

一方、肺炎球菌による髄膜炎が他菌種と最も異なる点は、1歳に好発年齢があるものの、10歳でも発症例がみられたことである。成人例も増加している。84の莢膜型が存在する肺炎球菌に対しては、免疫を獲得し難いことが考えられ、そのことが本菌による発症年齢を引き上げている要因のひとつになっていると推測された。

肺炎球菌性化膿性髄膜炎例では、インフルエンザ菌に比べ、発症後短時間で重篤化している例の多いことが注目された。

2) 化膿性髄膜炎由来菌の感性・耐性

図12に示すように、肺炎球菌は57株収集され、そのうちの23株が *pbp1a+2x+2b* 変異の PRSP(40.3%)、23株が PISP(*pbp2x*:12株、*1a+2x*:4株、*2x+2b*:3株、*2b*:2株、*pbp1a*:2株)であった。感性株は11株に過ぎなかった。

遺伝子解析結果と薬剤感受性との関係は極めて精度の高いもので、遺伝子変異の成績から治療薬の抗菌力を迅速に推定できた。例えば、日本でのみ重症感染症に対して使用されているPAPMに対しては、PSSPは0.004~0.008 μ g/ml、PISPは0.016~0.031 μ g/ml、PRSPは0.063~0.125 μ g/mlのMICを示すことが遺伝子変異の検索のみで報告することが可能であった。CTXやその他の β -ラクタム系薬に対しても同様のことは可能で、その具体的な推定値を明らかにした。

インフルエンザ菌は91株が送付されてきたが、そのうち感性菌は29株(31.8%)、TEM型 β -ラクタマーゼ産生株が27株(29.7%)、軽度耐性BLNARが24株(26.4%)、BLNARが4株(4.3%)、TEM+BLNARが6株(6.5%)という内訳で、急速にBLNARの増加してきていることが示唆された。また、インフルエンザ菌においても遺伝子変異から各 β -ラクタム系薬に対する抗菌力が推定できることが明らかにされた。すなわち、第一選択の治療薬であったCTXにおいては、軽度耐性BLNARは0.031~0.063 μ g/mlのMIC、BLNARでは0.25~1.0 μ g/mlのMICで、しかも殺菌力が明らかに低下しており、耐性菌にはむしろCeftriaxoneやmeropenemなどの抗菌薬の方が抗菌力的に優れていた。

D. 考察 & E. 結論

呼吸器感染症の主たる起炎菌である肺炎球菌とインフルエンザ菌において、菌が本質的に有している細胞壁合成酵素をコードする遺伝子上に変異が生じ、耐性化してきていることを明らかにし、その成績から、DNAレベルで2.2時間程度で迅速診断可能なシステムを確立した。実際に臨床応用可能できるか否かについても化膿性髄膜炎

例からの菌を対象として検討したが、その有用性は極めて高いと判断された。

遺伝子変異が明らかになれば、見かけのMICは同じであっても臨床効果のより期待できる治療薬剤を選択することが可能となる。今後はこのような迅速診断キットが研究用としてだけでなく、診断キットとしても使用できることが必要であろう。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Ubukata, Y. Shibasaki, K. Yamamoto, Y. Takeuchi, K. Sunakawa, M. Inoue, and M. Konno: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, (in press)
- 2) 山本 憲太郎, 生方 公子: β -ラクタマーゼ非産生ABPC耐性インフルエンザ菌(BLNAR). *日本臨床*, 2001, 4月号(印刷中)
- 3) 柴崎 有美, 生方 公子: ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP). -マクロライド耐性も含めて-. *日本臨床*, 2001, 4月号(印刷中)

2. 学会発表

- 1) Y. Shibasaki, N. Chiba, K. Hasegawa, P. C. Appelbaum, K. Nagai, and K. Ubukata: Association of additional amino acid substitutions in *pbp2x* and *pbp2b* genes in high-level beta-lactam resistance of *Streptococcus pneumoniae*. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- 2) K. Nagai, Y. Shibasaki, K. Hasegawa, T. A. Davies, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum, and K. Ubukata: Rapid identification and penicillin and macrolide resistance screening of *Streptococcus pneumoniae* isolated from US and Europe by PCR. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy
- 3) K. Ubukata, N. Chiba, K. Hasegawa, and Y. Shibasaki: Rapid identification of beta-lactamase negative and -positive ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* by PCR. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

名称: アンピシリン耐性インフルエンザ菌の検査法およびそのキット

出願番号: 特願平11-155399

特許公開：2000年12月

図1.肺炎球菌に対する基準薬剤ペニシリンGの薬剤感受性とPBP遺伝子変異の関係 (n=1,651)

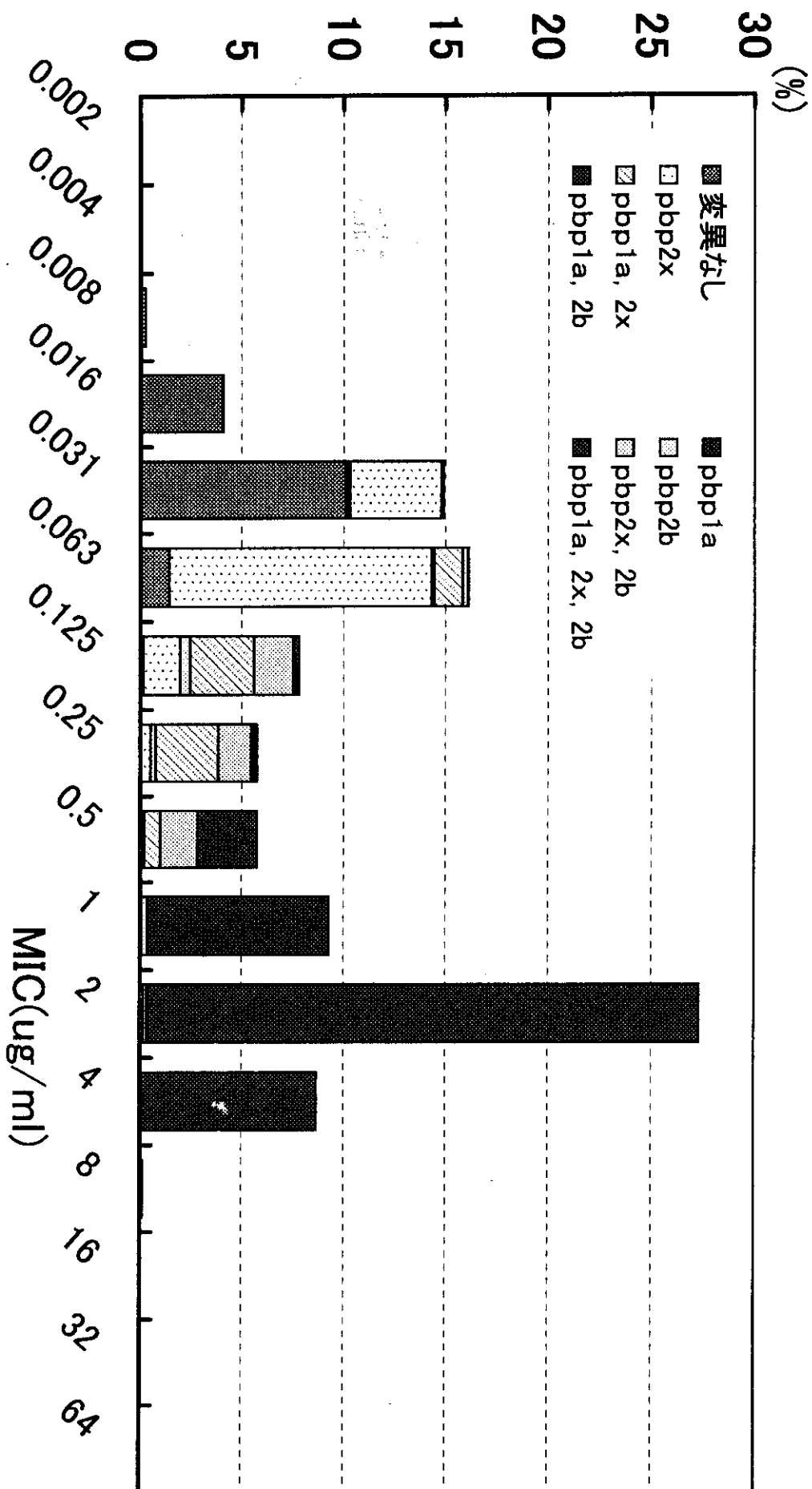


図2. PCRによる遺伝子迅速診断方法 -増幅される肺炎球菌DNA fragmentの位置-

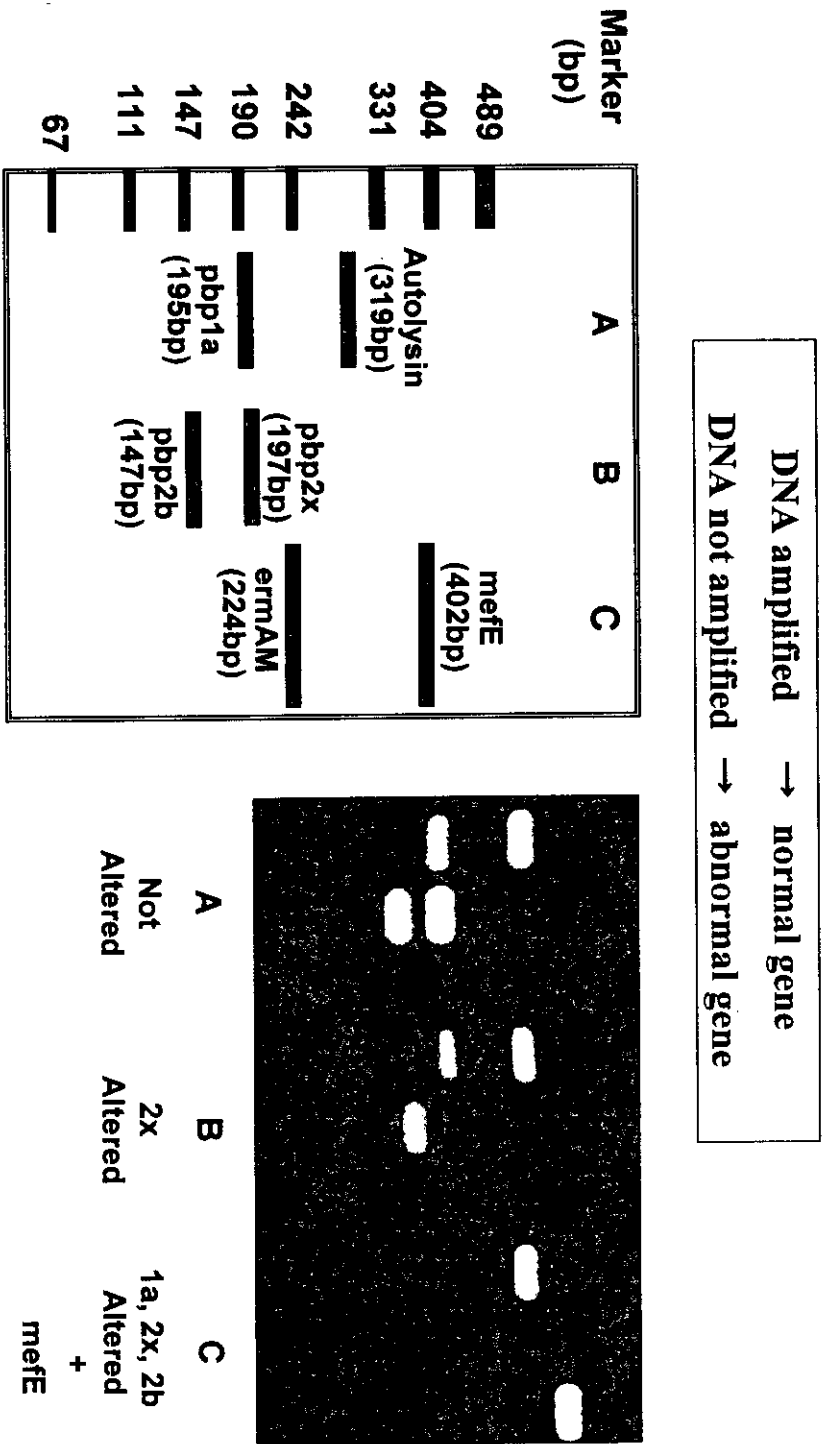


図3.肺炎球菌に対する基準薬剤ペニシリンGの薬剤感受性とPBP遺伝子変異の関係 (n=1,651)

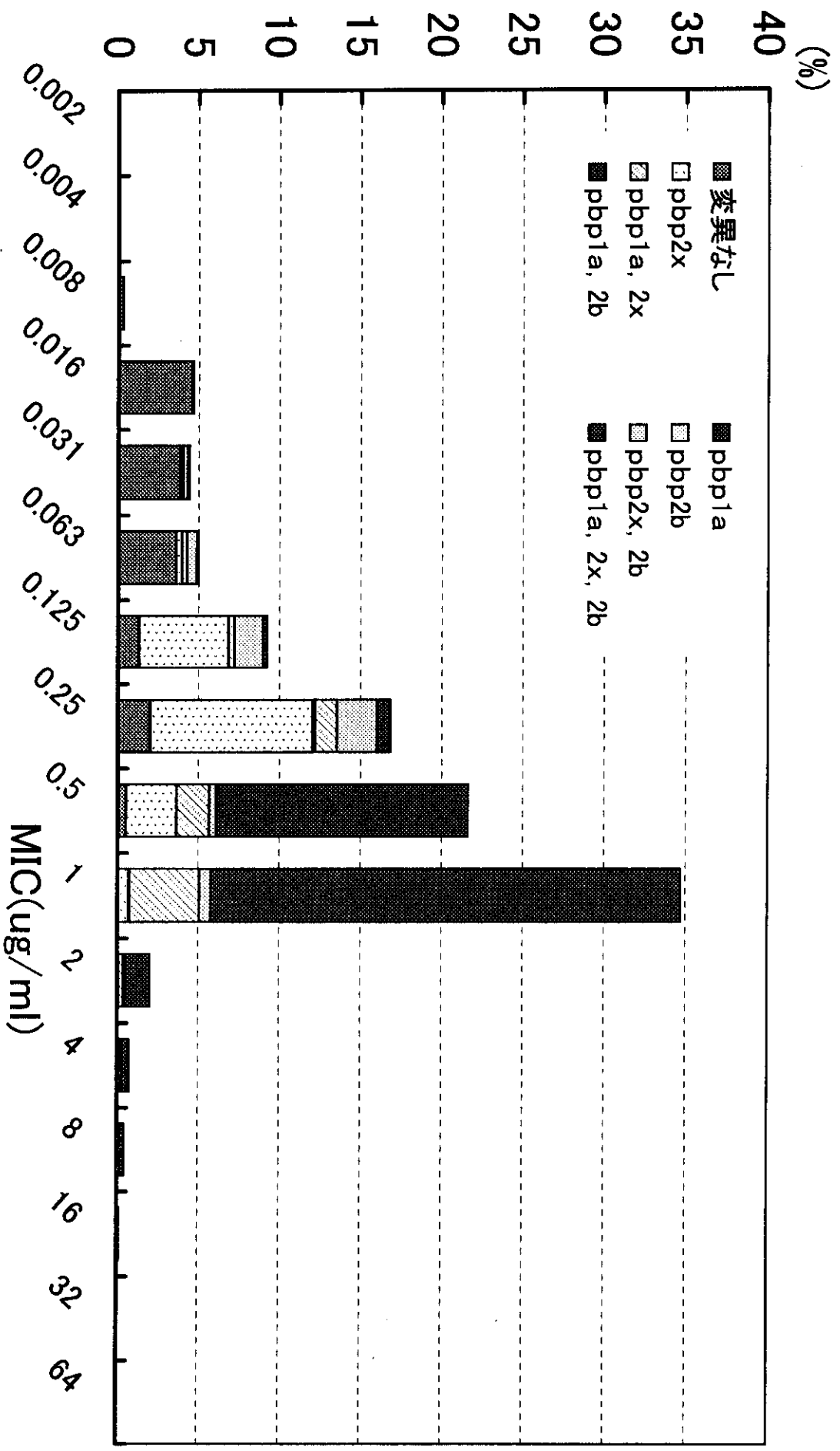


図4. PRSPに対する経口β-ラクタム系薬の抗菌力の比較 (n=795)

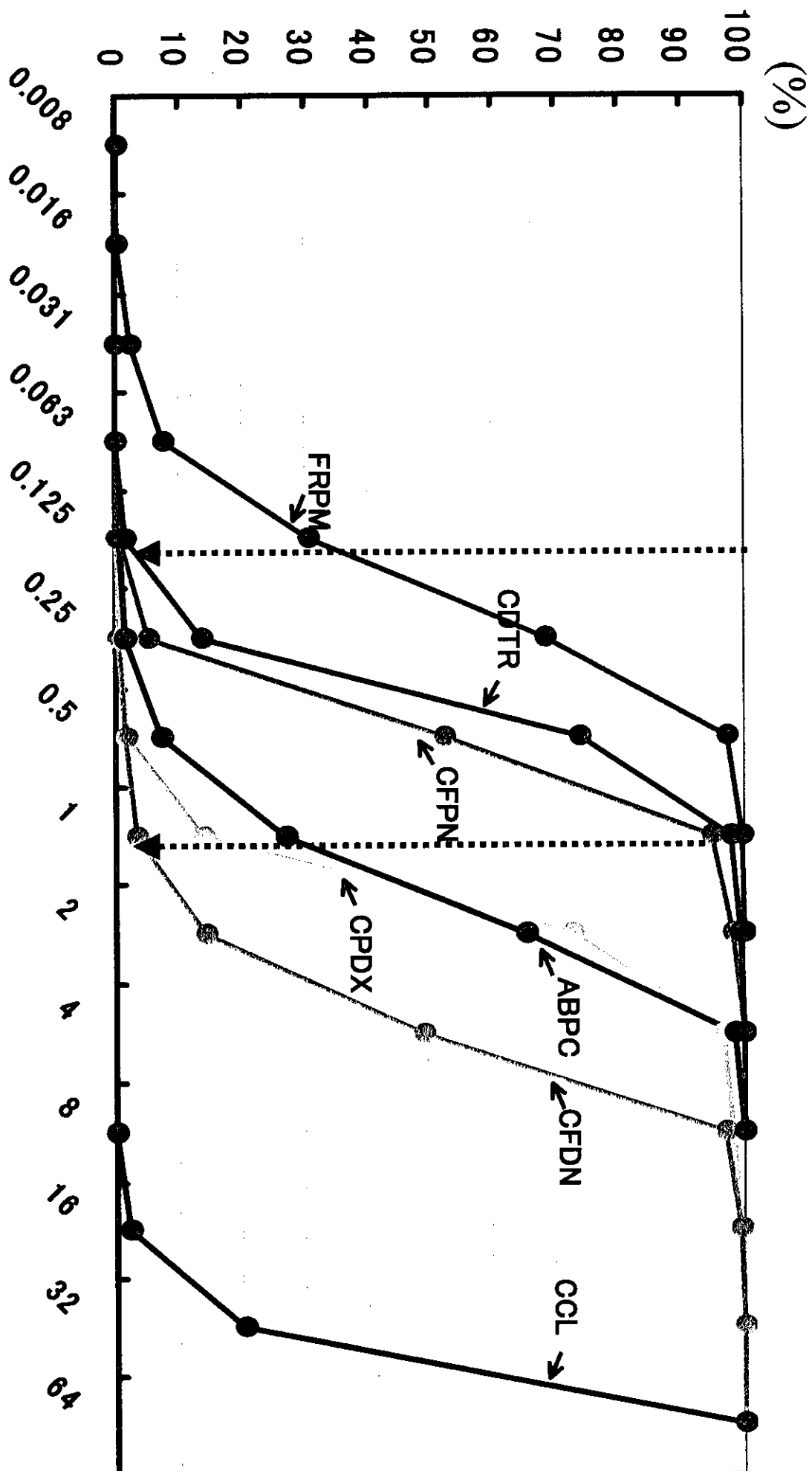


図5. 肺炎球菌に対するマクロライド系薬の感受性と遺伝子変異の関係 (n=1,647)

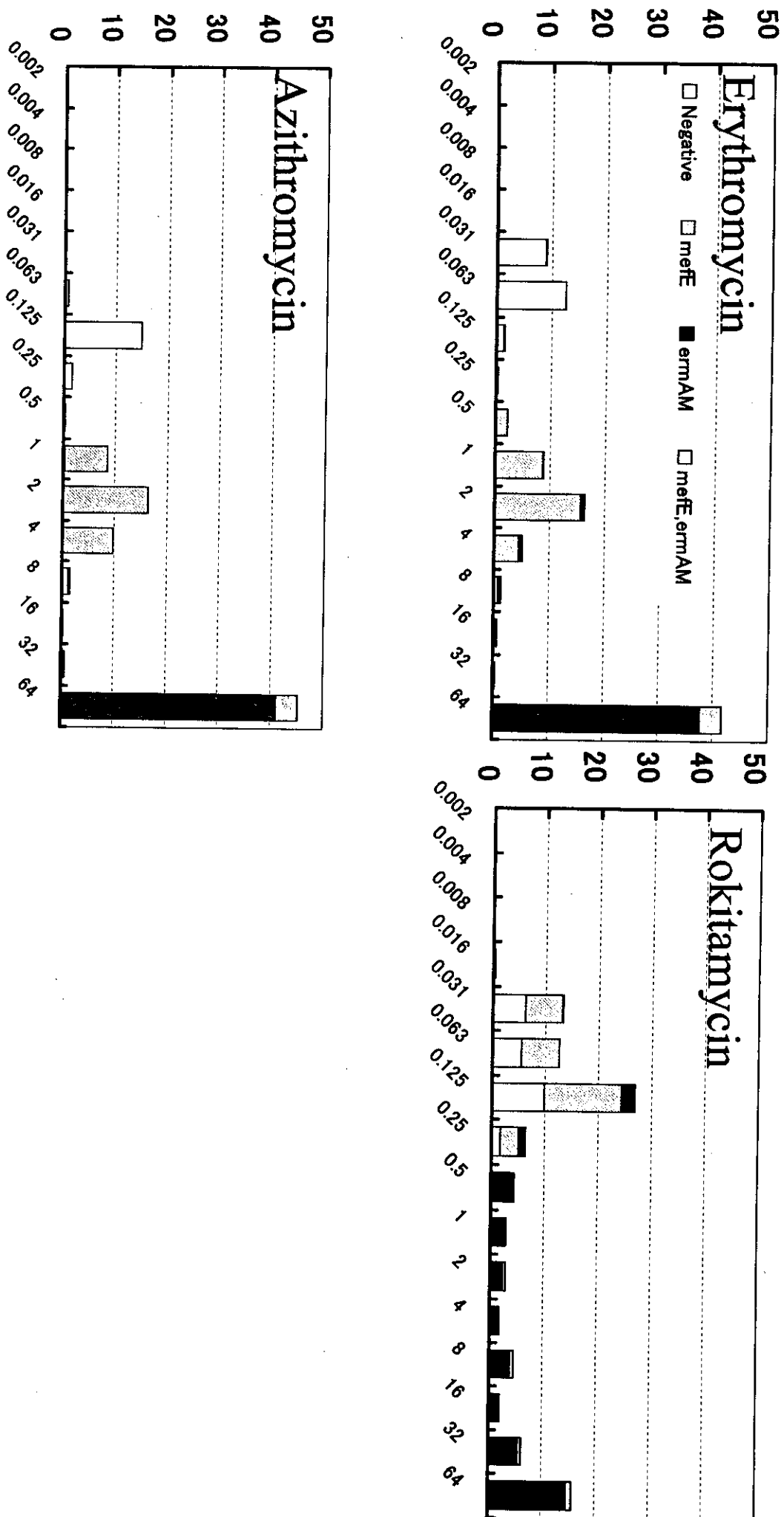


図6. インフルエンザ菌のPPBP3遺伝子上に見いだされたアミノ酸置換

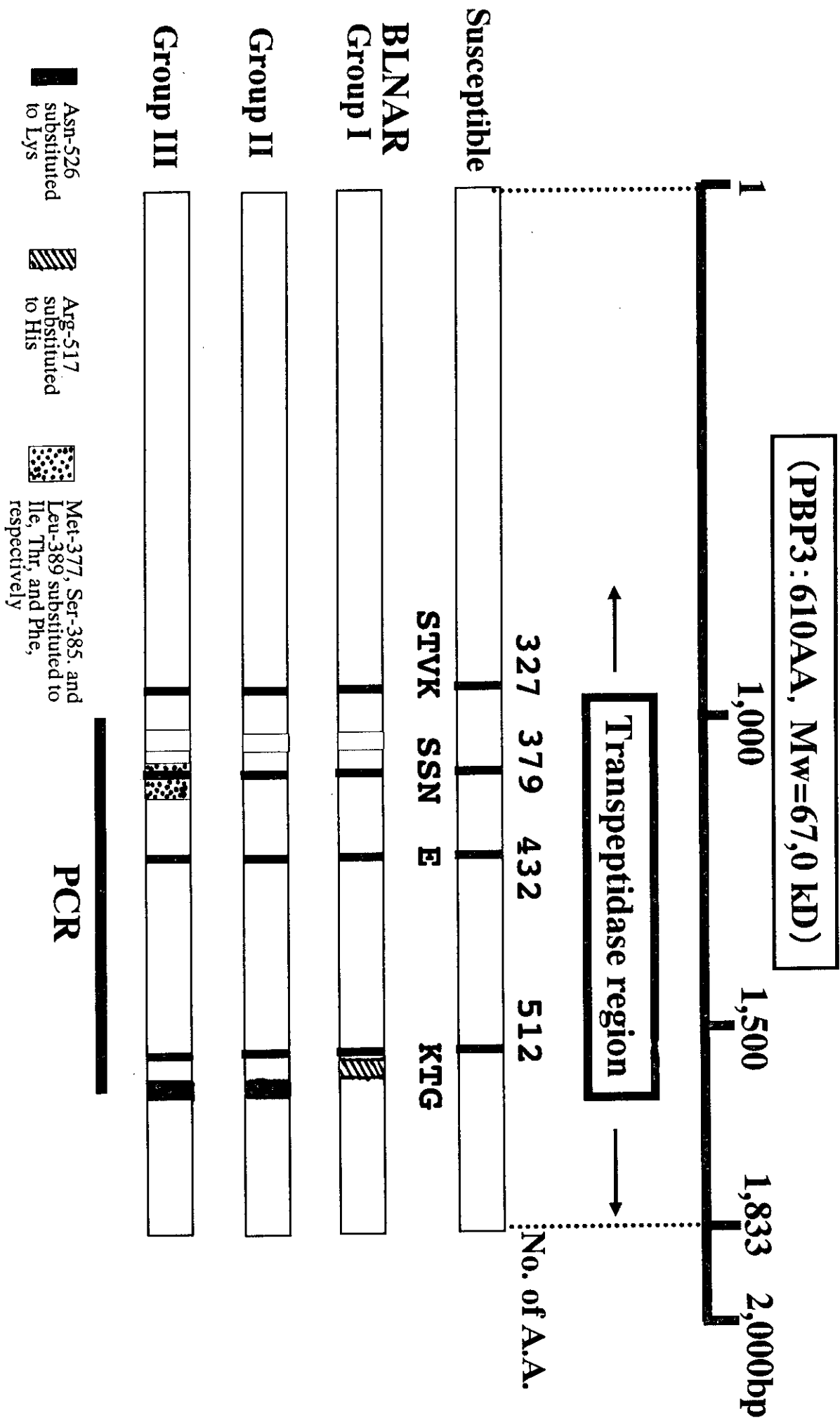


図7. 耐性インクルエンザ菌の識別 - PCRで増幅されるDNAの位置 -

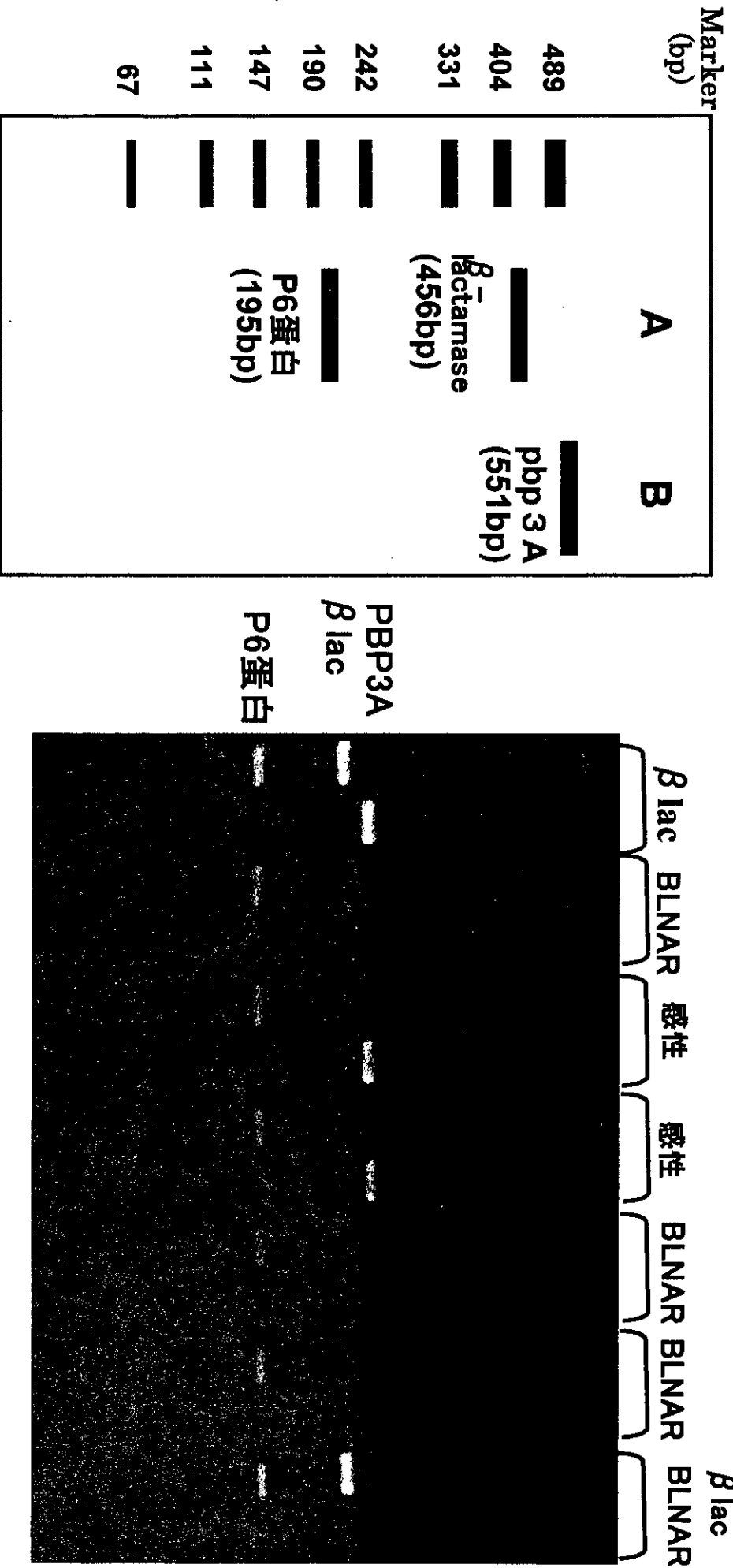


図8.インフルエンザ菌に対するアンピシリンの抗菌力と遺伝子変異の関係 ($n=572$)

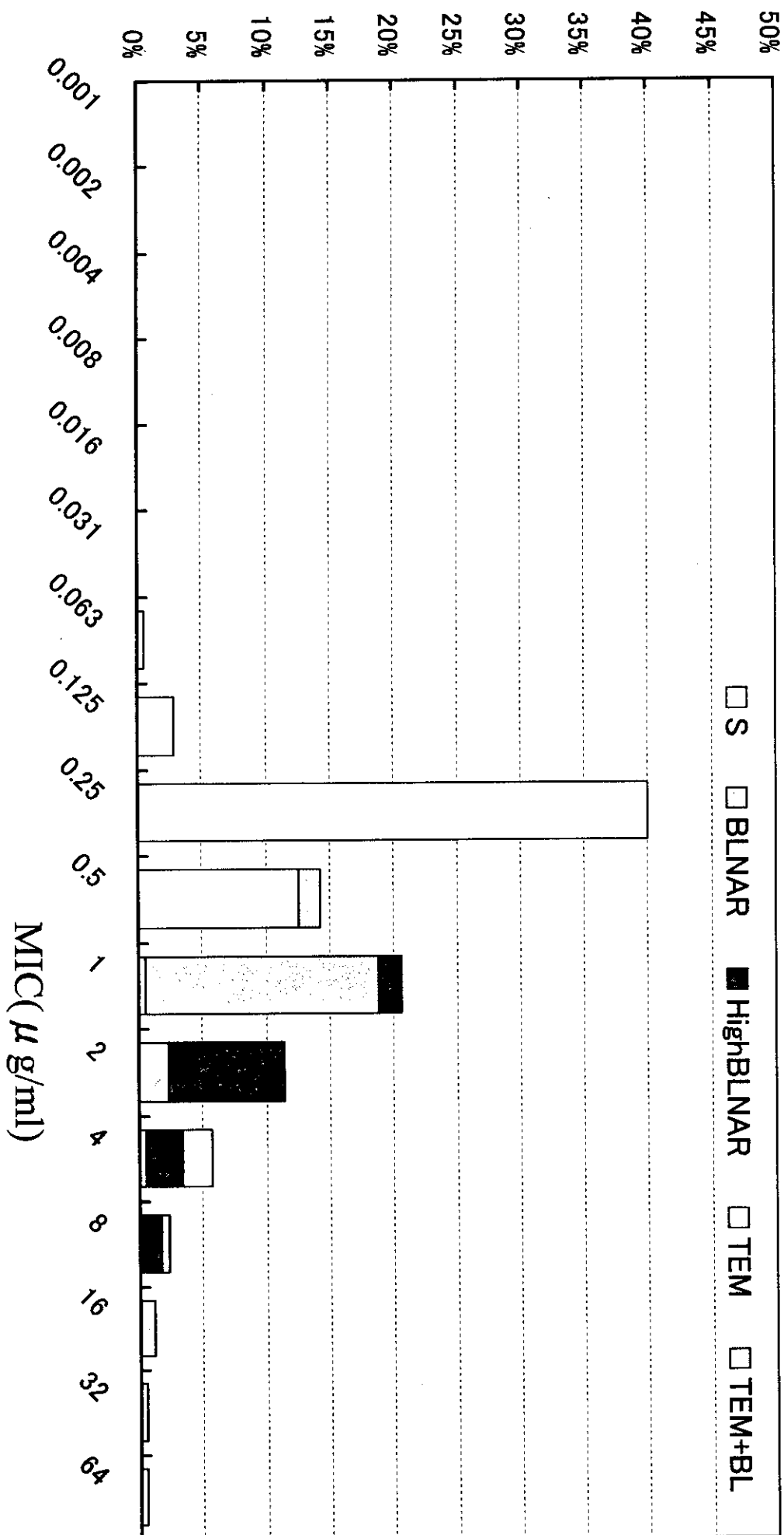


図9. BLNARIに対する経口β-ラクタム系薬の抗菌力の比較 (n=423)

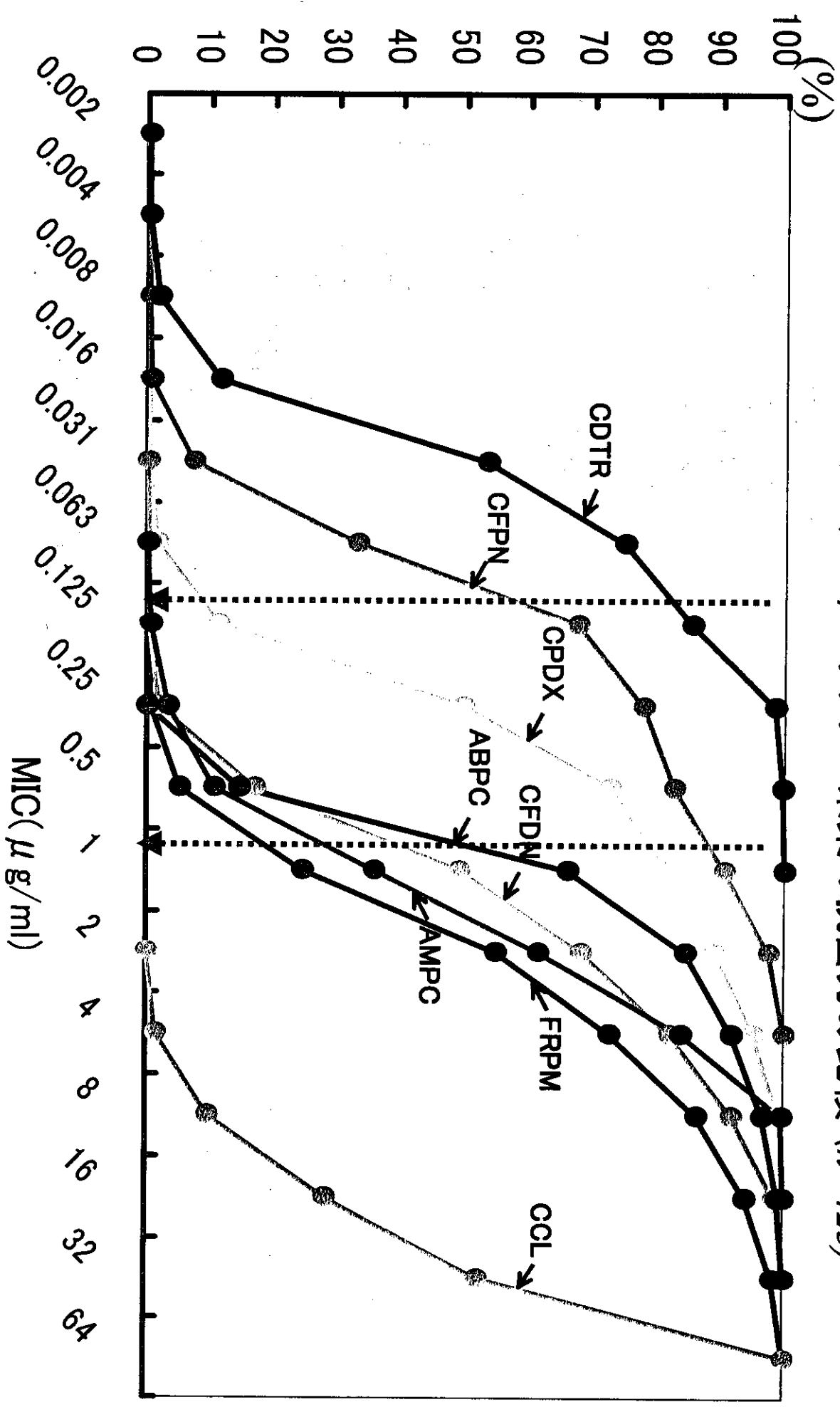


図10.小児化膿性髄膜炎からの検出菌と後遺症の有無 (n=422)

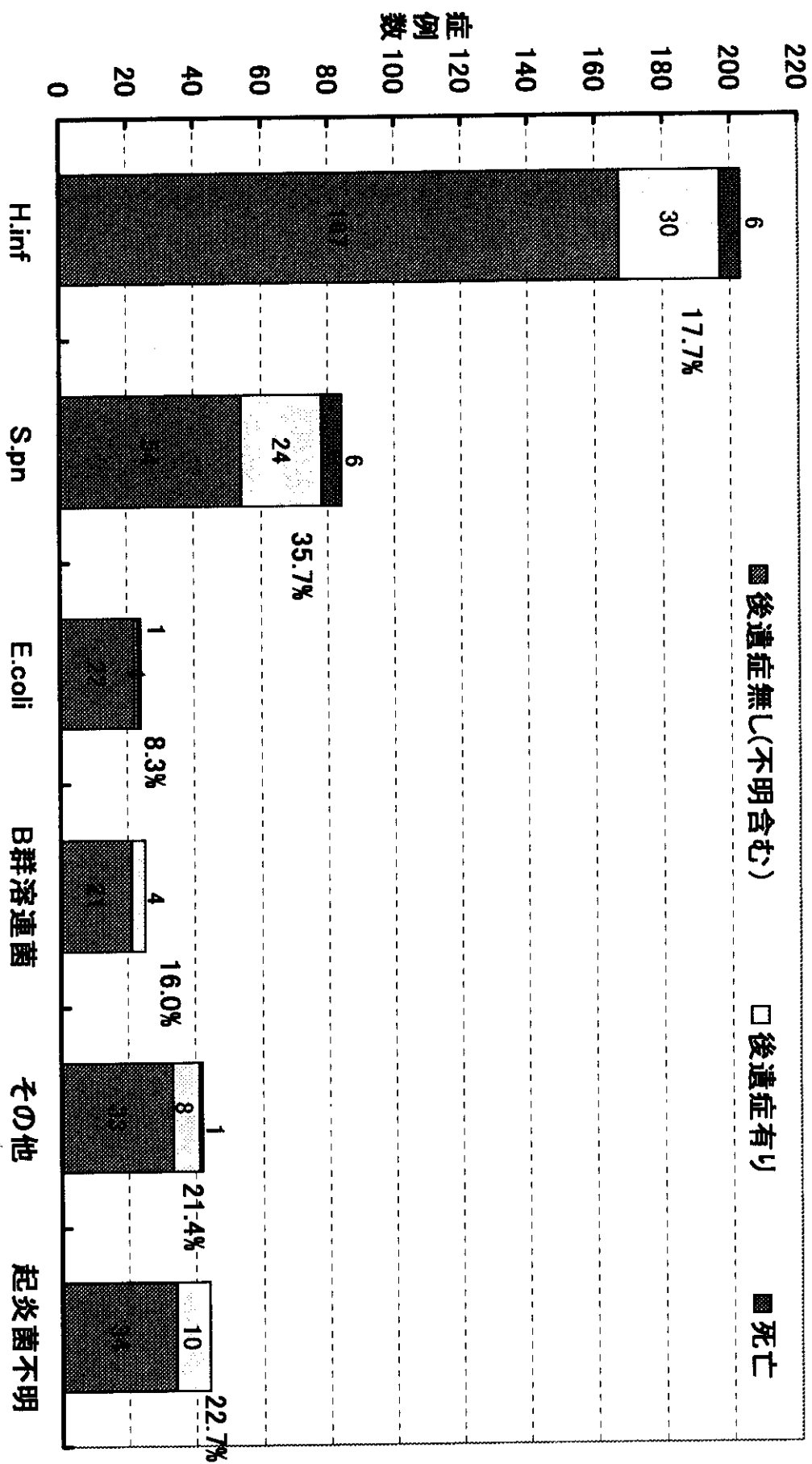


図11.年齢別にみた肺炎球菌とインフルエンザ菌による化膿性髄膜炎の発生状況 (1997.6～1999.6)

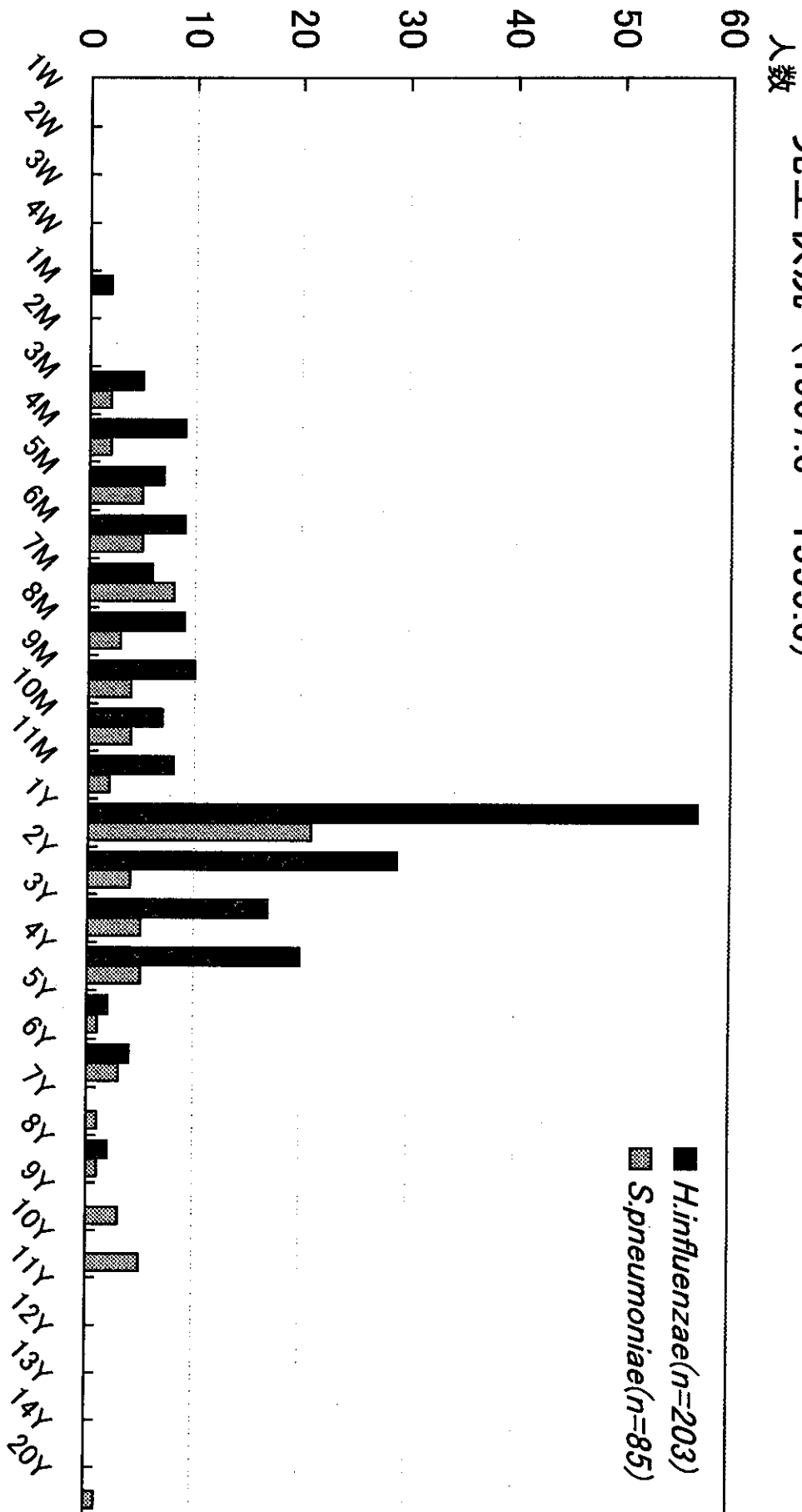
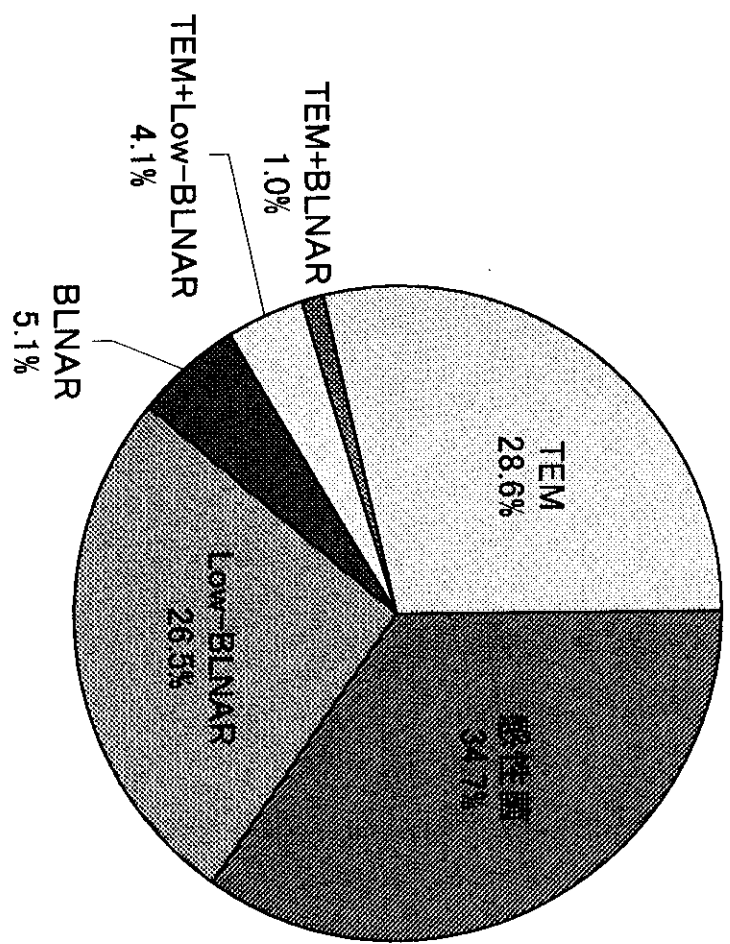
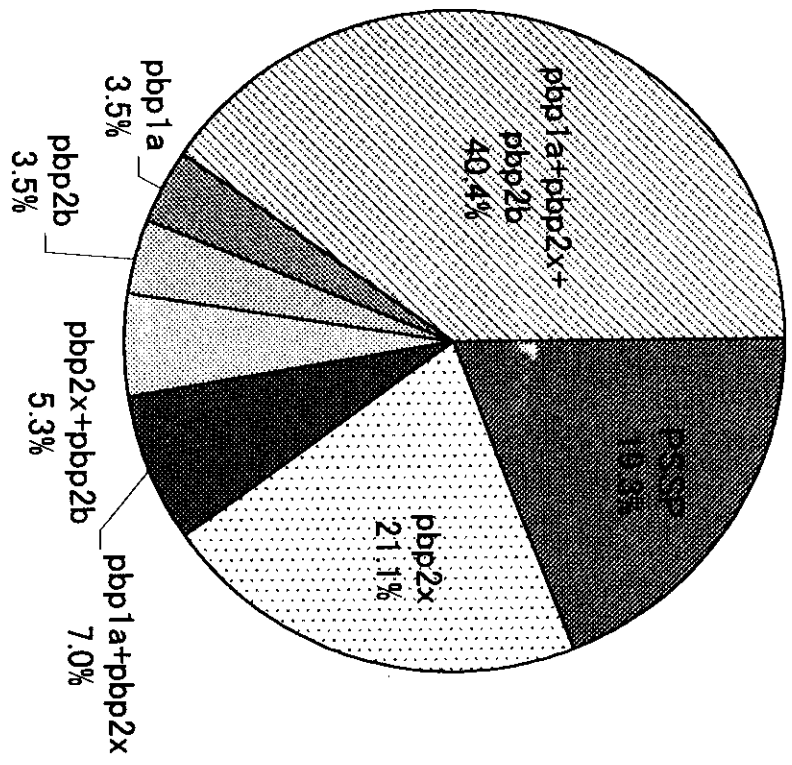


図12.化膿性髄膜炎例から分離された肺炎球菌とインフルエンザ菌の遺伝子変異

インフルエンザ菌 (n=98)



肺炎球菌 (n=57)



(2002.10)

平成12年度分担研究報告書

アミノグリコシド耐性菌のレファレンス因子の特定と迅速簡便検出法に関する研究

分担研究者 堀田国元 国立感染症研究所生物活性物質部
研究協力者 石川 淳、土崎尚史 国立感染症研究所生物活性物質部

コロニーPCR法を用いて複数種の耐性因子の同時一元的な検出法の確立を目指して研究を行い、以下の成果を得た。

1. MRSAの*mecA*遺伝子および3種のアミノグリコシド耐性遺伝子 [*aac*(6')/*aph*(2"), *aph*(3') および*aad*(4', 4")] を、それぞれのPCR増幅産物サイズに100~150bp程度の差をつけるようにプライマー設計することにより、一度のPCRで検出できる系を確立した。
2. また、コアグラーゼ遺伝子について3'領域のDirect repeatを標的としてコロニーPCRを行い、増幅産物を直接制限酵素*AfuI*処理して得られる切断パターンにより遺伝子多型を調べる系を確立した。
3. 上記の方法を用いて臨床分離MRSA株を調査した結果、以下のことが明らかになった。
 - 1) アルベカシン（ABK；抗MRSA剤）耐性と二機能酵素遺伝子*aac*(6')/*aph*(2")の間に相関性が認められた。但し、この遺伝子を保持していてもABK感受性のものも数多く認められた。
 - 2) 臨床における菌株の同定精度については、ABK耐性MRSAとして報告されたものの精度が低く、*mecA*と*aac*(6')/*aph*(2")の両方が検出されたのは試験した43株中21株であった。ABK感受性MRSAの同定精度は高かった（98%以上）。
 - 3) コアグラーゼ遺伝子に関しては、L21とコード番号を付けたものが圧倒的に多く、とくに*aad*(4', 4")だけが検出されたMRSAで相関性が高かったことから、L21はコアグラーゼII型との相関性が強く示唆された。
 - 4) アミノグリコシド耐性に関して、*aac*(6')/*aph*(2") はABK以外のKM系やISP以外のGM系に高度耐性を付与し、*aad*(4', 4")は4'-OHをもつKM、AMKおよびISPに特異的に耐性を付与した。両方をもつ菌株は、ABKに対して特異的に感受性なことが見出された

A. 目的

臨床分離される多数のMRSA菌株におけるアミノグリコシド耐性因子を迅速、簡便かつ正確に同定できるようにするため、耐性因子の解析を行うとともに、これまでの厚生科学研究において確立したコロニーPCR法を基礎に多種耐性因子の同時一元的に検出するためにMultiplexコロニーPCRの確立を目指す。また、コロニーPCRに続く制限酵素処理によるコアグラーゼ遺伝子の多型解析によるMRSAの識別法の確立を目指す。

B. 研究方法

1998年度に臨床分離されたアルベカシン(Arbekacin =ABK) 耐性および感受性のMRSA菌株を対象にコロニーPCR法¹⁾による抗生物質耐性遺伝子の迅速検出とコアグラーゼ遺伝子の多型解析（制限酵素処理との組み合わせによる）を以下のように行った。

1) 抗生物質耐性遺伝子

MRSAにおいてすでに知られている抗生物質耐性因子である*mecA*（メチシリン耐性遺伝子）と3種のアミノグリコシド耐性（修飾酵素：図1）遺伝子 [*aac*(6')/*aph*(2"), *aph*(3')および*aad*(4', 4")] を検出するために、GenBankの情報を基にそれぞれのPCR産物のサイズに100~150bp程度の差がでるようにプライマー（表1）を設定した¹⁻³⁾。

表2に示す条件で上記プライマーを混合した反応液に、爪楊枝を用いて目に見えない量の菌体をコロニーから採取・添加してPCRを行うことにより、一度のPCRで標的遺伝子を増幅検出するMultiplexコロニーPCRを行った。

PCR増幅断片のチェックは、反応後、アガロース電気泳動（図2）により行った。

2) コアグララーゼ遺伝子

MRSAのコアグララーゼ遺伝子⁵⁾の多型を調べるために、コアグララーゼ遺伝子の3'領域のDirect repeat (図3)を標的としてプライマーを作成してコロニーPCRを行い、PCR反応終了液を制限酵素 (*Alu I*) 処理して得られる切断パターンにより遺伝子多型を調べた。

C. 結果

1. Multiplex コロニーPCRによる抗生物質耐性遺伝子の検出

図2に示すように、採用した実験条件において標的抗生物質耐性遺伝子のPCR増幅がきれいに認められた。結果は、菌体から抽出したDNAを鋳型としたPCRの結果(各レーンに+と-で表示)とよく一致した。

全体として(表3)、試験したABK耐性と報告されたMRSA43株中 *mecA* (図2最上段バンド) が検出できたのは33株で、残り10株は図2の#7と#9のように *mecA* が検出されなかった(いずれも腸球菌)。ABK感受性MRSAでは供試52株中51株に *mecA* を検出した。

MRSA (*mecA*+) 株には、ABK耐性に関係なく *aad*(4', 4'') (図2最下段バンド) が90%以上の高頻度で検出された。

aac(6')/*aph*(2'') に関しては(図2の上から2番目のバンド)、ABK耐性株における検出頻度が64%、感受性株でも43%認められた。

aph(3') 遺伝子は検出頻度が少なく、二機能酵素遺伝子と共存している1例だけであった。

2. コアグララーゼ遺伝子の多型解析

図4に示すように、コアグララーゼ遺伝子のC末端繰り返し領域を標的としたコロニーPCRによってサイズの異なる4種のDNA断片が増幅し、それらの *Alu I* 切断によって10種の切断パターンが得られた。このうち圧倒的に多かったのは、L21と標識したもので、約680bpの増幅断片中に2つの *Alu I* 部位を持っており(図4)、*aad*(4', 4'') を単独で持つMRSAでは約94%、*aad*(4', 4'') と *aac*(6')/*aph*(2'') の両方を持つ菌株では80%という高頻度で検出された(表4)。

3. MRSAにおけるアミノグリコシドの耐性因子と耐性

アミノグリコシド耐性(表5)は、*aac*(6')/*aph*(6') を単独で持つ菌株では弱く、*aad*(4', 4'') を単独で持つ菌株では4'-OHをもつ *Isepamicin* (ISP) と *Amikacin* (AMK) に特異的に中等度の耐性が認められた。高度の耐性は *aac*(6')/*aph*(6') と *aad*(4', 4'') または *aph*(3') の2つをもつ場合で、耐性因子を持たない株は感受性であった。

一方、図5からも明らかのように、抗MRSA剤である *Arbekacin* (ABK) がMRSAに対して最も強い活性を示し、ABK耐性は *aac*(6')/*aph*(6') と *aad*(4', 4'') の2つを持つ菌株で低頻度の中等度耐性が認められただけであった。

D. 考察

Multiplex コロニーPCRにより1回のPCRで4種の薬剤耐性遺伝子を迅速に検出することができた。また、コアグララーゼ遺伝子の多型解析もコロニーPCR反応終了液の一部を直接 *Alu I* 処理することによって迅速簡便に行うことができるようになった。これらのことにより多数の菌株の標的遺伝子を簡便迅速確実なチェック法が確立できたと判断できる。

今回の解析により、臨床におけるMRSAの同定精度がABK耐性株では77% (33/43) と低く、感受性株では98% (51/52) と高いことが認められた。また、ABK耐性に関しても、少なくともその因子である *aac*(6')/*aph*(2'') を持つものは64% (21/33) にとどまった(表3)。以上のことから、今回確立したコロニーPCR法はABK耐性MRSAの同定精度向上に極めて有用と判断される。

一方、ABK感受性であっても43% (22/51) の菌株が *aac*(6')/*aph*(2'') を保持していることが認められた(ほとんどは同時に *aad*(4', 4'') を保持)。これらの菌株は今後ABK耐性に変身する可能性が考えられる。

さらに、コアグララーゼ遺伝子の多型解析から、最近の臨床MRSAは、特定のコアグララーゼ型(L21) とともに *aad*(4', 4'') を保持する菌株が圧倒的な優勢株となっていることも浮き彫りになった。L21は恐らくコアグララーゼII型と関連すると考えられる。以上のことから、コアグララーゼII型菌株対策としては、単にβ-ラクタム剤の使用を制限するだけではなく、4'-OHをもつAMKやISPの使用制限を考慮する必要と強く示唆される。

E. 結論

1. Multiplex コロニーPCRによって、MRSAや腸球菌の薬剤耐性因子の検出を簡便迅速確実に実行できる。
2. コロニーPCRに続く *Alu I* 処理は、コアグララーゼの多型解析に有用である。
3. アミノグリコシド耐性に関しては、*aac*(6')/*aph*(2'') と *aad*(4', 4'') をもつMRSA株に注意が必要であろう。

F. 健康危険情報: なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 土崎尚史、石川淳、堀田国元: コロニーPCR法によるMRSAおよび腸球菌の薬剤耐性遺伝子の迅速検出. *Jpn. J. Antibiot.* 53: 422-429 (2000)

2. 学会発表

- 1) 堀田国元: コロニーPCRによるMRSAおよび腸球菌の薬剤耐性遺伝子の迅速検出. 第73回日本細菌学会大会、2000年5月、札幌。
- 2) 土崎尚史、石川淳、堀田国元: コロニーPCRによるMRSAの多種薬剤耐性遺伝子の同時検出とコアグララーゼ遺伝子多型解析. 第83回日本細菌学会関東支部総会、2000年11月、東京。

表 1. 標的遺伝子とPCRプライマー

標的遺伝子	遺伝子産物	プライマー	PCR産物	文献
<i>mecA</i>	PBP2'	Forward: 5'-TGTCGGTAACCTGAATCAGC-3' Reverse: 5'-TGCTATCCACCCTCAAACAG-3'	519 bp	1, 2
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	AAC(6')/APH(2'')	Forward: 5'-TACAGAGCCTTGGGAAGATG-3' Reverse: 5'-CATTGTGGCATTATCATCATATC-3'	407	1, 3
<i>aph(3')-III</i>	APH(3')-III	Forward: 5'-CTGATCGAAAAATACCGCTGC-3' Reverse: 5'-TCATACTCTTCGAGCAAAGG-3'	269	4
<i>aad(4', 4'')</i>	AAD(4', 4'')	Forward: 5'-CTGCTAAATCGGTAGAAGC-3' Reverse: 5'-CAGACCAATCAACATGGCACC-3'	174	4
<i>coa</i>	Coagulase	Forward: 5'-ATAGAGATGCTGGTACAGG-3' Reverse: 5'-GCTTCCGATTGTTCCGATGC-3'	?	5

表 2. PCR条件

構成成分	終濃度	耐性遺伝子 増幅液	<i>coa</i> 遺伝子 増幅液
10x PCR Buffer	1 x	+	+
dNTPs	各0.2mM	+	+
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 mM	+	+
DNA polymerase (KOD-Plus)	0.4U	+	+
Primers			
<i>mecA</i> F & R	各0.2 μM	+	-
<i>aac(6')/aph(6')</i> F & R	各0.5 μM	+	-
<i>aph(3')-III</i> F & R	各0.2 μM	+	-
<i>aad(4', 4'')</i> F & R	各0.2 μM	+	-
<i>coa</i> F & R	各0.2 μM	-	+
反応液量		20 μl	20 μl
反応条件:	95°C, 3分 → (95°C, 30秒 → 50°C, 30秒 → 72°C, 1分) × 30		

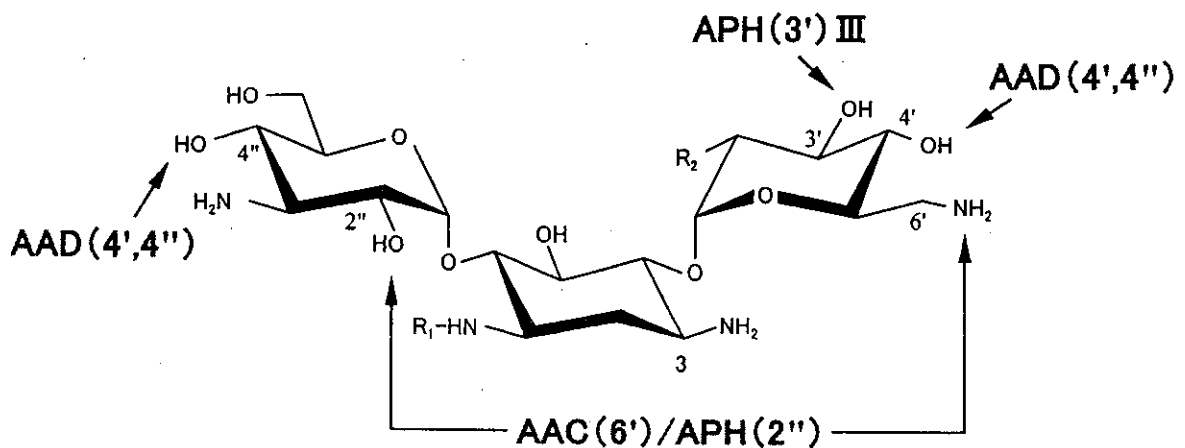


図 1. MRSAにおける既知アミノグリコシド修飾酵素の作用部位

strain	#1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	NC	PC	PCR product
<i>mecA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	519bp
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	407
<i>aphA3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	269
<i>aadC</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	174

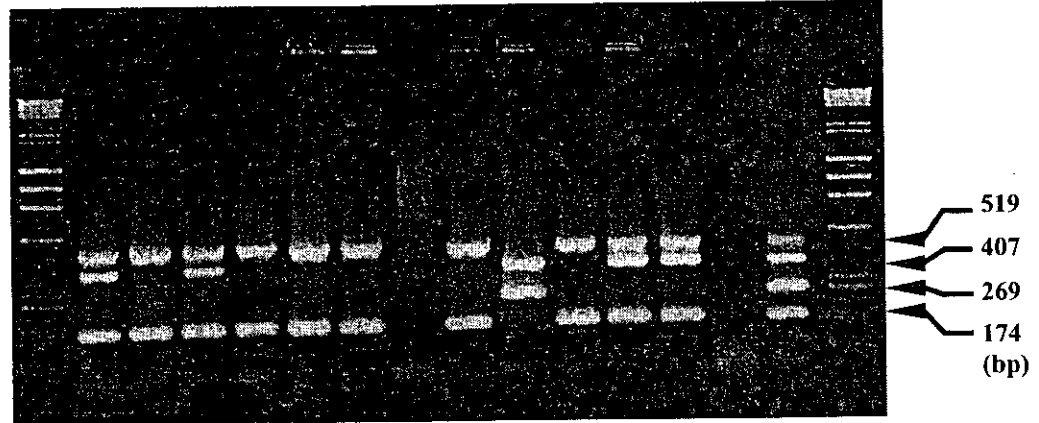


図2. Multiplex コロニーPCRによる抗生物質耐性遺伝子の増幅検出

表3. MRSAにおけるアミノグリコシド修飾酵素遺伝子の分布

遺伝子プロフィール*	ABK ^R MRSA** 33 株	ABK ^S MRSA 51 株	合計 84 株
<i>aad aac/aph aph</i>			
1 + + +	0	0	0
2 + + -	20/33 = 60.6%	20/51 = 39.2%	40/84 = 47.6%
3 + - +	0	0	0
4 - + +	1/33 = 3.0%	0	1/84 = 1.2%
5 + - -	11/33 = 33.3%	26/51 = 51.0%	37/84 = 44.0%
6 - + -	0	2/51 = 3.9%	2/84 = 2.4%
7 - - +	0	0	0
8 - - -	1/33 = 3.0%	3/51 = 5.9%	4/84 = 4.8%
<i>aad(4', 4'')+</i>	31/33 = 93.9%	46/51 = 90.2%	77/84 = 91.7%
<i>aac(6')/aph(2'')+</i>	21/33 = 63.6%	22/51 = 43.1%	43/84 = 51.2%
<i>aph(3')+</i>	1/33 = 3.0%	0	1/84

* *aad*= *aad(4', 4'')*, *aac/aph*= *aac(6')/aph(2'')*, *aph*= *aph(3')*

** ABK耐性MRSAとして臨床報告された菌株

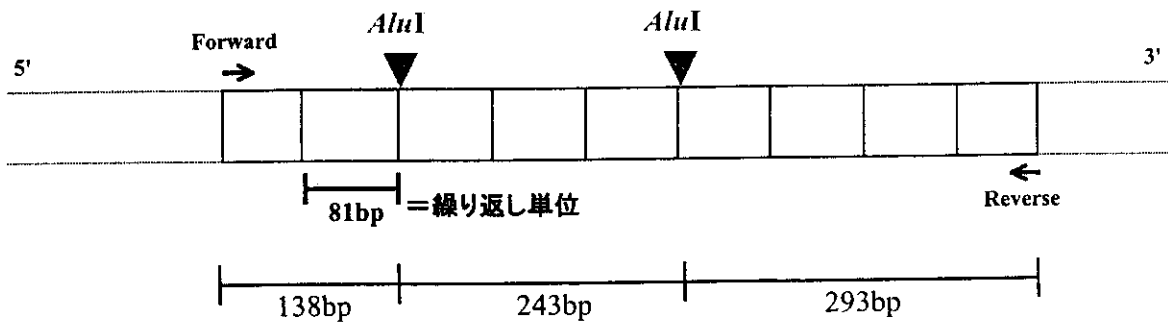
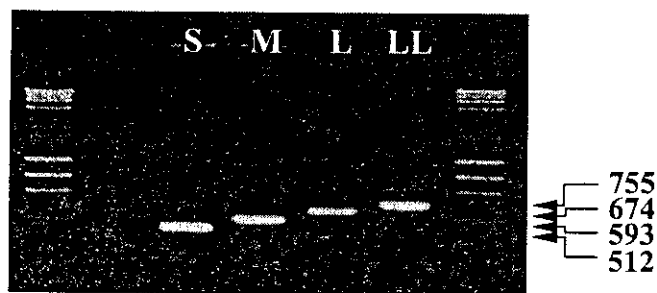
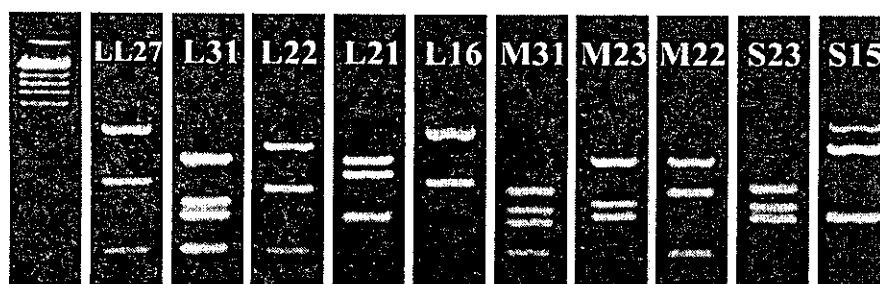


図3. コアグララーゼ遺伝子C末端繰り返し領域とAluI部位およびプライマー位置



↓ *Alu*I 処理



<i>Alu</i> Iサイト数:	2	3	2	2	1	3	2	2	2	1
サイズ(bp):	462	293	374	293	455	212	293	293	212	374
	212	162	219	243	219	162	162	219	162	138
	81	138	81	138		138	138	81	138	
		81				81				
計:	755	674	674	674	674	593	593	593	512	512

図4. コアグララーゼ遺伝子のPCR増幅断片（上段）とその*Alu*I切断パターン（下段）

表4. MRSA菌株のアミノグリコシド修飾酵素遺伝子とコアグララーゼ遺伝子のプロフィール

遺伝子プロフィール ^{*1}			ABK ^R -MRSA			ABK ^S -MRSA			L21 <i>coa</i> 合計		
<i>aad</i>	<i>aac/aph</i>	<i>aph</i>	33株:	<i>coa</i> 類別 ^{*2} (株数)		51株:	<i>coa</i> 類別 ^{*2} (株数)				
				L21	L31	M22	L21	L31	M22		
1	+	+	0				0				
2	+	+	20 ^{*3} :	15	0	3	20 ^{*4} :	17	0	0	32/40 = 80.0%
3	+	-	0				0				
4	-	+	1				0				
5	+	-	11:	10	1	0	26:	25	1	0	35/37 = 94.6%
6	-	+	0				2 ^{*5} :	0	1	0	
7	-	-	0				0				
8	-	-	1:	1	0	0	3 ^{*6} :	2	0	0	3/4 = 75.0%
合計			33:	26	1	3	51:	44	2	0	70/84 = 83.3%
				(78.8%)				(86.3%)			

*1: *aad*: *aad*(4', 4''), *aac/aph*: *aac*(6')/*aph*(2''), *aph*: *aph*(3')-III. *2: PCR産物サイズ L: 680bp, M: 590bp, S: 510bp. *3: M21およびM31を各1株含む. *4: L16およびS23を1株および2株含む. *5: LL27を1株含む. *6: S15を1株含む.

表5. MRSA菌株におけるアミノグリコシド耐性因子と耐性レベルの分布と関係

保持耐性因子*	アミノグリコシド耐性** (μg/ml)						<i>S. aureus</i> 菌株数		
	GM	SISO	NTL	ISP	AMK	ABK	ABK ^R	ABK ^S	計
<i>aac/aph</i> 単独	6	<3	<3	<3	<3	<3	0	2	2
<i>aad</i> 単独	<3	<3	<3	12~25	12~25	<3	5	11	16
	<3	<3	<3	6	6	<3	1	15	16
	<3	<3	<3	<3	<3	<3	2	0	2
<i>aac/aph</i> + <i>aad</i>	>100	>100	>100	100	>100	25	4	0	4
	>100	>100	>100	12~50	>100	3~12	10	0	10
	>100	>100	12~25	12~25	100	3	2	0	2
	100	50~100	6~12	6~25	25~50	<3	0	12	12
	50	25~50	3~12	6	12	<3	1	6	7
	50	25	3	<3	<3	<3	0	2	2
<i>aac/aph</i> + <i>aph</i>	25	6	3	12	12	<3	0	1	1
	>100	>100	100	12	25	6	1	0	1
	なし	<3	<3	<3	<3	<3	1	2	2
						27	51	78	

* *aac/aph* : *aac*(6')/*aph*(2''), *aad* : *aad*(4',4''), *aph* : *aph*(3')-III. ** GM: gentamicin, SISO: sisomicin, NTL: netilmicin, ISP: isepamicin, AMK: amikacin, ABK: arbekacin.

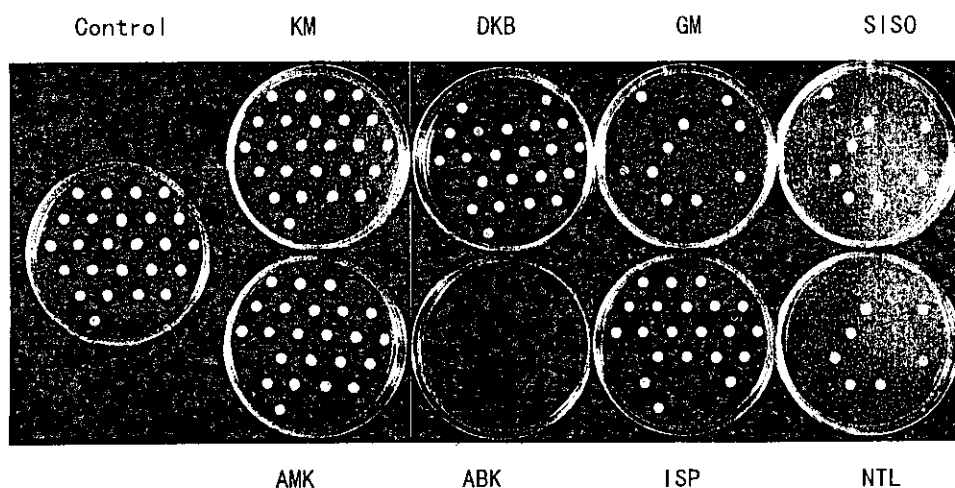


図5. ABK感受性MRSAに対するアミノグリコシド抗生物質の活性

参考文献

- 堀田国元、石川淳、石井亮一、斎藤文子、吉良清子、荒川宜親、池康嘉：アルベカシン耐性MRSAの判定における問題点とPCR検定の必要性と有用性. *Jpn. J. Antibiot.* 52: 525-532 (1999).
- Song, M.D.; M. Wachi, M. Doi, F. Ishino & M. Matsuhashi: Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett.* 221: 167-171 (1987).
- Rouch, D.A.; M.E. Byrne, Y.C. Kong & R.A. Skurray: The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3039-52 (1987).
- Vanhoof, R.; C. Godard, J. Content, H.J. Nyssen & E. Hannecartpokorni: Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. *J. Med. Microbiol.* 41: 282-290 (1994).
- Hookey J.V.; J.F. Richardson, B.D. Cookson: Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1083-1089 (1998).