

## 물 환경 시료에서 반코마이신 내성 엔테로코커스(VRE) 검출을 위한 Multiplex PCR의 적용성 연구

김민정<sup>†</sup> · 임보현 · 남세희 · 권순복 · 김기돈 · 김용연 · 이상태

한국수자원공사 수돗물분석연구센터

## Application of Multiplex PCR to detect Vancomycin Resistant Enterococcus (VRE) in Environmental Water in Korea

Min-jeong Kim<sup>†</sup>, Bo-Hyun Lim, Se Hee Nam, Soon Bok Kwon,  
Gi Don Kim, Yong Yeon Kim, and Sang Tae Lee

Korea Water Resources Corporation, Water Analysis & Research Center, Daejeon 306-711, Korea

Received June 23, 2009, accepted September 23, 2009

Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) can be very dangerous to human health particularly because vancomycin resistance genes can be transferred to other gram-positive bacteria. Multiplex Polymerase Chain Reaction(Multiplex PCR) has been reported as an effective method to detect VRE in clinical samples. Although researches on VRE in environmental water have been reported, they are not enough to characterize VRE pollution because each of them has collected limited number of samples. In this study, we analyzed 27 water samples collected from Korean rivers and lakes and performed Multiplex PCR to detect VRE in the water samples. From this result, it was found that multiplex PCR could be a useful method to detect VRE in environmental water.

**Key words:** Enterococcus, Vancomycin-Resistant Enterococcus, Multiplex PCR

### 1. 서 론

엔테로코커스(*Enterococcus* spp.)는 사람의 장에서 발견되는 그람양성 구균 중 하나로 하천이나 호소, 수영장, 해수 등 다양한 물 환경에 분포하고 있다. 이들의 인체 감염은 대부분 일부 종(*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans*, *E. casseliflavus* 등)에 국한되고, 그 병원성도 낮은 것으로 보고되고 있지만 경우에 따라 요로감염, 심내막염, 복막염, 창상감염 등을 유발하기도 한다<sup>1-3</sup>. 엔테로코커스는 포유류와 조류(bird)의 장에 존재하는 일반적 세균으로 알려져 있지만, 각종 질병치료 및 농·어업 등 광범위하게 항생제 사용이 증가함에 따라 다양한 항생제에 내성을 지니게 되었으며, 특히 아미노글리코사이드(aminoglycoside)와  $\beta$ -락탐( $\beta$ -

lactam)계 항생제에 대해서는 높은 내성을 갖는 것으로 보고되고 있다<sup>4</sup>. 엔테로코커스에 의한 감염증 치료에는 반코마이신(vancomycin)이 유일한 치료제로 사용되어 왔는데<sup>5,6</sup>, 1988년 영국에서 반코마이신 내성 엔테로코커스(Vancomycin Resistant Enterococci, VRE)가 처음으로 분리 동정된 이후 우리나라를 포함한 유럽, 미국, 오스트리아 등 여러 국가에서 VRE가 계속 분리되어 보고되고 있다<sup>7-9</sup>. 건강한 사람의 경우 VRE의 감염은 대부분 질병을 유발하지 않지만, 면역력이 약한 다른 환자나 노약자에게 전파할 가능성이 있고, 특히 반코마이신 내성 유전자가 다른 엔테로코커스나 병원성이 높은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)과 같은 그람 양성균으로 전이 될 수 있으므로 VRE를 심각한 병원균으로 구분하여 관리할 필요가 있다<sup>10</sup>.

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-42-629-2033, Fax: +82-42-629-2079, E-mail: herbej@kwater.or.kr

VRE는 일부 항생제(반코마이신과 테이코플라닌)에 대한 내성 정도와 항생제 내성 유전형의 유래 및 전이성에 따라 VanA, VanB, VanC, VanD, VanE 표현형으로 구분된다. VanA, VanB, VanD 표현형은 반코마이신에 대한 내성이 높지만 VanC, VanE 표현형은 상대적으로 내성이 낮고, 테이코플라닌에 대해서는 VanA 표현형만 높은 내성을 갖으며, 이러한 항생제에 대한 내성을 갖는 유전형은 VanC 표현형을 제외하고는 모두 획득된 유전형으로 보고되고 있다. 또한 VanA, VanB 표현형은 이러한 항생제 내성 유전형이 다른 그람양성균에 전이되는 것으로 보고되고 있다. VanC 표현형은 다시 VanC-1, VanC-2, VanC-3로 세분화 되는데 VanC-2와 VanC-3는 유전자 서열의 유사성 때문에 VanC-2/3으로 표현 한다<sup>11-13</sup>.

VRE를 분리 동정하기 위해서는 주로 디스크 확산법을 사용하여 항생제 감수성을 판정하고, 고체배지 희석법으로 최소성장 억제농도를 결정한다<sup>14,15</sup>. 그러나 VRE의 항생제 내성을 나타내는 유전자에 대해 PCR을 수행하면 번거로운 과정 없이 VRE를 표현형별로 분리 검출할 수 있다<sup>16,17</sup>. 특히 대표적인 VanA, VanB, VanC 세 표현형에 대해 다중 중합효소 연쇄반응(Multiplex PCR)을 적용하면 VRE를 보다 신속하게 검출할 수 있을 것이다. 임상 검체나 병원에서 나오는 폐기물에서의 VRE 검출 여부는 많은 연구에서 보고되고 있는데<sup>18-21</sup>, 표현형별 VRE 유전자에 특이적인 primer set를 이용한 Multiplex PCR을 통해 임상 검체로부터 VRE를 검출할 수 있다는 사실이 보고되었다<sup>22-24</sup>. 하지만 임상시료가 아닌 물 환경 시료에 대한 VRE 오염 분포에 대한 연구는 일부 수원에 국한 되어 있어 보다 다양한 수계에 대한 연구가 요구되는 실정이다<sup>25,26</sup>. 이에 본 연구에서는 전국의 다양한 물 환경 시료를 대상으로 엔테로코커스 오염 분포를 조사하였으며, 이 중 검출된 엔테로코커스를 대상으로 Multiplex PCR을 적용하여 VRE의 검출 여부를 확인하고 그 분포 특성을 살펴보고자 하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1 막여과법을 이용한 정수장 별 엔테로코커스 오염 실태조사

각각의 조사 지점으로부터 채취한 물 환경 시료 100 mL를 여과장치를 이용하여 막(pore 0.45  $\mu$ m,  $\phi$ 47 mm, millipore, HAWG047S6)에 여과 하였다. 이 때 시료의 탁질 정도에 따라 10~100배 희석하여 희석하지 않은 시료와 동시에 분석을 실시하였다. 여과한 막은 mE 배지(mE agar, Difco, 233320)에 옮겨 41 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C에서 48 시간 배양한 후 분홍색 또는 짙은 붉은 색의 집락을 관찰하였다. 분홍색 또는 짙은 붉은 색의 집락이 검출된 여과막은 다시 EIA 배지(Esculin Iron Agar, Difco, 248810)에 옮기고 41 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C에서 20~30분간 배양한 후 검게 변하는 집락의 수를 계수하여 엔테로코커스 양성으로 확정하였으며, 100 mL 당 집락수(CFU, Colony Forming Unit/100 mL)로 산출하였다. 엔테로코커스로 확인한 집락은 genomic DNA 추출을 위해 BHI 배지(Difco, 241830)에 삼분 도말하여 단일집락으로 분리하였다.

### 2.2 VRE 표준균주 및 표준균주의 genomic DNA

반코마이신 민감성 엔테로코커스 균주와 Van C-2 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양받아 DNA 추출 키트(Intron, 17121)를 사용하여 genomic DNA를 준비하였다. Van A, Van B, Van C-1의 경우 항생제내성균주는행으로부터 genomic DNA를 구매하여 사용하였다(Table 1).

### 2.3 다중중합효소 연쇄반응(Multiplex PCR)

엔테로코커스 양성 집락들을 분리하여 BHI 배지에 도말배양하고 DNA 추출키트를 사용하여 각 집락들로부터 genomic DNA를 추출하였다. VRE의 Multiplex PCR은 이전에 보고된 반코마이신 내성 유전자 염기

**Table 1.** Reference strains of vancomycin resistant or sensitive enterococci used in this study.

	Strain No.	Strain Name	Remarks (Strain/DNA)
Antibiotic-sensitive control	KCTC 3206	<i>E. faecalis</i>	Strain
Van A	CCARM 5024	<i>E. faecium</i>	genomic DNA
Van B	CCARM 5025	<i>E. faecalis</i>	genomic DNA
Van C-1	CCARM 5026	<i>E. gallinarum</i>	genomic DNA
Van C-2	KCTC 3638	<i>E. casseliflavus</i>	Strain

**Table 2.** Oligonucleotide primers used in Multiplex PCR for detection of VRE

Target gene	PCR product size(bps)	Oligonucleotide	
		Pair	Sequence(5' to 3')
vanA	460	AF AR	AAAAAGGCTCTGAAAACGCA AGCCAGTTCTTTTGCCTTCA
vanB	219	BF BR	GAATTGTCTGGTATCCCC GTTTACTTTGGTTACGCC
vanC-1	270	C1F C1R	ACTAACAATAGCTTCCCC ACTTCATATTCAGCGGG
vanC-2	388	C2F C2R	CCTTTACTTATFGTTCCGC TCTTGATAGGATAAGCCG

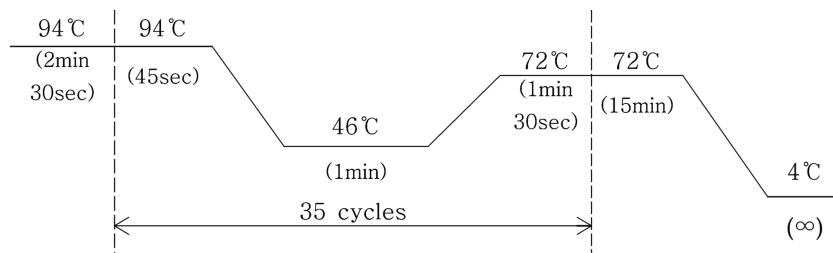
서열<sup>1)</sup>에 따라 PCR 반응 개시자들을 VRE 표현형별로 각각 제작(Bioneer)하여 VanA의 경우 460 bp(base pair), VanB의 경우 219 bp, VanC-1의 경우 270 bp, VanC-2의 경우 388 bp의 PCR 산물이 증폭되도록 하였다(Table 2). 음성대조군은 반코마이신 민감성 엔테로코커스 균주로부터 얻은 genomic DNA를 주형 DNA로 사용하였고, 양성대조군은 VanA, VanB, VanC-1 표준 genomic DNA와 VanC-2 표현형 표준균주에서 추출한 genomic DNA를 각각 사용하였다. Multiplex PCR은 각 genomic DNA 1 nmol에 DNA Taq polymerase 0.2 unit(QIAGEN, 203603), 10 mM dNTPs (QIAGEN), 1X PCR buffer(QIAGEN), VRE의 각 표현형별 primers를 첨가하여 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 2분 30초간 최초 변성 반응(denaturation) 이후, 94°C에서 45초 동안 변성 반응, 46°C에서 1분 동안 재결합(annealing), 72°C에서 1분 30초 동안 연장 반응(extension)하는 과정을 35회 반복하였고, 마지막 연장반응은 72°C에서 15분간 지속함으로써 완전한 증폭 산물이 생성되도록 하였다(Fig. 1). Multiplex PCR이 끝난 후 PCR 증폭산물은 0.5 µg/mL의 염색액(Ethidium Bromide, EtBr)을 첨가한 2% 한천젤(agarose gel)에 전기영동하여 자외선 조사장치에서 각

각의 증폭 산물을 양성, 음성대조군과 비교함으로써 VRE 표현형을 분석하였다. 또한 Multiplex PCR을 통해 증폭된 PCR 산물은 염기서열 분석(솔젠트)과, blast search(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해 종 판정을 수행하였다.

### 3. 결과 및 고찰

2005년부터 2008년까지 총 9회에 걸쳐 하천수 및 호소수 27개 지점의 물 환경 시료(원수)를 대상으로 엔테로코커스 오염 실태를 조사한 결과, 검출된 시점과 검출 범위는 다소 차이가 있었으나 모든 지점에서 1회 이상 검출되었다. 연도별로는 모든 수계에서 2006년에 비교적 높은 검출율을 보였으며, 수계별로는 한강수계, 금강·섬진강 수계, 낙동강 수계 순의 검출율을 보였다(Fig. 2). 하지만 동일 시점에 조사한 모든 정수시료에서는 엔테로코커스뿐만 아니라 지표 세균 및 어떠한 병원성 세균도 모두 검출되지 않아 이들 세균들이 정수처리 공정에서 안전하게 제거됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

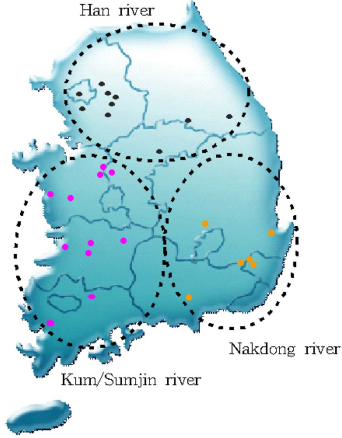
본 연구에서는 이처럼 연도별로 전 수계의 원수에서 엔테로코커스가 꾸준히 검출되는 결과를 바탕으로, 2008년 3분기에 검출된 엔테로코커스를 대상으로 VRE



**Fig. 1.** The reaction condition of Multiplex PCR.

**Table 3.** Examined water samples from Korean river system

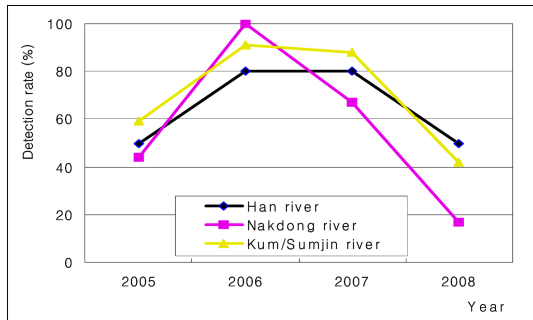
Han river	Nak dong river	Kum/Sumjin river
SJ-1	YS	CJ-2
WB	GM	GS
SN	HY	DH
CJ-1	SC	BA
BW	MY	HS
SH	BS	SS-1
HJ		SS-2
IS		CA
DS	-	AS
SJ-2		BR
-		DJ



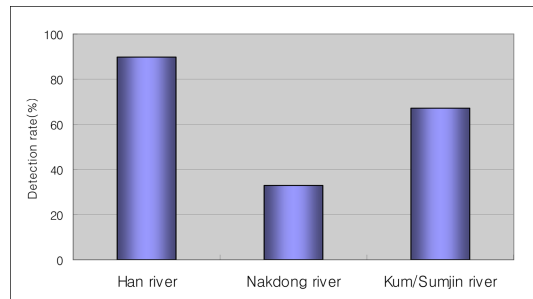
의 분포 특성을 조사하였다.

2008년 3분기에 27개 지점의 물 환경 시료를 대상으로 엔테로코커스 오염 실태를 조사한 결과 18개 지점에서 엔테로코커스가 검출되었는데, 한강 수계는 10개 조사 지점 중 11~61 CFU/100 mL 농도 범위로 9개

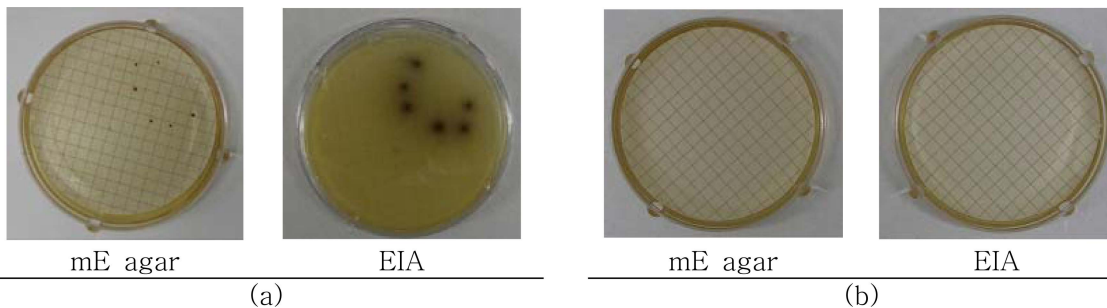
지점(90%)에서, 금강/섬진강 수계는 11개 조사 지점 중 7개 지점에서, 낙동강 수계는 6개 조사 지점 중 2개 지점에서 엔테로코커스가 검출되었다. 금강/섬진강 수계의 경우 두 지점은 검출 농도가 19 CFU/100 mL와 58 CFU/100 mL였으나, 나머지 지점과 낙동강 수계의



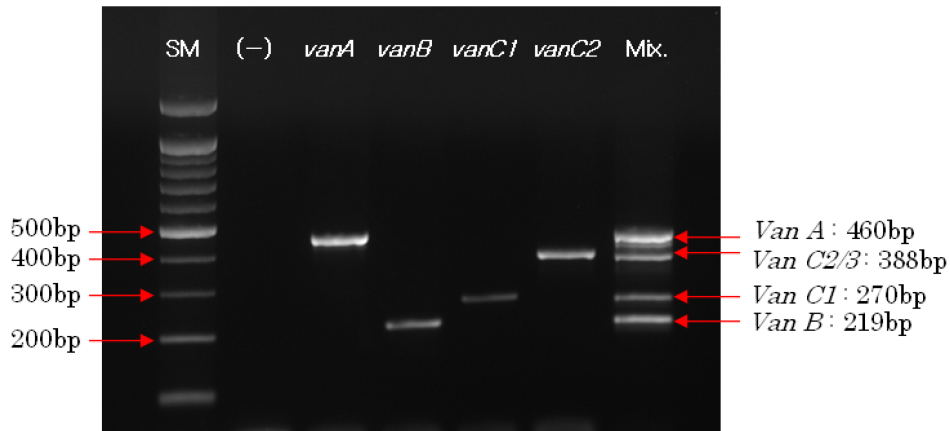
**Fig. 2.** Detection rate of *Enterococcus* spp. in Korean water samples from 2005 to 2008 by membrane filtration method.



**Fig. 4.** Detection rate of *Enterococcus* spp. in Korean water samples during the third quarter of 2008 by membrane filtration.



**Fig. 3.** Detection of *Enterococcus* spp. in Korean water samples during the third quarter of 2008 by membrane filtration. (a) Raw water samples; some Enterococcal colonies were detected. (b) Treated water sample; no colonies were detected.



**Fig. 5.** Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by Multiplex PCR with reference strains. Lane 1, molecular weight marker. Lane 2, *E. faecalis* KCTC 3206(vancomycin sensitive negative control). Lane 3, *E. faecium* CCARM 5024(*vanA*). Lane 4, *E. faecium* CCARM 5025(*vanB*). Lane 5, *E. gallinarum* CCARM 5026(*vanC-1*). Lane 6, *E. casseliflavus* KCTC 3638(*vanC-2*). Lane 7, mixture of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2*.

검출 농도 범위는 1~4 CFU/100 mL로써 상대적으로 한강 수계보다 검출 농도가 낮았다(Fig. 4).

엔테로코커스가 검출된 18개 평판으로부터 양성으로 확정된 집락은 BHI 배지에 삼분 도말하여 단일집락으로 분리하고 genomic DNA를 추출한 후 Multiplex PCR을 통해 VRE 분포 특성을 분석하였다. 이 때 음성대조군인 반코마이신 민감성 엔테로코커스 genomic DNA를 대상으로 한 Multiplex PCR에서는 어떤 증폭 산물도 확인할 수 없었으며, 양성대조군인 Van A, Van B, Van C-1 및 Van C-2 genomic DNA 혼합물과 각각의 표현형별 genomic DNA를 대상으로 한 Multiplex PCR에서는 각각 예상했던 크기(Van A: 460 bp, Van B: 219 bp, Van C-1: 270 bp, Van C-2/3: 388 bp)의 PCR 산물이 증폭되는 것을 확인함으로써 Multiplex PCR이 제대로 수행되었음을 확인하였고(Fig. 5), 이후 혼합 genomic DNA의 Multiplex PCR에 대한 증폭 산물을 현장 엔테로코커스 검출 시료에 대한 양성대조군으로 사용하였다.

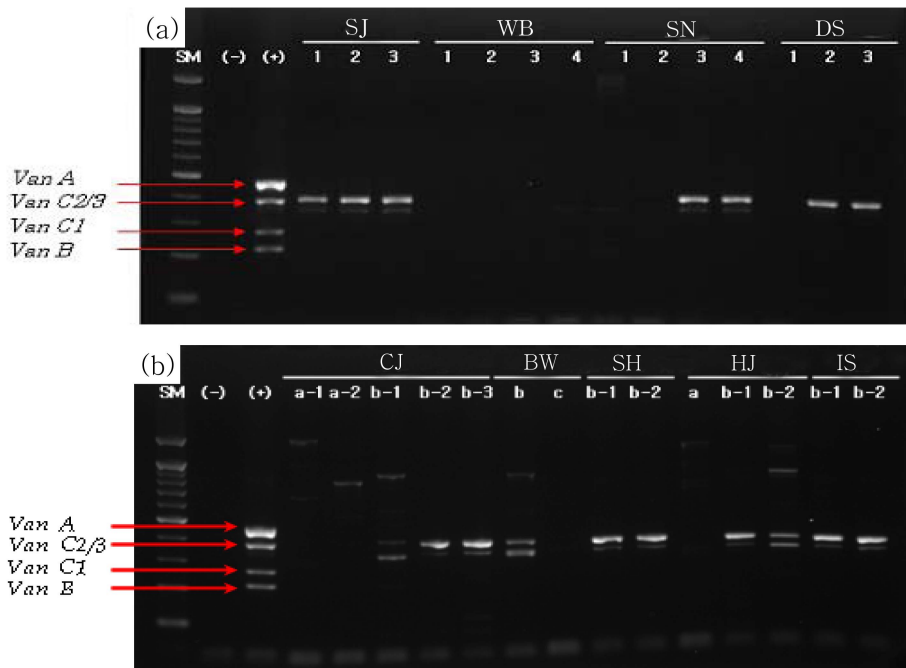
엔테로코커스가 검출된 18개 지점별 시료로부터 획득한 370개의 양성 집락 중 비교적 생장이 잘되는 집

락을 지점별로 일부 선별하여 48개(13%) 집락에 대해 Multiplex PCR을 수행한 결과, 12개(67%) 지점의 모든 시료에서 동일하게 388 bp 크기의 PCR 산물만 증폭됨을 확인함으로써 네 가지 표현형 중 Van C-2/3에 해당하는 VRE만 수계에 오염되어 있음을 확인하였으며, 엔테로코커스 양성 집락에 대한 VRE 검출률은 48%였다. 검출된 VRE의 수계별 분포 특성을 보면, 한강 수계는 9개 검출 지점 중 8개(89%) 지점에서 VanC-2/3 표현형의 VRE가 검출되었으며, VRE 검출률은 61%였고, 금강/섬진강 수계는 7개 검출 지점 중 4개(57%) 지점만 한강 수계와 동일한 VanC-2/3 표현형의 VRE가 검출되었으며, 검출률은 40%였다. 반면 낙동강 수계는 조사된 6개 지점 중 2개 지점에서 엔테로코커스가 검출되었으나, VRE는 전혀 검출 되지 않았다(Table 4, Fig. 6~8).

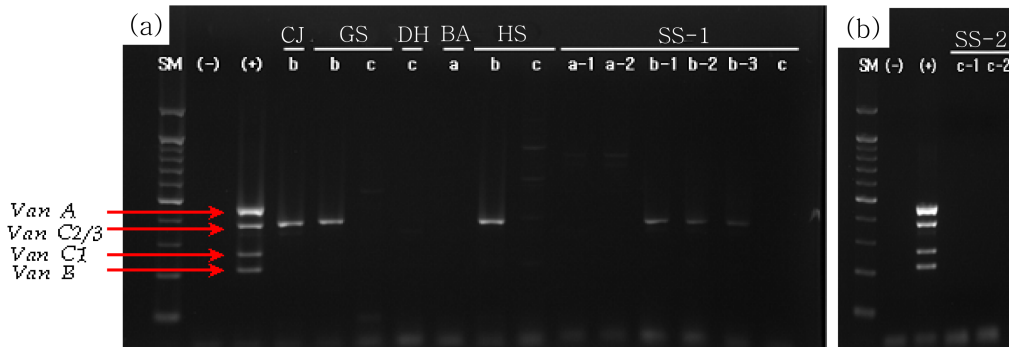
위의 결과를 보면 한강 수계의 VRE 오염이 다른 수계보다 높은 것으로 나타났는데, 이것은 한강 수계의 엔테로코커스 검출 농도가 상대적으로 다른 수계보다 높았고, 금강/섬진강 수계와 낙동강 수계는 대부분 검출 집락수가 4개 이하인 지점이 많았기 때문에 나타난

**Table 4.** Detection situation of *Enterococcus* spp. and VRE in Han, Nakdong and Kum/sumjin rivers

Water system	Number of examined water samples	Number of <i>Enterococcus</i> spp. detected samples (%: <i>Enterococcus</i> spp. detected/examined)	Number of VRE detected samples (%: VRE detected/examined, VRE/ <i>Enterococcus</i> spp)
Han river	10	9 (90%)	8(80%, 89%)
Nakdong river	6	2 (33%)	0( 0%, 0%)
Kum/Sumjin river	11	7 (64%)	4(37%, 57%)



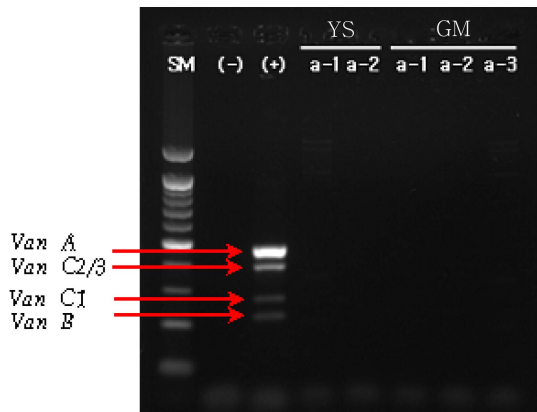
**Fig. 6.** Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by Multiplex PCR with *Enterococcus* genomic DNA detected in Han river. (a) Lane 1: molecular weight marker. Lane 2: *E. faecalis* KCTC 3206(vancomycin sensitive negative control). Lane 3: DNA mixture of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2*. Lane 4~6, Lane 7~10, Lane 11~14, Lane 15~17: *Enterococcus* spp. from site SJ, WB, SN, DS respectively. (b) Lane 1~3: same with (a), Lane 4~8, Lane 9~10, Lane 11~12, Lane 13~15, Lane 16~17: *Enterococcus* spp. from site CJ, BW, SH, HJ, IS respectively.



**Fig. 7.** Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by Multiplex PCR with *Enterococcus* genomic DNA detected in Kum/Sumjin river. (a) Lane 1: molecular weight marker. Lane 2: *E. faecalis* KCTC 3206(vancomycin sensitive negative control). Lane 3: DNA mixture of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2*. Lane 4, Lane 5~6, Lane 7, Lane 8, Lane 9~10, Lane 11~16: *Enterococcus* spp. from site CJ, GS, DH, BA, HS, SS-1 respectively. (b) Lane 1~3: same with (a), Lane 4~5: *Enterococcus* spp. from site SS-2.

결과로 판단된다. 또한 2005년부터 조사된 엔테로코커스 검출 특성을 보면 동일 조사 지점에서도 시기별로 검출되는 농도가 다른 점을 감안할 때 이번 조사를 통한 VRE 오염 분포는 1회성 결과로써 당해 시점의 분포 특성을 파악할 수 있을 뿐 전체적인 수계별 VRE 오염 실태를 파악하기 위해서는 지속적인 조사가 이루어

어져야 할 것이다. 다만 문헌에 따르면 한강유역에서 발생하는 축산폐수의 양이 국내 축산폐수 발생량의 28%로 높은 비중을 차지하고 있어<sup>27)</sup> 동물용 항생제가 한강수계에 유입될 가능성이 높고, 또한 한강 수계의 산업 발달이나 인구 밀집 등으로 인한 항생제 및 항생제 내성 세균이 오·폐수를 통해 유입될 가능성이 높



**Fig. 8** Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by Multiplex PCR with *Enterococcus* genomic DNA detected in Nakdong river. Lane 1, molecular weight marker. Lane 2, *E. faecalis* KCTC 3206(negative control). Lane3, DNA mixture of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2*. Lane 4~5, Lane 6~8: *Enterococcus* spp. from site YS, GM respectively and there wasn't any band in Nakdong river samples.

기 때문에 이러한 환경적 영향이 VRE 오염을 가중할 가능성을 배제할 수는 없을 것이다.

엔테로코커스 양성으로 확정된 집락을 관찰한 결과 집락의 색이 흰색, 베이지색, 노란색의 세 종류로 구분되었는데(Fig. 9), 이번 연구에서 검출된 VRE Van C-2/3 표현형은 특이하게도 모두 베이지색 집락으로부터 유래하였으며, 흰색과 노란색의 집락에서는 어떤 VRE 표현형도 검출되지 않았다. 이는 VRE의 항생제 내성과 관련된 유전자가 엔테로코커스 집락의 발색과 상관성이 있는지 향후 지속적인 연구를 수행해 볼 가치가 있으며, 이러한 상관성이 연구되면 VRE에 대한 수계 오염 분포 조사를 보다 쉽게 수행할 수 있을 것으로 판단된다.

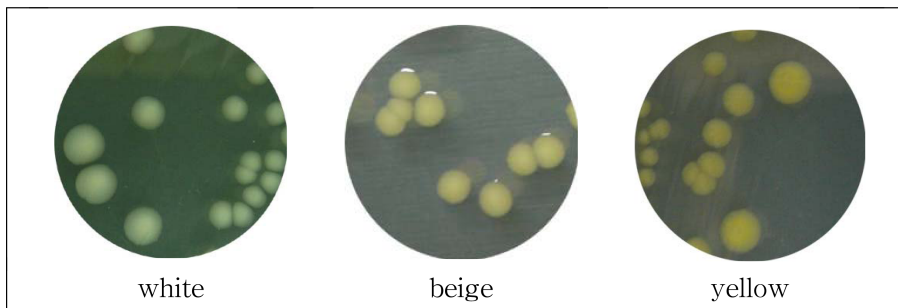
Multiplex PCR의 증폭 산물은 염기 서열 분석과 blast search(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해 VanC-2/3 표현형에 해당하는 VRE임을 재확인 하였으며, 종 판정 결과 문헌에 보고된 것과 같이 *E. casseliflavus*와 *E. flavescens* 종이 해당되는 것을 확인하였다(data not shown).

본 연구에서는 기존에 보고된 임상 검체를 대상으로 한 VRE 검출 연구<sup>22-24</sup>) 및 일부 수계에서 분리한 엔테로코커스의 항생제 감수성에 대한 연구와<sup>26</sup>) 달리 물 환경 시료를 대상으로 VRE를 검출하기 위해 Multiplex PCR법이 유용함을 확인하였으며, 이는 향후 증가되는 항생제 사용에 따른 VRE를 포함한 항생제 내성 세균의 오염 실태 파악에 적용됨으로써 수계의 상수원 관리에 기여할 것으로 판단된다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 지난 몇 년 동안 물 환경 시료(원수)에서 지속적으로 엔테로코커스가 검출됨에 따라 물 시료를 대상으로 Multiplex PCR법을 VRE 분석에 적용하고자 하였으며, 그 결과 검출된 엔테로코커스 양성 집락을 대상으로 Multiplex PCR을 수행하여 VRE의 표현형을 구분하여 분석할 수 있었다.

2008년 3분기에 채취한 여러 물 환경 시료를 대상으로 분석한 결과 한강 수계 및 금강/섬진강 수계 일부 지점의 시료에서 VRE를 검출하였으며 검출된 VRE의 표현형은 모두 항생제 내성이 약한 VanC-2/3로 분석되었다. Multiplex PCR법을 이용한 VRE 표현형별 분석법은 PCR 증폭 산물의 염기서열 분석을 통하여 결과를 재확인함으로써 물 환경 시료의 VRE 오염 실태 조사에 적용 가능함을 확인할 수 있었다. 또한 VanC-2/3 표현형의 VRE가 특이적으로 동일하게 베이지색을 띠



**Fig. 9.** Enterococcal colony's phenotype detected in Korean river is represented white, beige, yellow color. All of the colonies appeared enterococcal physiological character on the BHI agar.

는 집락에서만 검출됨으로써 향후 집락의 색과 표현형과의 상관성을 통한 VRE 분포 특성의 유추도 가능할 것으로 기대되었다. 다만 이번 연구의 결과가 당일 시점의 일회성 결과로서 특정 지점에서의 검출률이 높은 이유와 집락의 발생과 관련한 메카니즘에 대해서는 보다 면밀한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이번 연구에서 검출된 VanC-2/3형은 VanC에 속하는 세부 표현형으로 최소억제농도(MIC, Minimal Inhibitory Concentration) 분석에 의한 내성 농도가 반코마이신은 2~32 µg/mL, 테이코플라닌은 0.5 µg/mL 이하로 상대적인 항생제 내성이 약하며, 항생제 내성과 관련한 유전적 형질이 획득되지 않고 자체적으로 유해한 VRE로써 아직 수계의 항생제 오염에 의한 VRE 오염 실태는 심각하지 않은 것으로 판단되나, 최근 질병 치료나 농업, 축산업, 수산업 등에 다양한 항생제 사용이 증가하는 추세이고 이 항생제가 수계로 유입될 가능성이 상존하므로 항생제 내성이 강한 다른 표현형의 VRE를 포함한 다른 항생제 내성세균 또한 수계에 출현할 가능성을 배제할 수 없다. 특히 항생제 내성 유전 형질을 다른 그람 양성세균으로 전이하는 특성을 지닌 VanA와 VanB 표현형의 VRE가 출현될 경우 항생제 내성을 갖는 세균들의 출현 빈도는 증가할 가능성이 매우 높기 때문에 수계에 대한 지속적인 VRE의 분포 실태조사가 요구된다. 따라서 본 연구에서 물 환경 시료를 대상으로 VRE를 표현형별로 분석하기 위해 Multiplex PCR법을 적용한 것은 항생제 오염과 연계하여 수계의 VRE 오염 실태를 파악하고 상수원을 관리하는데 있어 중요한 자료를 제공할 것으로 기대한다.

### 참고문헌

1. 김종배, 김근희, 송혜원, 박성언, 엄용빈, 박상욱, 김양수, 박수진. *대한의생명과학회지*, **1999**, 5(1), 95-100.
2. 이수연, 배직현, *Korean J Clin Pcthol*. **1997**, 17(5), 743-756.
3. Murray, B. E., *Clin. Microbio.*, 1990, Rev.3, 45-65.
4. Krogstad, D. J., and A. R. Parquette. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1980**, 17, 965-968.
5. Cetinkaya Y., Falk P. and Mayhall C G. *Clinl Microbiol Rev.*, **2000**, 13(4), 686-707.
6. Nachamkin I., Axelrod P., Talbot GH., Fischer SH., Wennersten CB., Moellering RC. and Macgregor RR. *J. Clin Micorbiol*, **1988**, 26(7), 1287-1291.
7. Uttley A.H., Collins C.H., Naidoo J. and George J.C. *Lancet*, **1988**, i, 57-58.
8. LeClercq R, Dut Ka-Malen D, Duval J, Courvalin P. *Antimicrob, Agents Chemother*, **1992**, 36 : 2005-2008
9. Jan M. Bell, James C. Paton, John Turnidge, *J. Clin. Microbiol*, **1998**, 36(8), 2187-2190.
10. Noble WC., Virani Z. and Cree RG. *FEMS Microbiol Lett*, **1992**, 72(2), 195-198.
11. Leclercq, R., E. Derlot, M. Weber, J. Duval, and P. Courvalin. *Agents Chemother*, **1989**, 33, 10-15.
12. Leclercq, R., S. Dutka-Malen, J. Duval, and P. Courvalin. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1992**, 36, 2005-2008.
13. Dutka-Malen, S., C. Molinas, M. Arthur, and P. Courvalin, *Gene*, **1992**, 112, 53-58.
14. 이수연, 박진희, 박향숙, 이미애, 강은숙, 홍기숙, *Korean J Clin Pcthol*, **2000**, 20(3), 301-307.
15. A.L.Barry, C. Thornsberry, R.N.Jones, *J. Clin Microbiol*, **1986**, 23(1), 100-103.
16. Ke, D., F. J. Picard, F. Martineau, C. Menard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron. *J. Clin. Microbiol*, **1999**, 37, 3497-3503.
17. Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin, *J. Clin. Microbiol*, **1995**, 33, 24-27.
18. Endtz H.P., Braak N.V.D., Belkum A.V., Goessens W.H., Kreft D., Stroebel A.B. and Verbrugh H.V. *J. Clin Microbiol*, **1998**, 36(2), 592-594.
19. Harwood V.J., Brownell M., Perusek W. and Whitlock J.E. *Appl Environ Microbiol*, **2001**, 67(10), 4930-4933.
20. Swenson J M., Clark N C., Ferraro M J., Sahn D.F., Doern G., Pfaller M. A., Reller L.B., Weinstein M.P., Zabransky R.J. and Tenover F.C. *J. Clin. Microbiol*, **1994**, 32(7), 1700-1704.
21. Willey B.M., Kreiswirth B.N., Simor A.E., Williams. G., Scriver S.R., Phillips A. and Low D.E. *J. Clinical Microbiol*, **1992**, 30(7), 1621-1624.
22. Patel R., UHL J.R., Kohner P, Hopkins M.K. and Cockerill F.R. *J. Clin Microbiol*, **1997**, 35(3), 703-707.
23. Satake S., Clark N., Rimland D., Nolte F.S. and Tenover F.C. *J. Clin Microbiol*, **1997**, 35(9), 2325-2330
24. 홍기숙, 강은숙, 이미애, *Korean J Clin Pcthol*, **1998**, 18(3), 372-378.
25. 배명숙, 최강국, 박석환, 최문술, 이건형, *한국생태학회지*, **2004**, 27(5), 283-289.
26. 김말남, 권오민, 한강 유역에서 분리한 Enterococcus 속 세균의 항생제 감수성, *Korean. J. Environ. Biol*. **2008**, 26(3), 240-246.
27. 김주형, 박찬구, 김민영, 안승구, 한강수계 상류지역의 동물용 항생제 및 합성항균제 잔류실태 파악, *한국환경 분석학회지*, **2008**, 제 11권, 109-118.