

## 일개 대학병원에서 분리된 *vanA* 형 *Enterococcus faecium*에 대한 분자생물학적 특성

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

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

### Molecular Characterization of *vanA*-containing *Enterococcus faecium* Isolated from a Teaching Hospital

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

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

**Background** : The widespread dissemination of Tn1546 has been attributed to transposition into plasmid or transferable elements. The transposition has been achieved through the activity of insertion sequences. Genetic diversity in Tn1546 includes integration of IS elements such as IS1216V, IS1251, IS1476 and IS1542. We investigated molecular typing and the distribution of insertion sequences in *vanA*-containing *Enterococcus faecium* isolated from patients in a teaching hospital.

**Methods** : Sixteen strains of *vanA*-containing *E. faecium* isolated from Ajou university hospital were analyzed. PCR amplification of internal regions of Tn1546 was performed and PCR amplicons were directly sequenced on both DNA strands by the dideoxy termination method.

**Results** : For all 16 isolates, IS1216V sequences were located within Tn1546. IS1542 sequences were detected in the genome of 9 isolates. One isolate contained IS1216V in the *vanS* intragenic region. The structural analysis of Tn1546 in VRE isolates produced three different groups by the presence of the insertion sequences. Group I was characterized by deletions of *orf1* and *orf2* and IS1216V insertion in the *vanXY* intergenic region. Group II represented IS1542 in the *orf2-vanR* and IS1216V in the *vanXY* intergenic region with deletion of *orf1* region. Group III represented IS1542 in the *orf2-vanR* and IS1216V in the *vanXY* intergenic region without any deletion.

**Conclusions** : Most of Korean isolates contained IS1216V and IS1542 sequences. Transposon typing of isolates in this study revealed a similarity to the European's. The identification of insertion sequence within *vanA* gene cluster can be a useful tool in epidemiological investigations.

(*Korean J Clin Microbiol* 2003;6(2):119-125)

**Key words** : Tn1546, *vanA*, *E. faecium*, Insertion sequences

## 서 론

반코마이신 내성 장구균(vancomycin-resistant enterococci, VRE)은 1986년 Leclercq에 의해 처음 발견된 이래[1], 지난 10년간 반코마이신 사용 증가와 함께 병원성 감염의 원인균으로서 분리율이 급격히 증가하였다. 미국 질병예방통제센터(Centers for Disease Control and Prevention)의 국가 병원 감염 감독위원회(National Nosocomial Infections Surveillance System, NNIS)에 따르면[2] 1995년에서 2000년까지 중환자실(intensive-care unit, ICU)환자로부터 분리된 VRE 발생율이 12.8%에서 25.9%로 증가했다고 보고하였다.

VRE 감염관리를 위하여는 감염 역학을 먼저 파악하는 것이 필수 조건이다. VRE의 전파 방지를 위해서는 유행하는 VRE가 어디에서부터 유래하였는지를 역학조사를 통하여 규명하여야 한다. VRE는 균주 자체의 이동에 의한 전파와 내성 유전자의 수평 전이에 의해 전파된다[3-9]. 균주 이동으로 인한 확산을 규명하기 위해서는 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)에 의한 VRE 염색체의 분석이, 내성 유전자의 전파를 규명하기 위해서는 내성 유전자 구조를 분석하는 것이 필요하다. 최근 여러 연구에서 수평전이를 VRE 유행의 주 원인으로 보고하고 있다 [8, 9]. 균형 감별의 표준법으로 권장되는 PFGE나 ribotyping의 결과에서 서로 다른 형이라 하더라도 동일 내성 유전자만의 이동(horizontal spread)에 의한 유행인 경우도 있으므로 VRE 역학 연구시 PFGE와 함께 내성 유전자의 구조 분석도 반드시 병행되어야 한다[8-10]. 그러나 현재 국내 뿐 아니라 세계적으로도 아직 VRE 내성 유전자 구조 분석 기법이 정립되지 않은 실정이다. 구조 분석을 위하여 초기에는 반코마이신 내성 유전자를 포함한 Tn1546 전체를 long-range PCR을 시행한 후 제한효소로 처리하여 생성된 띠를 비교하는 restriction fragment length polymorphism이 주로 이용되었으나[11], 최근에는 transposon 내에 삽입된 insertion sequence (IS)를 규명하여 내성 유전자 구조를 분석하는 방법이 이용되기도 한다[12, 13].

이에 저자 등은 일개 대학병원의 임상검체에서 분리된 vanA형 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF)를 대상으로, 1) Glycopeptide 제제에 대한 내성 양상, 2) PFGE를 통한 균형 감별, 3) 내성 유전자 구조 분석을 통한 분자역학적 성상 등을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상균주

2000-2001년에 아주대학교병원 진단검사의학과에 세균 배양이 의뢰된 임상 검체에서 분리된 VREF 16주를 대상으로 하였다. VRE 검색은 반코마이신 6 $\mu$ g/mL을 함유한 Brain Heart Infusion 배지를 이용한 검색 방법으로 하

였고, 균 동정은 기존의 수기법, API20 STREP (bioMerieux, Hazelwood, MO, USA) strip 및 자동동정기인 Vitek system (bioMerieux)을 이용하여 동정하였다.

### 2. 최저발육저지농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

한천희석법으로 반코마이신 및 teicoplanin에 대한 최저발육저지농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)를 NCCLS 기준에 따라 측정하였다[14]. MIC에 따라 반코마이신과 teicoplanin 모두 32  $\mu$ g/mL 이상을 내성으로 판독하였다.

### 3. 내성유전자형 결정

VREF에 대한 내성유전자 검사는 multiplex PCR을 이용하였고, 시발체는 *vanA*, *vanB*, *vanCI*, *vanC2/3*에 대하여 시행하였다[15].

### 4. 유전적 형별 분석(Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

PFGE는 Murray 등의 방법[16]을 이용하였는데, 고품화된 세균의 DNA를 20 units *SmaI* (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)으로 25 $^{\circ}$ C에서 처리한 후, CHEF-DR II system을 이용하여 ramped pulse time을 시작 1초, 끝 20초로 하고 6V/cm, 24시간 전기영동 하였다. 분석은 Bio-Gene software (Vilber Lourmat Inc., Marne la-vallee, Cedex, France)를 이용하여 UPGMA법으로 군집 분석하여 유전적 연관성을 결정하였다.

### 5. 유전자 구조 분석

Tn1546 전체 유전자 내부를 overlapping 되도록 시발체를 이용하여 증폭하는 PCR mapping과 증폭산물 중 prototype과 비교하여 크게 나온 부분에 관하여 IS1216V, IS1542, IS1251 및 IS1476에 대한 IS-specific PCR을 시행하여 내성유전자의 구조를 분석하였다. 사용되었던 시발체는 Table 1과 같고, 표준 균주로는 prototype인 *E. faecium* BM4147을 이용하였다. DNA의 추출은 Ausbel 등 [17]의 방법을 이용하였고, 각 시발체와 융점 온도는 OLIGO program v. 6.0 (National Biosciences, Inc., Plymouth, MN., USA)을 이용하였다.

### 6. 유전자 염기 서열 분석

PCR 증폭 산물을 젤로부터 GENE CLEAN kit(Qbiogene Inc, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출한 후, ABI Prism 3100 DNA SEQUENCER (Perkin-Elmer, Norwalk, CT,

Table 1. Sequences and position of PCR primers used in this study

Primer	Sequence	Specificity	Location	Reference
42F	5'-ATTTTCCTGACGAATCCCTCG	<i>orf1</i>	42-62	13
349R	5'-TCGGAACAAGGYGAGCTTAGA	<i>orf1</i>	349-327	13
164F	5'-AACCTAAGGGCGACATATGGTG	<i>orf1</i>	164-185	13
921R	5'-AAAAGGAGCCACCATCTACCG	<i>orf1</i>	921-901	13
949F	5'-GCATGTAGTGATGAAACACCTAGCTGC	<i>orf1</i>	949-975	13
2976R	5'-TGAAGATGAATGGATACTGGGGACC	<i>orf1</i>	2,976-2,952	13
3514F	5'-ACTGTAATGGCTGGTGTAAAC	<i>orf2</i>	3,514-3,534	30
3978R	5'-CATAGTTATCACCCCTTCACATA	<i>orf2</i>	3978-3956	28
3907	5'-ATGCTTATAAATTCGGCCC	<i>vanR</i>	3907-3925	28
4794R	5'-ATCCAATCCCAAGTTTCCC	<i>vanR</i>	4794-4775	28
3992F	5'-TTATTGTGGATGATGAACATG	<i>vanR</i>	3992-4012	30
4511R	5'-TCGGAGCTAACCACATTC	<i>vanR</i>	4,511-4,494	30
4676F	5'-AACGACTATTCCAAACTAGAAC	<i>vanS</i>	4,676-4,697	10
5769R	5'-GCTGGAAGCTCTACCCTAAA	<i>vanS</i>	5,769-5,749	10
5235F	5'-ATATCACGTTGGACAAAGC	<i>vanS</i>	5,235-5,253	30
7035R	5'-TTACGTCATGCTCCTCTGAG	<i>vanA</i>	7,035-7,017	30
8448F	5'-GATGAACGCTCTCATCATGC	<i>vanX</i>	8,448-8,467	12
9138R	5'-TTCCTGAGAAAACAGTGCTTCA	<i>vanY</i>	9,138-9,117	12
9341F	5'-ATGGATACGGGTTGCTTGATAT	<i>vanY</i>	9,341-9,362	13
10577R	5'-GGTACGGTAAACGAGCAATAATACG	<i>vanZ</i>	10,177-10,533	13
ISV650F	5'-AACTTCACGATAGCTAAGGTT	IS1216V	650-670	This study
ISV744R	5'-AAGATAGCAGGAGGAATGAC	IS1216V	744-725	This study
IS1542F	5'-TCAAGCCGATGACTATGA	IS1542	245-263	This study
IS1542R	5'-CTATTTCCGATAACCGTGTAT	IS1542	1076-1056	This study
IS1251F	5'-GCATCCACTGTAAACAACAG	IS1251	272-292	This study
IS1251R	5'-CGCTGTGTTTGACCATCCAT	IS1251	699-680	This study
IS1476F	5'-CGCAACGGTTCCTATACGAC	IS1476	310-329	This study
IS1476R	5'-GATTGAAGCTGCGATTGATG	IS1476	874-893	This study

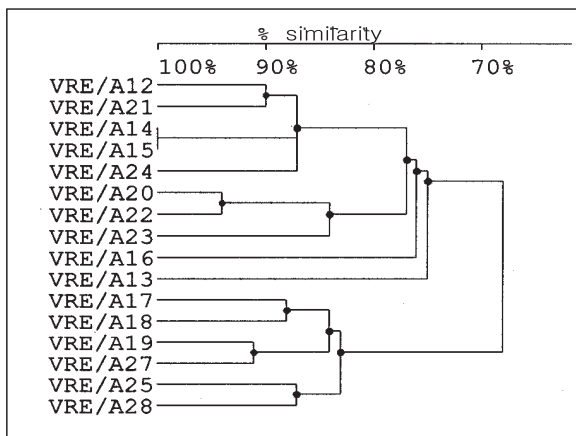


Fig. 1. Dendrogram produced following UPGMA analysis of the PFGE patterns of *SmaI*-digested DNA. The percent similarities between and within clusters are shown.

USA)를 사용하여 염기 서열을 분석하였다. *vanS* 증폭을 위하여 시발체는 4511F와 5769R을 사용하였다(Table 1).

## 결 과

### 1. MIC, 내성 유전자형 및 PFGE typing

반코마이신에 대한 MIC는 대상 균주 모두가 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상으로 고도 내성을 보여 VanA 표현형에 해당하였다. 반면 teicoplanin에 대한 MIC는 16-128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 나타내었는데, A27 균주의 경우 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 중등도 내성을 보였다. Multiplex PCR을 이용하여 대상 균주 모두에서 356 bp 크기의 *vanA* 내성유전자를 확인하였다(Table 2). PFGE 양상은 혈액분리주인 A14와 A15가 동일한 균주를 나타내었고, 90% similarity를 기준으로 하였을 때 3개의 cluster를 포함한 10개의 형을 나타내었다(Fig. 1).

Table 2. Glycopeptide resistance phenotypes and genotypes of VRE isolates

Strain NO.	Species	MIC(mg/L) of		Phenotype	Genotype
		Vancomycin	Teicoplanin		
A14	<i>E.faecium</i>	> 128	128	VanA	<i>vanA</i>
A15	<i>E.faecium</i>	> 128	128	VanA	<i>vanA</i>
A16	<i>E.faecium</i>	> 128	> 128	VanA	<i>vanA</i>
A17	<i>E.faecium</i>	> 128	32	VanA	<i>vanA</i>
A18	<i>E.faecium</i>	> 128	128	VanA	<i>vanA</i>
A19	<i>E.faecium</i>	> 128	32	VanA	<i>vanA</i>
A12	<i>E.faecium</i>	> 128	64	VanA	<i>vanA</i>
A20	<i>E.faecium</i>	> 128	32	VanA	<i>vanA</i>
A27	<i>E.faecium</i>	> 128	16	VanB	<i>vanA</i>
A28	<i>E.faecium</i>	> 128	32	VanA	<i>vanA</i>
A21	<i>E.faecium</i>	> 128	32	VanA	<i>vanA</i>
A25	<i>E.faecium</i>	> 128	32	VanA	<i>vanA</i>
A13	<i>E.faecium</i>	> 128	2	VanA	<i>vanA</i>
A22	<i>E.faecium</i>	> 128	32	VanA	<i>vanA</i>
A23	<i>E.faecium</i>	> 128	32	VanA	<i>vanA</i>
A24	<i>E.faecium</i>	> 128	32	VanA	<i>vanA</i>

Table 3. Structural analysis of Tn1546 in 16 VRE isolates

Strain No.	Specimen	42-349*	164-921	170-	949-	3514-	3907-	3992-	4676-	5235-	8448-	9341-	Type
				1913	2976	3978	4794	4511	5769	7035	9138	10577	
A14	blood	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	+	I
A15	blood	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	+	I
A16	blood	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	+	I
A17	blood	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	+	I
A18	blood	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	+	I
A19	blood	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	+	I
A12	blood	+	+	+	+	++	++	+	+	+	++	+	III
A20	bone	-	-	-	-	++	++	+	+	+	++	+	II
A27	cathter	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	+	Iv †
A28	cathter	-	-	-	-	++	++	+	+	+	++	+	II
A21	peri. fluid	-	-	-	-	++	++	+	+	+	++	+	II
A25	peri. fluid	-	-	-	-	++	++	+	+	+	++	+	II
A13	pl. fluid	-	-	-	-	++	++	+	+	+	++	+	II
A22	sputum	-	-	-	-	++	++	+	+	+	++	+	II
A23	sputum	-	-	-	-	++	++	+	+	+	++	+	II
A24	wound	-	-	-	-	++	++	+	+	+	++	+	II
BM4147			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, Presence of a PCR product of the expected size in Tn1546; ++, Presence of a PCR product of the larger than expected size in Tn1546; -, no PCR product was detected.

\*Nucleotide number of Tn1546. † Variant I

peri.= peritoneal, pl.= pleural.

## 2. 유전자 구조 분석

유전자 구조 분석에 따른 유형은 3가지로 구분되었다 (Table 3). I형은 *vanX-vanY* intergenic region에 *IS1216V*가

삽입되면서 *orf1*과 *orf2*의 결실이 동반된 유전자형이었고, II형은 *vanX-vanY* intergenic region에 *IS1216V* 삽입과 함께 *orf2-vanR* intergenic region에 *IS1542*의 삽입이 동반되면서 *orf1*의 결실이 있었다. III형은 II형과 같은

IS1216V와 IS1542의 삽입이 있으나 Tn1546의 좌측 결실은 동반되지 않은 형이었다. 대상 균주 중 A27 균주는 I형 변이형으로 I형의 유전적 특징과 함께 *vanS* 부위에 IS1216V 삽입이 동반된 형이었다. A27 균주를 대상으로 한 *vanS* 부위 염기 서열 분석상 점 돌연변이는 나타나지 않았다. 내성 유전자 유형 중 I형은 혈액 분리주가 대부분이었고, II형은 혈액이외의 검체에서 분리된 균주에서 대부분 나타내었다. 대상 균주 중 어떤 균주도 prototype과 같은 형을 나타낸 균주는 없었고, IS1251이나 IS1476의 삽입도 증명되지 않았다.

## 고 찰

지난 10년간 VRE는 전세계적으로 급증하였고, 병원 감염의 주요 원인균으로 부각되었다. VRE는 내성형에 따라 VanA, VanB, VanC, VanD, VanE 및 VanG의 6가지 형으로 분류되며[18-22], 이 중 다른 균으로 전이가 가능한 VanA와 VanB형이 감염 관리 차원에서 중요한 형이다. VanA형은 획득성, 유도성 내성을 나타내며, 반코마이신과 teicoplanin 모두에 내성을 보인다. *vanA* gene cluster는 Tn1546내에 포함되어 있다. Tn1546은 10.4 kb크기로 Tn3-subfamily에 속하며, transposase (*orf1*), resolvase (*orf2*) 및 7개의 유전자(*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* 및 *vanZ*)를 가진 *vanA* gene cluster의 3 부분으로 구성되어있다[23]. 이 중 *vanRSHAX* 유전자 부위는 유전자 변이 없이 유지되어있으나, Tn1546의 나머지 부분은 다양한 유전자 재조합으로 인한 변이를 나타낸다[8, 12, 13, 23]. 이러한 유전자 재조합에는 IS의 삽입, 좌우측 말단의 결실 및 점돌연변이 등이 포함되고, 이 중 IS 삽입이 Tn1546의 유전자 재조합의 주 요인으로 알려져 있다. Tn1546이 속해있는 Tn3 transposon은 non-conjugative transposon으로 자체적 conjugation 능력을 가지고 있지 않다. 그러므로 *vanA* 내성 유전자의 전파는 pheromone-responsive plasmid나 transferable elements로의 이동에 의하여 이루어지며, 이 이동이 가능토록 하는 것이 IS1216V와 같은 IS의 역할이다. Tn1546내에 삽입되는 것으로 알려진 IS는 IS1216V, IS1542, IS1251 및 IS1476 이다[24-27].

IS1216V는 다양한 지역에서, Tn1546내의 여러 부위에 삽입되는 것으로 보고되고 있다[24-26]. 최초로 보고된 것은 *vanX-vanY* intergenic region이었고, *vanR* 유전자의 upstream 부위 noncoding region에도 흔히 삽입된다. 본 연구에서 IS1216V는 대상 균주 모두에서 *vanX-vanY* intergenic region에 삽입되어있어 다른 보고와 일치하였으나, A27의 경우 *vanS*의 유전자내에도 삽입되어있었다. *vanS* 유전자는 protein kinase로 glycopeptide를 인지하여 *vanA* gene cluster를 활성화시키는 유전자로 *vanR*과 함께 통제 유전자의 역할을 한다. Hashimoto 등은 *vanA*형 VRE라고 하더라도 *vanS* 유전자의 점돌연변이가 발생 할 경우 teicoplanin에 감수성을 나타내게 된다고 보고하였다

[28]. A27 균주의 경우 teicoplanin MIC가 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 다른 균주에 비해 teicoplanin에 대해 저도 내성을 나타내었는데, *vanS* 유전자 중 염기 서열 5516 부위에 IS1216V가 삽입되어 있었고, 점돌연변이는 관찰되지 않았다. Teicoplanin에 대한 내성이 감소된 것은 *vanS* 유전자내에 삽입된 IS1216V의 영향으로 인한 표현형의 변화로 추정된다. *vanS* 내에 IS1216V가 삽입된 것은 국내에서는 최초이고, 국외에서는 두 번째 보고이다. 첫 번째는 Darini 등에 의하여 임상 분리주에서 발견된 바 있으나, 이 보고에서는 IS1216V 삽입으로 인한 표현형의 변화는 동반하지 않았다[24].

IS1542는 영국과 아일랜드를 비롯한 유럽의 임상 분리주와 동물 분리주에서 주로 보고되었고, 미국의 분리주에서는 보고된 바 없어 지역적 제한성을 나타낸다[25-27]. IS1542는 보고된 모든 균주에서 *orf2-vanR* intergenic region에 삽입되어있었다. 본 연구에서는 대상 균주 16 균주 중 10균주(63%)에서 IS1542가 삽입되어있었으며, 이는 국내 다른 보고와 유사한 결과였다[29].

IS1251은 대부분 *vanS-vanH* intergenic region에 삽입되고, 미국의 임상분리주에서 보고되었고, 유럽의 분리주에서는 보고된 바 없다[25-27]. 본 연구에서는 대상 균주 중 어느 균주에서도 IS1251은 발견되지 않았다. 상기 결과를 종합하여 보면, 국내 분리주는 대부분 IS1542의 삽입은 보이나, IS1251은 발견되지 않아서 국내 균주의 유전자 구조가 유럽의 균주와 유사한 양상을 나타낼 수 있다. 본 연구에서 대상 균주의 유전자형 분류에 의하면 혈액 분리주들은 A12 균주를 제외한 나머지 균주는 모두 I형을 나타내었고, 혈액이외의 검체 분리주들은 A27과 A13을 제외한 나머지 균주는 II형을 나타내었다. I형의 경우 Tn1546의 *orf1*과 *orf2* 부위가 모두 결실된 형으로 다른 형에 비해 *vanA* gene cluster의 크기가 작다. II형의 경우는 *orf1*을 포함한 좌측 말단의 결실이 있기는 하나 IS1542가 삽입되어 있어 I형에 비하면 *vanA* gene cluster의 크기가 크다. 혈액 분리주와 다른 검체 분리주의 유전자 구조형이 상이한 것에 대하여는 좀더 많은 균주를 대상으로 한 연구가 통해서 규명되어야 하겠으나, 혈액 내에 존재하기 위하여 유전자 크기 자체를 필수 유전자만을 보존시키는 방향으로 줄임으로써 생존을 위한 효율성을 높인 것으로 추정된다.

기존의 다른 보고에 의하면 임상 분리주 중 prototype을 나타내는 균주도 일부 있으나, 본 연구에서는 한 균주도 prototype은 나타내지 않아 이미 Tn1546의 유전자 재조합이 상당 부분 일어나 있음을 알 수 있었다. 이러한 유전자 재조합은 표현형과 유전자형의 불일치를 가져올 수 있고, 이로 인한 감염 관리의 혼선이 초래될 수 있다. VRE의 정확한 조기 검출은 1988년 이후 임상미생물 검사실의 주요 업무이고, 효율적인 감염 관리 사업 수립을 위하여 유행하는 내성 유전자형의 규명도 동반되어야 한다. 최근에는 분자생물학적 술식도 상당 부분 보편화된 실정

이므로 VRE에 대한 유전자형 검사도 동반되어야 한다고 사료된다.

## 요 약

**배 경** : 반코마이신 내성 유전자의 주로 plamid나 transferable elements에 의한다. Tn1546이 전이 가능한 매개 물질로의 이동시 insertion sequences (IS)의 역할이 필수적이며, 이로 인하여 Tn1546이 다양한 유전자 재조합을 보이게 된다. Tn1546에 삽입되는 것으로 알려진 IS는 IS1216V, IS1251, IS1476 및 IS1542 등이다. 이에 저자들은 국내에서 분리된 vanA형 *E. faecium*을 대상으로 IS 분포를 비롯한 분자생물학적 특성을 분석해보고자 하였다.

**방 법** : 아주대학교병원에서 분리된 vanA형 *E. faecium* 16주를 대상으로 하였다. Tn1546의 내부를 알려진 유전자 서열을 바탕으로 한 시발체를 이용하여 증폭하였다. 증폭산물을 대상으로 dideoxy termination법을 이용하여 유전자 염기 서열 분석을 하였다.

**결 과** : 대상 균주 모두에서 IS1216V가 발견되었고, 16균주 중 9균주에서 IS1542가 발견되었다. 한 균주는 vanS 유전자내에 IS1216V가 삽입되어있었다. Tn1546 유전자 구조 분석 결과 IS 삽입에 따라 크게 3가지 형으로 분류되었다. I형은 *orf1*과 *orf2*의 결실과 함께 IS1216V가 vanXY intergenic region에 삽입된 유형이었다. II형은 *orf2-vanR* intergenic region에 IS1542의 삽입, vanXY intergenic region에 IS1216V의 삽입 및 *orf1*의 결실이 동반된 형이었다. III형은 유전자의 결실 없이 IS1542와 IS1216V의 삽입이 있는 형이었다.

**결 론** : 대부분의 균주는 IS1216V와 IS1542의 삽입이 있었고, 이러한 유형으로 볼 때 유럽에서 분리된 VRE의 유전자 구조와 유사하였다. vanA gene cluster에 삽입된 IS 분포를 규명하는 것은 추후 분자생물학적 역학 분석시 유용할 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

1. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 1988; 319:157-61.
2. Anonymous. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992-April 2000, issued June 2000. *Am J Infect Control* 2000; 28:429-48.
3. Friden TR, Munsiff SS, Low DE, Willey BM, William G, Faur Y, Eisner W et al. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. *Lancet* 1993; 342:76-9.
4. Bates J, Jordens Z, Selkon JB. Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1993; 342:490-1.
5. Klare I, Heier H, Claus H, Reissbrodt R, Witte W. VanA mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 125:165-72.
6. Aarestrup FM. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist* 1995; 1:255-7.
7. Montecalvo MA, de Lancestre H, Carraher M, Gedris C, Chung M, K. Van Horn, Wormser GP. Natural history of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16:680-5.
8. Handwerker S, Skoble J, Discotto LF, Pucci MJ. Heterogeneity of the vanA gene in clinical isolates of enterococci from the Northeastern United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:362-8.
9. Mato R, de Lancestre H, Carraher M, Roberts RB, Tomasz A. Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York City Hospital. *Microb Drug Resist* 1996; 2:309-17.
10. 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 Microb* 2001; 39:1165-8.
11. Haaheim H, Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, Sundsfjord A. Long PCRs of transposons in the structural analysis of genes encoding acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Biotech* 1998; 24:432-7.
12. Brown AR, Townsley AC, Amyes SGB. Diversity of Tn1546 elements in clinical isolates of glycopeptide-resistant enterococci from Scottish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1309-11.
13. Simonsen GS, Myhre MRM, Dahl KH, Olsvik O, Sundsfjord A. Typeability of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant enterococci using long-range PCRs and specific analysis of polymorphic regions. *Microb Drug Resist* 2000; 6:49-57.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5th ed. Approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2000.
15. 이위교, 정민권, 곽연식. Vancomycin 내성 장구균의 분리율, 항균제 감수성 및 내성형에 관한 연구. 대한 임상병리학회지 1998; 8:51-6.
16. Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. Comparison of genomic DNAs of different en-

- terococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. J Clin Microbiol* 1990; 28:2059-63.
17. Ausubel FM, Brent R, Kinston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA et al. *Current protocols in molecular biology, section 2.4. Greene Publishing Associates, Brooklyn, N. Y. 1989.*
  18. Arthur M, Couvalin P. *Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:1563-71.
  19. Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. *Vancomycin resistance gene vanC is specific to Enterococcus gallinarum. Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:2005-8.
  20. Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. *VanD-type glycopeptide-resistant Enterococcus faecium BM4339. Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2016-8.
  21. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahn DF, Courvalin P. *VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in Enterococcus faecalis BM4405. Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2161-4.
  22. McKessae SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. *Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus in Enterococcus faecalis. Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3224-8.
  23. Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. *Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in Enterococcus faecium BM4147. J Bacteriol* 1993; 175:117-27.
  24. Darini AL, Palepou MF, James D, Woodford N. *Disruption of vanS by IS1216V in a clinical isolate of Enterococcus faecium with VanA glycopeptide resistance. Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:995-6.
  25. Palepou MF, Adebisiyi AMA, Tremlett CH, Jensen LB, Woodford N. *Molecular analysis of diverse elements mediating VanA glycopeptide resistance in enterococci. J Antimicrob Chemother* 1998; 42:605-12.
  26. Willems RJL, Top J, van den Braak N, van 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.
  27. Woodford N, Adebisiyi AMA, Palepou MF, Cookson BD. *Diversity of VanA glycopeptide resistance elements in enterococci from humans and nonhuman sources. Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:502-8.
  28. Hashimoto Y, Tanimoto K, Ozawa Y, Murata T, Ike Y. *Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant Enterococcus strains result in high-level vancomycin resistance and low level teicoplanin resistance. FEMS Microbiol Lett* 2000; 185:247-54.
  29. 최연화, 이영선, 이점규, 유재일, 김치경, 김봉수. 환자 와 가축에서 분리된 vanA형 VRE의 분자유전학적 연관성. *감염* 2001; 33:383-91.
  30. Stobberingh E, van den Bogaard A, London N, Driessen C, Top J, Willems R. *Enterococci with glycopeptide resistance in Turkeys, Turkey farmers, Turkey slaughterers, and urban residents in the south of the Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2215-21.