ORIGINAL ARTICLE
Korean J Clin Lab Sci. 2014, 46(2):64-67
http://dx.doi.org/10.15324/kjcls.2014.46.2.64
pISSN 1738-3544 eISSN 2288-1662

KJCLS

Rapid Detection of Vancomycin-resistance Enterococci by SYBR Green Real-time PCR

Byoung-Seon Yang

Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea

Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) are a leading cause of a nosocomial infection. While seven glycopeptide resistance genotypes have been found in Enterococci, *vanA* and *vanB* are the most common resistance genotypes. Aims of this study were to detect antibiotic susceptibilities of 23 *Enterococcus* spp, which broke out in a university hospital by the disk diffusion test, to investigate specific genes of *vanA* and *vanB* by conventional and real-time PCR. PCR for *vanA* and *vanB* was performed on 23 Enterococci, all 23 were positive for *vanA* type. This study reports the validation of a simple and rapid 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 a rapid initiation of strict infection control practices as well as a therapeutic guidance for a confirmed infection. The real-time PCR method is a rapid technique to detect *vanA* in Enterococci. It is simple and reliable for the rapid characterization of VRE.

Keywords: Enterococci, *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 © 2014 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: May 29, 2014
Revised: June 16, 2014
Accepted: June 16, 2014

서 론

Enterococci는 건강한 성인의 경우 대장에 상주하는 정상 상재균이다(Elsner 등, 2000). vancomycin-resistant enterococci (VRE)은 1987년 유럽에서 처음으로 보고된 이래 세계적으로 심내막염, 균혈증, 비뇨기계감염과 신생아 폐혈증등의 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). VRE는 국내에서는 1992년 처음으로 보고 되었고 원내감염을 일으키는 중요한 세균그룹으로 알려졌다(Cheng 등, 1997). VRE 집락이 형성된 환자는 신속히 격리하고 적어도 1주 이상의 간격으로 시행한 감시배양에서 연속적으로 3회 음성인 경우 격리를 해지한다. VRE의 정확하고 신속한 검출은 병원 내 감염전파의 추적과 관리를 위해서 필요하다. 또한 VRE가 분리되는 환자에 있어서 장내 집락화의 유무를 신속하게 검출하여 사람간의 전파 방지를 해야 한다(Devriese 등, 1993). Vancomycin내성 유전자는 *Enterococcus* 종사이에 전이가 가능하고, VRE검출이 지연되면 균주가 집락화 되어 병원감염의 문제가 된다. 전통적인 항생제 감수성 검사법 의한 VRE검출은 1일에서 5일정도 소요되며 *van*유전형 구별이 안되고 저농도 glycopeptide내성세균 검출이 어렵다(Elsner 등, 2000). 현재 VRE균주를 분자유전학적 방법으로 직접 검출하는 방법이 많이 사용하고 있다. PCR방법은 임상에서 분리한 균주의 검출 및 항생제내성유전자 분석에 특이적이고, 시간적인 소모가 적고 분석력과 재현성이 좋은 방법이다(Monstein 등, 1998). SYBR Green real-time PCR방법 melting curve 분석은 1997년 처음으로 소개 되었고 두가닥의 핵산이 한가닥으로 분리되는 현상을 말한다. 두가닥의 DNA에 비특이적으로 결합하는 형광색소인 SYBR Green을 사용하여 융해과정이 실시간으로 측정된다. 반응산물의 염기서열, 크기 및 GC비율에 따라 특징적인 melting curve을 보여 전기영동 하지 않고 반응산물을 확인할 수 있다(Tripathi 등, 2013). 본 연구에서는 대학병원으로부터 VRE균주를 분리하여 항생제감수성 검사를 실시하고 일반PCR 및 real-time PCR 방법

을 실시하여 신속검출의 유용성을 평가 하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

대학병원에서 VITEK II (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 균주를 사용하였다.

2. 방법

1) *Enterococcus*종 동정

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

2) 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 판정하였다.

3) 균주로 부터의 DNA 분리

23개의 VRE 균주를 가온법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 순수 분리된 23개 균주를 90°C에서 10분방치 후 진탕 하였다. 그리고 13,000 rpm서 5분간 원심 후 상층액을 얻었다.

4) PCR을 위한 Primer의 합성

Glycopeptide내성유전자(*vanA, vanB*)검출부위로 하는 primer을 제작하였고 각 primer의 염기서열, 반응산물을 크는 Table 1과 같다.

Table 1. PCR primers used in this study

Primer	Sequence	Product length (bp)
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

5) PCR

PCR을 위한 PCR 혼합액 dNTP (2.5 mM), 10× PCR buffer 2 μL, primer 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 *Van* 유전자 검출은 95°C에서 1분간 변성, 64°C에서 2분간 접합, 72°C에서 1분 30초간 확장의 순서로 35회를 시행하고 72°C에서 7분간 최종확장 하였다. 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.

6) Real-time PCR

iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 사용하여 real-time PCR을 실시하였다. 10 μL의 iQ SYBR Green Supermix, 2 μL의 primer혼합액, 1 μL의 DNA, 7 μL의 멸균증류수 넣어 반응액 20 μL를 제조하여 real-time PCR을 실시하였다. Real-time PCR은 CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하였다. 95°C에서 3분 반응 후 95°C에서 10초, 60°C에서 10초, 72°C에서 20초에서 반응을 40회 반복하였다. 마지막에서 PCR반응이 끝난 후 65°C에서 95°C까지 초당 0.5의 속도로 온도를 증가시키면서 융해곡선을 분석하였다.

결 과

1. *Enterococcus* 종 동정

혈액한천배지에서 다양한 용혈양상을 보이고, 그람염색결과 그람양성 쌍알균, 사슬알균형태로 나타났다. 생화학적 시험결과 catalase음성, bile esculin양성, 6.5% NaCl에서 성장하였고 arabinose을 분해하여 *E. faecium*으로 동정하였다.

2. 항생제감수성 시험

디스크감수성 시험에서는 vancomycin 디스크에서는 1~23균주(100%)가 내성으로 나타났으며, 또한 teicoplanin 디스크에 모든 균주가 내성으로 나타났다(Table 2).

3. PCR 및 real-time PCR

일반 PCR에서 *vanA* 생성 *Enterococcus*균주는 23균주(100%)

Table 2. Distribution of 23 strains of VRE from university hospital isolates, susceptibility profile and genotype

Strains	Disk diffusion		PCR	
	Van	Tec	*VanA*	*VanB*
CHN1	R	R	+	−
CHN2	R	R	+	−
CHN3	R	R	+	−
CHN4	R	R	+	−
CHN5	R	R	+	−
CHN6	R	R	+	−
CHN7	R	R	+	−
CHN8	R	R	+	−
CHN9	R	R	+	−
CHN10	R	R	+	−
CHN11	R	R	+	−
CHN12	R	R	+	−
CHN13	R	R	+	−
CHN14	R	R	+	−
CHN15	R	R	+	−
CHN16	R	R	+	−
CHN17	R	R	+	−
CHN18	R	R	+	−
CHN19	R	R	+	−
CHN20	R	R	+	−
CHN21	R	R	+	−
CHN22	R	R	+	−
CHN23	R	R	+	−

Van, vancomycin; Tec, teicoplanin; R, resistance.

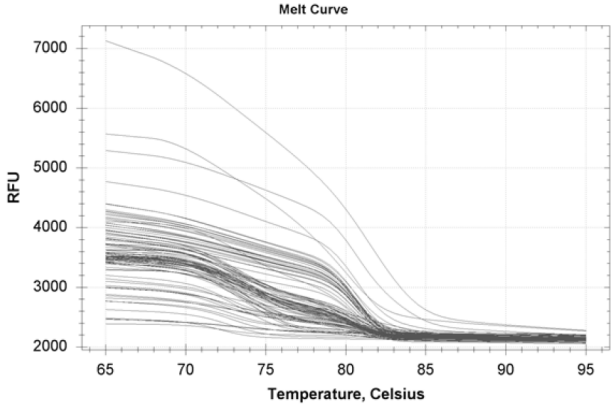

Fig. 1. Amplification melting curves for VRE in *vanA* real-time PCR.

가 양성으로 나타났으며, *vanB* 생성 *Enterococcus*균주는 검출되지 않았다. Real-Time PCR 분석 결과 23균주가 양성(melt peak 80.50°C)으로 나타나 일반 PCR결과와 일치하였다(Table 2, Fig. 1).

고 찰

Enterococci는 사람뿐만 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). VRE는 다양한 항생제에 저항성을 나타내고, 5종의 내성유전자는 *vanA, vanB, vanD, vanE* 그리고 *vanG*로 획득유전자이다. *vanC1, vanC2/C3* 2종의 유전자는 내인성유전자이다. *vanA*와 *vanB* 유전자을 가진 VRE가 임상에서 가장 많이 분리된다(Gold, 2000). VRE 유전자는 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).

VRE전파는 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.

본 실험에서 표현형적 방법으로 분리된 VRE 23균주를 디스크 감수성 시험 결과 모든 균주가 내성으로 나타났다. PCR방법에서 *vanA* 생성 *Enterococcus*균주는 23균주(100%)가 양성으로 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 3~5일이 걸리는 배양법의 민감도 및 특이도와 비교할 때 우수하다고 하였다(Roger 등, 1999; Sloan 등, 2004). 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.

본연구에 사용한 *Enterococcus* spp. 균주에서는 *VanA* 유전자를 포함하고 있는 것으로 나타났으며 PCR 방법은 *vanA, vanB* 유전자의 검출과 이 유전자의 monitoring에 중요한 역할을 할 것이다. 따라서 real-time PCR방법은 VRE균주를 정확하고 신속하게 검출할 수 있어 원내감염의 감시배양에 유용한 방법이라 사료된다.

Acknowledgements: None

Funding: 본 연구는 2013학년도 진주보건대학교 연구비지원에 의하여 이루어 졌음.

Conflict of interest: None

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Ind Microbiol* 1989, 27:731-734.
7. Gold HS. Vancomycin-resistant enterococci: Mechanisms and clinical observations. *Clin Infect Dis*. 2001, 33:210-219.
8. 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, 10:44-48.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Sloan LM. Uhl JR, Vetter EA, Schleck CD, Harmsen WS, Manahan J, et al. Comparison of the Roche LightCycler *vanA*/*vanB* detection assay and culture for detection of vancomycin-resistant enterococci from perianal swabs. *J Clin Microbiol*. 2004: 42:2636-2643.
13. Tripathi A, Shukla SK, Singh A, Prasad KN. A new approach of real-time polymerase chain reaction in detection of vancomycin-resistant enterococci and its comparison with other methods. *I J Med Micro*. 2013, 31:47-52.