

MLVA 法を用いた ND, a, ND 型腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例由来株の分子疫学的解析法の検討

古田 喜美 下村 佳 河本 秀一* 石村 勝之
国井 悦子 吉野谷 進 谷口 正昭 萱島 隆之
笠間 良雄 松本 勝 荻野 武雄

腸管出血性大腸菌(STEC)感染事例に対して、より精度の高い分子疫学的解析方法を確立するために、2004年7月中旬から8月中旬にかけて、広島市(7事例)、岡山県(15事例)、山口県(1事例)、および徳島県(3事例)で発生したパルスネットパターン No.292 の ND, a, ND 型による STEC O157:H7 感染症由来株について検討した。計 26 事例から分離した 27 株について Xba I によるパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)に加え、Bln I による PFGE、薬剤感受性試験、Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA) による解析を行った。Xba I による PFGE 解析では 2 種類のクラスタに分類されたが、すべての株の相似度は 95.5% と高い値を示した。Bln I では 3 種類のクラスタに分類され、岡山県の 3 株は他の株と比較し 84.3% の低い相似度を示した。薬剤感受性試験では供試 12 薬剤すべてに感受性を示した。MLVA では、解析可能な波形ピークを用いて Fingerprinting で系統樹解析を行った結果、5 種類に分類された。Xba I および Bln I による PFGE と MLVA による分類を総合すると、供試株は 11 種類に分類された。以上の結果から、Xba I による PFGE 解析で同じパターンを示す STEC は、Bln I による PFGE および MLVA を併用することで、より詳細に分類することが可能であることが示された。

キーワード： MLVA, VNTR(s), PFGE, パルスネット, 分子疫学的解析

はじめに

広域散在型食中毒事例等への迅速対応を目的として、各地方衛生研究所(地研)の分離菌株を国立感染症研究所(感染研)に収集してパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析するシステム(パルスネット)の構築が進み、自治体をまたぐ分散型集団事例(diffuse outbreak)の把握に効果をあげている。

しかし一方、パルスネットにおける PFGE 解析は、全国の多くの分離株の遺伝子型分類を行うため、Xba I の 1 種類の制限酵素の切断パターンの比較により分類が行われるが、同じ遺伝子型に分類される株が、他の制限酵素による PFGE において泳動パターンに違いが認められることがあるなど、より詳細な疫学解析を行うためには、場合により、本法のみの解析では不十分であることが指摘されている。従って、パルスネットにおける同じ遺伝

子型の STEC 感染症をさらに細かく分類し、より精度の高い疫学調査を可能とするためには、解析能の高い他の疫学マーカーの併用が不可欠である。

近年 DNA 多型解析法の 1 つとして細菌の DNA に存在する縦列反復塩基配列(Variable-Number Tandem-Repeats)を利用した Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis(MLVA)が開発され、*Neisseria meningitidis*¹⁾、*Enterococcus faecalis*²⁾、*Haemophilus influenzae*³⁾、*Bacillus anthracis*⁴⁾、*Yersinia pestis*⁵⁾⁶⁾、*Francisella tularensis*⁷⁾⁸⁾、*Borrelia* 属菌⁹⁾、*Xylella fastidiosa*¹⁰⁾、*Salmonella Typhimurium*¹¹⁾、*Salmonella Typhi*¹²⁾、*Pseudomonas aeruginosa*¹³⁾、*Legionella pneumophila*¹⁴⁾、*Burcella* 属菌¹⁵⁾、*Staphylococcus aureus*¹⁶⁾¹⁷⁾、*Mycobacterium tuberculosis*¹⁸⁾、*Bordetella pertussis*¹⁹⁾、*Leptospira interrogans*²⁰⁾、*Mycobacterium leprae*²¹⁾ など、多種類の細菌における DNA 多型解析で有用性を示す報告がなされている。2003 年に Bjorn-Arne Lindstedt ら²²⁾は、堺株も含めた 73 株の O157:H7

*：現 社会局保健部食品保健課

表1 2004年7月～8月発生のND, a,ND型O157:H7感染事例

発生場所	事例番号	菌株No	??	年齢	発症年月
広島市	事例1	広島04042	M	10	8/2
	事例1	広島04043	F	41	8/3
	事例2	広島04044	F	60	8/8
	事例3	広島04051	M	19	8/16
	事例4	広島04054	M	29	8/15
	事例5	広島04055	M	24	8/20
	事例6	広島04056	F	14	8/21
	事例7	広島04059	M	20	8/22
岡山県	事例8	岡山880	M	8	7/27
	事例9	岡山881	F	5	7/26
	事例10	岡山882	M	12	7/29
	事例11	岡山884	F	27	7/22
	事例12	岡山888	M	13	7/31
	事例13	岡山889	M	70	8/1
	事例14	岡山896	F	74	7/30
	事例15	岡山897	F	23	7/29
	事例16	岡山900	F	9	8/3
	事例17	岡山902	F	63	8/3
	事例18	岡山907	F	21	8/11
	事例19	岡山908	F	12	8/1
	事例20	岡山909	M	58	8/1
	事例21	岡山911	F	50	8/9
	事例22	岡山913	M	22	8/9
山口県	事例23	山口04Y26	M	36	8/13
徳島県	事例24	徳島1	F	18	7/19
	事例25	徳島2	F	17	7/27
	事例26	徳島3	F	33	8/14

株を用いた MLVA 法の有用性を示し、2004 年には改良された O157:H7 の MLVA 法を報告した²³⁾。

そこで、2004 年 7 月中旬から 8 月下旬にかけて中国・四国地域で発生したパルスネットパターン No.292 の ND, a,ND 型, STEC O157:H7 感染事例として、広島県内 7 事例 8 株と岡山県内 15 事例 15 株, 山口県内 1 事例 1 株, および徳島県内 3 事例 3 株を収集し, Xba I, Bln I による PFGE 解析および薬剤感受性試験に MLVA 解析を加え、これらの事例からの分離株の相同性を検証することにより, MLVA 解析の疫学マーカーとしての有用性を検討した。

供試菌株は、2004 年 7 月中旬から 8 月下旬に発生した広島市内の散発事例 8 件 8 株, 岡山県内 15 事例 15 株, 山口県内 1 事例 1 株, 徳島県内 3 事例 3 株の計 26 事例 27 株の O157:H7 (stx1, stx2) を用いた(表 1)。

2 PFGE 解析

PFGE は、感染研の示した PFGE New Protocol (以下, 新 PFGE 法) に準じて実施した。すなわち, トリプトソイブロス(TSB)で 37℃, 1 夜静置培養した菌液 200 μl を 12,000rpm, 5 分間遠沈後, 沈渣を滅菌蒸留水 200 μl に懸濁し, 等量の 1% Seakem R Gold agarose を加え, サンプルプラグキャストを用いて厚み 0.7mm のプラグを調製した。1%N-lauroylsarcosine 加 1mg/ml proteinase K 処理は 50℃ で 4～6 時間, 4mM Pefabloc SC 加 TE での

方 法

1 供試菌株

洗浄は 50 で 30 分間 2 回, TE 洗浄は氷上で 30 分間 1 回とした。制限酵素処理は Xba I で 50units/sample, Bln I で 50units/sample とし, 37 18 ~ 20 時間処理した。泳動装置は GenePath system(Bio-Rad)を使用し, ゲルは 1%Seakem[®] Gold agarose, 泳動バッファーは 0.5×TBE を用いた。電圧 6.0V/cm, パルスタイム 2.2-54.2s(linear ramp) 水温 12 の条件で 19 時間泳動後 0.5 μg/ml ethidium bromide で染色して写真撮影した。PFGE 画像は画像解析ソフト Fingerprinting (Bio-Rad) を用いて解析した。

3 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は SM(ストレプトマイシン), KM(カナマイシン), TC(テトラサイクリン), ABPC(アンピシリン), NA(ナリジクス酸), CP(クロラムフェニコール), CIP(シプロフロキサシン), CTX(セフォタキシム), ST(SXT 合剤), TMP(トリメトプリム), GM(ゲンタマイシン), FOM(ホスホマイシンの 12 薬剤についてセンシディスク (BBL) を用いて National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 法に準拠し, 1 濃度ディスク法で行った。

4 MLVA 解析

MLVA は, Bjorn-Arne Lindstedt らの方法²³⁾に従った。すなわち O157:H7 の染色体上に存在する 6 種類の Variable-Number Tandem-Repeats (VNTRs) とプラスミド上に存在する 1 種類の VNTR を増幅させるプライマーを用いて行った。プライマーセットは表 2 に示したとおり, Vhec1 ~ 7 の 7 種類で,

表 2 プライマー

名称	配列
Vhec1	-F: 5' -HEX-AGCCCGCAGTTGATACCTACG-3'
	-R: 5' -GATGCCGGATGAAAATGATAAGTT-3'
Vhec2	-F: 5' -TET-AACCGTTATGAAAGAAAGTCCT-3'
	-R: 5' -TCGCCAGTAAGTATGAAATC-3'
Vhec3	-F: 5' -TET-GGCCGGATGGAAACTATGCTATT-3'
	-R: 5' -GCCGCTATTTTTAACCACTGACTA-3'
Vhec4	-F: 5' -FAM-ATCGCCTTCTTCCCTCCGTAATG-3'
	-R: 5' -CTCCTCGCGCTCAGACAGTG-3'
Vhec5	-F: 5' -FAM-CTCAGGCGCCGTTAAGGTGTAGC-3'
	-R: 5' -TCCGCGGAGTGCAGAGAAAATAAA-3'
Vhec6	-F: 5' -HEX-ACGTTAAACCCGGAATGGAAAATC-3'
	-R: 5' -GAGCGAAAAATGTCTATCTTGAGG-3'
Vhec7	-F: 5' -FAM-ATGCGCGTTAGCTACACGACA-3'
	-R: 5' -TGAAAGCCCACACCATGCGATAAT-3'

表 3 反応液の調製

プライマー(100 pmol/μl) : 各0.1 μl
10×Ex Taq Buffer : 1.2 μl
DW : 8 μl
dNTPs(2.5 mM) : 0.5 μl
Ex Taq Polymerase(5U/μl) : 0.1 μl
DNA template : 2 μl
全量 : 12 μl

それぞれのフォワードプライマーには蛍光色素が標識されており, Vhec1 及び 5 は HEX, Vhec2, 3 は TET, Vhec4, 5, 7 は FAM を標識したものを用いた。PCR 反応液の調製は表 3 に示した。菌液は 10 分間煮沸溶菌させ, 12000rpm, 5 分間遠沈した上清をテンプレートとして用い, PCR 反応液は, プライマー-Vhec1 3 4 5 を混合した Mix1 とプライマー-Vhec1 2 6 7 を混合した Mix2 の 1 検体につき 2 本の反応系で行った。PCR 反応条件は表 4 に示した。PCR 後 Mix1 および Mix2 の PCR 増幅産物各 1 μl を滅菌精製水 18 μl と混合し, 混合液 1 μl に, ホルムアミド 12 μl およびサイズマーカー 1 μl を加えて, ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)で 60, 40 分間の電気泳動を行い, GeneScan Analysis Software(Applied Biosystems)で解析を行った。デンドログラムは Fingerprinting で作成した。

結 果

1 PFGE 解析結果

供試 27 株は Xba I による解析によりクラスター A, B に大きく分類された(図 1)。両者の相似度は 95.5% であり, その PFGE パターンは 1 または 2 本程度のバンドにより目視的に違いが認められたが, 互いに区別することは困難であった。クラスター A に分類された 7 株はさらに A1 と A2 に分類され, A1 と A2 との相似度は 97.1%, 各クラスター内

表 4 PCR 反応条件

反応	温度	時間	cycle数
初期変性	94	15分	1
変性	94	30秒	} 25
アニーリング	63	90秒	
伸張	72	90秒	
伸張反応	72	10分	1

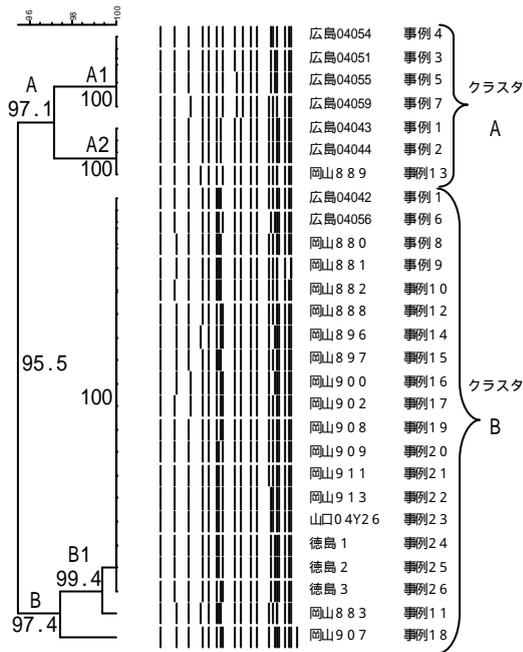


図1 PFGE(Xba I)による解析結果

の株はそれぞれ100%の相似度を示した。A1には広島市4事例,A2には広島市2事例,岡山1事例の株が含まれた。クラスターBに分類された20株はさらにB1とB2に分類され,B1とB2の相似度は97.4%であった。B1の19株のうち18株(広島2事例,岡山12事例,山口1事例,徳島3事例)は100%の相似度を示し,他の1株(岡山事例No.11)

とは99.4%の相似度であった。B2には岡山県の1株(事例No.18)のみが分類された。

BlnIによる解析では,CからEの3種類のクラスターに大きく分類された(図2)。クラスターEとC,Dとは84.3%と低い相似度を示し,CとDとの相似度は92.3%であった。クラスターCはC1からC5の5種類に分類された。C1とC2からC5との相似度は97.1%~92.7%であった。C1に分類された9株(広島6事例7株,岡山1事例,徳島1事例)は100%の相似度を示した。クラスターDはD1からD3の3種類に分類され,D1とD2,D3との相似度はそれぞれ97.1%,95.2%であった。D1に分類された9株(岡山8事例,徳島1事例)は100%の相似度を示した。クラスターEには岡山県の3株が分類され,そのうちの2株(事例9,10)は100%の相似度を示した。

2 薬剤感受性試験結果

全27株の12薬剤に対する感受性試験結果は,すべての薬剤に感受性であった。

3 MLVA解析結果

MLVA解析の結果,供試27株のうち20株の供試株は7本の波形ピークが得られたが,その他の供試株のうち,2株は4本,2株は5本,3株は6本の波形ピークしか得られず,VNTRs領域の増幅の有無に株間の差が認められた。その代表的なパターンを図3に示した。得られた波形ピークの大き

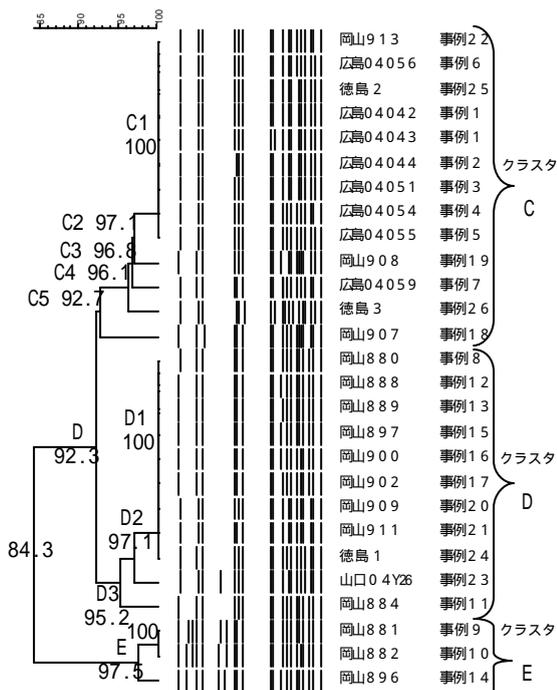
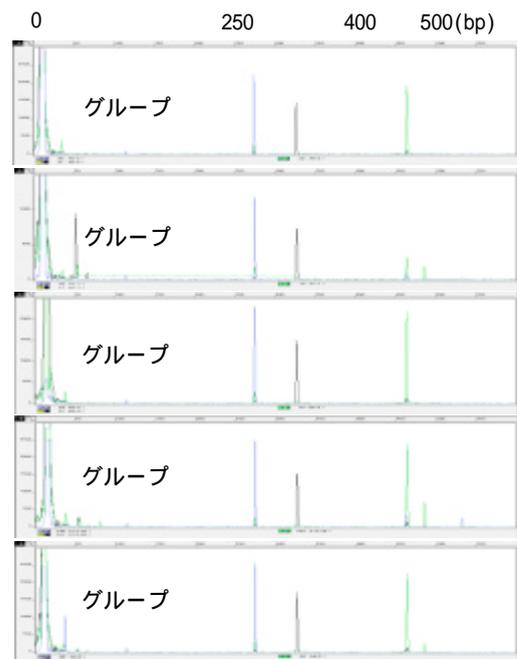


図2 PFGE(Bln I)による解析結果



* ~ は, Vhec1~7による増幅サイズを示す。

図3 代表的なMLVA波形パターン

さは, Vhec1 が 464bp, Vhec2 が 464bp, Vhec3 が 485bp, Vhec4 が 531bp, Vhec5 が 463bp, Vhec6 が 327bp で 2.8 回 および Vhec7 が 274bp となり, 各増幅サイズは, 各ピークに対して 1 種類しか認められず, また, 予測される VNTRs の繰返し回数は, Vhec1 が 21.5 回, Vhec2 が 4.5 回, Vhec3 が 3.5 回, Vhec4 が 6 回, Vhec5 が 5.6 回, Vhec6 が 2.8 回, および Vhec7 が 2.7 回となり, 繰返し回数も各ピークにおいて 1 種類しか認められなかった。ABI のデータを Fingerprinting に直接取り込み, PFGE と同様の操作で各ピークの系統樹解析を行った(図 4)。その結果, MLVA パターンは 5 種類に分類された(表 5)。グループ 1 には広島市 1 株, 岡山県 1 株, グループ 2 には広島市 1 株, グループ 3 には岡山県 1 株, グループ 4 には広島市 4 株, 岡山県 12 株, 山口県 1 株, 徳島県 3 株, グループ 5 には広島市 2 株, 岡山県 1 株が分類された。

4 PFGE および MLVA による分離株の分類

Xba I, Bln I による PFGE 解析および MLVA 解析を組み合わせた結果, 供試 27 株は全 11 種類に分類された(表 6, 図 5)。

考 察

2004 年 7 月から 9 月初旬にかけて日本各地(愛知, 石川, 大阪, 岡山, 鹿児島, 群馬, 埼玉, 東京, 徳島, 富山, 兵庫, 広島, 福岡, 三重, 山口)でパルスネットパターン No.292 の ND, a, ND

型を示す O157:H7(stx1, stx2)感染症が発生し, 広島市内でも散発的に 7 事例の ND, a ND 型 STEC 感染症が発生した。患者は外食を多くする家庭で発生する傾向がみられたが, 広島市内の各事例間の因果関係は不明であった。

これらの ND, a, ND 型 O157:H7 による事例の疫学的関連性について, より詳細な情報を得るため, この期間に中国・四国地区の地研に分離収集された ND, a, ND 型 O157:H7(stx1, stx2)26 事例 27 株について, PFGE 解析および薬剤感受性試験とともに, PFGE 解析と原理を異にする新しい解析手法である MLVA 解析を加えた疫学的解析を行った。

PFGE 解析によるデンドログラムでは, Xba I においては, 各地研で分離した ND, a, ND 型 O157:H7 株は, 2 種類のクラスターに分類されたが, 95.5%以上の相似度を示し, バンドの多少のゆらぎがみられたものの, 同じ系統であると考えられた。

一方 Bln I においては, 3 つのクラスターに分岐し, 広島市内で発生した 7 事例の 8 株すべてが相似度 92.7%以上のクラスター C 内にあった。同クラスター内には, 徳島県内事例 2 株(事例 25, 26)と岡山県内事例 3 株(事例 18, 19, 22)も存在していた。相似度 95.2%以上のクラスター D に含まれるのは, 岡山県内散発事例 9 事例 9 株(事例 8, 11~17, 20, 21)と徳島県内 1 事例 1 株(事例 24)と山口県内 1 事例 1 株(事例 23)であり, 岡山県内発生事例に偏っていた。相似度 97.5%以上のクラスター E に含まれるのは岡山県内散発 3 事例 3 株(事例 9, 10, 14)のみであった。クラスター C および D は相似度 92.3%で比較的高い相似性を示しており同一グループを形成する株であると考えられたが, クラスター E は, クラスター C および D と異なり, 84.3%と低い相似度であり, 異なるグループの株であると考えられた。このことから, 岡山県内の 3 株(事例 9, 10, 14)を除いて ND, a, ND 型 24 株は遺伝学的に近縁な株であると考えられるが, 広島市内散発事例株と岡山県内散発事例株とでは, 若干パターンが違い, 異なるグループを形成する株であることが示唆された。一方, 徳島県散発事例分離株は, 広島市内散発事例分離株群と岡山県内散発事例分離株群の 2 つのクラスター群に存在し, 発生日から考えると, 徳島・広島と徳島・岡山のルートによる, 一連の diffuse outbreak の可能性を示唆されるが, それぞれの物流ルートでの因果関係を

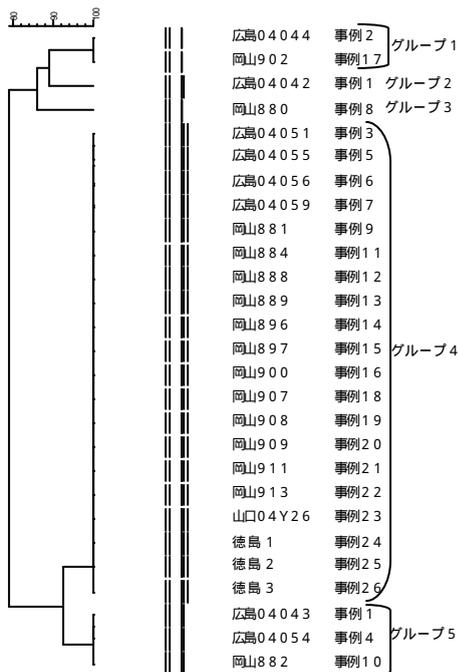


図 4 MLVA による解析結果

表5 MLVA パターンによる供試菌株の分類

菌株番号	Vhec PCR 結果						
	Vhec1	Vhec2	Vhec3	Vhec4	Vhec5	Vhec6	Vhec7
広島 04044			-	-	-		
岡山 902			-	-	-		
広島 04042	-			-			
岡山 880			-	-			
広島 04051							
広島 04055							
広島 04056							
広島 04059							
岡山 881							
岡山 884							
岡山 888							
岡山 889							
岡山 896							
岡山 897							
岡山 900							
岡山 907							
岡山 908							
岡山 909							
岡山 911							
岡山 913							
山口 04Y26							
徳島 1							
徳島 2							
徳島 3							
広島 04043				-			
広島 04054				-			
岡山 882				-			

示す情報はなかった。以上の結果，PFGE では，今回のND， a，ND株では，XbaI に比べ，BlnI による解析の方が，株間の異同をより詳細に解析することができると考えられた。

一方，薬剤感受性試験は，今回全ての株が感受性を示したために，疫学的解析に活用することができなかった。

近年O157:H7においてもMLVAを用いた分子疫学的解析法の有用性が報告されている²²⁾⁻²⁵⁾。今回の実験はLindstedtらの方法²³⁾を用いてO157:H7におけるMLVAの有用性の検討を行った。その結果，得られた波形ピークは，明瞭で安定したパターンを示した。近似する分子量のピークも，プライマーに3種類の蛍光色素を標識したことで，各

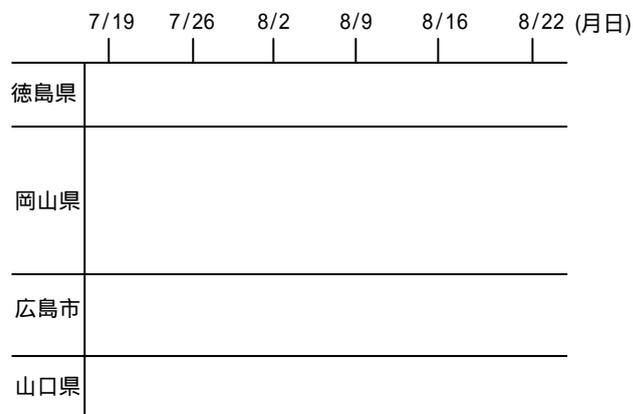
プライマーの増幅産物を特定し解析することが可能であった。しかし，各プライマーにおける増幅産物は，増幅サイズに差異が認められなかったため，今回使用した菌株の繰返し回数に差はないと考えられたが，O157において各領域の増幅サイズのvariationがどの程度あるかは，今後の課題である。FingerprintingでPFGEと同様の解析を行った結果，波形パターンは5種類のグループに分類することができた。このように複数の蛍光色素を用いたMLVA解析法は，手技的に簡易であり，再現性も高く，STECの分子疫学的解析手法として有効な方法の一つとなる可能性が示唆された。一方，米国CDCでは，O157:H7のMLVAにおいてLindstedtらのプライマーセット²³⁾だけでなく

表6 PFGE およびMLVA 結果の分類

菌株 No	事例 No	発生場所	XbaI	BlnI	MLVA	組合せパターン No
広島 04044	事例 2	広島市	A	C	1	
広島 04051	事例 3	広島市	A	C	4	
広島 04055	事例 5	広島市	A	C	4	
広島 04059	事例 7	広島市	A	C	4	
広島 04043	事例 1	広島市	A	C	5	
広島 04054	事例 4	広島市	A	C	5	
岡山 889	事例 13	岡山県	A	D	4	
広島 04042	事例 1	広島市	B	C	2	
徳島 2	事例 25	徳島県	B	C	4	
岡山 908	事例 19	岡山県	B	C	4	
岡山 913	事例 22	岡山県	B	C	4	
岡山 907	事例 18	岡山県	B	C	4	
徳島 3	事例 26	徳島県	B	C	4	
広島 04056	事例 6	広島市	B	C	4	
岡山 902	事例 17	岡山県	B	D	1	
岡山 880	事例 8	岡山県	B	D	3	
徳島 1	事例 24	徳島県	B	D	4	
岡山 884	事例 11	岡山県	B	D	4	
岡山 897	事例 15	岡山県	B	D	4	
岡山 888	事例 12	岡山県	B	D	4	
岡山 909	事例 20	岡山県	B	D	4	
岡山 900	事例 16	岡山県	B	D	4	
岡山 911	事例 21	岡山県	B	D	4	
山口 04Y26	事例 23	山口県	B	D	4	
岡山 881	事例 9	岡山県	B	E	4	
岡山 896	事例 14	岡山県	B	E	4	
岡山 882	事例 10	岡山県	B	E	5	

Noller らが設計したプライマー²⁴⁾を加えた9種類のプライマーを使用した実用性がより高い系の検討を行っており、今後、当所でもプライマー数を増やすなど、方法論についてより詳細に検討する必要があるとともに、他の多くの事例について検討を行い、データを蓄積することが重要である。

今回の一連の事例において PFGE および MLVA の解析による分類の地域・経時的な結果を、図 5 に示した。同一パターンに分類されたものが2県以上にわたって発生しているものは2種類あり、パターン No.9 は徳島県を初発とし、引き続いて岡山県、山口県と3県にわたって発生していた。パターン No.6 は徳島県を初発とし、引き続き岡山県で発生、岡山県が終息した後に、再び徳島県で発生、翌週には広島でも発生していた。一方、岡山



* PFGE および MLVA の組合せパターン No (表 7 参照)

図 5 県市別発生状況

県と広島市の発生状況を比較すると、岡山県内では、主としてパターン No.9 とパターン No.6 の株が 14 事例中 9 事例も占めていた。このように、中国・四国地区で広域的に発生している遺伝子的特性の近縁な株が原因となる STEC 感染事例が、岡山県では多いのに対し、広島市は、それらのパターンの占める割合は、8 事例中 1 事例しかなく、中国・四国地区で広域的に発生した株とは異なった遺伝子的特性を持つ株が、広島市において主とした STEC 感染事例の発生原因となっていると考えられ、パターン No.2 とパターン No.3 の株においては、広島市内に限られた diffuse outbreak の可能性が示唆された。さらに、これらパターンの株は、Xba I および Bln I での PFGE だけでは、区別することができないものであったが、MLVA 解析を併用することで分類が可能となった。このように PFGE では同一グループに分類されるものでも、MLVA を併用することで、さらに細かく分類できる場合もあることが示された。

以上の結果から、今回検討した Nd, a, Nd 型 O157:H7 株による STEC 感染事例は、中国・四国地区を含む全国的な diffuse outbreak の可能性が示唆されるが、このように、Xba I により同一 PFGE 型を示す分離株についても、Bln I による PFGE と PFGE とは原理の異なる MLVA 解析法を併用することで、O157 株間の遺伝子的特性の差異がより明確となり、関連事例間のより詳細な情報をつかむことが可能となると考えられた。今後は、MLVA 解析法の有効性についてさらに検討が必要である。

謝 辞

O157:H7 菌株を分与していただいた、岡山県環境保健センターの中嶋洋先生、山口県環境保健研究センターの工藤恵美先生、徳島県保健環境センターの谷好史先生に深謝致します。

文 献

- 1) Caugant DA et al: Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*, *APMIS*, 106(5), 505 ~ 525(1998)
- 2) Shankar V et al: Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *espA* gene encoding a novel surface protein, *Infect Immun*, 67(1), 193 ~ 200(1999)
- 3) Renders N et al: Variable numbers of tandem repeat loci in genetically homogeneous *Haemophilus influenzae* strains alter during persistent colonisation of cystic fibrosis patients, *FEMS Microbiol Lett*, 173, 95 ~ 102(1999)
- 4) Keim P et al: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*, *J Bacteriol*, 182(10), 2928 ~ 2936(2000)
- 5) Klevytska AM et al: Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome, *J Clin Microbiol*, 39(9), 3179 ~ 3185(2001)
- 6) Pourcel C et al: Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*, *BMC Microbiol*, 4, 22(2004)
- 7) Farlow J et al: *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis, *J Clin Microbiol*, 39(9), 3186-3192(2001)
- 8) Johansson A et al: World wide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, *J Bacteriol*, 186(17), 5808 ~ 5818(2004)
- 9) Farlow J et al: Strain typing of *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii* by using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, *Appl Environ Microbiol*, 40(12), 4612 ~ 4618(2002)
- 10) Della Coletta-Filho H et al: Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* Varieties, *Appl Environ Microbiol*, 68, 3731 ~ 3736(2002)
- 11) Lindstedt BA et al: DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp.*enterica* Serovar *Typhimurium* with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci, *J Clin Microbiol*, 41, 1469 ~ 1479(2003)
- 12) Liu Y et al: Molecular typing of *Salmonella enterica* Serovar *Typhi* isolates from various countries in Asia by a multiplex PCR assay on variable-number tandem repeats, *J Clin Microbiol*, 41, 4388 ~ 4394(2003)
- 13) Onteniente L et al: Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing, *J Clin Microbiol*, 41(11), 4991 ~ 4997(2003)

- 14) Pourcel C et al : Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping, *J Clin Microbiol*, 41(5), 1819 ~ 1826(2003)
- 15) Bricker BJ et al: *Brucella* 'HOOF-prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs), *BMC Microbiol*, 3, 15(2003)
- 16) Sabat A et al: New method for typing *Staphylococcus aureus* strains : multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates, *J Clin Microbiol*, 41, 1801 ~ 1804(2003)
- 17) Malachowa N et al: Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates, *J Clin Microbiol*, 43(7), 3095 ~ 3100 (2005)
- 18) Sun YJ et al: Characterization of ancestral *Mycobacterium tuberculosis* by multiple genetic markers and proposal of genotyping strategy, *J Clin Microbiol*, 42, 5058 ~ 5064(2004)
- 19) Schouls LM et al: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s, *J bacteriol*, 186(16), 5496 ~ 5505(2004)
- 20) Majed Z et al: Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*, *J Clin Microbiol*, 43, 539 ~ 545 (2005)
- 21) Groathouse NA et al: Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*, *J Clin Microbiol*, 42, 1666 ~ 1672 (2004)
- 22) Lindstedt BA et al: DNA fingerprinting of shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 based on multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA), *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2, 1 ~ 7(2003)
- 23) Lindstedt BA et al: Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Escherichia coli* O157 using PCR multiplexing and multi-colored capillary electrophoresis, *J Clin Microbiol Methods*, 58, 213 ~ 222(2004)
- 24) Noller AC et al: Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157: H7 isolates, *J Clin Microbiol*, 41, 5389 ~ 5397 (2003)
- 25) Keys C et al : Highly diverse variable number tandem repeat loci in the *E.coli* O157:H7 and O55:H7 genomes for high-resolution molecular typing , *J Appl Microbiol* , 98 , 928 ~ 940(2005)