

The Effects of Photodynamic Therapy for Vancomycin-resistant Enterococci

Pil Seung Kwon

Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 570-750, Korea

The aim of this study was to evaluate the effects of the photosensitizer photogem with light-emitting diode (LED) on vancomycin-resistant enterococci (VRE). Two VRE strains isolated from the feces of patients, that was identified *Enterococcus faecium* (*vanA*) and *Enterococcus gallinarum* (*vanCI*) using traditional biochemical tests and confirmed VRE genotyping from using polymerase chain reaction. In addition, three strains were used *Enterococcus faecalis* CDC-286 (*vanA*), *E. faecalis* CDC-583 (*vanB*) and *E. gallinarum* CDC-42 (*vanCI*). To examine the antimicrobial effect of photogem mediated photodynamic therapy (PDT) against, CFU quantification and Disk diffusion antimicrobial susceptibility test were evaluated. The effects of Photodynamic therapy was not associated with genotype. Photogem mediated PDT perfectly inhibited the colony formation of *E. faecalis* CDC-286. The number of viable bacteria decreased greatly after PDT application with photogem 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and energy density of 15 J/ cm^2 . The diameter of inhibition zone was increased to after PDT more than before PDT. The case of vancomycin disc on *E. faecalis* CDC-583 and *E. galinanum*-Patient were changed from resistant to intermediate resistant, from intermediate resistant to susceptible. These results demonstrate that lethal photosensitization of VRE can be achieved using photogem plus 630 nm LED irradiation.

Key Words : Vancomycin resistant enterococci, Photodynamic therapy, Photogem, LED

서론

장알균은 조건부산소성 그람양성알균으로 병독성이 낮아 임상적 큰 의미를 갖지 않았으나 1986년 유럽에서 반코마이신 내성 장알균(vancomycin-resistant enterococci, VRE)이 처음 보고된 이후 VRE는 세계적으로 중요한 병원균으로 보고되어 왔고(Leclercq 등, 1988) 주로 균혈증이나 요로감염, 심내막염, 그리고 골수염 등과 같은 다양한 기회감염을 일으킨다(Cuzon 등, 2008; Song 등, 2005).

Corresponding Author : Pil Seung Kwon, Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 570-750, Korea.

Tel: 010-6633-7544 E-mail: pskwon@wu.ac.kr

이 논문은 2011년도 원광보건대학 교내연구비 지원에 의해서 수행됨

Received : 19 SEP 2011

Return for modification : 24 SEP 2011

Accepted : 27 SEP 2011

우리나라의 VRE출현은 1992년 처음 보고되었고 1990년대 중반부터 균주 분리가 급격히 증가하였다(Park 등, 1992; Lee 등, 1998). 한국 내성세균조사단(Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance, KONSAR)의 조사에 의하면, 임상에서 분리균주 중 1997년에 2.9%, 2006년에 16%범위로 반코마이신에 내성을 보인 *Enterococcus faecium* 증가를 보였다(Lee 등, 2004). 그리고 2009년 대한감염관리학회(Korean Society for Nosocomial Infection Control, KOSNIC) 연구에 의하면 중환자실에서 분리되는 *E. faecium*의 30~45%에서 반코마이신에 내성을 보이고 있어 VRE에 대한 적절한 감염관리가 필요한 상황이다.

반코마이신은 글라이코펩티드계열 항균제로 1961년 반코마이신이 개발되어 메치실린 내성 *Staphylococcus aureus* 치료에 30년 이상 효과적으로 사용되었으며, 다른 항생제와 달리 내성이 쉽게 발현되지 않는 것으로 인식되어왔다. 그러나 2002년 6월 세계 처음으로 미국에서 반코마이신 내성 황색포도알균(vancomycin-resistant *Staphylococcus au-*

reus, VRSA) 감염 환자가 진단을 받았다(CDC, 2002). VRE는 VRSA에 접합을 통해 전달할 수 있기 때문에 문제가 된다(Noble 등, 1992; CDC, 2002; Clark 등, 2005). Clark 등은 미국 미시칸주와 펜실베이니아주에서 분리된 VRSA에서 VRE의 반코마이신 내성유전자 *vanA*를 포함한 트랜스포손 Tn1546이 발견되었으며, VRE는 VRSA의 출현을 막기 위해서도 중요하다(Song 등, 2005; Merquior 등, 2008).

VRE의 표현형으로는 7종류(VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL)로 알려지고 있으며 해당유전자형에 의해 발현된다(Leven, 2005; Boyd 등, 2008). 이중에서도 VanA, VanB 내성 장알균은 획득내성으로 감염관리의 대상이 되며 vancomycin과 teicoplanin의 MIC 및 유도능에 차이가 있다. 이런 VRE의 전파를 방지를 위한 감염관리지침은 있으나 국내의 의료기관에서 적용하기 어려운 실정이고 다각적 감염관리에도 근절하기 힘든 병원감염의 주요 다제내성균이다(Yoon 등, 2009). 박테리아의 박멸은 주로 항생제 혼합치료를 통하여 이루어지고 있고 박멸효과는 우수하나 항생제 오남용으로 인한 내성균과 독성 등의 부작용을 보완하기 위한 많은 대체방법들이 시도되고 있다(Gorbach, 1990).

광역학 치료는 환자에게 광감작제를 투여하고 어느 정도의 시간이 지나게 되면 정상조직과 암조직의 광감작제 농도차가 최대가 되는 시기에 광감작제가 흡수하는 특정 파장의 빛을 암세포에 조사하여 광화학반응을 일으키고 이때 발생하는 단일항산소에 의하여 암세포가 파괴되는 원리를 이용한 암치료법이다(Weishaupt 등, 1976). 광역학 치료는 암 치료 방법 중 하나이지만 세균과 곰팡이류 등의 치료 효과에는 활발한 연구가 이루어지지 않고 있는 상태이다(Wainwright, 1998; Phoenix 등, 2003). 본 연구에서는 이런 광역학 치료를 이용하여 VRE를 대상으로 치료효과를 검증하고자 하였다.

Light emitting diode (LED)는 국소적 부위에 조사할 수 있는 레이저보다 넓은 부위의 병소에 조사할 수 있고 빛의 단위 면적당 세기도 적게 받는다는 장점을 가지고 있어서 광역학 치료를 위해 광원으로써 많이 사용되고 있다(Machado, 2000; Mang, 2004).

본 연구에서는 630 nm에서 최대흡수파장을 보이는 1세

대 광감작제인 Photogem과 630 nm LED array를 자체 제작하여 VRE에 대한 광역학 치료를 시도하여 내성 유전자형별 광역학치료 효과를 비교하였다.

재료 및 방법

1. 대상균주

충남지역 단국대학교병원 진단검사의학과 미생물검사실로 의뢰된 대변검체 중 *E. faecium* (Patient-vanA), *E. gallinarum* (Patient-vanCI)를 분리동정 및 내성유전자증폭검사를 실시한 2가지 균주와 *E. faecalis* CDC-286, *E. faecalis* CDC-583, *E. gallinarum* CDC-42 3개의 CDC 균주를 대상으로 총 5가지의 균주를 사용하였다.

2. VRE 균주의 배양 및 균속 동정

검체를 즉시 bile esculin azide agar (BEAA, Difco) 와 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 반코마이신이 포함된 자가제조한 BEAA배지에 면봉으로 두껍게 접종하고 37°C 에서 배양하였다. 증균배양 후 1일째와 2일째 각각 배지의 색상 변화를 관독하였다. VRE로 의심되는 검은색 반응 집락을 그람염색을 하여 그람양성알균을 확인하고 catalase 음성, L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR)의 분해를 확인 후 혈액한천배지에 순수 배양하였다. 전통적인 방법인 potassium tellurite agar 0.04% 배지에서 검은색 집락, dextrose를 1% 되게 추가한 *Streptococcus faecalis* agar (SFA)배지에서 양성, mannitol에서 산 생성반응을 보이는 균주를 반코마이신 내성 *E. faecalis*으로 동정하였으며, 그 외 2차 시험인 arginine dihydrolase, 탄수화물(arabinose, raffinose, lactose)에서 산생성, 운동성 및 색소생성 시험, methyl-D-glucopyranoside (MGP)시험으로 *E. faecium*과 그 외 *E. gallinarum* 균을 동정하였다.

3. 내성 유전자형 조사

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 위한 enterococci DNA는 1.5 mL microtube에 1x washing 용액 200 μl 와 세균을 혼합하여 부유액을 만들고 8,000 rpm

으로 2분간 원심분리하여 세척한 후 cell lysis buffer 30 μ L (Genotek Co. Seoul, Korea)을 넣고 완전히 현탁시킨 후 12,000 rpm으로 5분간 원침하였다. Microtube를 100°C heating block에 넣고 10분간 가열하여 DNA를 용출하였다. Microcentrifuge를 사용하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다.

유전자형 결정을 위한 *vanA*, *vanB*, *vanC-1* primer (Table 1)는 이 등(1996)의 보고에 따라서 Genotek에서 합성하여 사용하였다. 각 primer를 2 μ L, mixture reagent (dNTP, *Taq* polymerase, $MgCl_2$) 4 μ L, 8-MOP 9 μ L, DNA 3 μ L를 혼합하여 PCR반응의 최종액을 20 μ L로 하였으며, primer와 검체 DNA를 제외한 모든 반응액(0.2M dATP, 50 mM KCl, 10 mM Tri-HCl pH 8.8, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton \times 100)은 실험조건을 갖게 한 상품화된(Genotek Co. Korea)시약을 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

PCR에서 첫째 cycle은 94°C에서 5분간 pre-denaturation하였고, 94°C에서 1분 denaturation, 60°C에서 1분 annealing, 72°C에서 1분 extension의 조건하에 30회 반복한 다음, 72°C에서 5분간 최종적으로 post-extension을 thermal cycler (turbo thermal cycler, Bionieer)를 이용하여 증폭하였다. 최종산물은 검체 간 상호 오염을 방지하기 위해 20분간 자외선(365 nm)을 조사한 후에 ethidium bromide를 포함한 2% 아가로오스겔에서 전기 영동하여 575 bp (*vanA*), 320 bp (*vanB*)와 420 bp (*vanC1*)에 해당하는 밴드의 유무를 판독하였다.

Table 1. Primer sequences that were used in PCR for vancomycin-resistance genotyping

Gene	Primer pairs	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>vanA</i>	vanA-1	GCGGTATTGAAACAGTGCC	354
	vanA-2	GCGGRCATCAGTTCGGGAAGTGC	
<i>vanB</i>	vanB-1	GGAATGGGAAGCCGATAGTCTCC	574
	vanB-2	GTTTAGAACGATGCCGCCATCC	
<i>vanC1</i>	vanC1-1	CCCACTTTCTTTTATCCCGC	420
	vanC1-2	ACCCGTCAATCCCAAGTTTCG	

4. 광원과 광감작제 및 광역학 치료

본 연구에 사용된 광감작제 Photogem (Lomonisov institute of Fine Chemical, Russia)은 Dulbecco's phosphate buffered saline (Hyclone, USA)에 10 mg/mL로 녹여 만든 뒤 0.2 μ m filter로 여과하여 사용하였다.

광원은 LED를 자체 제작하여 사용하였다. 사용된 LED는 5F의 원통모양으로 2,000 mcd의 광도를 가지며, 24 well plate에 조사하기 위해 LED array를 제작하였다. 630 nm LED array는 가로 120 \times 세로 180 mm로, 총 384 (16 \times 24)개의 LED가 장착되었다. LED의 회로 연결은 직렬과 병렬을 병합하여 사용하였고, 직류 전원을 사용하였다. LED의 수명 연장과 손상을 방지하기 위하여 안정적으로 저항을 150 Ω 으로 하였으며 LED array의 광량은 전원 공급장치(Hanil, Korea)의 전류를 조절하여 8.3 mW/cm²가 되도록 하였다. LED array와 조사받는 24 well plate 사이의 거리를 100 mm로 하고 12.1 V, 0.4 A의 전압과 에너지 밀도 8.3 mW/cm²의 630 nm LED를 30분 동안 조사하였다. 최종 에너지는 15 J/cm²이었다.

5. CFU (colony forming units) 측정

광감작제인 Photogem의 농도를 멸균된 시험관을 사용하여 6종의 VRE 균을 0.45% saline으로 부유액을 만든 후 탁도계(Densicheck plus, bioMerieux, USA)를 이용하여 McFarland No. 0.5로 맞춘 후 1.5 \times 10⁴ cells/mL가 되도록 계단 희석하였다. Photogem은 균주부유액과 함께 희석되어 최종농도 50, 25, 12.5, 6.25 μ g/mL가 되도록 한 후 24 well plate에 혼합하였다. 그 후 알루미늄 호일을 이용하여 빛을 차단시키고 37°C 배양기(Thermo Forma, 47502-3362)에서 3시간 동안 반응 시켰다. 그 후 630 nm의 LED 광원 출력장비를 사용하여 8.3 mW/cm²로 30분 동안 빛을 조사하였다. LED 조사가 끝난 후 마이크로플레이트 혼합기(Labnet, international Inc, USA)를 분당 회전수 100회로 5분 동안 혼합하였다. 그 후 trypticase soy agar에 각 군별로 20 μ L씩 분주 후 스프레더를 이용하여 접종한 후 18시간 배양시킨 후 생성된 집락의 수를 세었다. 각 그룹 당 3회에 걸쳐 측정하여 평균값과 표준편차를 산출하였다.

6. 광역학 치료전후의 항균제 억제대 비교

광역학 치료 전·후의 두 종류 실험균주에 대한 항균제 감수성은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 지침에 따라 디스크 확산법을 시행하였으며(CLSI, 2007), 디스크 확산법에는 penicillin (10 U), ampicillin (10 µg), erythromycin (15 µg), vancomycin (30 µg), teicoplanin (30 µg), tetracycline (30 µg) 및 ciprofloxacin (5 µg) 디스크 (BBL Microbiology System, Cockeysville, MD, USA)를 사용하였다. Trypticase soy broth (Difco)에 부유하여 탁도계를 McFarland의 No. 0.5에 맞추고 대조균은 바로 멸균된 면봉으로 Mueller-Hinton agar (Difco, MI, USA)에 고루 바른 후 분주기를 이용하여 디스크를 올려놓았으며, 광역학 치료균은 McFarland의 No. 0.5에 맞춘 균주희석액에 Photogem의 최종농도 100 µg/mL가 되도록 혼합 후 37°C 배양기에서 3시간 동안 반응시간을 주었다. 그 후 630 nm의 LED 광원 출력장비를 사용하여 8.3 mW/cm²로 30분 동안 15 J/cm²를 조사하였다. 광역학 치료가 끝난 치료균은 바로 멸균된 면봉으로 Mueller-Hinton agar (Difco, MI, USA)에 고루 바른 후 디스펜서를 이용하여 디스크를 올려놓았으며 접종된 평판은 하룻동안 배양기에서 배양시킨 후 디스크 주변의 억제대의 지름을 측정하였다.

결 과

1. 균속 동정결과

임상에서 분리된 VRE균의 생화학적 성상은 Table 2와 같았다. 두 균주 모두 catalase 음성과 그람양성 알균을 나타냈다. *E. faecium* 균주에서 양성은 arginine dihydrolase, PYR

의 분해, arabinose, lactose와 mannitol에서 산 생성이었으며, *E. gallinarum* 균주에서는 운동성 양성, arginine dihydrolase, PYR, MGP, arabinose, lactose, raffinose와 mannitol에서 산 생성을 보여 분리 동정되었다.

2. VRE 유전자형분석 결과

CDC 표준균주와 임상균주를 PCR 후 전기영동 확인한 결과 유전형 *vanA* 균 575bp로 확인되어 2가지 균 *E. faecium* 임상균주와 *E. faecalis* CDC-286균 두 종류가 확인되었으며, 420bp에는 유전형 *vanB* 균으로 표준균주 *E. faecalis* CDC-583이 확인되었으며, 354bp에는 *vanC* 유전자형으로 *E. gallinarum* CDC-42와 *E. gallinarum* 임상균주가 확인되었다. 전기영동의 결과는 Fig. 1과 같다.

3. 광역학치료후 집락형성시험결과

vanA 유전자형인 *E. faecalis* CDC-286와 임상환자로부터 분리된 *E. faecium* (Patient-*vanA*)균의 광역학 치료 후의 집락형성시험에서는 Photogem 50 µg/mL에서는 *E. faecalis* CDC-286균은 완전 사멸하였으나 *E. faecium* (Patient-*vanA*)은 평균 1002 CFU/mL가 형성되었고, *E. faecalis* CDC-286은 Photogem 25, 12.25, 6.125 µg/mL에서 각각 평균 1125, 4125, 12550 CFU/mL로 형성되었으며, 임상환자로부터 분리된 *E. faecium* (Patient-*vanA*)은 각각 평균 1825, 4275, 4625 CFU/mL가 형성되었다(Fig. 2 A). *vanB* 유전자형인 *E. faecalis* CDC-583은 광역학 치료 후의 집락형성시험에서는 Photogem 50 µg/mL에서는 평균 50 CFU/mL로 거의 사멸하였고, Photogem 25, 12.25, 6.125 µg/mL에서는 각각 평균 175, 1250, 2475 CFU/mL로 형성되었다 (Fig. 2 B). *vanC1* 유전자형인 *E. gallinarum* CDC-42와 임

Table 2. Properties of *E. faecium* and *E. gallinarum*

Species	TEL	PIG	MOT	ADH	PYR	MGP	ARA	LAC	RAF	MAM
<i>E. faecium</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+
<i>E. gallinarum</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Abbreviations: TEL, growth at 0.04% tellurite; PIG, production of yellow pigment; MOT, motility; ADH, arginine dihydrolase; PYR, pyrase; ARA, acid production from arabinose; LAC, acid production from lactose; RAF, acid production from raffinose; MAN, acid production from mannitol; +, positive; -, negative.

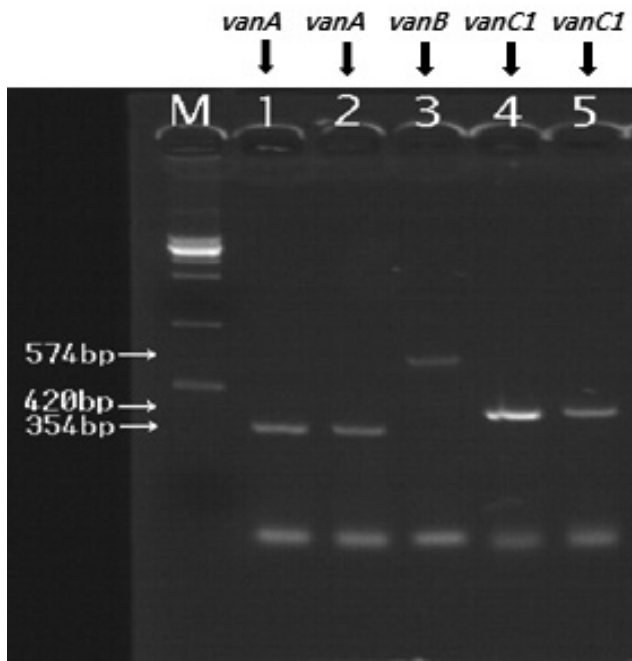


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products: Lane M; 1kb DNA size marker, Lane 1; *E. faecalis* CDC-286, Lane 2; *E. faecalis* of clinical isolate, Lane 3; *E. faecalis* CDC-583, Lane 4; *E. gallinarum* CDC-42, Lane 5; *E. gallinarum* of clinical isolate.

상환자로부터 분리된 *E. gallinarum* (Patient-*vanC1*)의 광역학 치료 후 집락형성시험에서는 Photogem 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 두 가지 균 모두 완전 사멸하지 않았다. *E. gallinarum* CDC-42은 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 평균 775 CFU/mL가 형성되었고, Photogem 25, 12.25, 6.125 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 평균 4425, 6650, 8375 CFU/mL가 형성되었다. 임상환자로부터 분리된 *E. gallinarum* (Patient-*vanC1*)은 Photogem 50, 25, 12.25, 6.125 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 3350, 6600, 7200, 9425 CFU/mL가 형성되었다(Fig. 2 C).

4. 광역학 치료 전.후의 항균제 억제대비교결과

항균제의 억제대의 비교시험은 Table 3과 같이 나타났다. *vanA* 형인 *E. faecalis* CDC-286은 광역학 치료 전에 항균제 내성인 것은 erythromycin (15 μg), tetracycline (30 μg), vacomycin (30 μg), teicoplanin (30 μg)이며, 중등도 내성은 ciprofloxacin (5 μg)이며, 감수성을 보인 것은 peni-

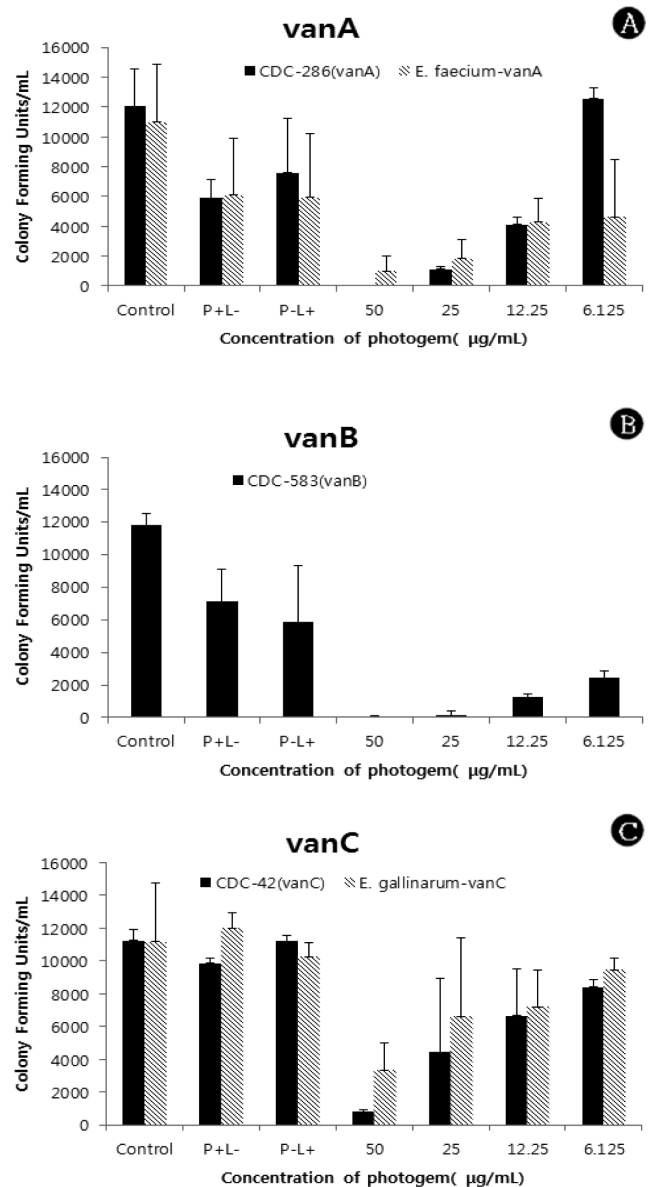


Fig. 2. Vancomycin resistant enterococci (in CFU/mL) after treatment with different photogem concentrations and genotype. The following groups: Control, Untreated; P+L-, Photogem alone; P-L+, LED alone; (A), *vanA* type VRE (filled bars: *E. faecalis* CDC286, shaded bars: *E. faecium*-Patient); (B), *vanB* type VRE (filled bars: *E. faecalis* CDC583); (C), *vanC* type VRE (filled bars: *E. gallinarum* CDC42, shaded bars: *E. gallinarum*-Patient). The bars are shown as averages + standard deviations.

cillin (10 U), ampicillin (10 μg) 이었다. 그러나 광역학 치료 후에는 중등도 내성인 ciprofloxacin (5 μg)이 감수성의

Table 3. Antibiotic susceptibility of PDT-treated and untreated vancomycin resistant enterococci.

Antibiotics		E	TE	CIP	P	Am	Va	Tei
Interpretive Standards (mm)	R	≤13	≤14	≤15	≤14	≤16	≤14	≤10
	I	14~22	15~18	16~20	–	–	15~16	11~13
	S	≥23	≥19	≥21	≥15	≥17	≥17	≥14
<i>E. faecalis</i> CDC286 (<i>vanA</i>)	untreated	R (0)	R (0)	I (19)	S (15)	S (24)	R (0)	R (9)
	PDT-treated ^a	R (0)	R (0)	S (24)	S (15)	S (24)	R (9)	R (11)
<i>E. faecium</i> –Patient (<i>vanA</i>)	untreated	R (0)	S (29)	R (15)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)
	PDT-treated ^a	R (0)	S (35)	I (18)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)
<i>E. faecalis</i> CDC583 (<i>vanB</i>)	untreated	R (0)	S (23)	S (26)	S (15)	S (24)	R (13)	S (18)
	PDT-treated ^a	R (13)	S (30)	S (27)	S (15)	S (25)	I (16)	S (19)
<i>E. galinatum</i> CDC42 (<i>vanC</i>)	untreated	S (24)	S (26)	I (16)	S (20)	S (24)	S (17)	S (19)
	PDT-treated ^a	S (28)	S (29)	I (19)	S (27)	S (26)	S (18)	S (20)
<i>E. galinatum</i> –Patient (<i>vanC</i>)	untreated	R (0)	R (0)	I (19)	S (16)	S (23)	I (16)	S (18)
	PDT-treated ^a	R (0)	R (0)	S (24)	S (32)	S (27)	S (20)	S (23)

^a Photogem based photodynamic therapy (sensitizer concentration 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the light dose of 15 J/cm^2). The resistant pattern was determined with the disc diffusion method (numbers present the diameters of zones of growth inhibition in mm). E, erythromycin; TE, tetracycline; CIP, ciprofloxacin; P, penicillin; Am, ampicillin; Va, vancomycin; Tei, teicoplanin; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

로 바뀌었고, 나머지 항균제는 치료 전과 동일한 감수성을 나타냈다. 억제대 크기로 비교하면 ciprofloxacin (5 μg)과 vancomycin (30 μg)이 광역학 치료 전에 19 mm와 0 mm가 광역학 치료 후 각각 24와 9 mm로 커졌고, 나머지 항균제의 억제대 크기는 뚜렷한 차이가 없이 나타났다. 임상균주인 *E. faecium* (Patient-*vanA*)는 치료 전에 tetracycline (30 μg)만 감수성을 보였고, 나머지 항균제에 대해서는 모두 내성으로 나타났다. 광역학 치료 후에는 ciprofloxacin (5 μg)이 중등도 내성으로 나타났고, 나머지 항균제는 치료 전과 동일하였다. 억제대 크기로 비교하면 tetracycline (30 μg)이 치료 전 29 mm가 치료 후 35 mm로 6 mm 커졌다. 나머지 항균제의 억제대 크기는 뚜렷한 차이가 없었다.

vanB 형인 *E. faecalis* CDC-583은 광역학 치료 전에는 erythromycin (15 μg), vancomycin (30 μg)이 내성, tetracycline (30 μg), ciprofloxacin (5 μg), penicillin (10 U), ampicillin (10 μg), teicoplanin (30 μg)이 감수성을 보였다. 광역학 치료 후에는 vancomycin (30 μg)만 중등도 내성으로 나타났고, 다른 항균제들은 변화가 없었다. 억제대 크기로 비

교하면 erythromycin (15 μg), tetracycline (30 μg)이 광역학 치료 전에는 각각 0과 23 mm였던 억제대가 치료 후에는 13와 30 mm로 커졌다. 다른 항균제에는 뚜렷한 차이가 없었다.

vanC 형인 *E. gallinarum* CDC-42는 치료 전. 후에 항균제 모두가 감수성에 변화가 없었고, 억제대의 크기도 뚜렷한 변화가 없었다. 임상환자로부터 분리된 *E. gallinarum* (Patient-*vanC1*)는 치료 전 erythromycin (15 μg), tetracycline (30 μg)이 내성, ciprofloxacin (5 μg), vancomycin (30 μg)이 중등도 내성으로 나타났고, penicillin (10 U), ampicillin (10 μg), teicoplanin (30 μg)이 감수성을 보였다. 그러나 치료 후에는 중등도 내성이던 ciprofloxacin (5 μg), vancomycin (30 μg)이 감수성으로 변화하였다. 억제대 크기로 비교하면 치료 전 ciprofloxacin (5 μg), penicillin (10 U), vancomycin (30 μg)의 억제대가 각각 19, 16, 16 mm이었고, 치료 후에는 24, 32, 20 mm로 5, 16, 4 mm씩 더 커졌다.

고 찰

VanA형은 vancomycin의 MIC가 64–1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, teicoplanin MIC가 6–512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 고농도 내성을 보이며, 유도성으로 *E. faecium*과 *E. faecalis*에 흔하다(Uttley 등, 1989). VanB형도 *E. faecium*과 *E. faecalis*에 흔한데 VanA와 달리 vancomycin의 MIC가 4–1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 다양한 내성정도를 보이며, teicoplanin MIC가 0.5–1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 낮다. VanC형은 운동성이 있는 균종인 *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* 및 *E. flavescens*에 흔하며 vancomycin에 대한 내성정도가 MIC가 2–32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 낮고 teicoplanin에 대해서도 MIC가 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하가 감수성이며, 자연내성으로 알려져 있다(Uttley 등, 1998; Arthur 와 Courvalin, 1993). 그러나 임상검체나 감염관리를 위한 검체에서 VRE가 분리되었을 때에는 그 균종을 정확히 동정하거나 vancomycin 내성의 유전자형을 정확히 밝혀야 한다. PCR 방법으로 VRE 유전자를 검출하는 것은 가장 특이도가 높은 검사법이고 저도 내성을 갖는 VRE 검출에도 유용하다고 알려져 있다(Leven, 2005). *vanA*와 *vanB* 유전자와 달리 *vanC* 유전자는 내인성의 균종 특이성이 있으며 유전자형의 결정만으로 균 동정이 가능하다. *vanC1*은 *E. gallinarum*, *vanC2*는 *E. casseliflavus*, *vanC3*는 *E. flavescens*에 특이적이지만 *vanC2*와 *vanC3* 유전자는 염기서열이 98.3%가 동일하여 PCR로 구분하기 어려운 것으로 알려져 있다(Navarro와 Courvalin, 1994). 본 연구에서는 VanA 균인 *E. faecalis* CDC 균주, 임상 대변검체에서 분리된 *E. faecium*, VanB 균인 *E. faecalis* CDC 균주, VanC형 중에서 VanC1인 *E. gallinarum* CDC 균주와 임상 대변검체에서 분리된 *E. gallinarum*을 PCR로 확인하여 표현형과 유전자형을 구분하였다.

광역학 치료는 광감작제를 전신 혹은 국소적인 방법으로 주입하여 축적시킨 뒤 특정파장의 광감작 광선을 조사하는 방식으로 원하는 표적을 선택적으로 파괴하여 신체의 손상을 최소화하기 위한 치료법이다. 현재 광역학 치료는 암세포 치료뿐만 아니라 항생제 내성균주 그리고 항암제와 병행 치료연구에도 활발한 연구가 진행되고 있다(Maisch, 2007). 현재 630 nm의 파장에서 에너지 흡수가 극대화되는 광감작제는 Hematoporphyrin derivatives (HPD)를 근간으로 하는

포르피머 소듐(porphimer sodium, 포토프린), 헤마토포피린 유도체(Hematoporphyrin Derivate, Photogem), 5-aminolevulinic acid (ALA) 등이 있으며 임상 허가가 나와 실제 적용되고 있다. 본 연구에 사용된 Photogem도 임상적 적용에는 문제가 없는 것으로 알려져 있다. 1900년, Raab에 의해 체외적인 방법으로 시도를 시작하여 오늘날까지 많은 연구들이 다양한 광감작제를 이용한 연구들이 이루어지고 있다(Hamblin와 Hasan, 2004). 그러나 국내에는 아직까지 박테리아 PDT가 시초단계이며, 많은 연구들이 이루어지지 않은 상태이다.

광역학 치료에 이용되는 광선은 주로 레이저가 사용되고 있는데 가격 면에서 고가인 것이 단점이다. 본 연구에서 사용된 LED는 사용이 용이하고 가격 면에서 저가여서, 최근, Peli 등(2008)에 의하면 메틸렌 블루와 663 nm LED를 이용하여 황색포도알균을 광역학치료 효과를 보았는데 균 희석액의 농도가 1×10^8 cells/mL로 시행하여 93% 감소하는 효과를 입증하였으며, 2010년 Rodnei 등에 의하면 장내세균에 광감작제인 Rose Bengal과 항균제인 erythrosin의 복합치료를 비교하였는데 여기에도 사용된 광원도 Blue light LED였으며, *Enterobacter cloacea*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*와 *Escherichia coli*를 대상으로 하여 *E. coli*에는 100% 완전한 사멸을 보였고, 나머지 세균에 대하여는 90% 이상의 감소를 보고하였다. 본 실험에서도 Photogem과 LED광원을 사용하여 표현형별로 비교하였더니 Fig. 2와 같이 내성이 강한 VanA형 *E. faecalis* CDC-286 균주는 Photogem의 농도 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 100% 사멸을 보였고, 같은 표현형인 임상분리균주인 *E. faecium*은 평균 1002 CFU/mL를 나타내어 같은 유전형이지만 균종에 따라 광역학 치료효과가 다르게 나타난 것을 볼 수 있었다. VanB 형인 *E. faecalis* CDC-583 균주도 Photogem의 농도 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 50 CFU/mL를 나타내어 같은 균종이지만 VanA 형 *E. faecalis* CDC-286보다 내성이 덜한 유전형이지만 완전 사멸을 못하였다. 이 결과로 유전형에 따라 치료효과가 달라진 것으로 생각된다. 그리고 Table 3과 같이 항균제 디스크 검사에서 치료 전, 후의 억제대를 비교 하였을 때 내성유전자의 강도의 차이와 무관하게 억제대 크기가 변한 것으로 보아 항균제 내성유전형별이 광역학 치료효과를 달

리 나타나지 않았으며, 균종별의 차이로 치료효과가 달라지는 것으로 생각되며, 본 연구는 많은 개체수를 조사하지는 못하였지만, VRE의 새로운 치료방법으로 사용될 수 있음을 입증하였다.

결론적으로 Photogem 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도와 630 nm LED를 이용한 광역학 치료는 VRE치료에 효과적인 것으로 나타나 새로운 치료방법으로 적용이 가능하며, 내성유전자형별 효과차이는 없는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistant in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993, 37:1563-1571.
- Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008, 52:2667-2672.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin—United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002, 51(26):565-567.
- Clark NC, Weigel LM, Patel JB, Tenover FC. Comparison of Tn 1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005, 49:470-472.
- Cuzon G, Naas T, Fortineau N, Nordmann P. Novel chromogenic medium for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol.* 2008, 46:2442-2444.
- Gorbach SL. Bismuth therapy in gastrointestinal disease. *Gastroenterology.* 1990, 99:863-875.
- Hamblin MR and Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *J Photochem Photobiol B.* 2004, 3:436-450.
- Korean Society for Nosocomial Infection Control. KONIC web-based reports & analysis program. http://konis.cdc.go.kr/sub/reports_icu.htm/, last visited on 04 Jun 2011.
- Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistant to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 1988, 319:157-161.
- Lee K, Jang SJ, Lee HJ, Ryoo N, Kim M, Hong SG, et al. Increasing prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae*, and imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Korea: KONSAR study in 2001. *J Korean Med Sci.* 2004, 19:8-14.
- Lee WG, Jung MK, Kwak YS. Vancomycin-resistant enterococci: incidence, antimicrobial susceptibility, and resistance genotypes. *Korean J Clin Pathol.* 1998, 18:51-56.
- Leven M. Molecular methods for the detection of antibacterial resistance genes. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in laboratory medicine*. 5th ed. 2005, p509-531. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA.
- Machado AE. HPhotodynamic therapy: principles, potential of application and perspectives. *Quimica Nova.* 2000, 23:237-243.
- Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future. *Laser Med Sci.* 2007, 22:83-91.
- Mang TS. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy.* 2004, 1:43-48.
- Merquior VL, GonCalves Neves FP, Ribeiro RL, Duarte RS, de Andrade Marques E, Teixeira LM. Bacteraemia associated with a vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* strain harbouring both the vanA and vanC1 genes. *J Med Microbiol.* 2008, 57:244-245.
- Navarro F and Courvalin P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994, 38:1788-93.
- Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1992, 72:195-198.
- Park JW, Kim YR, Shin WS, Kang MW, Han KJ, Shim SI. Susceptibility tests of vancomycin-resistant enterococci. *Korean J Infect Dis.* 1992, 24:133-137.
- Peloi LS, Soares RRS, Biondo CEG, Souza VR, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci.* 2008, 33:231-237.
- Phoenix DA, Sayed Z, Hussain S, Harris F, Wainwright M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003, 39:17-22.
- Raab C. Ber die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusoria. *Z Biol.* 1900, 39:524-646
- Rodnei RD, Juliana JC, Santos EL, Costa AC, Jorge AO. Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosin in photodynamic therapy against Enterobacteriaceae. *Lasers Med Sci.* 2010, 25:581-586.

24. Song JY, Hwang IS, Eom JS, Cheong HJ, Bae WK, Park YH, *et al.* Prevalence and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci (VRE) strains isolated from animals and humans in Korea. *Korean J Intern Med.* 2005, 20:55-62.
25. Uttley ACH, George RC, Naidoo J, Woodford N, Johnson AP, Collins CH, *et al.* High-level vancomycin resistant enterococci causing hospital infections. *Epidemiol Infect.* 1989, 103:173-181.
26. Uttley ACH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin resistant enterococci. *Lancet.* 1998, i:57-58.
28. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998, 42:13-28.
29. Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* 1976, 36:2326-2329.
30. Yoon YK, Sim HS, Kim JY, Park DW, Sohn JW, Roh KH, *et al.* Epidemiology and control of an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in the intensive care units. *Yonsei Med J.* 2009, 50:637-643.
31. 이위교, 광연식, 기재홍, 박한오. Vancomycin 내성 장구균의 소화관 내 보균율 및 PCR과 amplified fragment polymorphism (AFLP)를 이용한 분자생물학적 분류. 대한임상병리학회. 1996, 17:S69.