ORIGINAL ARTICLE

Korean J Clin Lab Sci. 2013, 45(1):16-20
ISSN 1738-3544

KJCLS
KOREAN JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY SCIENCE

Rapid Detection of Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in Clinical Samples from University Hospital

Byoung-Seon Yang[1], Jung-Yeon Park[1], and Seung-Gu Choi[2]

[1]Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea
[2]Department of Clinical Laboratory Science, Shinheung College, Uijeongbu 480-701, Korea

Outbreaks of vancomycin-resistant enterococci (VRE) are being reported more frequently in many countries. While seven glycopeptide resistance genotypes have been described in Enterococci, *vanA* and *vanB* are the most common resistance genotypes. The aim of this study was to detect antibiotic susceptibilities of 23 *Enterococcus faecium* strains, which caused an outbreak in a University hospital by a disk diffusion test to investigate the presence of the species specific gene, and the resistant genotypes, *vanA* and *vanB* by duplex PCR. PCR for *vanA* and *vanB* was performed on 23 enterococci. Twenty three were identified as *E. faecium* and were tested positive for the *vanA* genotype. This study will report on the validation of a simple and accurate VRE detection method that can be easily incorporated into the daily routine of a clinical laboratory. Early detection of VRE strains, including those with susceptibility to vancomycin, is of paramount clinical importance as it allows rapid initiation of strict infection control practices, as well as the therapeutic guidance for confirmed infections. The PCR method developed in the present study is simple and reliable for the rapid characterization of VRE.

Keywords: Vancomycin-resistant enterococci (VRE), *vanA*, *vanB*

Corresponding author: Byoung Seon Yang
Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea.
Tel: 82-55-740-1851
E-mail: ybseon@hanmail.net

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2013 Korean Society of Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: January 27, 2013
Revised: February 7, 2013
Accepted: March 13, 2013

서 론

Enterococci는 건강한 성인의 경우 대장에 상주하는 정상 상재균이다(Elsner 등, 2000). 현재 심내막염, 균혈증, 비뇨기계감염과 신생아 패혈증 등의 환자에 있어서 병원내 감염으로 증가 추세에 있다(Dutka-Malen 등, 1995). *Enterococcus faecalis*와 *E. faecium*은 임상에서 가장 많이 분리되는 종이며, *E. avium, E. durans, E. casseliflavus, E. gallinarum*과 *E. flavescens* 균주는 5%이하로 드물게 분리된다(Papaparaskevas 등, 2002). 1980년대 이후 vancomycin-resistant enterococci (VRE)는 원내감염을 일으키는 중요한 세균그룹으로 알려졌다. 병원에서 얻은 균혈증의 대부분을 차지한다(Cheng 등, 1997). VRE는 다양한 항생제에 저항성을 나타내고, 5종의 내성유전자는 *vanA, vanB, vanD, vanE* 그리고 *vanG*로 획득유전자이다. *VanC1, vanC2/C3* 2종의 유전자는 내인성 유전자이다. *VanA*와 *vanB* 유전자를 가진 VRE가 임상에서 가장 많이 분리된다(Perez-Hernamdez 등, 2002). VRE유전자는 접합성 plasmid나 transposon에 위치한다(Radu 등, 2001). *vanA* 유전자를 가진 Enterococci는 vancomycin과 teicoplanin의 고농도에 저항성을 보이고 *vanB*의 경우는 vancomycin만 내성을 보인다. *vanC*의 경우는 vancomycin의 저농도에 내성을 보인다(Bell 등, 1998).

VRE 전파는 균주 자체가 이동하는 수직 전이와 내성 유전자만이 전파되는 수평 전이 기전에 의하며, VRE 전파를 방지하기 위하여 대부분의 대학병원에서는 centers for disease control and prevention (CDC)의 hospital infection control practices advisory committee (HICPAC)기준에 따르고 있다. VRE 집락이 형성된 환자는 신속히 격리하고 적어도 1주 이상의 간격으로 시행한 감시배양에서 연속적으로 3회 음성인 경우 격리를 해지한다. VRE의 정확한 신속검출은 병원 내 감염전파의 추적과 관리를 위해서 필요하고, 또한 VRE가 분리되는 환자에 있어서 장내 집락화의 유무를 신속하게 검출하여 사람 간의 전파를 방지해야 한다(Devriese 등, 1993). VRE을 관리하기 위해서 신속하고 정확한 검

출이 필요하다. 배양에 기초한 표현형에 의한 VRE 검출은 시간이 많이 소요되고, 저농도 glycopeptide 내성세균 검출이 어렵다(Elsner 등, 2000). PCR방법은 임상 분리균주의 검출 및 항생제내성유전자 분석에 특이적이고, 시간적인 소모가 적고 분석력과 재현성이 좋은 방법이다(Monstein 등, 1998). 본 연구에서는 대학병원으로부터 VRE균주를 분리하여 종특이유전자 및 *vanA*, *vanB*유전자를 대상으로 duplex PCR 방법을 실시하여 표현형과 유전자형을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 재료

2012년 9월부터 11월까지 대전 C 대학병원에서 VITEK (bioMerieux, Inc. Haxelwood, MO, USA)기기로 vancomycin-resistance Enterococci 세균으로 동정된 23균주를 대상으로 하였다.

분리균주 동정 및 항생제 감수성 검사 정도관리 균주로 *Enterococcus faecium* ATCC 19434, *Enterococcus casseliflavus* ATCC 700327 균주를 사용하였다.

2. *Enterococcus*종 동정

세균 부유액을 혈액한천배지에 접종한 후 30°C 배양기에서 18~24시간 배양 후 집락 및 용혈유무를 관찰하였다. 순수분리집락을 도말하여 그람염색을 실시하였다. 생화학적 시험으로 catalase test, bile esculin test, 6.5% NaCl배지에서 성장유무를 관찰하였다.

3. 항생제감수성 시험

세균 부유액을 Mueller-Hinton Agar (MHA)에 고르게 접종한 후, 배지의 중앙에는 vancomycin (30 μg)디스크와 teicoplanin (30 μg) 있는 디스크를 20 mm 간격으로 놓았다. 접종 배지는 37°C 항온기에 18시간 배양 후 결과를 판정하였고 minimal inhibitory concentration (MIC)는 MH액체배지에 vancomycin항생제는 400 μg/mL, 350 μg/mL, 300 μg/mL, 250 μg/mL, 200 μg/mL로 희석, teicoplanin항생제는 128 μg/mL, 64 μg/mL, 32 μg/mL, 16 μg/mL, 8 μg/mL희석하여 균주 접종 후 배양하여 판독하였다.

4. 균주로부터의 DNA 분리

23개의 VRE 균주를 가온법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 순수 분리된 23개 균주를 90°C에서 10분 방치 후 진탕하였다. 그리고 13,000 rpm에서 5분간 원심 후 상층액을 얻었다.

5. Duplex PCR을 위한 primer의 합성

*Enterococcus*종 동정 및 VRE 유전자를 분석하기 위한 primer를 아래과 같이 제작하였다(Table 1).

6. Duplex PCR을 이용한 *Enterococcus*종 및 *van*유전자의 증폭

Duplex PCR을 위한 PCR 혼합액 dNTP (각기 2.5 mM), 10× PCR buffer 2 μL, primer 2쌍 10 pmol 각각 1 μL씩 넣었고, genomic DNA (25 μg) 1 μL, *Taq* DNA polymerase (2 unit) 1 μL, 최종 반응액은 증류수로 20 μL 되게끔 실시하였다. DNA thermal cycler (Perkin Elmer, Inc. Wellesley, MA, USA)에서 *Enterococcus*종 동정은 94°C에서 2분간 변성, 58°C에서 1분간 접합, 68°C에서 1분간 확장의 순서로 30회를 시행하고 68°C에서 7분간 최종확장하였다. *Van* 유전자 검출은 95°C에서 1분간 변성, 64°C에서 2분간 접합, 72°C에서 1분 30초간 확장의 순서로 35회를 시행하고 72°C에서 7분간 최종확장하였다.

Table 1. PCR primers used in this study

Primer	Sequence	Product length (bp)
Enterococcus spp. (*ddl* gene)		
Ent1-F	GCA AGG CTT CTT AGA GA	587
Ent2-R	CAT CGT GTA AGC TAA CTT C	
Van gene		
Van AB-F	GTA GGC TGC GAT ATT CAA AGC	
Van A-R	CGA TTC AAT TGC GTA GTC CAA	231
Van B-R	GCC GAC AAT CAA ATC ATC CTC	330

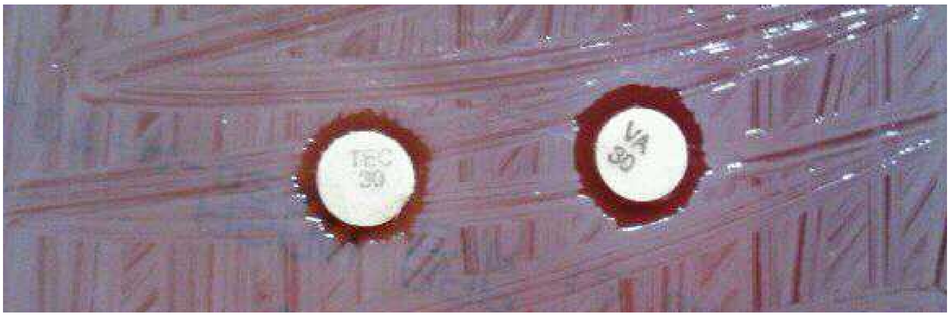

Fig. 1. Glycopeptide susceptibility of VRE as tested by disk diffusion test. VA, vancomycin (30 μg/mL); TEC, teicoplanin (30 μg/mL).

7. PCR 산물의 확인

PCR 증폭산물을 1.5% agarose gel에 midori green (2 μL)을 넣어 1× TAE buffer에서 70 volt, 100 mA로 45분 동안 전기영동을 실시한 다음, agarose gel을 UV transilluminator로 관찰하고, Gel Doc (Bio-Red, Inc. Hercules, CA, USA) 이미지 분석장치로 사진 촬영하였다.

결 과

1. *Enterococcus*종 동정

혈액한천배지에서 다양한 용혈양상을 보이고, 그람염색결과 그람양성 쌍알균, 사슬알균형태로 나타났다. 생화학적 시험결과 catalase음성, bile esculin양성, 6.5%NaCl에서 성장하였다.

2. 항생제감수성 시험

디스크감수성 시험에서는 vancomycin 디스크에서는 1~23균

Table 2. Distribution of 23 strains of vancomycin-resistant Enterococci from university hospital isolates, susceptibility profile and genotype

Strains	Phenotype				Genotype	
	DDT		MIC			
	Van	Tec	Van	Tec	*VanA*	*VanB*
Enterococcus faecium 1	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 2	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 3	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 4	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 5	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 6	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 7	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 8	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 9	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 10	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 11	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 12	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 13	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 14	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 15	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	-	-
Enterococcus faecium 16	R	R	250 μg/mL	32 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 17	R	R	320 μg/mL	64 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 18	R	R	320 μg/mL	64 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 19	R	R	320 μg/mL	64 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 20	R	R	320 μg/mL	64 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 21	R	R	320 μg/mL	64 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 22	R	R	320 μg/mL	64 μg/mL	+	-
Enterococcus faecium 23	R	R	320 μg/mL	64 μg/mL	+	-

DDT, disk diffusion test; MIC, minimum inhibition concentration; Van, vancomycin; Tec, teicoplanin; R, resistance.

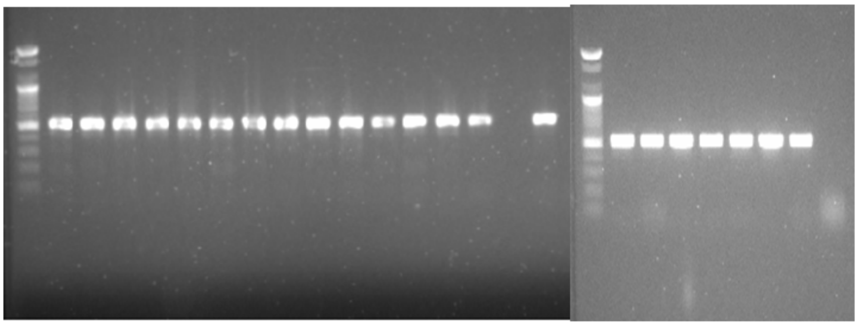

Fig. 2. Electrophoresis of the amplified products of *Enterococcus* spp. By a duplex PCR in a 1.5% agarose gel. Lane M, 100 bp DNA ladder; lanes 1 to 14 and 16 to 23, *E. faecium*; lane N, negative control.

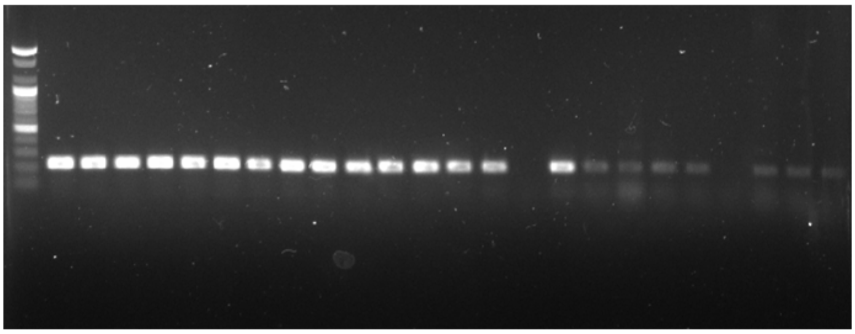

Fig. 3. Electrophoresis of the amplified products of *VanA* (231 bp), *VanB* (330 bp) genes. By a duplex PCR in a 1.5% agarose gel. Lane M, 100 bp DNA ladder; lanes 1 to 14 and 16 to 23, *VanA*; lane N, negative control.

주(100%)가 내성으로 나타났으며, 또한 teicoplanin 디스크에 모든 균주가 내성으로 나타났다(Fig. 1).

MIC 결과 vancomycin항생제의 경우 1~16균주가 250 μg/mL, 17~23균주가 320 μg/mL에서 억제가 되었으며 teichoplanin항생제의 경우 1~16균주가 32 μg/mL, 17~23균주가 64 μg/mL에서 억제가 되었다(Table 2).

3. *Enterococcus*종 동정 및 VRE유전형

Duplex PCR에서 22균주(95%)가 *E. faecium*으로 동정되었으며, 15번 균주는 검출되지 않았다(Fig. 2). *VanA* 생성 *Enterococcus* 균주는 22균주(95%)가 양성으로 나타났으며 15번 균주가 음성으로 나타났으며, *VanB*생성 *Enterococcus*균주는 검출되지 않았다(Fig. 3).

고 찰

Enterococci는 사람 뿐만 아니라 동물, 식품으로부터 분리된다. 항생제 내성인 vancomycin-resistant enterococci (VRE)균주가 증가 추세에 있다. VRE균주는 병원내 감염을 일으키고 중환자실이나 혈액종양병동 등에서 토착화되어 가고 있는 실정이다. VRE균주의 유행과 전파를 막기 위한 감염관리지침이 있으나 모든 병원에서 적용하기가 어려운 실정이고 다각적 감염관리를 시행하여도 근절하기 힘든 병원감염의 주요 다제내성균이다(Facklam 등, 1989).

기존배양법을 이용한 경우 검출까지의 시간이 최소한 2~3일 걸리므로 검사소요시간을 줄이기 위해서 대변이나 직장도말 검체에서 직접 DNA를 추출하여 *Enterococcus*종 동정 및 VRE내성유전자를 검출하는 방법들에 관한 보고가 있으나 검체에서 직접 DNA을 추출하는 경우 검체에 포함된 억제 물질로 인해 중합효소연쇄반응을 저해하는 경우가 있다. 전통적인 방법으로 *Enterococcus*종 동정하는 경우 Lancefield group D 항원검사, 6.5% NaCl성장유무, pyrolidonydonylarylamidase시험, leucinearylamidase test와 bile esculin test를 사용하여 *Enterococcus*를 동정한다. 순수분리 배양해서 종 동정까지 24시간에서 48시간 걸린다. 자동화동정시스템을 사용하더라도 배양에서 종 동정까지 24시간 이상 걸린다. 종 동정이 되면 항생제 감수성검사를 실시하는데 vancomycin내성 유전자는 *Enterococcus*종 사이에 전이가 가능하다. 또한 VRE검출이 지연되면 VRE균주가 집락화되어 병원감염의 문제가 된다. 현재 DNA를 기초한 직접검출방법을 많이 사용하고 있다. *E. faecalis*-specific과 *E. faecium*-specific PCR검출방법은 다양한 유전자를 표적으로 한다. *ddl*(D-alanine-D-alanine ligase coding) 유전자는 *E. faecalis*와 *E. faecium*종을 특이적으로 검출하고 *PBP5* (penicillin binding protein coding) 유전자는 *E. faecalis*종을 특이적으로 검출한다. *vanC* 유전자는 *E. gallinarum, E. casseliflavus*와 *E. flavescens*을 검출한다(Duka-Malen 등, 1995). 본 실험에서 표현형적 방법으로 분리된 VRE 23균주를 디스크감수성 시험과 MIC 로 확인 결과 모든 균주가 내성으로 나타났다. Duplex PCR에서 22균주(95%)가 *E. faecium*으로 동정되었으며, *E. faecium* 15균주는 검출되지 않았다. *VanA* 생성 *Enterococcus*균주는 22균주(95%)가 양성으로 나타났으며 *E. faecium* 15균주가 음성으로 나타났으며, *VanB* 생성 *Enterococcus*균주는 검출되지 않았다. *VanA* 생성 *E. faecium*에 의한 병원내 집단 발병시 직장도말 검체를 액체배지에서 증균시킨 후 *vanA*에 특이한 PCR로 확인 하는 방법은 24~30시간 내에 95%의 민감도와 100%의 특이도를 보여 평균 4~5일이 걸리는 배양법의 민감도 및 특이도와 비교할 때 우수하다고 하였다(Roger 등, 1999). 또한 Kim 등(2007)도 내부 대조물질을 사용하여 위음성을 확인하고, 선택 액체배지를 이용한 신속 PCR을 시행하는 것이 VRE 보균 여부를 감시하는데 빠르고 민감한 방법이라고 하였지만 *vanA* 이외에 다른 유전자형을 검출하려면 다중PCR을 시행해야 하며 민감도가 떨어질 가능성이 있다고 하였다. 본 실험에서 *E. faecium* 15균주의 내성유전자형이 검출되지 않은 것은 유전자의 변이가 있을 것으로 예상된다.

대부분의 *Enterococcus* 균주에서는 *vanA* 유전자를 포함하고 있는 것으로 나타났으며 이 방법은 *vanA, vanB* 유전자의 검출과 이 유전자의 monitoring에 중요한 역할을 할 것이라 생각된다. 따

라서 분자 생물학적 기법인 duplex PCR을 이용한 VRE의 검출은 표현형적 방법에서의 문제점의 해결이나, 원내감염의 역학에 아주 유용한 방법이라 사료된다.

참고문헌

Bell JM, Paton JC, Turnidge J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J Clin Microbiol.* 1998, 36:2187-2190.

Cheng S, McCleskey FK, Lin M, Gress HJ, Petroziello JM, Lin R, *et al.* A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 1997, 35:1248-1250.

Devriese LA, Pot B, Collins MD. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Bacteriol.* 1993, 75: 399-408.

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.* 1995, 33: 24-27.

Elsner HA, Sobottka I, Feucht HH, Harps E, Haun C, Mack D, *et al.* Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* at a German university pediatric hospital. *Int J Hyg Envir Heal.* 2000, 203:147-152.

Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus species* isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Ind Microbiol.* 1989, 27:731-734.

Kim S. Sung H, Jeon HS, Park SJ, Park SH, Kim MN. Evaluation of a rapid enrichment-PCR method for the detection of *vanA* vancomycin-resistant enterococci in fecal specimens. *Korean J Clin Microbiol.* 2007, 10:44-8.

Monstein HJ, Quednau M, Samuelsson A, Ahrne S, Isaksson B, Jonasson J. Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. *Microbiology.* 1998, 144:1171-1179.

Papaparaskevas J, Tassios PT, Kalapothaki V, Avlami A, Legakis NJ, Vatopoulos AC. Epidemiology of multiresistant *Enterococcus avium* isolates in a Greek tertiary care hospital. *Int J Antimicrob Agents.* 2002, 20:432-437.

Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S, Claverie-Mertin F. A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002, 42:273-277.

Radu S, Toosa H, Rahim RA, Reezal A, Ahmad M, Hamid AN, *et al.* Occurrence of the *vanA* and *vanC2/C3* genes in *Enterococcus* species isolated from poultry sources in Malaysia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001, 39:145-153.

Roger M, Faucher MC, Forest P, St-Antoine P, Couttlee F. Evaluation of *vanA*-specific PCR assay for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during a hospital outbreak. *J Clin Micorbiol.* 1999, 37:3348-3349.