

## 국내에서 분리된 포도상구균의 Vancomycin 내성빈도 및 특성

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과

박성언 · 김종배†

국문초록: Vancomycin은 세포벽의 합성을 억제하여 세균에 대한 항균효과를 나타내는 glycopeptide계 항생물질로서 그람양성세균으로 인한 감염치료에 광범위하게 사용되며, 특히 methicillin 내성 포도상구균의 선택적 치료제로 쓰이고 있다. 그러나 최근 임상검체에서도 중등도의 내성을 가지는 포도상구균 (Mu50: MIC 8 µg/ml)이 나타나기 시작하였고 여러 가지 여건상 국내에서도 내성균주가 분리될 가능성이 높다고 사료되어 임상검체 중 methicillin 내성 포도상구균을 대상으로 vancomycin 감수성 및 내성빈도 조사를 실시하고 이에 따른 내성기전을 알아보려고 하였다. 본 실험 결과 107주 (株)의 methicillin 내성균주 중 23.3%가 vancomycin에 대하여 내성을 보였으며 vancomycin 내성을 나타내는 표준균주인 Mu50과 Mu3의 중간 정도의 내성빈도를 보였다. 중합효소 연쇄반응을 통해 장구균의 vancomycin 내성에 관여하는 *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*, *vanH* 특이 유전자는 증폭되지 않았다. SDS-PAGE를 실시하여 81 kDa, 58 kDa, 33 kDa, 28 kDa 등의 주요 단백 분획을 확인하였고, Mu50에서 45 kDa의 특징적인 단백 분획을 관찰하였다. LDH enzyme assay에서는 한 개의 검체가 Mu50과 함께 높은 LDH 활성을 보였다

### 서 론

Vancomycin은 대표적인 glycopeptide계 항생제로서 1956년 *Amycolatopsis orientalis*에서 추출되었다<sup>13)</sup>. 그람양성세균의 세포벽 합성에는 UDP-N-acetylmuramyl(MurNAc)-pentapeptide 전구체를 필요로 하게 된다<sup>19)</sup>. 이러한 전구체는 세포질 안에서 UDP-MurNAc-tripeptide의 carboxyl 말단부에 D-ala-D-ala의 dipeptide가 ligase에 의해 연결되어 완성되며 지방 운반체 (lipid carrier)에 의해 세포막 바깥으로 운반되어 UDP-N-acetylglucosamine과 함께 세포벽을 합성한다. Vancomycin을 비롯한 여러 glycopeptide계 항생제들은 이 전구물질의 말단부인 D-ala-D-ala 부분과 수소 결합하여 중합작용을 막고 UDP-N-acetylglucosamine과 격자구조 형성을 막아 정상적인 세포벽 형성이 이루어지는 것을 막는다<sup>25)</sup>.

Vancomycin은 포도상구균 감염에 대한 선택적 약제로 널리 쓰여져 왔다<sup>2)</sup>. 그러나 vancomycin

에 대한 내성을 갖는 균주가 1988년 *Enterococcus* spp.로부터 처음 발견된 이후, 포도상구균에서도 vancomycin에 대한 내성을 유도할 수 있음이 증명되었다<sup>24)</sup>. 1992년 Noble 등<sup>18)</sup>은 세균간 접합 (cell-to-cell mating)을 통하여 *Enterococcus* spp.의 *vanA* operon이 *Staphylococcus*로 전이될 수 있음을 보였다. Milewski 등<sup>14)</sup>은 저농도의 vancomycin과 teicoplanin이 함유된 배지에서 세균을 계대 배양하여 중등도 내성을 가지는 내성균주를 얻었다. 또한 Sieradzki 등<sup>22)</sup>은 minimal inhibitory concentration (MIC) 1.5 µg/ml인 배지에서 단계적으로 항생제의 농도를 높인 배지에서 세균을 배양하여 MIC가 100 µg/ml인 *Staphylococcus aureus*를 얻었다고 보고하였다. 그러나 지금까지 연구된 바에 의하면 *vanA*, *vanB*, *vanC* 등의 *Enterococcus* spp. 유래 vancomycin 내성 gene이 *S. aureus*에서는 검출되지 않았으며 따라서 이와는 다른 내성기전을 가질 것으로 생각하고 있다. 실험적으로 얻은 vancomycin 내성균주는 세균의 성장에 있어서 차이를 보이는데, 집락 크기가 작고, 성장 속도가 느리며 세균의 직경이 크고 세포벽이 두꺼워져 있으며 lysostaphin에 대한 내성이 증가되었고 혈액 배지에서 β 용혈대가 감소되어 있다<sup>17)</sup>.

\* 논문 접수: 2000년 7월 13일  
수정재접수: 2000년 8월 21일

† 별책 요청 저자

임상검체에서는 Hiramatsu 등<sup>8)</sup>이 vancomycin에 중등도의 내성을 가지는 *S. aureus* (Mu50: MIC 8 µg/ml)를 최초로 분리하였는데, 이후 비슷한 정도의 내성을 가지는 균주가 Michigan과 New Jersey 등에서 보고되었다<sup>3)</sup>. 이들 내성균주들은 모두 methicillin 내성균주로 vancomycin의 장기간 투여를 통해 내성을 획득한 것으로 보고 있다<sup>3,8)</sup>.

Hanaki 등<sup>6)</sup>은 Mu3과 Mu50을 대조균과 비교하여 실험한 결과 이들 내성세균에서 N-acetylglucosamine의 cell 내 흡수율의 증가 및 배지 내 방출량의 증가, penicillin-binding protein 2 및 2'의 증가, autolytic enzyme activity의 상승 등이 관찰되었다고 보고하였다. 또한 Milewski 등<sup>4)</sup>은 vancomycin 내성세균에서 NAD<sup>+</sup>-linked-D-lactate dehydrogenase와 homologous한 37 kDa의 protein이 대조균에 비해 증가하였다고 하였다.

우리나라의 경우 methicillin 내성을 비롯한 항생물질 내성빈도가 높은 것으로 알려져 있고, 아직까지 항생제 남용에 관한 사회 전반에 걸친 인식부족으로 다른 항생물질에 대한 내성균주가 나타날 수 있는 가능성이 높으므로 vancomycin에 대한 내성균주가 있을 가능성이 많을 것으로 예상이 된다. 따라서 본 논문에서는 국내에서 분리한 methicillin 내성 *S. aureus* 균주를 대상으로 vancomycin에 대한 세균의 감수성 검사를 실행하고 여러 가지 실험을 통해 이에 따른 특성을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험균주 분리 및 동정

1998년 9월부터 10월까지 4주 동안 강원도 원주시 소재 연세대학교 원주기독 병원 임상병리과 미생물 실험실에서 Genus *Staphylococcus*로 분리 동정된 137주의 균주를 대상으로 실험하였다. 시험관법을 이용한 coagulase 검사와 mannitol salt agar (MSA)에 배양하여 특징적인 성상을 보이는 균주를 황색포도상구균으로 확인 동정하였으며, 그 결과 118개의 균주를 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 vancomycin 내성 표준균주는 Mu50 (vancomycin MIC 8 µg/ml)과 Mu3 (vancomycin MIC 3 µg/ml)을 Dr. Hiramatsu (Juntendo University, Tokyo, Japan)로부터 분양받아 사용하였다.

### 2. Methicillin 내성 황색포도상구균의 선별검사

황색포도상구균의 methicillin 내성을 검사하기 위

하여 일차적으로 cefinase disk (BBL)을 이용하여 세균의 β-lactamase 생성능을 확인하였고, methicillin계 항생제인 oxacillin을 한천평판 희석법으로 순차적으로 희석하여 세균의 MIC를 측정하였다. 한천평판 희석법은 Mueller Hinton agar (MHA)에 2배 희석법으로 항생물질을 128 µg/ml부터 0.5 µg/ml까지의 농도로 첨가한 각각의 배지에 brain heart infusion (BHI) broth에서 18시간 배양한 균액을 백금으로 접종하여 37°C incubator에 24시간 배양 후 MIC를 판정하였다.

### 3. Vancomycin 및 teicoplanin 감수성 검사

Methicillin 내성으로 확인된 균주를 대상으로 vancomycin과 teicoplanin에 대한 MIC를 Hiramatsu 등<sup>7)</sup>의 방법에 따라 판정하였으며 몇 개의 균주를 선별하여 population analysis를 수행하였다. Teicoplanin 감수성 검사는 BHIA에서 디스크 확산법 (BBL; 30 µg/disc)을 사용하여 검사하였다.

### 4. 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction)

중합효소 연쇄반응은 boiling lysis 법<sup>20)</sup>을 이용하여 추출한 세균의 DNA 2 µl에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP가 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTP 1.6 µl와 10X buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0) 2 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.2 µl, 20 pmol의 forward 및 reverse primer 2 µl씩에 *Taq* DNA polymerase를 0.5 U 첨가하고 멸균증류수로 최종 반응하는 양이 20 µl가 되도록 한 후 thermal cycler (Hybaid Limited, U.K.)에서 표적 DNA의 증폭을 시도하였다. 이때 사용한 중합효소 연쇄반응의 시간과 온도 조건은 다음과 같다. *vanA* specific primer set을 이용한 경우, 94°C에서 2분 30초간 최초 denaturation 이후 94°C에서 45초간 denaturation, 49°C에서 1분간 annealing, 그리고 72°C에서 1분간 extension 하는 과정을 35회 반복하였으며, 마지막 extension은 72°C에서 15분간 지속하여 유지함으로써 완전한 extension이 이루어지도록 하였다. *vanB*, *vanC1*, *vanC2*, *vanH* primer set을 이용한 경우 동일한 조건하에 annealing 조건을 각각 49°C, 47°C, 47°C, 48°C로 조정하여 반응이 이루어지도록 하였다.

### 5. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Vancomycin 감수성 검사를 통해 선별된 세균의 단

**Table 1.** The nucleotide sequences of PCR primers used in this study for the detection of vancomycin resistant gene from *S. aureus*

Primers		Sequence (5' to 3')	Targets
vanA	Sense	AAAAAGGCTCTGAAAACGCA	vanA
	Antisense	AGCCAGTTCTTTTGCCTTCA	
vanB	Sense	GAATTGTCTGGTATCCCC	vanB
	Antisense	GTTTACTTTGGTTACGCC	
vanC1	Sense	ACTAACAATAGCTTCCCC	vanC1
	Antisense	ACTTCATATTTTCAGCGGG	
vanC2	Sense	CCTTTACTTATTGTTTCGGC	vanC2
	Antisense	TCTTGATAGGATAAGCCG	
vanH	Sense	CATAAATCAGAGATTCCGC	vanH
	Antisense	GTTTACCTCTATACTTCGGC	

백양상을 분석하기 위하여, Laemmli<sup>11)</sup>의 discontinuous buffer system을 이용하여 12.5% separating gel에서 SDS-PAGE를 실시하였다. 세균 부유액은 Moreira 등<sup>16)</sup>의 방법을 변형하여 준비하였으며, sample 완충액과 (0.1 M Tris-HCl, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, 1% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromphenol blue, pH 6.8)과 동량 혼합하여 95°C heating block에서 5분간 처리하고 10 mA로 bromphenol blue가 gel의 하단부에 이를 때까지 약 2시간 동안 전기영동한 후 Coomassie blue-R 250 용액으로 약 10분간 염색하였다.

#### 6. Lactate dehydrogenase assay (LDH)

세균의 vancomycin에 대한 내성기전을 알아보기 위하여 LDH assay를 실시하였다. BHIA에 37°C에서 24시간 배양한 세균을 0.85% 생리식염수에 부유하여 충분히 모은 후 3번 세척하였다. 세균을 다시 0.85% 생리식염수에 부유하고 50 W에서 10초 간격으로 15분간 초음파 분쇄 처리한 후, 10,000 rpm으로 원심분리하여 얻어진 상층액을 모아 실험에 사용하였다. 준비한 부유액을 Moldeus 등<sup>15)</sup>의 변법을 실험조건에 맞게 다소 변형하여 먼저 NADH를 phosphate buffer (pH 7.4)에 2.11 mM 농도로 준비한 NADH 용액 1 ml를 부유액 50 µl와 잘 혼합한 후 37°C heating block에서 약 2분 동안 방치한 다음 20 µl pyruvic acid 용액 (1.36 mM)을 첨가하여 340 nm에서 15분 동안 감소된 NADH의 양을 측정하였다. 측정된 부유액을 Lowry 법<sup>12)</sup>을 사용하여 단백 정량을

**Table 2.** Antimicrobial susceptibility test of vancomycin resistant *S. aureus*

Interpretation of vancomycin resistance	MIC (µg/ml) of agent		Number of strains
	Oxa	Vm	
Potential-VRSA	128>	4	3 / 107
	128>	6	1 / 107
	128>	7	1 / 107
	128>	8	1 / 107
Possible hetero-VRSA	128>	3	6 / 107
	128>	4	7 / 107
	128>	5	5 / 107
	128>	7	1 / 107

실시하여 1분 동안 반응하는 mg 단백질당 LDH의 양을 계산하였다.

## 결 과

### 1. 항생제 감수성 검사

*S. aureus*로 동정하여 실험에 사용한 118개 검체를 methicillin계 항생물질인 oxacillin으로 한천평판 회석법을 사용하여 감수성 검사를 실시하였으며 NCCLS 내성판정 기준<sup>23)</sup>에 따라 내성을 보인 균주는 107개 검체였다. 이 균주들을 대상으로 먼저 4 mg/L의 vancomycin이 포함된 BHIA에서 24시간 내

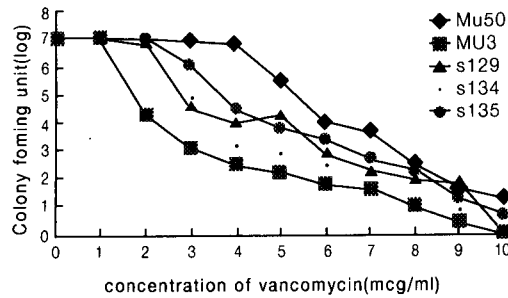


Fig. 1. Population analysis of vancomycin resistant *S. aureus*

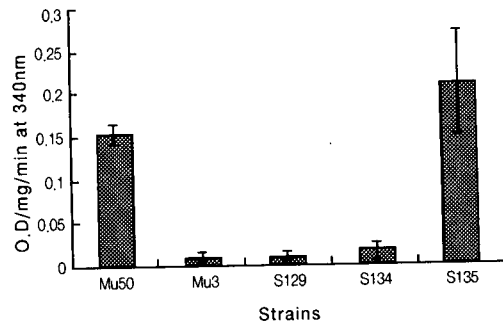


Fig. 3. LDH assay of vancomycin resistant *S. aureus*

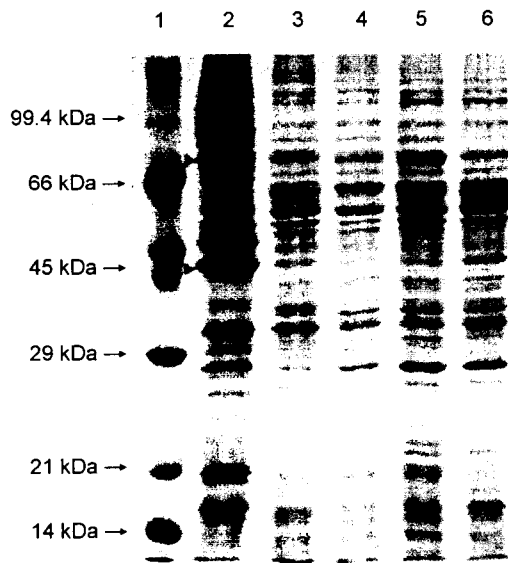


Fig. 2. SDS-PAGE of vancomycin resistant *S. aureus*. Lane 1, Marker; Lane 2, Mu50; Lane 3, Mu3; Lane 4, s129; Lane 5, s134; Lane 6, s135

에 완전한 증식을 보여 potential-VRSA로 판정된 균주는 6개 검체였으며, 48시간 동안 배양하여 증식을 확인할 수 있는 hetero-VRSA의 가능성이 있는 것으로 판정된 균주는 19개 검체였다. 따라서 실험에 사용된 methicillin 내성포도상구균 중 약 23.3% (25/107)의 검체가 vancomycin에 대하여 중등도의 내성을 가진 것을 알 수 있었다. 선별된 균주를 대상으로 increment 방법을 사용하여 vancomycin 농도가 1 µg/ml에서 10 µg/ml까지 함유된 BHIA 배지에서 MIC를 측정하였다. Teicoplanin 감수성 검사는 디스크 확산법을 통해 실시하였으며 모두 감수성으로 나타났다.

## 2. Vancomycin 내성균주의 내성빈도 분석

실험에 사용한 임상검체 중 vancomycin에 대한 MIC가 7 µg/ml 이상이었던 균주를 선별하여, 내성빈도를 조사하고 Mu50 및 Mu3과 비교해 보았다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 조사 대상으로 사용한 모든 황색포도상구균이 Mu50과 Mu3의 중간 정도의 내성빈도를 보였다.

## 3. 중합효소 연쇄반응

*Enterococcus* spp.에서 내성을 발현하는 *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* 및 *vanH* specific primer를 이용하여 각각의 조건에서 중합효소 연쇄반응을 실행한 결과 본 실험에 사용한 모든 포도상구균에서 표적 DNA가 증폭되지 않았다.

## 4. SDS-PAGE를 통한 단백질양상 분석

Vancomycin의 내성빈도 분석에 사용되었던 균주들을 대상으로 SDS-PAGE를 실시하여 Mu50 및 Mu3과의 단백질 분해를 비교 분석하였다. Fig. 2에서와 같이 marker를 기준으로 RFLP advanced program (Advanced American Biotechnology, CA., USA)을 이용하여 각각의 단백질 분해를 조사한 결과 81 kDa, 58 kDa, 33 kDa, 28 kDa에서 공통적인 주요 단백질 분해를 확인하였으며, Mu50은 45 kDa에서 특징적인 단백질이 확인되었다 (Fig. 2).

## 5. LDH enzyme assay

초음파 분쇄한 세균액을 기질액인 pyruvic acid와 보조효소인 NADH가 젖산과 NAD로 변환되는 것을 15분 동안 340 nm에서 NADH가 감소되는 양을 측정함으로써 세균내 LDH enzyme의 활성 정도를 알아보

았으며 단백질 정량을 실시하여 mg 단백질당 enzyme의 양을 계산하였다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 Mu50과 s135 균주에서 다른 균주에 비교하여 높은 LDH enzyme 활성치를 보였으며 두 균주 사이에는 통계학적으로 유의한 차이가 없이 비슷한 정도의 활성을 갖고 있는 것으로 나타났다 ( $p < 0.05$ ).

## 고 찰

항색포도상구균은 병원내 감염의 가장 흔한 원인균으로서 피부 및 창상 부위 감염은 물론 세균성 심내막염 및 폐렴 등의 질병을 일으킨다<sup>21</sup>). 초기에 이 세균의 치료에 사용되었던 페니실린은 1950년대 후반 약 50% 이상의 세균이  $\beta$ -lactamase를 생산함으로써 내성을 갖게 됨에 따라 1960년대 methicillin 및 cephalosporin계 항생물질로 대체되었으나<sup>4</sup>), 1970년대 methicillin 내성세균의 등장하면서 1950년대 후반 그람양성세균의 치료에 광범위하게 사용되어 온 vancomycin이 이에 대한 가장 효과적인 약제로 사용되었다. 그럼에도 불구하고 vancomycin 내성 장구균 및 coagulase 음성 포도상구균의 등장은 *S. aureus*에 있어서도 유사한 내성세균이 나타날 수 있는 가능성이 예견되었고<sup>9</sup>), 90년대 후반 중등도의 내성세균이 임상검체에서도 분리되기 시작하여<sup>7</sup>) 앞으로의 문제의 심각성을 충분히 환기시키고 있다.

실험에 사용된 107주의 methicillin 내성검체 중 25주가 vancomycin 내성세균 (potential VRSA: 6, hetero-VRSA: 19)으로 분리되어 23.3%의 분리율을 보였다. 이는 Hiramatsu 등<sup>7</sup>)이 일본의 5개 병원을 대상으로 하여 분리한 vancomycin 내성균주의 분리율인 20%, 5%, 10%, 22%, 22% 등과 비교할 때 비슷하거나 다소 높은 것으로 나타났다.

중합효소 연쇄반응 결과 *vanA*, *vanB*, *vanC1-C2*, *vanH*에 특이한 유전자 산물이 모두에서 증폭되지 않아 *S. aureus*의 vancomycin 저항성은 enterococci의 vancomycin 저항성 유전자와는 직접적인 관련이 없는 것으로 판단되었으며, 이와 같은 결과는 이전 논문들의 결과와 차이가 없었다<sup>6,23</sup>).

SDS-PAGE를 통하여 내성균주의 단백질양상을 내성표준주인 Mu50, Mu3과 함께 비교한 결과 큰 차이점을 보이지 않았으며 81 kDa, 58 kDa, 33 kDa, 28 kDa에서 공통적인 단백질 분획을 확인하였다. 다만 본 실험에서는 Mu50에서 45 kDa의 단백질 분획을 특징적으로 확인할 수 있었다. 81 kDa과 45 kDa의 분획은 각각 penicillin binding protein (PBP) 2와 PBP 4

에 해당하는 것으로 판단되며 나머지 분획은 확인되지는 않았으나 지금까지의 연구 결과들에 비추어 볼 때 vancomycin 내성에는 크게 관여하지 않을 것으로 예상된다<sup>16</sup>). Konx<sup>9</sup>) 등은 PBP가 peptidoglycan 말단부의 D-ala-D-ala 구조에 glycopeptide계 항생제가 결합하는 것을 구조적으로 막음으로써 상대적으로 항생제가 세포벽에서 작용하는 부위를 줄어들게 한다고 하였다. 한편 PBP 4는 분자량이 작은 (45 kDa) 단백질로서 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 주로 secondary cross-linking에 관여하면서 세균의  $\beta$ -lactam계 항생제에 대한 내성에 관여하는 것으로 보고되었다<sup>10</sup>).

Lactate dehydrogenase (LDH)의 측정 결과 한 개의 균주 (s135)가 내성 표준균주인 Mu50과 비슷한 정도의 높은 활성치를 보였다. 본 실험의 결과는 Milewski 등<sup>14</sup>)의 실험에서 낮은 농도 (1.25  $\mu$ g/ml)의 vancomycin 배지에서 내성을 획득한 변이 균주에서 LDH의 활성도가 대조균에 비해 높았다는 사실과 일치하였다. Vancomycin 내성 포도상구균에서 측정된 LDH는 *ddh*로 명명된 gene에 의해 발현되며 분자량이 36.7 kDa 정도로 VanH와 NAD<sup>+</sup>-linked-lactate dehydrogenase (dnLDH) 등과 같은 d-2-hydroxyacid dehydrogenase family와 아미노산 서열 분석 결과 28~40%의 상동성과 49~61%의 유사성을 지닌다<sup>14</sup>). 한편 Boyle-Vavra 등<sup>11</sup>)은 Milewski 등<sup>14</sup>)이 사용한 실험실 내성균주를 사용하여 *ddh* gene을 pM952-2 vector에서 insertional inactivation하여 dnLDH의 활성도의 변화를 측정된 결과 원래의 내성균주와는 달리 340 nm에서 NADH로 인한 흡광도의 증가가 관찰되지 않았으며 Western blotting을 통해 dnLDH에 해당하는 분획이 관찰되지 않았다고 하였다. 그러나 vancomycin 내성검사 결과에서는 vancomycin의 MIC가 모두 5  $\mu$ g/ml로 *ddh* gene이 inactivation된 변이 균주와 그렇지 않은 균주간에서 차이가 없는 것으로 보고하였다. 따라서 본 실험 결과에서 vancomycin 내성균주에서 LDH의 활성이 높아졌으나, 이것이 세균의 내성기전에 직접적으로 관여하는지에 대한 판단을 하기에는 미흡한 점이 많은 것으로 생각된다.

본 실험 결과 *S. aureus*의 vancomycin에 대한 내성기전에는 여러 가지 복합적인 요소가 관여하고 있는 것으로 보인다. 그러므로 국내에서 분리된 vancomycin 내성균주에 대한 기전을 좀 더 자세히 밝히기 위하여 앞으로 Western blotting을 통한 PBP의 확인과 더불어 LDH enzyme의 변화에 따른

peptidoglycan 전구체의 변화를 비롯한 내성기전에 관련된 다른 실험이 필요한 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Boyle-Vavra S, Jonge BLM, Ebert CC and Daum RS (1997): Cloning of the *Staphylococcus aureus* *ddh* gene encoding NAD<sup>+</sup>-dependent-d-lactate dehydrogenase and insertional inactivation in a glycopeptide-resistant isolate. *J Bacteriol*, **179**(21): 6756-6763.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention (1995): Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance: recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **44**(12): 1-20.
- 3) Centers for Disease Control and Prevention (1997): *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-United States, 1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **46**: 765-766.
- 4) Edmond MB, Wenzel RP and Pascualle (1996): Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: perspectives on measures needed for control. *Ann Intern Med*, **124**(3): 329-334.
- 5) Gross PA, Harkavy LH, Banrden GE and Flower MF (1976): The epidemiology nosocomial enterococcal urinary tract infection. *Am J Sci*, **272**: 75-81.
- 6) Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H and Hiramatsu K (1998): Activated cell wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother*, **42**: 199-209.
- 7) Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y and Kobayashi I (1997): Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, **350**: 1670-1673.
- 8) Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T and Tenover FC (1997): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*, **40**: 135-136.
- 9) Knox JR and Pratt RF (1990): Different modes of vancomycin and d-alanyl-d-alanine peptidase binding to cell wall peptide and a possible role for the vancomycin resistance protein. *Antimicrob Agents Chemother*, **34**: 1342-1347.
- 10) Labischinski H (1992): Consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin-binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Med Microbiol Immunol*, **181**: 241-265.
- 11) Laemmli CK (1970): Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- 12) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- 13) McCormick MH, Stark WM, Pittenger GE, Pittenger RC and McGuire JM (1956): Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biological properties. *Antibiot Annu*, **1955-1956**: 606-611.
- 14) Milewski WM, Boyle-Vavra S, Moreira B, Elbert CC and Daum RS (1996): Overproduction of a 37 kilodalton cytoplasmic Protein Homologous to NAD<sup>+</sup>-Linked-d-lactate dehydrogenase associated with vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**(1): 166-172.
- 15) Moldeus P (1978): Isolation and Use of Liver Cells. *Methods in Enzymology*, **22**: 60-71.
- 16) Moreira B, Boyle-Vavra S, de Jonge BLM and Daum RS (1997): Increased production of Penicillin-binding protein 2, increased detection of Other Penicillin-binding proteins, and decreased coagulase activity associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**(8): 1788-1793.
- 17) Morris JG, Shay DK Jr, Hebden JN, McCarter RJ, Perdue BE, Jarvis W, Johnson JA, Dowling TC, Polish LB and Schwalbe RS (1995): *Enterococci* resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. *Ann Intern Med*, **123**: 250-259.
- 18) Noble WC, Virani Z and Cree R (1992): Co-transfer of vancomycin and other resistant genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, **93**:

- 195-198.
- 19) Reynolds PE (1989): Structure, biochemistry, and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **8**: 943-950.
  - 20) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989): Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Haror, N.Y.
  - 21) Schberg DS, Culver DH and Gaynes RP (1991): Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med*, **91(Suppl B)**: 72s-75s.
  - 22) Sieradzki K and Tomasz A (1996): A highly vancomycin-resistant laboratory mutant of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, **142(2)**: 161-166.
  - 23) Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, O'hara CM, Clark NC and Hiramatsu K (1998): Characterization of *Staphylococci* with reduced susceptibility to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol*, **36(4)**: 1020-1027.
  - 24) Uttley AH, Collins CH, Naidoo J and George RC (1988): Vancomycin resistant enterococci. *Lancet*, **(i)**: 57-58.
  - 25) Van Heijenoort J (1994): Biosynthesis of the bacterial peptidoglycan unit, p39-55. In J-M. Ghuysen and R. Hackenbeck (ed.), Bacterial cell wall. Elsevier Science B.V., Amsterdam.

=Abstract=

**Characterization and Frequency of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated in Korea**

**Sung-Un Park and Jong-Bae Kim<sup>†</sup>**

*Department of Medical Technology, College of Health Science,  
Yonsei University, Wonju, 220-710, Korea*

The vancomycin, one of the family of glycopeptide antibiotics, inhibits the synthesis of bacterial cell wall peptidoglycan and has been widely used against gram-positive bacterial infections, especially for a treatment of methicillin resistant *S. aureus* infection. However, clinical isolate which was intermediately resistant to vancomycin (Mu50: MIC 8 µg/ml) was isolated in recent years. In this study we performed vancomycin susceptibility test with the increment method and population analysis with clinical isolates *S. aureus*. Also we did several kinds of tests with three selected isolates (s129: MIC 7 µg/ml, s134: MIC 7 µg/ml, s135: MIC 8 µg/ml) to find out possible mechanism of vancomycin resistance. As a result, the prevalence of vancomycin resistant *S. aureus* isolates among *S. aureus* strains resistant to methicillin was 23.3% (25/107). The vancomycin resistances of isolated strains of *S. aureus* were between those of Mu50 and Mu3 strains. By PCR analysis, none of the isolates with decreased vancomycin susceptibility contained known vancomycin resistant genes such as *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*, and *vanH*. Major bands of 81 kDa, 58 kDa, 33 kDa, 28 kDa were demonstrable in whole cell lysates by SDS-PAGE from all three isolates as well as reference strains. And especially, 45 kDa protein was overproduced in Mu50 strains. Among them increased production of NAD<sup>+</sup>-linked-D-lactate dehydrogenase (dnLDH) were detected from one clinical strain (s135) and Mu50 strain. From these data, we suggest that the mechanism of vancomycin resistance in these isolates are distinct from that in enterococci.

**Key Words:** Vancomycin, *S. aureus*, Population analysis, PCR analysis, SDS-PAGE, NAD<sup>+</sup>-linked-D-lactate dehydrogenase

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(3): 201–208, September, 2000]

---

<sup>†</sup>Corresponding author