

가축에서 분리된 Vancomycin 내성 장구균의 내성유전자 구조 분석을 통한 분자생물학적 역학 연구

허지영, 이선민*, 이석호**, 이위교, 용동은***, 이경원***, 신완식****, 이동건****

아주대학교 의과대학 진단검사의학교실, 베스티안 병원 진단검사의학과*, 순천향대학교 의과대학
부속 천안병원 소화기내과학교실**, 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실***,
가톨릭대학교 의과대학 감염내과학교실****

Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Poultry in Korea

Ji Young Huh, Sun Min Lee*, Suck Ho Lee**, Wee Gyo Lee, Dongeun Yong***,
Kyungwon Lee***, Wan Shik Shin**** and Dong Gun Lee****

Department of Laboratory Medicine, Ajou University School of Medicine, Suwon, Bestian Medical Center, Seoul, Division of Gastroenterology**, Department of Internal Medicine, Sooncheonhyang University Cheonan Hospital, Cheonan, Department of Laboratory Medicine***, Yonsei University School of Medicine, Division of Infectious Disease****, Department of Internal Medicine, Catholic University, Seoul, Korea*

Background : Vancomycin-resistant enterococci (VRE) have been increasingly isolated worldwide as a nosocomial pathogen. In Korea, because avoparcin has been used as a growth promoter in animal feed, *vanA*-containing enterococci have been found in animals. The aim of this study is to understand the epidemiology of VRE isolated from chicken of diverse geographic areas.

Methods : Thirty eight isolates of VanA VRE from chicken of diverse geographic areas were investigated. Multiplex PCR was used to confirm the genotype of VRE. Long PCR and restriction fragment length polymorphism (long PCR-RFLP) were performed to analyze the structure of Tn1546. If the RFLP pattern was different from the prototype, PCR amplification of internal regions of Tn1546 and subsequent sequencing analysis was performed.

Results : All 38 isolates harbored *vanA* gene and divided into 3 types by long PCR-RFLP. Thirty five isolates (92%) were classified as type I. Two isolates and one isolate were belonging to type II and type III, respectively. Type II revealed an insertion of IS1216V in *vanX-vanY* intergenic region. IS element integrated type III did not match any previously reported sequence.

Conclusion : Structural analysis of *vanA* gene cluster from chicken revealed that the majority of isolates (type I) have indistinguishable structure to E. fecium BM4147. This results indicated horizontal spread of resistance gene among isolates from chicken. Genetic rearrangement of Tn1546 was infrequently detected in Korea. (*Korean J Clin Microbiol* 2003;6(2):114-118)

Key words : Vancomycin-resistant enterococci (VRE), *VanA*, Tn1546, IS1216V

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음
(KRF-2001-042-F0025).

접수번호 : CM 6-2-06

교신저자 : 허지영

(442-721) 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5번지
아주대학교 의과대학 진단검사의학교실

TEL : 031) 219-5786 FAX : 031) 219-5778

E-mail : heidi2030@hanmail.net

서론

Vancomycin 내성 장구균(vancomycin-resistant enterococci, VRE)은 1986년 영국과 프랑스에서 처음 보고된 이래 분리빈도가 전 세계적으로 급증하였다[1]. VRE는 vanco-

Table 1. Sequence of PCR primers used for detection of vancomycin resistant genes

Gene	Sequences (5'→3')	Size (bp)	Reference
vanA	CCC ACT TTG CTT TTA TCC CGC ACC CGT CAA TCC CAA GTT TCG	356	[8]
vanB	CGC CAT ATT CTC CCC GGA TAG AAG CCC TCT GCA TCC AAG CAC	667	[7]
vanC1	GCG GTA TTG GGA AAC AGT GCC GCG GTC AAT CAG TTC GGG AAG TGC	429	[8]
vanC2	CGG GGA AGA TGG CAG TAT CGC AGG GAC GGT GAT TTT	484	[8]

Table 2. Sequence of PCR primers used for long PCR and vanX-vanY intergenic region

Gene	Location	Sequences (5'→3')	Size (bp)	Reference
Long PCR primers for Tn1546				
164F	164-185	AAC CTA AGG GCG ACA TAT GGT G	10414	[9]
10577R	10577-10553	GGT ACG GTA AAC GAG CAA TAA TAC G		
Primers for vanX-vanY intergenic region				
8448F	8448-8467	GAT GAA CGC TCT CAT CAT GC	691	[12]
9138R	9138-9117	TTC CTG AGA AAA CAG TGC TTC A		

mycin이외의 다른 항균제에도 내성을 나타냄으로써 감염증 치료시 적절한 항균제를 선택하기 어렵고, 황색 포도상구균 등 다른 균에게 내성을 전달할 수 있어 심각한 병원 감염 문제를 야기하고 있다. VRE의 분리양상은 미국과 유럽에서 차이를 보이는데, 이는 가축 사료에 glycopeptide 제제를 첨가해왔는지의 여부에 따른 것으로 생각된다. 가축 사료에 성장촉진제로 avoparcin을 첨가하지 않았던 미국의 경우 VRE는 주로 중환자실을 중심으로 하여 입원환자의 임상 검체에서 분리되었다. 반면 유럽에서는 avoparcin을 사용하였던 농가에서 가축과 사람에서 동일한 형의 VRE 또는 동일한 내성유전자 구조가 보고된 바 있어 가축으로부터의 VRE 전파가능성이 제시되었다. 유럽의 경우 입원환자에서 뿐 아니라 건강인과 가축에서도 VRE가 분리되는 것이 미국과 다른 점이다[2,3].

국내에서는 1992년에 박 등[4]이 백혈병 환자의 가검물에서 vancomycin에 고도내성을 보이는 *Enterococcus durans* 1예를 처음으로 보고하였다. 처음 보고된 후부터 1997년까지 국내 VRE의 분리빈도는 매우 낮았으나, 1998년 이후부터 경구용 vancomycin 사용의 증가와 더불어 VRE 분리는 현저하게 증가하였다. 국내 VRE 감염의 발생양상은 병원감염으로 전파되는 미국의 경우와 유사하나, 국내에서도 이미 avoparcin을 가축의 배합사료 제조시 사용하여 왔기 때문에(농림수산부 고시 배합사료 제조용 동물용 의약품 첨가 사용 기준에 의거) 가축에서의 분리에도 보고된 바 있다[5,6]. 이에 저자들은 국내 여러 지역의 닭에서 분리된 VanA형 *Enterococcus faecium* 38균주에 대하여 내성 유전자형을 확인하고 내성 유전자

의 구조를 분석하여 VRE의 역학연구에 도움이 되고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상균주

서울, 경기, 호남 및 영남지역의 닭에서 분리된 38주의 VanA형 *E. faecium*을 대상으로 하였다. 각 균주는 vancomycin 6 µg/mL을 함유한 Brain heart infusion agar (Becton Dickinson, Sparks, MD., USA)를 이용한 한천희석법으로 vancomycin 내성여부를 선별하였고, 선별 균주에 대하여 기존의 수기법, API 20 STREP (bioMerieux, Hazelwood, MO., USA) strip 및 자동동정기기인 Vitek system (bioMerieux)을 이용하여 동정하였다.

2. 내성유전형 결정

혈액한천배지에서 증식된 2-3개의 집락을 Trypticase soy broth (Becton Dickinson) 10 mL에 접종하여 24시간 배양한 후 Qiagen DNeasy Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 전반응액인 동결건조액 PreMix-Top [Bioneer, Korea: Taq polymerase 1 unit, dNTP 250 µM, 10 mM Tris (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂]이 들어 있는 0.5 mL 시험관에 대상균주 DNA 1 µL와 시발체 1.5 µL씩을 넣었다. GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster city, CA., USA)을 이용

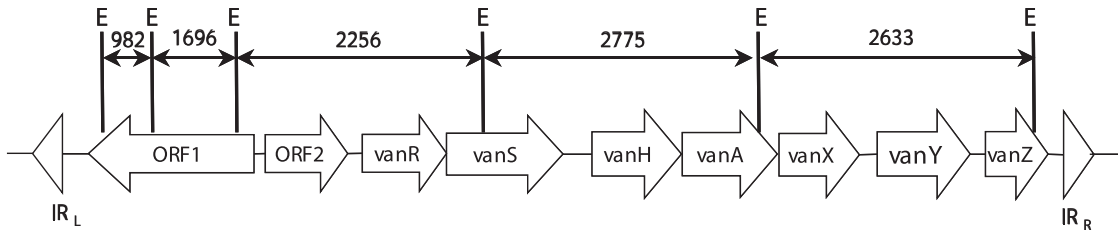


Fig. 1. The structure of VanA transposon Tn1546, indicating *EaeI* target sites (E) and predicted sizes of restriction fragments.

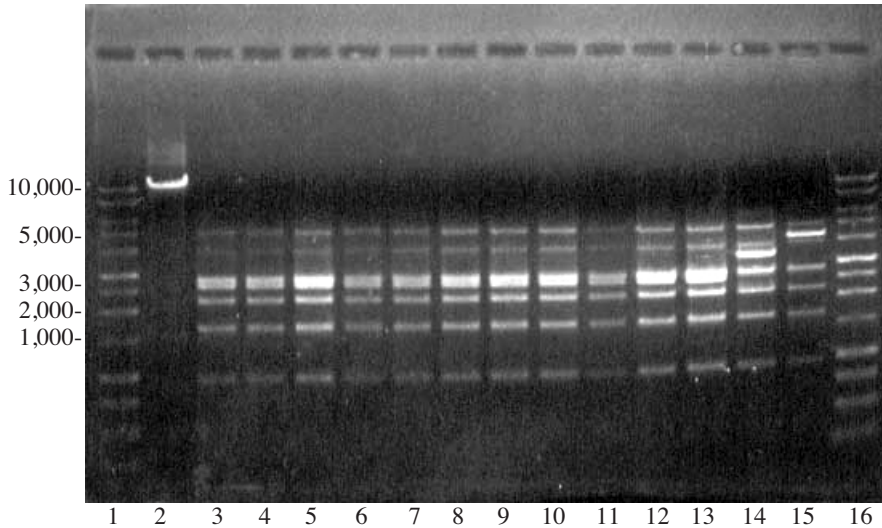


Fig. 2. Restriction fragment length polymorphism of Tn1546 amplicons digested with *EaeI*. 1, 16 : 1 kb DNA ladder (Promega, Madison, WI., USA), 2: long PCR amplicon of *E. faecium* BM4147, 3: *E. faecium* BM4147, 4: W1, 5: W2, 6: W4, 7: W5, 8: W6, 9: W7, 10: C35, 11: C36, 12: S33, 13: S34, 14: A33, 15: A35

하여 PCR을 시행(94℃ 5분; 1 cycle / 94℃ 30초, 60℃ 1분, 72℃ 1분; 30 cycle / 72℃ 5분; 1 cycle)한 후 증폭산물을 전기영동하여 UV에서 관찰하였다. 사용되었던 시발체 [7, 8]는 Table 1과 같다.

3. 유전자 구조 분석(Long PCR restriction fragment length polymorphism, long PCR-RFLP)

Long PCR을 이용해 10.4 kb 크기의 *vanA* gene cluster의 증폭산물을 구한 후 변별력이 있는 제한효소로 절단하여 띠의 양상을 분석하였다. 시발체[9]는 Table 2와 같고, 방법은 GeneAmp XL PCR kit (Applied Biosystems)를 사용하여 3.3x XL BufferII 30 μ L, GeneAmp 10mM dNTP blend 8 μ L, Mg(OAc)₂ 25 mM 6 μ L, rTth DNA polymerase 1 μ L, bacterial DNA 5 μ L, 시발체 4 μ L, 멸균 증류수 46 μ L를 전 반응액으로 하여 long PCR(94℃ 1분; 1 cycle / 98℃ 20초, 68℃ 10분, 30 cycle / 72℃, 10분; 1 cycle)을 시행한 후 증폭산물을 0.7% agarose gel에 전기영동하여 UV하에 관찰

하였다. QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용해 정제한 증폭산물을 *EaeI* (New England BioLabs, Inc., Beverly, MA., USA)로 절단하여 1.0% agarose gel에 전기영동한 후 띠의 양상을 비교 분석하였다. 정도관리 균주로는 *E. faecium* BM4147을 사용하였다.

4. PCR mapping 과 염기 서열 분석

Long-PCR RFLP 결과 정도관리 균주와 비교하여 띠의 양상이 틀리게 나오는 부분에 대하여 Table 2의 시발체를 사용하여 PCR mapping을 시행하였다. 증폭산물은 GEN-CLEAN kit (Qbiogene, Carlsbad, CA., USA)로 정제하여 ABI Prism 3100 DNA SEQUENCER (Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열분석을 시행하였다. 염기서열분석 결과는 DNASIS for windows v.2.6 (Hitachi Software Engineering, South San Francisco, CA., USA)을 이용해 알려진 염기서열들과 비교하였다.

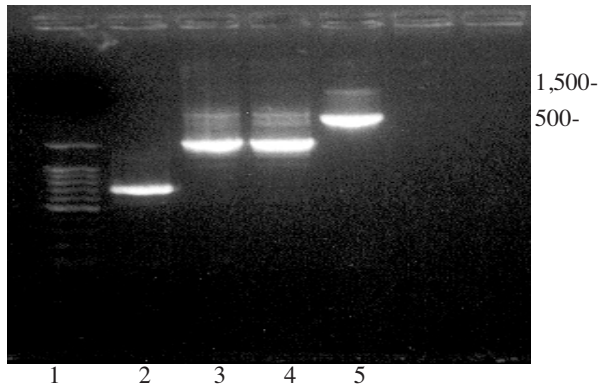


Fig. 3. PCR amplicons for vanX-vanY intergenic region. 1: 100 bp DNA ladder (Promega), 2: *E. faecium* BM4147, 3: A33, 4: A34, 5: A35

결 과

1. Long PCR RFLP

내성 유전자형은 대상 균주인 38균주 모두 *vanA*형이었다. 내성 유전자 구조분석을 위해 시행한 long-PCR에서는 대상 균주 모두 10.4 kb 크기의 Tn1546 내성 유전자가 증폭되어 RFLP를 통한 내성 유전자의 구조 분석이 가능하였다. 정도관리균주인 BM4147의 증폭산물을 *EaeI*으로 절단한 후 생기는 밴드 위치는 Fig. 1과 같다. 대상 균주에 대한 RFLP 결과 I, II, III의 세가지 유형으로 분류되었다. I형에 속하는 35균주는 정도관리 균주인 *E. faecium* BM4147와 long-PCR RFLP 결과가 일치하였고, II형에 2균주, III형에 1균주가 각각 속하였다(Fig. 2). II형과 III형은 제한효소 절단 위치 #7944 이후 부위의 양상이 정도관리 균주와 달랐다.

2. 염기 서열 분석

내성 유전자 구조분석 결과 정도관리균주와 다른 양상을 보인 A33, A34, A35 균주에 대하여 차이가 있는 절단 위치 #7944 이후의 부위를 부분 PCR 시행한 결과 Tn1546 염기서열 #8448과 #9138 사이의 증폭 부위가 정도관리 균주보다 커져있었다. 커진 부위를 대상으로 염기 서열 분석한 결과 II형 균주에는 IS1216V의 삽입이 확인되었고, III형에는 현재까지 보고된 적이 없는 염기서열의 삽입이 있었다(Fig. 3). 각각의 삽입위치는 A33, A34는 염기서열위치 9026, A35는 8716번이었다.

고 찰

VRE는 대부분 병원 입원환자의 임상검체에서 분리되지만 서유럽과 호주 등에서는 돼지, 닭 등의 가축과 건강인에서도 VRE가 분리되고 있다. 이런 나라들은 공통적

으로 glycopeptide 제제인 avoparcin을 가축사료에 20년 이상 첨가해 온 나라들이다. 유럽에서는가축과 건강인에서 VRE가 분리되는 원인을 avoparcin의 오랜 사용으로 인해 가축들의 장내 상재균이 vancomycin에 내성을 가지게 되었고, 먹이사슬을 통해 일반 건강인에게 VRE가 전파되었다고 보고 있다[1-3]. Klare 등[10]은 독일 건강인의 장내 VRE 보균율을 12%로 보고한 바 있으며, avoparcin의 사용을 금지한 후에는 보균율이 현저히 감소하였다고 하였다. VRE의 가축 분리율이 감소함에 따라 건강인에서의 분리율도 같이 감소하여 가축과 사람에서 분리되는 VRE가 밀접한 관련이 있음을 시사하였다.

국내에서는 1992년 처음 VRE가 분리된 이후 미국과 유사하게 대형병원의 중환자실을 중심으로 VRE의 분리가 증가하였으나, 가축사료에는 수년 동안 avoparcin이 첨가되어 왔었다. 이 때문에 국내의 가축에서도 VRE가 분리되고 있는데, 1999년 박 등[5]은 닭의 변분에서 VRE를 보고한 바 있으며, 2001년 최 등[6]도 국내 가축에서 분리된 VanA형 VRE에 전파양상에 대해 보고하였다. 그러나, 현재까지 국내에서 건강인의 VRE의 분리는 보고된 바가 없어 국내의 전파 양상이 미국형인지 유럽형인지는 아직 명확하지 않다. 본 연구에서의 가축 분리주들은 거의 대부분 prototype인 *E. faecium* BM4147과 내성 유전자 구조가 동일하였다.

최근 VRE의 역학에 관한 연구에는 *vanA* gene cluster가 포함되어 있는 Tn1546의 구조 분석이 주로 이용된다. Tn1546에 대해서는 많은 유전적 다양성이 보고되었다. 유전적 다양성의 주요인은 IS의 삽입, 결실, 점 돌연변이 등으로 인한 유전자 재조합이며, 이 중 IS의 삽입은 가장 중요한 원인이다. 삽입되는 IS의 종류는 IS1216V, IS1542, IS1251, 또는 IS1476으로 알려져 있으며, IS의 분포는 지역에 따라 차이가 있어 VRE의 역학 연구에서 표지자로 사용되어질 수 있다. IS1542와 IS1251은 각각 유럽과 미국의 균주에서 주로 발견되며, IS1476은 캐나다에서 보고된 바 있다. IS1216V는 Tn1546에 가장 빈번하게 삽입되며, *vanX-vanY* intergenic region 또는 *orf* region에 흔히 주변염기의 결실을 동반하면서 삽입된다[11-13]. IS1216V는 전세계적으로 널리 분포하며 지역적 제한성을 가지고 있지 않는다.

본 연구에서 닭에서 분리된 VRE의 Tn1546의 분석결과는 대부분 I형을 나타내었고, 이는 IS가 삽입되지 않은 prototype과 일치하였다. 이러한 결과는 가축 분리주에서 IS의 삽입과 그에 관련된 결실이 많은 미국, 영국, 네덜란드 등의 일부 유럽국가의 보고와는 차이가 있으나, 이탈리아와 독일에서는 본 연구와 동일한 형이 다수 보고된 바 있다[11, 14]. II형과 III형은 *vanX-vanY* intergenic region에 IS1216V 또는 다른 염기 서열이 삽입되어 있는 형으로, 3균주만이 이에 속하였다. IS1216V는 지역적 제한성을 가지지 않기 때문에 국내 가축 분리주의 양상이 미국이나 유럽 어느 쪽과 유사하다고 추정할 수는 없다. 국내

여러 지역의 닭에서 분리된 VRE의 대부분의 균주(92%)는 prototype과 동일한 내성 유전자 구조를 가지고 있었다. 이는 국내 가축 분리주에서는 최초의 VRE 내성 유전자가 유전자 재조합이 거의 없이 보존되어있음을 시사한다. 또한 국내 여러 지역으로 prototype의 내성 유전자가 수평전이에 의해 전파되었음을 추정할 수 있다.

Tn1546에 대한 IS 분포를 비롯한 구조 분석에 관한 연구는 향후 VRE의 분자생물학적 연구를 위한 새로운 방법으로 사료되며, 임상 분리주에서의 연구와 함께 시행함으로써 VRE 근원 추적에 유용할 것으로 사료된다.

요 약

배 경 : vancomycin 내성 장구균(vancomycin-resistant enterococci, VRE)은 병원감염의 주요 원인균으로 전세계적으로 분리빈도가 증가하고 있다. 국내의 경우 avoparcin의 사용으로가축에서도 VRE가 분리되고 있다. 이에 저자들은 국내 여러 지역의 닭에서 분리된 VRE 균주들의 내성 유전자의 구조를 비교하여 역학연구에 도움이 이 되고자 하였다.

방 법 : 국내 여러 지역의 닭에서 분리된 VanA형 VRE 38균주를 대상으로 하여 multiplex PCR을 이용해 vancomycin 내성 유전자형을 확인하였다. Long PCR-RFLP를 시행하여 내성 유전자의 구조를 분석하고, 정도 관리 균주와 비교하였다. 띠의 양상이 틀리게 나오는 부분에 대하여 내성유전자의 부분 PCR을 시행하고, 증폭 산물을 염기서열분석을 통하여 분석하였다.

결 과 : 38균주 모두 *vanA* 유전자가 증폭되었고, Long PCR-RFLP 결과 3형으로 분류되었다. I형에 대부분의 균주인 35균주(92%)가, II형과 III형에는 각각 2균주와 1균주가 속하였다. II형과 III형은 *vanX-vanY* intergenic region에 각각 IS1216V와 새로운 염기서열이 삽입되어 I형과 차이를 보였다.

결 론 : 국내 닭에서 분리된 VRE의 내성유전자 구조 분석결과 I형에 속하는 35균주가 *E. faecium* BM4147의 prototype과 일치하여 내성의 전파는 주로 내성 유전자의 수평전이로 인한 것으로 생각되었고 Tn1546의 유전적 변이는 크지 않은 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant Enterococci. *Clin Microbial Rev* 2000;13:686-707.
- Simonsen GS, Haaheim H, Dahl KH, Kruse H, Lovseth A, Olsvik Ø et al. Transmission of VanA-type vancomycin-resistant enterococci and *vanA* resistance elements between chicken and humans at avoparcin-exposed farms. *Microb Drug Resist* 1998;4:313-8.
- van den Bogaard AE, Willems R, London N, Top J, Stoberingh EE. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:497-505.
- 박지원, 김양리, 신완식, 강문원, 한경자, 심상인. Vancomycin 내성 enterococci에 대한 감수성 검사. *감염* 1992;24:133-7.
- 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* 1999;17:369-84.
- 최연화, 이영선, 이점규, 유재일, 김치경, 김봉수. 환자와 가축에서 분리된 vanA형 VRE의 분자유전학적 연관성. *감염* 2001;33:383-91.
- Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik Ø, Sundsfjord A. Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1105-10.
- 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;33:24-7.
- Haaheim H, Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik Ø, Sundsfjord A. Long PCRs of transposons in the structural analysis of genes encoding acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Biotechniques* 1998;24:432-7.
- Klare I, Badstubner D, Konstabet C, Bohme G, Claus H, Witte W. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. *Microb Drug Resist* 1999;5:45-52.
- Willems RJ, Top J, Braak N, Belkum A, Mevius DJ, Hendriks G, et al. Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn1546-like elements in enterococci from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:483-91.
- Brown AR, Townsley AC, Amyes SGB. 2001. Diversity of Tn1546 elements in clinical isolates of glycopeptide-resistant enterococci from Scottish hospitals. *Antimicrob Agent Chemother* 2001;45:1309-11.
- Mackinnon MG., Drebot MA, Tyrrell GJ. Identification and characterization of IS1476, an insertion sequence-like element that disrupt *vanY* function in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1805-7.
- Bonora MG, Bordin C, Bragagnolo L, Cirelli L, de Fatima M, Grossato A et al. Molecular analysis of *vanA* enterococci isolated from humans and animals in Northeastern Italy. *Microb Drug Resist* 2001;7:247-56.