

Evaluation of a Newly Developed Multiplex Real-time PCR Assay for the Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci from Rectal Swabs

Min-Kwon Jung¹, Wee-Gyo Lee², Myung-Hwa Park²

Department of Laboratory Medicine, ¹Seran General Hospital, Seoul,
²Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Background: Asymptomatic vancomycin-resistant enterococci (VRE) colonization precedes infection. VRE-colonized patients serve as silent reservoirs of enterococci that go on to colonize other patients. Rapidly identifying colonized patients is crucial to prevent the spread of VRE. The culture-based method of VRE screening is time-consuming. We evaluated the diagnostic performance of a recently developed multiplex real-time PCR for the detection of VRE.

Methods: We obtained 105 rectal swabs from patients who were being monitored for carriage of VRE. After 24 hour incubation of swabs in enterococcosel broth (EB) supplemented with 6 µg/mL vancomycin, multiplex real-time PCR was performed using the Anyplex™ VanR Real-time Detection (VanR) kit (Seegene, Inc., Seoul, Korea). The results of multiplex real-time PCR were compared to those of culture. We evaluated the specificity and detection limits of multiplex real-time PCR using VanR for VRE.

Results: A total of 96/105 (91.4%) samples were

VRE positive according to multiplex real-time PCR with EB while 85/105 (80.9%) samples were positive in culture. Eleven discordant results (10.4%) (multiplex real-time PCR positive, culture negative) were noted. All non-enterococcal bacteria and vancomycin-susceptible enterococci were negative. The DNA detection limits of VanR were 0.035 pg per reaction (3 µL) for *Enterococcus faecium* and 0.35 pg for *Enterococcus faecalis*.

Conclusion: The application of multiplex real-time PCR after EB incubation allows rapid and sensitive detection in 26-28 hours for VRE screening from rectal swabs. This method could facilitate the timely implementation of contact isolation to prevent the spread of VRE. (Korean J Clin Microbiol 2011;14: 138-143)

Key Words: Vancomycin resistant enterococci, Multiplex real-time PCR, Rectal swab

서 론

반코마이신 내성 장구균(vancomycin-resistant enterococci, VRE)은 1986년 프랑스에서 처음 보고된 이래 병원 감염균으로서 분리율이 급격히 증가하고 있다. VRE 감염 환자는, 장내 집락화가 선행된 후 숙주의 상태에 따라 감염으로 진행되기도 하고, 감염 증상 없이 다른 환자로 VRE를 전파하는 보균자의 역할만을 하기도 한다[1]. VRE 전파는 균주 자체가 이동하는 수직 전이와 내성 유전자만이 전파되는 수평 전이 기전에 의하며 [2-4], VRE 전파를 방지하기 위하여 대부분의 국내 대학병원은 CDC의 Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) 기준을 따르고 있다[5]. VRE 집락이 형성된 환자는

신속히 격리하고 적어도 1주 이상의 간격으로 시행한 감시배양에서 연속적으로 3회 음성인 경우 격리를 해지한다[6]. 그러나 기존의 VRE 감시배양은 선별적인 고형배지에 접종하거나 액체 배지에 증균 후 고형배지에 접종하는 방법을 사용하며 집락 선별, 계대 배양, 생화학반응 및 항균제 내성검사 등의 여러 단계를 거친 동정과정은 필요하므로 결과보고까지 3-5일이 소요되어 환자나 보균자의 격리나 감염관리가 지연될 수 있다. 또한 표현형만을 검사하는 방법만으로는 glycopeptide에 저도 내성을 보이는 VRE의 경우 검출이나 감별이 어려운 경우가 있다[7-9]. 장내에 VRE를 보균하고 있지만 균수가 적은 경우에도 직장도말 배양검사의 민감도가 낮아 검출되지 않을 수 있다[10]. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 신속하고 민감한 VRE 검출방법을 필요로 하게 되었고, 중합효소 연쇄반응이나 실시간 중합효소연쇄반응을 이용한 VRE 검색방법의 사용이 증가하고 있다 [11]. 최근 직장도말 검체에서 다중 실시간 중합효소연쇄반응(multiplex real-time PCR)을 이용하여, 2시간 이내에 *vanA*,

Received 2 July, 2011, Revised 19 August, 2011

Accepted 9 September, 2011

Correspondence: Wee-Gyo Lee, Department of Laboratory Medicine, Ajou University Hospital, San 5 Woncheon-dong, Yeongtong-gu, Suwon 443-721, Korea. (Tel) 82-31-219-5785, (Fax) 82-31-219-5778, (E-mail) weegyo@ajou.ac.kr

vanB, *vanC* 내성 유전자를 동시에 검출할 수 있는 Anyplex™ VanR Real-time Detection (VanR) 검사시약(Seegene, Inc., Seoul, Korea)이 개발되었다.

본 연구에서 저자들은 VRE의 감시배양 소요시간을 단축할 수 있는 VanR 검사시약의 진단 수행능을 평가하기 위하여 VRE 내성 유전자의 검출 특이도 및 검출 한계를 분석하고, 기존의 배양법을 이용한 VRE 검출 결과와 비교하였다.

대상 및 방법

1. 대상 검체

2010년 11월부터 2011년 3월까지 아주대학교병원 진단검사의학과에 일반 세균배양이 의뢰된 임상 검체 중 VRE가 분리되어 격리 중인 환자의 직장도말 105검체를 대상으로 하였다. 환자의 개인정보 유출을 차단하기 위한 직장도말 검체의 코드화를 위하여 본 연구와 직접적 이해관계가 없는 제3자가 해당 검체를 조회 및 검출하여 일련번호를 기록 코드화하였다. 코드화 이후 검체는 주어진 일련번호만 기록하여 진행함으로써, 환자의 개인정보 유출을 방지하였다.

2. VRE 내성 유전자 검출 특이도(Specificity) 평가

VanR 검사시약을 이용한 다중 실시간 중합효소연쇄반응의 VRE 내성 유전자 검출 특이도를 평가하기 위하여 반코마이신 감수성 *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Serratia marcescens* (ATCC 8100) 및 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883)를 사용하였다. 양성 대조 균주로 반코마이신 내성 *Enterococcus faecium* (BM 4147, *vanA*), *E. faecalis* (ATCC 51299, *vanB*)를 사용하였으며 각 균주 시험관에 phosphate buffered saline 1 mL 씩을 첨가하고 교반 후, QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN Korea Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 제조사의 지시대로 DNA를 추출하여 3회씩 반복 측정하였다.

3. 검출 한계(Detection limits) 평가

검출 한계를 평가하기 위하여 반코마이신 내성 *E. faecium* (BM 4147, *vanA*)과 *E. faecalis* (ATCC 51299, *vanB*) 균주에서 추출한 DNA 농도를 Nanodrop ND-1000 분광광도계(Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA)를 이용하여 측정하였다. 350 pg/reaction (3 µL)부터 0.35 fg/reaction (3 µL)까지 연속적으로 10배씩 단계 희석한 다음, VanR 검사시약을 이용하여 다중 실시간 중합효소연쇄반응을 3회씩 반복 시행하였다.

4. 기존 배양법과의 VRE 검출 결과 비교

1) VRE 배양검사: 직장도말 검체를 반코마이신이 8 µg/mL

포함된 ChromID VRE (ChromID) agar (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) 배지에 접종하였다. 35°C 배양기에서 24시간 배양 후 장구균으로 의심되는 집락을 골라 혈액한천 배지에 계대 배양하였다. 혈액한천 배지에서 자란 집락으로 균 동정 및 항균제 감수성 검사를 시행하여 VRE를 확인하였다.

2) 다중 실시간 중합효소연쇄반응 검사(Multiplex real-time PCR): 직장도말 검체를 반코마이신(Sigma Chemical Company,

St. Louis, MO, USA) 6 µg/mL이 첨가된 enterococcosel broth (EB) (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)에 접종한 후 35°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 검체 변한 배지 액 50 µL를 취해 VanR 검사시약에 포함된 DNA extraction solution 200 µL와 혼합한 뒤 heat block (100°C)에서 10분간 비등화시킨 후 13,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 DNA를 추출하였다. DNA 3 µL와 VanR 검사시약에 포함된 5x VanR Oligo Mix (primer, template of internal control) 4 µL, 8-methoxypsoralen 3 µL, 2x Detection Mix (DNA polymerase, buffer containing dNTPs) 10 µL를 제조사의 지시에 따라 혼합한 뒤 다음과 같은 조건으로 다중 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였다. CFX96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) 장비를 사용하여 95°C에서 2분간 반응시킨 후 95°C에서 30초, 60°C에서 30초 반응을 총 45회 반복하였다. Fluorophore FAM (*vanA*), Quasar® 670 (*vanB*), Cal Fluor® Red 610 (*vanC*), Cal Fluor® Gold 540 (internal control)에 대한 기준주기 (cycle threshold, Ct) 값이 40 미만일 경우 양성으로 판독하였으며, 증폭반응 곡선 및 분석결과를 확인하였다. 양성 대조 균주는 *E. faecalis* (ATCC 51299, *vanB*)를 사용하였다.

결 과

1. VRE 내성 유전자 검출 특이도(Specificity) 평가

반코마이신 감수성 *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. pneumoniae* (ATCC 49619), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), *S. marcescens* (ATCC 8100), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) 모두 VanR 검사시약을 이용한 다중 실시간 중합효소연쇄반응의 증폭반응이 일어나지 않아 VRE 내성 유전자가 검출되지 않았다. 억제제로 인한 위음성을 확인할 수 있는 내부 대조물질의 증폭반응은 양성이었으며, 양성 대조 균주인 반코마이신 내성 *E. faecium* (BM 4147, *vanA*)과 *E. faecalis* (ATCC 51299, *vanB*) 균주에서만 각각 3회씩 반복 측정 결과 3회 모두 *vanA*와 *vanB* 내성 유전자가 검출되었다(Fig. 1).

2. 검출 한계(Detection limits) 평가

반코마이신 내성 *E. faecium* (BM 4147, *vanA*)과 *E. faecalis* (ATCC 51299, *vanB*) 균주의 DNA를 10배씩 단계 희석하여 다

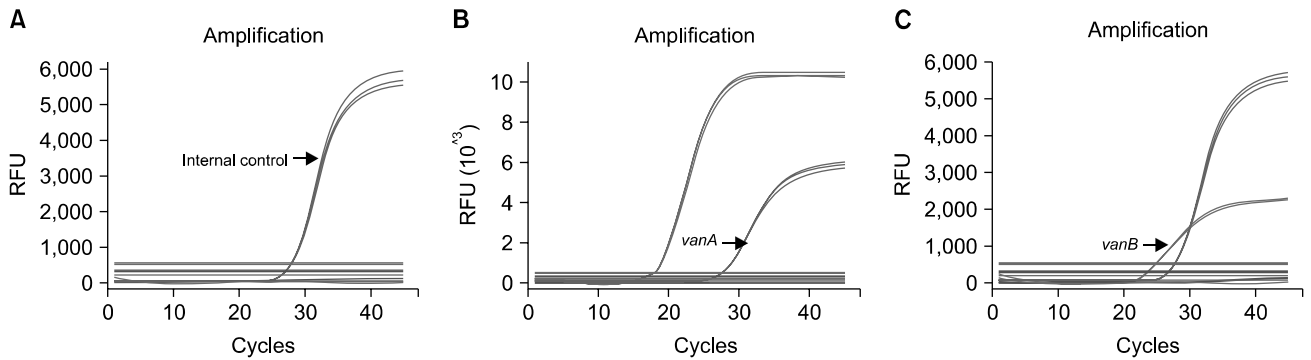


Fig. 1. Results of multiplex real-time PCR for the detection of VRE in triplicate. (A) *E. faecalis* (ATCC 29212). (B) *E. faecium* (BM 4147, *vanA*). (C) *E. faecalis* (ATCC 51299, *vanB*).

Table 1. Comparative results of multiplex real-time PCR using Anyplex™ VanR Real-time Detection kit and culture method for the detection of VRE

VRE detection	Multiplex real-time PCR		Total No. (%) of specimens
	Positive	Negative	
Culture			
Positive	85 (80.9%)	0 (0%)	85 (80.9%)
Negative	11 (10.4%)*	9 (8.5%)	20 (19.1%)
Total No. (%)	96 (91.4%)	9 (8.5%)	105 (100%)

*Discordant results between multiplex real-time PCR and culture method.

Abbreviation: VRE, vancomycin-resistant enterococci.

중 실시간 중합효소연쇄반응을 3회씩 반복 시행한 결과, *E. faecium* 균주는 0.035 pg/reaction (3 μL), *E. faecalis* 균주는 0.35 pg의 DNA 농도까지 각각 3회 모두 증폭반응이 관찰되었다.

3. 기존 배양법과의 VRE 검출 결과 비교

다중 실시간 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 105검체 중 96 (91.4%)건에서 VRE 양성이었으며 기존의 배양검사에서는 85 (80.9%)건이 양성이었다. 검출된 내성 유전자형은 *vanA* 79 건, *vanC* 2건 및 *vanA*와 *vanC* 동시검출이 15건이었다. 두 검사 방법 간에 11 (10.4%)건의 결과가 일치하지 않았다. 불일치 11건은 모두 다중 실시간 중합효소연쇄반응에서는 VRE 양성이었으나 배양검사에서 음성인 경우였고, 배양검사에서 양성이었으나 다중 실시간 중합효소연쇄반응에서 음성인 경우는 한 예도 없었다(Table 1). 불일치 11예의 경우 내성 유전자형은 *vanA* 8건, *vanC* 2건, *vanA*와 *vanC* 동시검출 1건이었다. 다중 실시간 중합효소연쇄반응에서 *vanA*와 *vanC*가 동시에 검출된 14건 중 6건은 배양검사서 *E. faecium*과 *Enterococcus gallinarum*이 동시에 검출되었고 7건은 *E. faecium*만 검출되었으며, 1건은 *E. gallinarum*만 검출되었다. 배양검사의 VRE 검출 및 균 동정에 필요한 평균 검사 소요시간은 72-96시간이었으며,

다중 실시간 중합효소연쇄반응 방법의 경우 직장도말 검체를 선별 액체배지인 EB에 배양하는 시간까지 포함해 26-28시간에 VRE 검출 및 내성 유전자형을 확인할 수 있었다.

고찰

VRE 보균자를 신속하게 검출하고 격리하여 전파를 방지하는 것이 병원 내 VRE 감염을 줄이는 주된 감염관리 방법이므로, 국내외 많은 병원에서 VRE 감시배양을 시행하고 있다[11]. CDC의 HICPAC 기준[6]에 따라 아주대학교병원 진단검사의학과에서도 미생물 배양검사가 의뢰된 임상 검체에서 VRE가 분리 동정된 경우, 감염관리실에 연락하여 환자를 신속히 격리한다. 격리 후 일주일에 한 번씩 VRE 보균 여부를 직장도말 검체를 배양하여 검사하고 3주간 연속적으로 음성 결과가 나온 경우에만 격리조치가 해제된다. 그러나 격리 해지가 된 환자에서 VRE의 재집락화가 보고되고 있으며[12], 같은 병동에 입원하고 있는 환자의 경우 원래 보균하고 있던 균주의 재발이 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)와 Tn1546 분석에 의해 밝혀진 바 있어[13] 감염관리의 문제점으로 대두되고 있다. 검출 민감도가 높은 실시간 중합효소연쇄반응 방법으로 VRE 내성 유전자를 검출한다면, 위의 경우처럼 배양으로 검출하지 못하는 적은 수의 균주를 보균하는 경우에도 격리대상 환자나 보균자에 대한 효율적인 감염관리를 시행하여 VRE 전파를 방지할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서도 다중 실시간 중합효소연쇄반응에서 반코마이신 내성 유전자가 검출되었으나 배양검사서 음성인 경우가 11건(*vanA* 8건, *vanC* 2건, *vanA* & *vanC* 1건)으로 11.4% (11/96)가 배양에서 위음성을 보였다. 이는 보균자의 장내 집락화된 균 수가 적을 경우 배양검사서 검출되지 않은 것으로, 균 수가 적다고 하더라도 전파의 원인이 되므로 VRE 검색 시 배양검사보다 민감도가 높은 방법을 사용하여야 함을 알 수 있었다.

표현형만을 검사하는 배양검사에서는 glycopeptide에 저도

내성을 보이는 VanC VRE의 경우 검출이나 감별이 어려운 경우도 있는데[7-9] 본 연구에서도 기존의 배양검사법으로 VRE 음성이지만 다중 실시간 중합효소연쇄반응에서 *vanC* 내성 유전자가 검출된 경우가 2건, 배양검사서 *E. faecium*이 배양되었지만 다중 실시간 중합효소연쇄반응에서는 *vanA*와 *vanC*가 동시에 검출된 경우가 7건 있었다. *vanC* 내성 유전자는 자연 내성이며, 내성이 전파되지 않으므로 분리 시 격리를 할 필요가 없지만, 불필요하게 감염관리를 하게 되는 경우를 방지하고, 만약 반코마이신에 다양한 정도의 내성을 보이는 vanB형이 vanC형으로 잘못 동정된 경우는 감염관리가 필요한 경우임에도 불구하고 방지하게 될 수 있으므로 이를 방지하기 위하여 정확한 균 동정이나 내성 유전자형 감별이 필요하다[14].

배양검사서 *E. gallinarum*이 검출되었으나 다중 실시간 중합효소연쇄반응에서 *vanA*와 *vanC* 내성 유전자가 동시에 검출된 경우도 1건 있었다. *E. gallinarum*이 *vanA*를 획득한 경우로 이러한 경우에는 VanC VRE라고 하더라도 *vanA* 내성 유전자를 같이 가지고 있으므로 내성 전파의 위험이 있어서 격리 등의 감염관리가 필요하다. VanC VRE가 *vanA*나 *vanB* 내성 유전자를 수평 전달받은 경우에, 다른 장구균에 반코마이신 고도 내성을 전달할 수 있으므로 임상적으로는 VanA나 VanB VRE 감염과 같으며, 감염관리도 동일하게 하여야 하기 때문이다[5].

기존 배양법을 이용한 경우 검출까지의 시간이 최소한 72-96 시간이 걸리므로, 검사 소요시간을 줄이기 위하여 대변이나 직장도말 검체에서 직접 DNA를 추출하여 VRE 내성 유전자를 검출하는 방법들에 관한 몇몇 보고가 있었으나, 검체에서 직접 DNA를 추출하는 방법은 검체에 포함된 인간 DNA, 화학물질, heme 등의 억제제로 인하여 중합효소연쇄반응이 저하되는 단점이 있다[11,15-17]. Palladino 등[11]에 의하면 직장도말 검체에 대해 직접 다중 실시간 중합효소연쇄반응을 시행하는 경우에는 억제율이 55%였지만 선별 액체배지에 증균 후 시행한 경우에는 10%로 감소하였으며, VRE 검출률은 45%에서 88%로 2배가량 증가하였다. Kim 등[18]도 추출한 DNA를 희석하여 다중 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 위음성 문제가 해결되었다고 보고하였다. 검체에서 직접 검사를 할 경우 억제제에 의한 위음성을 확인하기 위해서 내부 대조물질의 사용과 증폭 반응 곡선의 확인 및 교정조치가 중합효소연쇄반응 결과 판독 과정에 반드시 필요하다고 생각된다.

*vanA E. faecium*에 의한 병원 내 집단 발병 시 직장도말 검체를 액체배지에 증균시킨 후 *vanA*에 특이한 중합효소연쇄반응으로 확인하는 방법은 24-30시간 내에 94.5%의 민감도와 100%의 특이도를 보여 평균 4-5일이 걸리는 배양법의 민감도(액체배지에 증균하지 않고 직접 배양한 경우 89%, 증균 후 배양한 경우 98%) 및 특이도(100%)와 비교할 때 우수하였다[19]. Kim 등[20]도 내부 대조물질을 사용하여 위음성을 확인하고, 선별 액체배지를 이용한 신속 증균 중합효소연쇄반응을 시행

하는 것이 VRE 보균 여부를 감시하는데 빠르고 민감한 실제적인 방법이라고 하였지만 *vanA* 이외에 다른 유전자형을 검출하려면 다중 중합효소연쇄반응을 시행해야 하고 이 경우, 민감도가 떨어질 가능성이 있어[15] 실시간 정량 중합효소연쇄반응을 시행하여 민감도를 보완하여야 한다고 하였다. 직장도말 검체를 선별 액체배지에 증균 배양 후 실시간 중합효소연쇄반응을 시행하는 방법은, 시약 내에 포함된 내부 대조물질의 증폭 여부로 억제제로 인한 위음성을 확인할 수 있었으며, 배양검사보다 신속하고 민감하게 26-28시간 내에 VRE 검출로 감염 환자나 보균자의 격리조치 등 신속한 결정 및 대응을 할 수 있게 하고, 검사실의 검사정보시스템(Laboratory Information System, LIS)과도 연동이 가능하므로 VRE 감시배양에 적합한 검사법이라고 할 수 있다. 그러나 국내 병원의 검사실에서 실시간 중합효소연쇄반응 장비를 갖추지 못한 곳이 많고, 검사비용 또한 고가이며 숙련된 기술을 요하는 검사방법[18,20]이기 때문에, 국내 모든 병원에서 실제적으로 사용하기는 어렵다. 또한 현재 국내 보험급여 고시에 따르면 VRE 검출을 위한 중합효소연쇄반응법은 과거 VRE 보균자 및 고위험군 환자에게 선별적으로 실시할 때 인정되되 배양검사와 동시에 실시한 경우 각각 인정하는 것으로 되어있어서 배양검사와 함께 시행하여야 한다는 제한이 있다. 그러므로 과거 VRE 보균자 및 고위험군 환자를 대상으로 배양검사와 함께 다중 실시간 중합효소연쇄반응을 시행한다면 병원 내 VRE 환자나 보균자로부터 내성 유전자의 전파 및 원내 감염확산을 초기에 방지하는 데 유용할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구수행에 많은 도움과 자료를 제공해 주신 췌장 생명과학 연구소에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Roghmann MC, Qaiyumi S, Schwalbe R, Morris JG Jr. Natural history of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Infect Control Hosp Epidemiol 1997;18:679-80.
2. Handwerger S and Skoble J. Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:2446-53.
3. Simonsen GS, Haaheim H, Dahl KH, Kruse H, Løvseth A, Olsvik O, 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.
4. Lee WG, Jernigan JA, Rasheed JK, Anderson GJ, Tenover FC. Possible horizontal transfer of the *vanB2* gene among genetically diverse strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a Korean hospital. J Clin Microbiol 2001;39:1165-8.
5. Lee WG. Resistance mechanism and epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. Korean J Clin Microbiol 2008;11:71-7.

6. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICP-AC). Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995;16:105-13.
7. 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;33:1434.
8. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:836-71.
9. Sahn DF, Free L, Smith C, Eveland M, Mundy LM. Rapid characterization schemes for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1997;35:2026-30.
10. D'Agata EM, Gautam S, Green WK, Tang YW. High rate of false-negative results of the rectal swab culture method in detection of gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 2002;34:167-72.
11. Palladino S, Kay ID, Flexman JP, Boehm I, Costa AM, Lambert EJ, et al. Rapid detection of *vanA* and *vanB* genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:2483-6.
12. Donskey CJ, Huyen CK, Das SM, Helfand MS, Hecker MT. Recurrence of vancomycin-resistant enterococcus stool colonization during antibiotic therapy. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:436-40.
13. Lee WG, Park IJ, Jin HY, Park MH. Relapse and reacquisition of rectal colonization by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* after decolonization. *Epidemiol Infect* 2010;138:1449-53.
14. Toye B, Shymanski J, Bobrowska M, Woods W, Ramotar K. Clinical and epidemiological significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the *vanC* genotype). *J Clin Microbiol* 1997;35:3166-70.
15. Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1997;35:2325-30.
16. Drews SJ, Johnson G, Gharabaghi F, Roscoe M, Matlow A, Tellier R, et al. A 24-hour screening protocol for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2006;44:1578-80.
17. Morata P, Queipo-Ortuño MI, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2443-6.
18. Kim DH, Lee JH, Ha JS, Ryoo NH, Jeon DS, Kim JR. Evaluation of the usefulness of selective chromogenic agar medium (chromID VRE) and multiplex PCR method for the detection of vancomycin-resistant enterococci. *Korean J Lab Med* 2010;30:631-6.
19. Roger M, Faucher MC, Forest P, St-Antoine P, Coutlée F. Evaluation of a *vanA*-specific PCR assay for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during a hospital outbreak. *J Clin Microbiol* 1999;37:3348-9.
20. 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.

=국문초록=

반코마이신 내성 장구균 검출을 위한 다중 실시간 중합효소연쇄반응 검사시약 평가

¹세란병원 진단검사의학과, ²아주대학교 의과대학 진단검사의학교실

정민권¹, 이위교², 박명화²

배경: 반코마이신 내성 장구균(vancomycin-resistant enterococci, VRE) 감염 환자는 장내 집락화가 선행된 후 감염 증상 없이 다른 환자로 VRE를 전파하는 보균자의 역할을 한다. VRE의 전파 방지를 위하여 장내 집락화된 환자의 신속한 검출이 중요하지만 배양에 기초한 VRE 검색 방법은 시간이 오래 걸리는 문제점이 있다. 이번 연구는 VRE 검출을 위해 최근 개발된 다중 실시간 중합효소연쇄반응(multiplex real-time PCR)법의 진단 수행능을 평가하고자 하였다.

방법: VRE 감시배양을 위하여 의뢰된 직장도말 105검체를 대상으로, 반코마이신 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 첨가된 enterococcosel broth (EB)에 24시간 배양한 후 Anyplex™ VanR Real-time Detection (VanR) (Seegene, Inc., Seoul, Korea) 검사시약으로 다중 실시간 중합효소연쇄반응을 시행하였고 기존 배양검사 결과와 비교하였다. 또한 VanR 검사시약의 VRE 내성 유전자 검출 특이도와 검출 한계를 조사하였다.

결과: 다중 실시간 중합효소연쇄반응을 시행한 105검체 중 96 (91.4%)건에서 VRE 양성이었으며, 배양검사에서는 85 (80.9%)건에서 VRE가 배양되었다. 두 검사방법 간에 11 (10.4%)건의 결과가 일치하지 않았으며, 모두 다중 실시간 중합효소연쇄반응 양성, 배양 음성이었다. 반코마이신 감수성 장구균을 포함한 그람 음성과 양성 표준균주를 대상으로 시행한 다중 실시간 중합효소연쇄반응결과는 모두 VRE 음성이었으며, 10배씩 단계 희석한 반코마이신 내성 *vanA* *Enterococcus faecium* 균주의 DNA는 0.035 pg/reaction (3 μL), *vanB* *Enterococcus faecalis* 균주의 DNA는 0.35 pg의 농도까지 증폭반응이 관찰되었다.

결론: 직장도말 검체를 EB에 배양한 후 시행한 다중 실시간 중합효소연쇄반응 검사법은 26-28시간에 VRE 내성 유전자를 신속하고 민감하게 검출할 수 있었다. 이 방법은 시기적절한 격리시행에 도움을 주어 VRE 내성 유전자의 전파를 방지할 수 있을 것으로 기대된다. [대한임상미생물학회지 2011;14:138-143]

교신저자 : 이위교, 443-721, 경기도 수원시 영통구 원천동 산5
아주대학교병원 진단검사의학과
Tel: 031-219-5785, Fax: 031-219-5778
E-mail: weegyo@ajou.ac.kr