

Cica Geneus Staph POT Kitの原理と メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学

Principle of Cica Geneus Staph POT Kit and molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus

愛知県衛生研究所 主任研究員 鈴木 匡弘

MASAHIRO SUZUKI (Senior Researcher)

*Laboratory of Bacteriology, Department of Microbiology and Medical Zoology,
Aichi Prefectural Institute of Public Health*

1. はじめに

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、現在においても医療現場で最も多く検出される薬剤耐性菌である。いわゆる院内感染原因菌として、感染管理が欠かさない病原菌である。日本で検出されるMRSAの多くは、全ての β -ラクタム薬(抗MRSA活性を持つセファロスポリンを除く)に耐性を獲得しているのみならず、ゲンタマイシンやクリンダマイシン、レボフロキサシンなど多くの临床上重要な薬剤にも耐性を示す。MRSAがマスコミの話題に上ることは少なくなったが、検出数自体は増加傾向にあり、普通に存在する薬剤耐性菌となってしまった。

さらに医療行為との関連性が見いだされないにもかかわらずMRSAが検出される、いわゆる市中獲得型MRSA(CA-MRSA)の存在が指摘されている。特に北米では高病原性型のCA-MRSAが蔓延し、問題視されている¹⁾。幸い日本では未だ高病原性型CA-MRSAの蔓延は見られないようだが、CA-MRSA自体は決して少なくない。

蔓延状態にあるMRSAだが、医療現場における感染管理の徹底によって院内感染を減らす事ができる。特に入院患者へのMRSA伝播抑制は医療現場の努力によって達成可能と考えられ、多くの病院で感染対策が効果を上げている。そこで感染対策の一助として院内伝播の実態を可視化できる分子疫学解析を紹介し、分子疫学解析の敷居を下げるために開発、キット化されたPhage ORF typing法(POT法)およびCica Geneus Staph POT Kit(以下Cica POT Kit)について解説する。

2. MRSAの系統

日本でどのようなMRSAが検出されるか整理するために、MRSAの分類法について紹介する。MRSAは、遺伝的背景の研究から多くの系統が存在することが判明している。MRSAはもともとメチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)が、耐性遺伝子である*mecA*を獲得したことによって発生したと考えられている。MRSAの系統は、*mecA*遺伝子が挿入されたゲノムそのものの系統と*mecA*遺伝子を黄色ブドウ球菌に運び込むStaphylococcal cassette chromosome *mec*(SCC*mec*)のタイプとの組み合わせで決めると理解しやすい。

ゲノムそのものの系統を決めるためには、multilocus sequence typing(MLST)が利用される²⁾。MLSTでは、7カ所のハウスキーピングジーン塩基配列の多型を利用する。得られた塩基配列はMLSTのデータベースと照合し、sequence type(ST)を決める。また近縁なST型同士をまとめclonal complex(CC)とすることもある。

SCC*mecI*はcassette chromosome recombinaseと*mec* gene complexの種類の組み合わせからtypeが決められ、その他の挿入部分の構造からsubtypeが決められる。SCC*mec*のtypeやsubtypeの種類は研究の進展とともに増えつつあるが、世界で分離されるMRSAが保有するSCC*mec*の多くはtype I~Vである³⁾。

ST型とSCC*mec*の組み合わせで決めたMRSAの系統は、クローンと表現される。日本の病院では、ST5(またはCC5)かつSCC*mec* type IIを保有するNew York / Japan(NY/Japan)クローンが大多数を占める⁴⁾。また近年話題となることの多いCA-MRSAとしてはST8(またはCC8)か

つSCC*mec* type IVのクローンが多い。日本で分離されるCA-MRSAの中には、Toxic shock syndrome toxin-1 (毒素性ショック症候群毒素-1)を産生するものもある。しかし、ほとんどの場合Panton-Valentine Leicocidin (白血球破壊毒素)は産生しない。また小児を中心にST89かつSCC*mec* type IIのクローンが流行しており、表皮剥奪毒素(ETB)を産生することからブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群(SSSS)やとびひの起因菌となる。

3. クローンと株

臨床検体や環境材料などから分離同定された菌は株と呼ばれる。クローンは株の集合とも言えるが、同一クローンに分類される株間にも多様性が見られる。例えばNY/Japanクローンに分類される株を、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析すると多様なPFGEパターンを示す。しかし同一クローンに分類される株間には共通点が多く、保有する毒素遺伝子や薬剤感受性パターンなどには一定の傾向が見られる。

クローンによって多様性の程度は様々で、PFGE解析の結果を見る限りNY/Japanクローンには高い多様性が見られるが、小児で流行しているST89かつSCC*mec* type IIのクローンの多様性は乏しく、株を識別することが困難である(図1)。

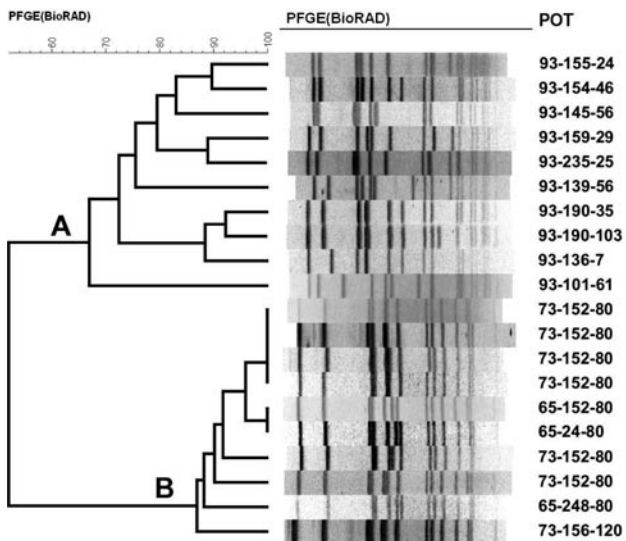


図1 NY/Japanクローンおよび小児流行クローン各10株のPFGEパターン疫学的に関連性が見いだされないNY/Japanクローン様分離株(2002~2006年、5医療機関で分離)および小児流行クローン分離株(2002~2006年、5医療機関で分離)各10株のPFGEパターンをデンドログラム解析。NY/Japanクローン様分離株は多様なPFGEパターンが見られる(クラスターA)。一方、小児流行クローン分離株のPFGEパターンはよく似ており、多様性に乏しい(クラスターB)。Cica POT Kit解析結果においても同様の傾向が見られる。

4. MRSAの感染対策

MRSAは日本では広く蔓延しているため、ある程度の規模の病院であれば1ヶ月に少なくとも数株程度は検出されることが考えられる。MRSAが検出される原因は、病院外部から持ち込まれるMRSAが存在することである。抗生物質の使用によってMSSAがMRSA化することは通常ない。

MRSAの感染対策としては接触感染予防策の徹底などが基本となるが、ここでは同一株の伝播を分離菌株の遺伝子型から解析し、集団感染の範囲を特定できる分子疫学解析について説明する。

病院には常に外部から持ち込まれるMRSAが存在することは、前述の通りである。したがって、MRSAが検出されたことと、MRSAが院内伝播したことは必ずしも一致しない。そこで検出されたMRSAが持ち込みなのか、院内伝播なのかを判断する必要が出てくる。

ここで分子疫学解析が威力を発揮する。MRSAには多様性があるため分子疫学解析によって、多種類の遺伝子型に分類できる。外部から持ち込まれた株の場合、それぞれの遺伝子型は異なると期待され、実際分子疫学解析を実施するとほとんどの場合すべて異なる遺伝子型となる。一方病院内伝播の場合、通常1つの株が広がることが多いと考えられ、分子疫学解析すると同一遺伝子型となる。

MRSAの遺伝子型を決める手法としては、PFGE法が標準法である。PFGE法ではゲノムDNA全体を制限酵素で切断、電気泳動し、電気泳動パターンから遺伝子型を決定する。菌株識別能力および再現性に優れ、適用可能な菌種が多いなど分子疫学解析にふさわしい多くの特徴を持つ。MRSAも含めた黄色ブドウ球菌の解析においても株レベルの多様性を検出可能な優れた菌株識別能を示し、特にNY/Japanクローンによる院内感染を調査するには、PFGE以外の方法では菌株識別能が不足するため分離株を十分に分けられない傾向にあった。その一方で特殊な電気泳動装置を必要とすることや作業者のトレーニングを必要とすることなどに加え、解析結果が得られるまで少なくとも3日と時間がかかるという欠点がある。また、手軽に実施することが困難であり、時間もかかることから院内感染が疑われた際の調査手法としてどの医療機関でもPFGE解析を行えるわけではない。

5. POT法開発の目的

先に述べたように、MRSA院内感染が疑われた際に、PFGE解析を実施することは敷居が高い。そこで黄色ブドウ球菌、特にMRSAの集団感染時に容易に分子疫学解析を実施可能とすることを目的にPOT法は開発された⁵⁾。NY/Japanクローンが圧倒的多数を占める日本の環境においても、十分な菌株識別能力を発揮するよう株レベルでの識別を可能とすることを目指した。そのため、POT法は、分離株の近縁関係を捉えるよりむしろ分離株が同一か否かを判定することに主眼が置かれている。POT法開発の目標をまとめると以下のようになる。

- (1) 菌株識別能力: NY/Japanクローンのタイピングが可能となるよう、PFGE法と同等の株レベルでの菌株識別能力の実現。
- (2) 解析時間: 半日程度で実施可能な迅速性の実現。
- (3) 必要機器: 一般的な実験機器で実施できるようにする。

Cica POT Kitでは論文発表されているPOT法の原法⁵⁾を改良し、MRSAとMSSAの区別ができるようにするとともに、MRSAクローンの簡易同定機能を加えた⁶⁾。

6. POT法の原理

POT法では菌株毎に保有状態が異なるORFを事前を選んでおき、それらの保有パターンをMultiplex PCRによって検出することで菌株の遺伝子型を決定する。

公表されている多くの黄色ブドウ球菌株全ゲノム配列をORF保有パターンの視点から比較すると、黄色ブドウ球菌内では菌株間に以下の違いが見られる。

Genomic islet: ゲノム内の所々にORF 1~数個から構成される菌株毎に保有状態の異なる小領域“genomic islet”が存在する。genomic isletは、全ゲノム塩基配列解析から存在が判明したが機能は明確でないことが多く今まであまり注目されてこなかった⁷⁾。しかし黄色ブドウ球菌では、genomic isletの保有パターンはMLST解析によって得られるCCと一対一で対応する⁶⁾。Cica POT Kitではgenomic islet 2個を検出し、クローンの簡易同定に利用している(表1 POT1-5, 6)。採用した2個はMRSAに多いクローンの識別がなるべく正確となるよう選択してある。

Genomic island: ゲノム中に毒素遺伝子などが連なって挿入されている部分がある。これらの遺伝子群は、元々のゲノムには存在せず外来性である。病原性に関わるgenomic islandの場合、pathogenicity islandと呼ばれる。その他機能不明の外来性遺伝子群やSCCmecもgenomic islandの一種である。同一クローン内における保有genomic islandやgenomic island内の多様性は高くない。Cica POT Kitでは、Mu50⁸⁾と呼ばれるMRSA株で見いだされたgenomic islandから1個のORFを検出している(表1 POT2-8)。加えてSCCmecのtype IIとIVが同定できるようmec gene complex class AおよびB、cassette chromosome recombinase A2などSCCmec関連遺伝子を5個検出している(表1 POT1-1~4, 7)。

Prophage: 黄色ブドウ球菌のゲノムには、通常1~2個程度のファージが溶原化している^{7, 8)}。Prophageもgenomic islandの一種である。黄色ブドウ球菌ファージは様々なものが報告されているが、それぞれのファージを構成するORFのうち同一機能を担うと見られるORFの種類は限られており、各機能に相当するORFが組み合わさり、ファージを構成している。したがってファージの種類は多いが、ファージを構成する主なORFの種類はある程度限定される。これらの中から適当なものを選択すると、多くのクローンで株を識別可能な程度に保有パターンの多様性が見られる(図2)。Cica POT Kitでは、菌株

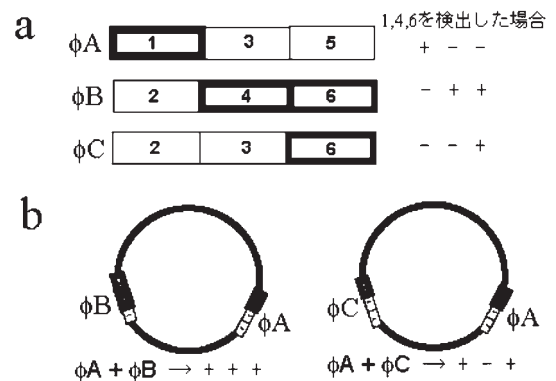


図2 POT法の概念図

POT法では菌株識別のためファージを構成するORFから適当なものを選んで検出し、その保有パターンによって遺伝子型を決める。

a ファージの模式図。黄色ブドウ球菌ファージは機能単位でORFが組み合わさったモザイク構造となっている。模式図では同一番号の部分は同一ORFから構成されているとする。1、4、6を検出した場合phi A、phi B、phi Cはそれぞれ+-、-+-、--+-となる。

b 黄色ブドウ球菌ゲノムに溶原化しているファージの模式図。黄色ブドウ球菌ゲノム中には1~2個のファージが溶原化していることが多い。左のゲノムにはphi Aおよびphi B、右のゲノムにはphi Aおよびphi Cが溶原化しているとする。模式図aの1、4、6を検出した場合左右のゲノムはそれぞれ+++、+-+となり、POT法ではこのパターンを遺伝子型とする。ファージを構成するORFは多いため、溶原ファージを構成するORFの組み合わせは複雑となり、菌株識別に利用することができる。

識別のためprophageを構成するORFを13個検出し(表1 POT2-2~7, POT3-1~7)、株レベルでの菌株識別を実現している⁵⁾。

Cica POT Kitでは上記21種類のORFに加え、トランスポゾンTn554の検出を加えている(表1 POT2-1)。Tn554は同一CCに分類される株間においても保有の有無に差があるため、菌株識別能力の向上に貢献している。

7. Cica POT Kitの実施手順

POT法はMultiplex PCRによる分子疫学解析法であるため、通常のPCRを実施する機器が必要となる。Cica POT Kitの操作手順はPCRに不慣れな検査者が操作する可能性も考慮し、微量なピペッティングを極力減らすよう試薬が調製してある。

テンプレート調製:Cica POT Kitでは、熱抽出サンプルをテンプレートとして使用する。ところが黄色ブドウ球菌、特にMRSAは細胞壁が頑丈で単に蒸留水に懸濁して加熱しただけでは十分量のテンプレートが得られないことが多い。リボスタフィンを使うことで確実にテンプレート調製できるが、リボスタフィンの失活に注意する必要がある。Cica POT Kitでは、Cica Genus DNA抽出試薬の使用を推奨しており、同試薬の使用によって容易に熱抽出サンプルを調製できる。

PCR反応液調製:Cica POT Kitには、プライマーやTaqなどPCR反応液調製に必要な試薬が一通り同梱されている。また、PCR反応液調製の際に蒸留水は必要ない。Cica POT Kitでは、菌株識別のためのORF 22個を2本のPCR反応チューブで増幅する。PCR反応液はプライマーミックス(Mix.1, Mix.2)それぞれについて調製する。5X AptaTaq DNA Master、PCRサプリメント、プライマーミックスを1検体当たり4μLずつ混合し、テンプレートを各反応液に8μLずつ添加し、遺伝子増幅装置にセットする。遺伝子増幅装置の機種間差による影響はほとんどないと考えられる。しかし、複雑なMultiplex PCRであるため、反応チューブと遺伝子増幅装置の相性が悪い場合、増幅が悪くなる可能性がある。

増幅産物の検出:通常のミニゲル電気泳動装置で、各PCR増幅バンドを分離可能である。ゲルとしては4%アガロースゲル、バッファーとしては0.5Xあるいは1.0Xの

TBEバッファーを用いる。4%アガロースゲルの調製には慣れが必要なので、プレキャストゲルの利用も検討する価値がある。プレキャストゲルのブランドによっては染色に時間がかかるため、染まりが悪い場合は染色時間を延長する。Cica POT Kitによる増幅バンドは明瞭な事が多いが、薄いバンドでもサイズが一致すれば“+”にとる。非特異バンドの出現は少ないが、出現した場合は無視する。

8. POT型

POT型への変換:Cica POT Kitでは結果の取り扱いを容易とするため、増幅バンドの有無を1、0に置き換え、さらに十進法に変換することでPOT型としている(表1)。

表1 図3のCica POT Kit解析泳動パターンからPOT型への変換

ターゲット領域	係数	1-3, 5, 7		4, 6		8		9	
		結果	×係数	結果	×係数	結果	×係数	結果	×係数
<i>femA</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
POT1-1 <i>mecA</i>	64	1	64	1	64	1	64	1	64
POT1-2 Class B ^{*1}	32	0	0	0	0	0	0	0	0
POT1-3 II a ^{*2}	16	1	16	1	16	1	16	1	16
POT2-1 Tn554	128	1	128	1	128	1	128	1	128
Mix. 1 POT2-2 Phage	64	0	0	0	0	1	64	1	64
POT2-3 Phage	32	1	32	1	32	0	0	1	32
POT2-4 Phage	16	1	16	1	16	1	16	0	0
POT2-5 Phage	8	1	8	1	8	1	8	0	0
POT2-6 Phage	4	1	4	1	4	1	4	0	0
POT2-7 Phage	2	1	2	1	2	1	2	1	2
POT2-8 Island ^{*3}	1	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>femA</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
POT1-4 <i>ccrA2</i>	8	1	8	1	8	1	8	1	8
POT1-5 Islet ^{*4}	4	1	4	1	4	1	4	1	4
POT1-6 Islet ^{*4}	2	0	0	0	0	0	0	0	0
POT1-7 Class A ^{*5}	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mix. 2 POT3-1 Phage	64	1	64	1	64	0	0	1	64
POT3-2 Phage	32	1	32	1	32	1	32	1	32
POT3-3 Phage	16	0	0	0	0	1	16	0	0
POT3-4 Phage	8	0	0	0	0	0	0	1	8
POT3-5 Phage	4	1	4	0	0	1	4	0	0
POT3-6 Phage	2	1	2	1	2	0	0	0	0
POT3-7 Phage	1	1	1	0	0	1	1	1	1
POT 1 POT1-1 + ... + POT1-7		93		93		93		93	
POT 2 POT2-1 + ... + POT2-8		180		180		223		226	
POT 3 POT3-1 + ... + POT3-7		103		98		53		105	

*1. *mec* gene complex class B, *2. SCCmec type IIa specific, *3.genomic island, *4.genomic islet, *5. *mec* gene complex class A

POT型は、POT1-POT2-POT3と3つに分けて記述している。同一株ではPOT1-POT2-POT3と3つの数値全てが一致する。

POT型の3つの数値のうち、株を識別している部分はPOT2とPOT3である。この部分は主にファージを構成するORFの保有パターンから計算されている。またPOT1の数値はSCCmec関連ORFの検出結果とgenomic isletの保有パターンの組み合わせから計算されるため、MRSA

クローンと相関があり、この数値から検査した株のMRSAクローンが大まかに推定できる(表2)。従ってPOT1の数値が異なる株の場合、両者は遺伝的に遠いと考えられる。例外としてSCCmec type IIのcassette chromosome recombinaseは脱落しやすいようで、例えばNY/JapanクローンのPOT1の値は通常93であるが85となる株も存在する。同様に小児流行クローンのPOT1の値は通常73であるが65となる株がしばしば見られる(図1)。

表2 POT1の値と日本で分離されるMRSAクローンの関係

POT1	CC	SCCmec	備考
64	59	V	PVL産生株が多い。他にCC89のSCCmec type V
65	89	不明	壊れたSCCmec type II b保有株の可能性
70	121	V	ETA産生株が多い
73	89	II b	小児流行クローン。ETB産生株が多い
77	5	II ut	SCCmec type II, subtype 不明
85	5	不明	壊れたSCCmec type II a保有株の可能性
93	5	II a	院内感染型MRSA(NY/Japanクローン)
98	8	I	
104	多様	IV	CG12, CC59, CC72, CC78, CC89などのSCCmec type IV
106	8	IV	他にCC1のSCCmec type IV, USA300の多くは106-77-113
108	5	IV	
110	30	IV	PVL産生株が多い

9. Cica POT Kitの性能

9.1 Simpson's index

Cica POT Kitの菌株識別能力を判断するために、病院内で水平伝播した可能性の低い392株の黄色ブドウ球菌を使用し、Simpson's indexを計算した⁹⁾。Simpson's indexは互いに関連のない2株をタイピングしたとき、異なる株と判定される確率である。使用菌株の内訳はNY/JapanクローンMRSA 255株、その他のMRSA 65株、MSSA 72株である。供試菌株は、Cica POT KitおよびSmaI切断によるPFGE解析を行った。PFGEパターンは、バンド1本違いで異なるパターンとした。

392株のMRSAはCica POT Kitでは232タイプに、PFGEでは249タイプに分類することができ、Simpson's indexはともに約0.99であった。

9.2 POT型の安定性

38名の患者から間隔を開けて1名につき2株ずつ、合計76株のMRSAを採取した。分離間隔は3~68日であった。供試菌株は、Cica POT KitおよびSmaI切断によるPFGE解析を行った。PFGEパターンは、バンド1本違いで異なるパターンとした。

32名の患者から分離された32組の分離株(84.25%)はPOT型、PFGEパターンともに同一となった(表3)。論

文発表済みのPOT法原法でORF 1個違いかつ同一PFGEパターンの分離株対⁵⁾については同一POT型となった。その一方5組(13%)は同一由来株である可能性が高いにもかかわらずORF 2個以上異なるPOT型となった。POT法では溶原ファージの脱落あるいは溶原化によって本来同一の株が異なるPOT型となる可能性が15%程度あると考えられる。ORF 1個違いのPOT型の判定についての判断は、さらなるデータの蓄積が必要である。

表3 同一患者由来株をCica POT KitおよびPFGE法解析した結果の比較

同一患者由来株間で異なるバンド数またはORF数		同一患者由来株組数 (n=38)	分離間隔 (平均値)
PFGE	POT法		
0	0	32 (84.25)	3 - 68 (20.9)
0	3	1	27
1	1	1	15
2	2	1	27
2	3	2	43 - 44 (43.5)
2	5	1	4

10. Cica POT Kitによる院内感染の解析

図3は、ある病院の同一病棟で発生したMRSA集団感染から得られた株をCica POT KitとSmaI切断によるPFGE法で解析した結果である。同一感染源由来と考え

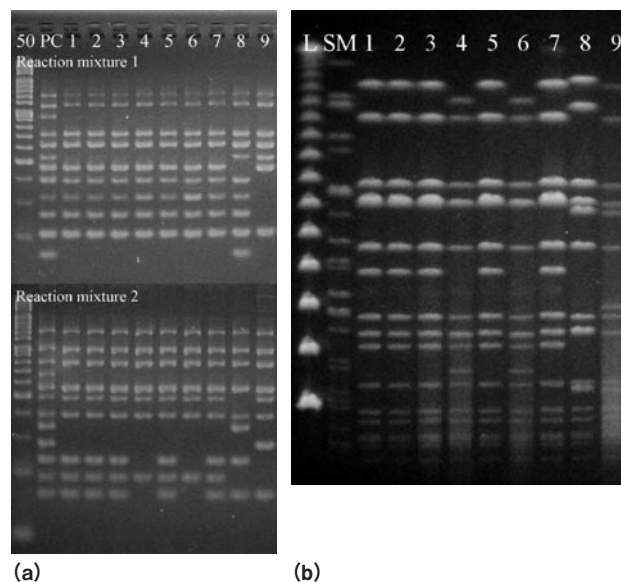


図3 集団感染由来MRSAのCica POT Kit解析及びPFGE解析
集団感染発生が疑われた同一病棟から得られた9株のMRSAをCica POT Kit (a)およびPFGE法(b)で解析した。Cica POT Kit、PFGE法ともに菌株番号1~3、5、7が同一パターン(POT型93-190-103)となり集団感染が強く示唆された。加えて菌株番号4および6が同一パターン(POT型93-190-98)となり、93-190-103とは別の集団を形成していた。菌株番号8(POT型93-223-53)および9(POT型93-226-105)はPOT型、PFGEパターンともに異なっており、集団感染とは異なるMRSAと考えられる。
50:50bpラダー、PC:ポジティブコントロール、1~9:菌株番号、L:ラダー、SM:画像解析用サイズマーカー

られる分離株(1~3、5、7)は、同一POT型(93-190-103)かつ同一PFGEパターンを示している。また別の2株(4、6)についても、同一POT型(93-190-98)かつ同一PFGEパターンを示し同一株であることを示唆している(表1)。一方菌株番号8および9については、POT型(8: 93-223-53、9: 93-226-106)およびPFGEパターンともに異なっており、集団感染とは関連のない株と判定される。

同一病院で短期間に分離された株を解析した場合、Cica POT KitとPFGE法の結果は良く一致する。Cica POT Kitでは、複数分離株が同一POT型となった場合に集団感染の発生を疑う。POT型から菌株間の近縁関係を推定することは困難であり、ORF 1個違いのよく似たPOT型となった場合は、異なる株である可能性が高い。例外的にPOT2とPOT3の値が同じ、かつPOT1の値が93と85となった場合に限り、同一株由来の可能性がやや高いと考えられる。院内感染の有無を判断する際にはCica POT Kit、PFGE法どちらの場合でも、入院病棟や担当した医療スタッフなど、遺伝子型以外の疫学情報も加味して総合的に判断する必要がある。

11. おわりに

POT法は、MRSA院内感染時における分子疫学解析の敷居を下げるための新しい方法である。現在のところ解析実績は少なく、今後性能の検証やデータの蓄積が必要になる。その一方でPOT法によって迅速に結果が得られ、結果は施設間比較が容易であるといった特徴がある。Cica POT Kitを利用することでMRSAの分子疫学解析は容易となる。Cica POT Kitが感染管理に役立つことを期待する。

参考文献

- 1) M. Z. David and RS Daum. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**: 616-87. (2010)
- 2) M. C. Enright, N. P. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock and B. G. Spratt. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1008-15. (2000)
- 3) J.A. Otter and G. L. French. *Lancet. Infect. Dis.* **10**:227-39. (2010)
- 4) T. Ohkura, K. Yamada, A. Okamoto, H. Baba, Y. Ike, Y. Arakawa, T. Hasegawa and M. Ohta. *J. Med. Microbiol.* **58**:1329-36. (2009)
- 5) M. Suzuki, Y. Tawada, M. Kato, H. Hori, N. Mamiya, Y. Hayashi, M. Nakano, R. Fukushima, A. Katai, T. Tanaka, M. Hata, M. Matsumoto, M. Takahashi and K. Sakae. *J. Appl. Microbiol.* **101**:938-47. (2006)
- 6) M. Suzuki, M. Matsumoto, M. Takahashi, Y. Hayakawa and H. Minagawa. *J. Appl. Microbiol.* **107**:1367-74. (2009)
- 7) M.T. Holden, E. J. Feil, J. A. Lindsay, S. J. Peacock, N. P. Day, M. C. Enright, T. J. Foster, C. E. Moore, L. Hurst, R. Atkin, A. Barron, N. Bason, S. D. Bentley, C. Chillingworth, T. Chillingworth, C. Churcher, L. Clark, C. Corton, A. Cronin, J. Doggett, L. Dowd, T. Feltwell, Z. Hance, B. Harris, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, K. D. James, N. Lennard, A. Line, R. Mayes, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, S. Whitehead, B. G. Barrell, B. G. Spratt and J. Parkhill. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:9786-91. (2004)
- 8) M. Kuroda, T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, K. Hiramatsu. *Lancet.* **357**:1225-40. (2001)
- 9) P.R. Hunter and M.A. Gaston. *J Clin Microbiol* **26**: 2465-6. (1988)