3개의 밴드 차이를 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(Tenover 등, 1995). 30쌍의 VRE 균주 중 19쌍은 동일 환자의 임상 분리주와 장내 보균주가 근접하게 연관된 균주로 나타났다. 내성 유전자형이 서로 달랐던 5쌍과 동일한 내성 유전자 구조를 가진 6쌍의 균주는 PFGE상 유전적 연관성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 4).

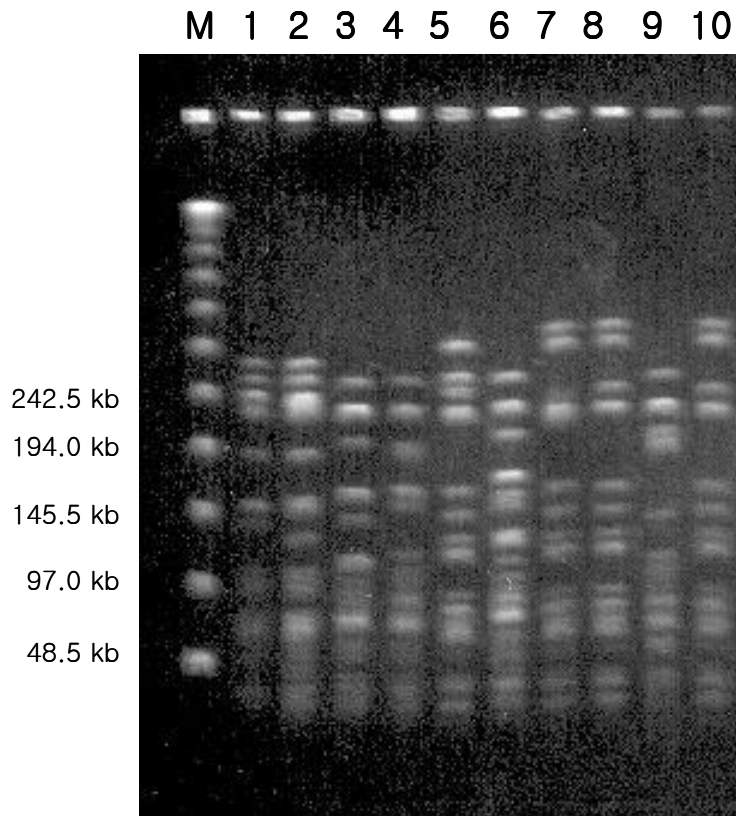


Fig. 4A. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) of *SmaI*-restricted genomic DNA of VRE isolates from admitted patients in Ajou University Hospital. M, molecular weight marker; lane 1, AJ1r; lane 2, AJ1; lane 3, AJ2; lane 4, AJ2r; lane 5, AJ3; lane 6, AJ3r; lane 7, AJ5; lane 8, AJ5r; lane 9, AJ7; lane 10, AJ7r.

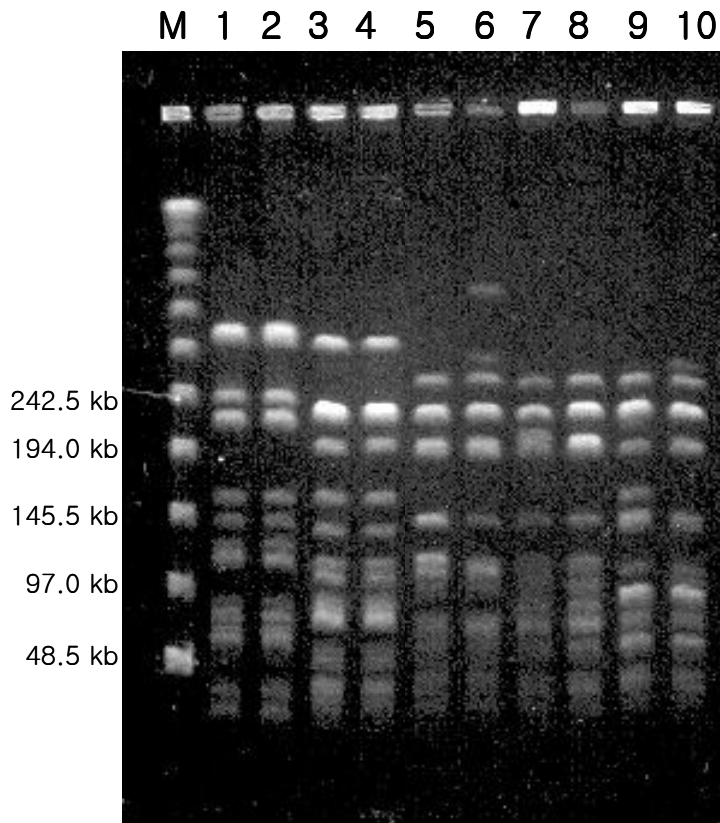


Fig. 4B. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) of *SmaI*-restricted genomic DNA of VRE isolates from admitted patients in Ajou University Hospital. M, molecular weight marker; lane 1, AJ6r; lane 2, AJ6; lane 3, AJ8; lane 4, AJ8r; lane 5, AJ10; lane 6, AJ10r; lane 7, AJ12; lane 8, AJ12r; lane 9, AJ14; lane 10, AJ14r.

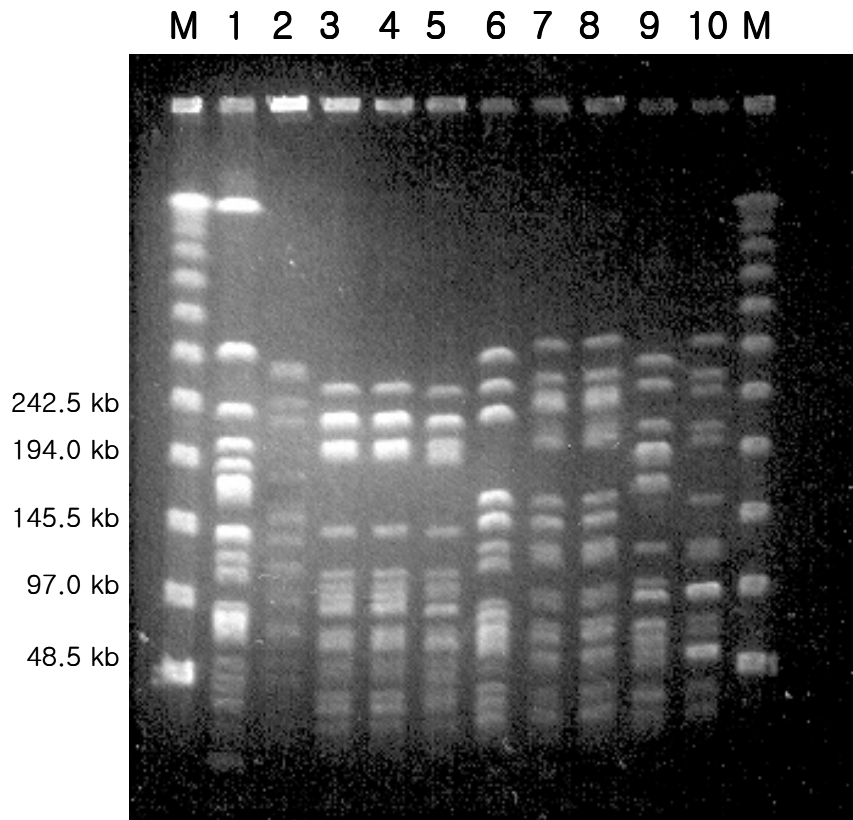


Fig. 4C. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) of *SmaI*-restricted genomic DNA of VRE isolates from admitted patients in Ajou University Hospital. M, molecular weight marker; lane 1, AJ4r; lane 2, AJ4; lane 3, AJ9; lane 4, AJ9r; lane 5, AJ15; lane 6, AJ15r; lane 7, AJ16; lane 8, AJ16r; lane 9, AJ17; lane 10, AJ17r.

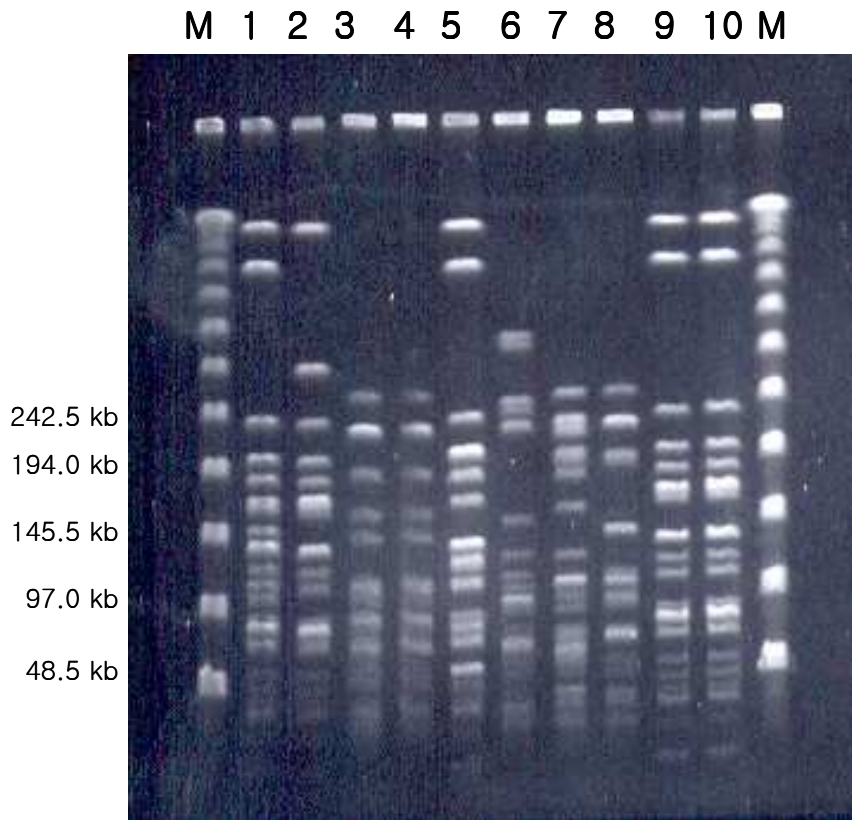


Fig. 4D. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) of *SmaI*-restricted genomic DNA of VRE isolates from admitted patients in Ajou University Hospital. M, molecular weight marker; lane 1, AJ21; lane 2, AJ21r; lane 3, AJ22; lane 4, AJ22r; lane 5, AJ23; lane 6, AJ23r; lane 7, AJ24; lane 8, AJ24r; lane 9, AJ25; lane 10, AJ25r.

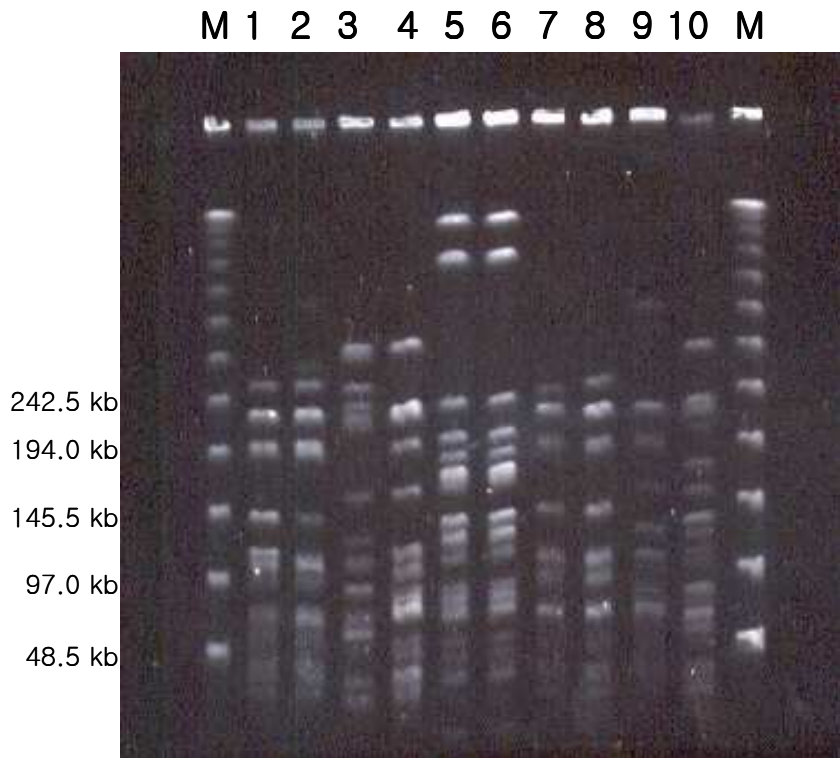


Fig. 4E. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) of *SmaI*-restricted genomic DNA of VRE isolates from admitted patients in Ajou University Hospital. M, molecular weight marker; lane 1, AJ26; lane 2, AJ26r; lane 3, AJ27; lane 4, AJ27r; lane 5, AJ28; lane 6, AJ28r; lane 7, AJ29; lane 8, AJ29r; lane 9, AJ30; lane 10, AJ30r.



Fig. 4F. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) of *SmaI*-restricted genomic DNA of VRE isolates from admitted patients in Ajou University Hospital. M, molecular weight marker; lane 1, AJ31; lane 2, AJ31r; lane 3, AJ32; lane 4, AJ32r; lane 5, AJ33; lane 6, AJ33r; lane 7, AJ34; lane 8, AJ34r; lane 9, AJ35; lane 10, AJ35r.

E. 병독성 인자 분석

VRE 임상 분리주의 87%(26/30)와 장내 보균주의 83%(25/30)에서 955 bp 크기의 *esp* 유전자가 검색되었다. A- 및 C-반복서열의 구조는 *esp* 양성인 임상 분리주 26주 중 6-7형 13주(50%), 5-8형 6주(23%), 3-7형 3주(12%), 3-8형 4주(15%)였고, 장내 보균주 25주에서는 6-7형 10주(40%), 5-8형 8주(32%), 3-7형 4주(16%), 3-8형 2주(8%), 8-8형 1주(4%)로 관찰되었다. 10쌍의 균주에서는 임상 분리주와 장내 보균주 간에 *esp*의 보유 유무 또는 A- 및 C-반복서열의 구조가 일치하지 않았는데 한 쌍의 균주(AJ2/AJ2r)를 제외한 나머지 9쌍은 PFGE상 유전적 연관성이 없는 것으로 나타났다(Table 5.) 대조군인 VSE 균주는 15주 중 10주(67%)에서 *esp* 유전자가 양성되었고, A- 및 C-반복서열은 5-8형 5주(50%), 6-7형 4주(40%), 5-12형 1주(10%)로 관찰되었다(Table 6.). 가축 분리주는 15균주 중 1 균주(7%)에서만 *esp* 양성으로 환자 분리주에 비해 현저히 낮은 빈도를 보였고, A- 및 C-반복서열의 구조는 4-3형으로 인체 분리주에서는 발견되지 않았던 형이었다(Table 7.).

Table 5. *Esp* profile of VRE from admitted patients in Ajou University Hospital.

Strain No.	<i>esp</i>	A-repeat	C-repeat	Strain No.	<i>esp</i>	A-repeat	C-repeat
AJ1	+	5	8	AJ21	+	3	8
AJ1r	+	5	8	AJ21r	-		
AJ2	+	6	7	AJ22	+	6	7
AJ2r	+	8	8	AJ22r	+	6	7
AJ3	-			AJ23	+	3	8
AJ3r	+	5	8	AJ23r	+	5	8
AJ4	+	6	7	AJ24	+	5	8
AJ4r	-			AJ24r	+	3	7
AJ5	-			AJ25	+	3	8
AJ5r	-			AJ25r	+	3	8
AJ6	-			AJ26	+	3	7
AJ6r	-			AJ26r	+	3	7
AJ7	+	6	7	AJ27	+	5	8
AJ7r	-			AJ27r	+	6	7
AJ8	+	6	7	AJ28	+	3	8
AJ8r	+	6	7	AJ28r	+	3	8
AJ9	+	6	7	AJ29	+	3	7
AJ9r	+	6	7	AJ29r	+	3	7
AJ10	+	3	7	AJ30	+	5	8
AJ10r	+	3	7	AJ30r	+	5	8
AJ12	+	6	7	AJ31	+	6	7
AJ12r	+	6	7	AJ31r	+	6	7
AJ14	+	6	7	AJ32	+	6	7
AJ14r	+	6	7	AJ32r	+	6	7
AJ15	+	6	7	AJ33	+	6	7
AJ15r	+	5	8	AJ33r	+	6	7
AJ16	+	5	8	AJ34	+	5	8
AJ16r	+	5	8	AJ34r	+	5	8
AJ17	-			AJ35	+	6	7
AJ17r	+	5	8	AJ35r	+	6	7

AJ1-35, clinical VRE isolates; AJ1r-35r, intestinal VRE isolates

Table 6. *Esp* profile of VSE from admitted patients in Ajou University Hospital.

Strain No.	<i>esp</i>	A-repeat	C-repeat
AJVS1	+	5	12
AJVS2	-		
AJVS3	-		
AJVS4	+	6	7
AJVS5	+	5	8
AJVS6	-		
AJVS7	+	6	7
AJVS8	+	5	8
AJVS9	+	6	7
AJVS10	+	5	8
AJVS11	+	5	8
AJVS12	-		
AJVS13	-		
AJVS14	+	5	8
AJVS15	+	6	7

AJVS1-15, clinical VSE isolates

Table 7. *Esp* profile of VRE isolated from chickens.

Strain No.	<i>esp</i>	A-repeat	C-repeat
AJC1	-		
AJC2	-		
AJC3	-		
AJC4	-		
AJC5	-		
AJC6	-		
AJC7	-		
AJC8	-		
AJC9	-		
AJC10	-		
AJC11	-		
AJC12	-		
AJC13	-		
AJC14	-		
AJC15	+	4	3

AJC1-15, VRE isolates from chicken

IV. 고찰

임상적으로 환자에게 감염을 일으키는 장구균의 대부분은 *E. faecalis*와 *E. faecium*이다. 특히 *E. faecalis*는 장구균 감염의 90%를 차지해 그 다음으로 빈번하게 분리되는 장구균인 *E. faecium*과는 현격한 차이를 보였다. 그 이유 중 하나는 *E. faecalis*는 cytolysin, aggregation substance, gelatinase 등의 병독성 인자를 *E. faecium*에 비해 많이 보유하고 있어 질병을 보다 쉽게 유발할 수 있기 때문으로 여겨졌다(Mundy 등, 2000). 그러나, 근래에 들어서 *E. faecalis* 감염은 점차로 감소하고 대신 *E. faecium*의 분리빈도가 증가하고 있다. 이는 최근 항균제 사용의 증가와 *E. faecium*은 *E. faecalis*보다 여러 항균제에 대해 내성을 가지기 때문인 것으로 일부 설명이 가능하다. 특히 반코마이신에 내성을 보이는 장구균의 90%이상이 *E. faecium*으로 반코마이신 내성 *E. faecium* (vancomycin-resistant *E. faecium*, VREF)의 증가와 더불어 장구균 감염에서 *E. faecium*이 차지하는 자리도 커지고 있다(Mundy, 1998; Chavers 등, 2003).

장구균은 원래 장내 정상 상재균의 일부로 존재했기 때문에 인체에서 분리되는 VRE는 감염증상 없이 장내 상재균의 형태로 존재하는 경우와, 실제적으로 감염증을 일으켜 VRE 감염증에 대한 치료가 필요한 경우로 나뉜다. 무증상으로 장내집락만 가지는 사람은 치료를 요하는 상태는 아니지만 그 중 일부는 감염증으로 발전할 수 있고, VRE를 다른 사람에게 전파하는 매개가 될 수 있어 관리가 필요한 상태이다. 그러나, 적극적인 감시배양을 시행하지 않는 한 무증상의 VRE 장내 보균자를 밝혀내기는 사실상 불가능하다. 유럽의 경우 가축을 통한 VRE의 유입으로 건강인의 분변에서 VRE가 분리되는 경우가 있으나, 입원환자에서 실제로 감염증을 일으키는 VRE의 분리빈도는 3%이하로 미국에 비해 현저히 낮다(Schouten 등, 2000). 이처럼 건강인의 장내에 상재하는 VRE가 병원에서의 VRE감염증의 증가와 연결되지 않는 것은 환자 분리주와 건강인의 장내 보균주 간에 균주 자체의 병독성에 차이가 있을 수 있음을 시사한다.

장구균의 주요 병독성 인자 중 하나인 esp는 장구균의 표면 단백질로 부착인

자로 작용하여 biofilm 형성에 관여한다(Shankar 등, 1999; Toledo-Arana 등, 2001). *Esp* 유전자는 감염증을 유발하는 유행성 균주에서 더 흔히 검색되며 특히 *vanA* 내성 유전자와 함께 다른 장구균에게 전이될 수 있어 병독성이 강한 VRE의 확산에 기여하였다고 추정된다(Oancea 등, 2004). 유럽에서는 병원 분리주에서 *esp*의 빈도가 VRE의 61%, VSE의 64%에서 양성인 데 반해(Woodford 등, 2001), 건강인의 VRE 장내 보균주는 전부 *esp* 음성이었다고 보고 된 바 있다(Willems 등, 2001). 다른 연구자들은 VRE 중 가축 분리주, 식품 분리주, 환경 분리주 및 건강인의 장내 보균주에는 *esp*의 빈도가 현저히 낮다고 보고하였다(Eaton과 Gasson 등, 2002; Mannu 등, 2003; Semedo 등, 2003).

본 연구에서 *esp*는 VRE 임상 분리주의 87%, 장내 보균주의 83%에서 검색되었고, VSE에서도 67%의 양성율을 보여 VRE의 경우와 유사한 빈도를 보였으나, 가축 분리주에서는 15주 중 1주(7%)에서만 *esp*가 검색되었다. 이는 국내 가축 분리주는 환자 분리주에 비해 현저히 약한 병독성을 가지고 있어 가축을 통한 사람으로의 VRE 유입이 발생하더라도 실제적인 VRE 감염을 일으킬 가능성은 희박할 것임을 시사하였다. 반대로, 입원 환자의 VRE 장내 보균주는 임상 분리주와 동등한 병독성을 가지고 있으며 실제 감염증을 일으킨 균주와 차이를 보이지 않았다.

A- 및 C-반복서열 구조는 처음 *esp*가 발견된 *E. faecalis*에서 3-7형이 prototype으로 알려져 있으며, 현재까지 반복서열의 정확한 역할은 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 6-7형이 임상 분리주의 50%, 장내 보균주의 40%에서 보여 가장 흔했고, 5-8형은 임상 분리주의 23%, 장내 보균주의 32%로 두 번째로 많았다. 대조균인 VSE 균주도 5-8형과 6-7형이 각각 50%와 40%로 대부분을 차지하여 VRE 균주와 유사한 분포를 보였다. *Esp* 양성인 가축 분리주의 반복서열 구조는 3-4형으로 인체 분리주와는 일치하지 않았다. PFGE상 유전적으로 근접하게 연관된 균주로 나왔던 19쌍 중 18쌍이 *esp*의 보유 유무와 반복서열의 구조가 일치하였고, 1쌍(AJ2/AJ2r)은 6-7형, 8-8형으로 동일한 *vanA* 내성 유전자 구조와 균주들의 유전적 연관성에도 불구하고 반복서열의 구조가 상이한 것으로

나타났다. 상기의 경우 정확한 기전은 알 수 없지만 PFGE상 유전적으로 근접한 관계에 있는 균주들에서 유전자 재조합이 일어난 결과라고 추측하였다. 반복 서열의 구조는 *E. faecium*의 경우 *E. faecalis* 보다 A-반복서열의 수는 증가하고 C-반복서열의 수는 감소하는 경향이 있는 것으로 알려졌는데(Eaton과 Gasson 등 2002; Leavis 등, 2004), 본 연구에서는 가축 분리주의 경우를 제외하면 A-와 C-반복서열이 전부 증가되어 있었다. 위의 결과가 외국의 보고와 차별되는 국내 균주의 특징인지 혹은 본원 균주만의 특징인지를 확인하기 위해서는 추후 연구가 필요하다.

VRE는 glycopeptide 제제에 대해 내성을 나타내 감염을 일으킬 경우 효율적인 치료 약제의 선택이 극도로 제한된다는 점 외에도 장구균을 포함한 다른 균주에게도 내성 유전자를 전달할 수 있다는 점에서 감염관리의 중점적 대상이 된다. 처음 VRE가 보고 된 이후 초기에는 주로 단일 유행성 균주에 의한 병원감염이 보고 되었지만 최근 몇 년 간의 전파는 내성 유전자의 수평 전이에 의한 유행이 많아져 균주의 유전적 형별 분석만으로는 VRE의 전파역학을 이해하기에 어려움이 있다(Chavers 등, 2003).

VRE는 내성 유전자에 따라 6개의 형으로 분류가 되는데 내성 획득형인 VanA, VanB, VanD, VanE 및 VanG형과 자연 내성을 가지고 있는 VanC형이다(Malathum과 Murray, 1999; Klare 등, 2003). 이 중 국내에서 보고된 형은 VanA, VanB, VanC형이다. VanA형은 반코마이신에 고도내성, teicoplanin에 중등도에서 고도내성을 보이며, VanB형은 반코마이신에는 다양한 정도의 내성을 가지나, teicoplanin에는 일반적으로 감수성을 보인다. VanA, VanB형은 반코마이신에 노출에 의해 내성이 유도되며 *E. faecium*과 *E. faecalis*에서 흔하게 볼 수 있다. VanC형은 반코마이신에 저농도내성, teicoplanin에는 감수성이며, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescence*에서 내인성 내성 유전자로 존재한다. 병원 감염관리에서 중점적으로 관리가 필요한 형은 내성 유전자의 전이를 통해 내성균주의 확산이 가능한 VanA형과 VanB형이며, 특히 VanA형은 최근 가장 빈번하게 분리되고 있어 가장 문제가 되고 있다.

내성 유전자의 수평 전이를 규명하기 위해서 다양한 방법으로 내성 유전자에 대한 구조 분석이 시행되어 왔다. 그 중 가장 많이 이용된 방법으로는 전체 내성 유전자를 증폭한 후 변별력이 있는 제한 효소로 절단한 후 전기영동을 시행하여 나타난 띠를 비교하는 long-PCR restriction fragment length polymorphism(RFLP)법과 내성 유전자 내부가 중복되도록 PCR을 시행해 각각의 증폭산물의 크기를 prototype의 그것과 비교하는 방법이 있다. 전자의 경우 비교적 쉽게 한번의 PCR로 내성 유전자의 구조 비교가 가능한 장점이 있어 내성 유전자의 양쪽 말단 부위가 대개 보존되어 있는 *vanB*의 구조분석에 유용하다. 그러나, *vanA*와 같이 시발체가 결합하게 되는 유전자의 말단 부위에 흔히 결실, 삽입 등의 유전자 재조합이 동반된 경우에는 증폭산물을 얻을 수 없는 단점이 있다. 또한 제한 효소에 의한 절단 형태에 차이가 관찰되는 경우에도 유전자 재조합이 일어난 부위를 구체적으로 알기 힘들다. 후자의 방법은 내성 유전자의 전체 부분에 대해 부분적으로 겹쳐지게 PCR을 시행하여 prototype 균주의 내성 유전자와 비교함으로써, 각 부분별로 유전자의 결실 및 삽입을 추정할 수 있다. 이후 유전자 재조합이 의심되는 부분에 대하여 유전자 염기 서열 분석을 시행하여 삽입된 유전자를 규명하거나, 결실된 부분을 확인할 수 있어 유전자의 변이를 보다 정확하게 알 수 있는 장점이 있다.

vanA 내성 유전자집단인 Tn1546에서 중간부분에 해당하는 *RSHAX* 부위는 *vanA*내성을 나타내는데 제일 중요하며 대개 잘 보존되어 있으나, 트랜스포손의 이동에 관여하는 *orf*나, teicoplanin 내성과 관련이 있다고 생각되는 *vanY* 및 *vanZ* 부위에는 흔히 유전자의 결실 및 삽입이 관찰된다. 삽입되는 IS로는 IS1216V, IS1542, IS1251 및 IS1476이 있고, 지역에 따라 IS의 종류는 약간씩 차이를 보여 *vanA* VRE의 역학분석에 이용되고 있다. IS1216V는 국내를 포함한 여러 다양한 지역에서 보고되며, 삽입되는 위치는 주로 *vanX-vanY* intergenic region 또는 *orf* region이고 삽입부위에 흔히 염기의 결실이 동반된다. IS1542는 *orf2-vanR* intergenic region(#3932)에 삽입되고, 유럽 분리주에서 보고되고 있으나, 미국 분리주에서는 보고된 바 없다(Woodford 등, 1998; Schouten 등,

2001; Brown 등, 2001). IS1251은 대부분 *vanS-vanH* intergenic region에 삽입되었고, 미국을 제외한 지역에서는 보고 되지 않았다(Jensen 등, 1998; Willems 등, 1999). IS1476은 캐나다에서 *vanY*에 삽입된 균주가 보고 되었다(Mackinnon 등, 1997).

국내에서 분리되는 VRE의 경우 대부분의 *vanA* 내성 유전자는 이미 유전자 재조합을 거친 상태로, 양쪽 말단 부위에 결실이 있거나, IS가 삽입된 경우가 많아 RFLP법보다는 overlapping PCR을 통한 분석이 내성 유전자의 구조 비교에 유용하다(Huh 등, 2004). 저자들은 본 연구에서 *vanA* 내성 유전자의 구조분석을 위해 overlapping PCR을 통해 증폭산물의 크기를 비교하고, 삽입된 IS의 종류와 위치를 확인하였다. 그 결과 IS의 삽입과 염기의 결실여부에 따라 내성 유전자는 크게 3 형으로 구분되었는데, 그 중 III형이 68%로 가장 흔했으며, 이는 또한 Schouten 등이 보고 한 유럽 분리주와 같은 형이다(Schouten 등, 2001). 그러나, 유럽의 경우 일부 균주에서만 IS1542가 삽입되어 있어 모든 대상 VRE 균주에 IS1542가 삽입되어 있는 국내의 균주와는 차이를 나타냈다(이위교 등, 2003; Huh 등, 2004). 본 연구에서 동일 환자에서 분리된 균주들은 83%(25쌍)에서 실제 감염을 일으킨 균주와 장내 보균주의 내성 유전자 구조가 동일하였고, 63%(19쌍)은 균주의 유전형 분석 결과 서로 근접하게 연관된 균주였다. 6쌍의 균주는 내성 유전자의 구조는 같았으나, PFGE결과 서로 유전적 연관성이 없는 균주로 나타나 인체 내에서 내성 유전자의 수평이동이 일어났음을 시사하였다.

유럽에서 건강인의 장내에서 분리된 VRE는 병독성 인자가 거의 없어 실제로 감염증을 일으키는 경우는 드물지만 본 연구의 환자에서 분리된 장내 보균주는 실제 임상 분리주와 내성 유전자 구조와 균주의 유전형이 유사하고 병독성 인자도 동등한 비율로 관찰되어 유럽에서 보고 된 건강인의 장내 보균주와는 달리 병독성이 강한 것으로 추정된다.

최근 미국에서도 건강인의 감시배양에서 VRE가 분리가 보고 된 바 있는데(D'Agata 등, 2001), 미국의 경우 가축사료에 avoparcin이 첨가된 적이 없는 만큼 이는 병원의 병독성이 강한 균주가 일반사회로 유입되었음을 시사하였다. 또

한, 장내 상재균으로 VRE를 가지고 있는 입원환자 중 VRE 감염증으로 발병하는 비율은 8.2%와 11.3%로 각각 보고 된 바 있어(Henning 등, 1996; Patel 등,2001) 입원환자의 VRE 장내보유율은 실제 감염증 환자보다 많게는 10배에 해당할 것으로 추정된다.

본 연구에서 동일인의 임상 분리주와 장내 보균주의 *vanA* 내성 유전자 구조, 균주의 유전 형별 및 *esp*의 보유 유무를 검색한 결과 63%에서 장내 보균주와 임상 분리주가 일치하는 것으로 나타났다. 이는 장내 보균된 VRE가 환자의 상태에 따라 감염을 야기한 것으로 추정되며, 따라서 효과적인 감염관리를 위해서는 VRE 감염증이 발병하기 전 장내 보균시기부터 감염관리 대상으로 포함시킬 필요가 있다. 이를 위해 이식병동과 중환자실 등 고위험 병동에 대하여 정기적으로 VRE에 대한 감시 배양을 시행하고 장내집락화가 된 환자에 대해서 조기 발견 및 격리수용을 유도함으로써 원내 VRE의 전파를 줄이고, 입원환자들의 병독성이 강한 균주가 일반사회로 유입되지 않도록 하는 노력이 필요하다.

V. 결론

저자는 동일 환자의 분변과 임상검체에서 분리된 VanA VRE 균주들을 대상으로 유전적 관련성과 함께 *vanA* 내성 유전자의 구조 및 병독성 인자인 *esp* 유전자의 유무 및 구조를 분석하여 향후 VRE의 감염 관리 대책수립의 기초 자료로 이용하고자 하였다.

vanA 내성 유전자의 구조분석 결과 동일 환자의 임상 분리주와 장내 보균주의 내성 유전자 및 균주의 유전 형별은 19쌍(63%)에서 근접하게 연관된 균주였고, 5쌍(17%)은 *vanA* 내성 유전자 구조 및 균주의 유전적 연관성이 없었으며, 6쌍(20%)은 균주의 유전적 연관성은 없었으나, *vanA* 내성 유전자 구조는 일치하여 내성 유전자의 수평전이를 시사하였다. *Esp* 유전자는 가축 분리주에서는 1주(7%)에서만 양성을 보여 가축 분리주의 병독성은 약한 것으로 추정되었으며, 임상 분리주와 장내 보균주는 각각 26주(87%), 25주(83%)에서 *esp*가 검색되어 높은 양성율을 나타냈다.

상기의 결과에 의하면 장내 보균주도 임상 분리주와 동등하게 병독성 인자 및 *vanA* 내성 유전자를 보유하고 있어 효과적인 감염관리를 위해서는 VRE 감염증이 발병하기 전 장내 보균시기부터 감염관리 대상으로 포함시켜야 한다. 이를 위해 병원에서는 적극적으로 VRE에 대한 감시배양을 시행하고 VRE 장내 보균자들에 대해서도 VRE 감염증 환자들과 동일한 관리를 시행해야 할 것이다.

참고문헌

1. 박지원, 김양리, 신완식, 강문원, 한경자, 심상인: Vancomycin 내성 enterococci 에 대한 감수성 검사. *감염* 24:133-137, 1992
2. 이위교, 이석호, 이선민, 허지영, 용동은 이경원, 이동건, 신완식: 일개 대학병원에서 분리된 *vanA*형 *Enterococcus faecium*에 대한 분자생물학적 특성. *대한임상미생물학회지* 6:119-125, 2003
3. 최연화, 이영선, 이점규, 유재일, 김치경, 김봉수. 환자와 가축에서 분리된 *vanA*형 VRE의 분자유전학적 연관성. *감염* 33:383-91, 2000
4. 허지영, 이선민, 이석호, 이위교, 용동은, 이경원, 신완식, 이동건: 가축에서 분리된 Vancomycin 내성 장구균의 내성유전자 구조분석을 통한 분자생물학적 역학 연구. *대한임상미생물학회지* 6:114-118, 2003
5. Appelbaum PC, Bozdogan B: Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Lab Med* 24:381-402, 2004
6. Arthur M and Couvalin P: Genetics and mechanism of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1563-1571, 1993
7. Baysallar M, Kilic A, Aydogan H, Cilli F, Doganci L: Linezolid and quinupristin/dalfopristin resistance in vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prior to clinical use in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 23:510-512, 2004
8. Brown AR, Townsley AC, Amyes SGB: Diversity of Tn1546 elements in clinical isolates of glycopeptide-resistant enterococci from Scottish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1309-1311, 2001

9. Burleson BS, Ritchie DJ, Micard ST, Dunne WM: Enterococcus faecalis resistant to linezolid: case series and review of the literature. *Pharmacotherapy* 24:1225-1231, 2004
10. Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, Banks SE, Steinhauer JR, Smith AM, Johnson CN, Funkhouser E, Chavers LP, Stamm AM, Waites KB: Vancomycin-resistant enterococci : 15 years and counting. *J Hosp Inf* 53:159-171, 2003
11. D'Agata EMC, Jirjis J, Gouldin C, Tang YW: Community dissemination of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *Am J Infect control* 29:316-320, 2001
12. Eaton TJ, Gasson MJ: A variant enterococcal surface protein Espfm in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol Lett* 216:269-275, 2002
13. Gold HS: Vancomycin-resistant enterococci: mechanism and clinical observations. *Clin Infect Dis* 33:210-219, 2001
14. 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* 185:247-254, 2000
15. Henning KJ, Delencastre H, Eagan J, Boone N, Brown A, Chung M, Wollner N, Armstrong D: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on a pediatric oncology ward: duration of stool shedding and incidence of clinical infection. *Pediatr Infect Dis J* 15:848-854, 1996
16. 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* 42:1897-1902,

17. Jensen LB, Ahrens P, Dons L, Jones RN, Hammerum AM, Aarestrup FM: Molecular analysis of Tn1546 in *Enterococcus faecium* isolated from animals and humans. *J Clin Microbiol* 36:437-442, 1998
18. Kauffman CA: Therapeutic and preventive options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. *J Antimicrob Chemother* 51(suppl S3):iii23-iii30, 2003
19. Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W: Occurrence and spread of antibiotic resistance in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol* 88:269-290, 2003
20. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P : Plasmid-mediated resistance to vancomycin & teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 319:157-161, 1988
21. 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* 48:1379-1381, 2004
22. Leavis H, Top J, Shanker N, Borgen K, Bonten M, van Embden J, Willems RJL: A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol* 186:672-682, 2004
23. Mackinnon MG, Drebot MA, Tyrrell GJ: Identification and characterization of IS1476, an insertion sequence-like element that disrupts VanY function in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1805-1807, 1997
24. Malathum K, Murray BE: Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics, epidemiology and therapeutic options. *Drug Resist*

Updat 2:224-243, 1999

25. Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Dupre I, Sechi LA: Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol* 88:291-304, 2003
26. Mundy LM; Enterococci: susceptibility, resistance, and now dependence on vancomycin. *Am J Clin Pathol* 109:367-370, 1998
27. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M: Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 13:513-522, 2000
28. Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM: Comparison of genomic DNAs of different enterococci isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol* 28:2059-2063, 1990
29. Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G: Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* 54:232-235, 2004
30. Park YH, Seo KS, Yoo HS. Development of multiplex PCR for detection of vancomycin resistant enterococci and epidemiological application in Korea. *J Korean Soc Chemother* 17:369-384, 1999
31. Patel R: Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 51(suppl S3):iii13-iii21, 2003
32. Patel R, Allen SL, Manahan JM, Wright AJ, Krom RAF, Wiesner RH, Persing DH, Cockerill III FR, Thompson RL: Natural history of vancomycin-resistant enterococcal colonization in liver and kidney transplant recipients. *Liver Transpl* 7:27-31, 2001

33. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFG, Voss A, and the European VRE study group: Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:816-822, 2000
34. Schouten MA, Willems RJJ, Kraak WAG, Top J, Hoogkamp-Korstanje JAA, Voss A: Molecular analysis of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant enterococci isolated from patients in Europe shows geographic transposon type clustering. *Antimicrob Agents Chemother* 45:986-989, 2001
35. Semedo T, Santos MA, Lopes MFS, Marques JJF, Crespo MTB, Tenreiro R: Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: A common trait in the genus? *System Appl Microbiol* 26:13-22, 2003
36. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 67:193-200, 1999
37. Shin JW, Yong D, Kim MS, Chang KH, Lee K, Kim JM, Chong Y: Sudden increase of vancomycin-resistant enterococcal infections in a Korean tertiary care hospital: possible consequences of increased use of oral vancomycin. *J Infect Chemother* 9:62-67, 2003
38. Simonsen GS, Haaheim H, Dahl KH, Kruse H, Lovseth A, Olsvik Ø, Sundsfjord A: Transmission of VanA-type vancomycin-resistant enterococci and *vanA* resistance elements between chicken and humans at avoparcin-exposed farms. *Microb Drug Resist* 4:313-318, 1998.
39. Simonsen GS, Myhre MR, Dahl KH, Olsvik Ø, Sundsfjord A: Typeability of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant enterococci using long-range PCRs and specific analysis of polymorphic regions. *Microbiol Drug Resist* 6:49-57, 2000

40. Stobberingh E, van den Bogaard A, London N, Driessen C, Top J, Willems R: Enterococci with glycopeptide resistance in Turkeys, Turkey farmers, Turkey Slaughters, and (sub)urban residents in the south of the Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? *Antimicrob Agents Chemother* 43:2215-2221, 1999
41. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murry BE, Persing DH, Swaminathan B: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233-2239, 1995
42. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, Clerk N, Killgore G, O'Hara CM, Jevitt L, Patel JB, Bozdogan B: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* 48:275-280, 2004
43. Toletto-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penades JR, Lasa: The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 37:4538-4545, 2001
44. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC : Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1:57-58, 1988
45. van den Bogaard AE, Willems R, London N, Top J, Stobberingh EE: Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother* 49:497-505, 2002.
46. Willems RJ, Homan W, Top J, van Santen-Verheuvél, Tribe D, Manziros X, Gaillard C, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Mascini EM, van Kregten E, van Embden JDA, Bonten MJM: Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in hospitals. *Lancet* 357:853-855, 2001

47. Willems RJ, Top J, van den Braak N, van Belkum A, Mevius DJ, Hendriks G, van Santen-Verheuevel M, van Embden JDA: Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn1546-like elements in enterococci from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 43:483-491, 1999
48. Woodford N, Adebiyi AMA, Palepou MFI, Cookson BD: Diversity of VanA glycopeptide resistance elements in enterococci from humans and nonhuman sources. *Antimicrob Agents Chemother* 42:502-508, 1998
49. Woodford N, Soltani M, Hardy KJ: Frequency of *esp* in *Enterococcus faecium* isolates. *Lancet* 358:584, 2001

-ABSTRACT-

Molecular Characterization of Vancomycin-resistant Enterococci from Clinical and Surveillance Specimens

Ji Young Huh

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associated Professor Wee Gyo Lee)

Background : Vancomycin-resistant enterococci(VRE) were first detected in Europe in 1986, and have been isolated from hospitalized patients worldwide. VanA resistance, characterized by high level resistance to vancomycin and teicoplanin, is the most prevalent in clinical enterococcal isolates. To target infection control, the molecular characteristics of clinical and intestinal enterococcal isolates recovered from hospitalized patients, was compared. Screening and structural analysis of enterococcal surface protein gene, *esp*, were also performed.

Method : From January 2002 to May 2004, Thirty pairs of *vanA*-containing enterococci were collected from Ajou University Hospital(Ajou UH). Each of the pairs were intestinal and clinical isolates from the same patient. Fifteen vancomycin-susceptible enterococci(VSE) in clinical specimens and fifteen VRE isolated from chicken are also analyzed as a control. Multiplex PCR were performed to examine the presence of *vanA*, *vanB*, and *vanC1/C2* genes.

For structural analysis of Tn1546 PCR amplification of overlapping internal regions of Tn1546 was performed. To clarify insertion sequence(IS), genomic DNA of isolates were amplified with a combination of Tn1546-derived primer and IS primer. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) of *Sma*I-digested genomic DNA was performed using CHEF-DRII device. The banding patterns were interpreted as described by Tenover et al. The presence of *esp* gene were determined by PCR for the N-terminal of *esp* gene. A and C repeat number variation of each *esp* gene also assessed by PCR.

Result : Tn1546 pattern showed 4 types[I(prototype), II, III, IV]. All strains isolated from chicken represented type I. All clinical and intestinal VRE isolates belonged to type II, type III and type IV, which contained IS1542 and IS1216V. VRE isolates from the same patient were closely related in nineteen pairs. Five pairs of isolates were unrelated and represented different Tn1546 types in each pairs. Six pairs of isolates revealed identical Tn1546 type but were genetically unrelated in each pairs, suggesting horizontal spread of *vanA* gene. Twenty six of clinical VRE isolates(87%) and twenty five of intestinal VRE isolates(83%) harbored *esp* gene and ten of VSE(67%) also revealed the presence of *esp* gene. Only one chicken isolate(7%) harbored *esp* gene.

Conclusion : Among nineteen pairs, the clinical and intestinal VRE isolates from same patients revealed genetically closely related and harbored identical Tn1546. They also agreed with the presence of *esp* gene. Therefore, patients colonized with VRE will continue to serve as a reservoir for the transmission of VRE. A regular VRE rectal surveillance program should be needed.

Key words : VRE, Tn1546, *vanA*, *esp*