

Evaluation of a Rapid Enrichment-PCR Method for the Detection of *vanA* Vancomycin-resistant Enterococci in Fecal Specimens

Sollip Kim¹, Heungsung Sung¹, Hong Sun Jeon¹, Suk Ja Park¹, Sang-Hyuk Park², Mi-Na Kim¹

¹Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center,

²University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Rapid and accurate surveillance is crucial in controlling vancomycin-resistant enterococci (VRE). Culture-based surveillance takes more than 4 days and direct polymerase chain reaction (PCR) is rapid but compromised by a low sensitivity. In this study, we evaluated the performance of an enrichment-PCR method for *vanA* VRE surveillance.

Methods: In July 2006, 100 fecal specimens were inoculated to Enterococcosel agar (EA) and Enterococcosel broth (EB) containing 6 µg/mL vancomycin. After 1 or 2 day-incubation bacterial pellets were obtained from 1 mL of blackened EB and *VanA* PCR were performed with DNA extract of the pellets (EB+PCR). Blackened EB were also subcultured on EA (EB+EA). Black colonies on EA were submitted to identification and antimicrobial susceptibility test and, if necessary, they were confirmed with *vanA* PCR. The electronic medical records were reviewed for previous history of colonization or infection of VRE.

Results: A total of 59 specimens were positive for

VRE by at least one method. *VanA* VRE was detected from 43, 54, and 53 specimens by EA, EB+PCR, and EB+EA, respectively; 54 EB+PCR positive specimens comprised 43 EA-positive, 7 EA-negative/EA+EB-positive and 4 EB+PCR-only-positive, and 11 EA-negative/EB+PCR-positive specimens were from the previous VRE-colonizers. The five EB+PCR-negative specimens were EB+EA-positive, suggesting false negativity, probably due to PCR inhibitors. The average turn-around time for EA was 88±35 h, whereas 98% of EB+PCR positive results were obtained at day 1.

Conclusion: Enrichment in EB followed by PCR (EB+PCR) appears to be a rapid and sensitive method for the detection of *vanA* VRE in stool specimens. Internal control would be required to detect false negative results. (Korean J Clin Microbiol 2007;10:44-48)

Key Words: Vancomycin-resistant enterococci, *vanA* PCR, Enrichment broth

서 론

최근 장구균에 의한 심내막염, 패혈증, 요로감염 등의 심각한 임상감염과 원내감염이 증가하고 있다[1]. 미국에서는 장구균이 원내감염 패혈증의 세 번째로 흔한 원인균으로 알려져 있다[2,3]. 국내에서는 장구균이 임상검체에서 분리되는 균의 11.8%를 차지하고 있으며, 분리된 *E. faecium*의 25%가 반코마이신 내성이며 지속적인 증가 양상을 보이고 있다[4]. 이러한 장구균 감염의 증가는 부분적으로 면역저하자의 증가와 관련이 있지만, 다제내성 장구균의 확산 때문이기도 하다[5].

본원의 경우 10여 년간 반코마이신내성장구균(vancomycin-resistant enterococci, VRE) 발생이 계속 증가하여 2006년 상반기

기에 전체 임상검체에서 분리되는 *E. faecium*의 40% 정도가 반코마이신 내성으로 나타나[unpublished data] 감염관리를 위해 VRE 감시배양의 필요성이 증가하고 있다. 본원에서 분리되는 획득성 VRE는 모두 반코마이신에 고도내성을 보이는 *vanA* VRE로[6] 표현형질이 확실하기 때문에 고형배지로 선별 후 동정과 항균제 감수성 검사로 확인하는 방법을 써 왔다.

VRE의 신속하고 민감한 검출은 VRE 감염 환자에게는 적절한 항균제 치료를 가능하게 하고, 균 정착이 있는 환자에게는 적절한 감염관리를 시행하여 VRE의 전파를 예방할 수 있게 한다[5]. VRE의 감시배양은 통상 VRE에 선별적인 고형배지에 접종하거나 액체배지에 증균 후 고형배지에 접종하는 방법을 사용하는데 검사결과 보고까지 4~5일이 소요되어 VRE 감염 관리에 문제가 되고 있다[7,8]. 이에 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 등을 이용하여 신속한 VRE 감시를 하고자 하는 시도들이 있었다[5,9,10].

본 연구에서는 감시배양을 의뢰한 임상검체에 대하여 선택 액체배지로 증균시킨 후 *vanA* PCR을 시행하는 검사법을 기존

Received 3 January, 2007, Accepted 5 February, 2007

Correspondence: Mi-Na Kim, Department of Laboratory Medicine and Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, 388-1, Pungnap 2-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea. (Tel) 82-2-3010-4511, (Fax) 82-2-478-0884, (E-mail) mnkim@amc.seoul.kr

의 방법과 비교함으로써 신속증균 PCR법의 유용성을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 검체

2006년 7월 13일부터 31일까지 서울아산병원 진단검사의학과에 VRE 감시배양을 위해 의뢰된 대변 또는 직장도말 100검체를 대상으로 하였다.

2. VRE 검출방법

1) **선별고형배지에 직접 접종법(EA):** 반코마이신 $6\mu\text{g/mL}$ 가 들어있는 자가 제조한 Enterococcosel 한천(EA)에 검체를 접종한 후 35°C 에서 2일 동안 배양하였다. 검은색으로 자란 집락을 선택하여 다시 혈액한천배지에 접종한 후 하룻밤 배양하여 자란 집락으로 생화학적 동정과 디스크확산법에 의한 항균제감수성검사를 시행하였다[11]. 생화학적 동정은 집락의 성상, 운동성, bile esculin 검사양성, 6.5% NaCl에서 증식, 1-*O*-methyl- α -D-glucopyranoside (MGP)로부터의 산 생성능, arginine dihy-

drolase, arabinose 환원능, tellurite 내성 등을 이용하여 판단하였다.

2) **신속증균 PCR법(EB+PCR):** 반코마이신 $6\mu\text{g/mL}$ 가 들어있는 Enterococcosel 액체배지(EB)에 검체를 접종한 후 35°C 에서 배양하고 1일과 2일째 판독하였다. 배지가 검게 변하면 1 mL를 덜어 14,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 균 침사를 얻었다. 이를 증류수로 1회 세척 후 GenElute Bacterial Genomic DNA kit (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 DNA를 분리하였다. *vanA* 유전자에 특이적인 시발체를 이용하여 PCR을 시행하였다[12]. 반응조건은 94°C 에서 2분간 denaturation 후 94°C 30초, 56°C 45초, 72°C 45초로 35회 시행하고 마지막으로 72°C 에서 5분간 extension하였다. 최종산물을 전기영동하여 356 bp에 해당하는 밴드를 확인하였다. 양성대조군으로는 *E. faecalis* A256 (*vanA*)를 사용하였다[12].

3) **신속증균 후 선택배지에 접종법(EB+EA):** 검게 변한 EB를 EA에 계대배양하고, 검은색 집락을 따서 다시 혈액한천배지에 계대배양하였다. 0.5~1.0 mm 크기의 용기되고 회백색을 띠는 장구균에 합당한 집락에 대해 생화학 동정과 반코마이신, 테이코플라닌에 대한 감수성 검사를 디스크확산법으로 시행하

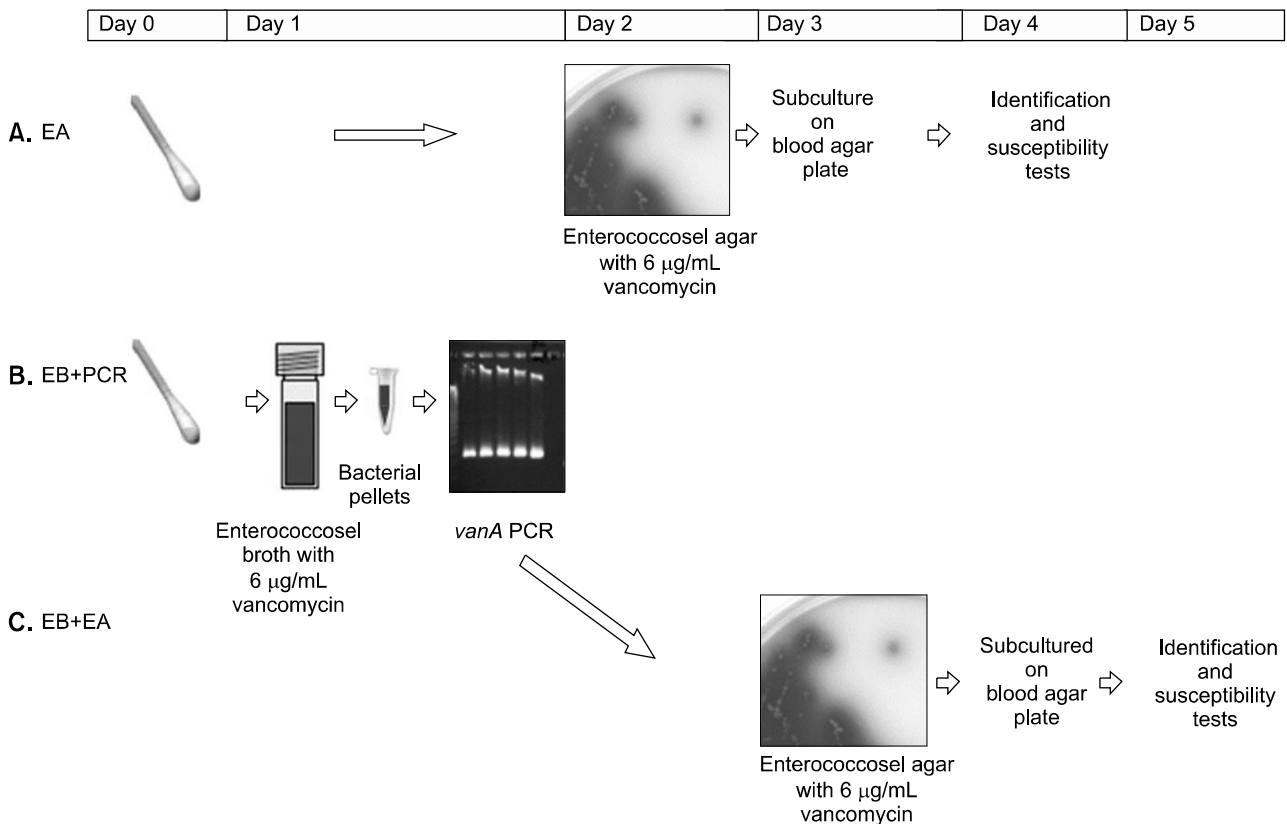


Fig. 1. Flowchart showing the shortest course of the positive results in EA, EB+PCR, EB+EA methods. (A) Black colonies on EA were subcultured on blood agar plate and then identification and susceptibility tests were performed with the suspected colonies. (B) The bacterial pellets were obtained from blackened EB, and DNA extraction and *vanA* PCR were performed on the same day. (C) Blackened EB were subcultured on EA and then black colonies on EA were processed as in EA method.

고, 검사법 간에 서로 다른 결과를 보인 경우 확인을 위하여 고형배지에 자란 집락에서 DNA를 추출하여 *vanA* 유전자 검출을 위한 PCR을 시행하였다(Fig. 1).

3. 의무기록 조회

EA로 VRE 선별검사를 실시했을 때의 검체접수에서 결과보고까지의 시간을 조사하였다. 환자의 의무기록을 검토하여 이전의 임상검체 또는 VRE 감시배양에서 VRE가 분리되었는지 조사하였다.

결 과

최소 한 가지 방법에서 VRE가 검출된 경우는 59검체(59%)였다. 이 중 EA에서는 43검체(72.9%), EB+PCR에서는 54검체(91.5%), EB+EA에서는 53검체(89.8%)가 양성이었다. 세 검사에 모두 양성 41검체, EA와 EB+PCR 양성 EB+EA 음성 2검체, EA 음성 EB+PCR, EB+EA 양성 7검체, EB+PCR만 양성 4검체, EB+EA만 양성 5검체, 모두 음성 41검체였다. 모든 VRE 균주는 *vanA* 표현형을 보였고, PCR에서 *vanA* 양성이었다. EB+PCR 양성 중 43검체는 EA에도 양성이고, 7검체는 EA 음성이고 EA+EB 양성이었다. EB+PCR에만 양성인 4검체는 이전에 VRE가 분리되었던 환자의 검체였다. EB+PCR 음성이고 EB+EA 양성인 5검체는 EA에 자란 집락으로 PCR 검사를 한 결과 *vanA*형임이 확인되었다(Table 1).

EA는 검체접수에서 최종보고까지 평균 88±35시간이 걸렸고, EB+PCR은 1일째 53검체에서, 2일째 1검체에서 *vanA* VRE를 검출하였다. EB+EA는 양성인 경우 5일 정도 소요되었다(Fig. 1).

고 찰

세 가지 검사 방법에서 모두 결과가 일치한 경우는 82검체(82%)였으며, 불일치한 경우는 18검체(18%)였다. EB+PCR은 평가한 세 가지 검사법 중 민감도가 가장 높았다. 이번 연구에서 EB+PCR은 EA 양성인 검체를 모두 검출하고, 11검체(18.6%)를 더 검출하였는데 이 중 7검체는 EB+EA에도 양성이고, EB+PCR에만 양성인 4검체 또한 이전 감시배양에서 양성이었던 환자의 검체로서 EB+PCR의 민감도가 높은 데서 기인하는 불일치로 판단하였다. VRE 감시배양에서 VRE를 선택적으로 배양하는 고형배지를 이용하는 경우에는 민감도가 검사자의 집락판독에 의존하게 된다. 또한 EA에서는 혈액배양에서 자란 장구균의 전형적인 집락모양을 관찰할 수 없고 검은색 집락만을 선택하기 때문에 대변검체를 배양하면 반코마이신에 내재적 내성인 *Pedococcus*, *Leuconostoc* 등과[13] 일부 group D streptococci나 enterococci 등이 반코마이신 내성이 없이도 검은

Table 1. Results of EB+PCR, EA, EB+EA method

EA	EB+PCR	EB+EA	No. of isolates
+	+	+	41
+	+	-	2
-	+	+	7
-	+	-	4
-	-	+	5
-	-	-	41

Abbreviations: EB, enterococcosel broth; EA, enterococcosel agar.

색 집락으로 자라기 때문에 반드시 동정과 감수성 검사로 확인해야 한다. 이에 비해 선택액배지에서 증균시켜 균 침사로부터 DNA를 추출하면 집락판독에 영향을 받지 않는 장점이 있다.

EB+PCR 음성, EB+EA 양성인 5검체는 대변에 포함된 PCR 억제물질들에 의한 PCR 위음성을 시사하였다. 이들 5검체 중 4검체는 이전에 감시배양이나 임상검체에서 VRE가 나온 적이 없었던 환자들의 것으로 VRE 균 수가 상대적으로 적었을 것으로 추정된다. Palladino 등[5]의 연구를 보면 직장도말을 액체배지에 증균시킨 후 실시간 다중 PCR을 시행한 경우 억제율(inhibition rate)이 10%인 반면 검체를 직접 PCR한 경우 억제율이 55%였다. 이 결과를 볼 때 검체를 직접 PCR하는 방법은 임상검사에 적용하기 어렵다. 2006년 Drews 등[9]은 직장도말로 PCR을 시행하였는데, 내부대조물질이 음성인 경우 DNA를 다시 추출하고 10배로 희석하는 방법을 이용해 PCR 억제현상을 해결하였다. 이번 연구에서는 검사에 사용한 정성 PCR의 검출 한계치를 검증하지 않았고 억제물질에 의한 위음성을 검출하기 위한 내부대조물질을 사용하지 않은 한계점이 있었다. 따라서 PCR 위음성 문제를 해결하기 위해서는 내부대조물질을 사용하여 PCR 억제현상을 발견하고 DNA 재추출 및 검체 희석 등의 조치를 취할 수 있어야 하겠다.

EB+PCR 양성 검체는 대부분 1일째에 액체증균배지가 검체 변하여 한 검체를 제외한 모든 검체의 결과를 1일째에 얻을 수 있었다. 반면 EA는 88±35시간이 소요되었다. EA에 자란 집락을 다시 비선택배지에 배양한 후 생화학적 동정을 하는 방법은 4~5일이 걸린다[7,8]. 이 동안 병원환경이 VRE 감염 환자 또는 균 정착 환자로부터 VRE에 오염될 가능성이 있고 다른 환자에게 전파될 수 있어 시기적절한 감염관리에 문제가 된다[5]. Pearman[10]은 대규모 VRE 유행을 종결시킨 경험에서 VRE 감시의 신속성이 결정적인 역할을 했다고 보고하였다. 1995년 PCR을 이용한 *van* 유전자 검출법이 소개되어[14] 고형배지에 자란 집락으로 PCR을 시행하여 VRE를 동정할 수 있게 되었다[14,15]. PCR을 임상검체에 직접 적용하면 8시간 안에 결과를 얻을 수 있는 반면 PCR 억제물질로 인해 민감도가 낮았다[16]. 이에 비해 임상검체를 액체선택배지에 증균시켜 PCR

로 확인하는 방법은 24~30시간 내에 동정할 수 있고 기존의 감시배양을 대체할 만한 민감도, 특이도를 보였다[5,17]. 액체 배지 증균 후 실시간 다중 PCR법으로 *vanA*, *vanB* 유전자를 함께 검출하는 경우 24~28시간 안에 결과를 보고할 수 있고, 민감하며, 내부대조물질을 사용함으로써 PCR 억제물질에 의한 위음성도 교정하여 우수한 수행능을 보였다[5,9]. 본 연구에서처럼 정성 PCR을 시행하면 실시간 PCR보다 2~3시간이 더 소요되지만, 2가지 방법 모두 검체 접촉한 다음날 양성결과를 보고할 수 있는 검사체계로서 임상에서 느끼는 turn-around time에는 큰 차이가 없을 것이다. 국내 검사실에서 실시간 PCR 장비를 갖추지 못한 곳이 많고 검사비용 또한 비싸기 때문에 EB+PCR이 실제적인 방법일 것으로 생각한다. 본 연구에서는 *vanA* VRE의 검출만을 목표로 하였기 때문에 액체배지 증균 후 정성 PCR법을 고안하는 데 유리한 점이 있었다. *vanA* 외에 다른 유전자형도 검출하려면 다중 PCR을 시행해야 하고, 이 경우 민감도가 떨어질 가능성이 있으므로[18] 실시간 정량 PCR을 시행하여 민감도를 보완하거나 정성 PCR의 민감도를 높이는 방법이 필요할 것이다.

EB+PCR에만 양성인 4검체는 이전에 VRE가 분리된 환자에서 추적감시를 하는 검체였기 때문에 위양성 가능성은 낮다. PCR은 항상 교차오염에 의한 위양성 가능성이 있기 때문에 특이도를 검증할 수 있는 방법이 필수적이다. 이번 연구에서 PCR 음성대조물질은 모두 음성결과를 보였다. 기존의 VRE가 분리된 환자들을 대상으로 감시배양을 하는 검체가 대부분이었기 때문에 대상검체의 59%가 VRE 양성으로 양성예측도가 높았다. 또한 과거 검사가 양성인 것으로 진양성 여부를 판단하는 것이 가능했다. 하지만 VRE 집락률이 낮은 환자군을 대상으로 처음 감시하는 경우라면 수행능 평가에서 특이도가 더 중요한 요인이 될 것이다[19]. 특이도에 대한 검증은 향후 다양한 환자군에서 많은 수의 검체로 더 평가할 필요가 있다.

결론적으로 EB+PCR은 VRE 보균 여부를 감시하는 데 EA를 대체할 수 있는 민감하고 신속한 방법이었다. EB+PCR의 민감도와 특이도를 보증할 수 있는 내부대조물질이 필수적일 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Emori TG and Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev 1993;6:428-42.
- Mascini EM and Bonten MJ. Vancomycin-resistant enterococci: consequences for therapy and infection control. Clin Microbiol Infect 2005;11(Suppl 4):43-56.
- Jones RN, Marshall SA, Pfaller MA, Wilke WW, Hollis RJ, Erwin ME, et al. Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE Program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results, and laboratory testing accuracy. SCOPE Hospital Study Group. Diagn Microbiol Infect Dis 1997;29:95-102.
- Lee K, Lim CH, Cho JH, Lee WG, Uh Y, Kim HJ, et al. High prevalence of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and increase of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in Korea: a KONSAR program in 2004. Yonsei Med J 2006;47:634-45.
- 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.
- Yoo SJ, Sung H, Cho YU, Kim MN, Pai CH, Kim YS. Role of horizontal transfer of the transposon *Tn1546* in the nosocomial spread of *vanA* vancomycin-resistant enterococci at a tertiary care hospital in Korea. Infect Control Hosp Epidemiol 2006;27:1081-7.
- Willey BM, Kreiswirth BN, Simor AE, Willaims G, Scriver SR, Phillips A, et al. Detection of vancomycin resistance in *Enterococcus* species. J Clin Microbiol 1992;30:1621-4.
- Willey BM, Jones RN, McGeer A, Witte W, French G, Roberts RB, et al. Practical approach to the identification of clinically relevant *Enterococcus* species. Diagn Microbiol Infect Dis 1999;34:165-71.
- 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.
- Pearman JW. 2004 Lowbury Lecture: the Western Australian experience with vancomycin-resistant enterococci - from disaster to ongoing control. J Hosp Infect 2006;63:14-26.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S16. Wayne, PA; CLSI, 2006.
- Lee SY and Pai CH. Fecal colonization with vancomycin-resistant enterococci (VRE): clinical and epidemiologic features. Korean J Clin Pathol 1997;17:743-56.
- Ruoff KL. *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and Other Infrequently Isolated Aerobic Catalase-negative, Gram-positive Cocci. In: Murray PR, ed. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed, Washington; ASM Press, 2003:434-44.
- 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.
- Coombs GW, Kay ID, Steven RA, Pearman JW, Bertolatti D, Grubb WB. Should genotypic testing be done on all phenotypically vancomycin-resistant enterococci detected in hospitals? J Clin Microbiol 1999;37:1229-30.
- Petrich AK, Luinstra KE, Groves D, Chernesky MA, Mahony JB. Direct detection of *vanA* and *vanB* genes in clinical specimens for rapid identification of vancomycin resistant enterococci (VRE) using multiplex PCR. Mol Cell Probes 1999;13:275-81.
- Roger M, Faucher MC, Forest P, St-Antoine P, Coutlee 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.
- 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.
- John R, Lifshitz MS, Jhang J, Fink D. Post-analysis: Medical Decision-making. In: mcpherson RA, Pincus MR, eds. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21st ed, Philadelphia; Saunders Elsevier, 2007:68-75.

=국문초록=

대변검체에서 *vanA*형 반코마이신 내성 장구균을 검출하기 위한 신속 증균 중합효소연쇄반응법 평가

울산대학교 의과대학 서울아산병원 ¹진단검사의학과, ²울산대학교 의과대학 의학과

김슬윳¹, 성홍섭¹, 전홍선¹, 박숙자¹, 박상혁², 김미나¹

배경: 반코마이신내성 장구균(vancomycin-resistant enterococci, VRE)을 신속하고 민감하게 검출하는 감시배양 체계는 VRE 전파를 막는 데 매우 중요하다. 감시배양 검체를 배양하여 VRE를 검출, 확인하는 데는 4일 이상 소요되며, 검체에서 직접 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하는 것은 민감도가 낮다. 본 연구에서는 *vanA* VRE 감시배양을 위한 신속증균 PCR법의 수행능을 평가하고자 하였다.

방법: 2006년 7월 13일부터 31일까지 VRE 감시배양을 위해 의뢰된 대변 또는 직장도말 검체 100개를 대상으로 세 가지 검사를 비교하였다. 각 검체를 반코마이신 6 µg/mL이 든 Enterococcosel 평판배지(EA)와 액체배지(EB)에 배양하였다. EB를 접종 후 1일째와 2일째에 판독하여 검체 변환 경우 1 mL를 따서 균 침사를 얻고 DNA를 추출하여 *vanA* PCR을 실시하고(EB+PCR), 남은 EB를 EA에 계대배양하였다. EA는 2일 후 판독하여 검은색 집락을 골라 동정과 항균제감수성 검사를 시행하고 필요시 *vanA* PCR로 확인하였다(EB+EA). VRE 감염 여부와 감시배양 결과를 전자의무기록으로 조회하였다.

결과: 59검체가 최소 한 가지 이상의 방법에서 VRE 양성이었다. EA, EB+PCR, EB+EA에서 각각 43, 54, 53검체가 양성이었다. EB+PCR 양성 54검체는 EA 양성 43개, EA 음성/EA+EB 양성 7개, EB+PCR에만 양성 4개 등이었다. 11개의 EA 음성/EB+PCR 양성 검체는 이전에 VRE가 분리되었던 환자의 검체였다. EB+PCR 음성/EB+EA 양성인 5검체는 EB+PCR법에서 PCR 억제물질에 의한 위음성 가능성이 있었다. EA는 검체접수에서 최종보고까지 평균 88±35시간이 걸렸고, EB+PCR은 양성검체의 98%에서 1일째에 결과를 얻을 수 있었다.

결론: 신속증균 PCR법은 *vanA* VRE를 검출하는 데 신속하고 민감한 방법이었다. 신속증균 PCR법의 위음성을 검출하고 교정하기 위해 내부대조물질이 필요할 것이다. [대한임상미생물학회지 2007;10:44-48]

교신저자 : 김미나, 138-736, 서울시 송파구 풍납2동 388-1
울산대학교 의과대학 서울아산병원 진단검사의학과
Tel: 02-3010-4511, Fax: 02-478-0884
E-mail: mnkim@amc.seoul.kr