

장구균의 vancomycin 내성 유전자와 종 특이유전자의 검출을 위한 Multiplex polymerase chain reaction 개발

조윤상^{*}, 이희수, 김종만, 안종삼, 류관동¹, 박용호¹, 유한상¹, 이문한¹

국립수의과학검역원, 서울대학교 수의과대학¹

(게재승인: 2003년 2월 28일)

Development of multiplex polymerase chain reaction for the detection of vancomycin resistant genotypes and *Enterococcus* Sp.-specific genes

Yun-Sang Cho^{*}, Hee-Soo Lee, Jong-Man Kim, Jong-Sam Ahn, Pan-Dong Ryu¹,

Yong-Ho Park¹, Han-Sang Yoo¹, Mun-Han Lee¹

National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, Korea,

¹College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

(Accepted: February 28, 2003)

Abstract: A multiplex PCR assay, which allows simultaneous detection of vancomycin resistant genotypes and *Enterococcus* species-specific genes, was developed. Vancomycin resistant enterococci (VRE) from chickens and humans could be detected for *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2*, *ddl_{E,faecium}* and *ddl_{E,faecalis}* by multiplex PCR. Eight isolates of VRE from humans ($n=11$) had *ddl_{E,faecium}* and *vanA*, and 3 isolates of the VRE had *ddl_{E,faecium}* and *vanB*. One isolate of VRE from chickens ($n=6$) had *ddl_{E,faecium}* and *vanA*, and 5 isolates of the VRE had only *vanA*. *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* were also confirmed for the species-specific gene by multiplex PCR. This multiplex PCR could detect *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *vanA*, *vanB*, *vanC-1* and *vanC-2*, simultaneously. The PCR assay established in the present study can be an alternative to time-consuming biochemical tests and antibiotic susceptibility tests of *Enterococcus* spp.

Key words: vancomycin resistant enterococci, multiplex polymerase chain reaction

서 론

Vancomycin resistant enterococci (VRE)의 내성형은 VanA, VanB, VanC, VanD 및 VanE형으로 나누어지며, 각각 *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD* 및 *vanE* 유전자를 가진 유전자형으로 구분한다¹ (Table 1). *vanA*, *vanB* 및 *vanD* 유전자형은 내성 유전자가 전이될 수 있는 유전자형이며, *vanC*와 *vanE* 유전자형은 유전자 전이를 통해 내성이 전

달되지는 않는다^{2,6}. Polymerase chain reaction (PCR)은 병원체 진단에 광범위하게 적용되고 있으며⁷, 전염원의 동정⁸⁻¹⁰과 항균제 저항성 유전자를 특이적으로 검출하는데 이용되어지고 있다¹¹. 그 동안 많은 연구에서 PCR은 표준균주에 대해 정확한 결과를 나타내며¹², 분자생물학적 검사의 표준법으로 확인되었다¹³. Van 유전자형을 검출하는 PCR은 분리균주에서 예외적으로 음성결과를 보이며, 실험에 많은 시간이 소요된다는 단점이 있지만,

* Corresponding author: Yun-Sang Cho

National Veterinary Research and Quarantine Service, 480 Anyang 6-dong, Anyang, 430-8824, Korea

Tel: 031-467-1769, Fax: 031-467-1778, E-mail: choys@nvrgs.go.kr

Table 1. Characteristics of vancomycin resistance²⁷

Resistance	Transferable resistance				Intrinsic resistance		
	Phenotype	VanA ²²	VanB ²³	VanD ²⁴	VanC1 ^{3,25}	VanC2 ^{3,15}	VanC3 ^{3,25}
Gene	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanD</i>	<i>vanC-1</i>	<i>vanC-2</i>	<i>vanC-3</i>	<i>vanE</i>
MIC _{vancomycin} ^a	16-1024	4-1024	4	2-32	2-32	2-32	2-32
MIC _{teicoplanin}	8-1024	0.25-2	4	0.125-4	0.125-4	0.125-4	0.125-4
Species	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>E. hirae</i>	<i>E. faecium</i> , <i>faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i> , <i>E. flavescens</i>	<i>E. flavescens</i> , <i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>
Localisation	Plasmid (and chromosome)	Chromosome (and plasmid)	Chromosome	Chromosome (?)	Chromosome (?)	Chromosome (?)	Chromosome (?)
Mobile element	<i>Tn</i> ^b 1546	<i>Tn</i> 1547	(?)	(?)	(?)	(?)	(?)

비용, 검사시간 및 검사효율 등이 좋기 때문에 장구균의 역학조사와 감염을 통제하기 위한 수단으로써 많이 사용된다¹².

Van 유전자의 근원은 정확히 밝혀지지 않았지만, *van* 유전자를 검출하는 multiplex PCR은 많은 연구자들에 의해 개발되었다. Dutka-Malen 등¹⁴은 multiplex PCR로 *van* 유전자인 *vanA*, *vanB*, *vanC-1* 및 *vanC-2*와 *E. faecium*과 *E. faecalis*의 D-alanine:D-alanine ligase (Ddl) 유전자인 *ddl*_{*E. faecium*}과 *ddl*_{*E. faecalis*}를 각각 검출하였다. Satake 등¹⁵도 Dutka-Malen 등¹⁴의 *vanC-2* primer를 약간 변형한 primer를 이용하였으며, Patel 등¹³은 *vanA*, *vanB*, *vanC-1* 및 *vanC-2* 특이 primer로 PCR을 수행한 후 restriction fragment length polymorphism (RFLP)으로 유전자형을 동정하였으며, Petrich 등¹⁶은 *vanA*와 *vanB* 특이 primer를 이용하여 각각의 내성유전자형을 검출하였다. Reed 등¹²도 Dutka-Malen 등¹⁴이 사용한 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 한편, Kariyama 등¹⁷은 Dutka-Malen 등¹⁴의 primer로 PCR을 수행한 결과, *vanA*와 *ddl*_{*E. faecalis*}의 증폭산물이 희미하거나, *vanB*와 *ddl*_{*E. faecalis*} 증폭산물에는 비특이 반응이 관찰되었고, *ddl*_{*E. faecium*} 증폭산물은 생기지 않았다고 보고하였으며 [Dutka-Malen 등¹⁴은 *ddl*_{*E. faecium*} primer에 대한 정정문을 발표하였음], internal PCR control로써 16S rRNA primer¹⁸를 추가하고 Clark 등¹⁹과 Satake 등¹⁵의 primer와 Dutka-Malen 등¹⁴이 사용한 primer를 변형하여 multiplex PCR을 확립하였다. Hong 등²⁰과 Seo 등²¹은 *van* 유전자인

vanA, *vanB*, *vanC-1* 및 *vanC-2* 유전자형을 구별하는 primer를 사용하였다.

본 연구에서는 Dutka-Malen 등¹⁴이 사용한 primer중 *vanB*와 *ddl*_{*E. faecium*}의 primer를 변형하여 사용하였으며, 이러한 기법을 통하여 국내 분리 장구균에 적용함으로써 *vanA*, *vanB*, *vanC-1* 및 *vanC-2* 유전자형 구별과 함께 *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* 및 *E. casseliflavus*의 동정을 동시에 할 수 있었다.

재료 및 방법

사용 균주와 배양 조건

vanA, *vanB*, *vanC-1* 및 *vanC-2* 유전자형의 VRE 표준 균주로써 *E. faecium* B7641 (*vanA*), *E. faecalis* V583 (*vanB*), *E. gallinarum* GS (*vanC-1*) 및 *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*vanC-2*)을 사용하였다^{13,21,28,29}. 또한, Seo 등²¹이 국내 닭의 분변과 환자의 요와 혈액으로부터 분리한 VRE와 본 실험에서 분리한 장구균, *Streptococcus* spp. 및 *Aerococcus* spp.를 사용하였으며, 주요 식중독원인균으로는 *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Campylobacter jejuni* ATCC 33291, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica* 및 *Bacillus cereus*를 사용하였다. 모든 배양은 Brain Heart Infusion (BHI) broth (Difco, USA)로 37°C

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study

Genes	Primers	Sequence of oligonucleotide (5' to 3')	Position	PCR product size (bps)	References
<i>vanA</i>	vanA1	GGGAAAACGACAATTGC	175-191	732	14
	vanA2	GTACAATGCGGCCGTTA	907-891		
<i>vanB</i>	vanBF	ATGGGAAGCCGACAGTC	174-190	635	14 (modified)
	vanB2	GATTTCGTTCTCGACC	808-792		
<i>vanC-1</i>	vanC1	GGTATCAAGGAAACCTC	246-272	822	14
	vanC2	CTCCGCCATCATAGCT	1067-1051		
<i>vanC-2</i>	vanD1	CTCTACGATTCTCTTG	455-486	439	14
	vanD2	CGAGCAAGACCTTTAAG	885-869		
<i>ddl_{E.faecium}</i>	ddl _{FM1}	TAGAGACATTGAATATGCC	359-377	536	14
	ddl _{FM2}	GCTTCCACCTAACATCGTGTA	874-894		This work
<i>ddl_{E.faecalis}</i>	ddl _{FS1}	ATCAAGTACAGTTAGTCT	98-116	941	14
	ddl _{FS2}	ACGATTCAAAGCTAACTG	1038-1021		

에서 수행하였다.

Oligonucleotide primers

본 실험에서 사용한 6개의 oligonucleotide primer는 Dutka-Malen 등¹⁴이 사용한 *vanA*, *vanB*, *vanC-1* 및 *vanC-2* 유전자와 *E. faecium*과 *E. faecalis*의 D-Ala:D-Ala ligase 유전자에 대한 primer 중 *vanB* forward primer와 *ddl_{E.faecium}* reverse primer를 변형한 것이었다^{3,30-33} (Table 2).

Multiplex PCR

BHI broth 1.5 ml에 37°C, 18시간 배양된 균액을 12,000 ×g, 5분간 원심침전하여 증류수로 2회 세척하였다. 이를 nuclease-free water (Promega, USA) 100 μl에 부유시켜 10분간 끓인 다음, 얼음물에 20분간 담갔다. 이를 12,000 ×g, 10분간 원심침전한 후 상층액을 template DNA로 사용하였으며, 5 μl를 취하여 multiplex PCR에 광하였다. PCR mixture는 다음과 같이 구성하여 총 50 μl가 되게 하였다; 50 pmole 각 oligonucleotide primers, 2.5 U *Taq* polymerase (Promega, USA), 0.5 mM 각 deoxynucleoside triphosphate (Promega, USA), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 at 25°C), 0.75 mM MgCl₂, 0.1% Triton[®] X-100, 1.0% dimethyl sulfoxide (Sigma, USA). 'Hot start' 방법으로 PCR을 실시하였다. PCR 혼합물을 GeneAmp[®] PCR System 9600 (Perkin-Elmer, USA)으로 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation 시키고, 54°C, 1분간 annealing 시킨 다음, 65°C, 7분간 반응시키면서 2.5 U *Taq* polymerase (Promega, USA)를 첨가시킨 후,

30회 증폭반응 (72°C, 1분; 94°C, 1분; 54°C, 1분)을 실시하고 마지막으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. Multiplex PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel상에서 전기영동 후 gel을 ethidium bromide로 15분간 염색하고, 15분간 증류수로 탈색시킨 다음, 자외선 조사하여 증폭산물을 확인한 후 Polaroid MP-4+ camera system (Sigma, USA)으로 촬영하였다.

결 과

Multiplex PCR에 의한 VRE 특이유전자 검출

ddl_{E.faecium}, *ddl_{E.faecalis}*, *vanA*, *vanB*, *vanC-1* 및 *vanC-2*에 대한 특이 primer를 이용하여 (Table 2), *vanA*, *vanB*, *vanC-1* 및 *vanC-2* 유전자형의 VRE 표준균주인 *E. faecium* B7641 (*vanA*), *E. faecalis* V583 (*vanB*), *E. gallinarum* GS (*vanC-1*) 및 *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*vanC-2*)에 multiplex PCR을 적용한 결과, 각각의 특이 증폭산물을 확인하였다 (Fig. 1). 즉, *vanA* 유전자형의 *E. faecium*은 536 bp와 732 bp 크기의 *ddl_{E.faecium}*과 *vanA* 유전자의 특이증폭산물을 확인하였으며 (Fig. 1, lane 2), *vanB* 유전자형의 *E. faecalis*는 635 bp와 941 bp 크기의 *vanB*와 *ddl_{E.faecalis}* 유전자의 특이증폭산물을 확인하였다 (Fig. 1, lane 3). *vanC-1* 유전자형인 *E. gallinarum*은 822 bp 크기의 특이증폭산물을 확인하였으며 (Fig. 1, lane 4), *vanC-2* 유전자형인 *E. casseliflavus*는 439 bp 크기의 특이증폭산물을 확인하였다 (Fig. 1, lane 5). 각각의 특이

증폭산물의 염기서열은 해당 유전자의 염기서열과 일치하였다.

확립된 multiplex PCR의 특이성 확인

Multiplex PCR을 VRE 표준균주, 동물분변에서 분리된 *E. hirae*, *E. durans*, *E. avium*, *Streptococcus equinus*, *S. uberis*, *Aerococcus* spp., *E. faecium* 및 *E. faecalis*에 적용한 결과, 사용한 primer가 *E. faecium*, *E. faecalis*, *vanA*, *vanB*, *vanC-1* 및 *vanC-2*에 특이적임을 확인하였다 (Fig. 2). 즉, *van* 유전자형 표준균주인 *E. faecium* B7641, *E. faecalis* V583, *E. gallinarum* GS 및 *E. casseliflavus* ATCC 25788은 각각 *vanA*, *ddl_{E,faecium} vanB*, *ddl_{E,faecalis} vanC-1* 및 *vanC-2*의 특이 증폭산물을 확인하였고 (Fig. 2, lane 2 to 5), VSE인 *E. faecium*과 *E. faecalis*에서는 각각 *ddl_{E,faecium}*와 *ddl_{E,faecalis}* 특이 증폭산물이 확인되었으나 (Fig. 2, lane 19, 20), *E. hirae*, *E. durans*, *E. avium*, *S. equinus*, *S. uberis* 및 *Aerococcus* spp.에서는 특이 증폭산물이 확인되지 않았다 (Fig. 2, lane 6 to 18).

Multiplex PCR을 *vanA*, *vanB*, *vanC-1* 및 *vanC-2*의 VRE 표준균주, *E. faecium*과 *E. faecalis* 분리균주, 주요 식중독 원인균인 *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica* 및 *Bacillus cereus*에 적용하여, primer의 특이성을 확인한 결과 (Fig. 3), *van* 유전자형 표준균주인 *E. faecium* B7641, *E. faecalis* V583, *E. gallinarum* GS 및 *E. casseliflavus* ATCC 25788은 각각 *vanA*, *ddl_{E,faecium} vanB*, *ddl_{E,faecalis} vanC-1* 및 *vanC-2*의 특이 증폭산물을 확인하였고 (Fig. 3, lane 2 to 5), VSE인 *E. faecium*과 *E. faecalis*에서는 각각 *ddl_{E,faecium}*와 *ddl_{E,faecalis}* 특이 증폭산물이 확인되었으나 (Fig. 3, lane 16, 17), *E. coli* O157:H7를 비롯한 주요 식중독 원인균에서는 특이 증폭산물이 확인되지 않아 primer의 특이성을 확인할 수 있었다 (Fig. 3, lane 6 to 15).

Multiplex PCR에 의한 장구균의 종 동정과 내성 유전자형 분석

Multiplex PCR을 이용하여 동물에서 분리한 장구균을 동정하고 내성 유전자형을 분석하였다. 소, 돼지, 닭 및 개 등에서 분리한 *E. faecium*의 경우, *E. faecium* 특이 증폭산물인 *ddl_{E,faecium}*을 확인하였으며 (Fig. 4), 닭에서 분리한 vancomycin 내성 *E. faecium*에서는 *vanA* 유전자도 동시에 검출할 수 있었다 (Fig. 4, lane 8). 소와 돼지에서 분리한 *E. faecalis*를 분석한 결과, *E. faecalis* 특이 증폭산물인 *ddl_{E,faecalis}*를 확인하였으며 (Fig. 5), 닭에서 분리

한 *E. gallinarum*을 분석한 결과, *vanC-1* 유전자의 특이 증폭산물을 확인하였다 (Fig. 6). 소, 돼지 및 염소에서 분리한 *E. casseliflavus*를 분석한 결과, *vanC-2* 유전자의 특이 증폭산물을 확인하였다 (Fig. 7).

Multiplex PCR을 이용한 동물과 사람 유래 VRE 내성 유전자 분석

Multiplex PCR을 이용하여 동물 및 사람 유래 VRE에 대한 내성 유전자를 확인하였다. 사람 유래 VRE ($n = 11$)는 모두 *E. faecium*이었으며, 8 균주는 *vanA* 유전자형이었고, 3 균주는 *vanB* 유전자형이었다 (Table 3). 닭 유래 VRE로 동정된 6주 중 1주는 *ddl_{E,faecium}*과 *vanA* 특이 증폭산물을 확인할 수 있었으며, 5주는 *vanA* 유전자만 확인되었다. *E. casseliflavus* 20주 중 2주를 제외하고는 *vanC-2* 유전자를 확인할 수 있었으며, *E. gallinarum*은 모두 *vanC-1* 유전자를 확인할 수 있었다 (Table 3).

고 찰

장구균의 주요 균종 동정과 *van* 유전자형 구별을 신속하게 하기 위하여 장구균 종 특이 유전자와 *van* 유전자의 primer로 *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* 및 *E. casseliflavus*의 동정과 *vanA*, *vanB*, *vanC-1* 및 *vanC-2*의 유전자 검출을 동시에 할 수 있는 multiplex PCR 기법을 개발하여 적용하였다.

본 실험의 primer 중 *vanB*의 forward primer와 *ddl_{E,faecium}*의 reverse primer는 Dutka-Malen 등¹⁴이 사용한 primer를 변형하였는데 (Table 2), 이를 *vanA* 유전자형 *E. faecium* B7641, *vanB* 유전자형 *E. faecalis* V583, *vanC-1* 유전자형 *E. gallinarum* GS 및 *vanC-2* 유전자형 *E. casseliflavus* ATCC 25788에 적용한 결과, 각각의 특이 증폭산물을 확인하였다. 반응조건 또한, Dutka-Malen 등¹⁴의 방법과 달랐는데, 본 연구에서는 'Hot start' 방법으로 실시하였고, 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA)를 첨가하였다. PCR mixture에 DMSO를 첨가하면, DNA의 염기 쌍을 파괴하는데 용이하여 denaturation 온도를 낮춰주고, template 길이를 길게 해줌으로써, primer의 annealing condition을 향상시켜주어 PCR 효율을 증가시킨다^{34,36}. 본 실험에서는 *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* 및 *E. casseliflavus*에 특이한 primer를 사용하였는데, *vanA* 유전자는 위의 4가지 균종이외에도 *E. avium*, *E. durans*, *E. mundtii* 및 *E. hirae* 등에 출현하며²⁷, *vanC-2*와 *vanC-3* 유전자는 *E. casseliflavus*, *E. flavesceus* 및 *E. mundtii* 등에 출현하기 때문에^{2,3,15,25}, 앞으로 이러한 균종의 동정과 vancomycin 내성관련 유전자형 분석을 위한 PCR이 개발

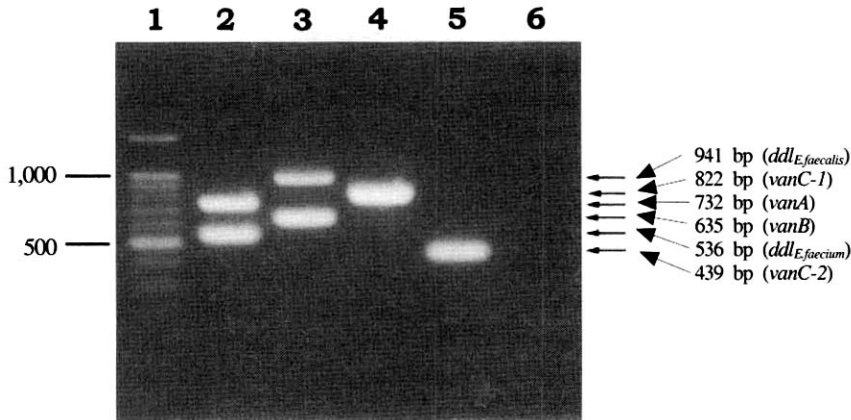


Fig. 1. Electrophoretic analysis of PCR-amplified DNA from vancomycin resistant enterococci. Lanes: 1, 100 bp DNA Ladder (Promega); 2, *E. faecium* B7641 (*vanA*); 3, *E. faecalis* V583 (*vanB*); 4, *E. gallinarum* GS (*vanC-1*); 5, *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*vanC-2*); 6, negative control; the size (in base pairs) of the PCR products are indicated on the right.

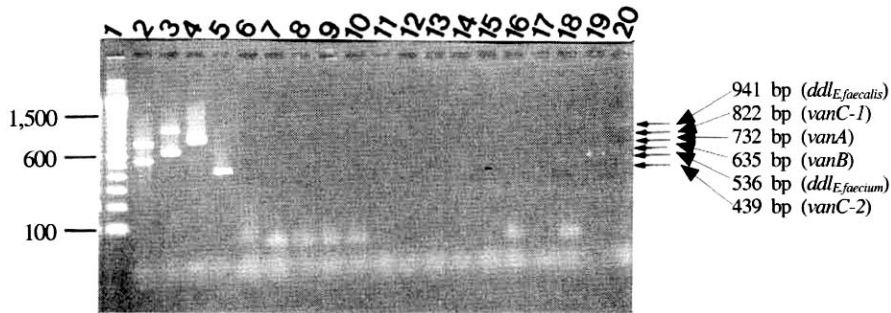


Fig. 2. Specificity of multiplex PCR in the detection of vancomycin-resistant and -susceptible enterococci. Lanes: 1, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 2, *E. faecium* B7641 (*vanA*); 3, *E. faecalis* (*vanB*); 4, *E. gallinarum* (*vanC-1*); 5, *E. casseliflavus* (*vanC-2*); 6 to 7, *E. hirae* cattle isolates; 8, *E. hirae* pig isolate; 9, *E. hirae* chicken isolate; 10, *E. hirae* goat isolate; 11, *E. hirae* dog isolate; 12 to 14, *E. durans* cattle isolates; 15, *E. avium* cattle isolate; 16, *Streptococcus equinus* cattle isolate; 17, *Streptococcus uberis* cattle isolate; 18, *Aerococcus* spp. cattle isolate; 19, *E. faecium* cattle isolate; 20, *E. faecalis* cattle isolate; the size (in base pairs) of the PCR products are indicated on the right.

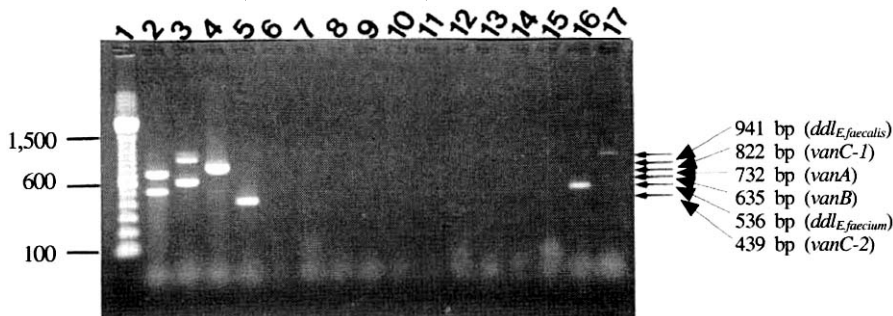


Fig. 3. Specificity of multiplex PCR in the detection of *Enterococcus* species-specific and *van* genes in vancomycin-resistant enterococci, vancomycin-susceptible enterococci, and principal food poisoning bacteria. Lanes: 1, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 2, *E. faecium* B7641 (*vanA*); 3, *E. faecalis* V583 (*vanB*); 4, *E. gallinarum* GS (*vanC-1*); 5, *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*vanC-2*); 6, *E. coli* O157:H7; 7, *Salmonella typhimurium*; 8, *Sal. enteritidis* ATCC 13076; 9, *Campylobacter jejuni* ATCC 33291; 10, *Listeria monocytogenes*; 11, *Staphylococcus aureus*; 12, *Clostridium perfringens*; 13, *Cl. botulinum*; 14, *Yersinia enterocolitica*; 15, *Bacillus cereus*; 16, *E. faecium* cattle isolate; 17, *E. faecalis* cattle isolate; the size (in base pairs) of the PCR products are indicated on the right.

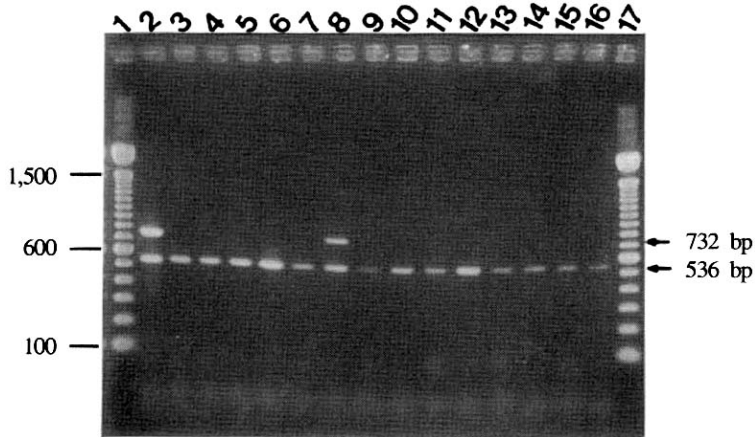


Fig. 4. Identification and genotype analysis of *E. faecium* by multiplex PCR. Lanes: 1 and 17, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 2, *E. faecium* B7641 (*vanA*); 3 to 4, *E. faecium* cattle isolates; 5 to 7, *E. faecium* pig isolates; 8 to 13, *E. faecium* chicken isolates; 14 to 16, *E. faecium* dog isolates. Chicken isolate (lane 8) was also confirmed *vanA* gene by multiplex PCR; the size (in base pairs) of the PCR products are indicated on the right.

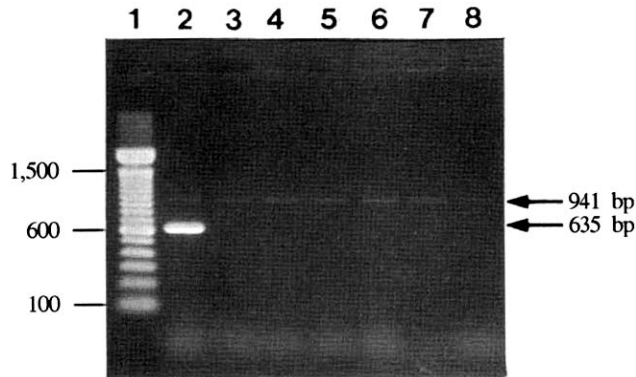


Fig. 5. Identification and genotype analysis of *E. faecalis* by multiplex PCR. Lanes: 1, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 2, *E. faecalis* V583 (*vanB*); 3 to 8, *E. faecalis* cattle isolates; the size (in base pairs) of the PCR products are indicated on the right.

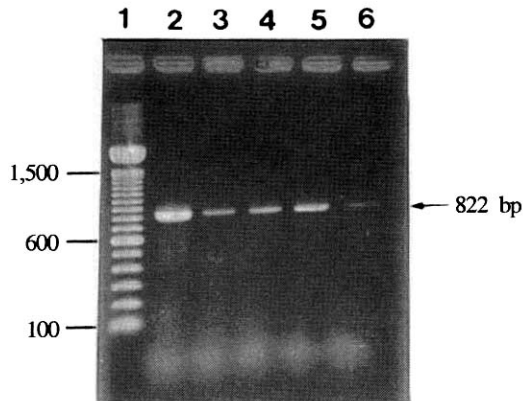


Fig. 6. Identification and genotype analysis of *E. gallinarum* by multiplex PCR. Lanes: 1, 100 bp DNA (Invitrogen); 2, *E. gallinarum* GS (*vanC-1*); 3 to 6, *E. gallinarum* chicken isolates; the size (in base pairs) of the PCR products are indicated on the right.

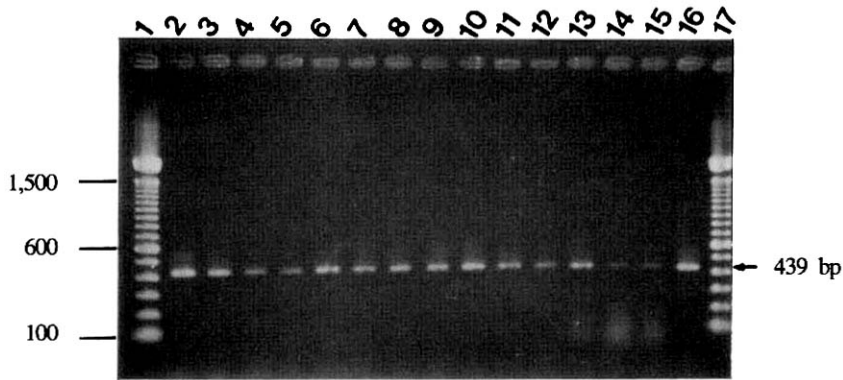


Fig. 7. Identification and genotype analysis of *E. casseliflavus* by multiplex PCR. Lanes: 1 and 17, 100 bp DNA (Invitrogen); 2, *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*vanC-2*); 3 to 8, *E. casseliflavus* cattle isolates; 9 to 15, *E. casseliflavus* pig isolates; 16, *E. casseliflavus* goat isolate; the size (in base pairs) of the PCR products are indicated on the right.

Table 3. Identification of *Enterococcus* spp. and vancomycin resistant genes from humans and animals by multiplex PCR

Organism	Origin (No. of isolates)	Source	Strain	Phenotype	PCR products
<i>E. faecium</i>	Humans (11)	blood	a	VanA	<i>ddl_{E. faecium}</i> <i>vanA</i>
		urine	b	VanA	<i>ddl_{E. faecium}</i> <i>vanA</i>
		urine	c	VanA	<i>ddl_{E. faecium}</i> <i>vanA</i>
		urine	d	VanA	<i>ddl_{E. faecium}</i> <i>vanA</i>
		urine	e	VanA	<i>ddl_{E. faecium}</i> <i>vanA</i>
		urine	f	VanA	<i>ddl_{E. faecium}</i> <i>vanA</i>
		urine	g	VanA	<i>ddl_{E. faecium}</i> <i>vanA</i>
		urine	h	VanA	<i>ddl_{E. faecium}</i> <i>vanA</i>
		urine	i	VanB	<i>ddl_{E. faecium}</i> <i>vanB</i>
		urine	j	VanB	<i>ddl_{E. faecium}</i> <i>vanB</i>
		urine	k	VanB	<i>ddl_{E. faecium}</i> <i>vanB</i>
<i>E. gallinarum</i>	Chickens (6)	cecum	1	VanA	<i>vanA</i>
		cecum	2	VanA	<i>vanA</i>
		cecum	3	VanA	<i>vanA</i>
		cecum	4	VanA	<i>vanA</i>
		cecum	5	VanA	<i>ddl_{E. faecium}</i> <i>vanA</i>
		cecum	6	VanA	<i>vanA</i>
<i>E. gallinarum</i>	Cattle (2)	feces	I	VanC1	<i>vanC-1</i>
		feces	II	VanC1	<i>vanC-1</i>
	Pigs (2)	feces	24	VanC1	<i>vanC-1</i>
		feces	PI	VanC1	<i>vanC-1</i>
	Chickens (4)	cecum	CH2	VanC1	<i>vanC-1</i>
		cecum	CH3	VanC1	<i>vanC-1</i>
		cecum	CH4	VanC1	<i>vanC-1</i>
		cecum	CH5	VanC1	<i>vanC-1</i>
	Dog (1)	feces	142-1	VanC1	<i>vanC-1</i>
Bear (1)	feces	149	VanC1	<i>vanC-1</i>	

(continued on next page)

Table 3. Identification of *Enterococcus* spp. and vancomycin resistant genes from humans and animals by multiplex PCR

Organism	Origin (No. of VRE)	Source	Strain	Phenotype	PCR products
<i>E. casseliflavus</i>	Cattle (11)	feces	14	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	101	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	104	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	105-2	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	100	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	109	VanC2	-
		feces	120	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	122	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	123	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	2	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	c1	VanC2	<i>vanC-2</i>
	Pigs (6)	feces	4-3-2	VanC2	-
		feces	pI	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	pII	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	pIII	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	pIV	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	pV	VanC2	<i>vanC-2</i>
	Dog (1)	feces	142-2	VanC2	<i>vanC-2</i>
	Goats (2)	feces	90	VanC2	<i>vanC-2</i>
		feces	27	VanC2	<i>vanC-2</i>

되어, 장구균을 동정하는데 있어 고전적인 미생물학적 방법 뿐 아니라, PCR을 이용한 유전자 분석방법도 병행하면, 신속하게 장구균 종 동정과 내성 유전자형 구별을 할 수 있을 것으로 사료된다^{37,38}. 또한, 새로운 vancomycin 내성 유전자인 *vanD*²⁴, *vanE*²⁶ 및 *vanB2*³⁹ 유전자에 대한 연구도 병행하여야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서 사용한 primer의 특이성은 장구균 선택배지인 Enterococcosel agar에서 자랄 수 있는 균주인 *Streptococcus equinus*, *S. uberis* 및 *Aerococcus* spp.와 주요 식중독 원인균인 *E. coli* O157:H7 등을 공시하여 확인하였다. 따라서, Enterococcosel agar로부터 분리된 균에 multiplex PCR을 적용하여 *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* 및 *E. casseliflavus*의 동정과 vancomycin 내성 유전자형을 확인할 수 있을 것으로 사료되며, 앞으로 분변과 식육에 직접 적용하는 방법을 개발하면, 가검물로부터 신속하고 간편하게 vancomycin 내성 장구균을 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 multiplex PCR을 동물과 사람 유래 장구균에 적용한 결과, *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* 및 *E. casseliflavus*의 동정과 van 유전자형을 동시에 구별할 수 있었다. Multiplex PCR을 사람 유래 VRE 11주

와 닭 유래 VRE 6주에 대해 실시한 결과, *ddl_{E,faecium}*, *vanA* 및 *vanB* 유전자의 증폭산물을 확인하였다. 한편, 닭 유래 VRE 5 균주에서는 *ddl_{E,faecium}* 유전자가 증폭되지 않았는데, 이는 *vanA* 유전자를 가지고 있는 *E. avium*, *E. durans*, *E. mundtii* 및 *E. hirae* 등의 균주인 것으로 사료된다. *E. casseliflavus* ($n = 20$) 중 18주에서는 *vanC-2* 유전자를 확인할 수 있었으나, 소 유래 1주와 돼지 유래 1주에서는 특이증폭산물이 없었다. 이들 2 균주는 생화학시험과 Vitek을 통해 *E. casseliflavus*로 동정되었으나, *E. casseliflavus*가 아닌 다른 장구균일 것으로 사료된다. 따라서, 장구균의 정확한 동정을 위해서는 multiplex PCR을 이용한 특이유전자 검출을 병행해야 할 것으로 사료된다. 또한, 앞으로 새로운 내성유전자형인 *vanB2*³⁹, *vanD*⁴⁰⁻⁴² 및 *vanE*^{1,26}의 유전자형을 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR이 개발된다면, 새로운 van 유전자형을 신속 정확하게 분석할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 과제는 농림부 국립수의과학검역원의 연구비 (P-AD13-2000-03-07)에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- van Caesele P, Giercke S, Wylie J, et al. Identification of the first vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* harbouring *vanE* in Canada. *Can Commun Dis Rep*, 27:101~104, 2001.
- Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, et al. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 36:2005~2008, 1992.
- Navarro F, Courvalin P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother*, 38:1788~1793, 1994.
- Toye B, Shymanski J, Bobrowska M, et al. Clinical and epidemiologic significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the *vanC* genotype). *J Clin Microbiol*, 35:3166~3170, 1997.
- Bell JM, Paton JC, Turmidge J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J Clin Microbiol*, 36:2187~2190, 1998.
- Liassine N, Frei R, Jan I, et al. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from a Swiss hospital. *J Clin Microbiol*, 36:1853~1858, 1998.
- Courvalin P. Genotypic approach to the study of bacterial resistance to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 35:1019~1023, 1991.
- Frankel G, Giron JA, Valmossio J, et al. Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. *Mol Microbiol*, 31:1729~1734, 1989.
- Oyofe BA, Thornton SA, Burr DH, et al. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30:2613~2619, 1992.
- Eyers M, Chapelle S, Van Camp G, et al. Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S gene fragments. *J Clin Microbiol*, 31:3340~3343, 1993.
- Predari SC, Ligozzi M, Fontana R. Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by polymerase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother*, 35:2568~2573, 1991.
- Reed RP, Sinickas VG, Lewis C, et al. A comparison of polymerase chain reaction and phenotyping for rapid speciation of enterococci and detection of vancomycin resistance. *Pathology*, 31:127~132, 1999.
- Patel R, Uhl JR, Kohner P, et al. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. *J Clin Microbiol*, 35:703~707, 1997.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*, 33:24~27, 1995 (Erratum, 33:1434).
- Satake S, Clark N, Rimland D, et al. Detection of vancomycin resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol*, 35:2325~2330, 1997.
- Petrich AK, Luinstra KE, Groves D, et al. Direct detection of *vanA* and *vanB* genes in clinical specimens for rapid identification of vancomycin resistant enterococci (VRE) using multiplex PCR. *Mol Cell Prob*, 13:275~281, 1999.
- Kariyama R, Mitsuhashi R, Chow JW, et al. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, 38:3092~3095, 2000.
- van de Klundert JAM, Vliegthart JS. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, et al, eds *Diagnostic molecular microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.:547~552, 1993.
- Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, et al. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, 37:2311~2317, 1993.
- 홍원표, 김민, 송정원 등. Vancomycin 내성 *Enterococcus faecium*에 대한 plasmid DNA 및 random amplified polymorphic DNA 분석. *대한임상병리학회지*, 18:379~385, 1998.
- Seo KS, Song DJ, Gwyther MM, et al. Development of multiplex PCR for detection of vancomycin resistant enterococci (VRE) and epidemiological application in Korea. *Korean J Vet Res*, 39:343~352, 1999.
- Klare I, Heier H, Claus H, et al. *vanA*-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiol Lett*, 125:165~172, 1995.
- Fraimow H, Jungking D, Lander D, et al. Urinary tract

- infection with an *Enterococcus faecalis* isolate that requires vancomycin for growth. *Ann Intern Med*, 121:22~26, 1994.
24. Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother*, 41:2016~2018, 1997.
 25. Clark N, Teixeira L, Facklam R, et al. Detection and differentiation of *vanC1*, *vanC2* and *vanC3* glycopeptide resistance genes in enterococci. *J Clin Microbiol*, 36:2294~2297, 1998.
 26. Fines M, Perichon B, Reynolds P, et al. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:2161~2164, 1999.
 27. Lemcke R, Bulte M. Occurrence of the vancomycin-resistant genes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* and *vanC3* in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. *Int J Food Microbiol*, 60:185~194, 2000.
 28. Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE, et al. In vivo development of teicoplanin resistance in a VanB *Enterococcus faecium* isolate. *J Infect Dis*, 167:1224~1227, 1993.
 29. Sahn DF, Free L, Handwerker S. Inducible and constitutive expression of *vanC-1*-encoded resistance to vancomycin in *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39:1480~1484, 1995.
 30. Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, et al. The VANA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes. *Mol Gen Genet*, 224:364~372, 1990.
 31. Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, et al. 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, 1992.
 32. Evers S, Sahn DF, Courvalin P. The *vanB* gene of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583 is structurally related to genes encoding D-Ala:D-Ala ligases and glycopeptide-resistance proteins VanA and VanC. *Gene*, 124:143~144, 1993.
 33. Evers S, Reynolds PE, Courvalin P. Sequence of the *vanB* and *ddl* genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene*, 140:97~102, 1994.
 34. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, et al. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci*, 91:5695~5699, 1994.
 35. Varadaraj K, Skinner DM. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G+C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene*, 140:1~5, 1994.
 36. Baskaran N, Kandpal RP, Bhargava AV, et al. Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome Methods*, 6:633~638, 1996.
 37. Sahn DF, Free L, Smith C, et al. Rapid characterization schemes for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, 35:2026~2030, 1997.
 38. Grosso MD, Caprioli A, Chinzari P, et al. Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy. *Microb Drug Resist*, 6:313~318, 2000.
 39. Dahl KH, Lundblad EW, Rokenes TP, et al. Genetic lineage of the *vanB2* gene cluster to Tr5382 in vancomycin-resistant enterococci and characterization of two novel insertion sequences. *Microbiol*, 146:1469~1479, 2000.
 40. Casadewall B, Courvalin P. Characterization of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J Bacteriol*, 181:3644~3648, 1999.
 41. Ostrowsky BE, Clark NC, Thauvin-Eliopoulos C, et al. A cluster of *vanD* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: Molecular characterization and clinical epidemiology. *J Infect Dis*, 180:1177~1185, 1999.
 42. Boyd DA, Conly J, Dedier H, et al. Molecular characterization of the *vanD* gene cluster and a novel insertion element in a vancomycin-resistant *Enterococcus* isolated in Canada. *J Clin Microb*, 38:2392~2394, 2000.