

イヌのメチシリン耐性

*Staphylococcus pseudintermedius* 感染症の

分子疫学的研究

Molecular epidemiological studies on methicillin-resistant  
*Staphylococcus pseudintermedius* infections in dogs

2015 年 9 月

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程

分子生物学

DV1161 笠井 智子

# 目次

緒言	3
第 1 章 イヌ表在性膿皮症由来 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> における staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i> type および 表皮剥脱毒素遺伝子 ( <i>expA</i> , <i>expB</i> ) の分布調査	
1. 序論	6
2. 材料と方法	8
3. 結果	11
4. 考察	12
第 2 章 メチシリン耐性 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> の検出および staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i> typing の簡便化を目的 とした multiplex PCR 法の改良	
1. 序論	13
2. 材料と方法	16
3. 結果	19
4. 考察	21

第 3 章	イヌ由来メチシリン耐性 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> の	
	分子疫学的解析	
1.	序論	23
2.	材料と方法	25
3.	結果	30
4.	考察	35
	総括	39
	General Overview	40
	謝辞	44
	引用文献	45
	図表	58

## 緒言

ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) 属は哺乳類の常在菌であるが、時として感染症の原因菌にもなりうる。ブドウ球菌には宿主固有性のあることが知られており、イヌの常在ブドウ球菌は *S. pseudintermedius* であることが 2007 年の菌種再分類によって明らかとなった(Bannoehr *et al.*, 2007; Devriese *et al.*, 2005; Hajek, 1976; Sasaki *et al.*, 2007b)。本菌種は表在性膿皮症や外耳炎のほか、各種感染症の主要な原因菌としても認識されている(Bannoehr and Guardabassi, 2012; Devriese *et al.*, 2005)。また、2009 年と 2010 年には、本菌種が保有する 2 種類の表皮剥脱毒素 (ExpA, ExpB) がイヌの皮膚に特異的に病変を形成することが報告された(Futagawa-Saito *et al.*, 2009; Iyori *et al.*, 2010)。

ブドウ球菌の中でもとくに問題となるのはメチシリン耐性ブドウ球菌である。医学領域ではメチシリン耐性 *S. aureus* (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) による感染症が病院内だけでなく市中でも発生しており、感染の拡大が懸念されている。小動物臨床領域では、1999 年にイヌではじめてメチシリン耐性 *S. pseudintermedius* (MRSP) が報告された(Gortel *et al.*, 1999)。2004 年以降は MRSP による感染症が急増しており、世界的に問題となっている(Bemis *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2008)。

MRSP に関する報告も同様に増加しており、その多くは MRSA の研究を参考に行われてきた。MRSA では遺伝子型に基づいた数多くの疫学報告が存在しており、例えば遺伝子型のひとつである

staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) の type が感染症の病態とよく関連することが知られている。したがって、こうした遺伝子型の情報は MRSA クローンの流行予測やその制御において重要となる。MRSP では、SCC*mec*-type III-like と type V の 2 種類が世界の主要な SCC*mec*-type であることが判明している(Perreten *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Youn *et al.*, 2011)。しかし、SCC*mec*-type と臨床的背景との関連性を分析した研究はほとんど存在しない。また、MRSP における病原因子やリスク因子はまだ十分に解明されていない。

そこで本研究では、まずイヌの表在性膿皮症由来 MRSP 株について、SCC*mec*-type の分布と ExpA, ExpB をコードする表皮剥脱毒素遺伝子 (*expA*, *expB*) の保有状況を調査した。この結果、表在性膿皮症由来 MRSP の SCC*mec*-type は type III-like と type V に大別され、MRSP と *expA*, *expB* には関連性のないことが明らかとなった (第 1 章)。

第 1 章では、MRSP の解析に CPS の菌種を同定する multiplex PCR (M-PCR) 法(Sasaki *et al.*, 2010)、メチシリン耐性遺伝子 (*mecA*) を検出する PCR 法、ならびに SCC*mec* typing を行う 3 種類の PCR 法(Kondo *et al.*, 2007; Perreten *et al.*, 2010)の計 5 種類の PCR 法を用いた。この 5 種類の PCR 法は個別に行う必要があることから、MRSP の遺伝子検査は煩雑なものであった。本研究では、従来の遺伝子検査法の改良に取り組み、5 種類の PCR 法を 2 種類の M-PCR 法に集約することで、検査の簡略化を試みた。さらに、改良した M-PCR 法を用いて臨床材料由来のブドウ球菌株を解析し、改良法の有用性を検証した (第 2 章)。

最後に、第 2 章で確立した改良型 M-PCR 法を用いて、対象疾患を

拡大した分子疫学調査を行った。各種感染性疾患から分離された MRSP 株について、SCC*mec*-type を薬剤感受性パターンや臨床的背景と関連付けて分析した。メチシリン感性 *S. pseudintermedius* (methicillin-susceptible *S. pseudintermedius*, MSSP) 株との比較も行った。その結果、MRSP の SCC*mec*-type III-like と type V はそれぞれ院内感染型 (healthcare-associated, HA-) MRSP と市中感染型 (community-associated, CA-) MRSP として定義できることが明らかとなった (第 3 章)。

# 第 1 章 イヌ表在性膿皮症由来 *Staphylococcus pseudintermedius* における staphylococcal cassette chromosome *mec* type および表皮剥脱毒素遺伝子 (*expA*, *expB*) の分布調査

## 1 序論

*Staphylococcus pseudintermedius* はイヌの皮膚・粘膜の常在菌であり (Allaker *et al.*, 1992a; Allaker *et al.*, 1992b)、代表的な感染性皮膚疾患である表在性膿皮症の主要原因菌としても知られている (Bannoehr and Guardabassi, 2012)。*S. pseudintermedius* には表皮剥脱毒素 (exfoliative toxins, ETs) ExpA および ExpB を保有する株が存在し、これらの ETs はイヌ表皮に特異的に作用して、皮膚病変を形成することが報告されている (Futagawa-Saito *et al.*, 2009; Iyori *et al.*, 2011; Iyori *et al.*, 2010)。しかし、表在性膿皮症由来の *S. pseudintermedius* 株における ETs の分布を調査した報告はほとんど存在しない (Futagawa-Saito *et al.*, 2009; Iyori *et al.*, 2010)。また、メチシリン耐性 *S. pseudintermedius* (MRSP) 株ではまだ ETs の報告はなく、MRSP が ETs に関連した病原性を有するかは不明である。

MRSP は 1999 年にはじめて報告され (Gortel *et al.*, 1999)、とくに 2004 年以降は小動物臨床領域で MRSP 感染症が急増している (Bemis *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2007; Kania *et al.*, 2004; Loeffler *et al.*, 2007; Zubeir *et al.*, 2007)。分子疫学的解析では MRSP 株はさまざまな遺伝子型によって分類され、staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)

による型別では2つの SCCmec-type 大別されることが知られている。ひとつは SCCmec-type III-like であり、欧州をはじめ世界各地で報告されている (Moodley *et al.*, 2009; Onuma *et al.*, 2012; Perreten *et al.*, 2010; Ruscher *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012)。もうひとつは SCCmec-type V で、北米や韓国、タイでの報告がある (Black *et al.*, 2009; Chanchaithong *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2012; Moodley *et al.*, 2009; Perreten *et al.*, 2010; Youn *et al.*, 2011)。なお、前者は 2008 年に Descloux らが報告し SCCmec-type II-III と命名している。しかし、この type は SCCmec-type の国際認定機関である International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) には承認されておらず、また、メチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) 由来の SCCmec-type III とほぼ同じ構造をもつことから、本論文中では type III の亜型として type III-like と表記する。

SCCmec-type などによる遺伝子型別は、MRSP 株の地理的分布や流行予測などに活用することができる。しかし、イヌの表在性膿皮症における SCCmec-type の分布に関する国内の報告はまだ少ない (Onuma *et al.*, 2012)。そこで本章では、国内のイヌ表在性膿皮症由来 MRSP 株について、*expA*, *expB* の保有率と SCCmec-type の分布を調査した。



## 2 材料と方法

### 2-1 材料

2010年4月から2012年12月の期間中に、国内3都県（東京、栃木、千葉）の個人動物病院3施設を受診した74頭の表在性膿皮症罹患犬を被検対象とした。症例の平均年齢は7.9歳（10ヶ月齢－15歳齢）、性別は雄が37頭、雌が37頭であった。犬種の内訳はシー・ズー（10頭）が最も多く、プードル（9頭）、ミニチュア・ダックスフント（7頭）、柴犬（5頭）、パグ（5頭）、チワワ（4頭）、コッカー・スパニエル（4頭）、ウェスト・ハイランド・ホワイト・テリア（2頭）、レトリバー（2頭）、マルチーズ（2頭）、ヨークシャー・テリア（2頭）、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル（2頭）、ジャック・ラッセル・テリア（2頭）、バセット（1頭）、狆（1頭）、ジャーマン・シェパード（1頭）、ペキニーズ（1頭）、シュナウツァー（1頭）、ワイマラナー（1頭）ならびに雑種犬（3頭）であった。採材は、各症例の病変部からシードスワブ  $\gamma$ 2号（栄研化学、東京）を用いて行った。採取した検体を5%羊血液加トリプトソイ寒天培地（TSA; BD Japan、東京）に塗抹後、37°Cで18時間培養してコロニーを分離した。得られたコロニーはコロニー形態、グラム染色性ならびにカタラーゼ試験の陽性反応に基づいてブドウ球菌株と特定し、以降の分析に供試した。供試菌株は、コロニーを100  $\mu$ lのTE buffer（10 mM Tris, 1 mM EDTA [pH 8.0]）に懸濁し McFarland 1.0 に調整したのち、10 Uのachromopeptidase（和光純薬、大阪）を添加して55°Cに設定したヒートブロックで10分間溶菌処理を行った(Sasaki *et al.*, 2010)。この反応液

の上清を DNA テンプレートとして用いた。

## 2-2 方法

### 2-2-1 MRSP の同定と SCC*mec* typing

供試菌株の菌種同定は、Sasaki ら (2010) による multiplex PCR (M-PCR) 法を用いて行った。メチシリン耐性判定は、メチシリン耐性遺伝子 *mecA* を検出する PCR 法(Zhang *et al.*, 2005)を実施し、*mecA* 陽性をもってメチシリン耐性株とした。MRSP 株の SCC*mec* typing には、既知の 3 種類の PCR 法(Kondo *et al.*, 2007; Perreten *et al.*, 2010)を用いた。

### 2-2-2 表皮剥脱毒素遺伝子の検出

2 種類の表皮剥脱毒素遺伝子 *expA*, *expB* の検出は、以下のプライマー (山本ら、2012、第 15 回日本獣医皮膚科学会学術集会) を用いた PCR 法にて行った。

*expA* 検出用プライマー                      塩基配列

forward                      5'-ATTTGTTACATGGATTTATT-3'

reverse                      5'-AGGGGCATTAACAATAAGATC-3'

*expB* 検出用プライマー                      塩基配列

forward                      5'-TTTATGACAGCTATGCTCATT-3'

reverse                      5'-TCCTAAATTAGCGTCAAAAAT-3'

PCR は、反応組成を Ex Taq ポリメラーゼ 0.2 $\mu$ l (Takara Bio、滋賀)、10 $\times$ PCR 緩衝液 2.5 $\mu$ l、dNTPs 4 $\mu$ l、各 20 $\mu$ M プライマー 0.25 $\mu$ l、鋳型 DNA 1 $\mu$ l に滅菌蒸留水を加えて全量を 25 $\mu$ l とした。PCR 条件はサーマルサイクラー (iCycler, Bio-Rad) を用いて 95 $^{\circ}$ C 3 分間の初期熱変性を行った後、熱変性 95 $^{\circ}$ C 30 秒、アニーリング 55 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 30 秒のセットを 30 サイクル行い、最終伸長反応を 72 $^{\circ}$ C 2 分間行った。PCR 増幅産物は 1.0%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム溶液で染色したのちゲル撮影装置でバンドパターンを確認した。

### 3 結果

被検 74 症例からは合計 74 株のブドウ球菌が分離され、これらはすべて *S. pseudintermedius* と同定された。*S. pseudintermedius* 株における *mecA* 陽性の MRSP 株の割合、すなわち MRSP 率は 70.3% (52/74 株) であった (Table 1)。各症例の投薬歴に着目すると、全 74 症例中 65 症例 (87.8%) が採材日より過去 6 ヶ月以内に抗菌薬治療を受けており、その割合は MRSP 群で 96.2% (50/52 症例)、MSSP 群では 68.2% (15/22 症例) であった。

PCR 法による SCC*mec* typing の結果、MRSP 52 株は 33 株 (63.4%) の SCC*mec*-type III-like と 18 株 (34.6%) の type V に大別された。1 株は型別不能 (nontypeable, NT) であった。SCC*mec*-type III-like と type V を保有する MRSP 株の電気泳動パターンをそれぞれ Fig. 1A と 1B に示した。

*expA*, *expB* の検出された代表株の電気泳動パターンを Fig. 2 に示した。*S. pseudintermedius* 株における *expA* の保有率は、MSSP は 22.7% (5/22 株) であったのに対し、MRSP では 1.9% (1/52 株) と低値を示した (Table 2)。なお、この MRSP 株の SCC*mec*-type は type V であった。一方 *expB* は、1 株の MSSP で検出され、MRSP 株からは検出されなかった (Table 2)。

## 4 考察

本章ではすべての被検症例から *S. pseudintermedius* が分離され、その MRSP 率は 70.3%であった。過去の報告における MRSP 率をみると、国外では英国が 5.1%(Maluping *et al.*, 2014)、韓国が 29.3%(Youn *et al.*, 2011)、ならびに中国が 47.8%(Wang *et al.*, 2012)と、いずれも本章の MRSP 率より低く、国内では 66.5%(Kawakami *et al.*, 2010)と同等であった。この結果から、日本ではイヌ表在性膿皮症において MRSP が蔓延傾向にあることが示唆された。また、MRSP 陽性症例は MSSP 症例よりも高率に抗菌薬治療を受けていたことから、抗菌薬の投与によって MRSP が選択される可能性が考えられた。

ETs はイヌ表在性膿皮症における重要な病原因子であると考えられているが、今回調査した MRSP 株の *expA*, *expB* 保有率は低く、メチシリン耐性と ETs には関連性のないことが示唆された。

## 第 2 章 メチシリン耐性 *Staphylococcus pseudintermedius* の検出および staphylococcal cassette chromosome *mec* typing の簡便化を目的とした multiplex PCR 法の改良

### 1 序論

ブドウ球菌属は血漿凝固因子であるコアグラーゼの産生能によってコアグラーゼ陽性ブドウ球菌 (coagulase-positive staphylococci, CPS) とコアグラーゼ陰性ブドウ球菌 (coagulase-negative staphylococci, CNS) に分類され、CPS は CNS よりも病原性が高いとされている (Fitzgerald and Penades, 2008)。CPS は現在までに以下の 7 菌種が記載されている：*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius* (Devriese *et al.*, 2005; Freney *et al.*, 1999)。

とくに *S. pseudintermedius* は、2007 年に発表されたブドウ球菌の菌種再分類によって、イヌの常在菌であることが明らかとなった (Sasaki *et al.*, 2007b)。CPS の 7 菌種は互いに生化学的性状が類似していることから、*S. pseudintermedius* と他の CPS をルーチンの生化学的検査で鑑別することは非常に困難であった (Devriese *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2007b)。また、臨床検査会社ではとくに *S. pseudintermedius* がヒトの主要な CPS である *S. aureus* と誤同定されることが多く、医学と獣医学双方の臨床現場に混乱を招いていた (Pottumarthy *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2010; 笠井ら, 2010)。こうした背景から、*nuc* 遺伝子を標的とした multiplex PCR (M-PCR) 法 (Sasaki *et al.*, 2010) や、制限酵素 *MboI* を用

いた PCR-RFLP 法(Bannoehr *et al.*, 2009)による CPS の正確な同定法が開発された。

MRSA による感染症が医学領域で問題となっているのと同様に、獣医学領域では MRSP 感染症の急増が注目を集めている(Bemis *et al.*, 2009; Gortel *et al.*, 1999; Guardabassi *et al.*, 2004; Kania *et al.*, 2004; Schwarz *et al.*, 2008)。メチシリン耐性は、*mecA* 遺伝子にコードされた変異型ペニシリン結合タンパク (penicillin-binding protein 2a または 2') が  $\beta$ -ラクタム系薬に対して低い親和性を示すことにより生じている。*mecA* 遺伝子は可動性遺伝子カセットである staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) 内に存在しており(Ito *et al.*, 1999; Katayama *et al.*, 2000)、*mecA* 遺伝子を含む SCC*mec* がメチシリン感性のブドウ球菌株に挿入されると、メチシリン耐性株となる。

SCC*mec* にはカセットを構成する必須要素が 2 種類あり、ひとつはカセットの形質挿入に関わる *ccr* 遺伝子複合体 (*ccr*)、もうひとつはメチシリン耐性をコードしている *mec* 遺伝子複合体 (*mec*) である。今日までに 8 種類の *ccr* (type 1-8) と 5 種類の *mec* (class A-E) が報告されており、*ccr* と *mec* の組み合わせにより計 11 種類の SCC*mec*-type が IWG-SCC によって承認されている(Hiramatsu *et al.*, 2013; International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements, 2009)。このうち、MRSA では SCC*mec*-type I から type V が世界的に分布している(Hiramatsu *et al.*, 2013)。一方 MRSP では、MRSA の SCC*mec*-type III に酷似した構造の SCC*mec*-type III-like、ならびに type V の 2 つが日本を含めた世界の主

要な MRSP クローンであることが報告されている (Onuma *et al.*, 2012; Perreten *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Youn *et al.*, 2011)。

一般的な *S. pseudintermedius* の疫学研究は、Sasaki ら (2010) の M-PCR 法など遺伝学的手法による菌種同定、PCR 法による *mecA* 遺伝子の検出 (Zhang *et al.*, 2005) ならびに 3 種類の PCR 法による SCC*mec* typing に基づいて行われる。SCC*mec*-type は、まず 2 種類の M-PCR 法によって *ccr* の type と *mec* の class を分類して type I から type V を決定する (Kondo *et al.*, 2007)。さらに、MRSP に特有とされる type III-like については、別の PCR 法を実施して確認することができる (Perreten *et al.*, 2010)。つまり、菌種 (*S. pseudintermedius*)、*mecA* 遺伝子の有無ならびに type III-like を含む SCC*mec*-type の情報を得るためには合計 5 種類の PCR 法を実施する必要があった。そこで本章では、煩雑な従来の 5 種類の遺伝子検査法を 2 種類の M-PCR 法に集約することで、検査の簡便化を図った。改良した M-PCR 法は臨床分離株に応用し、従来法による分析結果と比較した。



## 2 材料と方法

### 2-1 材料

CPS の標準株と、既報に記載のあるブドウ球菌株を含む計 15 株を参照株として用いた (Ito *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2007a, b) (Table 3)。M-PCR 1 の特異度検証には、CNS 14 菌種 (*S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. xylosum*, *S. felis*, *S. chromogenes*, *S. simiae*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. caprae*, *S. captis*, *S. hominis*, *S. warneri*) と *Micrococcus caseolyticus* の計 15 株を用いた。さらに、改良法の有用性を検証する臨床分離株として、2011 年 9 月から 2012 年 8 月の期間中に東京都内の動物病院 1 施設を受診した 86 頭の細菌感染症罹患犬から得たブドウ球菌株を用いた。検体の採材と菌分離は第 1 章と同様の手順で行い (第 1 章 2-1、p.6)、得られたコロニーのうち 59 株をコロニー形態、グラム染色性ならびにカタラーゼ試験の陽性反応に基づいてブドウ球菌株と特定し、以降の分析に供試した。PCR に用いる DNA 抽出液は第 1 章と同様の方法で準備した (第 1 章 2-1、p.6)。

### 2-2 方法

#### 2-2-1 *mecA* 遺伝子検出のためのプライマーの設定

第一の改良型 M-PCR 法 (M-PCR 1) は、既知の CPS 菌種同定の M-PCR 法に新規に設計した *mecA* 遺伝子検出用のプライマーを加えることで、菌種と *mecA* 遺伝子を同時に検査できる方法とした。*mecA* 遺伝子は MRSA と MRSP で 99% 相同であることから、*mecA* 遺伝子を検出するプライマーは GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) に登録

されている両菌種の塩基配列 (MRSA, accession no. AB037671.1; MRSP, accession no. AM904732.1) を基に、Oligo Primer Analysis Software, version 6.89 (Molecular Biology Insights) を用いて設定した。また、既知の 16 種類のプライマー(Sasaki *et al.*, 2010)についても、特異度を高めるために、4 種類 (sch-F, sch-R, pse-F2, pse-R5) について配列を改良した。M-PCR 1 に用いたプライマーは Table 4 に示した。

#### 2-2-2 SCCmec の一括 typing のためのプライマー選出

第二の改良型 M-PCR 法 (M-PCR 2) は SCCmec-type I, II, III, III-like, IV ならびに V の 6 種類を識別する検査法とした。M-PCR 2 に用いるプライマーセットは、既報のプライマーリスト(Kondo *et al.*, 2007; Oliveira and Lencastre, 2002; Perreten *et al.*, 2010)を参照して 14 種類のプライマーを選出した (Table 4)。プライマーの選出基準は、*ccr* と *mec* をそれぞれ分類することが可能であり、かつプライマー同士が干渉しないこととした。

#### 2-2-3 検出限界の測定

検出限界は、DNA 抽出液の菌数を測定後、抽出液を 10 倍段階希釈した DNA テンプレートを用いて改良型 M-PCR 法を実施し、PCR 反応液中あたりの検出限界を測定した。

#### 2-2-4 改良型 M-PCR 法と従来法との比較

M-PCR 1 および M-PCR 2 の PCR は、反応組成を Tks Gflex DNA ポ

リメラーゼ 0.5 $\mu$ l (Takara)、2 $\times$ Gflex 緩衝液 12.5 $\mu$ l、各 20 $\mu$ M プライマー 0.25 $\mu$ l、鋳型 DNA 1 $\mu$ l に滅菌蒸留水を加えて全量を 25 $\mu$ l とした。PCR 条件はサーマルサイクラー (iCycler, Bio-Rad) を用いて、M-PCR 1 では 98 $^{\circ}$ C 2 分間の初期熱変性を行った後、熱変性 98 $^{\circ}$ C 10 秒、アニーリング 56 $^{\circ}$ C 15 秒、伸長反応 68 $^{\circ}$ C 45 秒のセットを 33 サイクル行い、最終伸長反応を 68 $^{\circ}$ C 3 分間行った。M-PCR 2 では、熱変性 98 $^{\circ}$ C 10 秒、アニーリング 53 $^{\circ}$ C 15 秒、伸長反応 68 $^{\circ}$ C 45 秒のセットを 30 サイクル行った。PCR 増幅産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム溶液で染色したのちゲル撮影装置でバンドパターンを確認した。供試したすべてのブドウ球菌株は、従来の 5 種類の PCR 法を用いて CPS の菌種同定(Sasaki *et al.*, 2010)、*mecA* 遺伝子の有無(Zhang *et al.*, 2005)、SCC*mec* typing(Kondo *et al.*, 2007; Perreten *et al.*, 2010)を行い、改良法の結果と比較した。

### 3 結果

#### 3-1 M-PCR 1 による CPS と *mecA* 遺伝子の同時検出

M-PCR 1 に供試した参照株のうち、CPS の 7 株は各菌種に特異的な 1 本のバンドが従来法と同様に確認された (Fig. 3, lanes 1-7)。MRSA (5 株)、MRSP (2 株) ならびにメチシリン耐性 *S. schleiferi* (1 株) は、各菌株で菌種のバンドとは別に *mecA* 遺伝子に一致するバンド (168 bp) が得られた (Fig. 3, lanes 8-12)。特異度の検証に用いた CNS 14 株と *Macrococcus caseolyticus* ではバンドは検出されなかった (Fig. 3, lanes 13-16、データは 4 株分のみ示している)。DNA 抽出液の段階希釈による測定の結果、検出限界は  $10^3$  個/反応液であった (Fig. 4)。

#### 3-2 M-PCR 2 による SCC*mec* の一括 typing

参照株の MRSP 2 株は、M-PCR 2 により各々の SCC*mec*-type を正確に分類することができた。SCC*mec*-type III-like の MRSP 株は、type 3 *ccr* (1,791 bp)、class A *mec* (209 bp) ならびにカドミウム耐性遺伝子の隣接領域 (831 bp) にそれぞれ一致する計 3 本のバンドパターンにより同定された (Fig. 5, lane 1)。SCC*mec*-type V の MRSP 株は、type 5 *ccr* (518 bp) と class C *mec* (831 bp) を示す 2 本のバンドにより同定できた (Fig. 5, lane 2)。SCC*mec*-type I から type V をもつ MRSA の参照株についても、各菌株の *ccr* および *mec* に一致する 2-4 本のバンドにより鑑別することができた (Fig. 5, lanes 3-7)。SCC*mec*-type III-like、type II、ならびに type III では *ccr*、*mec* のものとは異なる 1 本の非特異的なバンド (約 2,500 bp) が認められたものの、SCC*mec* typing には影響

しないものであった (Fig. 5, lanes 1, 4, 5)。

### 3-3 M-PCR 1、M-PCR 2 の臨床分離株への応用

被検 86 症例から分離したブドウ球菌 59 株に M-PCR 1 を用いたところ、すべての菌株は 2 種類の CPS : *S. pseudintermedius* (n = 48) と *S. schleiferi* (n = 11) に同定された。このうち、34 株 (*S. pseudintermedius* 30 株、*S. schleiferi* 4 株) が *mecA* 遺伝子を有するメチシリン耐性株であった。MRSP 30 株を M-PCR 2 で分析したところ、16 株 (53%) が type III-like の SCC*mec* を、14 株 (47%) が type V を保有していた。M-PCR 2 と従来の方法による SCC*mec* typing の結果は、すべての菌株で一致した。

## 4 考察

メチシリン耐性の判定は、オキサシリンを指示薬とした薬剤感受性試験による方法が一般的である(Bemis *et al.*, 2009; CLSI, 2014)。しかしこの薬剤感受性試験では、一部の MRSP 株についてメチシリン耐性判定を誤る可能性が指摘されている(Kania *et al.*, 2004)。このため、PCR による *mecA* 遺伝子の検出は最も正確なメチシリン耐性判定法 (gold standard) として認識されている(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014)。

小動物臨床領域における MRSP 発生率は世界的に増加しており、第 1 章の結果も含め、国内の MRSP 率は 60%以上と高い傾向にある(Kawakami *et al.*, 2010)。また、国外でも地域によっては 47.8%と高い MRSP 率が報告されている(Wang *et al.*, 2012)。本章でも *S. pseudintermedius* 48 株中 30 株 (62.5%) がメチシリン耐性であり、高い MRSP 率を認めた。このような MRSP 率の高値からも明らかであるが、*S. pseudintermedius* のメチシリン耐性判定は疫学研究のみならず獣医臨床領域においても必須の検査項目である。

本研究で改良した M-PCR 1 は、CPS 7 菌種の特異的な検出が可能であり、検出限界は  $10^3$  個/反応液であることが確認された。したがって、M-PCR 1 の感度・特異度は実用性に問題なく、かつ *mecA* 遺伝子と CPS を簡便な手技で同時に分析できる有用性の高い検査法となった。

M-PCR 2 では、MRSP の主要なクローンである SCCmec-type III-like と type V が単回の手技で鑑別可能となった。これ以外の type については MRSA の参照株で検証を行い、SCCmec-type I-V および III-like の計 6 type が分類できることが確認された。本章で分析した MRSP の臨床分離株は SCCmec-type III-like と type V に大別され、過去の報告と一致する結果となった(Perreten *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Youn *et al.*, 2011)。したがって、今回改良した M-PCR 2 は広い地域で利用できるものと考えられる。

本章で改良した 2 種類の M-PCR 法は迅速かつ正確に MRSP の検出と SCCmec typing を実施できるため、ルーチン検査としても利用可能である。ヒトの臨床現場で MRSA の遺伝子検査が導入されているように、獣医学領域でもこのような遺伝子検査を積極的に採用するか否かは、今後の検討事項であると思われる。

### 第 3 章 イヌ由来メチシリン耐性 *Staphylococcus pseudintermedius* の分子疫学的解析

#### 1 序論

MRSP に関する報告は過去 10 年間で急増しており、その多くがヒトの重要な病原菌であるメチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) の報告を参考に行われてきた。MRSA の疫学調査は、菌株を遺伝子型に分類して解析する方法が主流である。例えば、MRSA は SCCmec-type I, II, III を主に保有する院内感染型 (healthcare-associated, HA-) MRSA と、SCCmec-type IV, V を主に保有する市中感染型 (community-associated, CA-) MRSA とに大別される。こうした遺伝子型の情報は患者のリスク評価や抗菌薬治療、流行株の予測などに活用されている。一方 MRSP では、SCCmec-type III-like と type V の 2 種類が世界の主要な SCCmec type であることが判明しており、第 1 章においても表在性膿皮症に由来する MRSP の SCCmec-type がこの 2 種に大別されることが確認された。しかし、SCCmec-type を表現型や臨床的背景と関連づけて分析した研究はほとんど存在しない。そこで本章では、*S. pseudintermedius* 感染症の治療法・予防法を検討する目的で、各種感染症に罹患したイヌから得た臨床分離株を分子疫学的に解析し、薬剤感受性パターン、遺伝的多様性ならびにリスク因子の評価を遺伝子型別に行った。

#### 2 材料と方法

国内の個人動物病院 10 施設および麻布大学附属動物病院を受診し、



細菌感染症が疑われた病犬 462 症例を対象とした。各症例の病変部よりスワブ採材し、分離された計 282 株の *S. pseudintermedius* を各種解析に供試した。菌種同定と *mecA* の検出、および MRSP の SCC*mec* typing には第 2 章で確立した M-PCR 1, 2 を用いた。薬剤感受性試験は、24 の薬剤について最小発育阻止濃度 (MIC) の測定またはディスク拡散法により行った。MRSP 株はさらにパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による型別を実施し、遺伝的多様性を評価した。また、*S. pseudintermedius* 株を遺伝子型および薬剤感受性パターンごとに分類し、各群の臨床情報 (年齢、性別、基礎疾患、治療歴) について統計学的解析を行った。検定は  $\chi^2$  検定、Fisher の確率検定あるいは Mann-Whitney の U 検定を用いて、統計学的有意差 ( $P < 0.05$ ) の認められた項目を各群のリスク因子とした。

### 3 結果

*S. pseudintermedius* 282 株中 195 株 (69.1%) が MRSP であった。MRSP 195 株の SCC*mec*-type の内訳は、type III-like が 103 株 (52.8%)、type V が 73 株 (37.4%) であり、19 株 (9.7%) は NT であった。疾患別に SCC*mec*-type の分布をみると、type III-like は type V よりも高い頻度で入院症例から検出されていた。また、SCC*mec*-type III-like は type V に比べて PFGE 型の遺伝的相同性が高く、薬剤感受性パターンもほぼ同一であった。さらに、SCC*mec*-type III-like と type V の 2 群比較から、前者では入院・手術と抗菌薬投与がリスク因子であることが判明した。

## 4 考察

本研究の結果から、SCC*mec*-type III-like と type V はそれぞれ院内感染型 MRSP (HA-MRSP)、市中感染型 MRSP (CA-MRSP) に相当することが示唆された。したがって、イヌの *S. pseudintermedius* 感染症では MSSP、HA-MRSP と CA-MRSP の 3 つのタイプを想定する必要があると言える。これら 3 タイプの薬剤感受性パターンに着目すると、MSSP では第一世代セファロスポリン、HA-MRSP ではミノサイクリンがそれぞれ高い感性率を示した。一方、CA-MRSP では感受性パターンが多様であった。よって、実際の治療において、MSSP と HA-MRSP では上記の抗菌薬が有効と考えられるが、CA-MRSP では薬剤感受性試験に基づいた抗菌薬選択が推奨される。このような遺伝子型を考慮した薬剤の選択は、抗菌薬の治療効果を高めるだけでなく、薬剤耐性菌出現のリスクを最小限に抑える効果も期待できる。

## 総括

本研究では、近年増加している MRSP 感染症を疾患別、遺伝子型別に多面的に分析した。病原性の分析では、表在性膿皮症由来の MRSP は表皮剥脱毒素と関連性のないことを示した。*S. pseudintermedius*、とくに MRSP の病原性に関してはいまだ不明な点が多く、今後の研究による解明が期待される。

対象疾患を拡大した分子疫学解析では、MRSA の院内感染型、市中感染型に相当する遺伝子型が MRSP にも存在し、HA-MRSP、CA-MRSP として分類できることを新たに見出した。この分類が国外の MRSP 感染症にも適応するか否かは、今後さまざまな地域で検証される必要がある。本研究で確立した改良型 M-PCR 法は SCC*mec*-type に基づいたこの分類を簡便に行えることから、今後の疫学研究に寄与するものと考えられる。また、MSSP、HA-MRSP、CA-MRSP はそれぞれ異なる薬剤感受性パターンを示したことから、これらの分類は *S. pseudintermedius* 感染症の治療に有用と思われる。

本論文の一部は以下に公表した。

Kasai, T., Kato, Y., Saegusa, S. and Murakami, M. 2015. Distribution of major staphylococcal cassette chromosome *mec* types and exfoliative toxin genes in *Staphylococcus pseudintermedius* strains from dogs with superficial pyoderma in Japan. J. Azabu Univ.

## General overview

Genus *Staphylococcus* is normal inhabitant of the skin and mucosa of mammals and is involved in opportunistic host infections. *S. pseudintermedius* is known as a major opportunistic pathogen of dogs, and the emergence of methicillin-resistant strains has caused serious problems in small animal medicine. Although a substantial number of reports on methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) have been published, there have been few reports which analyzed the association between microbiological and clinical characteristics, or virulence of MRSP. In the present study, we collected clinical isolates of *S. pseudintermedius* from diseased dogs and analyzed them from clinical and bacteriological aspects. We also developed rapid diagnostic tests for MRSP by modifying conventional analysis methods.

In Chapter 1, to understand the genotypic distribution of *S. pseudintermedius*, we surveyed 74 dogs with superficial pyoderma in three veterinary hospitals in Japan. Seventy-four *S. pseudintermedius* strains were isolated, 52 of which (70.3%) were *mecA*-positive MRSP. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of the identified MRSP strains revealed that the most prevalent genotype was SCC*mec*-type III-like (63.4%) followed by type V (34.6%). These data suggested high prevalence of MRSP strains consisting of two major SCC*mec*-types among canine pyoderma in Japan. We found low prevalence of exfoliative toxin

genes (*exp*) in the MRSP strains: *expA* and *expB* were present in 1.9% and 0%, respectively. These findings suggest no association in carriage between *mecA* and *exp* genes in *S. pseudintermedius* from canine pyoderma.

In Chapter 2, we described our improved multiplex PCR (M-PCR) methods to identify MRSP and its SCC*mec*-type. Epidemiological studies of *S. pseudintermedius* are usually based on species identification via M-PCR method, PCR-based detection of *mecA*, and three additional PCR procedures to determine the prevalence of SCC*mec*-types. Thus, a total of five PCR procedures are required to determine those characteristics of *S. pseudintermedius* strains. In order to simplify the detection of MRSP and its SCC*mec* typing, we integrated the complicated conventional methods by reducing five PCRs to two M-PCRs (M-PCR 1 and 2). We confirmed that these improved M-PCR strategies are useful for characterizing MRSP and applied them to veterinary clinical staphylococcal strains. We successfully and readily identified 30 MRSP strains from 86 dogs using M-PCR 1, and determined the SCC*mec*-type for each of the 30 MRSP strains—type III-like (16 strains, 53.3%) and type V (14 strains, 46.7%), both of which are prevalent worldwide—using M-PCR2. These results were identical to those obtained using conventional methods.

In Chapter 3, we analyzed 282 *S. pseudintermedius* isolates to gain insight into the association between microbiological and clinical characteristics of MRSP. A total of 195 (69.1%) strains were identified as *mecA*-positive MRSP and classified into genotypes by staphylococcal

cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing. We determined 103 of 195 (52.8%) strains as SCC*mec*-type III-like, 73 (37.4%) as type V, and the other 19 (9.7%) as nontypeable. SCC*mec*-type III-like MRSP strains were statistically-significantly correlated with hospital admission and antimicrobial therapy, and exhibited a homogeneous genotype similar to the ST71-MRSP that was known as a global endemic clone in dogs. In contrast, SCC*mec*-type V MRSP strains were not highly-correlated with those histories and exhibited genotypic and phenotypic heterogeneity. These properties of MRSP strains with SCC*mec*-types III-like and V were similar to those of healthcare-associated (HA-) and community-associated (CA-) methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), respectively. Thus, we here designated SCC*mec*-types III-like and V as HA-MRSP and CA-MRSP. We also presented the therapeutic approach and simplified screening method for each genotype in the present study.

Such a genotypic classification of MRSP strains in association with clinical background would be helpful in formulation of infection control measures and treatment strategies in veterinary practice.

In conclusion, we analyzed canine *S. pseudintermedius* infections and demonstrated that cutaneous pyoderma caused by MRSP had no relationship with exfoliative toxins. We also found that MRSP with SCC*mec*-types III-like and V were analogous to HA- and CA-MRSA. To assess whether this classification could be applied against the MRSP isolates from any part of the world, further studies in many regions and countries need to be

conducted. Our improved M-PCR strategies would be helpful in future epidemiological studies.

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始懇切なる御指導と御助言を賜りました麻布大学公衆衛生学第二研究室、加藤行男准教授ならびに同大学分子生物学研究室、村上賢教授に深謝いたします。また、本論文を御高閲いただきました同大学実験動物学研究室、猪股智夫教授、同大学内科学第二研究室、久末正晴准教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました順天堂大学医学部微生物学、佐々木崇助教に厚く御礼を申し上げます。

本研究を行うにあたり、多大な御協力を頂きました麻布大学附属動物病院小動物臨床研究室、川原井晋平講師、同大学公衆衛生学第二研究室の皆様、同大学分子生物学研究室の皆様、吉田動物病院 池順子先生、石崎動物病院 石崎俊史先生、すとう動物病院 周藤明美先生、かじ動物病院 清野かじ先生、ぱんだ動物病院 田中樹竹先生、山口獣医科医院 山口光昭先生、あおい動物病院 山下祐輔先生、臼井犬猫病院 臼井玲子先生、ファールブル動物医療センター 堀中修先生に深く感謝の意を表します。

また、本研究を行うにあたり、御理解と御協力を頂きました北川犬猫病院の三枝早苗院長とスタッフの皆様には深謝いたします。

最後に、社会人学生としての研究生活を理解し、支えてくれた家族に深く感謝いたします。



## 引用文献

- Allaker, R.P., Lloyd, D.H., Bailey, R.M., 1992a. Population sizes and frequency of staphylococci at mucocutaneous sites on healthy dogs. *The Veterinary record* 130, 303-304.
- Allaker, R.P., Lloyd, D.H., Simpson, A.I., 1992b. Occurrence of *Staphylococcus intermedius* on the hair and skin of normal dogs. *Research in veterinary science* 52, 174-176.
- Bannoehr, J., Ben Zakour, N.L., Waller, A.S., Guardabassi, L., Thoday, K.L., van den Broek, A.H., Fitzgerald, J.R., 2007. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *Journal of bacteriology* 189, 8685-8692.
- Bannoehr, J., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., Fitzgerald, J.R., 2009. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of clinical microbiology* 47, 469-471.
- Bannoehr, J., Guardabassi, L., 2012. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary dermatology* 23, 253-266, e251-252.
- Bardiau, M., Yamazaki, K., Ote, I., Misawa, N., Mainil, J.G., 2013. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats. *Microbiology and immunology* 57, 496-501.

- Beco, L., Guaguere, E., Lorente Mendez, C., Noli, C., Nuttall, T., Vroom, M., 2013a. Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections (1): diagnosis based on clinical presentation, cytology and culture. *The Veterinary record* 172, 72-78.
- Beco, L., Guaguere, E., Lorente Mendez, C., Noli, C., Nuttall, T., Vroom, M., 2013b. Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections: part 2-- antimicrobial choice, treatment regimens and compliance. *The Veterinary record* 172, 156-160.
- Bemis, D.A., Jones, R.D., Frank, L.A., Kania, S.A., 2009. Evaluation of susceptibility test breakpoints used to predict *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 21, 53-58.
- Black, C.C., Solyman, S.M., Eberlein, L.C., Bemis, D.A., Woron, A.M., Kania, S.A., 2009. Identification of a predominant multilocus sequence type, pulsed-field gel electrophoresis cluster, and novel staphylococcal chromosomal cassette in clinical isolates of *mecA*-containing, methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary microbiology* 139, 333-338.
- Chanchaithong, P., Perreten, V., Schwendener, S., Tribuddharat, C., Chongthaleong, A., Niyomtham, W., Prapasarakul, N., 2014. Strain typing and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococcal species in dogs and people associated with dogs in Thailand. *Journal of applied microbiology*

117, 572-586.

DeLeo, F.R., Otto, M., Kreiswirth, B.N., Chambers, H.F., 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375, 1557-1568.

Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A., Haesebrouck, F., 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55, 1569-1573.

Feng, Y., Tian, W., Lin, D., Luo, Q., Zhou, Y., Yang, T., Deng, Y., Liu, Y.H., Liu, J.H., 2012. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in pets from South China. *Veterinary microbiology* 160, 517-524.

Fitzgerald, J.R., Penades, J.R., 2008. Staphylococci of Animals. In *Staphylococcus; Molecular Genetics*, pp. 255-269. Edited by Lindsay, J.A. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Freney, J., Kloos, W.E., Hajek, V., Webster, J.A., Bes, M., Brun, Y., Vernozy-Rozand, C., 1999. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci of the International Committee on Systematic Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 2, 489-502.

Futagawa-Saito, K., Makino, S., Sunaga, F., Kato, Y., Sakurai-Komada, N.,

- Ba-Thein, W., Fukuyasu, T., 2009. Identification of first exfoliative toxin in *Staphylococcus pseudintermedius*. FEMS microbiology letters 301, 176-180.
- Gortel, K., Campbell, K.L., Kakoma, I., Whittem, T., Schaeffer, D.J., Weisiger, R.M., 1999. Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. Am J Vet Res 60, 1526-1530.
- Guardabassi, L., Loeber, M.E., Jacobson, A., 2004. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. Veterinary microbiology 98, 23-27.
- Hajek, V., 1976. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. Int J Syst Bacteriol 26, 401-408.
- Herold, B.C., Immergluck, L.C., Maranan, M.C., Lauderdale, D.S., Gaskin, R.E., Boyle-Vavra, S., Leitch, C.D., Daum, R.S., 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. Jama 279, 593-598.
- Hillier, A., Lloyd, D.H., Weese, J.S., Blondeau, J.M., Boothe, D., Breitschwerdt, E., Guardabassi, L., Papich, M.G., Rankin, S., Turnidge, J.D., Sykes, J.E., 2014. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). Veterinary dermatology 25, 163-175, e142-163.

- Hiramatsu, K., Ito, T., Tsubakishita, S., Sasaki, T., Takeuchi, F., Morimoto, Y., Katayama, Y., Matsuo, M., Kuwahara-Arai, K., Hishinuma, T., Baba, T., 2013. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infection & chemotherapy* 45, 117-136.
- Clinical and Laboratory Standards Institute., 2013. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; second informational supplement VET01-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute., 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC)., 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 4961-4967.
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., Hiramatsu, K., 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45, 1323-1336.
- Ito, T., Katayama, Y., Hiramatsu, K., 1999. Cloning and nucleotide

sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. Antimicrobial agents and chemotherapy 43, 1449-1458.

Iyori, K., Futagawa-Saito, K., Hisatsune, J., Yamamoto, M., Sekiguchi, M., Ide, K., Son, W.G., Olivry, T., Sugai, M., Fukuyasu, T., Iwasaki, T., Nishifuji, K., 2011. *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes subcorneal clefts in canine epidermis. Veterinary dermatology 22, 319-326.

Iyori, K., Hisatsune, J., Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Ide, K., Nagata, M., Fukata, T., Iwasaki, T., Oshima, K., Hattori, M., Sugai, M., Nishifuji, K., 2010. Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs. FEMS microbiology letters 312, 169-175.

Jones, R.D., Kania, S.A., Rohrbach, B.W., Frank, L.A., Bemis, D.A., 2007. Prevalence of oxacillin- and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001-2005). Journal of the American Veterinary Medical Association 230, 221-227.

Kadlec, K., Schwarz, S., Perreten, V., Andersson, U.G., Finn, M., Greko, C., Moodley, A., Kania, S.A., Frank, L.A., Bemis, D.A., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., Duim, B., Wagenaar, J.A., van Duijkeren, E., Weese, J.S., Fitzgerald, J.R., Rossano, A., Guardabassi, L., 2010.

Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. The Journal of antimicrobial chemotherapy 65, 1826-1828.

Kania, S.A., Williamson, N.L., Frank, L.A., Wilkes, R.P., Jones, R.D., Bemis, D.A., 2004. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. American Journal of Veterinary Research 65, 1265-1268.

笠井 智子, 三枝 早苗, 佐々木 崇, 2010. 臨床検査機関でメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) と同定されたイヌ由来ブドウ球菌株の分類学的再検討. 獣医臨床皮膚科 16, 119-124.

Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K., 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy 44, 1549-1555.

Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Nagata, M., Nishifuji, K., Iwasaki, T., Fukata, T., 2010. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* Isolated from dogs with pyoderma in Japan. Journal of Veterinary Medical Science 72, 1615-1619.

Klevens, R.M., Morrison, M.A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L.H., Lynfield, R., Dumyati, G., Townes, J.M., Craig, A.S.,

- Zell, E.R., Fosheim, G.E., McDougal, L.K., Carey, R.B., Fridkin, S.K., 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Jama* 298, 1763-1771.
- Kondo, Y., Ito, T., Ma, X.X., Watanabe, S., Kreiswirth, B.N., Etienne, J., Hiramatsu, K., 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 264-274.
- Loeffler, A., Linek, M., Moodley, A., Guardabassi, L., Sung, J.M., Winkler, M., Weiss, R., Lloyd, D.H., 2007. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary dermatology* 18, 412-421.
- Ma, X.X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S., Hiramatsu, K., 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, 1147-1152.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant



- bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18, 268-281.
- Maluping, R.P., Paul, N.C., Moodley, A., 2014. Antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from veterinary clinical cases in the UK. *Br J Biomed Sci* 71, 55-57.
- McCarthy, A.J., Harrison, E.M., Stanczak-Mrozek, K., Leggett, B., Waller, A., Holmes, M.A., Lloyd, D.H., Lindsay, J.A., Loeffler, A., 2015. Genomic insights into the rapid emergence and evolution of MDR in *Staphylococcus pseudintermedius*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 70, 997-1007.
- Moodley, A., Stegger, M., Ben Zakour, N.L., Fitzgerald, J.R., Guardabassi, L., 2009. Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (*spa*) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary microbiology* 135, 320-326.
- Naimi, T.S., LeDell, K.H., Como-Sabetti, K., Borchardt, S.M., Boxrud, D.J., Etienne, J., Johnson, S.K., Vandenesch, F., Fridkin, S., O'Boyle, C., Danila, R.N., Lynfield, R., 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Jama* 290, 2976-2984.
- Nhan, T.X., Leclercq, R., Cattoir, V., 2011. Prevalence of toxin genes in consecutive clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and clinical impact. *Eur J Clin Microbiol* 30, 719-725.

- Nienhoff, U., Kadlec, K., Chaberny, I.F., Verspohl, J., Gerlach, G.F., Kreienbrock, L., Schwarz, S., Simon, D., Nolte, I., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. *Veterinary microbiology* 150, 191-197.
- Oliveira, D.C., Lencastre, H.d., 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, 2155-2161.
- Onuma, K., Tanabe, T., Sato, H., 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. *Veterinary dermatology* 23, 17-22, e15.
- Perreten, V., Kadlec, K., Schwarz, S., Gronlund Andersson, U., Finn, M., Greko, C., Moodley, A., Kania, S.A., Frank, L.A., Bemis, D.A., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., Duim, B., Wagenaar, J.A., van Duijkeren, E., Weese, J.S., Fitzgerald, J.R., Rossano, A., Guardabassi, L., 2010. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65, 1145-1154.
- Pottumarthy, S., Schapiro, J.M., Prentice, J.L., Houze, Y.B., Swanzy, S.R., Fang, F.C., Cookson, B.T., 2004. Clinical isolates of *Staphylococcus*

- intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of clinical microbiology 42, 5881-5884.
- Ruscher, C., Lubke-Becker, A., Semmler, T., Wleklinski, C.G., Paasch, A., Soba, A., Stamm, I., Kopp, P., Wieler, L.H., Walther, B., 2010. Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. Veterinary microbiology 144, 340-346.
- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., Hiramatsu, K., 2007a. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. Journal of clinical microbiology 45, 1118-1125.
- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., Hiramatsu, K., 2007b. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. Journal of clinical microbiology 45, 2770-2778.
- Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirota, S., Kawakami, T., Fukata, T., Hiramatsu, K., 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. Journal of clinical microbiology 48, 765-769.
- Schwarz, S., Kadlec, K., Strommenger, B., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-2006 in

- Germany. The Journal of antimicrobial chemotherapy 61, 282-285.
- Solyman, S.M., Black, C.C., Duim, B., Perreten, V., van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A., Eberlein, L.C., Sadeghi, L.N., Videla, R., Bemis, D.A., Kania, S.A., 2013. Multilocus sequence typing for characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. Journal of clinical microbiology 51, 306-310.
- Wang, Y., Yang, J., Logue, C.M., Liu, K., Cao, X., Zhang, W., Shen, J., Wu, C., 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma in North China. Journal of applied microbiology 112, 623-630.
- Westh, H., Zinn, C.S., Rosdahl, V.T., 2004. An international multicenter study of antimicrobial consumption and resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from 15 hospitals in 14 countries. Microb Drug Resist 10, 169-176.
- Youn, J.-H., Koo, H.C., Ahn, K.J., Lim, S.-K., Park, Y.H., 2011. Determination of staphylococcal exotoxins, SCCmec types, and genetic relatedness of *Staphylococcus intermedius* group isolates from veterinary staff, companion animals, and hospital environments in Korea. Journal of Veterinary Science 12, 221.
- Zhang, K., McClure, J.A., Elsayed, S., Louie, T., Conly, J.M., 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of clinical

microbiology 43, 5026-5033.

Zubeir, I.E., Kanbar, T., Alber, J., Lammler, C., Akineden, O., Weiss, R., Zschock, M., 2007. Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin/oxacillin-resistant *Staphylococcus intermedius* isolated from clinical specimens during routine veterinary microbiological examinations. Veterinary microbiology 121, 170-176.

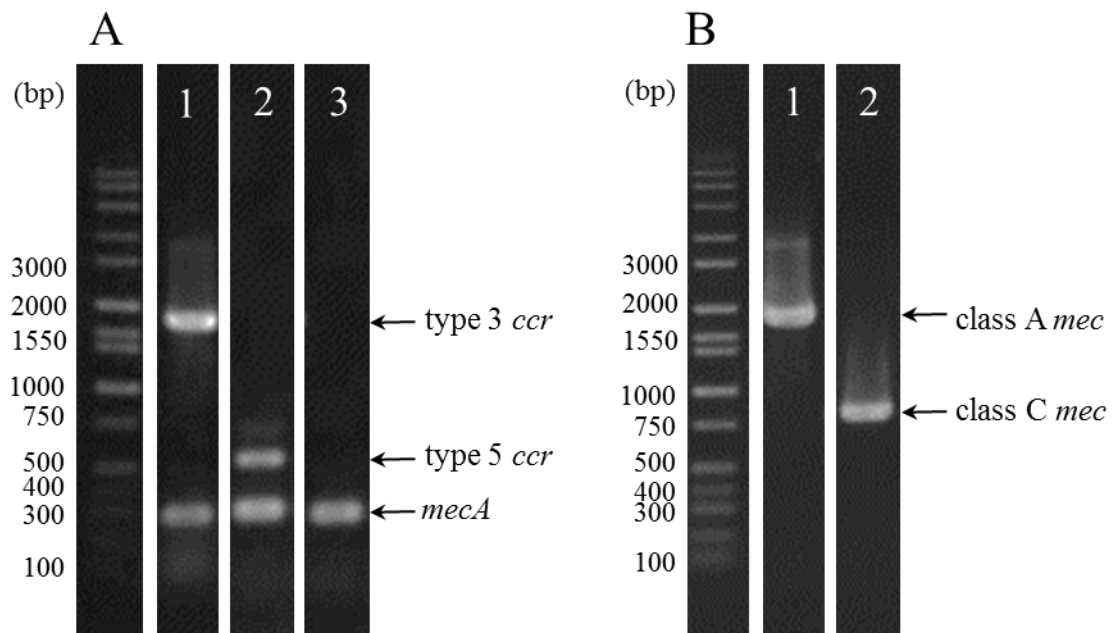


Fig. 1 Multiplex PCR analysis of *ccr* gene complex (A) and *mec* gene complex (B).

Lane 1, SCC*mec*-type III-like MRSP; lane 2, SCC*mec*-type V MRSP; lane 3, SCC*mec*-nontypeable MRSP. (A) Upper bands in lanes 1 and 2 represent types 3 and 5 *ccr* genes, respectively. Lane 3 is a nontypeable strain that possesses *mecA* gene only. (B) Lanes 1 and 2 show single bands specific to class A and class C *mec*.

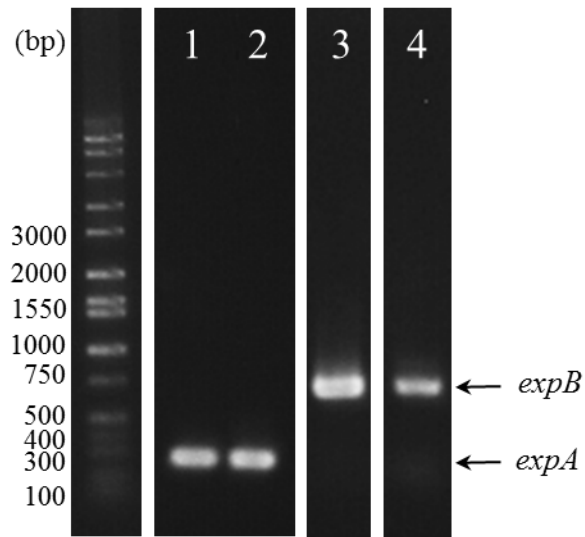


Fig. 2 PCR analysis of exfoliative genes.

Lane 1, a MSSP isolate carrying the *expA* gene; lane 2, positive control strain for *expA*; lane 3, a MSSP carrying the *expB* gene; lane 4, positive control strain for *expB*.

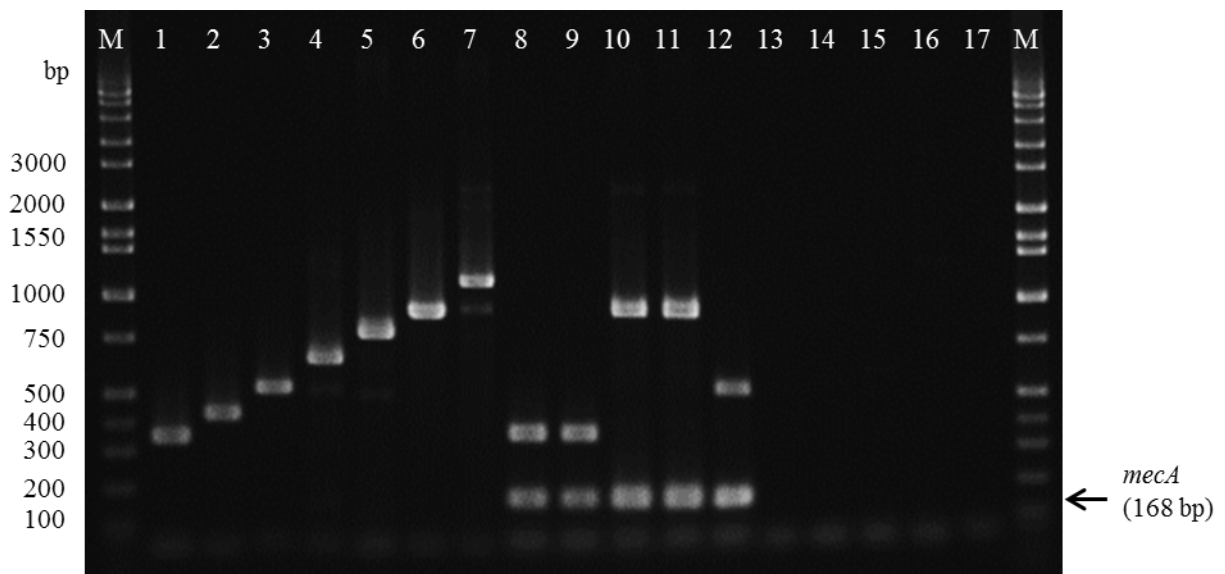


Fig. 3. Modified multiplex PCR 1 (M-PCR 1) for methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci (CPS) identification.

Lane 1, *S. aureus* (GTC 286); lane 2, *S. intermedius* (JCM 2422); lane 3, *S. schleiferi* (JCM 7470); lane 4, *S. delphini* group A (DSM 20771); lane 5, *S. hyicus* (JCM 2423); lane 6, *S. pseudintermedius* (LMG 22219); lane 7, *S. delphini* group B (h-2C); lanes 8-9, MRSA (NCTC 10442 and NVAU 06003); lanes 10-11, MRSP (NVAU 06002 and NVAU 06045); lane 12, methicillin-resistant *S. schleiferi* (TKCC 10049); lane 13, *S. sciuri*; lane 14, *S. xylosus*; lane 15, *S. felis*; lane 16, *Micrococcus caseolyticus*; lane 17, water (negative control); M, molecular weight marker.



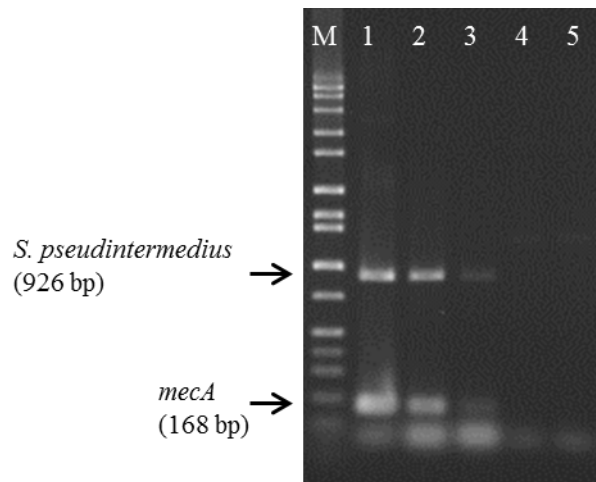


Fig. 4. Sensitivity assay for M-PCR 1.

Target products (923 bp of *S. pseudintermedius* and 168 bp of *mecA*) are marked by arrows.

Lane 1,  $10^5$  cells equivalent (one  $\mu\text{L}$  template); lane 2,  $10^4$  cells equivalent; lane 3,  $10^3$  cells equivalent; lane 4,  $10^2$  cells equivalent; lane 5, water (negative control); M, molecular weight marker.

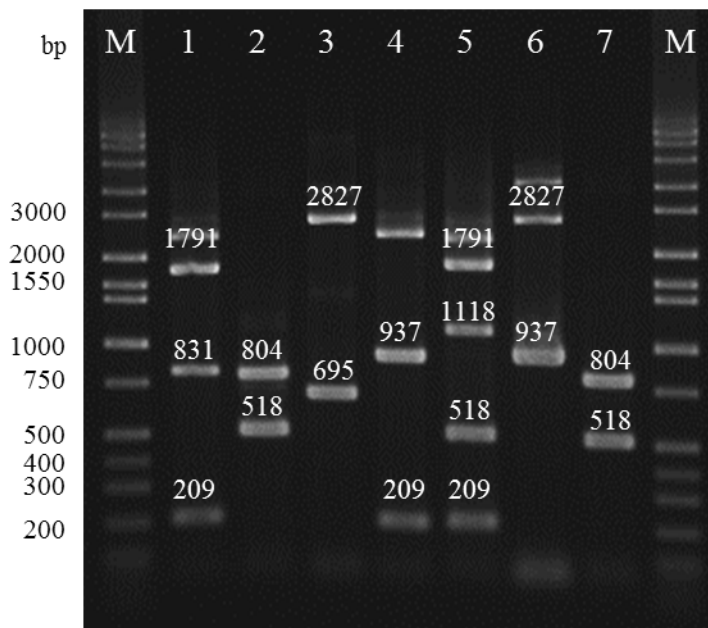


Fig. 5. Modified multiplex PCR 2 (M-PCR 2) for the *SCCmec*-type determination.

Lane 1, *SCCmec*-type III-like MRSP (NVAU 06002); lane 2, type V MRSP (NVAU 06045); lane 3, type I MRSA (NCTC 10442); lane 4, type II MRSA (NVAU 06003); lane 5, type III MRSA (85/2082); lane 6, type IV MRSA (NVAU 06032); lane 7, type V MRSA (TKCC 12053B); M, molecular weight marker.

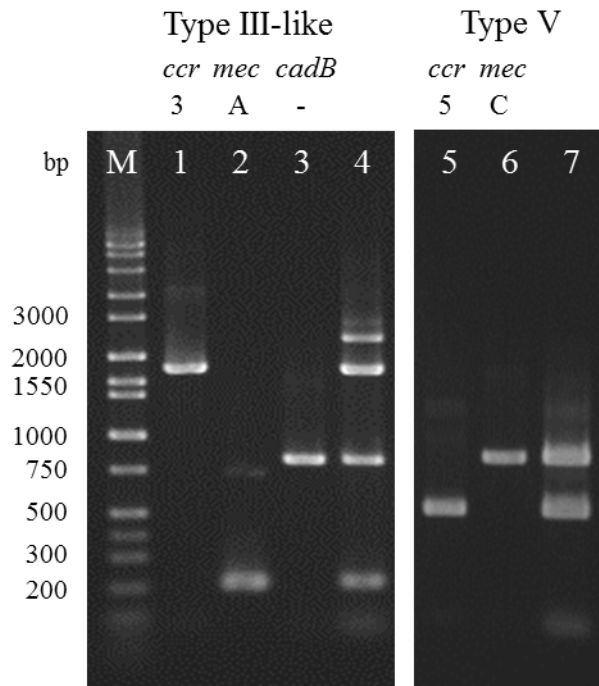


Fig. 6. Conventional PCRs for the determination of *SCCmec*-types of MRSP. Lanes 1-4 and 5-7 were PCR products from *SCCmec*-type III-like MRSP (NVAU 06002) and *SCCmec*-type V MRSP (NVAU 06045), respectively. Lane 1, type 3 *ccr*; lane 2, class A *mec*; lane 3, *cadB*(-); lane 4, products by M-PCR 2 (= lane 1 in Fig. 5.); lane 5, type 5 *ccr*; lane 6, class C *mec*; lane 7, products by M-PCR 2 (= lane 2 in Fig. 5.); M, molecular weight marker.

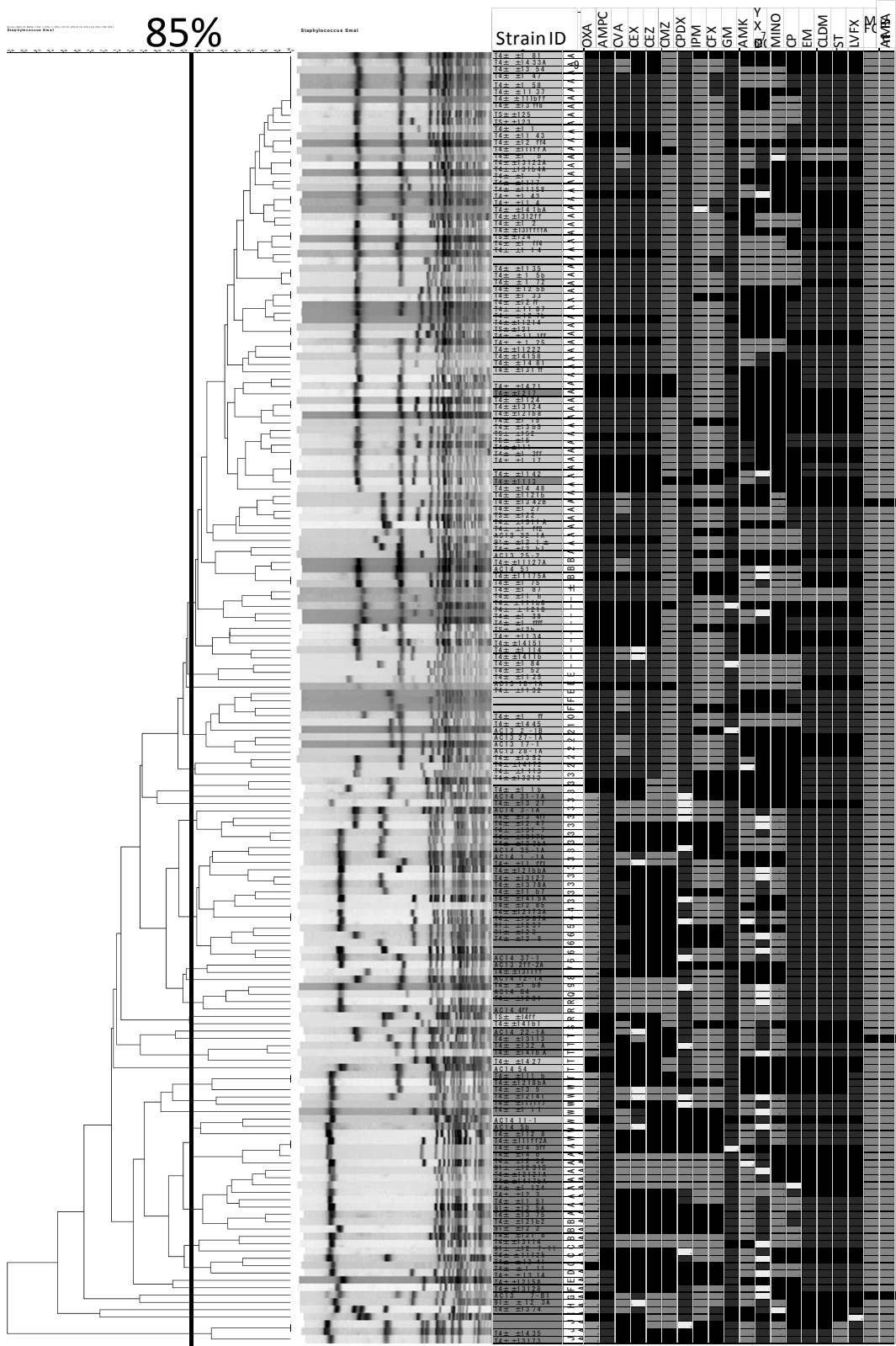


Fig. 7. PFGE, antibiogram type, and SCC *mec* – types of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains.

- Susceptible
  Intermediate
  ,  Resistant
- SCC*mec*-type III-like
- SCC*mec*-type V

Table 1. Distribution of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* strains from canine pyoderma

	No. (%) of strains
<i>S. pseudintermedius</i>	74 (100)
Methicillin-susceptible	22 (29.7)
Methicillin-resistant	52 (70.3)
SCC <i>mec</i> -type III-like	33
SCC <i>mec</i> -type V	18
Nontypeable	1

Table 2. Distribution of two exfoliative toxin genes among *S. pseudintermedius* strains

<i>S. pseudintermedius</i>	n	No. (%) of positive strains	
		<i>expA</i>	<i>expB</i>
Methicillin-susceptible	22	5 (22.7)	1 (4.5)
Methicillin-resistant	52	1 (1.9)	0 (0)

Table 3. Reference CPS strains used for this study.

Species	Strain	<i>mecA</i>	<i>ccr</i> type	<i>mec</i> class	SCC <i>mec</i> -type	Reference
<i>S. aureus</i>	GTC 286 <sup>T</sup>	-				
	NCTC 10442*	+	1	B	I	Ito <i>et al</i> (2001)
	NVAU 06003*	+	2	A	II	Sasaki <i>et al</i> (2007a)
	85/2082*	+	3	A	III	Ito <i>et al</i> (2001)
	NVAU 06032*	+	2	B	IV	Sasaki <i>et al</i> (2007a)
	TKCC 12053B*	+	5	C	V	This study
<i>S. intermedius</i>	JCM 2422 <sup>T</sup>	-				
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	JCM 7470 <sup>T</sup>	-				
	TKCC 10049*	+	5	C	V	This study
<i>S. delphini</i> group A	DSM 20771 <sup>T</sup>	-				
<i>S. hyicus</i>	JCM 2423 <sup>T</sup>	-				
<i>S. pseudintermedius</i>	LMG 22219 <sup>T</sup>	-				
	NVAU 06002*	+	3	A	III-like	Sasaki <i>et al</i> (2007a)
	NVAU 06045*	+	5	C	V	Sasaki <i>et al</i> (2007a)
<i>S. delphini</i> group B	h-2C*	-				Sasaki <i>et al</i> (2007b)

T, type strain; \*provided from Juntendo University; †clinical strains identified each species and SCC*mec* type by conventional methods.

Table 4. Primers used in the multiplex PCRs.

Primer for PCR	Nucleotide sequence (5'-3')	Specificity	SCCmec-type	Size (bp)	Reference
M-PCR 1 (for species identification of CPS and detecting <i>mecA</i> )					
M-mecA F2 M-mecA R2	GCGATCAATGTTACCGTAGTT AAGCGATAATGGTGAAGTAGAA	<i>mecA</i>		168	This study
au-F3 au-nucR	TCGCTTGCTATGATTGTGG GCCAATGTTCTACCATAGC	<i>S. aureus</i>		359	Sasaki <i>et al.</i> (2010)
in-F in-R3	CATGTCATATTATTGCGAATGA AGGACCATCACCATTGACATATTGA- AACC	<i>S. intermedius</i>		430	Sasaki <i>et al.</i> (2010)
sch-Fed sch-Red	AATGGCTACAATGATAACTACTAAagat CATATCTGTCTTTTCGGCGGgga	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> , <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>		526	Sasaki <i>et al.</i> (2010) modified in this study
dea-F dea-R	TGAAGGCATATTGTAGAACAA CGRIACTTTTCGTTAGGTCG	<i>S. delphini</i> group A		661	Sasaki <i>et al.</i> (2010)
hy-F1 hy-R1	CATTATATGATTGAACGTG GAATCAATATCGTAAAGTTGC	<i>S. hyicus</i>		793	Sasaki <i>et al.</i> (2010)
pse-F2ed pse-R5ed	TRGGCAGTAGGATTCGTTAAatg CTTTTGCTGYCMTTTTGgctt	<i>S. pseudintermedius</i>		926	Sasaki <i>et al.</i> (2010) modified in this study
deb-F deb-R4	GGAAGRITTCGTTTTTCTAGAC TATGCGATTCAAGAACTGA	<i>S. delphini</i> group B		1135	Sasaki <i>et al.</i> (2010)
M-PCR 2 (for determine SCCmec types I to V and III-like)					
α1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	type 1 <i>ccr</i>	I	695	Kondo <i>et al.</i> (2007)
α2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	type 2 <i>ccr</i>	II, IV	937	Kondo <i>et al.</i> (2007)
α3	AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT	type 3 <i>ccr</i>	III, III-like	1791	Kondo <i>et al.</i> (2007)
βc	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT				
γR	CCTTATAGACTGGATTATTCAAAA- TAT	type 5 <i>ccr</i>	III, V	518	Kondo <i>et al.</i> (2007)
γF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATA- AT				
IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	class B <i>mec</i>	I, IV	2827	Kondo <i>et al.</i> (2007)
IS2(iS-2) mA7	TGAGGTTATTCAGATATTTGATGT ATATACCAAACCCGACAACACTACA	class C <i>mec</i>	V	804	Kondo <i>et al.</i> (2007)
MECI P2 MECI P3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCATTGTC	class A <i>mec</i>	II, III, III-like	209	Oliveira <i>et al.</i> (2002)
sccmecIII-F4	AACAGCCATGACAAGCAC	flanking region of the cadmium resistance operon	III-like	831	Perreten <i>et al.</i> (2010)
scc241-F6	AAGACTTAGCAGGAAAACGC	cadmium resistance operon, <i>cadB</i>	III	1118	Perreten <i>et al.</i> (2010)
sccmecIII-R3	TAATGCCCATCATTTCAC				



Table 5. Analysis of risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*

Variable level	No. (%) of MRSP strains with SCCmec-types III-like and V (n = 176)		No. (%) of MSSP strains (n = 87)		OR	95% CI	p-Value
Age in years	8.32 ± 0.307		6.69 ± 0.414				0.002
Sex							
Male	88	(50.0)	46	(52.9)	0.89	0.5329-1.491	0.70
Female	88	(50.0)	41	(47.1)			
Specimens collected from							
Skin lesions of pyoderma	108	(61.4)	63	(72.4)	0.61	0.3457-1.059	0.10
Ear discharge	50	(28.4)	23	(26.4)	1.10	0.6192-1.969	0.77
Surgical wound or catheter site	5	(2.8)	0	(0)	7.74	0.4368-137.3	0.10
Clinical history							
Underlying diseases	137	(77.8)	57	(65.5)	1.85	1.048-3.261	0.04
Allergic dermatitis	100	(56.8)	47	(54.0)	1.12	0.6680-1.877	0.69
Cushing's syndrome	16	(9.1)	3	(3.4)	2.80	0.7931-9.885	0.13
Hypothyroidism	18	(10.2)	7	(8.0)	1.30	0.5221-3.247	0.66
Neoplasm	4	(2.3)	3	(3.4)	0.65	0.1424-2.977	0.69
Cardiac disease	7	(4.0)	3	(3.4)	1.16	0.2924-4.600	1.00
Hospitalization and surgery	53	(30.1)	9	(10.3)	3.73	1.744-7.998	0.0003
Medication history of systemic therapy							
Antimicrobials	142	(80.7)	53	(60.9)	2.68	1.514-4.741	0.001
Number of classes of antimicrobials	1.41 ± 0.084		0.89 ± 0.096				0.0002
β-lactams	142	(80.7)	53	(60.9)	2.68	1.514-4.741	0.001
Cephalexin	81	(46.0)	23	(26.4)	2.37	1.353-4.159	0.003
3rd generation cephalosporins	28	(15.9)	6	(6.9)	2.55	1.015-6.426	0.05
Cefovecin	15	(8.5)	1	(1.1)	8.01	1.040-61.72	0.02
Fluoroquinolones	30	(17.0)	10	(11.5)	2.57	1.222-5.391	0.01
Trimethoprim/sulfamethoxazole	17	(9.7)	2	(2.3)	4.54	1.025-20.14	0.04
Macrolides	11	(6.3)	2	(2.3)	2.82	0.6101-13.00	0.23
Chloramphenicol	7	(4.0)	2	(2.3)	2.29	0.4839-10.84	0.35
Tetracyclines	25	(14.2)	15	(17.2)	0.79	0.3950-1.599	0.58
Glucocorticoids	46	(26.1)	25	(28.7)	0.88	0.4949-1.557	0.66
Medication history of topical therapy							
Antimicrobials	93	(52.8)	39	(44.8)	1.38	0.8232-2.310	0.24
Number of classes of antimicrobials	0.99 ± 0.090		0.70 ± 0.111				0.05
Mupirocin	33	(18.8)	8	(9.2)	2.28	1.004-5.174	0.048
Fluoroquinolones	45	(25.6)	15	(17.2)	1.65	0.8596-3.163	0.16
Aminoglycosides	55	(31.3)	30	(34.5)	0.86	0.5007-1.490	0.67
Macrolides	5	(2.8)	4	(4.6)	0.49	0.1607-2.347	0.49
Glucocorticoids	73	(41.5)	39	(44.8)	0.87	0.5195-1.465	0.69