

## [原 著]

Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (Low-Level MRSA)  
検出のための測定法の評価水野理恵<sup>1), 2)</sup>・川村久美子<sup>2)\*</sup>・奈田 俊<sup>3)</sup>・馬場尚志<sup>3), 4)</sup>・伊藤秀郎<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻<sup>2)</sup> 名古屋大学医学部保健学科・検査技術科学専攻<sup>3)</sup> 名古屋大学医学部附属病院検査部<sup>4)</sup> 名古屋大学医学部附属病院難治感染症部

(平成 19 年 5 月 11 日受付, 平成 19 年 7 月 14 日受理)

より精度の高い methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 検出法を見いだすことを目的に, 3 種類の MRSA 検査法 (薬剤感受性試験, PBP2a 検出法, MRSA スクリーニング培地) の評価を行った。PCR 法による *mecA* 遺伝子の検出では, 臨床分離 *S. aureus* 153 株のうち, 陰性 54 株, 陽性 99 株であった。*mecA* 遺伝子の有無を基準として, 各種 MRSA 検出法の感度を比較したところ, ラテックス凝集法による PBP2a の検出および MRSA スクリーニング培地は共に 100% であった。薬剤感受性試験については, 薬剤を oxacillin (MPIPC) と cefoxitin (CFX) の 2 剤を用い, 各々の薬剤について微量液体希釈法および寒天平板拡散法の 2 法で測定を行ったところ, CFX を用いた微量液体希釈法および寒天平板拡散法が感度 97.0% と最も優れていた。本研究において, *mecA* 遺伝子を保有しているにもかかわらず, MPIPC もしくは CFX による薬剤感受性試験 (微量液体希釈法, 寒天平板拡散法) では MRSA と判定できなかった株 (Low-level MRSA) が 15 株存在し, このうち, 2 株は実施されたすべての薬剤感受性試験において MSSA と誤判定された。これら菌株の western blotting による発現解析の結果, Low-level MRSA 15 株とも PBP2a は発現していたが, MSSA と誤判定された 2 株については発現量の低下傾向が認められた。これら Low-level MRSA は 7 種類のスクリーニング培地にすべて発育可能であったが, 少量の菌 (100~500 cfu/ml) における回収率では CFX 含有培地は 80~100% と最も良好であった。

以上の結果から, CFX による薬剤感受性試験, CFX 含有 MRSA スクリーニング培地, PBP 2a 検出法の有用性が確認され, これらを組み合わせることで, より高感度で正確な MRSA 検出ができるものとする。

**Key words:** Low-level MRSA, 検出法

## 序 文

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) は, 主要な院内感染起因菌の一つであり, ときに肺炎, 術後感染症, 敗血

症など重篤な感染症を引き起こす。1961 年に英国で最初に臨床分離され<sup>1)</sup>, その後半合成ペニシリンやセフェム系抗菌薬の多用とともに急速に世界中に広がり, 現在では MRSA が検出されない国はほとんどないのが現状である<sup>2)</sup>。MRSA には易感染患者に対し院内感染を引き起こす院内感染型 MRSA と感染リスクがない若年者などに水疱性痂疹や皮膚軟部組織感染症を引き起こす市中感染型 MRSA がある<sup>3)</sup>。院内感染型 MRSA は, oxacillin (MPIPC) をはじめとするほとんどすべての抗菌薬に高度耐性を示すことから, 薬剤感受性試験の結果により速やかに判定することが可能で

著者連絡先: (〒461-8673) 名古屋市東区大幸南 1-1-20  
名古屋大学医学部保健学科・検査技術科学  
専攻 基礎検査学講座 微生物学研究室  
川村久美子  
TEL: 052-719-3116  
FAX: 052-719-1506  
E-mail: kumiko@met.nagoya-u.ac.jp

ある<sup>3)</sup>。一方、近年、米国やヨーロッパをはじめとする各国で増加しつつある市中感染型 MRSA は、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に対してヘテロ耐性を示し、さらにアミノグリコシド系抗菌薬など多くの抗菌薬にも感受性を示すことから、日常の薬剤感受性試験による判定が困難な場合もあり<sup>3)</sup>、臨床現場で問題となりつつある<sup>4, 5)</sup>。

MRSA は、本来 *S. aureus* に存在しない penicillin binding protein 2a (PBP2a) をコードする *mecA* 遺伝子を保有しており<sup>6)</sup>、その判定の gold standard は polymerase chain reaction (PCR) による *mecA* 遺伝子の検出となる。しかし、このような分子生物学的手法を用いた検出法を日常検査として採用している施設は少なく、多くの細菌検査室では薬剤感受性試験のみで判定している。薬剤感受性試験については、米国臨床検査標準委員会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS, 現 Clinical Laboratory Standards Institute; CLSI) が測定法および判定基準を厳しく規定しており、各施設においてはその勧告法に従った検査が行われている。しかし、1990 年初頭より、*mecA* 遺伝子を保有しているものの日常行われる MPIPIC による薬剤感受性試験では MRSA と判定できない臨床分離株が報告されるようになり<sup>7-9)</sup>、Low-level MRSA もしくは borderline MRSA として注目されるようになった。その後、NCCLS も MPIPIC による寒天平板拡散法の MRSA 判定における限界を認め、4%NaCl を含有する MRSA 分離培地、PBP2a 産生、および *mecA* 遺伝子の検出など複数の確認試験の追加を推奨するようになった<sup>10)</sup>。また、近年 MPIPIC に代わってセファマイシン系の薬剤である cefoxitin (CFX) を用いた感受性試験の有用性が報告されるようになり<sup>11)</sup>、2004 年の NCCLS M-100-SI4 では CFX disk を用いた感受性スクリーニング法が追加されるに至った<sup>12)</sup>。このようにさまざまな MRSA 検出法が推奨されているなか、1999 年には Minnesota で very-Low-level MRSA による小児の市中感染敗血症による死亡例も報告され<sup>13)</sup>、MRSA 検出法が再評価されるようになってきた<sup>14, 15)</sup>。近年、我が国においても市中感染が増加しつつあり、正確かつ迅速な MRSA 検出法を見直す必要に迫られている。本研究では、より精度の高い MRSA 判定法を見出すことを目的に、臨床分離株 *S. aureus* 153 株を対象に MPIPIC および CFX を用いた薬剤感受性試験、PBP2a の検出、MRSA スクリーニング培地など、現在 MRSA 判定に用いられる各種検査法の比較検討を行った。

## 材料と方法

### 1. 使用菌株

菌株は精度管理用標準株 *S. aureus* ATCC29213 および 2004 年 1 月から 2007 年 2 月の期間に名古屋大学医学部附属病院および名古屋掖済会病院にて感染症を疑う 153 名の患者材料から分離された *S. aureus* 153 株 (血液 88 株、咽頭粘液 45 株、喀痰 15 株、IVH カテーテル 2 株、開放性膿 3 株) を対象とした。

### 2. 薬剤感受性試験

最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) の測定は Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 勧告法<sup>16)</sup>に準拠し、微量液体希釈法および寒天平板拡散法にて測定を行った。寒天平板拡散法では oxacillin disk および cefoxitin disk (栄研化学) を使用した。

### 3. *mecA* 遺伝子の検出

滅菌生食水 300  $\mu$ l にコロニー数個分を懸濁させ、15,000 rpm で 2 分間遠心後、沈渣を TritonX 100 lysis buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA, 1% TritonX 100) 100  $\mu$ l に懸濁した。サンプルは 100°C で 10 分間加熱後、4°C、15,000 rpm で 1 分間遠心し、得られた上清を鋳型 DNA として使用した。*mecA* 遺伝子検出用 primer は Forward primer 5'-GTGAAGATATACCAAGTGATT-3' および Reverse primer 5'-ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT-3' を用いた。

PCR 反応は鋳型 DNA 2  $\mu$ l と PCR 反応液 (20 mM Tris-HCl (pH8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP mixture, 1.0 U Taq polymerase, primer sets) 23  $\mu$ l を混和し、94°C・5 分加熱後、94°C・60 秒、50°C・60 秒、72°C・120 秒で 30 サイクル、72°C・10 分の条件にて行った。得られた増幅産物 (147 bp) は 0.5  $\mu$ g/ml エチジウムブロマイド加 2% アガロース (ニッポンジーン) を用いて電気泳動を行い、紫外線照射により確認した。

### 4. PBP2a の検出

PBP2a の検出は MRSA-LA 「生研」(デンカ生研) を用いたラテックス凝集反応にて行った。血液寒天平板にて好氣的条件下で一夜培養した菌 2 白金耳分を採取し、抽出試薬 1 50  $\mu$ l に懸濁した。菌懸濁液を 100°C で 3 分間加熱し、2 分間の放冷後、抽出試薬 2 を 1 滴 (約 50  $\mu$ l) 滴下し、攪拌した。15,000rpm で 1 分間遠心し、得られた上清 50  $\mu$ l と感作ラテックス 1 滴 (約 25  $\mu$ l) をスライド凝集反応板上にて反応させ、凝集の有無を確認した。

Table 1. MRSA screening medium

Medium	Antimicrobial agents	NaCl	Carbohydrate
CHROM agar MRSA	CFX 6.0 $\mu\text{g/ml}$	2.5%	Not shown
MRSA-ID	CFX	Not shown	Not shown
MRSAI-CFX	CFX	4%	Mannitol 1%
MDRS-K	CFX 6.0 $\mu\text{g/ml}$	2%	Mannitol 1%
MRSA-screen	MPIPC 6.0 $\mu\text{g/ml}$	4%	Starch 0.15%
MDRS-II	MPIPC 4.0 $\mu\text{g/ml}$ , CZX 12.5 $\mu\text{g/ml}$	3.6%	Mannitol 1%
MRSAI-A	CZX 25 $\mu\text{g/ml}$	4%	Mannitol 1%

Abbreviations: ceftizoxime, CZX; cefoxitin, CFX; oxacillin, MPIPC.

### 5. 各種 MRSA スクリーニング培地の評価

現在国内で市販されている CHROM agar MRSA (関東化学(株)), MRSA I-A, MRSA I-CFX (日研生物医学研究所), MDRS-K, MDRS-II (極東製薬工業(株)), MRSA-screen agar (日本バクテリオンディッキンソン), MRSA-ID (日本ビオメリユール(株)) の計 7 種類の MRSA スクリーニング培地を検討した (Table 1)。

血液寒天平板にて好氣的条件下の一夜培養で得られた 1 colony を各々の MRSA スクリーニング培地に接種し、添付書に従い 35 もしくは 37°C にて培養した。判定は 24 時間, 48 時間の 2 回行い, 48 時間後にコロニーの発育を認めなかったものを陰性とした。さらに回収率を検討するため, McF 0.5 に調整した菌液 (約  $1-5 \times 10^8$  cfu/ml) を PBS (pH 7.4) にて 50,000 倍希釈し, 菌量を  $1-5 \times 10^2$  cfu/ml に調整した。得られたサンプル 50  $\mu\text{l}$  を血液寒天平板および各種スクリーニング培地に接種した後, 35 もしくは 37°C にて培養し, 24 時間, 48 時間後の 2 回コロニー数の計測を行った。回収率は各種スクリーニング培地で得られたコロニー数と血液寒天平板で得られたコロニー数の比率 (%) として算出し, 異なる 2 日間に測定された値の平均値を示した。また, 4  $\mu\text{g/ml}$  CFX と 2% NaCl 含有 Mueller Hinton broth (enrichment broth) による前培養の有効性を検討するため, enrichment broth にて一夜培養した菌を PBS (pH 7.4) にて  $1-5 \times 10^2$  cfu/ml に調整したものについても同様に回収率を求めた。

### 6. Western blotting

Yoshida らの方法を若干改変し行った<sup>2)</sup>。Luria-Bertani (LB) broth で一夜培養した菌液を新鮮な LB broth に植え継ぎ, OD<sub>660</sub> 0.6~0.65 まで培養し 8.5 ml 分の菌体を回収した。得られた菌体は Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) にて 1 回洗浄後, lysis

buffer (50 U/ml lysostaphin, 4  $\mu\text{g/ml}$  DNase, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, PBS (pH 7.4)) 200  $\mu\text{l}$  に懸濁し, 37°C で 30 分間インキュベートし完全に溶菌した。溶菌後, 15,000 rpm, 15 分間, 4°C で遠心し, PBS (pH 7.4) にて 2 回洗浄を行い, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 加 PBS 50  $\mu\text{l}$  に懸濁して膜画分を得た。得られたサンプルのタンパク質濃度は DC Protein Assay Kit I (BioLad) にて測定した。

サンプルに 2×sample buffer を添加し, 10 分間煮沸後, 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて 20 mV, 120 分間 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis を行った。泳動後, セミドライブロッティング装置を用いて 100 V, 50 分間ニトロセルロースメンブレン (Applied Biosystems) へ転写を行った後, 3% スキムミルク添加 washing buffer (50 mM Tris-buffered saline) にて室温, 1 時間ブロッティングを行った。メンブレンを washing buffer で 3 回洗浄後, 一次抗体の抗 PBP2a ウサギ抗体, 抗 PBP2 ウサギ抗体さらに 2 次抗体である抗ウサギ IgG-peroxidase 標識ヤギ抗体 (MBL) にて, 各々 1 時間ずつの反応を行った。発色反応は 4-chloro-1-naphthol および過酸化水素水溶液にて行った。

## 結 果

### 1. *mecA* 遺伝子および PBP2a の検出

臨床分離 *S. aureus* 153 株の *mecA* 遺伝子を PCR 法にて検出した結果, *mecA* 遺伝子保有株 (MRSA) は 99 株, *mecA* 遺伝子非保有株 (MSSA) は 54 株であった。

ラテックス凝集法により PBP2a を確認したところ, MRSA 99 株は全株陽性, MSSA 54 株は全株陰性となり, PCR 法の結果と完全に一致した。

### 2. 各種 MRSA スクリーニング培地による検出

7 種類の MRSA スクリーニング培地を用いたとこ

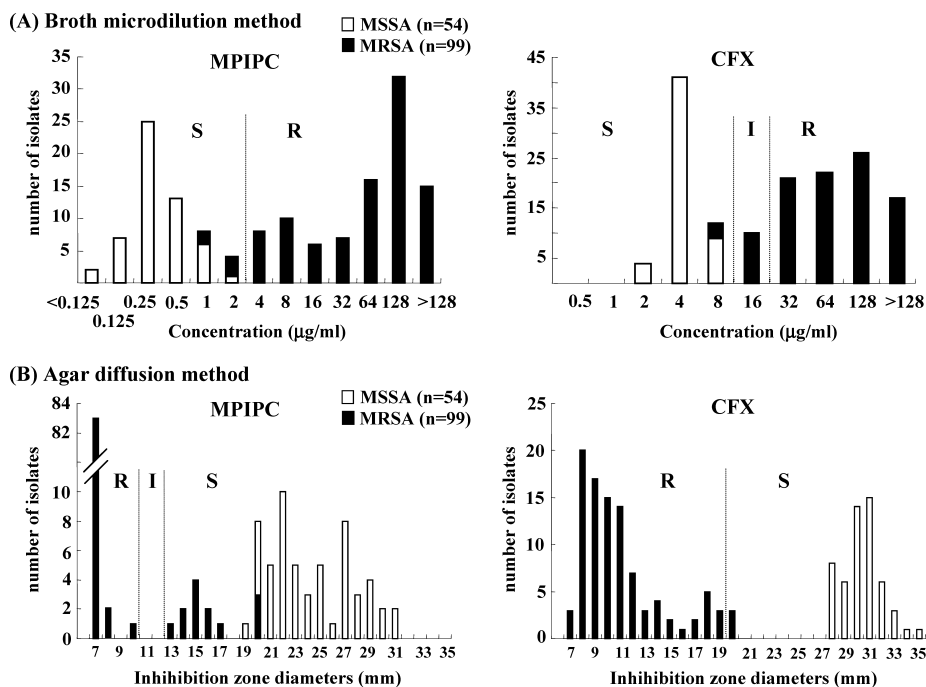


Fig. 1. Distributions of MICs of MPIPc and CFX for 153 *S. aureus* clinical isolates.

MICs of MPIPc and CFX for 153 clinical isolates of *S. aureus* were measured and the susceptibilities were categorized into S, I, and R according to recommendations by CLSI. Panels: A, Agar dilution method; B, Agar diffusion method. Open bars, MSSA isolates; solid bars, MRSA isolates.

Abbreviations: MPIPc, oxacillin; CFX, ceftioxin; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

ろ、すべての培地で MSSA 54 株は発育しない一方、MRSA 99 株はすべて 24 時間後に十分な発育が認められた。

### 3. 薬剤感受性試験による MRSA 判定

微量液体希釈法による MPIPc の MIC range は、MSSA が  $<0.125\sim 2\mu\text{g/ml}$ 、MRSA が  $1\sim >128\mu\text{g/ml}$  であった。MRSA 99 株の中で susceptible に分類される  $2\mu\text{g/ml}$  以下の MIC 値を示したものが 5 株 (5.1%) 存在した (Fig. 1A)。一方、CFX の MIC range は MSSA が  $2\sim 8\mu\text{g/ml}$ 、MRSA は  $8\sim >128\mu\text{g/ml}$  であった。MRSA 99 株の中で 3 株 (3.0%) が susceptible ( $\leq 8\mu\text{g/ml}$ ) に、10 株 (10.1%) が intermediate ( $16\mu\text{g/ml}$ ) と判定された (Fig. 1A)。

寒天平板拡散法においては、MPIPc disk を用い判定した場合、99 株中 86 株 (86.9%) が MRSA と判定されたが、13 株 (13.1%) が  $14\sim 20\text{ mm}$  の阻止円を形成し、MSSA と誤判定された。一方、CFX disk を用いた場合、MSSA 株と MRSA 株の阻止円の直径には明瞭な差が認められ、99 株中 96 株 (97.0%) が

MRSA と判定されたが、3 株 (3.0%) に誤判定が見られた (Fig. 1B)。なお、いずれの検査法および薬剤を用いた場合でも、MSSA を MRSA と誤判定した株は認められなかった。

### 4. *mecA* 遺伝子検出法と各種測定法との比較

*mecA* 遺伝子の有無を基準として、各種 MRSA 検出法の感度を比較した。ラテックス凝集法による PBP 2a の検出および各種 MRSA スクリーニング培地による MRSA の検出感度は 100% であった。薬剤感受性試験においては、MPIPc を用いた微量液体希釈法の感度は 94.9%、CFX では 97.0% であった。寒天平板拡散法では MPIPc disk を用い判定した場合には 86.9%、CFX disk を用いた場合には 97.0% となり、いずれの測定法においても CFX を用いたほうが良好な感度が得られた (Table 2)。

本研究において、*mecA* 遺伝子を保有しているにもかかわらず、MPIPc および CFX を用いた薬剤感受性試験のいずれかで MRSA と判定できなかった株が認められた。これらの株を「Low-level MRSA」と定義

Table 2. Comparison of recommended methods for detection of MRSA.

Each method compared with <i>mecA</i> gene detection	Sensitivity (%) <sup>a)</sup>	Specificity (%) <sup>b)</sup>
Broth microdilution method		
MIPIC	94.9	100
CFX <sup>c)</sup>	97.0	100
Disk diffusion method		
MIPIC	86.9	100
CFX <sup>c)</sup>	97.0	100
PBP2a latex agglutination test	100	100
MRSA Screening Medium <sup>d)</sup>		
CHROMagar MRSA	100	100
MRSA-ID	100	100
MRSA I-CFX	100	100
MDRS-K	100	100
MRSA screen	100	100
MDRS-II	100	100
MRSA I-A	100	100

<sup>a)</sup> Percentage of the 99 *mecA*-positive isolates for which the test results were obtained as positive.

<sup>b)</sup> Percentage of the 54 *mecA*-negative isolates for which the test results were obtained as negative.

<sup>c)</sup> Results of "intermediate" were included as "resistant" category.

<sup>d)</sup> One colony of each isolate was inoculated onto MRSA screening medium, and those plates were incubated for 24 h at 37°C.

Table 3. Characteristics of the 15 low-level MRSA isolates that were misclassified by susceptibility testing methods

Number of isolates	Broth microdilution <sup>a)</sup> (MIC, $\mu\text{g/ml}$ )		Disk diffusion <sup>b)</sup> (zone diameter, mm)	
	MIPIC	CFX	MIPIC	CFX
1	1	<u>32</u>	S (20)	R (15)
2	2	16	S (17)	S (20)
3	<u>8</u>	16	S (14)	R (18)
4	<u>4</u>	16	S (15)	R (18)
5	1	8	S (20)	R (19)
6	<u>4</u>	16	S (14)	R (18)
7	<u>8</u>	<u>32</u>	S (16)	R (14)
8	<u>4</u>	16	S (15)	R (16)
9	2	8	S (20)	S (20)
10	<u>8</u>	16	S (13)	R (18)
11	<u>8</u>	16	R (10)	R (17)
12	<u>4</u>	16	S (16)	R (19)
13	2	8	S (15)	S (20)
14	<u>4</u>	16	S (15)	R (19)
15	<u>4</u>	16	R ( 8)	R (14)

<sup>a)</sup> Underlined numbers indicate the MIC judged as "resistant" according to CLSI recommendation M100-S 15. The CLSI MIC breakpoints were used for the following drugs: MIPIC (susceptible,  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ ; and resistant,  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ ) and CFX (susceptible,  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ ; intermediate,  $16 \mu\text{g/ml}$ ; and resistant,  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ ).

<sup>b)</sup> Zone diameter interpretive standard were used for the following drugs: MIPIC (susceptible,  $\geq 13 \text{ mm}$ ; intermediate,  $11\text{--}12 \text{ mm}$ ; and resistant,  $\leq 10 \text{ mm}$ ) and CFX (susceptible,  $\geq 20 \text{ mm}$ ; and resistant,  $\leq 19 \text{ mm}$ ). Abbreviations: MIPIC, oxacillin; CFX, cefoxitin; S, susceptible; R, resistant.

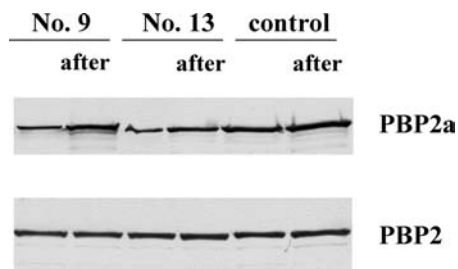


Fig. 2. PBP2a expression of low-level MRSA isolates.

Western blot analysis was determined for the 2 of 15 Low-level MRSA isolates (strains 9 and 13 shown in Table 3) and one high-level MRSA isolate (MIC of MIPIC,  $>128 \mu\text{g/ml}$  and MIC of CFX,  $>128 \mu\text{g/ml}$ ) as control. Soluble proteins prepared from cells grown in antibiotic-free medium to the mid-logarithmic phase of growth were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and probed with antibodies to PBP2a or antibodies to PBP2. PBP2 expression served as internal positive control. The induction of cefoxitin was performed by pre-culture using broth including sub-MIC cefoxitin for 3 isolates tested.

すると、MRSA99株の中で計15株(15.2%)あり、このうち、2株(No. 9, 13)はすべての薬剤感受性試験においてMSSAと誤判定されていた(Table 3)。

##### 5. Low-level MRSA における PBP2a の産生性

Low-level MRSA 15株のPBP2a発現量をwestern blottingにより調べたところ、全例発現が確認できた。しかし、すべての薬剤感受性試験においてMSSAと誤判定された2株(No. 9, 13)については、高度耐性MRSA (*mecA* 遺伝子陽性, MIPIC  $>128 \mu\text{g/ml}$ , CFX  $>128 \mu\text{g/ml}$ ) に比し発現量が低い傾向が認められた(Fig. 2)。これらの菌株を1/4 MICのCFX存在下で培養し発現誘導を行うと、高度耐性MRSAと同程度までPBP2aの発現量が増加し、またMIPICのMICも誘導前の2倍まで上昇した。

##### 6. Low-level MRSA の MRSA スクリーニング培地による検出

MRSA スクリーニング培地は材料を直接接種しMRSAを検出できる特性を有している。しかし、材料を直接塗布の場合にはコロニーを接種する場合と異なり、菌量が一定にならないため、検出率が変動する可

能性がある。特にLow-level MRSAはPBP2aの発現量が低い傾向が認められた株もあり、その傾向が大きくなる可能性も考えられる。そこで、発現量の低下傾向が認められたLow-level MRSA 2株(No. 9, 13)と高度耐性 (*mecA* 遺伝子陽性, MIPIC  $>128 \mu\text{g/ml}$ , CFX  $>128 \mu\text{g/ml}$ ) を示したMRSA 1株を用いて、接種菌量100~500 cfu/mlにおける各MRSAスクリーニング培地の回収率を検討したところ、CFX含有培地では79~100%と良好な回収率が得られた。MIPICおよびCZX含有培地においては、Low-level MRSAを検出しにくい傾向が認められたが、4  $\mu\text{g/ml}$  CFXを含むenrichment brothにて前培養を行うことにより、すべての株で回収率の改善が認められた(Table 4)。

## 考 察

黄色ブドウ球菌感染症におけるメチシリン耐性の正確かつ迅速な検出は、適切な抗菌薬治療を行うために、また院内におけるMRSAの広がりを防止するためにも重要である。本研究において、PCRによる*mecA* 遺伝子検出法をgold standardとすると、ラテックス凝集反応によるPBP2a検出の感度、特異度は共に100%であった。本法は操作法も簡便で、20分以内に結果を得ることができる迅速検出法であり<sup>17)</sup>、MSSA株とMRSA株を区別する最適な方法であると思われる。

薬剤感受性試験においては薬剤にCFXを用いたほうが、誤判定が少ない傾向にあった。特にCFX diskを用いた寒天平板拡散法は最もMSSAとMRSAの境界が明瞭であり、感度も97.0%と良好であった。この結果はこれまでの報告<sup>11, 14)</sup>とも一致しており、薬剤感受性試験の中では、CFX diskによる寒天平板拡散法が最も簡便かつ正確なMRSA検出法であることが確認できた。一方、微量液体希釈法を行う場合にはCFXにおけるintermediateのカテゴリーが問題となる可能性が明らかとなった。今回の検討では、MRSA 99株のうち10株(10%)がこのカテゴリーに分類された。これらの株は、CLSI (旧NCCLS) 勧告法<sup>16)</sup>のコメント「CFXがintermediateと判定された場合には、*mecA* 遺伝子もしくはPBP2aの検出、CFX diskなど追加を行うこと」に従えばMRSAと判定できるが、日常検査における検査時間やコストの削減を考慮すると、確認試験の追加はできる限り少ないことが望ましい。今後、CFXを日常検査に導入する際には、ブレイクポイントの再検討が必要になる可能性も示唆された。

Table 4. Recovery of low-level MRSA isolates on each MRSA screening medium

Medium <sup>a)</sup>	Pre-culture <sup>b)</sup>	Incubation period (h)	% numbers of colonies recovered		
			No. 9 <sup>c)</sup>	No. 13 <sup>c)</sup>	Control <sup>d)</sup>
C-MRSA (CFX)	(-)	24	83.8	98.4	98.4
	(+)	48	100	100	100
		24	100	100	100
MRSA-ID (CFX)	(-)	24	100	100	100
	(+)	48	100	100	100
		24	100	100	100
MRSA I-CFX (CFX)	(-)	24	100	100	100
	(+)	48	100	100	100
		24	100	100	100
MDRS-K (CFX)	(-)	24	79.6	82.9	100
	(+)	48	100	100	100
		24	100	100	100
MRSA-screen (MPIPC)	(-)	24	0	0	65.7
	(+)	48	100	100	100
		24	100	100	100
MDRS-II (MPIPC, CZX)	(-)	24	3.4	3.4	84.0
	(+)	48	30.3	10.2	100
		24	100	100	100
MRSA I-A (CZX)	(-)	24	35.8	20.9	86.8
	(+)	48	100	100	100
		24	100	100	100

a) The MRSA screening medium contains sodium chloride and antimicrobial agents as selective agents. Parentheses indicate the antimicrobial agents. MPIPC, oxacillin; CFX, ceftioxin; CZX, ceftizoxime.

b) Bacteria were pr-cultured using enrichment broth containing 2% NaCl, 4 µg/ml CFX, and Mueller Hinton broth at 18 h before plating on each screening agar medium.

c) Susceptibility profiles of three low-level MRSA isolates for MPIPC and CFX were shown in Table 2.

d) One high-level resistant MRSA isolate (MIC of MPIPC, >128 µg/ml; MIC of CFX, >128 µg/ml) was using as control isolate.

本研究において、MPIPC および CFX を用いた薬剤感受性試験では MRSA と判定できなかった株 (Low-level MRSA) が 15/153 株 (9.8%) 存在した。国内におけるこのような MRSA 株の存在については、Hososaka ら<sup>9)</sup>が全国サーベイランスの結果 oxacillin-susceptible MRSA(OS-MRSA) が 6/480 株 (1.25%) 存在したと報告している。Hososaka らは寒天平板希釈法による MPIPC の MIC 2 µg/ml 以下を OS-MRSA として抽出しており、筆者らも微量液体希釈法による MPIPC の結果からは 5/153 株 (3.2%) が Low-level MRSA となり、ほぼ同様の傾向であった。これら Low-level MRSA 15 株のうち、薬剤感受性試験すべてで MSSA と誤判定された 2 株においては PBP2a の発現量低下傾向が認められ、このことが誤判定の一因である可能性が示唆された<sup>14)</sup>。このように

現在数%以下ではあるが、国内に Low-level MRSA が存在することが明らかとなり、検査の際には十分な注意が必要であると思われた。

近年、臨床現場では MRSA による院内感染の outbreak を速やかに発見するため、MRSA の検出を目的とした検査依頼も増加しており、MRSA スクリーニング培地が日常検査に導入されるようになった。現在、MPIPC, CZX, CFX などの抗菌薬を含む多くの種類が市販されているが、なかでも CFX 含有培地の有用性については多くの研究者が報告している<sup>15, 18)</sup>。MRSA スクリーニング培地使用のメリットの一つとして、検査材料から直接 MRSA を検出できることが挙げられる。CFX 含有 MRSA スクリーニング培地は、PBP2a の発現量低下が認められた Low-level MRSA 株においても 80~100% と高い回収率を示

し、少量のMRSAを検出する際の有用性が示唆された。また、海外ではMRSAスクリーニング培地の使用に際し、選択性の向上、増菌およびPBP2a誘導の目的で、NaClや抗菌薬を添加した enrichment broth による前培養を行うことが推奨されている<sup>19)</sup>。今回の検討でも、enrichment broth による前培養後は回収率の上昇が認められ、カテ先など菌量が少量であることが予想される材料における前培養の有用性が示唆された。

本研究の結果より、現在行われているMRSA検出法のなかでは、セファマイシン系抗菌薬であるCFXを用いた寒天平板拡散法、ラテックス凝集法によるPBP2aの検出、およびCFX含有スクリーニング培地が最も正確にMRSAを判定できる方法であった。これらの検出法はヘテロ耐性を示すLow-level MRSA株も正確に検出しており、特にCFX含有MRSAスクリーニング培地は、菌量が少ない材料からのMRSA検出も期待できる。以上のことから、CFX含有MRSAスクリーニング培地を分離培地として使用し、さらにCFX diskによる薬剤感受性検査もしくはラテックス凝集法によるPBP2a検出法を組み合わせることで、Low-level MRSA株の見逃しを食い止め、より迅速で、正確にMRSAを検出することができる可能性が示唆された。

**謝 辞** 本研究の遂行にあたりまして、菌株の分与を賜りました名古屋掖済会病院検査部、ならびに抗PBP2aウサギ抗体を分与いただきました名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学教室・山田景子先生に御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Jevons, M. P. 1961. 'Celbenin'-resistant staphylococci. Br. Med. J. 1: 124-125.
- 2) Yoshida, R., K. Kuwahara-Arai, T. Baba, et al. 2003. Physiological and molecular analysis of a *mecA*-negative *Staphylococcus aureus* clinical strain that expresses heterogeneous methicillin resistance. J. Antimicrob. Chemother. 51: 247-255.
- 3) Schito, G. C. 2006. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. Suppl. 1: 3-8.
- 4) Ribeiro, A., C. Dias, M. C. Silva-Carvalho et al. 2005. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J. Clin. Microbiol. 43: 1985-1988.
- 5) Furuya, E. Y., F. D. Lowy. 2006. Antimicrobial resistant bacteria in the community setting. Nature Rev. 4: 36-45.
- 6) Ito, T., Y. Katayama, K. Asada, et al. 2001. Structural comparison of three types of *Staphylococcus cassette* chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2001. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1323-1336.
- 7) Liu, H., G. Buescher, N. Lewis, et al. 1990. Detection of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* and differentiation from methicillin-resistant strains. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9: 717-724.
- 8) Hiramatsu, K., H. Kihara, T. Yokota, et al. 1992. Analysis of bostrains methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction. Microbiol. Immunol. 36: 445-453.
- 9) Hososaka, Y., H. Hanaki, H. Endo, et al. 2007. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: A new type of MRSA. J. Infect. Chemother. 13: 79-86.
- 10) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1990. Approved Standard, M2-A4, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 4<sup>th</sup> ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania.
- 11) Felten, A., B. Grandry, P. H. Lagrange, et al. 2002. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. J. Clin. Microbiol. 40: 2766-2771.
- 12) National committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 14<sup>th</sup> informational supplement. NCCLS M100-S14. NCCLS, Wayne, PA, USA.
- 13) Centers for Disease Control and Prevention. 1999. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Minnesota and North Dakota, 1997-1999. JAMA 282: 1123-1125.
- 14) Velasco, D., M. M. Tomas, M. Cartelle, et al. 2005. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 55: 379-382.
- 15) Flayhart, D., J. F. Hindler, D. A. Bruckner, et al. 2005. Multicenter evaluation of BBL CHROMagar MRSA medium for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from surveillance cultures of the Anterior Nares. J. Clin. Microbiol. 43: 5536-5540.



- 16) Clinical Laboratory Standards Institute. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15<sup>th</sup> informational supplement. CLSI/NCCLS M100-S15. CLSI, Wayne, PA, USA.
- 17) Nakatomi Y., J. Sugiyama. 1998. A rapid latex agglutination assay for the detection of penicillin-binding protein 2'. Microbiol. Immunol. 42: 739-743.
- 18) Flournoy, D. J., S. Wongpradit, S. L. Silberg. 1990. Screening media for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from non-sterile body sites. Med. Microbiol. Immunol. 179: 25-30.
- 19) Brown, D. F. J., D. I. Edwards, P. M. Hawkey, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J. Antimicrob. Chemother. 56: 1000-1018.

### Evaluation of Three Techniques for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Rie Mizuno,<sup>1)</sup> Kumiko Kawamura,<sup>1)</sup> Toshi Nada,<sup>3)</sup> Hisashi Baba,<sup>3), 4)</sup> Hideo Ito<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Medical Technology, Nagoya University School of Health Science

<sup>3)</sup> Department of Clinical Laboratory Medicine, Nagoya University Hospital

<sup>4)</sup> Department of Infectious Diseases, Nagoya University Hospital

Some of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is often misdiagnosed as methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) by the susceptibility testing. Although, detection of the *mecA* gene by PCR was considered to be the "gold standard," the susceptibility tests have been performed in the clinical laboratory. The aim of our study was to evaluate the performances of three methods for detection of MRSA and find more accurate and sensitive methods for detection of MRSA isolates. The 153 clinical isolates of *S. aureus* studied were divided into 99 MRSA (*mecA*-positive) and 54 MSSA (*mecA*-negative) isolates by PCR. The sensitivity of both the PBP2a production by latex agglutination test and the MRSA screening medium were 100%. The sensitivity of both broth microdilution method and the disk diffusion method with CFX were 97.0%, and those were superior to the disk diffusion method with MIPIC for recovery of MRSA. There were 15 isolates (low-level MRSA) that the results obtained by the susceptibility testing with MIPIC or CFX were different from those of PCR. The PBP2a expression of some low-level MRSA isolates by western blot assay were reduced, but the PBP2a production by latex agglutination test and the MRSA screening medium detected all 15 low-level MRSA isolates. Therefore, the results of our experiment confirmed usefulness of the susceptibility testing with CFX, the PBP2a production by latex agglutination test, and some sorts of the MRSA screening medium. We suggested that combination with these methods is the best performing tests for routine detection of all MRSA including low-level MRSA isolates.