

Heat Shock Protein 60 유전자의 PCR-RFLP를 이용한 Coagulase 음성 포도구균의 균종동정

오은지, 장정도, 박연준, 김선무, 김병기

가톨릭대학교 의과대학 임상병리학교실

Species Identification of Coagulase Negative Staphylococci by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism of Heat Shock Protein 60 Gene

Eun-Jee Oh, M.D., Jung-Do Jang, M.D., Yeon-Joon Park, M.D.,
Sun Moo Kim, M.D., Byung Kee Kim, M.D.

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, the Catholic University of Korea,
Seoul, Korea

Background : An accurate and rapid method for species identification of coagulase negative staphylococci (CNS) has been increasingly necessary for the clinical significance and planning the management of patients with staphylococcal infections. Recently, it has been reported that there is a highly conserved area on their 60KDa heat shock protein (HSP60) gene sequences between the interspecies of CNS and it can be amplified by a set of universal degenerate primer. This led us our attention to focus on whether the PCR-based RFLP method using *Mse I* restriction enzyme could be a useful tool for the species identification of CNS.

Methods : In the present study, we performed PCR-based RFLP analysis using a set of degenerate primers covering HSP60 and *Mse I* restriction enzyme on the seven reference strains and 25 clinical isolates (10 of *S. epidermidis*, 10 of *S. haemolyticus*, 4 of *S. lugdunensis* and 1 of *S. warneri*) which were previously identified by the API-STAPH, Vitek GPI card and/or with conventional biochemical test.

Results : All the seven reference strains revealed that each strain has a distinct electrophoresed band patterns with combination of different number (up to 8) and size of fragments. And these distinct band patterns showed remarkable concordance with the seven reference strains and 25 clinical isolates.

Conclusion : These results strongly suggest that the PCR-RFLP method using degenerate primers covering the HSP60 gene and *Mse I* digestion enzyme offer a convenient and accurate tool for species-specific identification of CNS.

Key words : Coagulase Negative Staphylococci, Heat Shock Protein (HSP)60, Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism

서 론

원 본 접수 : 2000년 1월 15일
수정본접수 : 2000년 3월 4일
교신저자 : 박연준

접수번호 : CM 3-1-5

(137-040) 서울특별시 서초구 반포동 505번지
가톨릭대학교 의과대학 강남성모병원 임상병리과
Tel: 02-590-1604 Fax: 02-592-4190

Coagulase 음성 포도구균 (coagulase negative staphylococci ; CNS)은 병원감염 감시를 시행하는 병원들에서 분리되는 병원균 중 9.0 - 9.7%를 차지하고 [1, 2], 병원감염에 의한 균혈증의 26%를 차지하며 [3], 기

회감염의 원인으로 그 중요성이 크게 증가하고 있다. 포도구균에는 현재 32가지의 균종이 있으나, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. warneri*, *S. saprophyticus* 등이 가장 흔히 인체 감염을 일으킨다[4]. 따라서 이들의 균종별 특성 및 역학적, 임상적 의의에 대한 연구의 중요성이 증가하고 있으며 [2, 4-6], 균종에 따른 장기 특이성, 항균제 감수성 양상을 밝혀 CNS가 분리되는 환자의 치료 방침에 도움을 주기 위한 정확한 균종 동정이 필요하다. 균종 동정을 위한 방법으로서 생화학적, 물리적 특성을 이용하는 관례적 방법의 경우는 시간과 노력이 많이 들고, 상품화된 kit에 의한 표현형적 구별은 정확도가 50-70%로 낮은 실정이며 [6, 7], 분자생물학적 연구방법으로 ribotyping [8], DNA pulsed-field gel electrophoresis [9] 등이 있으나 방법이 복잡하고, 절편 양상을 해석하는데 어려움이 있어 아직도 개선을 요한다. 따라서 임상 검사실에서 비교적 손쉽게 CNS의 균종 동정을 정확히 밝힐 수 있는 방법이 필요하다. Heat shock protein (HSP) 60 유전자는 원핵생물과 진핵생물에 공히 존재하며 생존에 필수적이고, 변이가 없는 것으로 알려져 있으며, 이러한 특성으로 인해 최근 eubacteria의 계통 발생학적 연구 등에 사용되어지고 있다 [10-12]. 본 연구에서는 CNS를 대상으로 HSP60에 대한 중합효소연쇄반응(PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 방법으로 균종 동정을 시도하고, 상품화된 포도구균 동정 kit인 API STAPH와 Vitek GPI card를 이용한 표현형적 균종 동정을 시행하여 그 결과를 분석 후, HSP60 유전자의 PCR-RFLP 방법의 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

7가지 균종의 CNS 표준균주(*S. epidermidis* ATCC 14990 ; *S. haemolyticus* ATCC 29970 ; *S. lugdunensis* ATCC 49576 ; *S. warneri* ATCC 49454 ; *S. saprophyticus* ATCC 35552 ; *S. xylosus* ATCC 29977 ; *S. intermedius* ATCC 29663)와 임상검체에서 분리된 CNS 25균주(*S. epidermidis* 10균주, *S. haemolyticus* 10균주, *S. lugdunensis* 4균주, *S. warneri* 1균주)를 대상으로 하였다. 임상검체에서 분리된 25균주 중 *S. lugdunensis*는 API STAPH (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo, USA) kit 및 ornithine 검사, colony pigment 관찰 [13]을 추가로 이용하여 동정하였고, 나머지 임상균주들은 API STAPH kit와 Vitek GPI card (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.)를 이용하여 동정하였다.

2. HSP60 유전자의 PCR-RFLP

1) DNA 분리

실험 대상 균주를 혈액천배지에 18-24시간 배양 후 자란 집락 5-6개를 Brain Heart Infusion (BHI) 액체 배지에서 37℃에서 24시간동안 진탕 계대배양하였다. BHI 액체배지에서 자란 균액 1mL에서 QIAamp tissue kit (Qiagen Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 분리하였고, 용출된 DNA는 UV분광광도계(Ultaspec 3000, Pharmacia Biotech Inc., Cambridge, England)를 사용하여 정량하였다.

2) PCR

PCR 혼합물에는 50mM KCl, 10mM Tris (pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 200μM dNTP, *Taq* DNA polymerase 2U (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), 50ng DNA에 HSP60 gene에 대한 degenerate primer H1 5'-GAATTCGAIIGCIGGIGA(T/C)GGIACIACIAC-3', H2 5'-CGCGGGATCC(T/C)(T/G)I(T/C)(T/G)ITCICC(A/G)AAICCGGIGC(T/C)TT-3' [6]이 각각 30pmol 이 포함 되도록 하여 총 반응액이 100 μL가 되도록 하였다. PCR thermocycler는 Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Cetus, CT, USA)을 이용하여 95℃ 3분간 반응 후 94℃ 1분, 37℃ 2분, 72℃ 3분간 반응을 35회 반복하고, 마지막 반응은 72℃에서 10분간 반응시켰다. 이 후 PCR 반응물을 2% agarose gel에서 전기영동하여 600bp 증폭산물을 확인하였다.

3) 제한효소 처리

PCR 증폭산물에 무수 에탄올과 3M sodium acetate를 넣어 에탄올 침전반응을 시키고, 침전반응산물을 UV-분광광도계를 사용하여 정량하였다. 침전시킨 PCR 증폭산물에 증폭산물 1μg당 *Mse* I 제한효소 8U를 넣어 37℃에서 4시간 반응시킨 후, 제한효소 반응산물을 12% acrylamide gel에서 90V, 90분간 전기영동하고 0.5 mg/L ethidium bromide가 포함된 1X Tris-Borate EDTA 용액에서 30분간 염색하였다.

4) 전기영동상의 절편양상 분석

Ethidium bromide로 염색한 polyacrylamide gel을 영상 분석기(ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech Inc., Cambridge, England)를 이용하여 표준균주 절편의 크기를 구하고, 균종간의 특이성을 분석하였다.

3. 상품화된 kit에 의한 표현형 분석

1) API STAPH kit (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo, USA)를 이용한 동정

19가지의 기질이 각 tube에 들어 있는 API STAPH kit

에 제조원의 사용 지침에 따라 검사를 시행하였다. API STAPH 배지에 균을 풀어 균, 부유액의 탁도를 MacFarland 0.5에 맞춘 후, 각각의 기질이 들어 있는 microtube에 접종하고, 35℃에서 18시간 배양 후 감별도표를 참조하여 판독하였다.

2) Vitek GPI (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo, USA) card를 이용한 표현형 분석

Vitek GPI card를 이용하여 제조회사의 편람에 따라, 순수 배양된 균주를 Vitek 비색계로 McFarland 표준탁도 0.5에 맞추어 Vitek GPI card에 접종한 후 배양기 및 판독기에 넣고 4-15시간 후에 컴퓨터 프로그램(version R06.01)에 의해 판독하였다.

결 과

HSP60 유전자의 PCR-RFLP

Degenerate primer를 이용한 PCR 결과 7종의 포도구

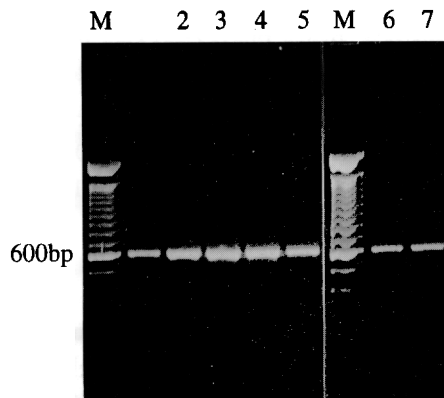


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified HSP60 gene from seven *staphylococcus* ATCC strains using a pair of degenerate primers. Lanes: 1. *S. intermedius* ATCC 29663, 2. *S. saprophyticus* ATCC 35552, 3. *S. haemolyticus* ATCC 29970, 4. *S. xylosus* ATCC 29977, 5. *S. epidermidis* ATCC 14990, 6. *S. lugdunensis* ATCC 49576, 7. *S. warneri* ATCC 49454, M, 100bp ladder.

균 표준균주(Fig. 1.)와 임상균주 25균주 모두에서 600bp의 증폭산물이 관찰되었다. 이들 증폭산물을 *Mse I* 제한효소를 사용하여 처리 후 polyacrylamide gel에서의 전기영동을 시행한 결과 표준균주 7균주 중 6균주에서는 2-8개의 다양한 절편이 관찰되었고, *S. haemolyticus* (ATCC 29970)는 제한효소에 반응하지 않고 600bp band 1개만이 관찰되어 균종간에 유전자형이 뚜렷이 구분되었다(Table 1, Fig. 2). 임상검체에서 분리된 25 균주의 PCR-RFLP 결과는 표준균주 양상과 동일하였다(Fig. 3).

2. 상품화된 kit에 의한 표현형 분석(Table 2)

1) API STAPH kit를 이용한 균종 동정

7종의 CNS 표준균주를 API STAPH kit를 이용하여 동정한 결과 *S. intermedius* (ATCC 29663), *S.*

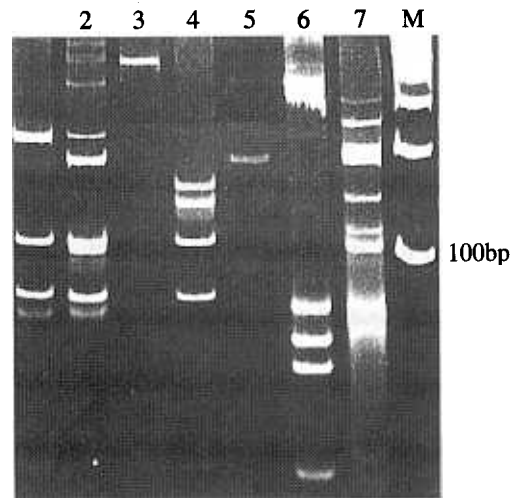


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis PCR-amplified HSP60 gene from seven staphylococcal ATCC strains after enzymatic restriction with *Mse I*. Lanes: 1. *S. intermedius* ATCC 29663, 2. *S. saprophyticus* ATCC 35552, 3. *S. haemolyticus* ATCC 29970, 4. *S. xylosus* ATCC 29977, 5. *S. epidermidis* ATCC 14990, 6. *S. lugdunensis* ATCC 49576, 7. *S. warneri* ATCC 49454, M, 100bp ladder.

Table 1. Summary of HSP 60 gene PCR-RFLP product sizes

Staphylococcal ATCC strains	Major band (bp)	Minor band (bp)
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	186, 183	
<i>S. haemolyticus</i> ATCC 29970	600	
<i>S. lugdunensis</i> ATCC 49576	308, 66, 53, 44	21
<i>S. warneri</i> ATCC 49454	288, 235, 193	344, 187, 180, 136, 110, 100, 64, 20
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 35552	216, 183, 104, 71	22, 18
<i>S. xylosus</i> ATCC 29977	152, 135, 104, 71	123, 22, 18
<i>S. intermedius</i> ATCC 29663	219, 106, 73	64, 23, 18

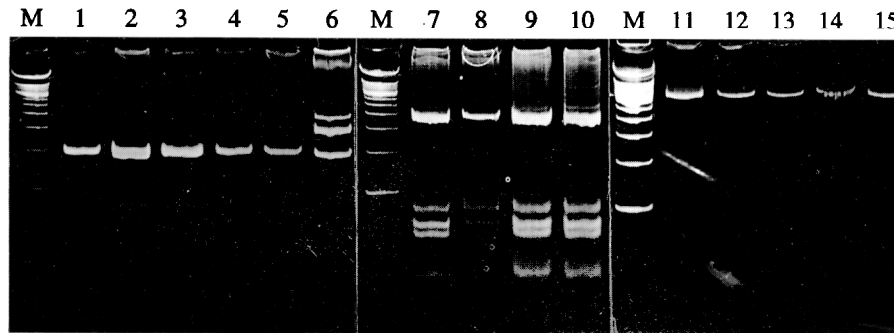


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR-amplified HSP60 gene from 14 clinical isolates of Staphylococci after enzymatic restriction with Mse I. Lanes: 1-5. *S. epidermidis*, 6. *S. warneri*, 7-10. *S. lugdunensis* 11-15. *S. haemolyticus*, M, 100bp ladder.

Table 2. Comparison of the API-STAPH and Vitek GPI card for the species identification of coagulase negative staphylococcal ATCC strains

Staphylococcal ATCC strains	API STAPH (% of identification)	Vitek GPI (% of identification)
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	<i>S. epidermidis</i> (93%)	<i>S. epidermidis</i> (93%)
<i>S. haemolyticus</i> ATCC 29970	<i>S. haemolyticus</i> (90%)	<i>S. haemolyticus</i> (99%)
<i>S. lugdunensis</i> ATCC 49576	<i>S. lugdunensis</i> (52%)	unidentified
<i>S. warneri</i> ATCC 49454	<i>S. warneri</i> (61%)	<i>S. warneri</i> (97%)
	<i>S. hominis</i> (31%)	
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 35552	<i>S. xylosus</i> (30%), <i>S. saprophyticus</i> (27%) <i>S. hominis</i> (25%)	<i>S. saprophyticus</i> (78%)
<i>S. xylosus</i> ATCC 29977	<i>S. xylosus</i> (99%)	<i>S. xylosus</i> (97%)
<i>S. intermedius</i> ATCC 29663	<i>S. intermedius</i> (80%)	<i>S. warneri</i> (96%)*

* misidentified.

haemolyticus (ATCC 29970), *S. xylosus* (ATCC 29977), *S. epidermidis* (ATCC 14990)은 19가지 기질 검사 중에서 80% 이상의 동정률로서 정확히 동정되었으나, *S. saprophyticus* (ATCC 35552), *S. warneri* (ATCC 49454), *S. lugdunensis* (ATCC 49576)은 기질 검사 결과 각각 27%, 61%, 52%로 낮은 동정율을 보였다. 동정 결과 불일치를 보인 생화학적 검사 항목으로는 *S. saprophyticus*(ATCC 35552)에서는 D-mannose와 sodium pyruvate 검사였고, *S. warneri*(ATCC 49454)와 *S. lugdunensis* (ATCC 49576)에서는 sodium pyruvate 검사였다.

2) Vitek GPI card를 이용한 표현형 분석

7종의 CNS를 Vitek GPI card로 검사한 결과, *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. haemolyticus* ATCC 29970, *S. warneri* ATCC 49454, *S. xylosus* ATCC 29977 4균주에서만 90% 이상의 동정률로서 정확히 동정되어 57% (4/7)의 일치율을 나타내었다. 동정되지 않은 3균주 중 *S. intermedius* ATCC 29663은 *S. warneri*로 잘못 동정되었고, *S. saprophyticus* ATCC 35552는 78%의 동정

율을 나타내었으며, *S. lugdunensis* ATCC 49576 균종은 어느 균종으로도 동정되지 않았다. 동정결과 불일치를 보인 생화학적 검사종목은 *S. intermedius*에서는 arginine 가수분해, lactose, mannitol, sorbitol, pyruvate였고, *S. saprophyticus*에서는 inulin, cellobiose 이었다.

고 찰

CNS는 면역이 저하된 환자나 이식 및 기관 삽입술 등의 이물질 반응과 관련되어 기회감염의 원인으로 그 중요성이 크게 증가하고 있으며 병원감염에 의한 균혈증의 26%를 차지한다[3, 5, 14, 15]. 따라서 이들 감염의 임상적 의의를 규명하기 위하여 CNS의 정확한 균종 동정이 요구된다. CNS의 균종 동정을 위한 판독적 방법의 경우, 시간과 인력이 많이 소요되고, antibiogram 및 ribotyping을 이용한 방법도 동정률이 60-70% 정도로 낮아 정확한 균종 동정이 불가능하다[3]. 그 외 phage typing 방법은 *S. epidermidis*와 *S. saprophyticus*에서 그 유용성이 보고되어 있으나, 방법과 균종 판독의 표준화가 필요하고 특이도와 재현성이

낮으며[16, 17], *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. xylosum* 등의 CNS에는 적용할 수 없어 임상적 유용성이 제한되어 있다[18, 19]. 상품화된 kit와 자동화 장비에 의한 표현형은 시행 방법이 간편하고 판독이 용이하여 일반 검사실에서 많이 사용하고 있으나, 정확도가 70-100%로 보고자마다 다양하고[20, 21], 특히 병원감염의 원인균으로 그 중요성이 증가하고 있는 *S. hominis*와 *S. warneri*의 경우 각각 36%와 27%의 오류를 보인다는 보고가 있다[7, 22]. 본 연구에서도 API STAPH kit를 사용한 결과, *S. warneri*가 *S. warneri* (61%), *S. hominis* (31%)로 동정되었으며, *S. saprophyticus* 및 *S. lugdunensis*의 정확도가 27%, 52%로 낮아 추가시험이 필요할 것으로 생각된다. Vitek GPI card의 경우 *S. intermedius*가 *S. warneri* (96%)로 잘못 동정되었고, *S. saprophyticus*는 78%의 낮은 정확도를 나타내었으며, *S. lugdunensis*는 data base에 포함되어 있지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 보면 API STAPH kit와 Vitek GPI card를 사용하여 7종의 CNS 표준균주를 동정한 결과, 두 방법 모두에서 4균종만 동정이 가능하였다. 특히 연조직 감염 및 카테터 감염, 패혈증, 심내막염의 원인균으로 그 중요성이 증가하고 있는 *S. lugdunensis*[23, 24]의 경우, Vitek GPI card에는 data base 자체에 포함되어 있지 않았으며, API STAPH에서도 52%의 낮은 정확도를 보였다. 그 외 분자생물학적으로 CNS의 균종을 동정하는 방법으로서, cellular fatty acid 분석은 비교적 저렴하고, 방법이 간단하며 많은 수의 균종을 동시에 동정할 수 있는 장점이 있으나 재료와 방법의 표준화가 어려워 임상적 유용성은 적고[3], plasmid 분석은 다양한 plasmid를 가지는 균종들에서는 유용하나 plasmid가 적은 *S. auricularis* 및 *S. lugdunensis* 등에서는 적용할 수 없는 단점이 있다[25]. Restriction endonuclease fingerprinting에 의한 분자생물학적 동정방법은 *Cla I*, *Pst I*, *Bgl II*, *Sac I* 등의 효소로 분석한 보고가 있으나 절편 수가 너무 많고 복잡한 양상을 보여 정확한 동정을 위해서는 southern blot hybridization 등의 추가 방법이 필요하다[26, 27]. 또한 ribotyping에 의한 CNS 동정방법은 균종간 서로 다른 절편 양상을 보여 판독이 용이하나, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* 등에서는 동일 종 내 다양한 유전자 발현을 보여 균종 동정이 어렵다[28]. 그 외 최근 보고되고 있는 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR에 의한 균종 동정은[29] 방법이 간단하나 PCR 과정을 2회 실시하므로 오염가능성이 있어 임상검사실에서 시행하기에는 부적합한 것으로 생각된다.

HSP60 유전자는 single-copy gene으로 원핵생물 및 진핵생물에 공히 존재하며 균종내 microheterogeneity가 거의 없고, DNA-DNA hybridization과의 일치율도 rRNA에 비해 높아 계통발생학적 연구에서 명확히 규명되지 못한 eubacteria의 특성 분석에 유용하다

[30]. Goh 등[6]은 HSP60 유전자에 대한 degenerate primer를 이용하여 29종의 포도구균과 그람양성 및 그람음성구균, mycobacteria, candida를 포함한 균들에서 PCR을 수행하여 600bp의 증폭산물이 생성됨을 보고하였다. 또한 포도구균에서의 증폭산물을 이용하여 제조한 소식자로 dot blot hybridization을 시행한 결과 균종간에 cross-hybridization이 일어나지 않아 HSP 유전자내에 포도구균의 균종 감별에 이용될 수 있는 다양한 유전자 서열 부위가 존재함을 시사하였고, 이를 reverse checkerboard chemiluminescent hybridization 방법으로 포도구균의 균종을 동정함으로써 증명하였다[15]. 그러나 Goh 등[15]이 균종 동정에 사용한 hybridization 방법은 실험과정에 target DNA의 양이 일정해야 하고, 소식자의 양도 일정하게 도포되어야 하며, 시험균주를 모든 표준균주와 hybridization 해야하는 불편함이 있다. 또한 *S. intermedius*와 *S. delphini* 소식자는 교차반응을 보이는 단점이 있다. 본 연구에서는 소식자 제조 과정이 필요 없는 제한효소 반응으로 균종간 감별을 시도하고자 하였으며, degenerate primer를 이용하여 시행한 PCR 반응물을 *Mse I* 제한효소로 처리하여 전기영동한 결과 균종간 서로 다른 절편이 관찰되어 육안 판독으로도 균종감별이 가능하였다. 표준균주에서 얻은 결과를 임상균주에 적용하기 위하여 Vitek card 또는 API-STAPH 및 관계적 동정법을 이용하여 확인된 25균주를 표준균주와 동일하게 실험한 결과 표준균주와 동일한 절편양상을 나타내어 균종내 heterogeneity가 없고, 동일 균종내에서 HSP60 유전자의 변이가 잘 일어나지 않음을 알 수 있었다. 또한 서로 다른 균종간에는 매우 뚜렷한 다양성을 보여 육안 판독으로 균종 동정을 할 수 있었으므로 임상 균주의 동정에 유용할 것으로 생각된다.

이상으로 CNS에서 HSP60 유전자의 PCR 및 *Mse I* 제한효소처리는 통상적인 생화학적 동정 시스템보다 정확하고, 비교적 간단한 유전자형 분석 방법으로서, 임상 미생물 검사실에서 CNS의 균종동정에 유용하게 이용될 수 있으리라 생각된다.

요 약

배 경 : Coagulase 음성 포도구균은 병원감염의 주요 원인균으로 그 빈도가 증가하고 있으며, 균종에 따라 감염 및 항균제 양상이 다양하므로 이들 감염의 임상적 의의, 역학 조사를 위해서 정확한 균종 동정이 필요하다. 본 연구에서는 60 kDa heat shock protein (HSP60)에 대한 degenerate primer를 이용하여 증합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 시행하고, *Mse I* 제한효소로 처리하여 반응산물의 다형성을 비교함으로써 coagulase 음성 포도구균의 균종을 동정하고자 하였다.

방 법 : 7종의 표준균주와 임상검체에서 분리된 25균주의 coagulase 음성 포도구균 (*S. epidermidis* 10균주, *S. haemolyticus* 10균주, *S. lugdunensis* 4균주, *S. warneri* 1균주)을 대상으로 DNA를 분리한 후, HSP60 gene에 대한 degenerate primer를 이용하여 PCR을 시행하고, 증폭산물을 *Mse* I 제한효소로 처리하여 전기영동상의 균주간 절편양상을 분석하였다. 표준균주를 대상으로 API-STAPH (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO, USA)와 Vitek GPI card (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO, USA)를 이용하여 표현형적 균종 동정을 실시하여, 그 결과를 증합PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 결과와 비교 분석하였다.

결 과 : PCR 결과, 실험 대상 균주 모두에서 600bp의 증폭산물이 관찰되었다. *Mse* I 제한효소 처리 후 전기영동 결과, *S. haemolyticus* ATCC 29970은 제한효소에 반응하지 않아 600bp band 1개만이 관찰되었으나, 나머지 표준균주 6종은 2-8개의 다양한 절편이 관찰되어 표준균주 균종간에 유전자형이 구분되었다. 임상검체에서 분리된 25균주의 PCR-RFLP 결과, 표준균주와 동일한 절편 양상이 관찰되었다.

결 론 : Coagulase 음성 포도구균에서 HSP60 유전자의 PCR 및 *Mse* I 제한효소처리는 통상적인 생화학적 동정 시스템보다 정확하고 비교적 간단한 유전자형 분석 방법으로서, 균종동정에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991;91:72S-5S.
- Jarvis WR, Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother* 1992;29:19-24.
- Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:117-40.
- Kloos WE and Bannerman TL. eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1999:264-82.
- Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National nosocomial infections surveillance system. *Am J Med* 1991;91:86S-9S.
- Goh SH, Potter S, Wood JO, Hemmingsen SM, Reynolds RP, Chow AW. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1996;34:818-23.
- Grant CE, Sewell DL, Pfaller M, Bumgardner RV, Williams JA. Evaluation of two commercial systems for identification of coagulase negative staphylococci to species level. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;18:1-5.
- Kloos WE, Ballard DN, Webster JA, Hubner RJ, Tomasz A, Couto I, et al. Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:313-23.
- Kumari DN, Keer V, Hawkey PM, Parnell P, Joseph N, Richardson JF, et al. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulse-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1997;35:881-5.
- Ellis RJ, van der Vies SM. Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 1991;60: 321-47.
- Yura T, Nagai H, Mori H. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Ann Rev Microbiol* 1993;47:321-50.
- Craig EA, Weissman JS, Horwich AL. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 1994;78:365-72.
- Kloos WE. *Staphylococcus*. In : Collier L, Balows A, Tenover FC, eds. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9th ed. London : Edward Arnold, 1998:577-622.
- Pfaller MA, Herwaldt LA. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:281-99.
- Goh SH, Santucci Z, Kloos WE, Faltyn M, George CG, Driedger D, et al. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *J Clin Microbiol* 1997;35:3116-21.
- Ferreiros CM, Souto MJ, Criado MT, Suarez P. Phage typing and phage induction in carrier and invasive *Staphylococcus epidermidis* isolates. *J Hosp Infect* 1991;18:293-9.
- Torres Pereira A and Melo Cristino JA. Phage typing of *Staphylococcus saprophyticus*. *Epidemiol Infect* 1991;107:557-63.
- Rosdahl VT, Gahrn-Hansen B, Møller JK, Kjaeldgaard P. Phage-typing of coagulase negative staphylococci. Factors influencing typability. *APMIS* 1990;98:299-304.

19. Boussard P, Pithsy A, Devleeschouwer MJ, Dony J. *Phage typing of coagulase negative staphylococci. J Clin Pharm Ther* 1992;17:165-8.
20. Crouch SF, Pearson TA, Parham DM. *Comparison of modified Minitek system with Staph-Ident system for species identification of coagulase negative staphylococci. J Clin Microbiol* 1987;25:1626-8.
21. Bannerman TL, Kleeman KT, Kloos WE. *Evaluation of the Vitek Systems Gram-Positive Identification card for species identification of coagulase negative staphylococci. J Clin Microbiol* 1993;31:1322-5.
22. Ieven M, Verhoeven J, Pattyn SR, Goossens H. *Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol* 1995;33:1060-3.
23. Herchline TE, Ayers LW. *Occurrence of Staphylococcus lugdunensis in consecutive clinical cultures and relationship of isolation to infection. J Clin Microbiol* 1991;29:419-21.
24. Kloos WE. ed. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9th ed. London: Edward Arnold, 1998:577-622.
25. Kloos WE. *Systematics and the natural history of staphylococci. Soc Appl Bacteriol Ser* 1990;19:25S-37S.
26. Bialkowska-Hobrzanska H, Jaskot D, Hammerberg O. *Evaluation of restriction endonuclease fingerprinting of chromosomal DNA and plasmid profile analysis for characterization of multiresistant coagulase negative staphylococci in bacteremic neonates. J Clin Microbiol* 1990;28:269-5.
27. Wilton J, Jung K, Vedin I, Aronsson B, Flock JI. *Comparative evaluation of a new molecular method for typing Staphylococcus epidermidis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:515-21.
28. Bialkowska-Hobrzanska H, Harry V, Jaskot D, Hammerberg O. *Typing of coagulase negative staphylococci by Southern hybridization of chromosomal DNA fingerprints using a ribosomal RNA probe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:588-4.
29. Mendoza M, Meugnier H, Bes M, Etienne J, Freney J. *Identification of Staphylococcus species by 16S-23S intergenic spacer PCR analysis. Int J Syst Bacteriol* 1998;48:1049-55.
30. Viale AM, Arakaki AK, Soncini FC, Ferreyra RG. *Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. Int J Syst Bacteriol* 1994;44:527-33.