

## 소아의 치아 우식 부위별 세균 다양성

김은미 · 백근식<sup>1</sup> · 하명옥광주보건대학교 치위생과 · <sup>1</sup>한국기초과학지원연구원 생명과학연구부

## Bacterial diversity in children's dental caries

Eun-Mi Kim · Keun-Sik Baik<sup>1</sup> · Myung-Ok HaDepartment of Dental Hygiene, Gwangju Health University · <sup>1</sup>Division of Life Science, Korea Basic Science InstituteReceived : 31 July, 2013  
Revised : 17 October, 2013  
Accepted : 17 October, 2013

## Corresponding Author

Eun-Mi Kim  
Department of Dental Hygiene  
Gwangju Health University  
73 Bungmun-daero(St) 419 beon-gil(Rd)  
Gwangsan-gu, Gwangju, 506-701  
Korea.  
Tel : + 82-62-958-7639  
+ 82-10-8805-0661  
Fax : + 82-62-958-7631  
E-mail : nambada7@ghu.ac.kr

## ABSTRACT

**Objectives** : Molecular biology techniques were employed to assess diversity of bacterial in children's dental caries.**Methods** : DNA of germs was extracted and the diversity of the 16S rRNA clones was analyzed by amplified rDNA restriction analysis and sequencing. The experimental samples were pit and fissure caries (PC), deep dentinal caries (DC), smooth surface caries (SC), and supragingival plaque (PQ) from 50 children of age less than 12 years old. The control group was healthy teeth supragingival plaque (HT). Thirty clones from each 16S rRNA clone library of 5 samples were randomly selected, thus a total of 150 clones were analyzed.**Results** : Amplified rDNA restriction analysis uncovered 18, 20, 11, 17, and 22 phylotypes from healthy teeth, pit and fissure caries, deep dentinal caries, smooth surface caries, and supragingival plaque, respectively. Sequencing analysis found the dominance of *Actinomyces naeslundii* and *Fusobacterium nucleatum* in the healthy teeth; *Leptotrichia* sp. in the pit and fissure caries; *Actinomyces* sp., *Streptococcus mutans*, and *Rahnella aquatilis* in the deep dentinal caries; *Streptococcus mutans* and *Actinomyces* sp. in the smooth surface caries; *Enterobacter hormaechei* and *Streptococcus sanguinis* in the supragingival plaque.**Conclusions** : Clonal analysis identified 6 phyla, 20 genera, and 51 species.**Key Words** : ARDRA, bacterial diversity, dental caries, 16S rRNA gene**색인** : ARDRA, 세균 다양성, 치아우식, 16S rRNA 유전자

## 서론

구강 내 양대 구강질환으로 알려져 있는 치아우식증은 구강 치면세균막 내 세균에 의해 치아 경조직이 탈회되는 현상이다. 특히, 어린이에서 가장 많이 발생하는 구강질환으로 치아상실을 초래하는 주요 원인이다. 선진국에서는 치아우식증이 감소하고 있는 추세지만, 우리나라를 비롯하여 많은 나라에서는 아직도 치아우식증이 어린이의 구강건강을 해치는 요인으로 남아있다<sup>1)</sup>.

치아우식은 발생 부위에 따라 소와열구 우식(pit and fissure

caries; PC), 심부 상아질 우식(deep dentinal caries; DC), 평활면 우식(smooth surface caries; SC)으로 구분된다. 소와열구의 구조는 많은 구강미생물이 정체하기 쉬운 형태를 갖고 있어, 우식의 발생빈도가 가장 높다. 심부 상아질 우식은 초기 치아우식이 상아질까지 진행된 상태이거나 2차 우식이 발생한 상태이다. 평활면 우식은 비교적 매끄러운 표면인 순(협)면, 설면, 인접면 등에 발생하는 우식이다. 치아는 부위에 따라 형태와 성분이 다르고, 또 환경적 조건이 다르므로 상재하는 미생물총이 다르며, 이에 따라 우식발생 양태에 차이가 생긴다<sup>2)</sup>.

Copyright©2013 by Journal of Korean Society of Dental Hygiene

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in medium, provided the original work is properly cited.

▶ 본 논문은 2012년 광주보건대학교 교내 연구지원사업에 의하여 연구되었음.

일반적으로 병원성 세균을 검출하는 방법으로는 현미경을 이용하여 병소 샘플을 직접 관찰하는 방법, 세균배양법, 생화학 검사법, 간접면역형광법, 종특이 DNA 탐침법, DNA 유전자 염기서열 분석 등이 있다. 이러한 세균 검출법 중 가장 신뢰받을 수 있는 방법이 DNA를 이용하는 방법이고, 그 중에서도 16S rRNA 유전자 염기서열 분석이 가장 빠르고, 정확한 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 핵산을 이용하는 방법에는 모든 세균에 존재하는 유전자들, 즉 *rpmB* ( $\beta$ -subunit of RNA polymerase), *atpD* ( $\beta$ -subunit of ATP-synthase), *infB*(translation initiation factor 2), *clxA*(hsp70 protein), 16S rRNA 유전자 등의 housekeeping 유전자를 이용하여 종을 동정한다. 이 중 16S rRNA 유전자는 세균의 종 수준으로 구분할 수 있는 정보를 담고 있어, 이 유전자의 염기서열 변화는 미생물간의 진화적 유연관계를 파악하는데 매우 유용하다. 또한 16S rRNA 유전자의 특정 부분은 진화 속도가 매우 느리기 때문에 많은 생물이체가 공통적으로 갖는 보존된 염기서열을 가지며 진화속도가 빠른 부분은 종과 속간의 분화를 볼 수 있어 다양한 분류군간의 상호 비교를 가능하게 하였다<sup>4)</sup>. 현재 RDP (Ribosomal Database Project)의 database로부터 이용할 수 있는 16S rRNA 유전자 염기서열은 2,765,278개(<http://rdp.cme.msu.edu/>)의 sequence가 포함되어 있다. 이러한 염기서열은 분리된 미생물의 16S rRNA 유전자 염기서열 뿐만 아니라 다양한 환경으로부터 분리된 clone 유전자도 포함되어 있어서 상호비교 분석이 용이하다.

ARDRA(Amplified rDNA Restriction Analysis)는 16S rRNA 혹은 특정 유전자를 증폭한 후 제한효소를 처리하여 RFLP 패턴에 따라 염기서열 분석 없이 종(species)수준으로 구별할 수 있는 방법이다<sup>5)</sup>. ARDRA는 제한효소를 이용하여 쉽게 DNA를 단편화함으로써 패턴을 판독할 수 있으므로 동일한 패턴을 가지는 clone 혹은 균주를 빠르게 screening 할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 ARDRA 패턴의 유사도에 따라 프로그램을 이용하여 grouping함으로써 많은 수의 분석 군집을 간편하고 빠른 시간 내에 처리할 수 있어 미생물 군집내의 다양성을 쉽게 파악할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

구강 내에는 약 700여종 이상의 세균 종이 존재하며, 이들의 절반 이상이 현재 분리 배양되지 않은 상태이다. 아직까지는 우식이 형성되는 과정에 특정 세균이 주요한 역할을 담당

하는지, 무작위적인 세균의 집단에 의하여 우식이 발생하는지 많은 논란이 되고 있다. 이러한 관점에서 국내의 연구들은 치아우식에 주로 관여한다고 알려져 있는 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus* 등 특정 세균 분포에 관한 연구가 주를 이루고 있을 뿐, 치아우식 부위의 전반적인 세균 군집 다양성에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 국내에 거주하면서 탄수화물을 주식으로 하는 소아에서 치아우식 부위별로 세균 군집 다양성을 관찰하는 것은 의미가 있다고 사료된다.

이에 본 연구에서는 소아의 우식 부위별로 치면세균막을 채취하고 세균의 DNA를 추출하여, 16S ribosomal RNA 유전자 증폭 및 cloning을 통해 ARDRA 패턴 분석과 염기서열 분석을 함으로써 소아의 치아우식 부위별 세균 다양성을 확인하고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구 대상

보호자에게 동의를 구한 후 12세 미만의 50명 소아에서 대조군으로 건강한 치아(healthy teeth: HT)와 네 부위의 치아우식 샘플을 채취하였다(Table 1).

우식 치아는 각각 발생 양태가 다른, 소와열구 우식(pit and fissure caries; PC), 심부 상아질 우식(deep dentinal caries; DC), 평활면 우식(smooth surface caries; SC) 그리고 우식 치아의 치은연상 치면세균막(supragingival plaque; PQ)으로 구분하여 모두 네 부위에서 채취하였다. 상아질까지 침범한 우식 치아는 방사선 사진 검사를 이용하여 선별하였다. 그리고 대조군으로는 치아우식이 없고, 수복된 치아가 없는 구강의 구치부 험면 및 설면의 치은연상 치면세균막(helathy teeth; HT)을 채취하였다.

채취에 사용된 모든 기구는 가압증기 멸균하여 사용하였다. 채취 부위를 격리시킨 후 HT, PC와 SC는 탐침기 및 스켈러를 이용하여 채취하였고, DC는 spoon excavator, PQ와 HT는 특수큐렛을 이용하여 채취하였다. 채취한 시료는 0.85% 생리 식염수에 넣고 실험실로 운반하여 DNA 추출에 사용하였다.

Table 1. List of sample from a healthy subject and 4 different dental careis groups

	Healthy teeth	Pit & fissure caries	Deep dentinal caries	Smooth surface caries	Supragingival plaque
Clones:					
Number of samples (n=50)	5	10	9	9	17
Age average	7.0	9.1	7.0	7.0	7.0

## 2. 연구 방법

### 2.1. DNA 추출 및 정량

전체 DNA를 추출하기 위한 방법은 Pitcher<sup>6)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. 생리식염수에 채취된 시료를 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 농축하였다. 농축된 시료에 lysozyme solution(50mg/ml in TE buffer) 100 $\mu$ l를 첨가 한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 guanidine-sarkosyl solution(5mol/l guanidine thiocyanate, 0.5mol/l EDTA, 0.5% v/v sarkosyl) 500 $\mu$ l를 첨가하여 vortex로 5-10분간 혼합 후 세포를 lysis 시켰다. Lysis 후 차가운 얼음에 시료를 정지시키고 차가운 7.5M ammonium acetate 250 $\mu$ l를 첨가하였다. 시료를 혼합한 후 다시 10분간 얼음에서 반응시켰다. Chloroform과 isomylalcohol(24:1, v/v) 500 $\mu$ l를 넣고 vortex로 혼합한 후 원심분리(13,000 rpm, 10min) 하였다. 상층 부분을 새로운 tube에 옮긴 후 0.6 volume의 2-propanol(isopropanol)을 첨가하였다. 여러번 거꾸로 흔들어 준 후 DNA 침전을 위하여 원심분리(13,000rpm, 10min)한 후 상층액은 버렸다. 70% ethanol로 DNA를 세척한 다음 건조 시킨 후 멸균된 증류수에 녹여 사용 시까지 -30 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

DNA의 shearing을 확인하기 위해 1% agarose gel을 이용하여 전기영동 하였고, DNA 농도는 spectrophotometer(Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, USA)로 정량하였다.

### 2.2. PCR, cloning 및 ARDRA 분석

16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 세균에 특이적으로 부착하는 27F(AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), 803R(5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA G-3'), 1088R(5'-GCT CGT TGC GGG ACT TAA CC-3') 및 1492R(5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primer를 사용하였다. PCR을 위한 반응액은 template DNA 100ng, 200uM dNTP, 10mM Tris-HCl(pH 9.0), 40mM KCl, 0.15mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM MgSO<sub>4</sub>, 20ug BSA, 1U Taq. polymerase 그리고 forward와 reverse primer 각각 20p mole을 첨가하고 증류수로 50 $\mu$ l되게 조성하였다. PCR은 TP600(TaKaRa, Japan)을 이용하였으며, PCR 조건은 pre-denaturation 과정으로 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 수행하였고, denaturation(94 $^{\circ}$ C, 30초), annealing(55 $^{\circ}$ C, 30초), elongation(72 $^{\circ}$ C, 40초) 반응을 총 30회 반복하고 post-elongation(72 $^{\circ}$ C, 10분)을 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 증폭 크기를 확인하였다.

증폭된 PCR 산물은 Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega, USA)을 이용하여 정제하였고, 단일 염기 서열을 가진 clone으로 분리하기 위해 pGEM-T easy vector

system(Promega, USA)을 이용하였다. PCR 산물과 vector의 농도를 3:1 비율로 첨가하고 2 $\times$ ligation buffer, T4 DNA ligase를 혼합하여 반응 시켰다. 반응 후 E.coli DH5 $\alpha$  competent cell에 형질 전환시켜 X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indoly-D-galactopyranoside Promega, USA), IPTG(isopropyl- D-thiogalacto-pyranoside Promega, USA), ampicillin(50 mg/ml)이 포함된 LB agar 배지에서 blue/white colony 선별 방법에 의해 형질 전환된 clone을 선별하였다. 임의로 선정한 각 부위별 16S rRNA 유전자 clone library에서 30개의 white colony를 direct reamplified PCR로 증폭하였다. 이때 사용한 primer는 vector 내에 존재하는 pGTf(5'-TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA-3')와 pGTTr(5'-ACT CAA GCT ATG CAT CGA ACG C-3') primer를 사용하였고, PCR 조건은 16S rRNA 유전자 증폭과 동일하였다.

ARDRA(amplified rDNA restriction analysis) 분석은 증폭된 16S rDNA의 RFLP 분석을 위한 제한 효소는 4염기를 인식하는 HaeIII(GG $\downarrow$ CC; TaKaRa, Japan)를 사용하였다. 반응 조건은 증폭 산물 5 $\mu$ l와 제한효소 3U(unit) HaeIII를 혼합하고 멸균된 2차 증류수로 10 $\mu$ l가 되도록 하였다. 반응 시간과 온도는 2시간, 37 $^{\circ}$ C였다. 전기영동의 분석력을 높이기 위해 2.5%(w/v) agarose gel로 100V, 약 40분간 1 $\times$ TAE buffer로 전기영동 하였다. Agarose gel을 ethidium bromide 용액(10mg/ml)에서 10분간 염색하고, 30분간 탈염색한 후 전기영동 화상장치(Gel-Doc, Bio-rad)를 이용하여 gel image를 얻었으며, TIFF file format으로 저장하였다. Gelcompar II program(Applied Maths, Belgium)을 이용하여 ARDRA band pattern 간의 유사도를 결정하였고, negative 이미지로 변환한 후 normalization 과정을 통해 각기 다른 gel 상의 size marker와 RFLP pattern들을 표준화 하였다. Band based algorithm은 different-coefficient를 이용한 paired-wise similarity 계산 방법을 이용하였고, band-matching tolerance는 0.75%로 선택하였다. Similarity matrix의 cluster 분석은 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic average)에 의해 수행되었다<sup>7)</sup>.

### 2.3. 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용한 세균 동정

ARDRA 분석에서 다른 패턴을 보인 모든 16S rRNA 유전자 증폭산물은 Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega, USA)으로 정제하여 염기서열 분석하였다. 염기서열 분석 primer는 27F(E. coli numbering 8-27; 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')를 사용하였으며, PCR 반응은 PTC-150 MiniCycler TM(TaKaRa, Japan)을 이용하였으며

PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 초기 열처리를 한 후, 94°C에서 30 초, 55°C에서 30 초, 72°C에서 40 초씩 30회 반복하고 마지막으로 72°C에서 10분 동안 더 신장반응을 시켰다. 염기서열 분석은 capillary 방식의 ABI PRISM TM310 Genetic Analyzer(Applied Biosystem)를 사용하였으며, 분석에 사용된 sequencing kit는 dNTP에 형광물질 label 방식인 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystem)를 사용하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 계통 분석을 위해 염기서열의 chimeric artifact를 확인하기 위해 RDP(Ribosomal Database Project)의 CHECK\_CHIMERA program으로 확인하였다. 염기서열간의 유사도를 확인하기 위하여 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 Genbank와 EMBL database에서 유사한 염기서열을 비교하였다. Clone의 결정된 염기서열과 database에서 얻어진 염기서열은 PHYDIT program(ver 3.1)을 이용하여 CLUSTAL\_X<sup>8)</sup>로 정렬한 후 계통수 제작에 이용하였다. 염기서열간 유전적 거리는 Jukes와 Cantor distance model<sup>9)</sup>을 사용 추정 하였으며, Neighbor-joining method로 계통수를 작성하였다. Neighbor-joining data의 Bootstrap 분석 시 1,000회의 resampling을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하였고, 이를 토대로 계통수를 작성하였다.

## 연구성적

### 1. ARDRA 분석

치아 우식 부위별 및 대조군으로 제작된 16S rRNA 유전자 clone library로부터 30개의 clone을 무작위로 선별, 총 150개를 선별하였다. 각각의 제한효소 *Hae*III의 ARDRA 패턴은 operation taxo-

nomic unit(OTU)를 사용하여 각각의 phylotype간 pairwise comparison을 통해 유사도를 계산하였고, 이를 바탕으로 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic algorithm) 방법으로 유사도 dendrogram을 제작하였다. 제한효소 *Hae*III의 절단 패턴은 ARDRA 유사도 지수 99%의 이상을 기준으로 cluster를 구분하였다(Fig. 1).

HT는 전체 30개 clone에서 13개 clone이 단일 pattern으로 분석되었으며, 총 18개 ARDRA pattern을 보였다. 다양성 평가를 반영하는 coverage 값은 56.7%로 비교적 낮은 반영율을 보였다. 각각 30개 clone으로부터 우식 부위별 PC, DC, SC 및 PQ는 각각 14, 6, 11 및 16개 단일 pattern 결과를 보였으며, 전체 ARDRA pattern은 각각 20, 11, 17 및 22개로 분석되었다. 특히 DC는 단순한 pattern을 보였고 PQ는 가장 다양한 pat-

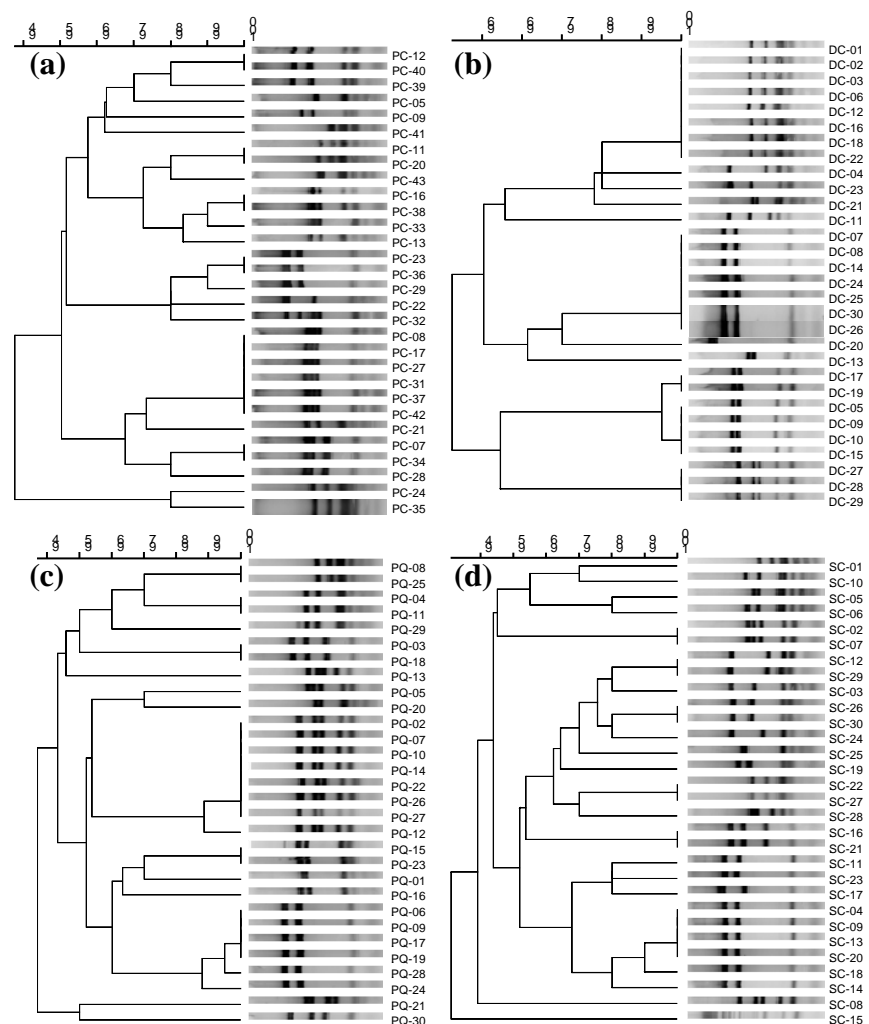


Fig. 1. Dendrogram constructed from the results of ARDRA pattern with (a) pit & fissure caries, (b) deep dental caries, (c) smooth surface caries, (d) supragingival plaque clones and distance matrix calculated by the UPGMA method using GelcomparII program

Table 2. Number of clones analyzed and a variety of diversity indices obtained based on ARDRA and sequencing pattern in 16S rRNA gene clone library from a healthy teeth and 4 different dental caries

Parameter	Healthy teeth	Pit & fissure caries	Deep dental caries	Smooth surface caries	Supragingival plaque
Total number of clone	30	30	30	30	30
No. of unique clone	13	14	6	11	16
No. of ARDRA pattern	18	20	11	17	22
% coverage (C) <sup>a</sup>	56.7	53.3	80.0	63.3	46.7

<sup>a</sup>Coverage(C): $[1-(n/N)] \times 100$

tem 결과를 보였다. Coverage 값은 DC, SC, PC 및 PQ가 각각 80.0%, 63.3%, 53.3% 및 46.7% 순으로 분석되었다(Table 2).

## 2. 세균 다양성

각 샘플로부터 30개 clone, 총 150개 모두 염기서열을 분석하였으며, 27F primer를 이용하여 평균 800개의 부분적인 염기서열을 얻었다. 샘플 DNA로부터 16S rRNA 유전자를 증폭할 경우 chimeric artifact를 형성할 수 있으며, 이러한 현상은 16S rRNA 유전자 단편들이 hybride molecule을 형성하여 이것을 주형으로 하는 반응이 나타나기 때문이다. 분석 결과, PCR 반응물 150개 clone 염기서열에서는 chimera가 없는 것으로 확인되었다.

결정된 부분적인 염기서열을 계통분류학적으로 어떤 문(phylum)에 속하는지 확인하기 위해 NCBI에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하여 분석한 결과, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* 및 *Bacteroidetes*로 크게 5개 문과 1개의 candidate TM7 문으로 확인되었다(Table 3). 각 시료를 살펴보면 HT에서 그람양성 세균인 *Actinobacteria*(10 clones, 33.3%)와 *Fusobacteria*(10, 33.3%)가 가장 높게 분포하였다. *Proteobacteria*(3, 10.0%), *Bacteroidetes*(3, 10.0%), candidate TM7(3, 10.0%)는 동일한 비율로 나타났으며, *Firmicutes*(1, 3.3%)는 가장 낮은 빈도로 나타났다. PC에서는 *Actinobacteria*(12, 40.0%)와 *Fusobacteria*(9, 30.0%)가 높은 출현빈도를 보였고, DC에서는 *Proteobacteria*(12, 40.0%), *Actinobacteria*(9, 30.0%) 및 *Firmicutes*(7, 23.3%) 순으로 우점하였다. SC에서는 *Actinobacteria*(12, 40.0%)와 *Firmicutes*(10, 33.3%)로 모두 그람양성 세균에 속하는 clone이 우세하였다. 마지막으로, PQ에서는 *Proteobacteria*(12, 40%)와 *Actinobacteria*(8, 26.7%)가 우세하였다(Table 3). 치아별 문 수준 출현 양상을 보면, *Actinobacteria*가 HT와 우식 치아 모든 부위에서 가장 높은 비율을 보였다. 반면에 *Firmicutes*는 우식 치아 부위에서 높은 비율을 보였고,

*Fusobacteria*는 HT와 PC에서 높은 비율을 보였으며, SC 및 PQ에서는 출현하지 않았다. 현재까지 분리가 이루어지지 않고 자연계 및 구강에 많이 존재하는 후보 문(candidate phylum)인 TM7은 HT와 PQ에서만 분석되었다. *Proteobacteria* 문에 속하는 clone들은 DC 및 PQ에서 높은 비율로 분석되었다.

건강한 치아와 우식 치아별 속 수준 출현 양상은 모든 부위에서 *Actinomyces* 속이 높은 비율을 차지하였으며, *Streptococcus* 속은 HT를 제외한 모든 부위에서 높게 분석되었다. *Leptotrichia* 속은 PC, *Enterobacter* 속은 PQ 그리고 *Ranella* 속은 DC에서 각각 높은 비율로 분석되었다. 전체적으로 *Actinobacteria* 문 4속, *Bacteroidetes* 문 3속, candidate TM7 문 1속, *Firmicutes* 문 3속, *Fusobacteria* 문 2속, *Proteobacteria* 문 8속으로 분석되었다(Fig. 2).

각 부위별 종 조성에서 HT는 *Actinomyces*(26.7%)와 *Fusobacterium*(26.7%) 두 속이 높은 비율을 보였으며, 그 중에서 *Actinomyces naeslundii*(16.7%) 및 *Fusobacterium nucleatum subsp. animalis*(20%) 두 종이 가장 높은 비율을 보였다. Candidate TM7에 속하는 3개의 clone이 10%의 비율로 분석되었으며, 치은연상 치면세균막에서 분석된 clone들과 매우 높은 유사도를 보였고, 또한 계통수에서도 이러한 clone들과 grouping 되었다. HT에서는 6문, 11속, 14종으로 분석되었으며, 미확인 종으로는 *Streptococcus* sp. *Fusobacterium* sp. 그리고 *Leptotrichia* sp.이었다. 4개의 각각 다른 우식 부위별 종 조성은 *Actinomyces* 및 *Streptococcus* 속에 속하는 종들이 모든 부위에서 13-30%의 분포 비율을 보였으며, 특히 *Actinomyces* 속이 전 부위에서 가장 높은 출현 비율을 보였다. *Actinomyces* 속에 속하는 종 중에서 치아우식에 관여하는 *A. naeslundii*는 SC를 제외한 3곳에서 출현하였다. 현재까지 분리된 *Actinomyces*속의 종과 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도 지수가 93.0% 이하로 분석된 clone 수는 13개를 차지하였으며, 계통도 분석결과 모두 새로운 종으로 분석되었다

(Fig. 3). 치아우식증의 원인균으로 가장 많이 알려진 *Streptococcus mutans*는 PQ를 제외한 3곳에서는 6.7-20.0% 비율을 보였다. 그리고 PQ에서는 역시 우식 원인균으로 알려진 *Streptococcus sanguinis*가 13.3%의 출현 비율을 보였다. PC에서 *Leptotrichia* 속으로 분석된 clone은 9개로 분석되었다. 9개 clone 모두 서로 다른 clone으로 확인 되었으며, 3개의

각기 다른 group으로 구분 되었다. 특이하게도 SC에서 출현한 *Enterobacter asburiae*와 *Enterobacter gracilis*를 제외하면 PQ에서 *Enterobacter* 속이 가장 높은 30% 비율로 나타났으며, 그 중 *Enterobacter hormaechei* 종이였다.

구강 내 cloning 분석에서 나타난 종 구성은 6개문, 20속, 51종으로 확인되었다(Table 3).

Table 3. Analyzed numbers of sequences in a healthy subject and dental caries with BLAST search program

Species	No. of clones were recovered from the following site:					Total	Phylum
	HT*	PC	DC	SC	PQ		
<i>Actinomyces dentalis</i>		1				1	
<i>Actinomyces georgiae</i>	1				1	2	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>				1	1	2	
<i>Actinomyces massiliensis</i>	1					1	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	5	2		1	2	10	
<i>Actinomyces oris</i>		2		1	2	5	
<i>Actinomyces viscosus</i>	1	1	1	2	1	6	<i>Actinobacteria</i>
<i>Actinomyces sp.</i>		3	8	3		14	
<i>Corynebacterium durum</i>				1		1	
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	2					2	
<i>Propionibacterium acidifaciens</i>		1		1		2	
<i>Rothia aeria</i>		1		2	1	4	
<i>Rothia dentocariosa</i>		1				1	
No. of clones	10	12	9	12	8	51	34.0%
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>			1			1	
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	1					1	
<i>Capnocytophaga sp.</i>		1				1	
<i>Prevotella denticola</i>		2				2	
<i>Prevotella loescheii</i>					1	1	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Prevotella marshii</i>	1					1	
<i>Prevotella melaninogenica</i>				2		2	
<i>Prevotella oris</i>					1	1	
<i>Prevotella salivae</i>		1				1	
<i>Prevotella tanneræ</i>	1					1	
No. of clones	3	4	1	2	2	12	8.0%

\* HT, healthy teeth; PC, pit & fissure caries; DC, deep dentinal caries; SC, smooth surface caries; PQ, supragingival plaque

Table 3. Continued

Species	No. of clones were recovered from the following site:					Total	Phylum
	HT	PC	Dental caries		PQ		
			DC	SC			
<i>L. paracasei subsp. tolerans</i>			1			1	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>				1		1	
<i>Staphylococcus sp.</i>				1		1	
<i>Streptococcus cristatus</i>					1	1	
<i>Streptococcus mutans</i>		2	6	4		12	Firmicutes
<i>Streptococcus oralis</i>		1				1	
<i>Streptococcus salivarius</i>				1		1	
<i>Streptococcus sanguinis</i>				1	4	5	
<i>Streptococcus sp.</i>	1	1			1	3	
<i>Veillonella dispar</i>				2		2	
No. of clones	1	4	7	10	6	28	18,7%
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. animalis</i>	6					6	Fusobacteria
<i>Fusobacterium sp.</i>	2					2	
<i>Leptotrichia buccalis</i>	1					1	
<i>Leptotrichia sp.</i>	1	9	1			11	
No. of clones	10	9	1	0	0	20	13,30%
<i>Acinetobacter ursingii</i>					2	2	
<i>Campylobacter gracilis</i>				1		1	
<i>Enterobacter asburiae</i>				1		1	
<i>E. cloacae subsp. dissolvens</i>				1		1	
<i>Enterobacter hormaechei</i>					9	9	
<i>Enterobacter sp.</i>			3			3	
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1		1	1		3	Proteobacteria
<i>Lautropia mirabilis</i>	1		1	2		4	
<i>Neisseria bacilliformis</i>		1				1	
<i>Neisseria flava</i>			1			1	
<i>Neisseria subflava</i>	1					1	
<i>Pseudomonas hibiscicola</i>					1	1	
<i>Rahnella aquatilis DSM</i>			6			6	
No. of clones	3	1	12	6	12	34	22,7%
Candidate division TM7	3				2	5	TM7
No. of clones	3	0	0	0	2	5	3,3%
Total no. of clones	30	30	30	30	30	150	100,0%

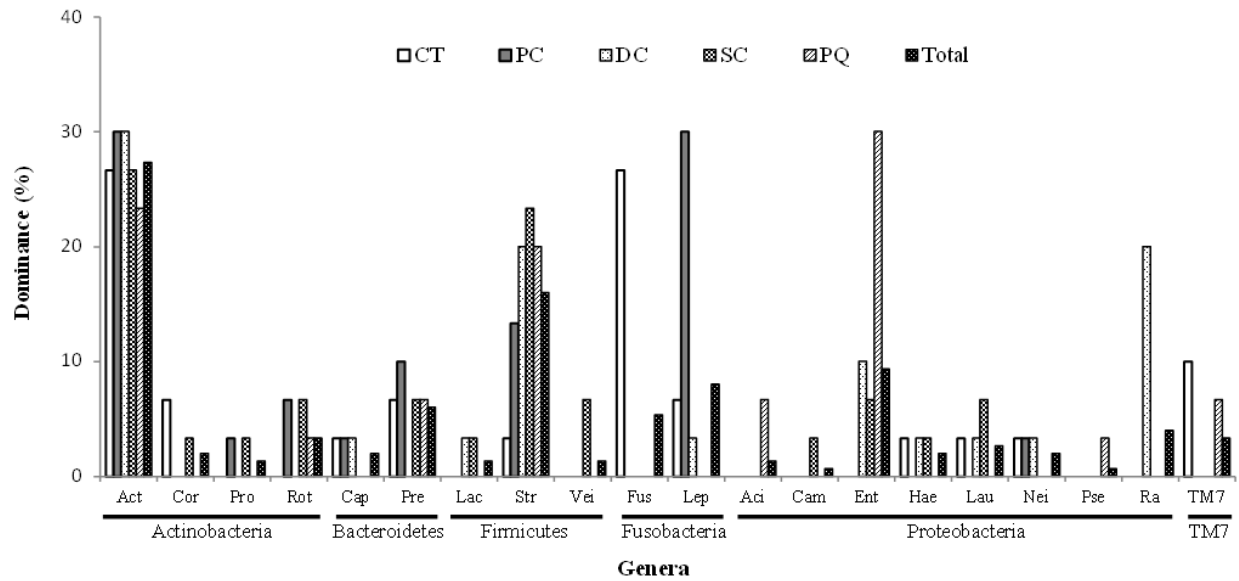


Fig. 2. Relative abundance of the genera identified in healthy teeth and four different dental caries

HT, health teeth; PC, pit and fissure caries; DC, deep dental caries; SC, smooth surface caries; PQ, supragingival plaque. Act, *Actinomyces*; Cor, *Corynebacterium*; Pro, *Propionibacterium*; Rot, *Rothia*; Cap, *Capnocytophaga*; Pre, *Prevotella*; Lac, *Lactobacillus*; Str, *Streptococcus*; Vei, *Veillonella*; Fus, *Fusobacterium*; Lep, *Leptotrichia*; Aci, *Acinetobacter*; Cam, *Campylobacter*; Ent, *Enterobacter*; Hae, *Haemophilus*; Lau, *Lautropia*; Nei, *Neisseria*; Pse, *Pseudomonas*; Ra, *Rahnella*; TM7, candidate genus



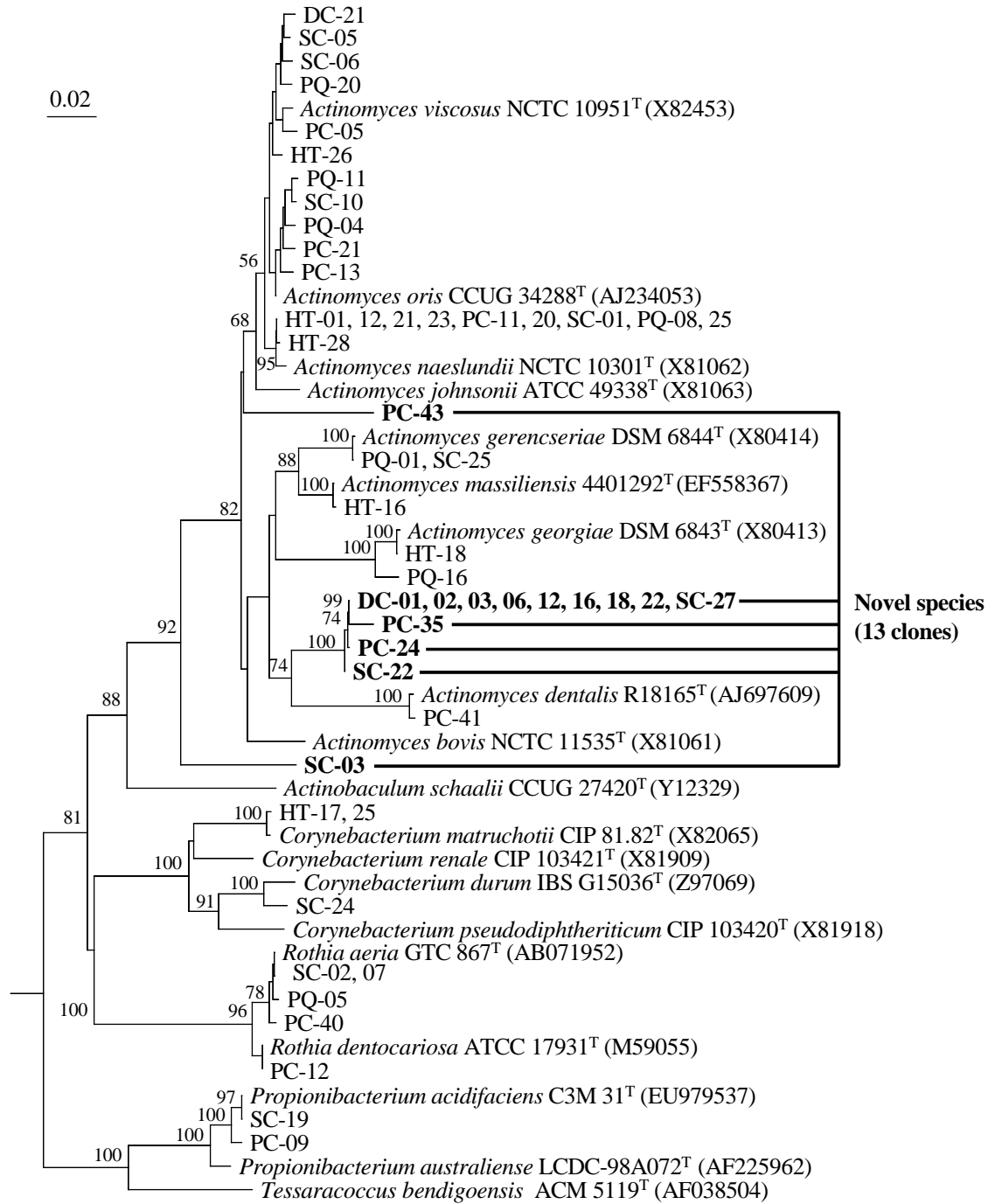


Fig. 3. Neighbour-joining tree based on partial 16S rRNA gene sequences showing relationships between dental caries clones and related genera of the phylum Actinobacteria. The percentage numbers at the nodes indicate the bootstrap support levels, based on neighbor-joining analysis of 1,000 resampled data sets. Bar, 0.02 nucleotide changes per 16S rRNA gene position  
HT, healthy teeth; PC, pit & fissure caries; DC, deep dentinal caries; SC, smooth surface caries; PQ, supragingival plaque

## 총괄 및 고안

치아우식증은 구강 내에서 빈번하게 발생하는 구강질환이며, 특히 소아에 있어 치아상실을 초래하는 주요 요인으로 작용하고 있다. 치아우식을 일으키는 복합적인 요인 중 세균의 역할이 필수적인 만큼 구강 내 치아우식에 관여하는 세균 군집 다양성을 탐색하는 것은 중요한 일이라 할 수 있다.

치아우식증은 일반적으로 발생양태에 따라 소와열구 우식, 심부상아질 우식, 평활면 우식, 치근면 우식으로 구분한다. 치근면 우식은 치조골 파괴가 일어나 치근노출이 생긴 노인의 구강에서 주로 발생한다. 본 연구는 치아우식이 치아상실의 주요 요인으로 작용하고 있는 소아를 대상으로 이루어진 실험으로, 치근면 우식은 시료채취에서 제외하였다. 그리고 일반적인 발생양태에 따른 우식 분류 외에 우식이 존재하는 구강의 치은연상 치면세균막을 추가로 채취하였고, 전체 4부위에서 시료를 채취하였다. 채취된 시료는 배양하지 않고 clone 분석 방법으로 세균 군집 다양성을 비교하였다.

각 시료로부터 30개 clone, 총 150개 clone에 대해 염기서열을 분석 하였으며, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* 및 *Bacteroidetes*로 크게 5개 문과 1개의 candidate TM7 문으로 분석 되었다. 대조군인 건강한 치아의 치은연상 치면세균막(HT)과 우식 치아별 출현 세균 양상을 보면, HT 및 4부위의 우식 치아에서 *Actinobacteria* 문이 가장 높은 비율을 보였다. 반면에 *Firmicutes* 문은 우식 치아 부위에서 높은 비율을 보였고, *Fusobacteria* 문은 HT와 PC에서 높은 비율을 보였으며, SC 및 PQ에서는 출현하지 않았다. 우식 치아 부분별 출현 양상에서 candidate TM7은 HT(3, 3.3%)와 PQ(2, 1.7%)에서만 출현하였다. TM7은 독일의 이탄습지(peat bog)로부터 처음 16S rRNA 유전자 염기서열을 cloning 하였으며, 토양, 담수, 해수, 온천, 쥐의 분변, 흰개미 소화관 등 매우 다양한 환경으로부터 분리되었다<sup>10</sup>. 또한 TM7은 구강 내 항상 존재하는 문으로 보고되고 있다<sup>11-14</sup>. 본 실험에서는 5 개 clone 모두가 치은연상 치면세균막에서 분석된 clone 들과 매우 높은 유사도를 보였고, 계통수에서도 이러한 clone 들과 grouping 되었다. 최근에 Keijser 등<sup>15</sup>은 pyrosequencing 분석 방법을 이용하여 타액에서 1.88%, plaque에서 1.86%로 존재하는 것으로 보고하고 있어, TM7 문은 현재까지 분리 배양이 이루어지지 않았지만 구강 내 많은 수가 존재하는 것으로 보아 치아우식에 관여하고 있을 것으로 사료된다. *Proteobacteria* 문에 속하는 clone들은 DC 및 PQ에서 높은 비율로 나타났다.

각 우식 부위별 종 구성과 특징을 살펴보면, HT에서 우점종은 *Fusobacterium nucleatum*과 *Actinomyces naeslundii*가 높

은 비율을 차지하였다. *A. naeslundii*는 구강 생물막을 형성하는 초기 군체로 알려져 있으며, 편도선과 치면세균막을 포함하는 구강에서 정상 균종으로 알려져 있다. 단일 종으로 가장 많은 출현 비율을 보이는 *F. nucleatum*은 그람 음성, 혐기성 세균으로 구강 내 상재균이며, 또한 인간으로부터 가장 빈번하게 분리되며, 괴사성 궤양성 치은염, 치주염, 축농증, 패혈증, 심내막염, 치근단 농양, 골반염 그리고 피부염을 일으키는 병원성 세균으로 보고되었다<sup>16-19</sup>. 또한 *F. nucleatum*은 소와열구 우식 및 심부 상아질 우식에서 우세한 세균으로 보고되고 있어<sup>20</sup> 초기 치면세균막 관리가 중요한 요인으로 보여진다.

PC는 clone 분석에서 *Fusobacteria* 문 *Leptotrichia* 속의 종들이 높게 분석되었다. *Leptotrichia* 속이 대부분 혐기적 조건을 선호하는 균주임에도 PC에서 높게 분석된 것은 시료 채취 시 소아의 치주질환 유무를 파악하지 않은 한계인 것으로 보여진다. 소와열구 우식은 주로 *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus* 및 *Actinomyces naeslundii*가 관여하는 것으로 보고되고 있는데, 본 분석에서는 *Leptotrichia* sp.와 *Streptococcus sanguinis*가 높은 비율로 분석되었다. Eribe 등<sup>21</sup>의 보고에 따르면 *Leptotrichia* 속에 속하는 일부 종들은 인간의 구강내에 초기 서식하면서 치면세균막에 정착하게 된다고 보고하고 있어 본 분석과 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

DC에서는 *Actinomyces* 속에 속하는 특정한 종이 매우 높게 분석되었다. 이 종은 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도 지수가 기존 *Actinomyces* 속과 매우 낮은 유사도 지수(94.3%)를 보이며, 계통도에서도 기존 분리 균주와 근연관계가 낮게 분석되었다. 이 종의 분리가 이루어지면 치아우식에 관여하는 또 다른 종일 가능성이 있는 것으로 보여진다. HT 및 우식치아 모든 부위에서 가장 높은 비율을 차지한 종은 *Rahnella aquatilis*와 *S. mutans* 이다. 일반적으로 심부 상아질 우식에 *Lactobacillus* sp.가 관여하는 것으로 알려진 것에 반해 본 실험에서는 배양 분석에서 *S. mutans*가 가장 높은 비율로 분리된 것은 Bowden<sup>22</sup>과 van Houte 등<sup>23</sup>의 보고와 일치하였다. *R. aquatilis* 표준균주는 통성혐기성, 그람 음성 간균이고 질소 고정을 하는 세균으로 알려져 있으며, 처음 담수로부터 분리된 후 1985년 이후부터 병원환자에서 많이 분리 되고 있다. 병원검체로는 주로 혈액, 수술 상처부위, 소변, 타액, 기관지 세척기구 등으로부터 분리되었으며, 패혈증의 원인균으로 알려져 있다<sup>24,25</sup>. 특히 이 세균은 아직까지 치아우식에 관여한다는 보고가 없어 추후 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

SC에서는 *S. mutans*가 가장 높게 분석되었다. *S. mutans*는

치아우식에 관여하는 세균으로 가장 많은 연구가 이루어진 종이다. *S. mutans*가 치아우식을 일으키는 기전은 glucosyl transferase(GTase)를 분비하여 sucrose를 glucose와 fructose로 분해하고 유산(lactic acid)을 생산하며 포도당을 중합시켜 글루칸을 합성한다. 이 중  $\alpha$ -1, 3 결합으로 이루어진 비수용성 물질인 뮤탄(mutan)은 점착성이 있어 치면에 부착하고 불용성이기 때문에 치면세균막을 형성하는 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는 물질로서 치면세균막의 양적 증대와 함께 구강 내 유산의 농도가 증가하여 치아 경조직을 탈회시킨다. 치아우식이 발생하려면 특정 세균이 일정시간 치면에 부착되어 정체되어야 하나 평활면은 구조적인 특성상 매끄러워 세균이 오래 머무를 수 없다. 그러나 *S. mutans*는 치면에 부착능력이 있어, 다량의 산을 생산하여 치아우식을 일으키는 주 원인균으로 알려져 있다.

HT에서 *Bacteroidetes* 문 *Capnocytophaga sputigena*가 유일하게 분리되었다. 이 균은 치주질환에 관여하는 균으로 알려져 있으며, 사춘기 전 치주염이 있는 어린이의 치주낭에서 많이 발견되는 것으로 보고되었다<sup>26)</sup>.

PQ에서 *Enterobacter homaechei*가 높게 분석되었다. *E. homaechei*는 타액에서 처음 분리되었으며, 병원환자의 혈액, 상처, 유아 및 신생아 폐혈증의 원인균으로 알려져 있다<sup>27,28)</sup>. *E. haemachei*는 아직까지 치아우식에 관여한다는 보고는 없지만 추후 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

치아우식에 관여하는 주요 미생물로는 *S. mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus milleri*, *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *A. viscosus*, *A. naeslundii* 및 *Rothia dentocariosa* 등이 알려져 있다<sup>2)</sup>. 본 연구 결과에서는 *S. milleri*, *L. casei* 및 *L. acidophilus*를 제외하고는 우식에 관여하는 모든 미생물들이 분석되었으며, 치아우식 부위별로 우점하는 세균을 확인 할 수 있었다. 구강 내에는 무수히 많은 세균이 존재하고 있고 치아우식을 일으키는 요인들이 복합적으로 작용하고 있어, 배양되지 않는 세균의 분리 등 더욱 다양한 연구들이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 결론

소아의 치아우식 부위별 세균 군집 다양성을 파악하기 위해 분자생물학적 방법을 이용하였다. 세균으로부터 직접 DNA를 추출하여 16S rRNA 유전자 클론을 제한효소 단편분석(amplified rDNA restriction analysis)과 염기서열 분석을 통하여 다양성을 확인하였다. 12세 미만의 50명 소아를 대상으로 소와열구 우식(pit and fissure caries; PC), 심부 상아질

우식(deep dentinal caries; DC), 평활면 우식(smooth surface caries; SC), 우식 치아의 치은연상 치면세균막(supragingival plaque; PQ)과 대조군으로 건강한 구강의 치은연상 치면세균막(healthy teeth supragingival plaque; HT)을 채취하였다. 5개의 시료에서 16S rRNA 유전자 clone library로부터 30개 clone을 무작위로 선별, 총 150개를 선별하여 분석하였다.

제한효소 단편 분석 결과 건강한 치아, 소와열구 우식, 심부 상아질 우식, 평활면 우식 및 우식 치아의 치은연상 치면세균막에서 각각 18, 20, 11, 17 및 22개의 phylotype을 확인하였다. 염기서열 분석 결과 건강한 치아에서는 *Actinomyces naeslundii* 및 *Fusobacterium nucleatum*이 우점하였다. 치아의 우식 부위별 우점종으로, 소와열구 우식 부위는 *Leptotrichia* sp, 심부 상아질 우식 부위는 *Actinomyces* sp., *Streptococcus mutans* 및 *Rahnella aquatilis*, 평활면 우식 부위는 *Streptococcus mutans*, *Actinomyces* sp., 그리고 우식 치아의 치은연상 치면세균막 부위는 *Enterobacter hormaechei*, *Streptococcus sanguinis*가 각각 우점하였다. Clone 분석을 통하여 확인된 종 구성은 6개문, 20속, 51종이었다.

## References

1. Kang HS, Jeong JH. A study on the correlation between the dental caries and dietary habits and snack intake of pre-school children. *J Korean Acad Dent Hyg* 2010; 10: 345-59.
2. Kim YG, Han MD. Oral microbiology. Seoul: Komoonsa; 1998: 261-84.
3. Kook JK, Park JW, Yoo SY, Kim HS, LEE NY. Distribution of mutans streptococci in dental plaque of children. *J Korean Acad Pediatr Dent* 2004; 31: 439-47.
4. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987; 51: 221-71.
5. Vaneechoutte M, Rossau R, De vos P, Gillis M, Janssens D, Paepe N, et al. Rapid identification of bacteria of the *Camamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis(ARDRA). *FEMS Microbiol Lett* 1992; 93: 227-33. DOI:10.1016/0378-1097(92)90467-3.
6. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett in App Microbiol* 1989; 8: 151-6.
7. Heyndrickx M, Vauterin L, Vandamme P, Kersters K, De Vos P. Applicability of combined amplified 16s rDNA restriction analysis(ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J Microbiol Methods* 1996; 26: 247-59. DOI:dx.doi.org/10.1016/0167-7012(96)00916-5.
8. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for

- multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4876-82. DOI: 10.1093/nar/25.24.4876.
9. Munro HN. Mammalian protein metabolism. New York: Academic Press; 1970: 21-132.
  10. Hugenholtz P, Tyson GW, Webb RI, Wagner AM, Blackall LL. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 411-9. DOI: 10.1128/AEM.67.1.411-419.2001.
  11. Marcy Y, Ouverney C, Bik EM, Losekann T, Ivanova N, Martin HG, et al. Dissecting biological "dark matter" with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 11889-94. DOI: 10.1073/pnas.0704662104.
  12. Curtis MA, Zenobia C, Darveau RP. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell Host Microbe* 2011; 10: 302-6. DOI: 10.1016/j.chom.2011.09.008.
  13. Wade WG. The oral microbiome in health disease. *Pharmacol Res* 2013; 69: 137-43. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.11.006.
  14. Liu B, Faller LL, Klitgord N, Mazumdar V, Ghodsi M, Sommer DD, et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PloS One* 2012; e37919. DOI: 10.1371/journal.pone.0037919.
  15. Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008; 87: 1016-20. DOI: 10.1177/154405910808701104.
  16. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 1311-8. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02420.x.
  17. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 55-71.
  18. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 2011; 13: 25-36.
  19. McKinnon A, Black AY, Lortie K, Fleming NA. A case of adolescent pelvic inflammatory disease caused by a rare bacterium: *Fusobacterium*. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2013; in press. DOI: 10.1016/j.jpog.2013.02.008.
  20. Cisar JL, Sandberg AI, Mergenhagen SE. The function and distribution of different fimbriae on strains of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naestlundii*. *J Dent Res* 1984; 63: 393-6. DOI: 10.1177/00220345840630030701.
  21. Eribe ERK, Paster BJ, Caugant DA, Dewhirst F E, Stromberg VK, Lacy GH, et al. Genetic diversity of *Leptotrichia* and description of *Leptotrichia goodfellowii* sp. nov., *Leptotrichia hofstadii* sp. nov., *Leptotrichia shahii* sp. nov. and *Leptotrichia wadei* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 583-92. DOI: 10.1099/ijs.0.02819-0.
  22. Bowden GHW. Microbiology of root surface caries in humans. *J Dent Res* 1990; 69: 1205-10. DOI: 10.1177/00220345900690051701.
  23. Van Houte J, Jordan HV, Laraway R, Kent R, Soparkar PM, DePaola PF. Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries. *J Dent Res* 1990; 69: 1463-8. DOI: 10.1177/00220345900690080301.
  24. Chang CL, Jeong J, Shin JH, Lee EY, Son HC. *Rahnella aquatilis* sepsis in an immunocompetent adult. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 4161-2.
  25. Tash K. *Rahnella aquatilis* bacteremia from a suspected urinary source. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2526-8.
  26. Leadbetter ER, Holt SC, Socransky SS. Capnocytophaga: new genus of gram-negative gliding bacteria. I. General characteristics, taxonomic considerations and significance. *Arch Microbiol* 1979; 122: 9-16.
  27. O'Hara CM, Steigerwalt AG, Hill BC, Farmer III JJ, Fanning GR, Brenner DJ. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family *Enterobacteriaceae* formerly known as Enteric Group 75. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2046-9.
  28. Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, et al. *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3297-303.