

Infrequent Restriction Site 중합효소연쇄반응을 이용한 *Vibrio parahaemolyticus*의 유전자형

금동극*, 강정옥, 최태열

성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 임상병리과*, 한양대학교 의과대학 임상병리과

Genotyping of *Vibrio parahaemolyticus* by Infrequent Restriction Site Polymerase Chain Reaction

Dong G. Keum,* Jung O Kang, Tae Y. Choi

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Sungkyunwan University*, Hanyang University College of Medicine

Background: Infrequent restriction site PCR (IRS-PCR) is a recently described DNA fingerprinting technique based on selective amplification of restriction endonuclease-cleaved fragments. We applied of IRS-PCR to clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea.

Methods: IRS-PCR assay was performed with adaptors for *Xba*I and *Hha*I restriction sites. A total of 35 strains of *V. parahaemolyticus* which were isolated from clinical specimens of patients with diarrhea were analyzed. The isolates were collected from different geographic areas of Seoul (n=12), Incheon (n=21) and Gwangju (n=2) during 1998-2000 in Korea.

Results: In IRS-PCR, amplified DNA fragments between 50 and 400 bp were found to be the most reproducible in this study. When *V. parahaemolyticus* isolates were amplified with AH1 and PX-G as primers, 35 isolates could be grouped into five IRS-PCR patterns: A (n=16), B (n=4), C (n=6), D (n=5) and E (n=4). The patterns were subdivided into 15 subtypes: A1, A2, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, D1, D2, D3, E1, E2 and E3. The IRS-PCR patterns of *V. parahaemolyticus* did not show any relationship with serotype or geographic origin, but the isolates from same outbreak produced a same pattern(A1).

Conclusion: The results provide evidence of the discriminatory power of the IRS-PCR method as it applies to *V. parahaemolyticus*.

(*Korean J Clin Microbiol* 2002;5:119-123)

Key words : *Vibrio parahaemolyticus*, Infrequent restriction site-polymerase chain reaction, Genotyping.

서 론

*Vibrio parahaemolyticus*는 호염성 그람음성 세균으로 근해의 해수나 해산물에 서식하며, 인체 감염은 주로 부

적절하게 조리한 해산물의 섭취로 위장관염을 일으킨다 [1]. 현재 범 세계적으로 *V. parahaemolyticus* new O3:K6가 유행하고있으며, 이미 국내에서도 이 혈청형의 *V. parahaemolyticus*가 몇 년 전부터 유행하고 있다[2]. *V. parahaemolyticus*의 역학적 조사를 위해서는 항생제 감수성 검사, 혈청형 검사, 독소 검사 및 분자생물학적 검사 등이 이용되고 있으나, 혈청형 검사가 많이 이용되고 있다[2, 3]. 최근 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 분석법, ribotyping법 및 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)법 등의 분자생물학적 방법이 사용되고 있으나, 각 방법마다 기술적인 어려움 또는 결과 해석에

접수번호 : CM 5-02-07

교신저자 : 최태열

(133-792) 서울시 성동구 행당동 17

한양대학병원, 임상병리과

Tel : (02) 2990-8974 Fax : (02) 2298-1735

E-mail : tychoi@hanyang.ac.kr

제한성을 갖고 있다[4-7]. 본 연구에 사용한 infrequent restriction site-polymerase chain reaction (IRS-PCR)법은 Mazurek 등[8]에 의하여 개발된 유전자 typing 방법 중의 하나로 세균의 DNA를 분리 후 frequent site restriction enzyme (*HhaI*) 과 infrequent site restriction enzyme (*XbaI*) 으로 DNA를 절단하고, 증폭하고자하는 염기서열에 특이하게 붙을 수 있는 염기서열의 adaptor (*HhaI* adaptor /*XbaI* adaptor)를 제작하여 부착한 후, 이 adaptor에 상보적 DNA 염기서열의 primer (PX-G)와 adaptor(AH1)를 사용하여 절단된 DNA의 염기서열을 증폭하는 것이다. 이 IRS-PCR은 아직까지 많은 세균에 적용되지 않았기에, 연구자들은 최근 국내에서 유행하고있는 *V. parahaemolyticus*의 genotyping에 사용하여 유의한 결과를 얻을 수 있었다.

방 법

1. 연구대상

1998년부터 2000년까지 국내 설사 환자들의 대변 검체에서 분리 동정된 *V. parahaemolyticus* 35 균주, *V. vulnificus* 4 균주, *V. alginolyticus* 1 균주, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. parahaemolyticus* ATCC 17803, 및 *V. parahaemolyticus* ATCC 27519를 분석하였다. 분리된 *V. parahaemolyticus*의 지역별 분포는 서울 12 균주(한양대학 병원), 인천 21 균주(가천의과대학, 중앙 길병원), 광주 2 균주(전남대학병원)였으며, 연도별로는 1998년 16 균주, 1999년 14 균주, 2000년 5 균주였다. *V. vulnificus* 및 *V. alginolyticus*는 모두 서울에서 분리된 균주였다. *V.*

parahaemolyticus 중에서 S-7, S-8 및 S-9는 서울(S)의 동일 지역에서 동시에 발생한 설사 환자들의 가검물에서 분리되었다.

2. IRS-PCR

1) Template DNA

*V. parahaemolyticus*에서 분리된 DNA (5 μ L)를 제한효소 20 U *HhaI*과 20 U *XbaI*으로 mixed buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM MgCl₂, 10 mM DTT)에서 37 $^{\circ}$ C, 2시간동안 절단하였다(총량 12.5 μ L). T4 DNA ligase (1.5 U), ATP (12.6 pmol), 10x ligase buffer (2 μ L), *HhaI* adaptor (20 pmol), *XbaI* adaptor (20 pmol), 및 증류수로 총량 20 μ L로 맞추어 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 ligation 시킨 후 65 $^{\circ}$ C에서 20분간 T4 DNA ligase를 비활성화 시켰다. 검체는 다시 5 U *XbaI*와 5 U *HhaI*으로 ligation에서 다시 붙을 수 있는 restriction site를 다시 한번 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 절단하였다.

2) Adaptor와 primer

사용한 adaptor와 primer의 oligonucleotide 염기서열은 table 1 에 수록되어 있으며 바이오니아(청원, 충북, 한국)에 주문 제작하였다. 간략하게 adaptor 제작을 기술하면 *HhaI* 제한효소로 절단된 DNA의 CG-3', *XbaI* 제한효소에 의하여 절단된 DNA의 5' -CTAG에 ligation되도록 고안하였다. *HhaI* adaptor는 7 bp의 oligonucleotide (AH2)가 22 bp oligonucleotide (AH1)의 14bp부터 20 bp까지 annealing 되게 제작하였다. *HhaI* adaptor는 AH1 과 AH2를 동량의 molar를 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% [w/v] gelatin)에 혼합하여

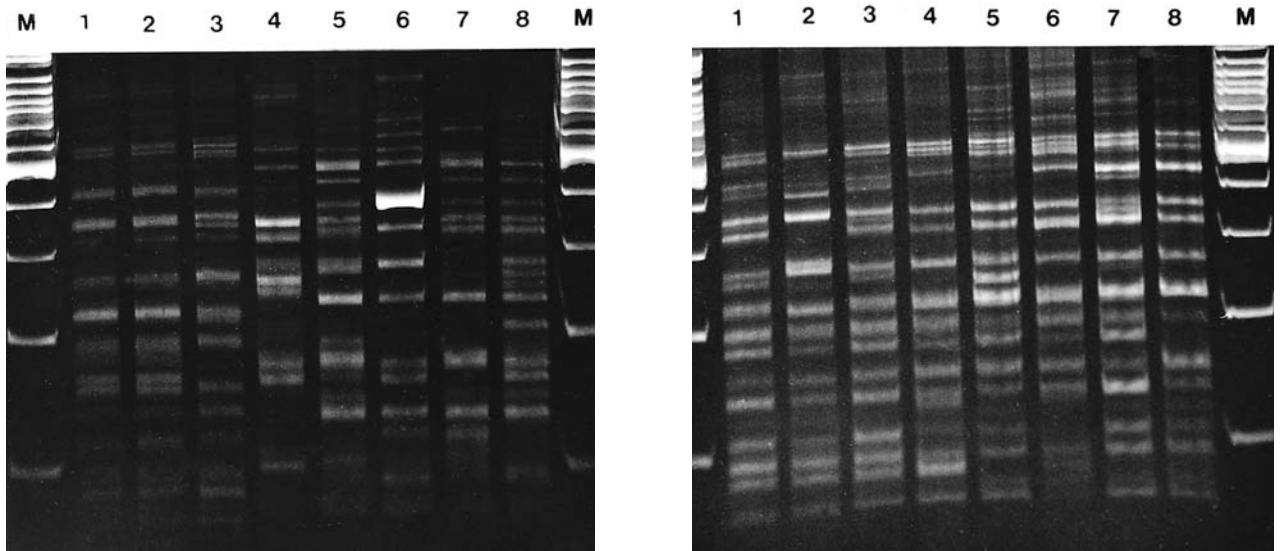


Fig. 1. IRS-PCR electrophoretic patterns of *V. parahaemolyticus* isolates; (Left) lane M, 100-bp ladder; lane 1, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; lane 2 *V. parahaemolyticus* ATCC 17803, lane 3, *V. parahaemolyticus* ATCC 27519; lane 4, *V. alginolyticus* isolate; lanes 5 to 8, *V. vulnificus* isolates, (Right) lanes 1 to 8, *V. parahaemolyticus* isolates (S-5, I-1, S-7, S-26, I-13, I-16, I-15 and I-17). The annealing temperature was 62 $^{\circ}$ C, and the primers were AH1 and PX-G.

Table 1. Adaptor and primer oligonucleotides

Oligonucleotide	Sequence
<i>HhaI</i> adaptor	
AH1.....5'	-AGA ACT GAC CTC GAC TCG CAC G-3' *
AH2.....3'	-TG AGC GT-5'
<i>XbaI</i> Adaptor	
AX1.....5'	-PO4-CTA GTA CTG GCA GAC TCT-3'
AX2.....3'	-AT GAC CG-5'
<i>XbaI</i> primers, PX-N [†]5'	-AGA GTC TGC CAG TAC TAG AN-3'

*: AH1 serves as part of the adaptor and as the *HhaI* primer.

†: N denotes any 4 nucleotide A, T, G, or C.

Table 2. Data summary for 35 *V. parahaemolyticus* isolates

Strains	Serovar new O3:K6*	Pattern of IRS-PCR	Year	Strains	Serovar new O3:K6*	Pattern of IRS-PCR	Year
I-1	-	B1	2000	I-26 [†]	+	A2	1999
I-4	+	B2	2000	I-27	+	A1	1999
I-8 [†]	+	B3	2000	I-28	+	A1	1999
I-11	+	B4	1999	S-5	+	A1	1998
I-12	-	E3	1999	S-6	-	C4	1998
I-13	+	C1	1999	S-7	+	A1	1998
I-14	-	E3	1999	S-8	+	A1	1998
I-15	-	E1	1998	S-9	+	A1	1998
I-16	-	D1	1998	S-10 [†]	+	A1	1998
I-17	+	D2	1998	S-12	+	A1	1999
I-18	-	E2	1998	S-13	+	A1	1999
I-19	+	D2	1998	S-14	+	A1	1999
I-20	+	C2	1998	S-15	-	C3	1999
I-21	+	D3	1998	S-16	-	C3	1999
I-22	+	D3	1998	S-17	-	C3	1999
I-23	+	A1	1998	G-1	+	A1	2000
I-24	+	A1	1998	G-2	+	A1	2000
I-25	+	A1	1999				

*Data were cited from [2].

[†]I-8, I-26, and S-10 were confirmed as serovar O4:K68 by slide agglutination test.

Abbreviations: S, Seoul; I, Incheon; G, Gwangju.

thermal cycler를 사용하여 80℃에서 4℃까지 1 시간 동안 온도를 점차 낮추어 annealing시켰다. 제작된 adaptor 는 20 μM로 맞추어 -20℃에 보관하여 사용 할 때마다 해동하여 사용하였다. *XbaI* adaptor는 7 bp oligonucleotide (AX2)가 18 bp oligonucleotide(AX1)의 5 bp부터 11 bp DNA에 ligation 되게 제작하였다. AX1의 5' 은 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 인산화 시켜 ligation에 사용하였다. 이 때 kinase는 즉시 65℃에서 10시간 비활성화 시켰다. AX1 와 AX2는 상기 방법과 동일하게 혼합하여 annealing 시켰다. PX primer는 AX1에 annealing 되도록 제작하였고,

XbaI 제한효소에 의하여 절단된 DNA의 3' 끝의 . . . TN(T, G, C, A) 염기서열의 상보적인 . . . AN(A, C, G, T)를 더 연장하여 제작하였다.

3) Amplification

PCR mixture는 1μL template DNA (ligation-redigestion product), 0.5 U Taq DNA polymerase, deoxynucleoside triphosphates (200 μM 각 각), AH1 및 PX-G primer (1.0 μ M), 10X PCR buffer 및 증류수로 총량이 50 μL 되도록 혼합하였다. 증폭은 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-

Elmer, Branchburg, NJ, USA)을 이용하여 initial denaturation은 94℃에서 5분간 그리고 denaturation은 94℃에서 30초, annealing 은 62℃에서 30초 extension은 72℃에서 90초로 40 cycle 증폭하였다. 증폭 산물은 7% polyacrylamide gel (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA)에서 200V, 2시간 전기 영동하여 ethidium bromide (0.5 µg/mL)로 10분간 염색 후 사진 촬영을 하였다.

결 과

IRS-PCR 결과는 주로 50 bp부터 400 bp사이에서 증폭된 DNA band가 재현성이 좋았으며, 50 bp이하 및 400 bp 이상의 DNA band는 재현성의 부족으로 결과 판독에서 무시하였다(Fig. 1). AH1과 PX-G를 primer로 사용하였을 경우 증폭된 DNA band 수는 8-14개 사이였다. 증폭된 DNA의 band 수와 band 위치에 따라 3개 이상의 차이가 있을 경우 유형을 A, B, C, D 및 E형으로 대별하였으며 각 유형에서 DNA band 수의 차이가 1-2개인 경우는 1, 2, 3 및 4로 세분하였다(Table. 2). *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus* 및 *V. vulnificus*는 증폭된 DNA band 수 및 위치의 차이가 커서(7개 band 이상) 다른 종이 쉽게 구별되었다. 특히 *V. vulnificus*는 증폭된 DNA 수 및 위치가 상이하여 분리 균주들의 DNA 염기서열의 다양성을 관찰할 수가 있었다(Fig. 1, lanes 5-8). 국내 분리된 *V. parahaemolyticus*의 IRS-PCR은 A형은 16 주(A1형: 15주 및 A2형: 1주), B형은 4 주(B1형: 1주, B2형: 1주, B3형: 1주 및 B4형: 1주), C형은 6 주(C1형: 1주, C2형: 1주, C3형: 3주 및 C4형: 1주), D형은 5 주(D1형: 1주, D2형: 2주 및 D3형: 2주), 및 E형은 4 주(E1형: 1주, E2형: 1주 및 E3형: 2주)로 A1형이 우세하였다. 각 균주의 IRS-PCR 유형은 현재 국내에서도 유행하고 있는 새로운 혈청형 new O3:K6과 무관하였고, 환자 거주지 및 발생연도와 상관성을 관찰할 수 없었다. 그러나 서울에서 집단 발생한 S7, S8 및 S9주는 모두 new O3:K6 혈청형으로 A1형에 속하였다.

고 찰

최근 *V. parahaemolyticus* new O3:K6가 전 세계적으로 유행하고 있으며, 국내에서도 지역적, 연도별 특성이 없이 현재 전국적으로 하절기에 유행하고 있다[2, 3, 5]. 연구자는 같은 혈청형의 *V. parahaemolyticus*라도 유전자의 염기서열에서는 차이가 있으리라 생각되어 최근 새로 개발된 IRS-PCR을 본 연구에 적용하였다.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)법을 이용한 *V. parahaemolyticus*의 유전자 결정에서 30여종 이상의 많은 type이 보고되고 있다[6]. 그러나 PFGE는 기술상 많은 양의 DNA가 필요하고 시간이 많이 소요되고, DNA band 수가 많아 결과 해석에 많은 어려움이 있다[4-6]. 본 연구에

서 사용한 IRS-PCR은 동일한 혈청형 new O3:K6라도 5가지 유전형으로 대별하여 구분할 수 있으며, 동일한 유형이라도 세분하여 2-4가지로 구분할 수가 있어 PFGE법과 결과 면에서도 필적할 만하다. 뿐만 아니라 IRS-PCR은 일반 PCR을 수행할 수 있는 검사실 이라면 기술상에 어려움 없이 신속하게 사용할 수 있는 장점이 있었다. 또한 IRS-PCR은 사용된 제한효소, 제작된 adaptor, 증폭에 사용한 primer의 종류에 따라 다양한 결과를 나타내어 시행자의 의도대로 실험을 기획하고 변화시킬 수가 있으며, 분석할 DNA 염기서열에 대한 정보가 없다고 하여도 사용된 adaptor의 DNA의 염기서열에 따라 primer를 제작하여 증폭을 시도할 수 있다[8, 9].

연구자가 *V. parahaemolyticus*에 사용한 제한효소는 *HhaI*과 *XbaI*이었는데, *HhaI*은 세균의 염기서열 중 흔히 존재하는 NNGCG-3' /CNN-3' 를 절단하며, *XbaI*은 세균의 염기서열 중 흔히 존재하지 않는 NNT-3' /CTAG-3' 를 절단하는 절단 효소이다. 본 연구에 사용된 IRS-PCR의 결과는 50-400 bp 사이에서 증폭되는 DNA band 수는 8-14개 정도였으며 재현성도 우수하였다. 사용된 primer (PX-G)는 *XbaI* adaptor의 AX1의 DNA 염기서열과 상보적이며 3' 말단 쪽으로 A는 *XbaI* 제한효소에 의하여 절단된 DNA (...TNN)의 T에 상보적인 DNA로 ligation 시 형성될 수 있는 primer dimer의 증폭을 막을 수 있다. A의 오른쪽에 G를 추가시킨 것은 증폭 시 특이성을 높이기 위하여 G, A, C, T 등을 추가시켜 각 primer에 따른 증폭의 특성을 높일 수가 있다[8]. 연구에 사용한 primer PX-G의 G를 C, A, T로 치환하여 사용하면 더욱 세분화된 유전형을 분석할 수 있으리라 생각되나, 본 연구에서는 PX-G로서도 *V. parahaemolyticus*의 유전형 분석에서 충분한 결과를 얻었기에 더 이상 실험을 연장하지는 않았다[8, 9].

본 연구 결과에서 *V. parahaemolyticus*는 A, B, C, D, 및 E형의 5가지로 구분한 기준은 Tenover 등[10]의 PFGE 결과 해석 기준을 참조하여 연구자가 임의로 결정한 방법으로 3개 이상의 DNA band의 차이가 있을 경우는 A, B, C, D 및 E형으로 대별하였고, 각 유형별 소 분류는 band 수의 차이가 1-2개인 경우 1, 2, 3 및 4로 세분하였다. *V. parahaemolyticus*의 IRS-PCR 유형의 DNA band 변화 수가 최고 6개 이하이고 같은 유형 내에서는 band 수의 차이가 1-2개 정도로 적은 것은 *V. parahaemolyticus*의 DNA 염기서열 중 돌연변이, 결손, 치환 등 염기서열의 변화가 다른 세균 (비정형 마이코박테리아, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens*, *Bartonella* spp., *Legionella pneumophila*)보다 비교적 적은 것으로 사료된다[8, 9, 11, 12]. IRS-PCR의 A, B, C, D, 및 E형은 지역 및 발생 연도와는 무관하였으나, 같은 장소에서 집단적으로 발생한 경우(S8, S9, S10)는 동일한 혈청형(new O3:K6)과 동일한 IRS-PCR 유형(A1형)을 나타내었다. 형광 물질이 부착된 primer를 사용한다면 증폭된 DNA band의 구별이 더욱 쉬우리라 생각되나, 본 연구에서는 전기영동 후 ethium

bromid로 염색후 UV상에서 각 band를 쉽게 구별할 수 있어서 형광 물질이 부착된 primer를 사용할 필요가 없었다 [9].

IRS-PCR은 임상 미생물 분야에서 역학적 연구 시 상당한 분별력뿐만 아니라 재현성이 높아, 분자 역학적 검사로 일반 PCR을 할 수 있는 검사실에서는 어디서나 손쉽게 시행할 수 있을 것으로 생각된다. 뿐만 아니라, primer와 adaptor만 미리 만들어 놓고 있으면, 검체 처리 과정을 포함하여 모든 과정이 하루 내에 이루어질 수가 있는 신속성이 있어 기존의 다른 분자 역학적 방법보다 더 우수할 것으로 사료된다[8, 9]. 그러나 동일한 primer를 사용한다 하여도 증폭 과정에서 DNA양, 온도, 완충액의 조건에 따라 많은 차이를 나타내 검사실 마다 알맞은 조건을 일정하게 유지하는 것이 중요하리라 사료된다[8]. 결론적으로, 연구자는 IRS-PCR법을 이용하여 특별한 장비나 probe 없이도 *V. parahaemolyticus*의 유전형 분석을 할 수가 있었다.

국 문 요 지

배 경 : Infrequent restriction site-polymerase chain reaction (IRS-PCR)은 2종의 제한효소로 절단된 DNA의 특정 부위를 증폭하는 DNA fingerprinting법이다. 본연구에서는 설사 질환 환자에서 분리된 *V. parahaemolyticus*를 IRS-PCR법을 이용하여 genomic fingerprinting을 시도하였다.

방 법 : IRS-PCR은 *HhaI* (frequent)와 *XbaI* (infrequent)의 제한효소 절단 위치에 맞게 adaptor (*HhaI* adaptor와 *XbaI* adaptor)를 제작하여 부착한 후 이 adaptor에 특이한 primer (PX-G, AH1)를 사용하여 시행하였다. 임상 분리균주는 1998년부터 2000년도까지 국내에서 설사환자로부터 배양 분리된 35 균주로 서울에서 12 균주, 인천 21 균주, 광주광역시 지역에서 2 균주를 채취하여 연구에 사용하였다.

결 과 : *V. parahaemolyticus* 균주를 대상으로 IRS-PCR을 실시한 결과, 증폭된 DNA 절편 중 50 bp와 400 bp에서의 증폭산물이 가장 재현성이 좋았다. AH1과 PX-G를 primer로 사용하여 IRS-PCR을 한 결과, A형(16 주), B형(4 주), C형(6주), D형(5주) 및 E형(4주)의 5가지 유형으로 구분할 수 있었고 이들은 다시 15가지 아형(A1, A2, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, D1, D2, D3, E1, E2 및 E3)으로 분류되었다. 균주의 IRS-PCR 결과는 항혈청형 결과(new O3:K6), 환자 거주지 및 분리 년도와도 상관이 없었다. 그러나 서울에서 집단 발생한 (S8, S9 및 S10)의 IRS-PCR은 동일한 A1형이었다.

결 론 : IRS-PCR을 *V. parahaemolyticus*의 genomic fingerprinting에 적용한 결과 분별력이 우수하여, PCR을 실시할 수 있는 임상 검사실에서 편리하게 사용할 수가 있었다.

참 고 문 헌

1. 권성열, 엄희섭, 오윤주, 조병관, 이동, 박원경 등. 인천에서 발생한 *Vibrio parahaemolyticus* 장염 유행의 크기 추정. *감염* 2000; 32: 100-7.
2. 금동극, 최태열. 군특이 중합효소연쇄반응을 이용한 *Vivrio parahaemolyticus* new O3:K6의 검출. *대한임상병리학회지* 2002; 22: 109-13.
3. Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mkhopadhyay AK, et al. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strain from the same clonal group from Southeast Asia travelers arriving in Japan. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3150-5.
4. Marshall S, Clark CG, Wang G, Mulvey M, Kelly MT, Johnson WM. Comparison of molecular methods for typing *Vibrio parahaemolyticus*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2473-8.
5. Chowdhury NR, Chakraborty S, Ramamurthy T, Nishibuchi M, Yamasaki S, Takeda Y, et al. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 631-6.
6. Wong HC, Lu KT, Pan TM, Lee CL, Shih DYC. Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1999; 34: 1535-9.
7. Skov MN, Pedersen K, Larsen JL. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, and plasmid profiling for typing of *Vibrio anguillarum* serovar O1. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 1540-5.
8. Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, Haas WH, Crawford JT. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2386-90.
9. Handley SA, and Regnery RL. Differentiation of pathogenic *Bartonella* species by infrequent restriction site PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3010-15.
10. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
11. Riffard S, LoPresti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M, Etienne J. Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 161-7.
12. Yoo JH, Choi JH, Shin WS, Hur DH, Cho YK, Kim KM, et al. Application of infrequent-restriction-site-PCR to clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Serratia marcescens*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3108-12.