

Table 3 Putative virulence factors found in GGS_124 and their prevalence in the SDSE isolates based on the results of PCR analyses

| <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> GGS_124 | | | | | Best hit strain | | | PCR analysis | | | | | | | |
|--|---|-------------|-------------|------------|---|---|--------------------|--------------|-----|---------|-----|-----|---------|-----|-----|
| Locus tag | Product name | Length (aa) | LPXTG motif | % Identity | Strain | Product name | Reference sequence | GGS_124 | 168 | GGS_117 | 170 | 164 | GGS_118 | 169 | 163 |
| | fimbrial subunit | | | | <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> | fimbrial subunit | | | | | | | | | |
| SDEG_0157 | Protein | 645 | IPNTG | 40.48 | MGCS10565 | protein | YP_002124169.1 | Yes | x | x | x | x | x | x | x |
| | T-antigen-like fimbrial structural subunit | | | | <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> | T-antigen-like fimbrial structural subunit | | | | | | | | | |
| SDEG_0158 | protein | 315 | IPKTG | 49.84 | MGCS10565 | protein | YP_002124168.1 | Yes | Yes | Yes | x | x | x | x | x |
| SDEG_0180 | hypothetical protein | 184 | | - | No hit | - | - | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| | hypothetical membrane associated protein | | | | <i>Streptococcus pyogenes</i> | hypothetical membrane-associated protein | | | | | | | | | |
| SDEG_0267 | protein | 242 | | 44.35 | MGAS2096 | Protein | YP_601272.1 | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| SDEG_0574 | cell surface serine endopeptidase | 216 | | 49.36 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | CspA | AAN85092.1 | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| | cell wall surface anchor family protein | | | | <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> | cell wall surface anchor family protein | | | | | | | | | |
| SDEG_0805 | anchor family protein | 486 | LPKAG | 43.73 | MGCS10565 | anchor family protein | YP_002123384.1 | Yes | Yes | x | x | Yes | x | x | Yes |
| | histidine triad protein | | | | <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> | histidine triad protein | | | | | | | | | |
| SDEG_0918 | histidine triad protein | 153 | | 51.35 | MGCS10565 | HtpA | YP_002123384.1 | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| | complement inhibitor protein | | | | <i>Streptococcus pyogenes</i> | complement inhibitor protein | | | | | | | | | |
| SDEG_0932 | protein | 226 | | 47.92 | MGAS2096 | protein | YP_601343.1 | Yes | x | x | x | x | Yes | x | x |
| | nisin resistance protein, putative | | | | <i>Streptococcus agalactiae</i> 2603V/R | nisin resistance protein | | | | | | | | | |
| SDEG_0979 | protein, putative | 322 | | 42.17 | <i>Streptococcus agalactiae</i> 2603V/R | Protein | NP_687984.1 | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| | YaeC family probable surface antigen negative regulator | | | | <i>Streptococcus agalactiae</i> 2603V/R | YaeC family probable surface antigen negative regulator | | | | | | | | | |
| SDEG_1327 | YaeC family probable surface antigen negative regulator | 280 | | 49.47 | <i>Streptococcus agalactiae</i> 2603V/R | YaeC family probable surface antigen negative regulator | NP_687791.1 | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| | regulator | | | | <i>Streptococcus suis</i> 98HAH33 | regulator Par | | | | | | | | | |
| SDEG_1429 | regulator | 185 | | 52.22 | 98HAH33 | regulator Par | YP_001200806.1 | Yes | x | Yes | Yes | Yes | Yes | x | Yes |
| | | | | | <i>Streptococcus pyogenes</i> | | | | | | | | | | |

Table 3 Putative virulence factors found in GGS_124 and their prevalence in the SDSE isolates based on the results of PCR analyses (Continued)

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------------------------------------|-----|-------|-------|---|----------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| SDEG_1480 | hypothetical protein | 299 | LPVTG | 33.33 | MGA56180 | hypothetical protein | YP_280631.1 | Yes | x | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| SDEG_1511 | hypothetical protein | 546 | | 27.59 | <i>Streptococcus suis</i> | hypothetical protein | ABQ42885.1 | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| | | | | | <i>Streptococcus uberis</i> | | | | | | | | | | |
| SDEG_1573 | adhesion protein | 661 | LPKTG | 38.8 | UT888 | adhesion protein | ABB52003.1 | Yes | Yes | x | x | x | x | x | Yes |
| SDEG_1601 | hypothetical protein | 249 | | - | No hit | - | - | Yes | x | Yes | x | x | Yes | x | x |
| | | | | | <i>Streptococcus pyogenes</i> | | | | | | | | | | |
| SDEG_1773 | hypothetical protein | 210 | FPSTG | 37.96 | M1 GAS | hypothetical protein | NP_268519.1 | Yes | Yes | Yes | x | x | Yes | Yes | Yes |
| | | | | | <i>Streptococcus sanguinis</i> | | | | | | | | | | |
| SDEG_1969 | hypothetical protein | 234 | | 32.77 | SK36 | hypothetical protein | YP_001035903.1 | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| | protein F2-like fibronectin binding | | | | <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> | fibronectin binding | | | | | | | | | |
| SDEG_1984 | Protein | 528 | LPATG | 40.46 | ATCC 35246 | protein | ABC87919.1 | Yes | x | x | Yes | Yes | x | Yes | Yes |
| SDEG_2022 | hypothetical protein | 106 | | - | No hit | - | - | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| SDEG_2141 | hypothetical protein | 175 | | - | No hit | - | - | Yes | x | x | x | Yes | x | x | Yes |

Genes encoding proteins, which contain predicted signal peptide based on SignalP <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> and the LPXTG motif based on HMMER http://bamics3.cmbi.kun.nl/jos/sortase_substrates/help.html and were not highly homologous to putative virulence factors of GGS_124. Distribution of the putative virulence factors of GGS_124 in the 16 SDSE strains was analyzed by PCR, and the results are presented as SDSE strains in order of decreasing lethality in mice. Yes: PCR analysis positive; x: PCR analysis negative.

(SDEG_0158), encoded in the FCT-6-like region in GGS_124, was detected in the 3 most virulent strains, GGS_124, GGS_168, and GGS_117. In both GGS_168 and GGS_117, the FCT-6-like region was not detected by PCR (data not shown). Interestingly, the SDEG_1601 gene encoding a functionally unknown hypothetical protein was amplified in isolates that cause STSS. However, no virulence factors associated with mouse lethality or Lancefield groups were found.

Relatedness of *emm* type and pathogenicity in SDSE

Particular M (or *emm*) types of GAS have been associated with certain streptococcal diseases [63]. In investigating the pathogenic traits of M4, M12, M1, and M3 GAS clinical isolates in a murine model [64], we found that murine lethality was closely associated with M type. The M1 and M3 types of GAS, which are isolated at high frequency from patients with STSS, showed higher virulence in mice than did M12 and M4. Using this mouse model, we assessed the virulence of the *emm* types of 8 group G SDSE isolates to analyze whether most frequent *emm*-type of isolates in epidemiological studies (see below) are more virulent in mice (Table 1). We found that the lethality in mice of these isolates was not associated with their isolation from patients with STSS or with the frequently isolated *emm*-type in humans such as stG10.0 and stG643.0 (see below). To determine whether the *emm* type of SDSE was associated with pathogenicity in humans, we reviewed the epidemiological data regarding the isolation frequencies of GCS and GGS in relation to their *emm* types [3,6,7,65,66] (Additional file 9). We found that stG10.0 was the most frequent *emm* type in Portugal and Japan, stG643.0 was the most frequent in western Norway, and stG6.0 was the most frequent in the USA. When we calculated the degree of correspondence among the isolation rates of *emm* types in each area using the Kendall tau rank correlation coefficient, we found no significant correlations among all regions (data not shown), suggesting that there is no linkage between *emm* type of SDSE and infectivity in humans or mice.

Discussion

Comparative analysis of *Streptococcus* 16S rRNA sequences had indicated that SDSE was more closely related to GBS than to GAS [67,68]. In contrast, we found that SDSE, which belongs to Lancefield groups C and G [3,65], is more closely related to GAS than to other sequenced streptococci based on genome wide and gene level comparisons

SDSE is known to cause diseases very similar to those caused by GAS, such as pharyngitis, cellulitis, infective arthritis, vertebral osteomyelitis, and STSS [10-16]. This similarity may be due, at least in part, to their

conservation of a large number of genes for virulence factors. Figure 7 shows a summary of putative virulence factors and proposed virulence functions in SDSE. SDSE shares most of the virulence factor genes of GAS, including streptolysin O, streptokinase, FCT-like regions, NADase, and DRS. However, GGS_124 and probably almost all other SDSEs lack SpeB, superantigens except for SpeG, and hyaluronan synthesis *via hasABC* [31]. As *spegg4*, which has about 1% of the mitogenic activity of GAS-derived SpeG, is the only gene encoding a protein homologous to superantigens, and most SDSE isolates do not harbor superantigen-like genes other than *spegg* [31,69], it is highly unlikely that superantigens play a significant role in the pathogenesis of SDSE infection in humans.

Particular M (or *emm*) types of GAS have been associated with certain streptococcal diseases [63]. We therefore analyzed the virulence in a mouse model of several SDSE strains bearing different *emm*-types, but we were unable to find a significant correlation between *emm*-type of SDSE and virulence. Further studies are needed to provide further insight into the linkage between *emm* type of SDSE and infectivity in humans.

Streptococcal phages are considered critical in horizontal gene transfer, especially in the transport of virulence factors [28,70], in *Streptococci*. Three prophage elements in GGS_124 were found to be homologous to GAS prophages in both nucleotide and amino acid sequences. The positions of prophage insertion were also conserved between GGS_124 and previously sequenced GAS prophages, suggesting that SDSE and GAS share the same phage species, and that horizontal gene transfer between SDSE and GAS has occurred. However, GGS_124 does not contain prophages that encode genes for superantigens, Sla, or MF. These phage encoded genes were also missing from all strains previously analyzed by a GAS microarray [31]. Sdn is an exception, since it was detected in 4 of these 58 SDSE strains [31]. These results showed that SDSE may have some resistance to infection by GAS phages carrying genes encoding virulence factors.

Prokaryotes possess the CRISPR/Cas system, which mediates resistance to infection by foreign DNA, such as viruses [26,27]. GGS_124 has a CRISPR/Cas system, designated CRISPR1/Cas, whereas the other SDSE isolates analyzed in this study had another CRISPR/Cas system, designated CRISPR2/Cas. We found that SDSE strains usually have a higher total number of spacers than GAS, suggesting that prophage infection of SDSE was restricted to some extent, resulting in a smaller number of virulence factors located in the prophage regions of SDSE. Similar restrictions were observed in SESZ when compared with SESE. For example, the SESE 4047 genome, which contains no CRISPR, contains genes encoding virulence factors in prophage regions. In contrast, SESZ MGCS10565

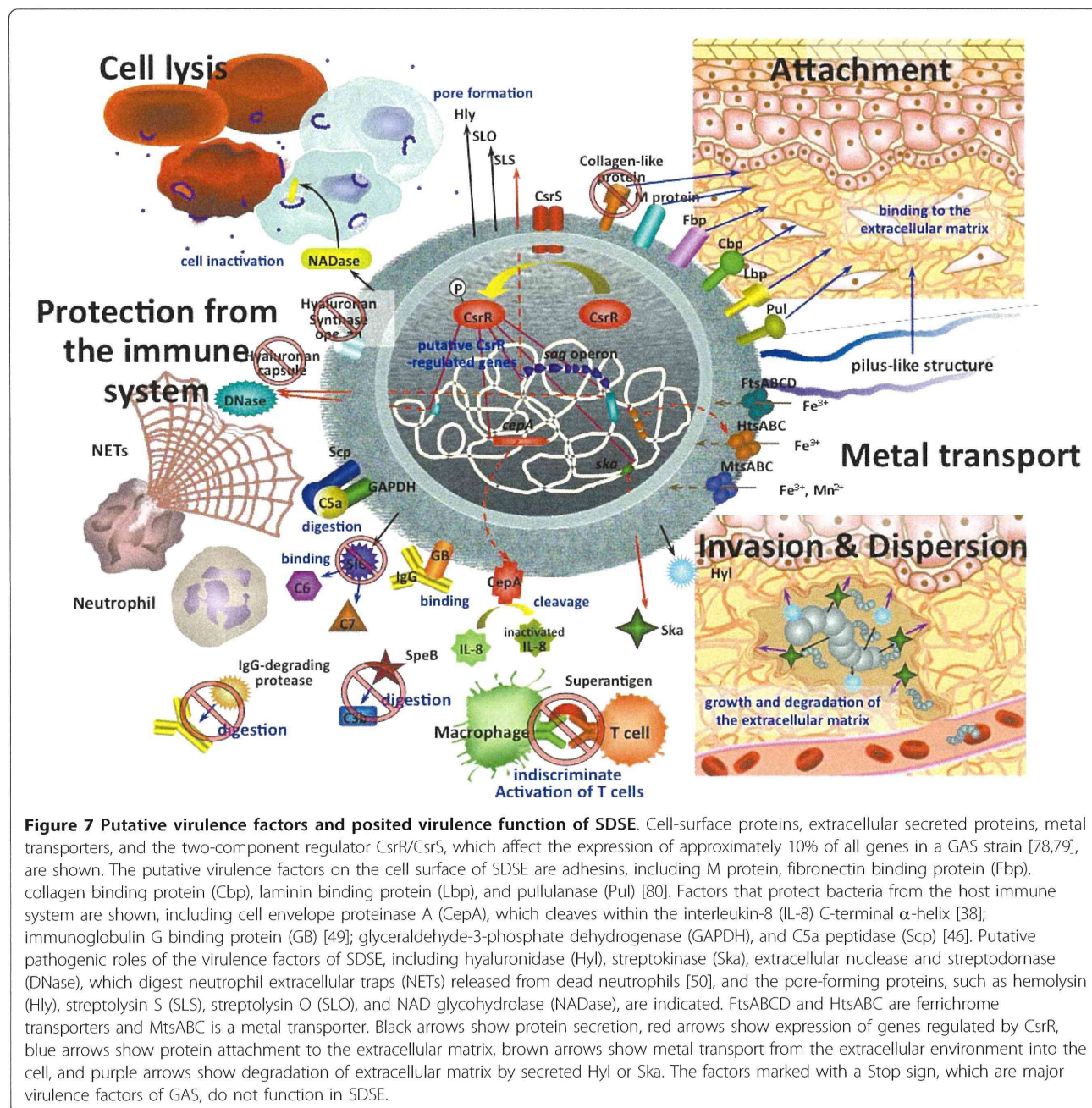


Figure 7 Putative virulence factors and posited virulence function of SDSE. Cell-surface proteins, extracellular secreted proteins, metal transporters, and the two-component regulator CsrR/CsrS, which affect the expression of approximately 10% of all genes in a GAS strain [78,79], are shown. The putative virulence factors on the cell surface of SDSE are adhesins, including M protein, fibronectin binding protein (Fbp), collagen binding protein (Cbp), laminin binding protein (Lbp), and pullulanase (Pul) [80]. Factors that protect bacteria from the host immune system are shown, including cell envelope proteinase A (CepA), which cleaves within the interleukin-8 (IL-8) C-terminal α -helix [38]; immunoglobulin G binding protein (GB) [49]; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and C5a peptidase (Scp) [46]. Putative pathogenic roles of the virulence factors of SDSE, including hyaluronidase (Hly), streptokinase (Ska), extracellular nuclease and streptodornase (DNase), which digest neutrophil extracellular traps (NETs) released from dead neutrophils [50], and the pore-forming proteins, such as hemolysin (Hly), streptolysin S (SLS), streptolysin O (SLO), and NAD glycohydrolase (NADase), are indicated. FtsABCD and HtsABC are ferrichrome transporters and MtsABC is a metal transporter. Black arrows show protein secretion, red arrows show expression of genes regulated by CsrR, blue arrows show protein attachment to the extracellular matrix, brown arrows show metal transport from the extracellular environment into the cell, and purple arrows show degradation of extracellular matrix by secreted Hyl or Ska. The factors marked with a Stop sign, which are major virulence factors of GAS, do not function in SDSE.

and H70, which contain 26 and 18 spacers, respectively, do not carry any prophages. Thus, the CRISPR system in streptococci sharing prophages may play a substantial role in the spread of virulence factors among species. Alternatively, these virulence factors may not benefit to SDSE during carriage or disease, such that the integration of these specific phages is not selected for.

Conclusions

We have shown here that SDSE likely acts as a pathogen, based on its genome sequence and close relationship with

GAS. As the frequency of isolation of SDSE from patients has increased, it should not be overlooked as a source of infection.

Methods

Bacterial strains

Three *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) isolates, GGS_124, GGS_117, and GGS_118, were obtained from 3 patients with STSS, and 5 SDSE isolates were isolated from 5 patients with non-STSS (Table 1). All SDSE isolates were classified as Lancefield

group *G. Streptococcus pyogenes* (GAS). NIH9 [71] was used as the SpeB-producing strain.

emm typing

The *emm* types were classified according to a protocol for *emm* typing of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocol_emm-type.htm.

SDSE infection in mice

All animal experiments were performed according to the guidelines of the Ethics Review Committees of Animal Experiments of Tokyo Women's Medical University and the National Center for Global Health and Medicine. Virulence in mice was determined as described [64]. Briefly, LD₅₀ values were determined by intraperitoneal (*i.p.*) injection of each SDSE strain into 5-6-7 week old female ddY mice.

Genome sequencing

We obtained draft contig data of GGS_124 from a commercial service (454 Life Sciences, Branford, CT), and the gaps between the contigs were tiled by PCR after closure to validate assembly using specific primers or by primer walking and an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). The percentage of QV40+ bases, an index of the quality of data from pyro-sequencing, was 99.87%. The genome sequence of GGS_124 has been deposited in the DDBJ database (accession no. AP010935).

Genome annotation and bioinformatics

Transfer RNAs (tRNAs), transfer-messenger RNA (tmRNA), and rRNA sequences were predicted using ARAGORN [72]. Coding sequences (CDS) were predicted using *in silico* Molecular Cloning (In Silico Biology Inc., Yokohama City, Kanagawa, Japan) for selection of optimal start sites. Predicted genes and intergenic regions were compared using the NCBI sequence database <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, and predicted CDS and start sites were adjusted accordingly. A genome-wide homology search was performed using the discontinuous megaBLAST algorithm <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> with a word size of 11 and rewards and penalties (2, -3) that optimize for alignments of about 85% identity. The phylogenetic tree of all sequenced *Streptococcus* species was constructed based on CVTree <http://tlife.fudan.edu.cn/cvtree/>[73]. Secretion signal peptides were predicted using SignalP <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>[74]. Sortases and cell wall sorting signals were predicted with available hidden Markov models using HMMER http://bamics3.cmbi.kun.nl/jos/sortase_substrates/help.html[75]. Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat

(CRISPR) spacers were detected using CRISPR Finder <http://crispr.u-psud.fr/>[76]. The phylogenetic tree of all sequenced *Streptococcus* was constructed based on the CVTree <http://tlife.fudan.edu.cn/cvtree/>[73]

Detection and sequencing of CRISPRs and CRISPR-associated protein (Cas) genes in the 8 SDSE strains

CRISPRs and Cas genes in the SDSE strains were detected by conventional PCR using ExTaq (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) and the primers listed in Additional file 10. Template DNA was isolated as described [64]. The PCR cycling conditions were 94°C for 2 min followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 54°C for 30 s, and 72°C for 4 min, and a final extension at 72°C for 6 min. The amplified CRISPR fragments were sequenced using an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems Inc.). The CRISPR spacers were identified using CRISPR Finder <http://crispr.u-psud.fr/>[76]. The sequences of CRISPR and the spacers have been deposited in the DDBJ database (accession numbers are listed in Table 2).

Determination of SpeB-like protease activity

SpeB-like protease activity was assayed as described [77], with slight modifications. Briefly, DTT was added to bacterial culture supernatants to a final concentration of 10 mM and incubated at 37°C for 30 min. An equal amount of 2 g/L azocasein was added, and incubation was continued for an additional 30 min at 37°C. Trichloroacetic acid was added to a final concentration of 5%, and incubation was continued for 15 min at 4°C. After centrifugation, an equal amount of 5 M NaOH was added to the supernatant, and its absorbance at 450 nm was measured.

Distribution of putative virulence factors unique to GGS_124 among the other SDSE

The distribution of putative virulence factors of GGS_124 among SDSE strains was analyzed by conventional PCR using ExTaq (Takara Bio Inc.) and the primers listed in Additional file 10. Template DNA extraction and PCR were performed as described [64].

Additional material

Additional file 1: Overview and comparison of the genome sequences of GGS_124 and genus *Streptococcus* available in databases as of January 2010.

Additional file 2: Unrooted phylogenetic tree of genus *Streptococcus*, including *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* GGS_124. The phylogenetic tree of all sequenced *Streptococcus* was constructed based on CVTree <http://tlife.fudan.edu.cn/cvtree/>[73], which constructs whole genome based phylogenetic trees without sequence alignment by using a Composition Vector (CV) approach. The genetic distances between the major nodes are shown.

Additional file 3: Genome rearrangement map of SDSE strain GGS_124 relative to GAS strains MGAS315 and strain SSI-1, and *S. uberis* 0140J. The genes were aligned from the predicted replication

origin of each genome. The colored bars separating each genome represent similarity matches identified by *in silico* molecular cloning. BLASTP comparisons of CDS with GAS MGAS315 and SSI-1 and *S. uberis* 0140J are shown as amino acid identities of $\geq 90\%$ (red), 89%-80% (orange), 79%-70% (yellow), 69%-60% (green), 59%-50% (light blue), and 49%-40% (dark blue). Prophages are highlighted as green boxes.

Additional file 4: GGS_124 genes showing higher similarity to genes from bacteria other than GAS, or no similarity to genes in the databases

Additional file 5: Features of CRISPR found in the GGS_124 genome and phages derived from GAS containing sequences homologous to GGS_124 spacers

Additional file 6: Putative virulence factors found in GGS_124 and their homologous genes in other streptococcal species

Additional file 7: Determination of SpeB-like protease activity in the SDSE isolates. SDSE (GGS_124 and GGS_118) and GAS (NIH9) were cultured in BHI in the presence or absence of E-64, and the culture supernatants were analyzed for protease activity using azocasein as a substrate. The background activity of BHI is also shown.

Additional file 8: Distribution of the virulence factors found in SDSE among other streptococci

Additional file 9: Comparison of emm-type of GCS and GGS isolates from humans reported from 4 countries. Shown are emm-specific differences of SDSE in invasive and noninvasive infections from 1998 to 2004 in Portugal [65], the emm types of 128 strains of SDSE collected from 11 medical institutions in Japan from September 2003 to October 2005 [7], the emm types of 64 GCS and GGS isolates associated with noninvasive disease in western Norway from February 2005 to March 2006 [66], and the emm types of 212 invasive SDSE isolates collected in Atlanta, Georgia, from July 2002 to June 2004 and in the San Francisco Bay Area of California from January 2003 to December 2004 in the USA [3]. Each stack was ordered from higher (top) to lower isolation frequency (bottom).

Additional file 10: List of oligonucleotide primers used in this study.

Acknowledgements

The authors thank Mr. Hanasaki and Mr. Shimada for assisting in gap filling of the GGS_124 genome and animal experiments. This work was partly supported by a grant for Research on Emerging and Reemerging Infectious Diseases (H19 Shinkouh-02). T. M. A was supported by International Cooperation Research Grant (21A129) from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

Author details

¹Department of Infectious Diseases, National Center for Global Health and Medicine, 1-21-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan. ²Graduate School of Infection Control Science, Kitasato University, 5-9-1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan. ³Department of Microbiology and Immunology, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan. ⁴Department of Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, 2-11 Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan.

Authors' contributions

YS and TMA performed the molecular genetic studies, participated in sequence alignment and drafted the manuscript. KO performed the molecular genetic studies and participated in sequence alignment. SYM and KU analyzed the genome sequences. JY, YS and TMA performed animal experiments. TK drafted the manuscript. UK, JY and TK conceived of the study, participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 7 June 2010 Accepted: 11 January 2011
Published: 11 January 2011

References

1. Lindbaek M, Hoiby EA, Lermak G, Steinholt IM, Hjortdahl P: **Clinical symptoms and signs in sore throat patients with large colony variant beta-haemolytic streptococci groups C or G versus group A.** *Br J Gen Pract* 2005, **55**:615-619.
2. Bramhachari PV, Kaul SY, McMillan DJ, Shaila MS, Karmarkar MG, Sriprakash KS: **Disease burden due to Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis (group G and C streptococcus) is higher than that due to Streptococcus pyogenes among Mumbai school children.** *J Med Microbiol* 2010, **59**:220-223.
3. Broyles LN, Van Beneden C, Beall B, Facklam R, Shewmaker PL, Malpiedi P, Daily P, Reingold A, Farley MM: **Population-based study of invasive disease due to beta-hemolytic streptococci of groups other than A and B.** *Clin Infect Dis* 2009, **48**:706-712.
4. Ekelund K, Skinhoj P, Madsen J, Konradsen HB: **Invasive group A, B, C and G streptococcal infections in Denmark 1999-2002: epidemiological and clinical aspects.** *Clin Microbiol Infect* 2005, **11**:569-576.
5. Lopardo HA, Vidal P, Sparo M, Jeric P, Centron D, Facklam RR, Paganini H, Pagniez NG, Lovgren M, Beall B: **Six-month multicenter study on invasive infections due to Streptococcus pyogenes and Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis in Argentina.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:802-807.
6. Sunaoshi K, Murayama SY, Adachi K, Yagoshi M, Okuzumi K, Chiba N, Morozumi M, Ubukata K: **Molecular emm genotyping and antibiotic susceptibility of Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis isolated from invasive and non-invasive infections.** *J Med Microbiol* 2010, **59**:82-88.
7. Sunaoshi KS, Aburahashi H, Kobayashi R, Yamamoto Y, Okuzumi K, Yoshida A, Misawa Y, Adachi K, Ubukata K: **Emm typing by genetic identification of Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis and susceptibility to oral antibiotics.** *Kansenshogaku Zasshi* 2006, **80**:488-495.
8. Takahashi T, Ubukata K, Watanabe H: **Invasive infection caused by Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis: characteristics of strains and clinical features.** *J Infect Chemother* 2010.
9. Reissmann S, Friedrichs C, Rajkumari R, Itzek A, Fulde M, Rodloff AC, Brahmadathan KN, Chhatwal GS, Nitsche-Schmitz DP: **Contribution of Streptococcus anginosus to infections caused by groups C and G streptococci, southern India.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:656-663.
10. Dawson ED, Taylor AW, Smagala JA, Rowlen KL: **Molecular detection of Streptococcus pyogenes and Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis.** *Mol Biotechnol* 2009, **42**:117-127.
11. Hilmarsdottir I, Valsdottir F: **Molecular typing of Beta-hemolytic streptococci from two patients with lower-limb cellulitis: identical isolates from toe web and blood specimens.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**:3131-3132.
12. Horii T, Izumida S, Takeuchi K, Tada T, Ishikawa J, Tsuboi K: **Acute peritonitis and salpingitis associated with streptococcal toxic shock syndrome caused by Lancefield group G alpha-haemolytic Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis.** *J Med Microbiol* 2006, **55**:953-956.
13. Kumar A, Sandoe J, Kumar N: **Three cases of vertebral osteomyelitis caused by Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis.** *J Med Microbiol* 2005, **54**:1103-1105.
14. Misawa Y, Okugawa S, Ubukata K, Okuzumi K, Okada M, Moriya K, Koike K: **A case of severe necrotizing cellulitis caused by group G Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis.** *Kansenshogaku Zasshi* 2006, **80**:436-439.
15. Moser C, Andresen K, Kjerulf A, Salamon S, Kemp M, Christensen JJ: **Infective Arthritis: Bacterial 23S rRNA Gene Sequencing as a Supplementary Diagnostic Method.** *Open Microbiol J* 2008, **2**:85-88.
16. Savini V, Catavittello C, Talia M, Manna A, Pompetti F, Di Bonaventura G, Di Giuseppe N, Febbo F, Balbinot A, Di Zaccaro S, Esattore F, D'Antonio D: **Beta-lactam failure in treatment of two group G Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis Pharyngitis patients.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**:814-816.
17. Mott ML, Berger JM: **DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria.** *Nat Rev Microbiol* 2007, **5**:343-354.
18. Nakagawa I, Kurokawa K, Yamashita A, Nakata M, Tomiyasu Y, Okahashi N, Kawabata S, Yamazaki K, Shiba T, Yasunaga T, Hayashi H, Hattori M, Hamada S: **Genome sequence of an M3 strain of Streptococcus pyogenes reveals a large-scale genomic rearrangement in invasive**

- strains and new insights into phage evolution. *Genome Res* 2003, 13:1042-1055.
19. Holden MT, Scott A, Cherevach I, Chillingworth T, Churcher C, Cronin A, Dowd L, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Moule S, Mungall K, Quail MA, Price C, Rabinowitsch E, Sharp S, Skelton J, Whitehead S, Barrell BG, Kehoe M, Parkhill J: **Complete genome of acute rheumatic fever-associated serotype M5 Streptococcus pyogenes strain manfredo.** *J Bacteriol* 2007, 189:1473-1477.
 20. McShan WM, Ferretti JJ, Karasawa T, Suvorov AN, Lin S, Qin B, Jia H, Kenton S, Najaf F, Wu H, Scott J, Roe BA, Savić DJ: **Genome sequence of a nephritogenic and highly transformable M49 strain of Streptococcus pyogenes.** *J Bacteriol* 2008, 190:7773-7785.
 21. Banks DJ, Porcella SF, Barbican KD, Beres SB, Phillips LE, Voyich JM, DeLeo FR, Martin JM, Somerville GA, Musser JM: **Progress toward characterization of the group A Streptococcus metagenome: complete genome sequence of a macrolide-resistant serotype M6 strain.** *J Infect Dis* 2004, 190:727-738.
 22. Beres SB, Sesso R, Pinto SW, Hoe NP, Porcella SF, DeLeo FR, Musser JM: **Genome sequence of a Lancefield group C Streptococcus zoonotic strain causing epidemic nephritis: new information about an old disease.** *PLoS One* 2008, 3:e3026.
 23. Sumbly P, Porcella SF, Madrigal AG, Barbican KD, Virtaneva K, Ricklefs SM, Sturdevant DE, Graham MR, Vuopio-Varkila J, Hoe NP, Musser JM: **Evolutionary origin and emergence of a highly successful clone of serotype M1 group A Streptococcus involved multiple horizontal gene transfer events.** *J Infect Dis* 2005, 192:771-782.
 24. Green NM, Zhang S, Porcella SF, Nagiec MJ, Barbican KD, Beres SB, LeFebvre RB, Musser JM: **Genome sequence of a serotype M28 strain of group A streptococcus: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity.** *J Infect Dis* 2005, 192:760-770.
 25. Smoot JC, Barbican KD, Van Gompel JJ, Smoot LM, Chaussee MS, Sylva GL, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Porcella SF, Parkins LD, Beres SB, Campbell DS, Smith TM, Zhang Q, Kapur V, Daly JA, Veasy LG, Musser JM: **Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A Streptococcus strains associated with acute rheumatic fever outbreaks.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:4668-4673.
 26. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J: **Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes.** *Science* 2008, 321:960-964.
 27. Marraffini LA, Sontheimer EJ: **CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA.** *Science* 2008, 322:1843-1845.
 28. Holden MT, Heather Z, Paillet R, Steward KF, Webb K, Ainslie F, Jourdan T, Bason NC, Holroyd NE, Mungall K, Quail MA, Sanders M, Simmonds M, Willey D, Brooks K, Aanensen DM, Spratt BG, Jolley KA, Maiden MC, Kehoe M, Chanter N, Bentley SD, Robinson C, Maskell DJ, Parkhill J, Waller AS: **Genomic evidence for the evolution of Streptococcus equi: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens.** *PLoS Pathog* 2009, 5:e1000346.
 29. van der Ploeg JR: **Analysis of CRISPR in Streptococcus mutans suggests frequent occurrence of acquired immunity against infection by M102-like bacteriophages.** *Microbiology* 2009, 155:1966-1976.
 30. Horvath P, Barrangou R: **CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea.** *Science* 2010, 327:167-170.
 31. Davies MR, McMillan DJ, Beiko RG, Barroso V, Geffers R, Sriprakash KS, Chhatwal GS: **Virulence profiling of Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis isolated from infected humans reveals 2 distinct genetic lineages that do not segregate with their phenotypes or propensity to cause diseases.** *Clin Infect Dis* 2007, 44:1442-1454.
 32. McMillan DJ, Vu T, Bramhachari PV, Kaul SY, Bouvet A, Shaila MS, Karmarkar MG, Sriprakash KS: **Molecular markers for discriminating Streptococcus pyogenes and S. dysgalactiae subspecies equisimilis.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010, 29:585-589.
 33. Betschel SD, Borgia SM, Barg NL, Low DE, De Azavedo JC: **Reduced virulence of group A streptococcal Tn916 mutants that do not produce streptolysin S.** *Infect Immun* 1998, 66:1671-1679.
 34. Flanagan J, Collin N, Timoney J, Mitchell T, Mumford JA, Chanter N: **Characterization of the haemolytic activity of Streptococcus equi.** *Microb Pathog* 1998, 24:211-221.
 35. Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T: **Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus.** *Science* 2004, 306:1037-1040.
 36. Zhao J, Hayashi T, Saarinen S, Papageorgiou AC, Kato H, Imanishi K, Kirikae T, Abe R, Uchiyama T, Miyoshi-Akiyama T: **Cloning, expression, and characterization of the superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin G from Streptococcus dysgalactiae.** *Infect Immun* 2007, 75:1721-1729.
 37. Kamezawa Y, Nakahara T, Nakano S, Abe Y, Nozaki-Renard J, Isono T: **Streptococcal mitogenic exotoxin Z, a novel acidic superantigenic toxin produced by a T1 strain of Streptococcus pyogenes.** *Infect Immun* 1997, 65:3828-3833.
 38. Edwards RJ, Taylor GW, Ferguson M, Murray S, Rendell N, Wrigley A, Bai Z, Boyle J, Finney SJ, Jones A, Russell HH, Turner C, Cohen J, Faulkner L, Sriskandan S: **Specific C-terminal cleavage and inactivation of interleukin-8 by invasive disease isolates of Streptococcus pyogenes.** *J Infect Dis* 2005, 192:783-790.
 39. Nishifuji K, Sugai M, Amagai M: **Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals.** *J Dermatol Sci* 2008, 49:21-31.
 40. Lahteenmaki K, Kuusela P, Korhonen TK: **Bacterial plasminogen activators and receptors.** *FEMS Microbiol Rev* 2001, 25:531-552.
 41. Chaussee MS, Gerlach D, Yu CE, Ferretti JJ: **Inactivation of the streptococcal erythrogenic toxin B gene (speB) in Streptococcus pyogenes.** *Infect Immun* 1993, 61:3719-3723.
 42. Falugi F, Zingaretti C, Pinto V, Mariani M, Amodeo L, Manetti AG, Capo S, Musser JM, Orefici G, Margarit I, Telford JL, Grandi G, Mora M: **Sequence variation in group A Streptococcus pili and association of pilus backbone types with lancefield T serotypes.** *J Infect Dis* 2008, 198:1834-1841.
 43. Mora M, Bensi G, Capo S, Falugi F, Zingaretti C, Manetti AG, Maggi T, Taddei AR, Grandi G, Telford JL: **Group A Streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:15641-15646.
 44. Lauer P, Rinaudo CD, Soriani M, Margarit I, Maione D, Rosini R, Taddei AR, Mora M, Rappuoli R, Grandi G, Telford JL: **Genome analysis reveals pili in Group B Streptococcus.** *Science* 2005, 309:105.
 45. Bjorck L, Kronvall G: **Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent.** *J Immunol* 1984, 133:969-974.
 46. Terao Y, Yamaguchi M, Hamada S, Kawabata S: **Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Streptococcus pyogenes is essential for evasion from neutrophils.** *J Biol Chem* 2006, 281:14215-14223.
 47. Stollerman GH, Dale JB: **The importance of the group A streptococcus capsule in the pathogenesis of human infections: a historical perspective.** *Clin Infect Dis* 2008, 46:1038-1045.
 48. Kumari K, Weigel PH: **Molecular cloning, expression, and characterization of the authentic hyaluronan synthase from group C Streptococcus equisimilis.** *J Biol Chem* 1997, 272:32539-32546.
 49. Starr CR, Engleberg NC: **Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A streptococcus.** *Infect Immun* 2006, 74:40-48.
 50. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, Feramisco J, Nizet V: **DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps.** *Curr Biol* 2006, 16:396-400.
 51. Beiter K, Wartha F, Albigler B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B: **An endonuclease allows Streptococcus pneumoniae to escape from neutrophil extracellular traps.** *Curr Biol* 2006, 16:401-407.
 52. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: **Neutrophil extracellular traps kill bacteria.** *Science* 2004, 303:1532-1535.
 53. Hasegawa T, Minami M, Okamoto A, Tatsuno I, Isaka M, Ohta M: **Characterization of a virulence-associated and cell-wall-located DNase of Streptococcus pyogenes.** *Microbiology* 2010, 156:184-190.
 54. Nitsche DP, Johansson HM, Frick IM, Morgelin M: **Streptococcal protein FOG, a novel matrix adhesion interacting with collagen I in vivo.** *J Biol Chem* 2006, 281:1670-1679.
 55. Barroso V, Rohde M, Davies MR, Gillen CM, Nitsche-Schmitz DP, Dinkla K, Chhatwal GS: **Identification of active variants of PARF in human pathogenic group C and group G streptococci leads to an amended description of its consensus motif.** *Int J Med Microbiol* 2009, 299:547-553.
 56. Binks M, Sriprakash KS: **Characterization of a complement-binding protein, DRS, from strains of Streptococcus pyogenes containing the emm12 and emm55 genes.** *Infect Immun* 2004, 72:3981-3986.

57. Sagar V, Kumar R, Ganguly NK, Menon T, Chakraborti A: **DRS is far less divergent than streptococcal inhibitor of complement of group A streptococcus.** *J Bacteriol* 2007, **189**:2933-2935.
58. Fernie-King BA, Seilly DJ, Davies A, Lachmann PJ: **Streptococcal inhibitor of complement inhibits two Additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme.** *Infect Immun* 2002, **70**:4908-4916.
59. Hartas J, Sriprakash KS: **Streptococcus pyogenes strains containing emm12 and emm55 possess a novel gene coding for distantly related SIC protein.** *Microb Pathog* 1999, **26**:25-33.
60. Caswell CC, Barczyk M, Keene DR, Lukomska E, Gullberg DE, Lukomski S: **Identification of the first prokaryotic collagen sequence motif that mediates binding to human collagen receptors, integrins alpha2beta1 and alpha11beta1.** *J Biol Chem* 2008, **283**:36168-36175.
61. Kimoto H, Fujii Y, Yokota Y, Taketo A: **Molecular characterization of NADase-streptolysin O operon of hemolytic streptococci.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1681**:134-149.
62. Madden JC, Ruiz N, Caparon M: **Cytolysin-mediated translocation (CMT): a functional equivalent of type III secretion in gram-positive bacteria.** *Cell* 2001, **104**:143-152.
63. Cunningham MW: **Pathogenesis of group A streptococcal infections.** *Clin Microbiol Rev* 2000, **13**:470-511.
64. Miyoshi-Akiyama T, Zhao J, Kikuchi K, Kato H, Suzuki R, Endoh M, Uchiyama T: **Quantitative and qualitative comparison of virulence traits, including murine lethality, among different M types of group A streptococci.** *J Infect Dis* 2003, **187**:1876-1887.
65. Pinho MD, Melo-Cristino J, Ramirez M: **Clonal relationships between invasive and noninvasive Lancefield group C and G streptococci and emm-specific differences in invasiveness.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:841-846.
66. Kittang BR, Langeland N, Mylvaganam H: **Distribution of emm types and subtypes among noninvasive group A, C and G streptococcal isolates in western Norway.** *APMIS* 2008, **116**:457-464.
67. Bentley RW, Leigh JA, Collins MD: **Intragenomic structure of Streptococcus based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences.** *Int J Syst Bacteriol* 1991, **41**:487-494.
68. Chatellier S, Harel J, Zhang Y, Gottschalk M, Higgins R, Devriese LA, Brousseau R: **Phylogenetic diversity of Streptococcus suis strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison.** *Int J Syst Bacteriol* 1998, **48 Pt 2**: 581-589.
69. Sachse S, Seidel P, Gerlach D, Gunther E, Rodel J, Straube E, Schmidt KH: **Superantigen-like gene(s) in human pathogenic Streptococcus dysgalactiae, subsp. equisimilis: genomic localisation of the gene encoding streptococcal pyrogenic exotoxin G (speG(dys)).** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002, **34**:159-167.
70. Ikebe T, Wada A, Inagaki Y, Sugama K, Suzuki R, Tanaka D, Tamaru A, Fujinaga Y, Abe Y, Shimizu Y, Watanabe H: **Dissemination of the phage-associated novel superantigen gene speL in recent invasive and noninvasive Streptococcus pyogenes M3/T3 isolates in Japan.** *Infect Immun* 2002, **70**:3227-3233.
71. Miyoshi-Akiyama T, Ikebe T, Watanabe H, Uchiyama T, Kirikae T, Kawamura Y: **Use of DNA arrays to identify a mutation in the negative regulator, csrR, responsible for the high virulence of a naturally occurring type M3 group A streptococcus clinical isolate.** *J Infect Dis* 2006, **193**:1677-1684.
72. Laslett D, Canback B: **ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:11-16.
73. Xu Z, Hao B: **CVTree update: a newly designed phylogenetic study platform using composition vectors and whole genomes.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:W174-8.
74. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S: **Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0.** *J Mol Biol* 2004, **340**:783-795.
75. Boekhorst J, de Been MW, Kleerebezem M, Siezen RJ: **Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPxTG-like sorting motifs.** *J Bacteriol* 2005, **187**:4928-4934.
76. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C: **CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:W52-7.
77. Kuo CF, Wu JJ, Lin KY, Tsai PJ, Lee SC, Jin YT, Lei HY, Lin YS: **Role of streptococcal pyrogenic exotoxin B in the mouse model of group A streptococcal infection.** *Infect Immun* 1998, **66**:3931-3935.
78. Gryllos I, Grifantini R, Colaprico A, Jiang S, Deforce E, Hakansson A, Telford JL, Grandi G, Wessels MR: **Mg(2+) signalling defines the group A streptococcal CsrRS (CovRS) regulon.** *Mol Microbiol* 2007, **65**:671-683.
79. Graham MR, Virtaneva K, Porcella SF, Gardner DJ, Long RD, Welty DM, Barry WT, Johnson CA, Parkins LD, Wright FA, Musser JM: **Analysis of the transcriptome of group A Streptococcus in mouse soft tissue infection.** *Am J Pathol* 2006, **169**:927-942.
80. Hytonen J, Haataja S, Finne J: **Streptococcus pyogenes glycoprotein-binding streptadhesin activity is mediated by a surface-associated carbohydrate-degrading enzyme, pullulanase.** *Infect Immun* 2003, **71**:784-793.

doi:10.1186/1471-2164-12-17

Cite this article as: Shimomura *et al.*: Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). *BMC Genomics* 2011 **12**:17.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対する
サーベイランスの構築と病因解析,
その診断治療に関する研究
(H22-新興-一般-013)

速報

平成22年度:分子疫学解析

研究代表者 **生方 公子**

平成23年(2011) 5月

関係各位

H22年度(2010年4月)、厚生労働省「新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業」のあらたな研究課題として、「**重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対するサーベイランスの構築と病因解析、その診断・治療に関する研究：H22-新興一般-013**」が採択されました。

当該事業におけるサーベイランスでは、我が国における侵襲性感染症由来肺炎球菌や溶血性レンサ球菌がどのように変化しつつあるのか、分子レベルでの疫学解析を行い、その変化を2006-2007年の成績と比較するとともに、世界のそれとも比較することにしました。

このような目的に沿い、全国の医療機関に勤務する多くの検査技師の皆様にご協力をお願いいたしました。幸いにも230施設以上の方々から快くご協力下さり、2010年5月から2011年1月までの9ヶ月間に、1,000株に上る菌株の送付をいただきました。

この他に、私どもは「**化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究**」も10年以上続けていますが、それらも含めた地道なエビデンスの積み重ねが、**莢膜b型インフルエンザ菌(Hib)ワクチン**や**小児用7価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV7)**の認可へ大きく貢献したものと自負しています。

ここに皆様方の日頃のご協力に心より感謝申し上げます。

今回のサーベイランスにおきましては、菌株をお送りいただきましても諸般の事情でそれぞれの施設へきめ細かいご報告が不可能でした。疫学解析としては、正確な薬剤感受性の測定と世界の菌株との比較のために、**Multilocus Sequence Typing (MLST)**が必要ですが、結果を得るにはまだ数ヶ月を要します。そこで、まずは疫学情報のみを速報としてまとめ、皆様方の日常業務あるいは臨床の先生方への説明にお役立ていただければと考えました。正式な報告書は数ヶ月先を目途にあらためてお送りしたいと考えています。

また、下記の理由で今後とも菌株の収集と解析を継続・実施しなければならなくなりましたが、これも本事業を当局が認めてくださった結果と考えております。

皆様には引き続きご協力賜りますようお願い申し上げます。

2011年5月10日

北里大学北里生命科学研究所
生 方

サーベイランスを継続する理由

御承知のことと存じますが、H23年2月14日付にて、厚生労働省健康局結核感染症課より各都道府県衛生主管部(局)を通じ、入院医療機関等に“**細菌性髄膜炎患者等の発生動向の把握**”に対するご協力の依頼文書が届いているかと存じます。

国立感染症研究所の岡部 信彦先生(化膿性髄膜炎発生状況データベース、Hib菌の解析は当研究室)と、肺炎球菌・溶血性レンサ球菌の解析は私が担当することになっています。サーベイランスの主たる目的は、ワクチン導入後にどのように菌が変化していくのか、あるいはワクチン接種の効果を全国レベルで把握することに主眼がおかれています。

1. 肺炎球菌

§ 目的

1980年代から欧米において問題化した耐性肺炎球菌感染症が本邦において注目され始めたのは、1990年代の半ば以降です。呼吸器感染症の原因菌として最も重要な肺炎球菌において明らかな耐性菌が出現し問題となったのは、先ず免疫学的に未成熟な小児における化膿性髄膜炎や肺炎、あるいは難治性急性中耳炎で、治療をする上で多くの問題が提起されました。それに対し、当時は成人の肺炎球菌性重症感染症はそれほど注目されませんでした。

しかし、我が国における急速な高齢化社会の到来(図-1と図-2参照)により、60歳以上の年齢層における肺炎球菌やレンサ球菌による重症感染症が増加しました。このことに着目し、先の1期目の研究事業(2006年～2009年)において、我が国では初めての「全国規模のサーベイランス」を実施しました。496例とその分離株の詳細な解析を行い、侵襲性肺炎球菌感染症(Invasive Pneumococcal Diseases: IPD)の実態を明らかにしました。その中で、IPDは小児のみならず、i) 基礎疾患を有する成人において極めて重要であること、ii) むしろ成人例において予後不良例が有意に多く、発症数日で死亡されていること、iii) 血液検査値でも特徴のあること、iv) 小児と成人由来株では耐性率が異なること、v) そしてワクチン接種の基盤となる莢膜型も異なることを明らかにしました。

2期目にあたるH22年度(2010年4月～2011年3月)においては、肺炎球菌感染症がどのように変貌しつつあるのか、菌側と宿主側から解析することにしました。そのなかから、先ず疫学成績について簡単に記載します。

藤谷浩介：デフレの正体経済は人口の波で動く(角川書店)2010(改変)

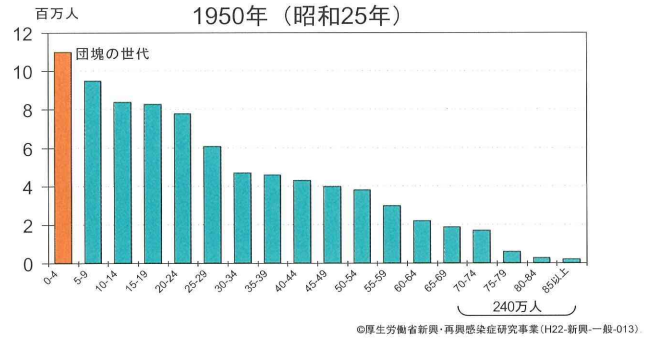


図-1 日本の人口動態：超高齢化社会の現実

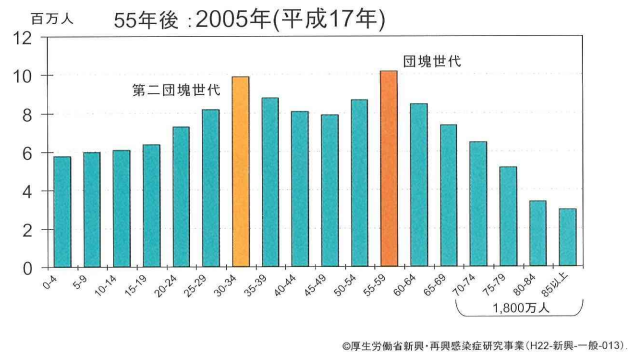


図-2 日本の人口動態：超高齢化社会の現実

§ 収集菌株と解析項目

対象とした菌株は、解析の都合上2010年5月から2011年1月までの9ヶ月間となっています。全国232医療機関の細菌検査室から、肺炎球菌と溶血性レンサ球菌の計1,000株の送付を受けました。

そのうち肺炎球菌は467株、小児由来が252株、成人由来が214株、年齢不詳が1株でした。これらの菌株はすべて平素無菌的な検査材料、すなわち髄液、血液、胸水、関節液、閉鎖性膿汁などから分離されたものです。

菌の病原性と密接に関連し、またワクチンカバー率の変化をみる上でも重要な莢膜型は、Statens Serum Institute(デンマーク)より購入した抗血清を

用い、莢膜膨化の有無を顕微鏡下で観察し判定しています。

薬剤耐性遺伝子の有無は Real-time PCR 法によって *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* 遺伝子, ならびにマクロライド系薬耐性に関わる *mefA* と *ermB* 遺伝子の解析を行っています。

§ 結果

1. 発症例の年齢分布

発症例の年齢分布は、**図-3**に1期目(2006~2007年:2006と略)、**図-4**に今回の2期目(2010~2011年:2010と略)の成績を示します。

1期目は1年間で496例でしたが、今回は9ヶ月で467例となっています。参加施設が232と若干

多くなっていますので、前回とほぼ同じ症例数が解析対象となったと考えています。

注目されるのは、今回は小児例が成人例をやや上回っていること、しかも1歳代の発症例が最も多いことでした。成人ではやはり60歳代以上が多くを占めていました。

疾患の内訳は小児と成人とに分け、それぞれ**図-5**と**図-6**に示します。小児では敗血症・菌血症由来が53%と多く、次いで化膿性髄膜炎の29.2%、肺炎(血液から菌が分離された例のみ)の11.9%となっています。その他に化膿性関節炎や感染性心内膜炎例もわずかながら認められています。

成人の疾患としては敗血症が36.4%、肺炎が34.6%(血液より菌が分離された例のみ)、化膿性髄

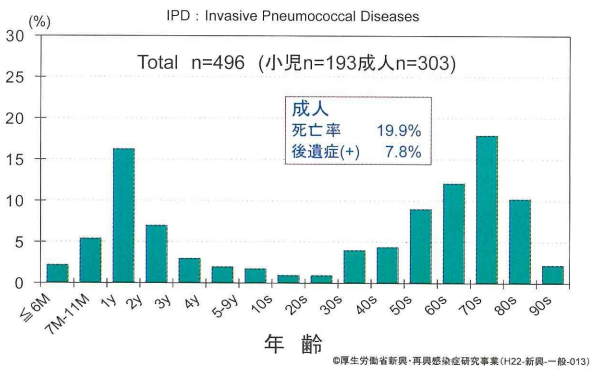


図-3 IPDの年齢分布(2006年)

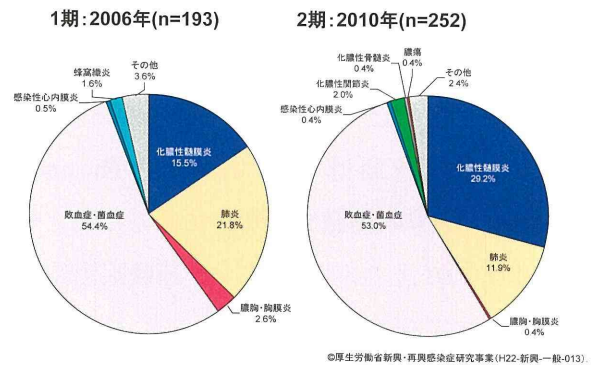


図-5 小児のIPD: 疾患の比較

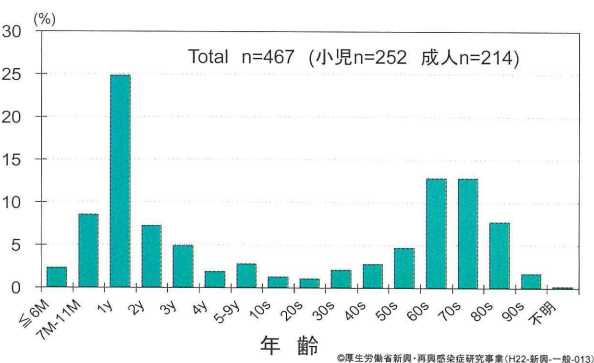


図-4 IPDの年齢分布(2010年)

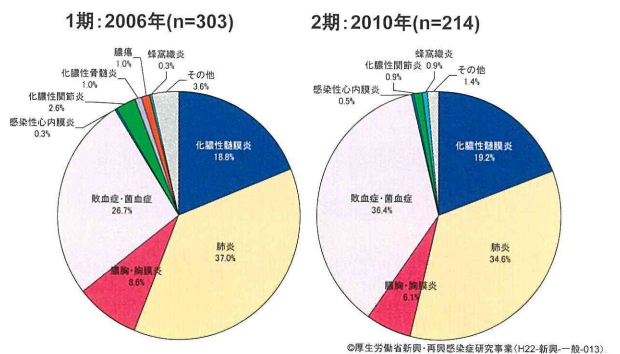


図-6 成人のIPD: 疾患の比較

膜炎が 19.2%、膿胸・胸膜炎が 6.1%認められています。なお、現在解析中ですが、成人発症例の多くが腫瘍手術後、糖尿病、心疾患、肝胆膵疾患、脳疾患、そして腎疾患など多岐にわたる基礎疾患を有しています。

2. 耐性遺伝子解析からみた感性/耐性の内訳

図-7には、米国の CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)における肺炎球菌に対するブレイクポイント(BP)を基準薬であるペニシリン G で示します。図には併せて遺伝子学的(genotyping:g)に解析した成績も示します。

現在、CLSIのリコメンドする肺炎球菌のBPは、化膿性髄膜炎例と非化膿性髄膜炎例とに分けて設定されています。この値は、米国で使用される薬剤投与量で得られる髄液中移行濃度や血中濃度、体内動態等から予測される臨床効果を踏まえて決定されています。化膿性髄膜炎の場合には、感受性(MIC)は 0.063 $\mu\text{g/ml}$ 以下を感性(S)、0.125 $\mu\text{g/ml}$ 以上は耐性(R)と考えて対応することとなっています。

さらに、非化膿性髄膜炎の場合は 2 $\mu\text{g/ml}$ 以下を“S”、4 $\mu\text{g/ml}$ を中間(I)、8 $\mu\text{g/ml}$ 以上を“R”とすると変更されました。変更理由は、米国の投与量

では肺炎であれば臨床効果が得られる注射薬剤が多いということかと思えます。

残念ながら、我が国の投与量において、CLSIのBPをそのまま当てはめてもよいという明確な臨床データはないように見受けられます。

子どもの遺伝子解析による成績では、遺伝子変異のない感性株は gPSSP、PISP は gPISP(*pbp2b*)、gPISP(*pbp2x*)、gPISP(*pbp1a+pbp2x*)、および gPISP(*pbp2x+pbp2b*)、そして gPRSP(*pbp1a+pbp2x+pbp2b*)と区別しているわけですが、図-7からも明らかのように変異を有する遺伝子の数が増えるほど感受性が低下してくることが示されています。つまり、遺伝子変異を調べた成績では、“S”、“I”、“R”のBP変更左右されないのが特徴です。

私見ですが、自動化機器での感受性測定において、CLSIの判定基準で表示された際、重症感染症であればあるほど実際のMICの値を見て、図-7の上から該当菌がどのような遺伝子変異を持った菌なのかを推定して抗菌薬を選択していただきたいと思えます。例えば、非髄膜炎例から分離された肺炎球菌が自動化機器によりMICが 2 $\mu\text{g/ml}$ と判定されて“S”と報告されても、遺伝子学的にはほとんどすべての菌株が gPRSPです。

紙面の関係でここには示しませんが、今回小児でも gPRSPの割合が 46.1%から 54.9%へと増加していました。それとは対照的に gPSSPは 14.1%から 8.3%へと減少しています。

一方、図-8に示したように、成人由来株では gPRSPが 17.3%から 34.1%と著しく増加しています。今回最も分離頻度の高かった gPISP(*pbp2x*)も 28.6%から 37.4%へと増加しています。対照的に gPSSPと gPISP(*pbp2b*)の割合は著しく減少しています。

成人例におけるこのような耐性菌の変化は、次に記す莢膜型の変化と密接に関連しています。

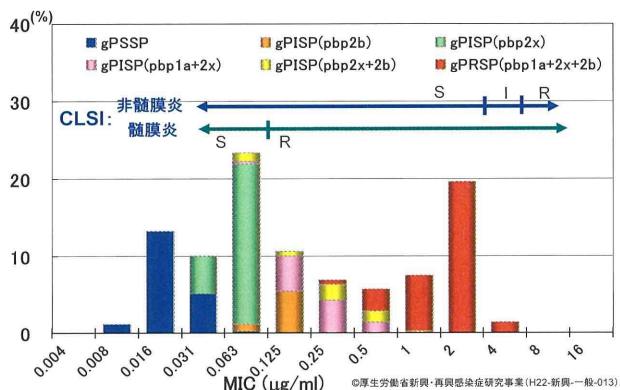


図-7 肺炎球菌のペニシリン G 感受性 (n = 496)

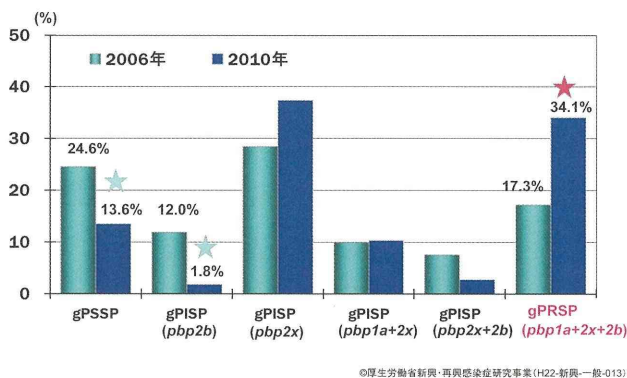


図-8 成人由来株における耐性菌の増加

表-1 肺炎球菌の莢膜型とワクチンに含まれる莢膜型

| Type | group | Type | group | Type | group | Type | group |
|-----------------------------------|-------|-------------------------|-------|------------------------------|-------|---------------|-------|
| 1 | | 13 | | 25 (25F, 25A) | | 39 | |
| 2 | | 14 | | | | 40 | |
| 3 | | 15 (15F, 15A, 15B, 15C) | | 28 (28F, 28A) | | 41 (41F, 41A) | |
| 4 | | 16 (16F, 16A) | | 29 | | 42 | |
| 5 | | 17 (17F, 17A) | | 31 | | 43 | |
| 6 (6A, 6B, 6C, 6D) | | 18 (18F, 18A, 18B, 18C) | | 32 (32F, 32A) | | 44 | |
| 7 (7F, 7A, 7B, 7C) | | 19 (19F, 19A, 19B, 19C) | | 33 (33F, 33A, 33B, 33C, 33D) | | 45 | |
| 8 | | 20 | | 34 | | 46 | |
| 9 (9A, 9L, 9N, 9Y) | | 21 | | 35 (35F, 35A, 35B, 35C) | | 47 (47F, 47A) | |
| 10 (10F, 10A, 10B, 10C) | | 22 (22F, 22A) | | 36 | | 48 | |
| 11 (11F, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E) | | 23 (23F, 23A, 23B) | | 37 | | | |
| 12 (12F, 12A, 12B) | | 24 (24F, 24A, 24B) | | 38 | | | |

・23価肺炎球菌ワクチン(PPV23): ニューモバックスNP® (青字 + 赤字のタイプが含まれる)
 ・7価結合型ワクチン(PCV7): プレベナー® (赤字のタイプが含まれる)

©厚生労働省新興・再興感染症研究事業(H22-新興-一般-013)

3. 莢膜型の変化

多糖体からなる莢膜は菌の病原性と深く関連していることが知られています。莢膜の型は表-1に示すように、現在 21 のグループに属する 68 の型と、25 の単一型の計 93 に識別することができます。このように肺炎球菌で莢膜型が多いのは、菌がヒトに対して病原性を発揮する上で、ヒトの免疫機構を回避するためといわれています。つまり、この莢膜があるためにヒトの補体や IgG が菌に結合し難く、そのため好中球は菌を貪食できないのです。例えば髄液のグラム染色標本で貪食像がほとんど観察されないのはこのためです。

このような莢膜型の中から、図-9に示すように、主に成人用として 23 価ポリサッカライドワクチン(PPV23: ニューモバックス NP®)、小児用 7 価結合型ワクチン(PCV7: プレベナー®)が開発されました。欧米では PCV7 は定期接種化されている国が多いのですが、日本では 2009 年に承認され、2010 年 2 月から接種できるようになりました。そして、“H22 年度ワクチン接種緊急促進事業”により、PCV7 は Hib ワクチン、ヒトパピローマウイルスワクチンとともに、接種費用に対する補助がなされるようになりました。

一方、65 歳以上のヒトでは第一回の PPV23 接種後、

成人用23価ワクチン(PPV23) ニューモバックス(Pneumovax NP®)
 小児用7価結合型ワクチン(PCV7) プレベナー(Prevenar®)

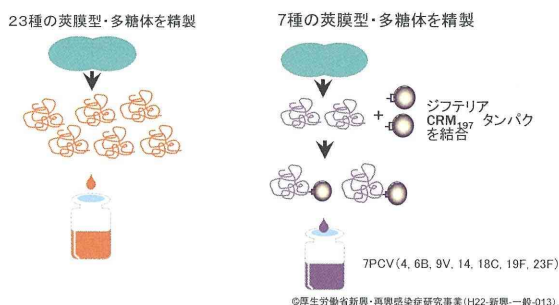


図-9 肺炎球菌用ワクチン

5 年目以降での再接種がようやく認められました。

さて莢膜型ですが、図-10には 2006 年、図-11には 2010 年の小児での成績を示します。図は左側に PCV7 に含まれる莢膜型を分離頻度の高い順に並べてあります。次いで、現在開発中の PCV13 に含まれる型、ワクチンに含まれない型と並べてあります。

2006 年と 2010 年を較べますと、4 年間でかなり変化してきていることが判ります。すなわち今回の成績では 6B 型が 28.5%と突出して多くを占め、次いで 23F 型の 14.5%、19F 型の 13%、14 型の 10.5%となっています。また、これらの型にはいずれも赤字で示した gPRSP の多いことが判ります。諸外国で比較的多い 9V 型、4 型、18C 型は gPSSP、あるいは

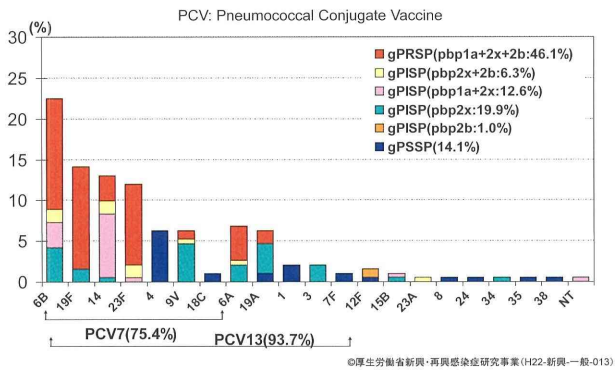


図-10 小児 IPD 分離株の莢膜型 (2006 年)

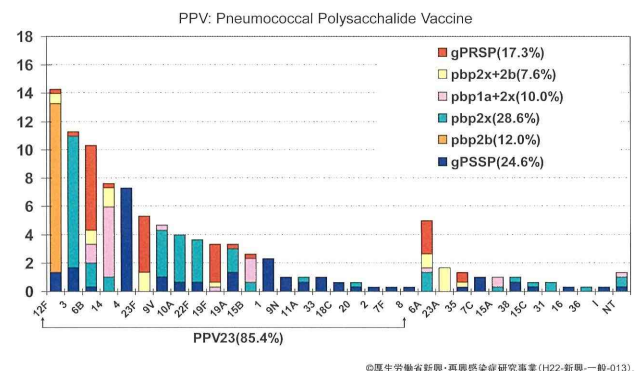


図-12 成人 IPD 分離株の莢膜型 (2006 年)

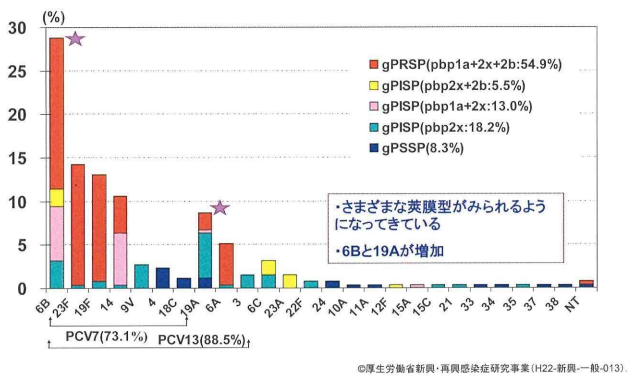


図-11 小児 IPD 分離株の莢膜型 (2010 年)

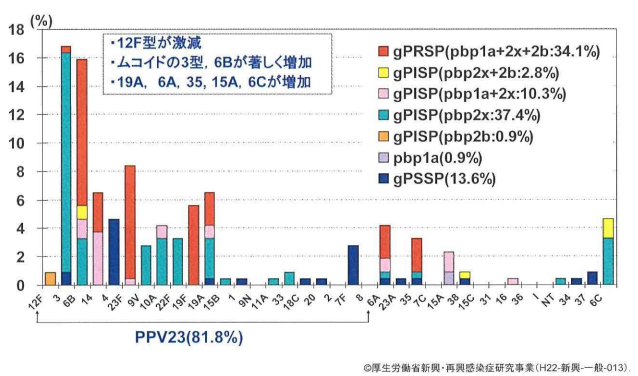


図-13 成人 IPD 由来株の莢膜型 (2010 年)

gPISP (pbp2x) で、我が国での分離はそれ程多いわけではありません。PCV7 のカバー率は約 73.1%、PCV13 のそれは 88.5%と算出されました。過去のデータと比較しますと、莢膜型は多様化し、カバー率は次第に低下してきているようにみえます。

また、ワクチン定期接種化後の欧米においてその増加が問題となっている 19A 型ですが、8.5%とやや増加傾向にあることが注目されます。

成人における同様の成績を図-12(2006年)と図-13(2010年)に示します。PPV23に含まれる型を2006年の分離頻度の高い順に並べ、2010年ではそれらがどのように変化しているのか比較できるようにしてあります。今回の成績では12F型が激減し、ムコイド型コロニーを形成する莢膜3型と6B型が明らかに増加しています。その他に6A型、6C型、

15A型、19A型、35型も増加しています。

ちなみに、成人用23価ワクチンであるPPV23のカバー率は81.8%でした。

小児と成人では分離菌の莢膜型が異なること、成人ではさまざまな莢膜型が分離されていることが特徴です。

§ 考察

2006年～2007年にかけて実施された「大規模サーベイランス」の成績と比較しますと、収集された菌株数はほぼ同数であり、感染症発生動向には余り変化のないことが推測されます。

しかし、菌の耐性化は小児あるいは成人においても依然として進行しており、さらにβ-ラクタム系薬に高度耐性化した肺炎球菌の増加が懸念されます。

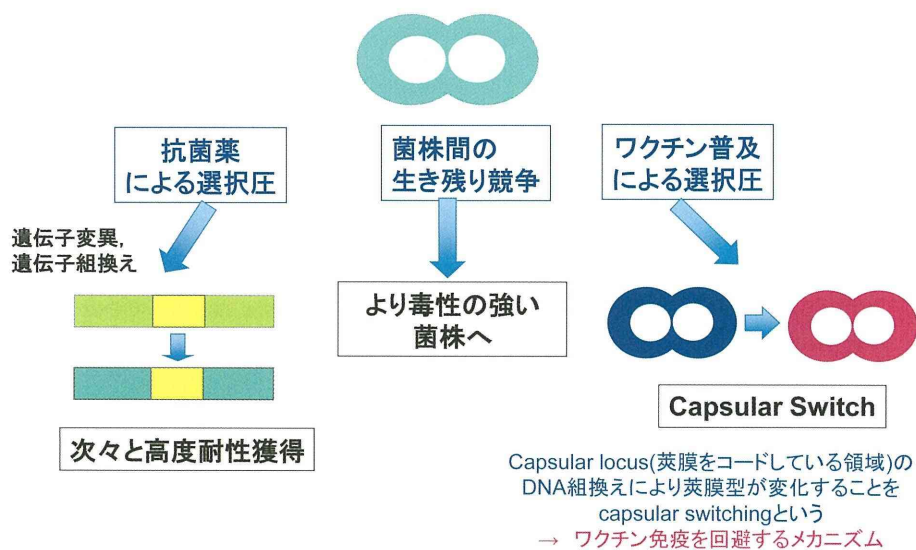


図-14 進化する肺炎球菌：まとめ

そして何よりも、耐性化と連動して小児の PCV7 および成人の PPV23 のカバー率は次第に低下してきていますが、特に欧米においてワクチン定期接種化後に増加したことが報告されている 19A や 6A 型などが増加しつつあることは、ワクチン効果を低下させることとして危惧されます。

最後に、まとめを「進化する肺炎球菌」として **図-14** に示しました。本菌は、i) より一層ビルレンスの高い菌の選択、ii) 抗菌薬の選択圧による遺伝子変異あるいは遺伝子組み換えによるさらなる耐性化、そして iii) ワクチン普及による選択圧下での

荚膜遺伝子領域の組換え (switching) 等が生じることが明らかになっています。肺炎球菌の培養には血液寒天培地が必要で、しかも容易に死滅しやすい菌であるにも関わらず、自らを自在に変化させるこのようなしなやかこそが、抗菌薬が進歩した今日においても菌が生き残ってきている証です。

今後、日本においてはワクチン普及によって荚膜型が大きく変動していくことが予想され、また耐性化の進行もありますので、継続的かつ正確な「全国規模の分子疫学サーベイランスが必要」であることを強調しておきます。

2. β 溶血性レンサ球菌

§ 目的

従来、溶血性レンサ球菌にはペニシリン系薬の抗菌力が優れていることから、タイムリーに診断され、適切な抗菌薬投与がなされれば予後は比較的良好と考えられていました。しかし、肺炎球菌の項にも記しましたように、急速な高齢化社会の到来と共に、2000 年前後から特に後期高齢者群において侵襲性レンサ球菌感染症が増加してきています。この詳細は既に website (<http://strep.umin.jp/>) 等でも公開してきているところですが、ここでは、1 期目(2006 年)と 2 期目にあたる 2010 年の収集株ではどのように変化してきているのか、その成績について報告します。

§ 収集菌株と解析項目

今回の菌株収集期間は 2010 年 5 月から 2011 年 1 月までの 9 ヶ月間です。侵襲性感染症由来 β 溶血性レンサ球菌として送付を受けた菌株は、*Streptococcus pyogenes* (GAS) が 102 株、*Streptococcus agalactiae* (GBS) が 180 株、*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) が 208 株、その他の *Streptococcus anginosus* group に分類されるレンサ球菌が 42 株、計 532 株でした。

それらは、すべて平素無菌的な検査材料、すなわち髄液、血液、胸水、関節液、閉鎖性膿汁などから分離されています。

解析項目は、GAS と SDSE については病原性に関わる M タンパク(菌体の表層に存在する繊維状タンパク)をコードする *emm* 遺伝子の解析による型別、GBS については real-time PCR による莢膜型の解析を実施しています。

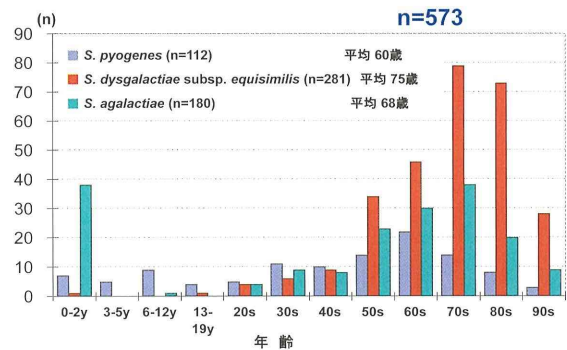
なお、各種抗菌薬感受性は、一部の菌種のみについては既に測定していますが、全株測定後に再度報告いたします。

§ 結果

1. 感染症例の年齢の特徴

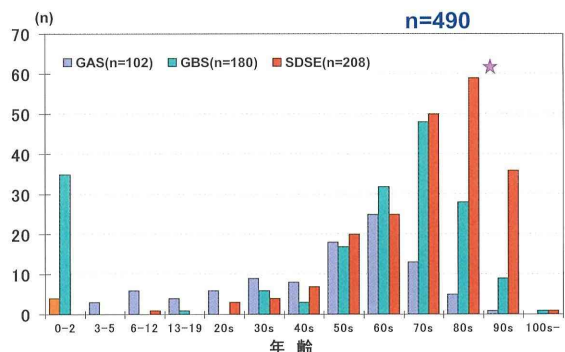
図-15 には 2006 年、図-16 には 2010 年のそれぞれにおいて、GAS、GBS、および SDSE のいずれかで侵襲性感染症を惹起した症例の年齢分布を示します。

感染症例の多くが 50 歳代以上の壮年期から後期高齢者層で発症していることが示されています。しかし、その年齢分布には微妙な違いが認められます。すなわち、GAS は 60 歳代にピークを有していますが、学童期にも認められるのに対し、SDSE は 50 歳代から発症例が急速に増加し、70~90 歳代の症例が多数を占めています。そして今回のピークは 80 歳代にシフトしてきていることが特徴です。症例全体をみますと、基礎疾患の保有率は 70%以上と非常に高くなっています。



©厚生労働省新興・再興感染症研究事業(H22-新興一般-013)

図-15 菌種別発症年齢分布(2006年)



©厚生労働省新興・再興感染症研究事業(H22-新興一般-013)

図-16 菌種別発症年齢分布(2010年)

一方、GBS による発症例のピークは、成人では 70 歳代に認めますが、50～60 歳代の症例も多く、2006 年よりも発症例数が増加しています。成人では急速にニューキノロン系薬耐性菌が増加してきていますが、あるいはそのことと関連しているのかも知れません。GBS は新生児感染症の原因菌としても重要ですが、そのほとんどは生後 3 ヶ月以内の発症です。生後 1 週間以内の早発型 (early onset) と遅発型 (late onset) に分けると、その 80% は遅発型です。現在、妊娠後期の女性に対し GBS 感染症の予防のために出産前検査が行なわれていますが、通常 1 回のみの検査のため保菌する GBS の菌量が少ないと、培養では陰性の場合が多いことが明らかになっています。今後、保菌検査をどのように実施するのがよいか、検証が必要だと思います。

2. 疾患の特徴

それぞれの菌種にみられる疾患の特徴は、**図-17** と **図-18** に示します。これらの疾患名は各医療機関によって記載されたものを集計しています。各菌種に共通して敗血症例が多かったのですが、その他を解析すると GAS と SDSE では Streptococcal Toxic Shock-like Syndrome (STSS)、壊死性筋膜炎、蜂窩織炎、化膿性関節炎が多く認められ、それらの化膿性疾患が GAS では 43.2%、SDSE では 42.7% を占めていました。

一方、GBS での化膿性疾患は 19.4% 程度でした。また、GAS や SDSE では化膿性髄膜炎は極めて稀であるのに対し、GBS では化膿性髄膜炎が 8.3%、加えてその他としたいろいろな感染症が認められたことが特徴です。

既に Website にも記していますのでここでは簡単に触れますが、レンサ球菌感染症の臨床的特徴

をまとめますと、**図-19** のとおりです。菌種によってかなりの違いが認められますが、このような違いは、ひとつには菌の構造と病原因子の違いにあります。

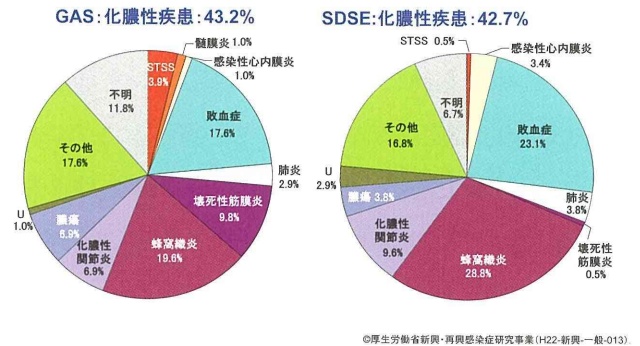


図-17 菌種別・疾患の違い-1 (2010 年)

GBS:化膿性疾患:19.4%

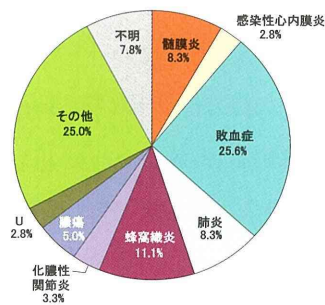


図-18 菌種別・疾患の違い-2 (2010 年)

1. 基礎疾患(+)例が70%以上
2. 疾患の違い
 - ・GASとSDSEは化膿性疾患
 - ・GBSは敗血症
 } 病原性の違い
3. 予後(平均)
 - 死亡率(10-14%)、後遺症(3-8%)
4. 死亡までの時間(平均)
 - GAS(2日)>SDSE(3日)>GBS(7日)

図-19 レンサ球菌感染症の臨床的特徴

3. 疫学解析に用いられる GAS, SDSE の M タンパクと GBS の莢膜

図-20 には、GAS, SDSE の M タンパク、そして GBS の莢膜を模式図で示します。M タンパクは菌体表層から繊維状に伸び、*emm* 遺伝子にコードされています。先端から A 領域にかけてはアミノ酸が多様性に富んでいます。この領域はヒト上皮細胞への結合にも関わる領域で、この部位を変化させヒトの免疫機構を回避して菌は生き残ってきます。このような M タンパクの多様性が菌の疫学解析に利用されます。これを *emm* 型別とといいます。すなわち、先端(N 末端側)の“超可変領域”の塩基配列を調べ、CDC リファレンスセンターへデータを送信し、解析結果の返信を受けます。

一方、GBS の病原性は、菌体表層に存在する多糖体の莢膜にあることが知られています。莢膜は現在 Ia, Ib, II, III 等、10 種類に区別できます。この型特異的部分に相当する遺伝子領域を real-time PCR で検索する方法を本研究事業において構築しており、迅速な解析が可能となっています。

このような表層産生物をコードする遺伝子の多様性は、菌がヒトの免疫機構を回避して生体内へ侵入する手段として重要なのです。

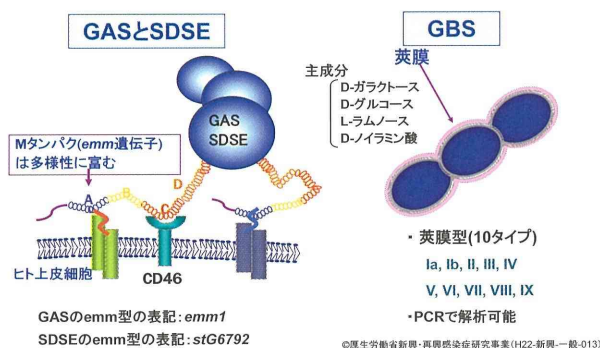


図-20 レンサ球菌の病原性：
—ヒトの免疫機構を回避する—

4. GAS の疫学

図-21 には2010年における GAS (n = 102) の *emm* 型別の成績を2006年の成績 (n = 112) と比較しながら示します。*emm* 型は現在 118 タイプと多岐にわたりますが、日本で多く分離されるのはその中の20タイプ程です。

世界的にみても、侵襲性感染症由来株で最も多いとされるのは *emm1* 型で、今回の成績にもみられるように、全体の36%と圧倒的多数を占めています。2006年の成績でも32%となっています。つまり、GASによる侵襲性感染症例の3人に1人はこの型によって発症していることが判ります。

先のサーベイランスで2番目に多かった *emm49* 型は減少し、代わって *emm89* 型が増加していました。

図-22 には2006年の我が国の成績と同時期の米

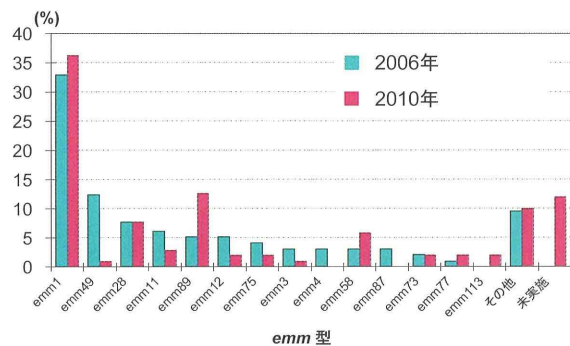


図-21 GAS株：2006年と2010年の比較

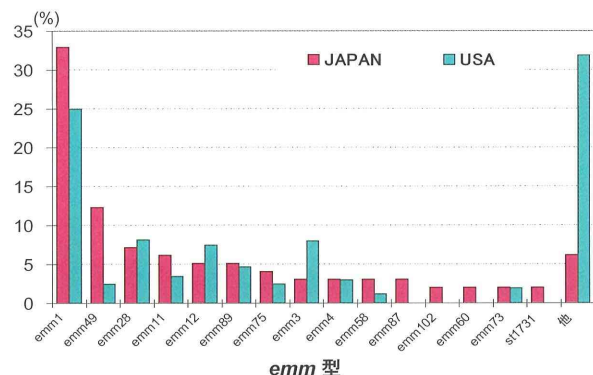


図-22 GAS株：米国株との比較

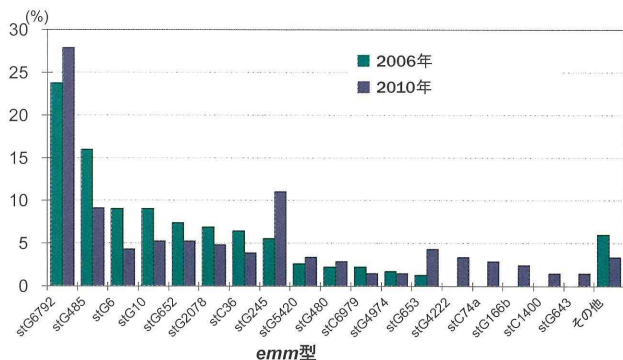
国の成績とを比較して示しますが、いずれも *emm1* 型が優位であることが判ります。そして、米国では多様な型による発症例が多くみられることも日本と異なっています。

ちなみに、咽頭・扁桃炎の原因菌として多く分離される GAS では *emm12* 型や *emm4* 型が優位です。

5. SDSE の疫学

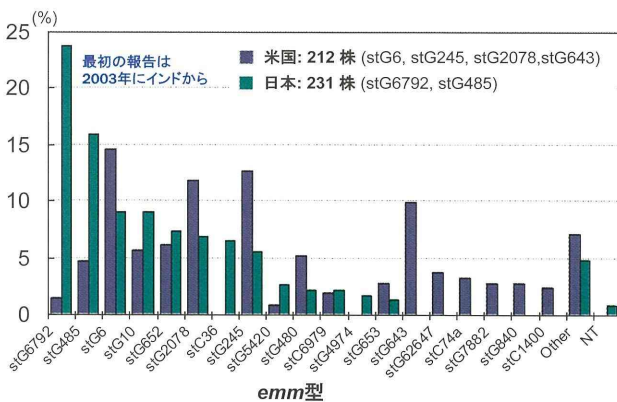
SDSE (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) の疫学成績は、**図-23**には2006年(n=281)と2010年の成績(n=208)の比較、**図-24**には日本と米国の成績との比較を示します。

今回の成績でも、最も優位に分離された型は



©厚生労働省新興・再興感染症研究事業(H22-新興-一般-013)

図-23 SDSE 株：2006年と2010年の比較



©厚生労働省新興・再興感染症研究事業(H22-新興-一般-013)

図-24 SDSE 株：米国との比較

stG6792 (28.5%)型でした。次いで多かったのは *stG245* の11%でした。その他にさまざまな型が認められ、特に前回分離されていない型も認められつつあって、分離菌が多様化してきていることが示唆されました。

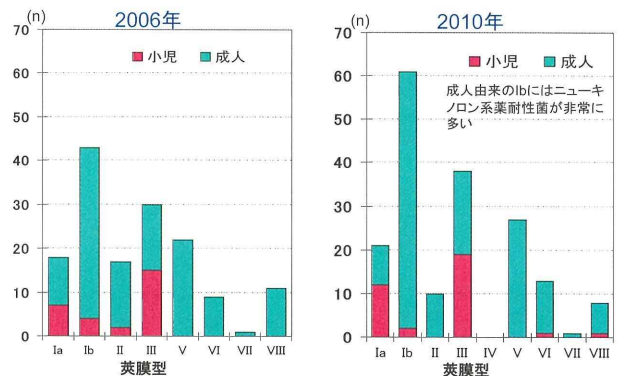
日本の疫学成績を米国のそれと比較しますと、明らかに異なっていることが判ります。すなわち、米国では *stG6*, *stG2078*, *stG245*, *stG643* 型等が多く、我が国で突出して多い *stG6792* 型は2%以下と極めて少ないことが大きな違いです。

6. GBS の疫学

図-25には、2010年のGBS(n=180)の莢膜型について、2006年(n=151)と比較しながら示します。本菌による感染症の罹患年齢は、生後1-3ヶ月までの小児重症感染症(n=36)と、成人感染症(n=144)の2群に分けられます。

2010年の疾患の内訳は、小児では化膿性髄膜炎と敗血症が大部分であったのに対し、成人では敗血症が50%以上と最も多く、次いで肺炎、化膿性関節炎等がみられています。その他に尿路性敗血症や感染性心内膜炎も認められたことが注目されました。

GBSによる成人例ではその85%が1つ以上の基礎疾患を有しており、自家感染という意味で GAS



©厚生労働省新興・再興感染症研究事業(H22-新興-一般-013)

図-25 GBS 株の莢膜型