

図1 自動化された遺伝子検査

(A) Cepheid社のGeneXpert® IとXpert® Carba-R (<http://www.cephheid.com/us/>より), (B) Nanosphere社のVerigene system (左: processor, 右: reader)とVerigene® Gram-Negative Blood Culture test (<http://www.nanosphere.us/products/verigene-system>より), (C) Idaho Technology社のFilmArray systemとFilmarray pouch (文献17より), (D) Becton Dickinson社のBD Max (<http://www.bd.com/products/product-categories/molecular.aspx>より)と、DNA反応液用のストリップとPCRカートリッジ (BD MAX system users manual FDA assay version.pdfより)。

PCR: ポリメラーゼ連鎖反応

(各社ホームページおよび文献17より)

ンデータベースのさらなる充実, 臨床に役立つ情報が容易に得られるような解析ソフトの進化などの問題があり, 普及するにはまだ時間がかかると考えられる<sup>12)</sup>。

#### ⑥ 自動化された遺伝子検査

こうした遺伝子検査の欠点のひとつが, ルーチンの細菌培養検査とは異質な手技が必要で, 特にmicroarray法となると手間がかかるという点である。こうした手技が自動化されていれば現場の労力も減り, 標準化された検査として普及の後押しになると考えられる(図1)。

(1) Xpert® MTB/RIF, Xpert® Carba-R  
自動化された遺伝子検査の中でもっともそ

の意義が評価され普及が進んでいるのは, 結核菌の同定とそのリファンピシン耐性を同時に検出できるCepheid社のXpert® MTB/RIF<sup>13)</sup>であろう。この検査はひとつのカートリッジの中で, 溶菌, DNA抽出, PCR増幅と産物の検出が行われるもので, 飛沫核を生じるリスクはほとんどなく, 2時間ほどで検査結果を得ることができる。感度は塗抹陽性例で98.2%, 特異度は99.2%と報告されている。発展途上国では安定した温度管理と電力供給およびコストが問題となるが, 技術的な指導も喀痰塗抹検査よりも簡便であり, さまざまな結核蔓延国で使用されてきている。

近年, このXpert®のシステムで, 肛門ス

## V 遺伝子検査の応用

ワブや便検体から、KPC型、VIM型、NDM型カルバペネマーゼ遺伝子を検出するキットが開発されてきている<sup>14)</sup>。日本で検出の多いIMP型が検出できるようになれば、わが国でも利用価値の高いものとなる可能性がある。

## (2) Verigene Gram-Positive or Negative Blood Culture Nucleic Acid Test

血液培養検査が陽性となってから細菌同定・薬剤感受性検査結果が出るまでには48～72時間かかるが、Nanosphere社のこの自動化されたDNA抽出とハイブリダイゼーションによる検出システムを用いると、約2.5時間以内に主要な菌の同定と薬剤耐性遺伝子が検出できる。

すでにグラム陽性菌では臨床応用がなされ、腸球菌による菌血症患者での適切な治療に有用であったとの報告がある<sup>15)</sup>。7種類の腸内細菌科細菌とアシネトバクター属、緑膿菌の同定と、CTX (cefotaxime)-M型、IMP型、VIM型、KPC型、NDM型、OXA-23型、OXA-24/40型、OXA-48型、OXA-58型β-ラクタマーゼ遺伝子の検出ができる、グラム陰性菌用のキットをTojoらが評価しており、臨床検体では、*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* spp. で検出・同定率が81～92%とやや劣るものの、人工検体において、β-ラクタマーゼ遺伝子は100%検出されている<sup>16)</sup>。今後、臨床検体でのさらなる検討が必要と考えられる。

## (3) FilmArray® (国外のみ)

微量液体技術 (microfluidic technology) と nested multiplex PCR 法の技術を組み合わせた FilmArray® プラットフォームを用いると、迅速に、高感度・高特異度で臨床検体中の病原体や薬剤耐性遺伝子を検出することが可能である<sup>17)</sup>。

Altunらによる、グラム陰性菌 10 菌種、グ

ラム陽性菌 8 菌種、カンジダ属 5 菌種の同定と、耐性因子 4 種類 (mecA, vanA/vanB, KPC) の検出が可能なパネルの評価では、血液培養陽性検体からの直接検出で 91.6% 検出が可能であった<sup>18)</sup>。検出までの時間は、FilmArray® を用いた場合には血液培養陽性後平均 21.67 時間、通常の培養検査では平均 53.92 時間であった。今後、検出できる菌種と薬剤耐性遺伝子の組み合わせにより、より有望な迅速検査となり得ると考えられる。

## (4) BD Max System

BD Diagnostics社のBD Max Systemでは、サンプルからのDNA抽出、multiplex SYBR green real-time PCR法を用いたPCR産物の融解曲線解析により、IMP型、GES型、KPC型、VIM型、OXA-23、48型、NDM型カルバペネマーゼ遺伝子を検出する方法が考案されており、実際の臨床分離株を用いた評価では100%の感度・特異度が示されている<sup>19)</sup>。今後、実際の臨床検体からの検出精度の評価が必要と考えられる。

## IV 遺伝子検査の臨床的意義

優れた薬剤耐性遺伝子検査が実用化されつつある中で、その臨床的な意義や活用法について考えておきたい<sup>20)</sup>。感染症診療の現場で、こうした遺伝子検査を活用するときに注意すべき点は以下の2点であると思われる。

ひとつは、薬剤耐性遺伝子が存在しても、それだけではその遺伝子が発現されているかどうかはわからないという点である。薬剤感受性検査があつてはじめて遺伝子検査の意義があるのであつて、遺伝子検査を行えば薬剤感受性検査は不要ということでは決してない。

第2点としては逆に、遺伝子検査で薬剤耐性遺伝子が見つかったが、薬剤感受性検査ではそう高度な耐性を示さない場合、その耐性遺伝子の存在が軽視される可能性がある。最

初は薬剤耐性遺伝子産物の産生量が少なくても、抗菌薬に曝された環境においてはその産生量が増し、薬剤耐性の度合いが上がるということが起こり得るからである。現在、大きな問題となりつつある CRE では、MIC (最小発育阻止濃度) 上はカルバペネム感受性であっても、感染症によってはカルバペネムによる治療が困難となる可能性があり、今後は薬剤感受性検査に加え、遺伝子検査を含めた耐性因子の検出が不可欠になると考えられる。

## V おわりに

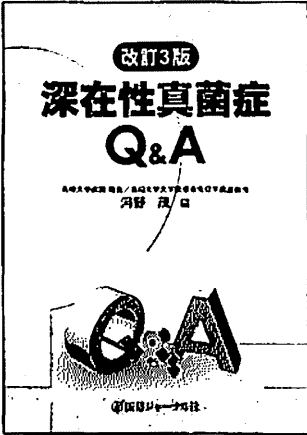
科学の進歩は目覚ましく、その進歩の賜物として、さまざまな有用な薬剤耐性遺伝子検査が実用化されつつある。それぞれの検査の原理や特性、そして結果の示す意味を十分理解して、臨床現場で活用していきたいものである。

## 文 献

- 1) Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, et al : Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (4) : 1257-1262, 2006.
- 2) Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, et al : Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect* **17** : 1798-1803, 2011.
- 3) Clinical Laboratory Standards Institute : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing : nineteenth informational supplement M100-S21. Wayne, PA. 2011.
- 4) Nordmann P, Poriel L, Dortet L : Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* **18** (9) : 1503-1507, 2012.
- 5) Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, et al : Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Diag Microbiol Infect Dis* **77** : 179-194, 2013.
- 6) Singh K, Mangold KA, Wyant K, et al : Rectal screening of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases : Comparison of real-time PCR and culture using two selective screening agar plates. *J Clin Microbiol* **50** (8) : 2596-2600, 2012.
- 7) Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, et al : Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* **67** : 906-909, 2012.
- 8) Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, et al : Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, Fox, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM). *J Antimicrob Chemother* **67** : 1865-1869, 2012.
- 9) Fishbain JT, Sinyavskiy O, Riederer K, et al : Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes directly from blood cultures by use of a nucleic acid microarray. *J Clin Microbiol* **50** (9) : 2901-2904, 2012.
- 10) Poirel L, Naas T, Nordmann P : Pyrosequencing as a rapid tool for identification of GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Clin Microbiol* **44** (8) : 3008-3011, 2006.
- 11) Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, et al : Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104 : H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS ONE* **6** (7) : e22751, 2011.
- 12) Török ME, Peacock SJ : Rapid whole-genome sequencing of bacterial pathogens in the clinical microbiology laboratory – pipe dream or reality? *J Antimicrob Chemother* **67** : 2307-2308, 2012.
- 13) Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al :

V 遺伝子検査の応用

- Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Eng J Med* **363** (11) : 1005-1015, 2010.
- 14) Tenover FC, Canton R, Kop J, et al : Detection of colonization by carbapenemase-producing gram-negative bacilli in patients by use of the Xpert MDRO assay. *J Clin Microbiol* **51** (11) : 3780-3787, 2013.
- 15) Sango A, McCarter YS, Johnson D, et al : Stewardship approach for optimizing antimicrobial therapy through use of a rapid microarray assay on blood cultures positive for *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* **51** (12) : 4008-4011, 2013.
- 16) Tojo M, Fujita T, Ainoda Y, et al : Evaluation of an automated rapid diagnostic assay for detection of gram-negative bacteria and their drug-resistance genes in positive blood cultures. *PLoS ONE* **9** (4) : e94064, 2014.
- 17) Poritz MA, Blaschke AJ, Byington CL, et al : FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection : development and application to respiratory tract infection. *PLoS ONE* **6** (10) : e26047, 2011.
- 18) Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, et al : Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* **51** (12) : 4130-4136, 2013.
- 19) Hofko M, Mischnik A, Kaase M, et al : Detection of carbapenemases by real-time PCR and melt curve analysis on BD Max system. *J Clin Microbiol* **52** (5) : 1701-1704, 2014.
- 20) Tuite N, Reddington K, Barry T, et al : Rapid nucleic acid diagnostics for the detection of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria : is it time for a paradigm shift? *J Antimicrob Chemother* **69** : 1729-1733, 2014.




## 深在性真菌症 Q & A 改訂 3 版

長崎大学病院 院長 / 長崎大学大学院感染免疫学講座教授 **河野 茂** 編

A5判 220頁 定価 (本体 3,500円+税) 送料実費  
ISBN978-4-7532-2364-0 C3047

◎深在性真菌症は、もはやまれな感染症ではない——。一般臨床医が日常診療で直面する疑問点、問題点を Q & A 形式でわかりやすく解説。疫学・環境から、真菌の感受性、診断、治療までを最新情報に改訂。

◎「MIC 測定の意味と解釈」、「バイオフィルム形成と抗真菌薬の感受性変化」、「抗真菌薬の併用療法」など新たな項目も追加し、更に充実した一冊に！


**株式会社 医薬ジャーナル社** 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 ( 振替番号 )  
 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKIビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369 ( 00910-1-33353 )  
<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌バックナンバー検索、ご注文などはインターネットホームページからが便利です。

# 感染症

- ◎蛍光顕微鏡
- ◎質量分析
- ◎遺伝子解析
- ◎DDST
- ◎イムノクロマトグラフィ

Author いいまよしつぐ  
飯沼由嗣\*

\*金沢医科大学 臨床感染症学

## Headline

1. 微生物検査のボトルネックは分離培養および感受性検査のための培養時間である。これを克服するために、質量分析や遺伝子解析などの最新技術を用いた微生物同定検査技術の開発がめざましい。
2. 微生物における遺伝子検査は、特定の菌を検体から全自動かつ直接検出可能な機器の開発が進んでいるが、今後は網羅的遺伝子検索技術を用いた検査法の開発が期待される。
3.  $\beta$ ラクタマーゼによる耐性菌の多様化が著しいがDDSTによる判定が開発され実施されている。スクリーニング培地やスクリーニング遺伝子検査の開発も進みつつある。
4. 迅速診断キットはおもにイムノクロマトグラフィによるキットが開発されPOCT検査としても広く用いられている。臨床的有用性の高い炎症マーカーの開発も期待される。

## はじめに

新薬の開発や移植技術の進歩は人類に大きな恩恵をもたらしているが、易感染性宿主 (immunocompromised host) の増加に伴う難治性の感染症の増加が問題となっている。また移動時間の短縮により世界中の感染症がわが国に持ち込まれるリスクが高まっている。これらの感染症は、迅速かつ正確な起炎菌診断が求められるが、その起炎菌は一般細菌のみならず、真菌、ウイルス、原虫など多様性に富み、一般臨床検査室レベルでは診断が困難なことも多い。一方で革新的な機器の開発に関連して、感染症検査も大きく進歩を遂げてきた。本稿では、感染症検査の最新情報と今後の展開について解説する。

## 感染症検査の流れと課題 (図1)

感染症検査は、通常感染症を疑う臨床症状、およびそれに伴い行われる血算生化学検査尿などの検査により推定され、実施される。一般細菌検査においては通常検査初日に行わ

れる塗抹鏡検と分離培養に引き続いて行われる同定感受性検査が基本となる。微生物検査における最大のボトルネックは菌の培養時間である。通常分離培養に1日、同定感受性にさらに1日の時間を要するため、検査提出から最短で2日間かかることになる。このため、初期治療 (empiric therapy) が適切か否か、あるいは標的治療 (target therapy) をどうするかについては、その結果を最低2日間待たなければならない。また基質拡張型 $\beta$ ラクタマーゼ (extended spectrum beta lactamase;ESBL) 産生菌やメタロ $\beta$ ラクタマーゼ (metallo beta lactamase;MBL) 産生菌などの特殊な耐性菌の検出にはさらに1日以上の日数が必要となる。

起炎菌同定をできる限り早く行うための迅速抗原検査キットが特定の微生物について開発され用いられているが、偽陰性や偽陽性の問題、あるいは感受性は判明しないため、その用途は病原菌の同定にはほぼ限定される。

遺伝子検査は菌の迅速同定を目的として、特に発育の遅い菌 (抗酸菌など) や検出が難しい菌 (クラミジアなど) に適応となってい

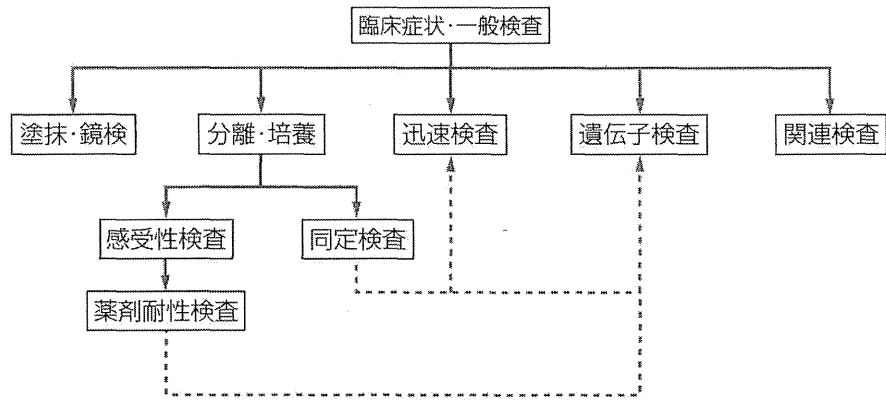


図1 感染症検査の流れ

る。特異性の高い検査ではあるが、コストが高く、日常ルーチンの迅速検査として用いられるケースはまれである。

### 塗抹検査

塗抹検査におけるトピックの一つにLED光源を用いた蛍光顕微鏡の開発があげられる。従来、蛍光顕微鏡は、高価かつ暗室（あるいはボックス）が必要なため、必ずしも全ての施設で日常的には行われてこなかった。抗酸菌検査においても、蛍光染色による塗抹検査の有用性は、Ziehl-Neelsen法などの従来法に比べて迅速性や簡便性、感度の点で優れ、新結核菌検査指針<sup>1)</sup>においても標準法として推奨されている。このLEDを用いた蛍光顕微鏡は、有害な紫外線を用いず、暗室が不要である。さらに、専用の顕微鏡の他、光学顕微鏡に後付できるタイプも開発されており、比較的安価である。蛍光顕微鏡は抗酸菌以外の病原体（アクリジンオレンジ染色：レジオネラやマラリア、ファンギフローラY染色：真菌、など）の検出にも用いられる。

オーラミンを用いた蛍光染色による抗酸菌塗抹検査は、検出が容易となる反面、非特異的な発光による偽陽性の問題や発がん性も指摘されてきた。近年、抗酸菌染色用のアクリジンオレンジ染色（アクリスティン<sup>®</sup>、極東製薬）が開発された。この染色液は、抗酸菌の

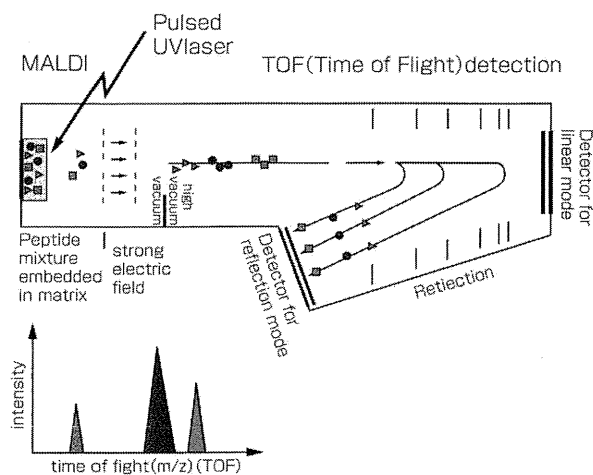
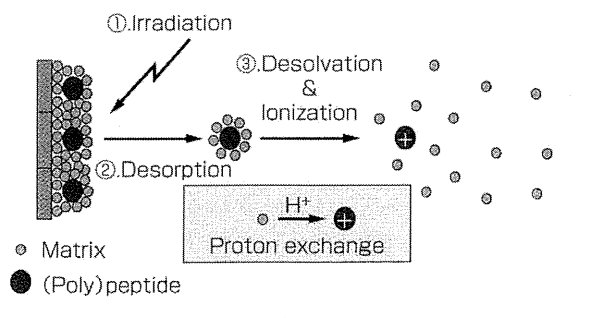
核酸に取り込まれ発光するため、非特異的な発光が比較的少ないとされる。また発がん性はなく、保存期間も長いので扱いが比較的容易である。

### 培養同定検査

同定検査の最大のトピックは、質量分析を原理とした細菌同定のための臨床検査機器の開発と実用化であろう。質量分析（mass spectrometry;MS）とは、蛋白質やペプチドなどの分子の重さ（質量）を測定することを意味するが、本装置はマトリックス（matrix）とよばれる蛋白質のイオン化を促進する化合物を菌と混合し、そのうえでレーザー照射を行い、イオン化した資料の飛行時間を測定し、そのスペクトラムの波形により菌の同定を行おうとするものである（Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, Time of Flight, Mass Spectrometry;MALDI-TOF MS）（図2A）<sup>2)</sup>。操作は非常に簡単である。同定を行おうとする菌のコロニーを専用のプレート上でマトリックス試薬と混合し、乾燥後装置にかけるのみで、機器が波形を自動で解析し、数分で菌が同定できる（図2B）。機器コストは高いが、検査のためのランニングコストは非常に低いことも特徴である。

本検査において検出される菌体成分は蛋白質が主体であり、そのうちリボソーム由来蛋

A MALDI(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)



B

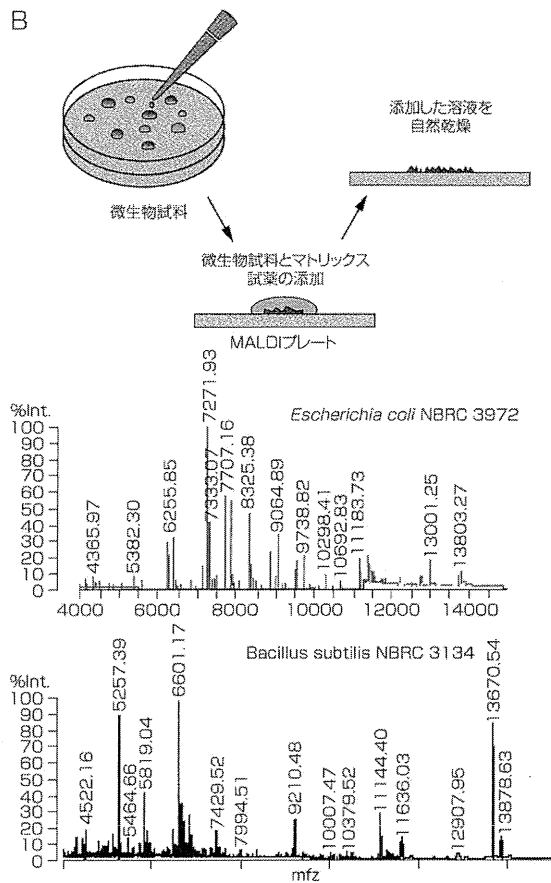


図2 質量分析装置 (MALDI-TOF MS) を用いた菌の同定

白質が50~70%程度占めるとされる。リボソーム由来の蛋白質が主体であることは16srRNA 遺伝子の解析により菌の分類が可能のように、菌の同定に有利に働いているものと推測される。従来の生化学的手法と比較して、菌種レベルで70~95%, 属レベルで80~98%との一致率と報告されている。一方、16srRNA 遺伝子配列の相同性が高い菌同士の鑑別は困難な場合がある(例:大腸菌と赤痢菌など)。また本検査において特に臨床的有用性が高いのは、血液培養陽性時の培養液からの直接同定である。正確な感受性を予測することはできないものの、同定結果の判明により、より適切な抗菌薬選択が可能となる。

MALDI-TOF MSの同定精度は、データベースの充実に伴いさらに改善してくるものと予想される。現時点では、一般細菌および酵母様真菌がおもなターゲットであるが、今後抗酸菌やその他の病原体の同定精度の改善

が期待される。一方で、同定のみならず、薬剤耐性因子の検出や株レベルのタイピングについても検討されつつあり、今後の研究成果が待たれる。

遺伝子検査 (表1)

1. 今日の遺伝子検査

遺伝子検査は、ルーチンの微生物検査で検出が困難な病原体(結核菌, クラミジア等)の核酸増幅技術を用いた同定検出についておもに保険収載されている。当初PCR法を用いた検査機器が開発され使用されてきたが、新技術が次々に開発され利用されつつある。また、遺伝子検査では、核酸の抽出などの前処理に一定の時間を要してきたが、その時間や手間を少なくする方法の開発、あるいは検体からの直接検出を行うことのできる全自動機器も開発されてきている。

コバスシステム (ロシュ・ダイアグノス



表1 おもな遺伝子検査

	製品名/会社	方法	対象病原体	特徴
核酸増幅による菌の同定	コバシステム /ロシュ・ダイ アグノスティック	TaqMan PCR	結核菌群, <i>Mycobacterium avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , 淋菌, クラミジア・トラコマティス, HIV, HBV, HCV, HPV	増幅と検出工程を1ステップで実施するTaqMan法により, 約2.5時間で結果が判明する。全自動でサンプルからの直接検出を行うことのできる機器も開発されている。
	Loopamp /栄研化学	LAMP	結核菌群, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , レジオネラ属, A型インフルエンザウイルス, 百日咳(研究用), ノロウイルス(研究用)	LAMP法とよばれる増幅効率の高い定温定量的増幅システムにより, 1時間以内に結果が判明する。抗酸菌の簡易迅速前処理技術(PURE法)の利用により, 前処理が約10分間程度で行うことができる。
	GENECUBE/ TOYOBO	QProbe	結核菌群, <i>M. avium</i> complex, <i>Helicobacter pylori</i> (クラリスロマイシン感受性判定, 研究用)	全自動でサンプルからの直接検出が可能な機器である。非常に短い増幅サイクルとQProbe法の採用により迅速かつ高感度な検出が可能である(全行程約40分)。また, SNP解析も可能であり, 微生物のみならずヒト遺伝子の解析によるテーラーメイド治療にも応用可能である。
	BDプローブ テックET/BD	SDA	淋菌, クラミジア・トラコマティス	SDA法とよばれる増幅効率の高い定温定量的増幅システムにより, 1時間以内に結果が判明する。
	GeneOhm/BD	Real-time PCR	MRSA, <i>Clostridium difficile</i> , B群連鎖球菌, VRE (すべて未承認)	耐性菌や病原菌のスクリーニング検出に特化した遺伝子解析システムである。
結核菌群 薬剤耐性 遺伝子変 異検出	GeneXpert/ Cepheid	Real-time PCR	結核菌群(リファンピシン耐性遺伝子変異検出), MRSA, <i>Clostridium difficile</i> , 淋菌, クラミジア・トラコマティス等(すべて未承認)	全自動でサンプルからの直接検出が可能な機器である。SmartCycler systemを用いて検出まで約1時間と迅速な核酸増幅を可能としている。結核菌の検出と同時にリファンピシン耐性遺伝子変異の検出も可能である。
	ジェノスカラー RFP, PZA/ニ プロ	核酸増幅+変異 特異プローブと のハイブリダイ ゼーション	結核菌群	RFPとPZAの遺伝子変異について, その責任遺伝子領域遺伝子の増幅と変異特異プローブとの結合により, それぞれの薬剤耐性を推測する。菌量が一定以上あれば, 喀痰からの直接検出が可能。

LAMP: Loop-Mediated Isothermal Amplification, PURE: Procedure for Ultra Rapid Extraction, SNP: Single Strand Polymorphism, SDA: Strand Displacement Amplification

ティック株式会社)は, TaqMan PCR法による核酸増幅を用いたシステムである。対象病原体は最も多く, 現在のシステムは定量的測定を行うこともできる。また全自動でサンプルから直接検出可能なシステムも開発され実用化されている。HPV(ヒトパピローマウイルス)については, ハイリスク型HPVの一括検出に加えて, 特に病原性が高くワクチン株ともなっているHPV 16型と18型の検出も可能である。

Loopamp(栄研化学)は増幅効率の高い定

量増幅システムであるLAMP法(Loop-Mediated Isothermal Amplification)を用いたシステムであり, 結核菌群のほか, マイコプラズマ, レジオネラ, A型インフルエンザなど呼吸器系病原体のラインアップが豊富である。また研究用試薬であるが, 百日咳やノロウイルスのキットも発売されている。特に結核菌群の検査時の前処理についてはPURE法(Procedure for Ultra Rapid Extraction)とよばれる簡易迅速前処理技術の採用とLAMP法により全行程1時間程度の迅速検査が可能となって



いる。

GENECUBE (TOYOBO) は QProbe<sup>®</sup>法を用いた全自動の遺伝子核酸増幅検査機器であり、検体からの遺伝子抽出から検出までをすべて全自動で行うことが可能である。また増幅時間も非常に短く、全行程40分程度で判定可能とされる。対象病原体としては、結核菌群、*Mycobacterium avium complex*, *Helicobacter pylori* (HP) となっている。このうちHPは単なる菌の検出ではなく、治療薬であるクラリスロマイシン耐性遺伝子の検出 (SNP (single nucleotide polymorphism) 解析) を行うことが目的となっている。このように QProbe<sup>®</sup>システムは SNP 解析を行うことができるため、将来的にヒト遺伝子解析によるテーラーメイド治療への応用が期待される。

BD プローブテック ET (Becton Dickinson (BD) 社) は、SDA (Strand Displacement Amplification) 法とよばれる増幅効率の高い定量増幅システムを用いたシステムであり、1時間以内に結果の判定が可能である。GeneOhm<sup>™</sup> system (BD 社) (未承認) は、薬剤耐性菌や病原菌のスクリーニング検出に特化した遺伝子解析システムである。GeneXpert<sup>®</sup> system (Cepheid 社) (未承認) は、検体から約1時間で病原体を検出可能な全自動のシステムであり、特に結核菌についてはリファンピシン耐性遺伝子の検出も可能である。

薬剤耐性遺伝子の検出を目的とした遺伝子検査も開発されている。結核菌は増殖速度が遅く、薬剤耐性が判明するまでに最低1か月ほどかかる。この間に抗結核治療が開始されているが、耐性菌であった場合には、早急に有効な抗結核薬への変更が必要となる。ファーストラインの抗結核薬のなかで、リファンピシン (rifampicin; RFP) とピラジナミド (pyrazinamide; PZA) は、薬剤耐性遺伝子が特定の遺伝子領域に集中しており、これを利用して薬剤耐性を推測する試薬が、ジェノ

スカラーである。菌量が一定量あれば喀痰からの直接検出も可能であり、より早期の適正な治療が可能となる。

## 2. 今後の遺伝子検査の方向性

今後の遺伝子検査の方向性であるが、遺伝子解析技術の急速な進歩に伴い臨床検査領域においても“網羅的”がキーワードになると考えられる。微生物領域における“網羅的”とは、①病原体の網羅的検出、②微生物遺伝子の網羅的解析、となる。この検査法の基盤となる遺伝子解析技術にはマイクロアレイと次世代シーケンスがある。

Verigene<sup>®</sup> System (Nanosphere 社) は金ナノ粒子に基づく遺伝子検出技術とマイクロアレイを用いた多項目同時検出が可能な全自動遺伝子解析システムである。病状から起炎菌の同定が困難な呼吸器感染症病原体や腸管感染症の病原体を臨床検体から網羅的に検出できる試薬、あるいは血液培養で検出されたグラム陽性菌やグラム陰性菌から起炎菌と耐性遺伝子を培養液から直接検出可能な試薬などが開発されている [<http://www.nanosphere.us>]。

次世代シーケンス法とよばれる、非常に多数の遺伝子をシーケンス解析可能な機器の微生物遺伝子解析への応用が始まっている。パソジェニカジャパン株式会社の院内感染検出システムは次世代シーケンス法を応用した微生物遺伝子検出システムであり、このシステムは、12種類以上の病原体を2,000種以上の病原体遺伝子の配列を一度の分析で解析可能である。主要な院内感染起炎菌の薬剤耐性遺伝子、病原性遺伝子、さらには菌株識別 (タイピング) に関連する遺伝子など、非常に多量の遺伝子情報の解析が24時間以内に判定可能である [<http://pathogenica.co.jp>]。

遺伝子検査の今後の展望には期待するところが非常に大きいですが、コスト面については十分な議論が必要である。施設にとっては高価な機器の費用の問題があり、また医療経済的

表2 βラクタマーゼによる薬剤耐性グラム陰性桿菌の種類と検査法

βラクタマーゼ	ESBL (CTX-M, TEM, SHVなど)	プラスミド性Class C βラクタマーゼ (AmpC; CMY, MOXなど)	MBL (IMP, VIM, NDMなど)	KPC	OXA
βラクタマーゼ分類	class A	class C	class B	class A	class D
おもな細菌	腸内細菌科(大腸菌, クレブシエラ, プロテウス等)	腸内細菌科(大腸菌, クレブシエラ等)	IMPやVIMは緑膿菌, アシネトバクター等非発酵菌, NDMは腸内細菌科	<i>K. pneumoniae</i> 等	アシネトバクター等
おもな薬剤耐性	すべてのペニシリン系, セファロスポリン系(アミノグリコシド, キノロン耐性率高い)	多くのペニシリン, セフェム系(アミノグリコシド, キノロン耐性率高い)	カルバペネムを含むすべてのβラクタム系(多くの株でアミノグリコシドおよびキノロン耐性)		
頻度	大腸菌の約10%	不明(1~5%?)	数%以内	わが国ではまれ	
治療薬	カルバペネム, アミノグリコシド, キノロン	カルバペネム, アミノグリコシド, キノロン	コリスチン, チゲサイクリン(緑膿菌以外)	コリスチン, チゲサイクリン	
特異的な検査法	βラクタマーゼ阻害薬(CVA)によるESBLの阻害を確認	ボロン酸によるAmpCの阻害を確認	メルカプト酢酸ナトリウム(SMA)による酵素の阻害を確認	Modified Hodge Testによる確認	特になし(薬剤感受性から推定し, 遺伝子検査にて確認)
スクリーニング培地	chromID ESBL/シスメックス・ビオメリュー	—	CHROMagar MDRP/関東化学	—	—

ESBL:extended spectrum beta lactamase (基質拡張型βラクタマーゼ), KPC:*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, MBL:metallo beta lactamase, MDRP:multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (多剤耐性緑膿菌)  
 コリスチンは2013年11月現在わが国では未承認である。

には高額化する検査費用についてどこまで保険収載されるのかが、今後の重要な検討課題となろう。

### 薬剤耐性菌検査

薬剤耐性菌とは、本来は感受性の抗菌薬が何らかの薬剤耐性化メカニズムにより、耐性化したものである。特に多剤耐性菌(通常有効とされる3系統以上の抗菌薬に耐性化した菌)は、感染対策上大きな問題となっている。わが国において、グラム陽性菌では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*;MRSA)やバンコマイシン耐性腸球菌(*vancomycin-resistant Enterococcus*;VRE)などが、またグラム陰性菌では、ESBL産生大腸菌、MBL産生緑膿菌などの多剤耐性緑膿菌(*multidrug-resistant Pseudomonas*

*aeruginosa*;MDRP), 最近では多剤耐性*Acinetobacter baumannii* (MDRAB)なども問題となっている。

特に最近では、高度薬剤耐性βラクタマーゼを獲得し、多剤耐性となるグラム陰性菌が問題となっている。先に述べた耐性菌の他に、プラスミド性class Cβラクタマーゼ(AmpC)産生菌、*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)産生*K. pneumoniae*など多様な薬剤耐性菌の出現により、検査室の負担が増加している。確定診断としては遺伝子検査が必要となるが、病院検査室においては通常は表現型にて判断されることとなる。

表2に現在わが国で問題となっている獲得型のβラクタマーゼの種類と検査法について示す。カルバペネム系抗菌薬はβラクタマーゼに比較的抵抗性であり、ESBL産生菌やプ

表3 おもな迅速抗原検査キット

	病原体	測定原理	使用検体
一般細菌真菌	溶血性連鎖球菌	IC	咽頭ぬぐい液
	肺炎球菌	IC	喀痰, 咽頭ぬぐい液, 耳漏, 鼻汁など
	肺炎球菌 (尿中抗原)	IC	尿
	大腸菌 O157	IC	糞便, 培養検体
	クロストリジウム・ディフィシル	IC	糞便 (毒素/菌体抗原)
	レジオネラ (尿中抗原)	IC	尿 (レジオネラ・ニューモフィラ血清型1)
	クリプトコッカス	LA	血清, 髄液
	マイコプラズマ・ニューモニア	IC	咽頭ぬぐい液
ウイルス	RSウイルス	IC	鼻腔ぬぐい液
	アデノウイルス	IC	咽頭ぬぐい液, 角結膜ぬぐい液
	インフルエンザウイルス A/B	IC	鼻腔ぬぐい液
	ノロウイルス	IC	糞便
	ロタウイルス	IC	糞便

IC:immuno chromatography (イムノクロマトグラフィ), LA:latex agglutination (ラテックス凝集法)

ラスミド性AmpC産生株に対して有効である。一方で、MBLやKPC、OXAなどはカルバペネム耐性すなわちβラクタマーゼ阻害薬配合薬も含むすべてのβラクタム系薬に対して耐性を示す。さらにこれらの耐性菌は、アミノグリコシド系薬やキノロン系薬に対しても耐性を示すことが多く、結果的に多剤耐性菌となる。治療薬は非常に限られ、コリスチンやチゲサイクリンなどが有効である。

検査法としては、ESBLおよびMBL産生菌に関してはわが国で比較的頻度が高く、βラクタマーゼ阻害薬を用いて阻害反応で判定するDDST (double disc synergy test) が普及し、多くの検査室で行われている (詳細は成書等<sup>3)</sup>参照)。プラスミド性AmpCについては、ボロン酸による阻害反応で確認する方法が推奨されている。またKPCはまだわが国ではまれな耐性菌であるが、Modified Hodge Testによって確認可能である。多剤耐性アシネトバクター (MDRAB) については表現型による判定は困難であり、薬剤感受性検査結果に基づく推測と遺伝子検査による確認が必要であ

る。

薬剤耐性菌をより積極的に発見するためのスクリーニング培地の開発も進んでいる。MRSA (MRSA 選択培地 (BD社), CHROMagar MRSA スクリーン培地 (関東化学), chromID MRSA (シスメックス・バイオメリユー), 等), VRE (VRE 選択培地 (BD社), chromID VRE New (シスメックス・バイオメリユー), 等) が利用されてきた。最近では、ESBL (chromID ESBL (シスメックス・バイオメリユー)) やMDRP (CHROMagar MDRP スクリーン培地 (関東化学)) などのスクリーニング培地も開発されている。また欧米では耐性菌スクリーニングのための遺伝子解析機器試薬の開発も進んでいる (GeneOhm<sup>®</sup> system (BD社))。

### 迅速検査 (表3)

特定の微生物や、培養で検出が困難なウイルスなどの病原体の検出のための抗原検査キットが開発されている。ほとんどがイムノクロマトグラフィを用いたキットとなっており、POCT検査として用いることが可能であ

る。検体は病変部位から採取することが原則となるが、肺炎球菌やレジオネラなどでは尿中抗原で検出するキットもある。

クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) は、毒素抗原検査キットのみが発売されていたが、毒素 (AおよびB) と菌体抗原 (GDH抗原) を同時に測定可能なキット (C. DIFF QUIK CHEK コンプリート<sup>®</sup>, アリーアメディカル) が開発され発売された。本キットの菌体抗原の感度は非常に良好で培養検査とほぼ同等の感度を示す。一方で、毒素抗原キットの感度は50~70%程度にとどまり、結果的に偽陰性率は高い。現時点では、GDH陽性毒素陰性の場合には、培養検査を行い、培養された菌の毒素産生を確認する必要がある。将来的には欧米で既に使用されている遺伝子検査 (The illumigene 〈Meridian社〉, GeneOhm<sup>™</sup> 〈BD社〉, GeneXpert 〈Cepheid社〉等) による迅速診断についても導入が必要と考えられる<sup>4)</sup>。

マイコプラズマの迅速診断は、これまで血清IgM抗体検出法 (イムノカードマイコプラズマ抗体 〈TFB社〉) が用いられてきたが、急性感染症の診断精度が劣ることが報告されてきた<sup>5)</sup>。このため確定診断のためには感度や迅速性の劣る培養検査や保険適応外であるが遺伝子検査 (LAMP) などが行われてきた。2013年マイコプラズマ抗原キット (リボテスト<sup>®</sup>マイコプラズマ 〈TFB社〉, プライムチェック<sup>®</sup>マイコプラズマ抗原 〈アルフレッサ社〉) が開発され承認された。遺伝子検査に相当する感度特異度を示すとされるが、今後の臨床データの集積が注目される。

ノロウイルス抗原については、クイックナビ-ノロ (デンカ生研) のみが利用可能であったが、次世代の試薬としてクイックナビ-ノロ2 (デンカ生研), イムノキャッチ-ノロ (栄研化学), GEテストイムノクロマト-ノロ (ニッスイ) が承認され、さらなる感度特異度の向上が期待される。

## 関連検査

炎症マーカーのトピックはプロカルシトニン (procalcitonin; PCT) の臨床応用があげられる。本マーカーはCRPやエンドトキシンなどのマーカーと比べて細菌感染症の診断において特異性が高く、PCTの値と重症度とがある程度相関するとされる。PCTを指標として感染症の治療を行うことにより、予後を悪化させることなくより早期に治療を中止可能であるとの報告もある。しかしながらメタ解析では感度77%、特異度79%との報告<sup>6)</sup>もあり、既存のマーカーと同様にこれのみを過大評価せず、指標の一つとして利用すべきである。今後さらに臨床的有用性の高いマーカーの開発も期待される。

## おわりに

質量分析や遺伝子解析技術などの最新の技術開発が微生物検査にも次々と導入されている。将来的にはより迅速かつ正確な起炎菌あるいは感染症の病態診断が可能となると期待される。治療困難な感染症の克服のためには、検査技術の進歩とともに、それを利用する臨床医も感染症診療の技術を向上させていく必要がある。

- 文献 1) 日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会 (編): 抗酸菌検査指針2007, 財団法人結核予防会, 2007  
 2) Clark AE, et al.: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 26:547-603, 2013  
 3) 日本臨床微生物学会: 多剤耐性菌検査の手引き. 日本臨床微生物学会 Web site (<http://www.jscm.org/tazaitaisei/index.html>) (2013年12月閲覧)  
 4) Culbreath K, et al.: Evolution of testing algorithms at a university hospital for detection

of *Clostridium difficile* infections. J Clin Microbiol 50:3073-3076, 2012

- 5) 成田光生：マイコプラズマ感染症診断におけるIgM抗体迅速検出法の有用性と限界 感染症誌81:149-154, 2007
- 6) Wacker C, et al.: Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 13:426-435, 2013

著者連絡先 (〒920-0293) 石川県河北郡内灘町大学1-1 金沢医科大学 臨床感染症学 飯沼由嗣

## 書 評

### 実地医家ならこれを読め！ PPI（プロトンポンプ阻害薬）治療のコツがわかる本

木下芳一／高橋信一・編

定 価 2,625円 (本体2,500円+税)  
発 行 2013年9月  
判型/ページ A5/136ページ  
ISBN 978-4-524-26905-1

胃酸分泌抑制薬の1つであるプロトンポンプ阻害薬（PPI）は、消化性潰瘍、食道胃逆流症（GERD）、ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）の除菌療法など日常診療で幅広く使われるようになった薬剤である。振り返ると、わが国での胃酸分泌抑制薬の歴史は、1982年のH<sub>2</sub>受容体拮抗薬の1つであるシメチジンの登場により大きく変わり、強力な胃酸分泌抑制作用により、入院加療を要した消化性潰瘍が外来で治療できる疾患となった。その後、H<sub>2</sub>受容体拮抗薬では治癒しない難治性潰瘍や、より強い胃酸分泌抑制が必要であるGERDの増加が問題となり、最初のPPI、オメプラゾールが1991年に登場した。その後、ランソプラゾール、ラベプラゾール、さらにエソメプラゾールと、現在、日本では4剤のPPIが市場に出ている。このようにPPIが数多く登場し、さらに使用する頻度が増えている背景には、萎縮性胃炎をもとに低酸あるいは無酸であった日本人の胃酸分泌が、ピロリ菌感染率の低下や食生活の欧米化により高まり、さらに高齢者人口の増加とともに、消化管出血として発症するNSAIDsや抗血小板薬、さらには抗凝固薬による消化管障害が著しく増加してきていることがある。

このたび南江堂より発売された本書であるが、一

言で言えば、編集者である木下芳一先生と高橋信一先生の臨床医としての素質と本質が表れた本であると言える。臨床で忙しい先生方は、厚いページ数の本は好まない。忙しい実臨床では、知りたいところにすぐにたどり着け、簡便に解説し答えを出してくれ、手軽に持ち運べ、置くのに場所を取らない、寝転んでも読める手引書が求められる。本書は、まさにその手引書にあたる。PPIとH<sub>2</sub>受容体拮抗薬との違いに始まり、GERDや薬剤による消化管障害でPPIの長期使用が多くなっている現況では、PPI長期使用の副作用も気になる場所であり、本書は最初にわかりやすく解説してくれている。その後、PPI 4剤の使い分け、GERD、ピロリ菌関連潰瘍、薬剤性潰瘍と解説は続き、ピロリ除菌療法についても要領よく記述されている。印象に残るカラフルな写真と図が豊富に使われ、さらに、「症例から学ぶPPIの上手な使い方」と要所にポイントが付けられており、木下先生、高橋先生の「やったぜ！」という微笑んだ顔が浮かぶ、臨床の温かさを感じる書籍である。消化器病を専門にしておられる先生はもとより、PPIを使う機会のある実地医家の先生にはぜひ身近に置き、一読いただきたい。

(川崎医科大学 消化管内科 教授 春間 賢)

# New PCR-Based Open Reading Frame Typing Method for Easy, Rapid, and Reliable Identification of *Acinetobacter baumannii* International Epidemic Clones without Performing Multilocus Sequence Typing

Masahiro Suzuki,<sup>a,b</sup> Eriko Hosoba,<sup>c</sup> Mari Matsui,<sup>d</sup> Yoshichika Arakawa<sup>b</sup>

Laboratory of Bacteriology, Aichi Prefectural Institute of Public Health, Nagoya, Japan<sup>a</sup>; Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan<sup>b</sup>; Department of Infectious Diseases and Immunology, Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan<sup>c</sup>; Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan<sup>d</sup>

Antimicrobial resistance issues have become a global health concern. The rapid identification of multidrug-resistant microbes, which depends on microbial genomic information, is essential for overcoming growing antimicrobial resistance challenges. However, genotyping methods, such as multilocus sequence typing (MLST), for identifying international epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* are not easily performed as routine tests in ordinary clinical laboratories. In this study, we aimed to develop a novel genotyping method that can be performed in ordinary microbiology laboratories. Several open reading frames (ORFs) specific to certain bacterial genetic lineages or species, together with their unique distribution patterns on the chromosomes showing a good correlation with the results of MLST, were selected in *A. baumannii* and other *Acinetobacter* spp. by comparing their genomic data. The distribution patterns of the ORFs were visualized by agarose gel electrophoresis after multiplex PCR amplification and digitized. *A. baumannii* sequence types (STs) corresponding to international clones I and II were successfully discriminated from other STs and *Acinetobacter* species by detecting the distribution patterns of their ORFs using the multiplex PCR developed here. Since bacterial STs can be easily expressed as digitized numeric data with plus (+) expressed as 1 and minus (−) expressed as 0, the results of the method can be easily compared with those obtained by different tests or laboratories. This PCR-based ORF typing (POT) method can easily and rapidly identify international epidemic clones of *A. baumannii* and differentiate this microbe from other *Acinetobacter* spp. Since this POT method is easy enough to be performed even in ordinary clinical laboratories, it would also contribute to daily infection control measures and surveillance.

Antimicrobial resistance has become a global health concern. The World Health Organization has stated that weak or absent antimicrobial resistance surveillance and monitoring systems accelerate the emergence and spread of antimicrobial resistance (see <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>). One of the weak points of current antimicrobial resistance surveillance and monitoring systems is the absence of genetic data for the bacterial isolates. Microbial genotyping is indispensable for a precise understanding of the genetic lineages of clinical isolates that cause nosocomial outbreaks (1).

*Acinetobacter baumannii* is one of the major multidrug-resistant nosocomial pathogens. In particular, *A. baumannii* epidemic clones, the so-called international clones I and II, usually show multidrug resistance, and only limited antimicrobials are efficacious for treating infections caused by them (2). On the other hand, *A. baumannii* clinical isolates other than the epidemic international clones are still susceptible to several antimicrobials. The performance of appropriate precautions that target the epidemic clones is indispensable for blocking their further nosocomial transmission. Therefore, it has become very important to rapidly discriminate the *A. baumannii* epidemic clones from other nonepidemic *A. baumannii* lineages and non-*baumannii* *Acinetobacter* species, such as *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. In this regard, multilocus sequence typing (MLST) is indeed useful for the exact identification of the epidemic clones, which are classified into several sequence types (STs), such as ST1

and ST2, by MLST performed at the Institut Pasteur. ST1 and ST2 are also assigned to clonal complex 109 (CC109) and CC92, respectively, by the MLST of Bartual et al. (19) as reported by Zarrilli et al. (3) However, MLST of *Acinetobacter* clinical isolates can be performed only in limited cases of nosocomial outbreaks even in Japan, and this results in a delay in the ability to alert for the emergence and spread of epidemic clones in hospital settings. Early identification of epidemic clones of *A. baumannii* is very important especially in the areas where they have not been prevalent yet. Therefore, the establishment of easy and rapid genotyping methods has been much awaited.

The construction of new analytical methods that make it easy to obtain genetic information of clinical isolates in ordinary clinical laboratories is desired. We consider that the most convenient way to simplify microbial genotyping would be to display the re-

Received 12 April 2014 Returned for modification 6 May 2014

Accepted 28 May 2014

Published ahead of print 4 June 2014

Editor: R. Patel

Address correspondence to Yoshichika Arakawa, [arakawa@med.nagoya-u.ac.jp](mailto:arakawa@med.nagoya-u.ac.jp).

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01064-14>.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.01064-14



TABLE 1 ORF candidates relating to small genomic islets (SGI) and their distributions among the *A. baumannii* genomes<sup>a</sup>

SGI ORF candidate <sup>b</sup>	ORF corresponding to the SGI ORF candidates among the indicated <i>A. baumannii</i> strain (Pasteur sequence type, GenBank accession no.) <sup>c</sup>			
	AB0057 (ST1, CP001182)	ACICU (ST2, CP000863)	ATCC17978 (ST77slv <sup>d</sup> , CP000521)	SDF (ST17, CU468230)
ACICU_00180*		ACICU_00180 (100)	A1S_0157 (99)	
AB57_0388*	AB57_0388 (100)			
AB57_0454*	AB57_0454 (100)		Between A1S_0376 <sup>e</sup> and A1S_0378 (99)	Between ABSDF3133 and ABSDF3134 (98)
AB57_0526	AB57_0526 (100)			Between ABSDF 3067 and ABSDF3068 (99)
ACICU_00563*		ACICU_00563 (100)		ABSDF2963 (100)
AB57_0815*#	AB57_0815 (100)		A1S_0767 (99)	
AB57_1987	AB57_1987 (100)	ACICU_01794 (99)		ABSDF1977 (98)
AB57_2085	AB57_2085 (100)		Between A1S_1754 and A1S_1755 (96)	
ACICU_01870*#		ACICU_01870 (100)	A1S_1782 (95)	ABSDF1960 (96)
ACICU_02042*#		ACICU_02042 (100)	A1S_1927 (99)	
AB57_2484*#	AB57_2484 (100)	ACICU_02351 (98)		
ACICU_02468		ACICU_02468 (100)	A1S_2266 (99)	ABSDF1260 (97)
ACICU_02520*	Between AB57_2751 and AB57_2752 (99)	ACICU_02520 (100)	Between A1S_2318 and A1S_2319 (99)	
ACICU_02597		ACICU_02597 (100)		
AB57_2930	AB57_2930 (100)	ACICU_02697 (99)	A1S_2485 (98)	
ACICU_02886	AB57_3056 (96)	ACICU_02886 (100)	A1S_2641 (97)	
ACICU_02966*#		ACICU_02966 (100)	Between A1S_2707 and A1S_2708 (98)	ABSDF0764 (98)
AB57_3308*#	AB57_3308 (100)			
ACICU_03137*#		ACICU_03137 (100)		ABSDF0546 (98)
AB57_3624*	AB57_3624 (100)	ACICU_03369 (99)	Between A1S_3168 and A1S_3169 (99)	
ACICU_03379*		ACICU_03379 (100)		ABSDF0314 (95)
ACICU_03418*		ACICU_03418 (100)	Between A1S_3220 and A1S_3221 (99)	ABSDF0260 (100)
A1S_3257			A1S_3257 (100)	ABSDF3356 (98)
ACICU_03581*		ACICU_03581 (100)	A1S_3381 (99)	ABSDF3529 (99)

<sup>a</sup> SGI, small genomic islet.

<sup>b</sup> ORFs showing the same distribution patterns among clonal isolates are indicated by an asterisk (\*), and ORFs selected for PCR-based ORF typing are indicated by a hash tag (#).

<sup>c</sup> Numbers in parentheses are the percent sequence similarities over representative SGI ORFs listed in the first column.

<sup>d</sup> slv, single locus variant.

<sup>e</sup> When nucleotide sequences corresponding to an SGI ORF candidate are found in the genomes of some *A. baumannii* strains but they have not been named in the annotated genome data, the ORFs flanking the nucleotide sequence similar to the SGI ORF candidate are provided.

sults as “1” for “+” and “0” for “–”, the so-called binary typing, which does not require any further handling of specimens, such as performing nucleotide sequence analyses, counting the allelic repeats, or analyzing complicated restriction enzyme digestion patterns. We previously succeeded in developing a genotyping method for *Staphylococcus aureus* by detecting the distribution patterns of its open reading frames (ORFs) using multiplex PCR that can be replaced with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (4, 5). In the genotyping of *S. aureus*, the distribution patterns of small genomic islets (SGIs) showed good correlations with the clonal complex (CC) types obtained by MLST. SGIs consist of one to several ORFs (6). Therefore, we hypothesized that the CCs of *A. baumannii* and the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex might be also estimated or predicted by detecting the distribution patterns of SGIs specific to each *Acinetobacter* species. The distribution patterns of SGIs can easily be visualized by agarose gel electrophoresis after multiplex PCR; therefore, clone typing of isolates can be performed in many ordinary microbiology laboratories in which equipment for only PCR and agarose gel electrophoresis is available.

In the present study, therefore, we developed a new multiplex PCR-based method for easy, rapid, and reliable discrimination of

the clonal complexes of *A. baumannii*, especially the epidemic clones.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial isolates.** A total of 226 *Acinetobacter* clinical isolates collected from patients in Japan between 2001 and 2012, including 79 *A. baumannii*, 20 *A. pittii*, 77 *A. nosocomialis*, 15 *Acinetobacter* species close to *A. nosocomialis*, 24 *A. radioresistens*, three *A. ursingii*, three *A. bereziniae*, two *A. soli*, one *A. junii*, one *Acinetobacter* genomic species 13BJ, and one *Acinetobacter* genomic species 14BJ, were used. These isolates were identified using their *rpoB* gene sequence (7). Two American Type Culture Collection (ATCC) reference strains available in our laboratory (*A. baumannii* strains ATCC 19606 and ATCC BAA-1605) were also used. The 79 *A. baumannii* clinical isolates and two ATCC reference strains were analyzed by MLST. The isolates were cultured overnight on soy bean casein digest agar plates at 37°C, and chromosomal DNA was extracted with the QuickGene SP kit DNA tissue (SP-DT) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). MLST analysis was performed according to the protocol of the Institut Pasteur MLST databases (<http://www.pasteur.fr/mlst>). The clustering of related STs, which was defined as a CC, was determined with the aid of the eBURST program (<http://eburst.mlst.net/>).

For *Acinetobacter*-specific ORF screening, *Pseudomonas aeruginosa* strain JCM 14847, *Pseudomonas putida* strain JCM 13063, *Pseudomonas fluorescens* strain JCM 5963, *Pseudomonas stutzeri* strain JCM 5965, *Pseu-*

TABLE 2 Species-specific ORF candidates

ORF <sup>a</sup>	Contig no., nucleotide position <sup>b</sup>	No. found/no. tested for <i>Acinetobacter</i> organism:				
		<i>A. baumannii</i>	<i>A. pittii</i>	<i>A. nosocomialis</i>	<i>Acinetobacter</i> species close to <i>A. nosocomialis</i>	Other <i>Acinetobacter</i> species
pittii-1	9, 490–1095	0/8	0/4	0/8	0/4	NT <sup>c</sup>
pittii-2	19, 296023–297078	0/8	3/4	0/8	0/4	NT
pittii-3	21, 113290–112808	5/8	2/4	0/8	0/4	NT
pittii-4	23, 336772–337306	5/8	3/4	0/8	0/4	NT
pittii-5	23, 435468–436845	0/8	2/4	1/8	4/4	NT
pittii-6*	25, 270084–271118	0/81	19/20	0/77	0/15	0/35
pittii-7	26, 56553–57056	0/8	2/4	0/8	0/4	NT
pittii-8	31, 96908–97756	0/8	3/4	0/8	1/4	NT
pittii-9	31, 288435–286909	0/8	0/4	0/8	1/4	NT
nosocomialis-1	6, 48398–49115	0/8	0/4	7/8	0/4	NT
nosocomialis-2	12, 64890–63445	8/8	0/4	8/8	1/4	NT
nosocomialis-3*	90, 13009–11208	0/81	0/20	76/77	0/15	0/35
Asp-1*	12, 41330–40363	0/81	0/20	0/77	15/15	0/35
Asp-2	15, 52010–54341	0/8	0/4	0/8	0/4	NT
Asp-3	15, 207828–209480	0/8	0/4	0/8	0/4	NT
Asp-4	16, 155456–156670	0/8	0/4	0/8	1/4	NT
Asp-5	21, 98536–99348	0/8	0/4	0/8	0/4	NT

<sup>a</sup> The ORFs selected for species identification are indicated by an asterisk.

<sup>b</sup> ORFs were selected from *A. pittii* D499 (pittii-1 to -9 [GenBank accession no. AGFH000000000]), *A. nosocomialis* NCTC 8102 (nosocomialis-1 to -3 [GenBank accession no. AIEJ000000000]), and *Acinetobacter* species GG2 (Asp-1 to -5 [GenBank accession no. ALOW000000000]).

<sup>c</sup> NT, not tested.

*domonas nitroreducens* strain JCM 2782, *Azotobacter vinelandii* strain JCM 21475, and *Brevundimonas diminuta* strain JCM 2788 were used as a negative control. These strains were provided by the Japan Collection of Microorganisms, Riken BioResource Center (BRC), which participates in the National BioResource Project of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT). *Achromobacter xylosoxidans* and *Escherichia coli* clinical isolates were also used as a negative control.

**Searching small genomic islets from *A. baumannii* whole-genome sequences.** The whole-genome DNA sequences of six *A. baumannii* strains, AB0057 (DDBJ/EMBL/GenBank accession no. CP001182), AB307-0294 (GenBank accession no. CP001172), AYE (GenBank accession no. CU459141), ACICU (GenBank accession no. CP000863), ATCC 17978 (GenBank accession no. CP000521), and SDF (GenBank accession no. CU468230), were obtained from an Internet database (PubMed [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez]) and compared to each other using the MBGD website (http://mbgd.genome.ad.jp/) and blast+ (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA), with a tabular output option, and homologues were visualized by ACT (8). The nonconserved regions among the six strains were identified and selected as potential SGIs. Among the selected SGIs, those containing single to several ORFs without the presence of structures resembling insertion sequences, transposases, or integrases were selected for the determination of CCs. Nonconserved regions with larger structures, such as transposons, prophages, and antimicrobial resistance islands, were excluded. The distribution patterns of the SGI candidates (Table 1) were investigated by PCR using 42 *A. baumannii* representative clinical isolates and two ATCC strains.

**Searching species-specific ORFs from whole-genome sequences.** The whole-genome DNA sequences of four *A. pittii* (strains D499 [GenBank accession no. AGFH000000000], DSM 9306 [AIEF000000000], DSM 21653 [AIEK000000000], and SH024 [NZ\_ADCH000000000]), two *A. nosocomialis* (strains NCTC 8102 [AIEJ000000000] and RUH2624 [NZ\_ACQF000000000]), three *Acinetobacter calcoaceticus* (strains PHEA-2 [CP002177], DSM 30006 [NZ\_APQI000000000], and RUH2202 [NZ\_ACPK000000000]), one *A. bereziniae* (strain LMG 1003 [NZ\_AIEI000000000]), one *Acinetobacter haemolyticus* (strain ATCC 19194 [NZ\_ADMT000000000]), one *Acinetobacter johnsonii* (strain SH046

[NZ\_ACPL000000000]), one *A. junii* (strain SH025 [NZ\_ACPM000000000]), three *Acinetobacter lwoffii* (strains NCTC 5866 [AIEL000000000], SH145 [NZ\_ACPN000000000], and WJ10621 [NZ\_AFQY000000000]), one *Acinetobacter parvus* (strain DSM 16617 [AIEB000000000]), four *A. radioresistens* (strains DSM 6976 [AIDZ000000000], SH164 [NZ\_ACPO000000000], SK82 [NZ\_ACVR000000000], and WC-A-157 [ALIR000000000]), one *A. ursingii* (strain DSM 16037 [AIEA000000000]), one *Acinetobacter venetianus* (strain RAG-1 [AKIQ000000000]), and four *Acinetobacter* species that have not been given scientific names (GG2 [ALOW000000000], ATCC 27244 [ABYN000000000], HA [NZ\_AJXD000000000], and NBRC 100985 [NZ\_BAEB000000000]) and the genomic data of six *A. baumannii* isolates mentioned in the section above were obtained from PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez) and compared using blast+. ORFs showing high percent sequence similarities among all *Acinetobacter* species used in the method were selected as candidates of markers specific to *Acinetobacter* species. ORFs found only in *A. pittii*, *A. nosocomialis*, or *Acinetobacter* species close to *A. nosocomialis* (corresponding to strain GG2) genomes were selected as candidates of species-specific ORFs (Table 2). The presence of species-specific ORFs was screened by PCR for representative isolates, including eight *A. baumannii*, four *A. pittii*, eight *A. nosocomialis*, and four *Acinetobacter* species close to *A. nosocomialis*.

**Multiplex PCR detection of selected ORFs to identify international clones.** To maximize the discriminatory power and reliability of the identification of international clones, seven ORFs in separate SGIs were selected for multiplex PCR detection in order to identify international clones with a minimum difference of two bands in the detected ORF ladder patterns of other CCs among the isolates used in this study (Table 1).

For easy execution, the selected ORFs were detected by multiplex PCR, which we call PCR-based ORF typing (POT). The primer pairs for detecting ORFs in the seven SGIs, *Acinetobacter*-specific ORF, *bla*<sub>OXA-51</sub> (9), and three species-specific ORFs (Table 2) were designed for multiplex PCR detection (Table 3). As ORFs in SGIs were found among *A. pittii*, *A. nosocomialis*, and *Acinetobacter* spp. close to *A. nosocomialis*, as well as for *A. baumannii*, the primers were designed to adapt universally to those *Acinetobacter* species.

Template DNAs for multiplex PCR were prepared by suspending bac-

TABLE 3 Primers finally selected for multiplex PCR

Target ORF	Primer direction	Sequence (5' to 3') <sup>a</sup>	Final concn (μM)	Amplicon size (bp)
atpA	Forward	CTGAACCTAGAACAGGATTTCAGT	0.2	553
	Reverse	TCACGGAAGTATTCACCCAT	0.2	
OXA-51	Forward	GCTTCGACCTTCAAAATGCT	0.2	465
	Reverse	TCCAGTTAACCAGCCTACTTGT	0.2	
pittii-6	Forward	CATGTAGGTAGTCAAATGCCTG	0.2	401
	Reverse	CCGCTGGTGATGCTTTATTC	0.2	
nosocomialis-3	Forward	GTGATCGTGGTGATAGCTGG	0.2	362
	Reverse	GTAAGTTCCTGTTGCAACTCC	0.2	
Asp-1	Forward	GGATCTTTAACTCCATGGCTC	0.2	321
	Reverse	GATTATCrTGTAAATAACCAACGCAC	0.2	
AB57_2484	Forward	TATGTACAAAGCCAACCGGA	0.2	271
	Reverse	GAATTTGAGCdGAAGCCATTA	0.2	
ACICU_02042	Forward 1	CCGCGTCTTTCATAATAAGCAA	0.1	234
	Forward 2	CCACGTCTCTCATAATAAGCAA	0.1	
	Reverse 1	TGGAGAAATAGATTCTTCAAAAGTTGT	0.1	
	Reverse 2	TGCAGAAATAGATTCTTCAmAAATTGT	0.1	
ACICU_02966	Forward	ACCGTAyCCCTTTTAATAAGTTCA	0.2	189
	Reverse	GGGCAAACCTATCATAGTTATATCGAC	0.2	
ACICU_01870	Forward	GCTGCAACCCAACCAATwA	0.2	151
	Reverse	AATTGGCTTCGhTGGATATTTATG	0.2	
AB57_3308	Forward	GCAACAGTTTCAAAATTAATGG	0.2	122
	Reverse 1	ACTGTTTGATGGGTATTGCAG	0.1	
	Reverse 2	ACTGTTTGATAGGCATTGCAG	0.1	
ACICU_03137	Forward	CCyGCACTGCTCTACGATAATG	0.2	102
	Reverse	TTGyTCATAATGAAAAGCCGCA	0.2	
AB57_0815	Forward	CTTTAGAmGAGGCACGTTGGTTTG	0.2	81
	Reverse	TTTCACAyGGCTCACCGT	0.2	

<sup>a</sup> Mixed nucleotide residues were described according to a standard code (r, A/G; d, A/G/T; m, A/C; y, C/T; w, A/T; h, A/C/T).

terial cells in 100 μl of Tris-EDTA buffer (pH 8.0) at a turbidity of McFarland standard 0.5 to 2, heating at 100°C for 10 min, and centrifugation at 14,000 rpm (approximately 15,000 × g) for 1 min. Next, POT was carried out with the four thermal cyclers, i.e., GeneAmp PCR system 9700 (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan), Applied Biosystems 2720 (Life Technologies Japan), GeneAtlas 322 (Astec, Fukuoka, Japan), and the Thermal Cycler Dice Gradient (TaKaRa Bio, Otsu, Japan), to validate their compatibility on the same platforms. The primer mixture was prepared by mixing all primers listed in Table 3 to 100× the final concentration. PCR was carried out in a 20-μl mixture containing 2 μl of the heat extract template DNA, prepared as described above, PCR buffer (3 mM Mg<sup>2+</sup>), 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.8 units of FastStart Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and 0.2 μl of the primer mixture. The sequences and final concentrations of the primers are shown in Table 3. All four DNA preparations extracted from clinical *A. baumannii* (POT 122 [ST2] in Table 4), *A. pittii* (POT 78 in Table 4), *A. nosocomialis* (POT 105 in Table 4), and *Acinetobacter* spp. close to *A. nosocomialis* (POT 105 in Table 4) were mixed and used as the DNA template for both the positive control and the ladder marker in PCR. The thermal conditions were as follows: 95°C for 10 min, 30 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 2 min, and then at 4°C for several hours before agarose gel electrophoresis. The PCR products (2 μl)

were electrophoresed on 4% agarose gels (NuSieve 3:1; Lonza, Basel, Switzerland) in 0.5× Tris-borate-EDTA (TBE) at 100 V for 50 min; the bands were then visualized with ethidium bromide.

After PCR, the seven SGI ORFs were scored in the order of their PCR amplicon size, with either “1” for “+” or “0” for “-” (binary code), depending on the presence or absence, respectively, of the band of amplicon DNA. These scores were then converted to decimal numbers, i.e., POT numbers. The results of each SGI binary were multiplied by 2<sup>n</sup> ( $n = 6 - 0$ ) and added. For example, the binary code of ST2 (1111010) was converted to 122 as follows:  $1 \times 64 + 1 \times 32 + 1 \times 16 + 1 \times 8 + 0 \times 4 + 1 \times 2 + 0 \times 1$ . Furthermore, each POT number was represented by a numerical label, ranging from a POT of 0 (0000000) to a POT of 127 (1111111).

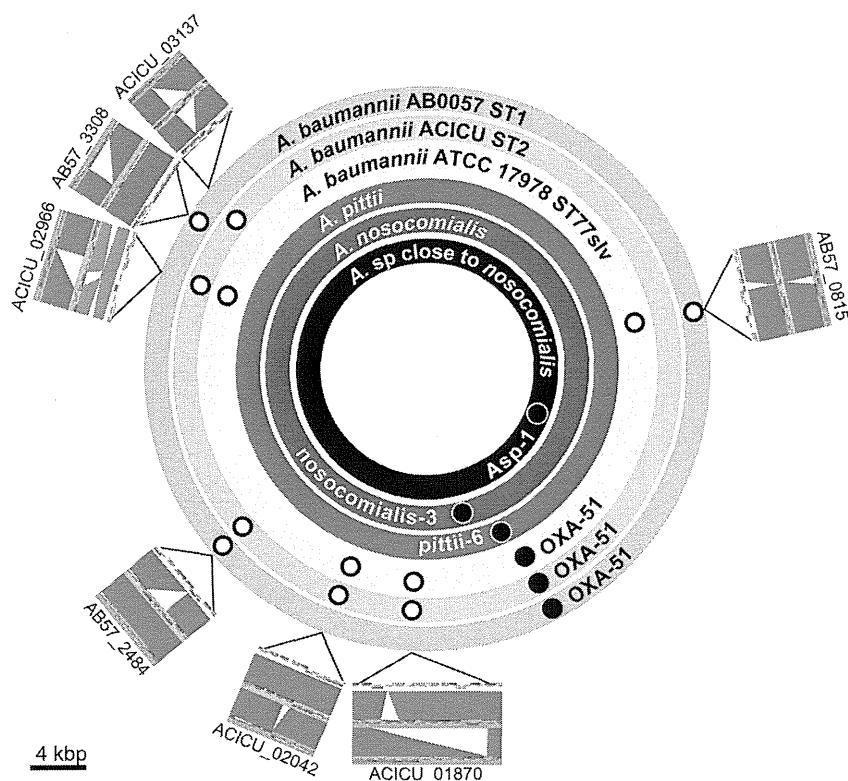
## RESULTS

A total of 24 SGI candidates (Table 1) were selected by comparing the whole-genome data of the six *A. baumannii* strains (AB0057, AB307-0294, AYE, ACICU, ATCC 17978, and SDF). Highly conserved (95 to 100% sequence similarity) DNA sequences were found in most of the SGIs of the six *A. baumannii* strains checked, and nucleotide sequence identities were also observed among

TABLE 4 Correlations between MLST and ORFs used for POT

POT no.	ST (CC or allele profile)	No. of isolates	Presence or absence of ORFs for the POT analysis by group:											
			ORFs for identification of bacterial species <sup>a</sup>					ORFs for calculation of POT no. <sup>b</sup>						
			<i>atpA</i>	OXA-51	<i>pittii</i> -6	<i>nosocomialis</i> -3	<i>Asp</i> -1	AB57_2484	ACICU_02042	ACICU_02966	ACICU_01870	AB57_3308	ACICU_03137	AB57_0815
<i>A. baumannii</i>														
122	ST2 (CC2)	27	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
69	ST1 (CC1)	3	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
0	ST235 (CC33)	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	ST33 (CC33)	18	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
8	ST148	1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
32	CC33 (3-5-7-1-12-1-2)	2	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
32	ST239 (CC216)	1	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
44	New (1-4-2-1-42-1-4)	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
44	ST40	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
10	ST52	1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
40	CC10 (1-3-2-1-4-1-4)	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
41	ST49	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
56	ST142	1	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
72	ST152	4	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
73	ST212	1	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
92	ST246	1	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
96	CC216 (3-4-2-2-7-2-2)	1	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
104	ST34 (CC34)	9	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
104	New (27-2v-2v-1-9-2-5)	3	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
104	ST145 (CC216)	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
106	CC109 (3-4-2-2-9-1-5)	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
108	ST133	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>A. pittii</i>														
66	NA <sup>c</sup>	9	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
70	NA	1	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
74	NA	2	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
74	NA	1	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
76	NA	1	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
78	NA	6	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>A. nosocomialis</i>														
97	NA	1	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
104	NA	26	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
105	NA	49	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
105	NA	1	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
<i>Acinetobacter</i> species close to <i>A. nosocomialis</i>														
41	NA	7	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
105	NA	4	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
109	NA	2	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
125	NA	2	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+

<sup>a</sup> Five ORFs, i.e., *atpA*, OXA-51, *pittii*-6, *nosocomialis*-3, and *Asp*-1, were used in the identification of each *Acinetobacter* isolate.<sup>b</sup> Seven ORFs, i.e., AB57\_2484, ACICU\_02042, ACICU\_02966, ACICU\_01870, AB57\_3308, ACICU\_03137, and AB57\_0815, were used for calculation of the POT number of each isolate.<sup>c</sup> NA, not adopted.



**FIG 1** Distributions of small genomic islets and species-specific markers on genomes of representative strains. Open circles indicate SGIs, and closed circles indicate species-specific genetic markers. Locations of *atpA* selected as the universal marker of *Acinetobacter* species are not provided. The genome sequence data of *A. pittii*, *A. nosocomialis*, and *Acinetobacter* species close to *A. nosocomialis* are still draft data at present. The positions of each marker were decided by mapping the contigs containing markers on the basis of the genome of *A. baumannii* ACICU. Genome comparison maps illustrated by Artemis Comparison Tool (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/act/>) are arranged outside the circles, indicating genomes. The outer, second outer, and third outer rings indicate the genomes of *A. baumannii* AB0057, ACICU, and ATCC 17978, respectively. The dark-gray drawings in genome comparison maps indicate matches between the sequences, and the silver drawing in ACICU\_02966 indicates an inversion match. The calibration bar indicates 4 kbp on all seven genome comparison maps. A large color version of this figure with high resolution is available in Fig. S1 in the supplemental material.

other *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex strains, although the sequence similarities ranged from 80% to 97%.

Strains belonging to the same CC showed very similar distribution patterns in 16 of the 24 SGI ORFs (Table 1). The CC identities of strains belonging to the major CC were identified based on the distribution patterns of those 16 SGI ORFs. However, the distribution patterns of the 16 SGI ORFs in strains of Pasteur ST145 could not be distinguished from those of a novel ST (allele numbers 27-2v-2v-1-9-2-5).

SGI ORFs adopted for multiplex PCR amplification (Table 1) were selected according to the following principles. First, ORFs that were found exclusively in international clones I or II but were absent among most clones other than the epidemic ones were selected. The ORFs specific to international clone I were AB57\_0815 and AB57\_3308, and those specific to international clone II were ACICU\_02966 and ACICU\_03137. Thus, the international clones can be identified and distinguished by detecting the four ORFs AB57\_0815, AB57\_3308, ACICU\_02966, and ACICU\_03137. Second, three ORFs (AB57\_2484, ACICU\_02042, and ACICU\_01870) were selected, because their distribution patterns in the epidemic clones were divergent in at least two alleles compared with those found in other nonepidemic lineages. These 3 ORFs were finally adopted to improve the discriminatory power of the test. The distribution patterns of the 7 SGI ORFs among the

*A. baumannii* clones and *Acinetobacter* species are shown in Fig. 1 and Table 4; see also Fig. S1 in the supplemental material.

Two ORFs (*atpA* and *sucD*) were selected as the candidates for universal markers of *Acinetobacter* species by comparing whole-genome sequences. These alleles were found among all *Acinetobacter* species in the BLAST databases (whole-genome sequencing [WGS] database as of 8 May 2013) showing higher percent sequence similarities (>80%) than other orthologs. *atpA* was finally chosen as the marker specific to *Acinetobacter* species and the marker for the internal control of PCR amplification.

Genetic markers specific to *A. pittii*, *A. nosocomialis*, and *Acinetobacter* spp. close to *A. nosocomialis* were also searched for their whole-genome data. ORFs designated pittii-6, nosocomialis-3, and Asp-1 (Table 2) were finally chosen as markers specific to *A. pittii*, *A. nosocomialis*, and *Acinetobacter* spp. close to *A. nosocomialis*, respectively (Table 2). The pittii-6 marker was chosen from nine candidate markers, and its specificity and sensitivity were 100% and 95%, respectively (Table 2). As pittii-6 was also found in *A. calcoaceticus* genome sequences, with an 83% sequence similarity in its nucleotide sequence level, primers were designed for the specific detection of *A. pittii*. The nosocomialis-3 marker was chosen from 3 candidates, and its specificity and sensitivity were 100% and 99%, respectively. The Asp-1 marker was chosen from

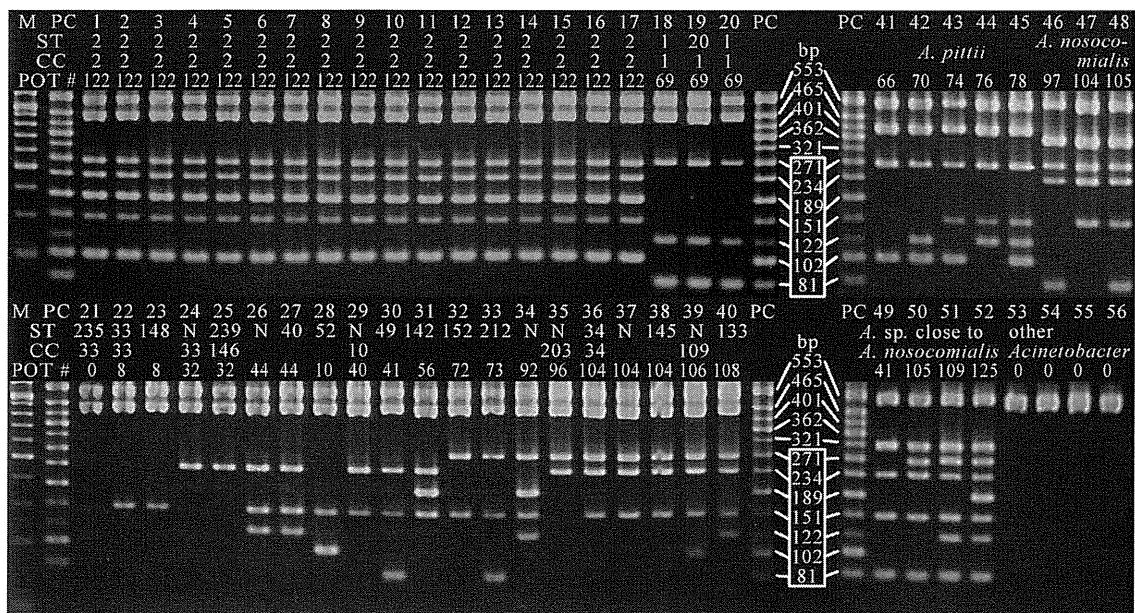


FIG 2 Agarose gel electrophoresis patterns of PCR-based ORF typing using 12-plex PCR. Lane M, 50-bp ladder marker; lane PC, positive control; lanes 1 to 40, *A. baumannii*; lanes 41 to 45, *A. pittii*; lanes 46 to 48, *A. nosocomialis*; lanes 49 to 52, *Acinetobacter* species close to *A. nosocomialis*; lane 53, *A. radioresistens*; lane 54, *A. ursingii*; lane 55, *A. bereziniae*; lane 56, *A. soli*. International clones II (lanes 1 to 17) and I (lanes 18 to 20) showed unique patterns and can be distinguished from other *A. baumannii* clones (lanes 21 to 40) and other *Acinetobacter* species (lanes 41 to 56). The POT numbers of both *A. baumannii* ST49 (lane 30) and an *Acinetobacter* species close to *A. nosocomialis* (lane 49) become 41, but these isolates can apparently be discriminated from each other by the ladder patterns of the upper 5 fragments of each isolate is shown in the white box. The binary numbers corresponding to each band were 1 for 81 bp, 2 for 102 bp, 4 for 122 bp, 8 for 151 bp, 16 for 189 bp, 32 for 234 bp, and 64 for 271 bp, from the bottom of the ladder in the box. The remaining 5 bands from 321 bp to 553 bp were used for the identification of *Acinetobacter* spp.

5 candidates, and its specificity and sensitivity were 100% and 100%, respectively.

The ladder patterns of the PCR amplicons described above were clearly distinguishable by the 12-plex PCR established as the POT in the present study (Fig. 2). The same results were obtained by all four thermal cyclers we evaluated. To substantiate the 12-plex PCR, 44 *A. baumannii* strains used for SGI ORF screening were tested by both monoplex PCR and POT, and complete data agreement was observed between the two methods.

A total of 81 *A. baumannii* strains, which have been classified into 18 CCs by MLST, were analyzed by the POT method. International clones I and II were distinguished from other genetic lineages with more than two differences in the bands of their ladder patterns. According to the ladder patterns of seven ORFs, *A. baumannii* strains were classified into 17 POT types, 11 of which exhibited one-to-one correspondence to the CCs. Moreover, clinically isolated *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* can be classified into three to five POT types at present (Table 4).

## DISCUSSION

In the present study, we first showed that the newly established POT is capable of rapidly identifying *A. baumannii* international clones in ordinary clinical laboratories without performing nucleotide sequencing analyses of multiple genes as with MLST. To increase the feasibility of the test, the number of SGI ORFs adopted for POT was optimized. International clones I and II were fully distinguished by this method from other clones or lineages of *Acinetobacter* species. Moreover, the CCs of *A. baumannii* can be estimated by POT. The discriminatory power of POT can be con-

trolled by optimizing the number of ORFs and loci selected for analysis. Such a newly developed POT method that compares the distribution patterns of ORFs and/or SGIs in each clinical isolate may well promise to be an easy and rapid genotyping method for identifying bacterial genetic lineages and molecular epidemiology, which is feasible in ordinary clinical microbiology laboratories.

Indeed, several methods to identify international clones using PCR have been reported (10, 11). However, they cannot identify newly emerging multidrug-resistant epidemic clones that might spread in the future. In fact, multidrug-resistant isolates other than the *A. baumannii* international clones have been reported (12–18). The POT method constructed in the present study is applicable to the identification of new CCs of *A. baumannii* or *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex species, including *A. nosocomialis* and *A. pittii*, in the future.

Although SGIs were first reported from *Salmonella enterica* in 2001 by whole-genome analysis (6), little attention has been paid to them so far. Using genomic comparisons of *S. aureus* strains, we found that the distribution patterns of SGI ORFs correlate with the clonal complex in *S. aureus* (5). In the present study, it was also proven that the distribution patterns of ORFs in SGIs correlated well with the CCs in *A. baumannii*. This finding indicates that a very similar concept can be applicable even to various bacterial genera, and that close correlations between the distribution patterns of SGIs and CCs may be a general phenomenon in the microbial world. In fact, the CCs of *P. aeruginosa* were successfully predicted with a strategy and protocol similar to those of the POT constructed in the present study (M. Suzuki and Y. Iinuma, unpublished data).