

VI. 유행(outbreak) 조사와 분자역학 방법들

1. 개요

같은 시기에 발생한 많은 감염 사례들이 동일한 병원체에 의한 집단적 감염인지, 즉 유행(outbreak)인지, 아니면 우연하게 동시에 발생한 것인지는 이 병원체를 통제하기 위해 매우 중요한 관점이 되어 왔다. 이를 위해서는 각각의 사례에서 분리된 병원체들이 서로 동일한 균주인지 아닌지를 감별할 수 있어야 하며, 임상미생물학적으로는 생물형(생리학적 특성이 구분가능한 동일 종 내의 균주), 혈청형(서로 구분이 가능한 항원성의 의한 동일 종내 균주), 파지형(균주에 감염되는 bacteriophage의 종류로 구분되는 동일 종내 균주), 또는 항균제 감수성 결과 등의 표현형적 방법을 흔히 사용해 왔다. 그러나 1970년대 분자생물학적 분석법들이 도입됨에 따라, 유전적으로 동일한 균종인지를 확인하는 방법들이 각 분리 균주간의 동일성을 분석하는 보다 정확한 방법으로 인식되었다. 병원체의 아형을 결정하는 방법(subtyping)들과(표 1)에 유전형 분석 방법들의 특성에 대하여 요약하였다.

표 1. 병원체의 아형결정 방법(Bacterial subtyping methods)

구분	아형 결정 방법	대상 병원체	예
표현형적 방법	항균제 감수성 검사	세균	MRSA, CRE
	생물형	세균	<i>Shigella sonnei</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>
	혈청형	세균, 바이러스	<i>Salmonella</i> spp., <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Vibrio cholera</i>
	파지형	세균	<i>Salmonella Typhi</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. aureus</i>
	생화학적 프로파일 (BioNumber)	세균	<i>E. coli</i> , <i>V. cholera</i> , <i>Shigella</i> spp.
유전형적 방법	PCR (특이적인 병독성 유전자 혹은 독소 유전자)	세균	<i>E. coli</i> (EHEC), <i>Vibrio cholera</i>
	PFGE	세균, 진균	
	RFLP	세균, 바이러스	
	MLST, MLVA	세균	
	DNA sequencing	세균, 바이러스	
	PCR ribotyping	세균	
	Plasmid typing	세균	

Abbreviation; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; RFLP, restriction fragment length polymorphism; MLST, multilocus sequence typing.

A. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

이 manual은 "PulseNet"를 운영하는 CDC에서 권장하는 표준절차서로서 검사실 간의 재현성을 높이고자 상세한 부분까지 표준화가 되어 있는 자료이다. 원문 그대로 번역하여 옮긴다.

자료 출처: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocols.html>.

Escherichia coli O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*의 PulseNet PFGE 표준절차

1. 목적

Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)를 이용한 *E. coli* O157:H7, *E. coli* Non-O157 (STEC), *Salmonella*, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* 의 분자 아형 결정을 위한 1일(24~26시간) 표준절차(one-day SOP)를 기술한다.

2. 범위

PulseNet 참가자에게 *E. coli* O157:H7, *E. coli* Non-O157 (STEC), *Salmonella*, *Shigella sonnei* 및 *Shigella flexneri*의 PFGE를 수행하기 위한 동일한 절차를 제공하여 생성된 결과의 실험실 간 비교가능성을 보장한다.

3. 용어 정의

- ① PFGE: Pulsed-field Gel Electrophoresis
- ② DNA: Deoxyribonucleic acid
- ③ CDC: Centers for Disease Control and Prevention
- ④ CLRW: Clinical Laboratory Reagent Water

4. 생물안전 주의

Escherichia coli O157:H7, *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* 및 *Shigella flexneri*는 사람의 병원체이며 심각한 질병을 일으킬 수 있다. *Escherichia coli* O157:H7의 세균은 100 균체 미만이라도 감염이 발생할 수 있다고 보고되었다.

또한 *Shigella* 종들도 감염 용량이 낮아 검사실 직원들에게 위해한 것으로 나타났다. 이 균속들을 운반하고 취급할 때는 항상 Biosafety Level 2 검사실(최소한)을 사용하고 극도의 주의를 기울여야 한다. 많은 양의 세균수를 다룰 때는 생물안전작업대에서 작업하고, 배양 산물에 오염된 모든 플라스틱 제품과 유리 제품을 안전하게 소독하거나 처분해야 한다.

이 표준절차를 시작하기 전에 모든 지침을 주의 깊게 숙지해야 한다. 균액이나 균이 들은 agarose plug에 접촉되거나 오염된 모든 플라스틱 제품, 유리 제품, 피펫, 시약저 등은 해당 기관의 지침에

따라 처분하거나 소독한다. 재사용할 수 있는 plug 들은 세척 전에 소독해야 한다. Well에서 plug를 밀어내는 데 사용되는 탭과 테이프를 포함한 일회용 plug 들도 오염되어 있으므로, 세척하여 재사용할 경우 1% Lysol/Amphyll 또는 90% Ethanol을 사용하여 최소 30분 동안 소독해야 한다.

5. 방법

- Day 0

대상 세균 배양

Trypticase Soy Agar with 5% defibrinated sheep blood (TSA-SB) plates (or BAP)에 시험 배양으로부터 분리된 하나의 단독 집락을 배지 전면에 접종하여 충분히 배양한다. 각 배양 균주에 대하여 보관 vial을 만들어 놓는 것이 좋다. 보관 vial은 TSA, HIA (heart infusion agar) 또는 이와 유사한 배지를 작은 screw cap tubes에 만들어 TSA-SB에 접종한 loop를 그대로 찢어 넣으면 된다. 이렇게 하면 필요한 경우 동일한 집락을 재검할 수 있다. 37°C에서 14~18 시간 동안 배양한다.

- Day 1

Plugs 만들기

아래의 모든 stock solution은 멸균되어야 한다.

- 1) 진탕 항온수조 혹은 진탕 배양기는 54~55°C로, 일반 항온수조는 55~60°C로 조정하여 준비하고, Spectrophotometer나, Microscan Turbidity meter, 혹은 bioMérieux Vitek colorimeter를 준비한다.
- 2) 다음과 같이 TE Buffer (10 mM Tris: 1 mM EDTA, pH 8.0)를 준비한다.
 - (1) 10 mL of 1 M Tris, pH 8.0
 - (2) 2 mL of 0.5 M EDTA, pH 8.0
 - (3) Dilute to 1,000 mL with sterile Ultrapure Clinical Laboratory Reagent Water (CLRW)

※ TE buffer는 plug agarose를 만들 때, 그리고 효소 처리된 PFGE plug들을 세척할 때 사용한다.
- 3) PFGE plug를 만들기 위해 다음과 같이 멸균된 250 mL screw-cap flask에 1% SeaKem Gold agarose in TE Buffer를 제조한다.
 - (1) 0.50 g (or 0.25 g) SeaKem Gold (SKG) agarose
 - (2) 50.0 mL (or 25.0 mL) TE Buffer를 첨가하여 agarose가 잘 퍼지도록 부드럽게 저어준다.
 - (3) 플라스크의 입구를 크린랩으로 막고 전자레인지에 30초 가열한다. Agarose가 완전히 녹을 때까지 10초 간격으로 부드럽게 흔들어 준다.

(4) 뚜껑을 닫고 온도가 맞추어진 55~60°C 항온수조에 15분간 혹은 사용 전까지 항온 시킨다.

※ 안전주의: 전자레인지에 가열된 플라스크 취급 시 방열 장갑 착용.

SeaKem Gold agarose는 plug의 효소처리와 세척 과정 중의 파손을 최소화할 수 있을 정도의 강도를 만들어 주기 때문에 PFGE plug 제조에 적합하다. Agarose를 완전히 녹이는 데 필요한 시간과 온도는 사용된 전자레인지의 사양에 따라 다르며 각 검사실에서 경험적으로 결정되어야 한다.

4) 멸균된 5 mL conical tube (12 mm x 75 mm Falcon tubes)에 균주 번호를 기록한다.

5) 다음과 같이 Cell Suspension Buffer (100 mM Tris: 100 mM EDTA, pH 8.0)를 만든다.

5.1. 100 mL of 1 M Tris, pH 8.0

5.2. 200 mL of 0.5 M EDTA, pH 8.0

5.3. Dilute to 1,000 mL with sterile Ultrapure water (CLRW)

6) 2 mL 의 Cell Suspension Buffer (CSB)를 균주번호가 기록된 5 mL conical tube에 넣는다. 멸균된 면봉을 CSB에 적신 후 배양된 집락 여러 개를 묻혀 conical tube 속의 CSB에 넣어 부드럽게 흔들어 균들이 고루 퍼지도록 부유시킨다. 작은 기포가 생기지 않도록 주의한다.

※ 필요한 세균 부유액의 최소 부피는 부유액의 농도를 측정할 장비(spectrophotometer, turbidity meter, or colorimeter)들의 사용 부피에 따라 준비한다. 6균주 이상을 준비할 경우는 부유액을 얼음에 보관한다. 부유액의 농도 조절을 바로 실시하지 않을 경우엔 냉장보관 한다.

7. 멸균된 CSB로 희석하거나 균을 추가하거나 하여 아래의 기준으로 세균 부유액의 농도를 조정한다.

1) Spectrophotometer: 610 nm wavelength, 흡광도(OD): 1.00 (range of 0.8~1.0)

2) Dade Microscan Turbidity Meter.

7.2.1. 0.40~0.45 (measured in Falcon 2054 tubes)

7.2.2. 0.58~0.63 (measured in Falcon 2057 tubes)

3) bioMérieux Vitek colorimeter: 17~18% transmittance (measured in Falcon 2054 tubes)

위 기준은 미국 CDC에서 만족할 결과를 위한 것이며 각 검사실에서 만족할 만한 결과를 얻기 위해 적정 농도를 결정할 수 있다.

Plugs 주조

1) PFGE plug molds의 각 well에 균주 번호를 기록한다. 재활용 plug mold를 사용할 때는 균주번호를 기록하기 전에 plug mold의 아래 부분을 테이프로 막아둔다.

※ 사용하지 않은 plug agarose는 실온에 보관하여 1~2회 정도 반복하여 사용할 수 있다. 전자레인지

지에 중간 세기로 10~15초 가열하여 녹이고 잘 흔든 후, 완전히 녹을 때까지 다시 5~10초 간격으로 가열하고 흔들어 사용한다. 이 agarose는 빠르게 녹는다.

2) 균주 번호가 적힌 멸균된 1.5 mL microcentrifuge tubes에 400 μ L adjusted cell suspensions를 넣는다.

3) 각 tube에 20 μ L of Proteinase K (20 mg/mL stock)를 가하고, pipette tip으로 부드럽게 혼합한다.

※ Proteinase K solutions (20 mg/mL)은 상품화된 것을 사용할 수 있다. 검사실에서 제조할 때는 멸균된 Ultrapure water (CLRW)로 제조한다. 가장 좋은 것은 작은 tube에 300~500 μ L 씩 분주하여 사용 전까지 -20°C에 얼려 보관하여 사용하는 것이다. 사용 직전에 필요한 양 만큼의 Proteinase K (PK) solutions를 녹인 후 얼음에 놓고 사용한다. 사용하고 남은 녹여진 Proteinase K 는 다시 얼리지 않고 폐기한다.

4) PK 처리된 세균을 부유액 400 μ L 에 녹여서 보온 중인 1% SeaKem Gold agarose 400 μ L 를 가하고 여러 번 부드럽게 pipetting을 하여 혼합한다. Over-pipetting은 DNA 손상의 원인이 될 수 있다. 1% SeaKem Gold agarose는 55~60°C 항온수조에 보관하여 온도를 유지해야 한다.

5) 즉시, 세균 부유액-agarose 혼합액을 균주번호가 맞는 plug mold의 well에 주입한다. 하나의 균주 번호 당 최소 2개의 plug를 만든다. 하나는 필요한 경우 재검에 사용할 수 있다. Well에 주입 시 기포가 생기지 않도록 주의한다. 실온에 10~15분 방치하여 굳힌다. 냉장고에 5분간 넣어 굳힐 수도 있다. Plug mold 아래를 막은 테이프가 따뜻한 agarose에 닿으면 쉽게 떨어져 새는 경우가 발생할 수 있으니 주의한다.

※ 일회용 plug molds를 사용할 경우는 세균 부유액, PK, agarose 부피를 반으로 줄여서 준비하고 준비한 혼합액으로 4개 까지 만들 수 있다.

※ Plug 주조 전에 PK의 선 처리를 하였기 때문에 중간에 세포 용해가 일어날 수 있어 이 주조 과정은 가능한 빠르게 진행해야 한다. 만약 많은 수의 균주에 대하여 plug를 주조한다면 한번에 10균주씩 반복하여 주조하는 것을 권장한다. 첫 번째 batch가 실온에 굳으면서 agarose내의 세균의 lysis가 진행되는 동안 두 번째 batch를 시작하는 형태로 신속하게 진행하면 된다.

이 추가적인 세균 용해 시간이 첫 번째 batch에 영향을 미치지 않기 때문에, 모든 batch는 세균 용해 과정과 세척 과정들을 함께 진행할 수 있다.

※ 이 plug들의 크기는 PFGE 전기영동 겔의 well들의 크기에 맞는 크기로 각 well의 구멍을 마치 마개로 막는 모양이라는 뜻에서 "plug" 라는 용어를 사용하였다.

Agarose Plugs 속의 세균 용해

같은 균주의 plug들은 같은 50 mL conical tube에서 함께 용해 과정이나 세척 과정을 진행할 수 있다. 한 tube에 서로 다른 균주의 plug들이 섞이면 안 된다.

- 1) 균주 수만큼의 50 mL polypropylene screw-cap 혹은 50 mL Oak Ridge tubes를 준비하고, 균주 번호를 기록한다.
- 2) 다음과 같이 Cell Lysis Buffer (50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8.0+1% Sarcosyl)를 제조한다.
 - 2.1. 50 mL of 1 M Tris, pH 8.0
 - 2.2. 100 mL of 0.5 M EDTA, pH 8.0
 - 2.3. 100 mL of 10% Sarcosyl (N-Lauroylsarcosine, Sodium salt)
 - 2.4. Dilute to 1,000 mL with sterile Ultrapure water (CLRW)
- 3) 사용할 총 Cell Lysis/Proteinase K Buffer의 부피를 계산한다.
 - 3.1. 하나의 50 mL tube당 5 mL Cell Lysis Buffer를 사용한다.
10개 tube면, 5 mL x 10 tubes = 50 mL
 - 3.2. 각 tube 당 25 µL Proteinase K stock solution (20 mg/mL)을 사용한다.
25 µL x 10 tubes = 250 µL
- 4) 계산된 부피의 Cell Lysis Buffer와 Proteinase K를 적절한 용기에 넣고 혼합하여 master mix를 준비한다. 이 lysis buffer 내 Proteinase K의 최종농도는 0.1 mg/mL 가 되며, 세균 부유액에 첨가되었던 농도(0.5 mg/mL)와는 다르다.
- 5) 균주 번호가 적힌 각 50 mL tube에 Proteinase K/Cell Lysis Buffer를 5 mL 가한다.
- 6) 굳은 plug들의 mold 위로 빠져 올라온 agarose가 보이면 얇은 칼날로 깨끗하게 제거한다.
Mold를 열고 6-mm wide spatula를 이용하여 같은 균주 번호가 적힌 준비된 50 mL tube에 조심스럽게 옮긴다. Plug들은 tube의 벽에 닿지 않고 buffer 속에 확실히 들어가야 한다. 이 제거된 agarose, plug mold, spatula 등은 오염되었으므로 적절한 소독처리를 해야 한다.
- 7) Mold에서 테이프를 제거하고 spatulas, scalpel과 함께 90% ethanol, 1% Lysol/Amphyll 혹은 다른 적절한 소독제로 소독한다. 세척 전에 15분 정도 소독액에 넣어 처리한다. 일회용 plug molds는 버리거나 혹은 재사용할 경우 90% ethanol에서 30~60 분간 방치한 후 세척한다.
- 8) Tube들을 rack에 세워 고정하고 54~55°C 진탕수조에서 1.5~2시간동안 세게 진탕하면서(150~175 rpm) 배양한다. 수조 내에서 용해가 일어나는 동안 수조의 수위는 tube의 lysis buffer 수위보다 높아야 한다.
- 9) 멸균된 Ultrapure water (CLRW)를 54~55°C로 사전에 충분히 가열해 놓는다. Plug들을 10~15 mL 로 두 번 세척할 수 있는 양을 준비한다(200~300 mL for 10 tubes).

세균 용해 후 Agarose Plugs의 세척

54~55°C 다음의 세척 과정을 진행할 때 plug들이 충분히 안전한지 확인해야 한다. 만약 plug들이 가장자리를 따라 금이 가거나 부서지는 경우가 있다면 진탕수조의 온도를 50°C로 낮출 필요가 있다.

- 1) 진탕수조에서 tubes를 꺼내어 깨끗한 용기에 lysis buffer를 부어 제거한다. 이때 투명한 색깔의

plug들이 함께 버려지는 경우가 없도록 spatula 같은 도구를 사용하여 plug들을 tube내에 붙잡아 두어야 한다. 모든 세척 과정에서 buffer나 세척액은 흡습지 위에 screened cap을 사용하거나 tube의 입구 가장자리를 조심스럽게 대어 완전히 제거하는 것이 중요하다. 상품화된 Plug 세척용기를 tube에 넣어 사용할 수도 있다.

- 2) 10~15 mL 의 가온된 멸균 Ultrapure water (CLRW)를 각 tube에 넣고, 54~55°C 진탕수조에서 10~15분간 진탕한다.
- 3) 동일하게 주의하면서 물을 조심스럽게 완전히 제거하고 2)번의 세척 과정을 한 번 더 반복한다.
- 4) 3)번 과정을 시작하기 전에 멸균된 TE Buffer (10 mM Tris: 1 mM EDTA, pH 8.0)를 54~55°C 수조에서 충분히 가온해 둔다. 10~15 mL TE Buffer로 4번씩 세척할 수 있는 양을 준비한다(400 ~ 600 mL for 10 tubes).
- 5) 물을 버리고 가온(54~55°C)된 멸균 TE Buffer 10~15 mL를 첨가하여 54~55°C 진탕수조에서 10~15분간 진탕한다.
- 6) TE Buffer를 버리고 이 세척 과정을 3번 더 반복한다.
- 7) 마지막 세척액을 버리고 5~10 mL sterile TE buffer를 가한다. 제한효소 처리 절차를 진행하던지 아니면 사용할 때까지 냉장고에 보관한다. Plug들은 조금 더 작은 tube에 옮겨 장기 보관할 수도 있다. 만약 같은 날에 제한효소 처리를 계속하여 진행할 경우는 마지막 TE 세척단계가 진행되는 동안 다음의 제한효소 처리 절차의 1)~3)번 과정을 완료해 두는 것이 시간적으로 적절하다.

Agarose Plugs 내 DNA의 제한효소 처리

Plug 조각은 아래 표에 따라 1차 제한효소로 처리되어야 한다. 그 이유는 PFGE에는 rare cutting enzyme이 필요하기 때문이며, 결과가 좋지 않을 경우, 2차 혹은 3차 제한효소로 남은 다른 조각들을 처리할 수 있기 때문이다. *E. coli* 종, *Salmonella* 종 및 *Shigella sonnei*는 1차 효소로 XbaI를, 2차 효소로 BlnI를 사용한다. *Shigella flexneri*는 1차 효소로서 NotI 및 2차 효소로서 XbaI로 시험한다. 2차(또는 3차) 효소의 사용은 2개 이상의 균주로부터 1차 효소로 얻은 PFGE 패턴을 구별 할 수 없는 상황에서 유용하다.

Organism	Primary Enzyme	Secondary Enzyme	Tertiary Enzyme
<i>E. coli</i> O157	XbaI (50 U/sample)	BlnI/AvrII (30 U/sample)	SpeI (30 U/sample)
<i>E. coli</i> non-O157	XbaI (50 U/sample)	BlnI/AvrII (30 U/sample)	SpeI (30 U/sample)
<i>Salmonella</i>	XbaI (50 U/sample)	BlnI/AvrII (30 U/sample)	SpeI (30 U/sample)
<i>S. sonnei</i>	XbaI (50 U/sample)	BlnI/AvrII (30 U/sample)	SpeI (30 U/sample)
<i>S. flexneri</i>	NotI (50 U/sample)	XbaI (50 U/sample)	SpeI (30 U/sample)

- 1) 1.5 mL microcentrifuge tubes를 균주 수대로 준비하고 균주번호를 기록 한다: Salmonella ser. Braenderup H98121standards를 표준균주로 사용하며 10-well gel에는 3개 well, 15-well gel의 경우는 4개의 well을 사용하므로 표준균주용 tubes를 3개 혹은 4개 준비하여 표시한다.
- 2) 제한효소 반응 준비: 10X restriction buffer를 sterile Ultrapure water (CLRW)로 다음과 같이 1:10 희석하여 1X restriction buffer를 제조한다.

Reagent	$\mu\text{L}/\text{Plug Slice}$	$\mu\text{L}/10 \text{ Plug Slices}$	$\mu\text{L}/15 \text{ Plug Slices}$
CLRW	180 μL	1,800 μL	2,700 μL
10X Restriction Buffer	20 μL	200 μL	300 μL
Total Volume	200 μL	2,000 μL	3,000 μL

- 3) 균주번호가 적힌 1.5 mL microcentrifuge tube에 200 μL 씩 1X restriction buffer를 첨가한다.
 - 4) 세척이 끝난 plug를 TE에서 spatula를 이용하여 꺼내어 일회용 멸균 Petri dish 혹은 큰 유리 슬라이드위에 놓는다.
 - 5) 한쪽 날만 있는 면도날(혹은 메스, 혹은 cover slip)로 각 균주의 plug와 표준균주 plug를 2.0~2.5 mm 넓이로 자른다. Spatula를 이용하여 희석된 restriction buffer가 들어 있는 1.5 mL microcentrifuge tube에 균주번호를 확인하면서 조심스럽게 buffer 속에 잠기도록 옮긴다. 남은 plug는 다시 5 mL TE buffer가 들어 있는 tube에 옮겨 4°C에 보관한다.
- PulseNet은 전기영동 겔을 만들 때 큰 teeth (10 mm 넓이 teeth)를 가진 comb로 만들길 권장한다. 그 이유는 각 gel lane들을 컴퓨터로 분석할 때, 작은 teeth (5.5 mm) 보다 정확하고 분석 시간이 짧기 때문이다. Plug로부터 잘려지는 조각의 수는 실험자의 경험과 숙련도, plug의 견고성, 그리고 plug를 수직으로 자를 지, 수평으로 자를 지에 달려있다.

5.1. 검체와 control plug 조각들을 37°C 수조에 5~10분, 혹은 실온에 10~15분 놓아둔다.

이 과정은 제한효소 반응 buffer가 plug 조각 내에 평형상태를 이루기 위함이다.

5.2. 그 후 200~250 μL tip을 장착한 피펫을 이용하여 tube의 바닥에서부터 조심스럽게 buffer를 흡입하여 제거한다. 이 과정에서 plug 손상이 있기 쉬우므로 주의해야 한다. 때로 plug 조각이 pipette tip에 흡입되기도 하니 주의해야 한다.

- 6) 다음과 같이 제한효소 master mix를 제조한다.

Reagent	$\mu\text{L} / \text{Plug Slice}$	$\mu\text{L} / 10 \text{ Plug Slices}$	$\mu\text{L} / 15 \text{ Plug Slices}$
CLRW	173 μL	1,730 μL	2,595 μL
10X Restriction Buffer	20 μL	200 μL	300 μL
BSA (10 mg/mL)	2 μL	20 μL	30 μL
XbaI (10 U/ μL)	5 μL	50 μL	75 μL
Total Volume	200 μL	2,000 μL	3,000 μL

※ 제한효소는 항상 온도 차단이 되는 저장 상자에 넣어 -20℃ 보관하고 사용 시에는 얼음 속에 유지되어야 한다.

※ Bovine Serum Albumin (BSA) 첨가를 강력히 권장: 몇몇 제한효소 공급업체는 master mix에 1X BSA를 추가하는 것을 특별하게 권장한다. PulseNet Central은 불완전한 효소 소화의 발생을 최소화하기 위해 모든 제한효소 반응액에 BSA를 추가할 것을 권장한다.

- 7) 각 tube에 200 μ l restriction enzyme master mix를 첨가한다. 뚜껑을 막고 손으로 조심스럽게 쳐서 혼합한다. Plug 조각이 master mix 내에 잘 들어 있는지 확인한다. 벽면에 붙어 있으면 안 된다.
- 8) 37℃ 수조에서 1.5~2시간 반응시킨다.
- 9) 만약 PFGE agarose 겔에 제한효소로 처리된 plug 조각들을 well에 넣어 전기영동을 하고자 하면, 제한효소 반응을 실시하기 약 1시간 전에 다음에 기술하는 절차(agarose gel 제조)의 1~4 단계를 실시하여, 제한효소로 처리된 plug 조각들을 well에 넣어 전기영동하기 전 최소한 30분 전에 충분히 gel이 굳도록 해야 한다.

Agarose Gel 제조

- 1) 수조가 55~60℃로 준비되어 있는지 확인한다.
- 2) 다음과 같이 0.5X Tris-Borate EDTA Buffer (TBE)를 만든다. 이 buffer는 전기영동 완충이기도 하고 동시에 agarose gel을 만드는 용액이기도 하다.

Reagent	Volume (mℓ)	Volume (mℓ)
5X TBE Stock	200	220
CLRW	1,800	1,980
Total Volume	2,000	2,200

Reagent	Volume (mℓ)	Volume (mℓ)
10X TBE Stock	100	110
CLRW	1,900	2,090
Total Volume	2,000	2,200

- 3) 다음과 같이 0.5X TBE에 1% SeaKem Gold (SKG) Agarose를 만든다.

3.1. 500 ml screw-cap flask에 다음과 같이 준비한다.

- 14 cm-wide gel form (10 wells)을 만들려면 100 ml 0.5X TBE에 1.0 g SKG agarose를 준비
- 21 cm-wide gel form (10 wells)을 만들려면 150 ml 0.5X TBE에 1.5 g SKG agarose를 준비

3.2. 0.5X TBE를 넣고 agarose가 잘 혼합되도록 흔들어 준다.

- 4) 뚜껑을 조금 열어놓고 60초 동안 전자레인지에 가열한다. 완전히 녹을 때까지 15초 간격으로 조심스럽게 흔드는 것을 반복한다.
- 5) 플라스크를 50~60°C 수조에 넣어 15분간 혹은 사용 전까지 수조온도에 평형이 되도록 놓아둔다.
안전주의: 전자레인지에 가열된 플라스크 취급 시 방열 장갑 착용.
※ 현재, Agarose LFTM (Amresco, X174)와 Certified Megabase Agarose (Bio-Rad, 161-3108)만이 SeaKem Gold를 대체할 수 있는 제품이다. Agarose를 완전히 녹이는 데 필요한 시간과 온도는 사용된 전자레인지의 사양에 따라 다르며 각 검사실에서 경험적으로 결정되어야 한다.
- 6) 1% SKG agarose 용액(약 2~5 ml)은 plug들을 well에 끼운 후, 빈 공간을 매워줄 때 사용되기 때문에 별도로 다른 용기에 제조하여 55~60°C 수조에 보관한다. 사용하지 않은 SKG agarose는 실온에 보관하였다가 여러 번 녹여 사용할 수 있다.
※ Agarose gel은 수평계로 완벽히 수평을 맞춘 실험대 위에서 제조하여야 한다. Comb holder를 조정하여 teeth의 끝이 gel platform에 닿도록 하여 설치한다.
- 7) 37°C 수조에서 제한효소로 처리된 plug tube들을 꺼낸다. Enzyme/buffer mixture를 제거하고 200 μ l 0.5X TBE를 첨가한다. 실온에 5분간 놓아두어 완충액 교환의 평형상태가 되도록 한다.
- 8) Plug 조각들을 tube로부터 꺼낸다. comb를 실험대에 놓고 각 teeth의 밑 부분에 plug 조각들을 다음과 같이 올려둔다.
 - 8.1. S. ser. Braenderup H9812 standards plug 조각들은 teeth (lanes) 1, 5, 10 (10 well gel) 번째에 혹은 teeth 1, 5, 10, 15 (15 well gel)번째에 올려둔다.
 - 8.2. 남은 teeth에는 검체 plug 조각들을 올려 두고 그 위치와 균주번호를 기록한다.
- 9) Kimwipe를 이용하여 teeth 위, plug 주변의 잔여 buffer를 제거한다. Plug slices가 comb teeth 위에서 공기 중에 마르도록 3~5 분간 방치하거나, 1% SKG agarose (55~60°C)로 plug 조각이 붙은 comb teeth를 감싸 굳힌다.
- 10) Comb을 gel 틀에 배치하고 plug 조각들이 comb teeth의 아래쪽에 올바르게 정렬되어 있는지 확인한다. Plug 조각들의 아래쪽 면이 검은 색 플랫폼과 수평이 되도록 한다.
- 11) 55~60°C로 식힌 agarose를 조심스럽게 부어 넣고 어떤 기포나 먼지들이 없도록 주의한다. 완전히 굳을 때까지 실온에 놓아둔다.
- 12) 전기영동 chamber에 검은 gel 플랫폼을 위치하고 2~2.2 l 의 새로 조제한 0.5X TBE 첨가한다. 장치의 뚜껑을 덮는다(buffer의 양은 이전에 장치를 사용하였을 때 순환 tube에 남아 있는 buffer가 있는지 물로 청소되었는지 등에 따라 조금씩 차이가 생길 수 있다).
- 13) 전원을 올리고 펌프를 1 liter/minute의 유속으로 조절한다(setting of about 70). 그리고 냉각 장치를 14°C에 맞추어 전기영동을 실시하기 전에 최소 30분 동안 가동한다.

14) 30~45 분 정도 agarose를 굳힌 후 comb를 조심스럽게 제거한다.

15) Comb가 제거된 well들은 55~60°C로 보온된 별도의 1% SKG agarose를 이용하여 채운다.

Kimwipe를 이용하여 Gel form을 해체하여 제조 틀의 가장자리와 주변에 넘친 agarose들을 제거한다. Agarose gel을 Gel form의 바닥에 붙인 채 조심스럽게 옮겨 전기영동 chamber 내에 위치해 있는 black gel frame 안쪽으로 조심스럽게 옮긴다. Chamber 뚜껑을 닫는다.

전기영동 조건들

Escherichia coli O157:H7 and *Shigella sonnei* strains restricted with XbaI or AvrII (BlnI):

- Select following conditions on CHEF Mapper
 - o Auto Algorithm
 - o 30 kb: low MW
 - o 600 kb: high MW o Select default values except where noted by pressing "enter".
 - o Change run time to 18-19 hours (See note below)
 - o (Default values: Initial switch time=2.16 s; Final switch time=54.17 s)
- Select following conditions on CHEF-DR III
 - o Initial switch time: 2.2 s
 - o Final switch time: 54.2 s
 - o Voltage: 6 V
 - o Included Angle: 120°
 - o Run time: 18~19 hours (See note below)
- Select following conditions on CHEF-DR II
 - o Initial A time: 2.2 s
 - o Final A time: 54.2 s
 - o Start ratio: 1.0 (if applicable)
 - o Voltage: 200 V
 - o Run time: 19~20 hours (See note below)

Salmonella strains restricted with XbaI or AvrII (BlnI):

- Select following conditions on CHEF Mapper
 - o Auto Algorithm

- o 30 kb: low MW
- o 700 kb: high MW
- o Select default values except where noted by pressing "Enter."
- o Change run time to 18~19 hours (See note below)
- o (Default values: Initial switch time=2.16 s; Final switch time=63.8 s)

- Select following conditions on CHEF DR-III
 - o Initial switch time: 2.2 s
 - o Final switch time: 63.8 s
 - o Voltage: 6 V
 - o Included Angle: 120°
 - o Run time: 18~19 hours (See note below)

- Select following conditions on CHEF DR-II.
 - o Initial A time: 2.2s
 - o Final A time: 63.8 s
 - o Start Ratio: 1.0 (if applicable)
 - o Voltage: 200 V
 - o Run time: 19~20 hours (See note below)

Non-O157 *Escherichia coli* strains restricted with XbaI or AvrII (BlnI):

- Select following conditions on CHEF Mapper
 - o Auto Algorithm
 - o 50 kb: low MW
 - o 400 kb: high MW
 - o Select default values except where noted by pressing "Enter."
 - o Change run time to 18~19 hours (See note below)
 - o (Default values: Initial switch time=6.76 s; Final switch time=35.38 s)

- Select following conditions on CHEF DR-III
 - o Initial switch time: 6.76 s
 - o Final switch time: 35.38 s
 - o Voltage: 6 V
 - o Included Angle: 120°

- o Run time: 18~19 hours (See note below)
- Select following conditions on CHEF DR-II
 - o Initial A time: 6.76 s
 - o Final A time: 35.38 s
 - o Start Ratio: 1.0 (if applicable)
 - o Voltage: 200 V o Run time: 19~20 hours(See note below)

Shigella flexneri strains restricted with NotI or XBAI:

- Select following conditions on CHEF Mapper
 - o Auto Algorithm
 - o 50 kb: low MW
 - o 400 kb: high MW
 - o Select default values except where noted by pressing "Enter."
 - o Change the switch times to the following values:
 - o Initial switch time: 5 seconds o Final switch time: 35 seconds
 - o Change run time to 18~19 hours (See note below)
 - o (Default values: Initial switch time = 6.76 s: Final switch time=35.38 s)
- Select following conditions on CHEF DR-III
 - o Initial switch time: 5 s
 - o Final switch time: 35 s
 - o Voltage: 6 V o Included Angle: 120°
 - o Run time: 18~19 hours (See note below)
- Select following conditions on CHEF DR-II.
 - o Initial A time: 5 s
 - o Final A time: 35 s
 - o Start Ratio: 1.0 (if applicable)
 - o Voltage: 200 V
 - o Included Angle: 120°
 - o Run time: 19~20 hours(See note below)

위에서 권장한 전기영동 시간은 CDC에서 사용한 장비 및 시약을 기준으로 작성되었다. 영동시간은

검사실별로 다를 수 있으며, S. ser. Braenderup H9812standard의 가장 작은 band가 gel 끝의 1.0~1.5 cm 범위 내에서 이동하도록 최적화한다.

장비의 초기 전류(mA)를 기록한다. 초기 mA는 110~150 mA 사이여야 한다. 이 범위 밖의 수치는 0.5X TBE 완충액이 부적절하게 준비되었고 완충액을 다시 만들어야 한다는 것을 의미할 수 있다.

- Day 2

Agarose Gel 염색과 판독

다음의 염색 절차는 PFGE 겔을 염색하기 위해 ethidium bromide를 사용하는 방법을 설명한다. 다른 DNA 염색법이 사용될 수도 있다.

- 1) 전기영동이 끝나면 장비를 끈다. Gel을 꺼내어 ethidium bromide로 염색한다. 40 μ l ethidium bromide stock solution (10 mg/l)을 Ultrapure water (CLRW) 400 ml 로 희석한다(이 양은 약 14 cm x 24 cm 크기의 염색 상자용이며 큰 용기는 더 많은 염색용액의 양을 요구할 수 있음). 뚜껑을 덮은 용기에서 20~30 분 동안 겔을 염색한다.

Ethidium bromide는 독성과 돌연변이 원이고 10 mg/ml Ethidium Bromide (EtBr)의 원액은 여러 상용 회사(Amresco X328, Bio-Rad, 161-0433, Sigma, E-1510)에서 구할 수 있다.

희석된 용액은 어두운 병에 보관할 수 있으며 유해 폐기물에 대한 해당 기관의 지침에 따라 폐기하기 전에 6~8회 재사용 할 수 있다. CDC는 EtBr를 배수구로 버리는 것은 권장하지 않는다.

EtBr을 함유한 수용액은 목탄을 통해 여과하거나 Amresco (E732-25 Destaining Bags) 또는 다른 회사의 활성탄 탈염소 또는 "tea" bags을 사용하여 분해 할 수 있으며, 용액 및 겔에서 EtBr을 효과적이고 안전하게 제거한다. 일단 EtBr이 제거되면, 처리된 수용액은 배수구로 버릴 수 있다.

EtBr에 대해 더 궁금한 점이 있으면 공급업체 또는 제조업체에서 제공한 MSDS (Material Safety Data Sheets)를 참조한다.

현재 유일하게 수용 가능한 대체할 수 있는 염색법으로는 GelRed™ (Biotium,31010), SYBR®Safe (Invitrogen, S-33102) 및 SYBR®Gold (Invitrogen, S-11494)가 있다. 검사실에서는 일상적으로 사용하기 전에 검사실에서 제조업체의 지침을 따라 시험 염색을 해보는 것이 좋다.

- 2) 약 500 ml 의 시약 등급 증류수에서 60~90분 동안 겔을 탈색한다. 20분마다 물을 교환한다.

Gel Doc 1,000, 2,000 EQ 또는 XR 또는 이와 동등한 시스템에서 UV 이미지를 캡처한다. 배경이 아직 밝게 관찰되면 추가로 30~60분 동안 더 탈색하면 사라진다.

- 3) 젤 이미지를 *.1sc 또는 *.scn 파일로 저장하려면 이미징 장비와 함께 제공된 지침을 따른다. 이 파일을 *.tif 파일로 변환하여 BioNumerics 소프트웨어 프로그램으로 분석한다. 젤 이미지는 이미징 장비(컴퓨터) 화면의 전체 창을 채워야 한다(well이나 낮은 밴드 부분을 자르지 않음). 이미지의 초점이 맞는지, 밴드에 포화(과다 노출)가 거의 없는지 확인한다.
- 4) 전기영동 챔버에서 buffer를 배출하고 폐기한다. 챔버를 2 l Ultrapure water (CLRW)로 헹구거나 며칠 동안 장치를 사용하지 않을 경우 챔버 및 호스에서 물을 배출하기 전에 펌프를 5~10분 동안 작동시켜 라인을 물로 씻어낸다.
- 5) H9812 표준에서 가장 낮은 밴드가 겔 바닥에서 1~1.5 cm 이내에 이동하지 않으면 각 검사실의 조건에 따라 영동시간을 경험적으로 결정해야 한다.
PFGE 결과를 24~28 시간 이내에 사용할 필요가 없는 경우 다음 사항에 유의한다.
 - Plugs를 긴 시간 동안 용해과정에 방치할 수 있다(3~16 hours).
 - PFGE plug에서 용해 완충액을 제거하기 위한 TE의 세척 단계는 보다 오랜 시간(30~45 분) 저온(37°C 또는 실온)에서 수행 할 수 있다. 1일에 시작하여 TE의 plug를 밤새 냉장시킨 후 2일째에 끝낼 수도 있다.

B. Multilocus sequencing typing (MLST)

데이터베이스를 기반으로 일반적인 세균의 유전자 염기서열을 분석하는 플랫폼은 아래와 같다. MLST 웹 사이트에는 각 균종들에 적용하는 housekeeping 유전자와 각 유전부위의 primer쌍의 염기서열, 이들의 각 PCR 반응조건들이 표준화되어 있다.

또한 전 세계적으로 발표된 각 유전자의 sequence type (ST) 데이터베이스와 이들의 조합으로 생성되는 clonal complexes (CC) 데이터베이스가 들어 있어 무료로 이용할 수 있다. 또한 이 웹 사이트들은 연구자들이 분석한 분리주들의 염기서열 데이터를 입력하여 누적된 데이터베이스로부터 각 유전자의 ST 번호를 매칭하여 검색할 수 있도록 하였으며 새로운 대립 유전자로 밝혀질 경우 등록하여 새로운 ST 번호를 부여하기도 한다.

각 유전자에 ST 번호를 입력하면 이 분리균주가 어느 CC에 포함되고 그들의 세계적인 혹은 지역적인 분포와 계통학적 관계에 대한 계통수 그래프를 제공하기도 한다. 본 지침서의 검사방법은 MLST NET (<http://www.mlst.net>)에서 제공하는 표준 방법을 기준으로 기술하였다. 기술된 PCR 조건과 반응액 등의 세부적인 내용은 각 검사실에 적합하도록 조정하여 사용해야 할 것이다.

또한 다양한 웹 사이트를 통한 데이터베이스 및 tool 참고는 다음과 같다.

BacMap: <http://bacmap.wishartlab.com>

BIGSdb: <http://pubmlst.org/software/database/bigsdb>

Centre for Genomic Epidemiology: <http://www.genomicepidemiology.org>
 CRISPRs web server: <http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/>
 ENA: <http://www.ebi.ac.uk/ena>
 EnsemblBacteria: <http://bacteria.ensembl.org/index.html>
 GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
 Genomes Online: <http://www.genomesonline.org>
 GMI: <http://www.globalmicrobialidentifier.org>
 IMG: <http://img.jgi.doe.gov>
 Institut Pasteur MLST databases: <http://www.pasteur.fr/mlst>
 Microbial Genome Database for Comparative Analysis: <http://mbgd.genome.ad.jp>
 MLST homepage: <http://www.MLST.net>
 Molecular Biology Database Collection: <http://www.oxfordjournals.org/nar /database/a>
 MYSQL 4.1: <http://www.mysql.com>
 NCBI Genome: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>
 PATRIC: <http://patricbrc.org>
 PHP: <http://www.php.net>
 PubMLST: <http://pubmlst.org>
 rMLST on PubMLST: <http://pubmlst.org/rmlst>
 SRA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>
 The Microorganisms Tandem Repeats Database: <http://minisatellites.u-psud.fr>

Abbreviation

CRISPR, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat; TREP, Tandem REPEAT; SRSR, short regularly spaced repeats; DVRs, direct variant repeats; LCTR, long clusters of tandem repeats; SPIDR, spacers interspersed direct repeats.

C. *Enterococcus faecalis* MLST scheme

1. 목적 및 범위

서로 다른 검사실 간의 불명확한 결과들이 서로 비교되는 일을 줄이기 위하여 표준방법을 제공한다. 이 MLST scheme은 네덜란드의 University Medical Center Utrecht의 Patricia Ruiz Garbajosa와 Rob Willems에 의해 작성되었다.

2. 용어 정의

- sequence type (ST): 각 유전자의 대립 유전자 번호
- clonal complexes (CC): 분석된 각 유전자의 대립유전자 번호들의 집합

3. 핵산 분리

- 1) BAP에서 하루 밤 배양된 단독 집락 하나를 취하여 1.5 ml microcentrifuge tube에 들은 TE buffer 1 ml 에 푼다.
- 2) 가볍게 vortex하고 spin 5초시킨 후, 균을 침전시키고 상청액을 제거한다.
- 3) 200 µl TE buffer로 침전된 균을 부유시킨다.
- 4) 검사실에서 사용하는 적절한 bacterial DNA isolation kit를 사용하여 핵산을 추출, 정제한다.

4. Primer 준비

MLST에서 사용되는 primers들은 대부분 house-keeping 유전자의 일부분을 증폭하기 위한 primer 들로써 균종 내 균주의 변이가 많은 부위를 포함한다. 이들 변이들은 세균의 생장에 지장이 없고 그 유전자 생성물인 단백질들의 기능에 지장을 주지 않아 대립인자의 개념으로 분석된다. 따라서 어떤 균종에서는 이 유전적 다형성(genetic polymorphism)이 거의 없어 역학적 분석 가치가 없는 균종도 존재한다.

MLST의 primer들은 PCR로 증폭된 산물을 대상으로 염기서열 분석을 실시할 때도 primer로 사용된다. PCR-sequencing에서의 단점은 primer 근처의 ~20 nucleotides를 판독하기 어렵다는 것이며, 이 때문에 염기서열 분석은 양쪽 사슬 모두를 실시하여 서로의 결과가 상보적으로 서로 일치하는지 반드시 확인해야 한다. 염기서열 분석에서 주의할 점은 판독 오류, 혹은 수기로 염기 순서를 입력하다가 오류가 생기는 등의 잘못된 변이가 입력되면 Sequence type (ST)이 바뀌거나 새로운 아형으로 인식되어 균주 간 상호 인식 혹은 관계가 먼 clonal complexes (CC)로 분류될 수 있기 때문에 주의해야 한다.

*Enterococcus faecalis*의 7개 house-keeping 유전자의 내부 조각에 대한 primer들은 아래와 같다.
(-1은 forward primer, -2는 reverse primer)

유전자/primer	염기서열(5'->3')	크기(bp)
glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)		
<i>gdh-1</i> <i>gdh-2</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	530
glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase		
<i>gyd-1</i> <i>gyd-2</i>	CAAAGTCTTAGCTCCAATGGC CATTTCGTTGTCATACCAAGC	395
phosphate ATP binding cassette transporter		
<i>pstS-1</i> <i>pstS-2</i>	CGGAACAGGACTTTTCGC ATTACATCACGTTCTACTTGC	583
glucokinase		
<i>gki-1</i> <i>gki-2</i>	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG ACCATTAAAGCAAAATGATCGC	438
shikimate-5-dehydrogenase		
<i>aroE-1</i> <i>aroE-2</i>	TGGAAAACCTTTACGGAGACAGC GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC	459
xanthine phosphoribosyltransferase		
<i>xpt-1</i> <i>xpt-2</i>	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	456
acetyl-CoA acetyltransferase		
<i>yiql-1</i> <i>yiql-2</i>	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	436

PCR 조건

- Enzyme: Taq polymerase Sphaero Q (Leiden, The Netherlands)
- Reaction volume: 25 μ l
- PCR cycle:
 - initial denaturation: 94°C for 5 min
 - 30 cycles (94°C for 30 s, 52°C for 30 s and 72°C for 1 min)
 - final extension: 72°C for 7 min

Sequencing

- PCR purification kit: Qiagen Inc. (Hilden, Germany)
- Sequencing rection: ABI PRISM Big Dye Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, Calif.)
- Sequencer: ABI 3700 DNA sequencer (Perkin-Elmer)

Sequence type 구하기

- 각 균주별 housekeeping gene의 sequence들을 아래 사이트에서 입력하고 allelic number를 획득한다.

PubMLST Database home Contents

Log in

Sequence query - Enterococcus faecium locus/sequence definitions

Please paste in your sequence to query against the database. Query sequences will be checked first for an exact match against the chosen (or all) loci - they do not need to be trimmed. The nearest partial matches will be shown.

Please select locus/scheme: Order results by:

adk best match

Enter query sequence (single or multiple contigs up to whole genome in size)

Alternatively upload FASTA file or enter Genbank accession

Select FASTA file:

Closest match: adk: 1

An alignment between your query and the returned reference sequence is shown rather than a simple list of differences because there are gaps in the alignment.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Query	CAAGGCAGTAGACCAAGCTGAAATCATTGATGCTTATGGTATCCCGCACATCCTCAACAGGAGATATGTTCCGCGCAGCGATGCAAAACGAAACAGCTCT									
Ref	-----G.T.AAA-----									

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Query	TGGCCTGGAAGCAAGTCTTATATGGATAAAGGTGCATTAGTTCCTGATGAAGTAACAAATGGAATCGTGAAAGAGCGACTAGCTGAACCAAGATACAGAG									
Ref	-----									

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Query	AAAGGCTTCTTATTAGATGGCTTCCACGTACGCTAGATCAAGCAAAAGCTCTGGACGCAATGCTAAAAGATTGGAATAAAAAAATTGATGCTGTCATCG									
Ref	-----									

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Query	ATATCCATGTTGGTGAAGAAATCTTGGTCGAACGCTAGCCGCGCGATTATCTGCAGCAATTGTGGAGCAACTTACCATAAAATTTCAACCCCTACAAA									
Ref	-----									

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Query	AGTTGAAGACACATGTGATCGTTGCGGTGGGCATGAATTCTATCAAGAGAAGATGATAAACCTGAGACGGTTAAAAATCGTCGGTTTAAACCAATTAAA									
Ref	-----									

	510	520
Query	AAAAATAAAAAAAGAAAAATAAT	
Ref	-----	

- 각 유전자 염기서열 결과를 차례로 입력하여 각 유전자별 대립유전자 번호를 확인한다.
- 처음 등록되는 염기서열의 변화가 발생할 때는 “새로운 대립유전자 보고” 기능을 사용하여 입력하고 회신을 기다린다.
- 모든 대립유전자 번호가 입력되면 대립유전자 조합으로 ST가 결정된다.

Search database by com x

University of Oxford [GB] | https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_efaecium_seqdef&page=profiles&scheme_id=1

PubMLST Database home Contents

Log in

Search *Enterococcus faecium* locus/sequence definitions database by combinations of loci

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored. Autofill profile

atpA	ddl	gdh	purK	gyd	pstS	adk
15	1	1	1	1	1	1

ST: Autofill

Options: Search: Display/sort options: Order by: ascending Display: records per page

Action: Reset Submit

Exact matches found (7 loci).
1 record returned. Click the hyperlink for detailed information.

ST	atpA	ddl	gdh	purK	gyd	pstS	adk	clonal complex
78	15	1	1	1	1	1	1	

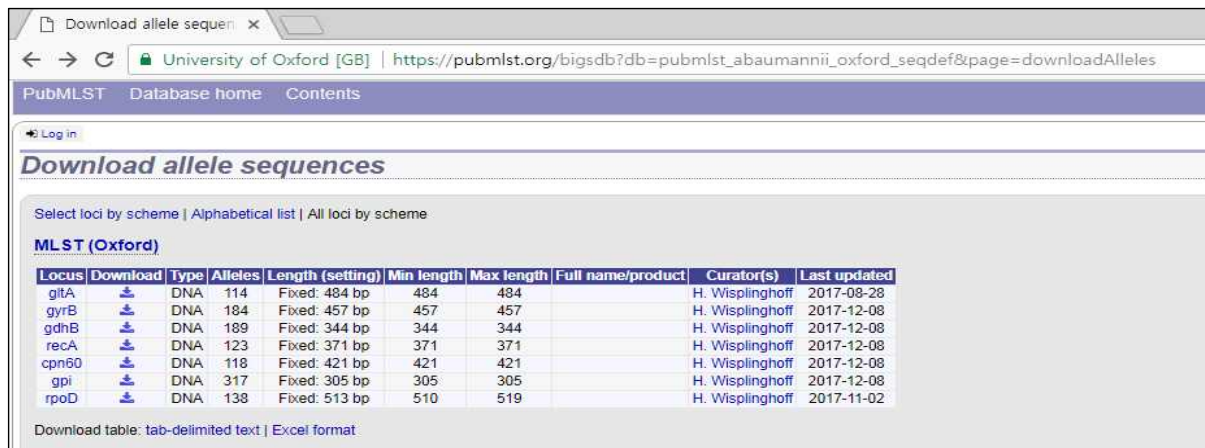
Analysis tools:
Export:

추가적인 정보

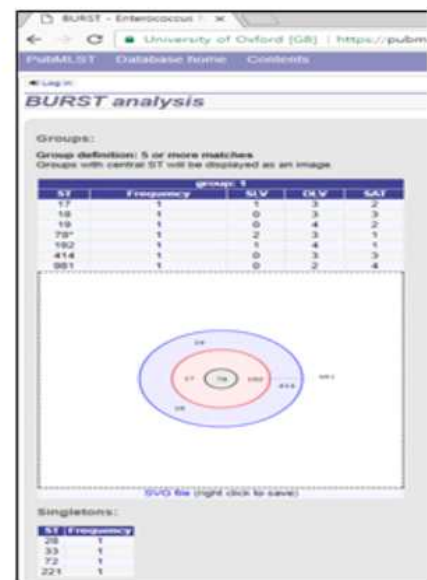
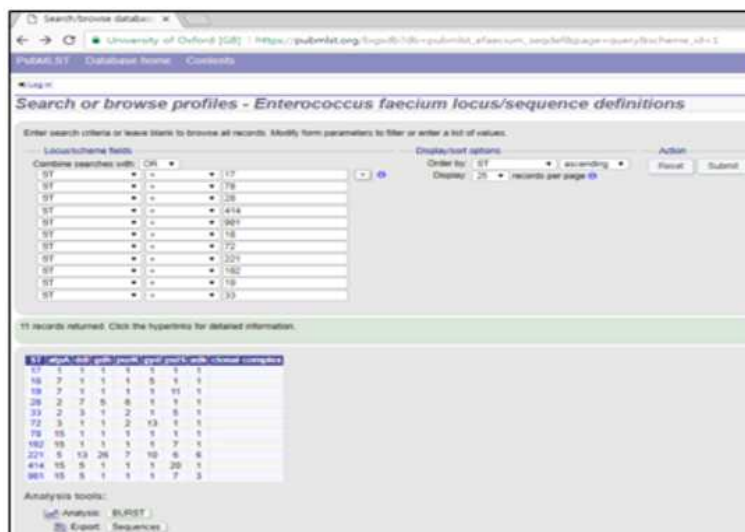
- 알고자 하는 sequence type의 allele profiles에 대한 정보도 제공받을 수 있다.

ST	gltA	gyrB	gdhB	recA	cpn60	gpi	rpoD	clonal_complex	species
1	1	1	1	1	1	1	6		
2	2	2	2	1	1	2	7		
3	1	1	1	1	2	1	4		
4	1	12	3	2	2	7	3		
5	1	3	3	2	2	3	1		
6	1	4	3	2	2	3	3		
7	3	3	3	2	3	3	8		
8	4	4	4	4	4	5	9		
9	1	3	3	2	2	6	8		
10	1	4	3	2	2	7	3		
11	4	11	6	1	7	8	6		
12	8	4	4	4	4	5	5		
13	1	7	8	9	1	4	14		
14	1	10	8	6	1	4	14		
15	1	12	11	10	1	9	4		
16	10	12	4	11	11	9	5		
17	1	12	12	11	4	10	3		
18	10	13	4	11	12	11	5		
19	1	14	3	2	2	9	3		
20	1	15	13	12	4	12	2		
21	1	12	3	2	2	9	3		
22	1	15	13	12	4	12	2		

- 각각의 allelic number의 sequence에 대한 정보도 제공 받을 수 있다.



- 연구대상 균주로부터 획득한 sequence type간의 유연관계를 보기 위하여 diagram을 작성 할 수도 있다.



참고 문헌

1. Park, Chang-Eun et al. Study on the Standardization of a Surveillance Culture Laboratory in Infection Control Fields. 대한임상감사과학회지, 2018;50:359-369.
2. (사) 대한임상병리사협회. 감염관리감시배양검사의 표준화방법 지침서. 고려의학, 2017.