

[原 著]

当院における2001年度分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学的解析と薬剤感受性

千田俊雄¹⁾・岡村 登¹⁾・米山志津¹⁾・大澤佳代²⁾・馬場千恵美¹⁾
 沢辺悦子^{1,3)}・古畑紀子³⁾・遠井初子³⁾・武部 功³⁾・角田千能³⁾
 西堀真弘³⁾・奈良信雄³⁾・三宅修司⁴⁾・吉澤靖之⁴⁾

¹⁾ 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科 生体防御検査学分野

²⁾ 神戸大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

³⁾ 東京医科歯科大学医学部附属病院 検査部

⁴⁾ 東京医科歯科大学医学部附属病院 呼吸器内科

(平成14年10月1日受付, 平成15年3月3日受理)

2001年1月から6月の間に東京医科歯科大学医学部附属病院の臨床検査材料から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 185株を用いて, パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) によるゲノムDNA型別, 薬剤感受性試験およびPCR法による毒素性ショック症候群毒素 (TSST-1) 遺伝子の保有の有無を調べ, 病院内での交差感染・定着がどのような状況であるかを検討した。PFGE解析の結果, PFGEパターンは79種類あり, さらに類似度80%以上でa~p型の16のDNA型に分類された。DNA型ではi型が最も多く77株 (42%) あった。薬剤感受性試験の結果, vancomycin およびrifampin に耐性の菌株はなかったが, arbekacin耐性株が3株検出された。病原遺伝子の一つであるTSST-1遺伝子の保有率は分離株の89%であった。PFGEパターンではNo.6 (i型) が26株 (14.1%) と最も高頻度に検出され, しかも特定の病棟に集中していたことから, その患者の入院期間・排菌期間などの調査をした結果, 医療スタッフあるいは医療器具を介した交差感染または定着の可能性が示唆された。本研究で行った患者の入院期間などの情報を含めたPFGEによる分子疫学的調査は, 医療スタッフに交差感染の事実を認識させ, 臨床的MRSAアウトブレイクを回避させる一つの効果的な手段であると考えられた。

Key Words : MRSA, PFGE, MIC, 院内感染

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は, 本邦では1980年代に急速に全国の病院に蔓延化し, 現在に至っても院内感染の重要な起炎菌として関心が向けられている^{1~3)}。本菌は化膿性皮膚疾患, 中耳炎, 副鼻腔炎, 肺炎, 尿路感染, 腸炎, 骨髄炎, 敗血症などの様々な疾患を引き起こす。また外毒素であるtoxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) を産生する株は毒素性ショック症候群の原因となる^{4,5)}。本菌は

術後患者, 免疫不全者, 高齢者, 未熟児などから高頻度に検出され, その多くが高度多剤耐性で有効な薬剤が少なく難治性の重症感染症を引き起こすことがある。そのため病院での本菌に対する院内感染防止対策が重要になっている。

我々は, これまで東京医科歯科大学医学部附属病院の院内感染対策委員会から特定病棟または特定期間におけるMRSAによるアウトブレイクの可能性の調査依頼を受け, パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による分子疫学調査を行ってきた。

今回, 我々はこのような調査依頼がなかった2001年1月から6月の期間で臨床検査材料から分離されたMRSAの全株についてPFGEによるゲノムDNA型別, 寒天平板希釈法による薬剤感受性試験および本菌

著者連絡先: (〒113-8519) 東京都文京区湯島1-5-45
 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科
 千田俊雄
 TEL 03-5803-5375
 E-mail: T.Chida.mtec@tmd.ac.jp

の病原遺伝子の一つである毒素性ショック症候群毒素 (TSST-1) 遺伝子の有無を調べ、当院でのMRSAによる交差感染の実態や状況について検討した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

2001年1月から6月までの期間に東京医科歯科大学医学部附属病院の各種臨床検査材料から分離された185株のMRSAを用いた。分離株の内訳は外来由来が40株(患者40名)、入院由来が145株(患者135名)であり、臨床検査材料別では喀痰(46株)、咽頭(15株)、鼻汁(7株)、尿(19株)、便(30株)、血液(6株)、皮膚膿(21株)、開放・閉鎖膿(11株)、腹部ドレーン(5株)、耳漏(6株)、その他(19株)であった。一人の患者からは1株を原則とした。但し、同一患者の異なる検査材料から分離された場合は、PFGEパターンが異なれば別の株とした。MRSAの判定は2%NaCl加Mueller-Hinton寒天平板による薬剤感受性試験でoxacillinの最小発育阻止濃度(MIC)が4 µg/ml以上とした。

2. PFGE法

石本らの方法に従って行った⁶⁾。2mlのTrypticase soy broth (BD)で、35℃、18時間培養した菌液を集菌した後、1.6%低融点アガロース(InCert Agarose) (BMA)と混和し、プラグモールド内でゲル化した。これをlysostaphin (100 µg/ml) (和光純薬)とproteinase K (1mg/ml) (和光純薬)で処理し、さらにpheylmethylsulfonyl fluoride (和光純薬)で洗浄後、制限酵素Sma I (TaKaRa)でDNAを消化した。このゲルブロックを1%pulsed field certified agarose (Bio-Rad)のwellに埋め込み、0.5 x Tris-borate-EDTA buffer中、14℃の定温で電気泳動を行った。泳動はCHEF-DR II装置(Bio-Rad)でパルスタイム5~40秒、電圧6 Volts/cm、24時間の条件で行った。泳動終了後、エチジウムブロマイド染色し、紫外線照射して写真撮影した。DNAサイズマーカーはCHEF DNAサイズスタンダードLambda ladder (Bio-Rad)を用いた。解析はPFGEのバンドパターンからMolecular Analyst[®] Software Fingerprinting Version 1.6 (Bio-Rad)を用い、菌株間の類似度はDiceの計算方法(2×同一のバンド数×100/両者の株のバンド総数)、クラスタリングはUPGMA法を選択してdendrogramを作成後、類似度80%(PFGEパターンの解釈評価基準のclosely relatedに相当)^{7,8)}以上のクラスター内のPFGEパターンを同一のDNA型としてグループ化する型別を行った。

3. 薬剤感受性試験

ampicillin (ABPC: 明治製薬)、oxacillin (MPIPC: 第一製薬)、cephalothin (CET: 塩野義製薬)、vancomycin (VCM: 塩野義製薬)、gentamicin (GM: シェリング・プラウ)、arbakacin (ABK: 明治製薬)、tetracycline (TC: 日本ワイスレダリー)、erythromycin (EM: 塩野義製薬)、chloramphenicol (CP: 三共)、ofloxacin (OFLX: 第一製薬)、rifampin (RFP: 第一製薬)の計11薬剤を使用した。MRSA菌株の薬剤感受性は米国臨床検査標準委員会(NCCLS)法に準じ⁹⁾、寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。被験菌株を35℃で一晩培養後、10⁷ CFU/mlに調整した菌液の5 µlを抗菌薬の最終濃度(512~0.125 µg/ml)を含んだMueller-Hinton寒天平板培地(Difco)に、ミクロプランターで接種し、35℃、24時間培養後、MICを測定した。精度管理用標準菌株として*Escherichia coli* ATCC 25922および*Staphylococcus aureus* ATCC 25923を用いた。各薬剤の耐性のbreakpointはNCCLSの基準を用いた⁹⁾。

4. TSST-1遺伝子の検出

PCR法によりTSST-1遺伝子の検出を行った^{10,11)}。5 mlのBrain heart infusion broth (Difco)で35℃、18時間培養後、菌液を集菌した。さらにlysostaphin (Sigma)処理後、フェノール法でDNAを抽出・精製した。精製DNA 1 µlをPCR反応液(組成: d NTP 200 µM, 10× buffer 5 µl, MgCl₂ 2mM, Primer-1 [5'-ACC CCT GTT CCC TTA TCA TC-3']¹⁰⁾ 2pmol, Primer-2 [5'-TTT TCA GTA TTT GTA ACG CC-3']¹⁰⁾ 2pmol, Taq DNA polymerase (Promega) 2.5U, 超純水で計50 µlに調整)に混和しサーマルサイクラー(PC-800) (アステック)で増幅した。PCR条件はinitial denaturation 94℃ 5分, 35cycles (denaturation 94℃ 2分, annealing 57℃ 2分, extension 72℃ 1分), final extension 72℃ 7分で行った。PCR産物はアガロースゲル(1%)電気泳動を行いエチジウムブロマイド染色後、紫外線照射して写真撮影した。陽性コントロールとして*S. aureus* FRI 1169株および587株を用いた。またDNAサイズマーカーは100bp DNA Ladder (Promega)を用いた。

II. 結果

1. MRSAの分離頻度および感染症の有無

2001年度前半に本学医学部附属病院の臨床検査材料より分離された*S. aureus*の総株数のうち、MRSAの割合は入院では56.9%、外来では20.4%であり(表1)、これは過去4年間ほぼ同程度で推移した。また今回の

表1 2001年1月から6月までの臨床検査材料別のMRSA分離頻度

検体	入院	外来
呼吸器 ^{a)}	161/315 (51.1) ^{c)}	25/172 (14.5)
尿	28/44 (63.6)	15/27 (55.6)
便	55/66 (84.6)	1/1 (100)
血液	12/15 (80)	1/1 (100)
その他 ^{b)}	97/149 (65.1)	27/138 (19.6)
合計	335/589 (56.9)	69/339 (20.4)

^{a)} 喀痰、咽頭、鼻汁等

^{b)} 膿、滲出液、耳漏、腹部ドレーン、腹水、膈分泌物、眼脂等

^{c)} MRSA株数/S. aureus株数 (%)

研究に用いた185株のMRSAは175名の患者から分離された。175名の患者のうち感染症状を呈していたのは42名であったが、起炎菌がMRSAであるかどうか決定できない症例も多く含まれていた。残りの133名の患者はMRSAの定着あるいは汚染と判定された。

2. PFGEパターンおよびDNA型別

185株のPFGEパターンはNo.1～79の79種類あり、これをさらに類似度80%以上でグループ化しa～p型の16のDNA型に分類された(図1)。PFGEパターンで多いのはi型に属したNo.6が26株(14.1%)で、次にg型に属したNo.8が22株(11.9%)であった。ま

た79種類のPFGEパターンのうち、No.41～79の39種類のPFGEパターン(44株)は前年度までに検出されなかった新しいパターンであった。これら新しいパターンが属するDNA型はh, jおよびo型を除いたすべての型にあり、特にa型の大部分とb～f型, k, l, m, nおよびp型のすべてが新しいPFGEパターンであった(図1)。最も多いDNA型はi型の77株(41.6%)、次にg型の51株(27.6%)、h型の20株(10.8%)の順であった(表2)。

病棟別のDNA型別およびPFGEパターンの分布をみると、i型およびg型はほとんどの病棟で検出された。特に病棟Eではi型が70%(14株)であり、このうちの11株は全く同じPFGEパターン(No.6)を示した。病棟Lではg型が100%(7株)を占め、6株は全く同じPFGEパターン(No.8)を示した。病棟Fではi型が80%(4株)を占めたが(表2)、PFGEパターンは異なっていた。一方、外来患者由来株では全く同一のPFGEパターンはほとんど認められなかった。それらのPFGEパターンの約半数は外来由来株だけに検出されたが、残りの半分のPFGEパターンは外来だけでなく病棟由来株でも検出された(図1)。DNA型ではi型およびg型の頻度がそれぞれ

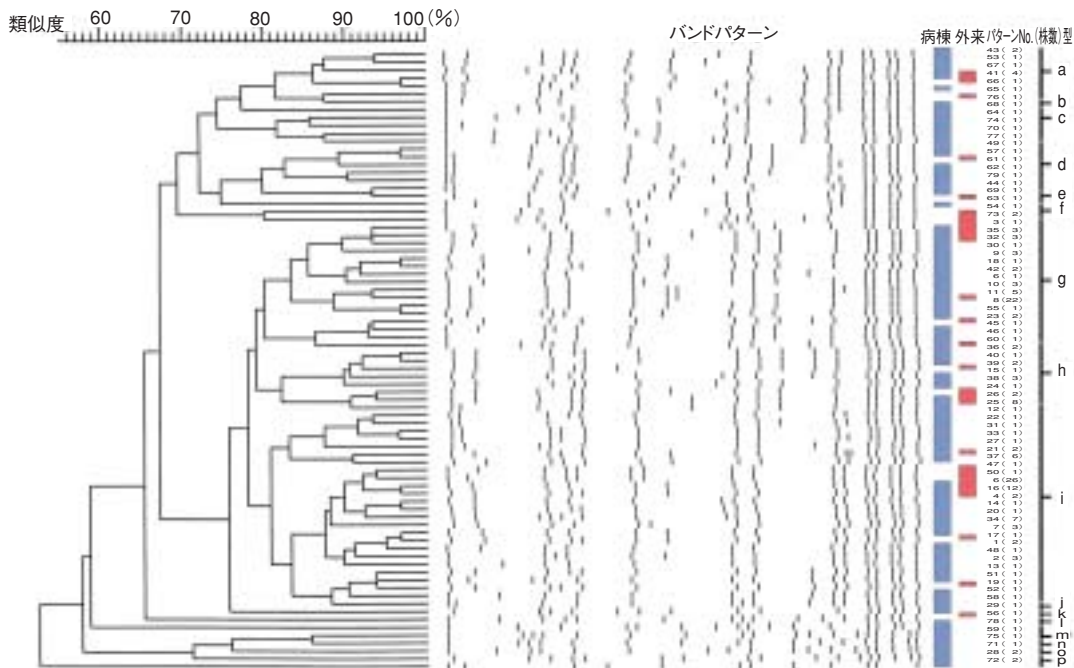


図1 MRSA (185株) のPFGEパターンおよびそのdendrogram
No.はPFGEパターンNo.を示し、検出された菌株数は()内に示した。類似度80%以上で型別した。

表2 外来・入院病棟別のDNA型別分布

DNA 型別	入院病棟																外来	計	%	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	ICU				
a		1 ^{a)}	2	1							1			3	1			2	11	5.9
b	1																		1	0.5
c		1				1					1				1				4	2.2
d			1					1			4							1	7	3.8
e																		1	1	0.5
f									1									2	3	1.6
g	2	2	5	1	4		2	1	2		3	7	3	6			3	10	51	28
h					2		1	2		1	5						3	6	20	11
i	8	4	4	1	14	4	1	3	2	1	9		5	4	1	1	15	77	42	
j									1										1	0.5
k																		1	1	0.5
l																		1	1	0.5
m											2								2	1.1
n													1						1	0.5
o											1		1						2	1.1
p																		1	2	1.1
計	12	8	12	3	20	5	4	7	4	4	26	7	13	12	1	7	40	185	100	

^{a)} 数字はMRSA菌株数

37.5%, 25%と比較的高かった。

3. 薬剤感受性

11薬剤のMRSA (185株) に対するMIC₅₀, MIC₉₀, MICの範囲, 耐性率を表3に示す。また各薬剤の年次別耐性率を表4に示す。185株のすべては2剤から8剤に耐性で, 病棟, 外来共にほぼ同じ傾向を示した。6薬剤に耐性を示したのは94株 (50.8%), 7薬剤に耐性を示したのは48株 (25.9%) であり, 両者を合わせると142株 (76.8%) であった。また8薬剤耐性も10株 (5.4%) に認められた。CET, EM, OFLXおよびTCは約90%が耐性であった。CPに耐性を示したのは10株 (5.4%) があった。ABKには3株 (1.6%) で軽度耐性 (MIC; 16 μg/ml) を示した。この3株のABK耐性株は8薬剤に耐性で, 同一の薬剤耐性パターンを示したが, DNA型は3株とも異なり (l,m,n型), TSST-1の有無および病棟も異なっていた。一方, VCMとRFPにはすべて感性を示した。

4. TSST-1 遺伝子の検出

MRSA185株中164株 (88.6%) がTSST-1遺伝子を保有していた。

5. 各病棟, 特に, 病棟Eにおける同一PFGEパターンの分離推移

病棟EではPFGEパターンNo.6 (i型) のMRSAが9名の患者から分離された。9名の患者の入院期間, MRSAの排菌期間 (MRSAの検査依頼がありMRSA陽性となった期間) について図3に示す。患者1は喀痰および血液, 患者2は喀痰, 膿および便, 患者3お

よび8は便, 患者4は喀痰, 便および皮膚膿, 患者5および9は喀痰, 患者6および7は腹部ドレーンからMRSAが検出された。PFGE解析した株のほとんどは排菌期間の初期分離株であった。図2に示すレーン2, 5, 6, 15および16は3月から4月にかけて病棟Eから検出されたPFGEパターンNo.6の株である。患者は9症例とも高齢者 (平均73歳) で入院期間は1~5ヶ月 (平均3ヶ月) の長期入院であった。患者1, 2および5は臨床的にMRSA感染症 (肺炎) と診断されたが, 全例治療によって軽快治癒した。残りの6名の患者はMRSAが分離されたが, 臨床的に治療経過からMRSAは起炎菌ではないと判断された。患者9名から分離された11株中10株は6薬剤に耐性で, しかも同一の薬剤耐性パターンを示しTSST-1遺伝子もすべて保有していた。今回, 症例の検討を行わなかったが, この他にも幾つかの病棟でa型, h型, i型あるいはg型に属した2~6株が全く同一のPFGEパターンおよび薬剤耐性パターンを示し, 加えてTSST-1遺伝子の有無も同じであった。

III. 考察

MRSAの感染様式には患者自身の保菌状態からの内因感染, 患者間あるいは医療従事者を介した感染, 医療器具などの院内環境あるいは外部から持ち込まれることによる感染などが考えられる。今回の研究で当院外来における*S. aureus*中のMRSAの分離頻度およびそのDNA型別のi型とg型の検出頻度が比較的高

表3 MRSA185株の薬剤感受性

薬剤	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			耐性率 (%)
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
MPIPC	4~512	256	512	100
ABPC	8~512	32	256	100
CET	0.25~128	64	128	91.3
VCM	0.5~2	1	2	0
GM	≤ 0.125 ~512	0.5	128	36.1
ABK	≤ 0.125 ~16	0.5	2	1.6
TC	0.5~512	128	256	88
EM	0.25~512<	512<	512<	97.3
CP	4~128	8	16	5.5
OFLX	0.5~512<	16	128	94
RFP	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	0

かった。この理由としては、当院に入院歴のある患者の外来受診ケースあるいは他病院から当院へ受診に来るケースが多いためではないかと考えられた。また全く同一のPFGEパターンを示した病棟および外来由来株は、この期間に限ってみるとほとんどは外来で検出される以前に病棟で検出されていたことから、当院に入院したことのある患者が外来を受診したケースではないかと推測された。一方、病棟をみると、特に病棟Eでは9名の患者から検出された株がPFGEパターン、薬剤耐性パターンおよびTSST-1遺伝子の有無が一致し、さらに9名の患者の入院期間およびMRSAの排菌期間も重なりあったことから、同一由来株と考えられるMRSAによる同一病棟内での医療スタッフあるいは医療器具を介した交差感染・定着の可能性が示唆された。この他にも幾つかの病棟で、異なる患者から比較的短い期間に分離された数株が全く同一のPFGEパターン、薬剤耐性パターンおよびTSST-1遺伝子を示している場合がみられ、数種類の異なる株の散発的な交差感染あるいは定着による院内感染が起きていた可能性が示唆された。また多種類のDNA型が検出されていた病棟Kの場合は、個々の患者が異なるDNA型のMRSAを保菌していた可能性が考えられたが、病棟に出入りする人々により持ち込まれた可能性も否定できない。薬剤感受性では、過去4年間、MRSAの臨床分離株のすべてがABKに感性であったが(表4)、本研究で用いた分離株でABKに耐性を示す株が少数ではあるが検出されたことから、今後当院で増加することも予測されるため注視していく必要がある。またVCMに低感受性MRSAが国内および諸外国でも報告され¹²⁾、VCM耐性の株も米国ではじめて分離されたことから¹³⁾、当院においてもABKと共に耐性菌の出現に注意していかなければならない。その他の薬剤に関しては5年間の耐性の推移では大きな

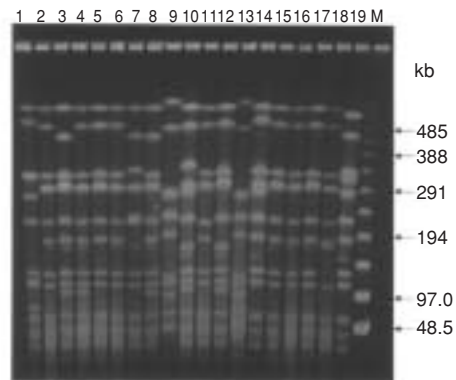


図2 制限酵素Sma I 消化によるMRSAのPFGE泳動パターンの1事例

レーン1.PFGEパターンNo.58 (i型);レーン2, 5, 6, 11, 14, 15, 16および17, PFGEパターンNo.6 (i型);レーン3および8, PFGEパターンNo.9 (g型);レーン4, PFGEパターンNo.8 (g型);レーン7, PFGEパターンNo.63 (g型);レーン10, PFGEパターンNo.26 (h型);レーン12, PFGEパターンNo.35 (g型);レーン18, PFGEパターンNo.10 (g型);レーン19, PFGEパターンNo.21 (i型);レーンM, lambda ladder;レーン9および13,型別不能のため解析から除外した。括弧内はDNA型を示す。

変動は認められなかったが(表4)、耐性菌の出現を防ぐためにもより適切な薬剤を選択していくことが望まれる。一方、MRSAのTSST-1陽性率が1980年代では5%以下であったのが、1990年代には80%以上と大きく変化したとの報告があり¹²⁾、当院でも同様にMRSAのTSST-1陽性率が88.6%と非常に高かった。新生児・未熟児にTSST-1産生MRSAが感染すると重症化しやすい¹⁴⁾など、MRSAの病原性が高まっていると考えられた。

今回、臨床的にMRSAによるアウトブレイクが認められなかった半年間において病院内における

表4 MRSA分離株の薬剤耐性率の年次推移

薬剤	年度				
	1997	1998	1999	2000	2001
MPIPC	100 ^{a)}	100	100	100	100
ABPC	100	100	100	100	100
CET	100	88.9	77.1	94.6	91.3
VCM	0	0	0	0	0
GM	33.9	18.3	24.3	45.5	36.1
ABK	0	0	0	0	1.6
TC	89	77	63	88.3	88
EM	100	94.4	97.1	98.5	97.3
CP	2.8	4.8	0	12.7	5.5
OFLX	99.1	89.7	77.1	95.6	94
RFP	0	0	1.4	1	0

a) 数字は百分率 (%)

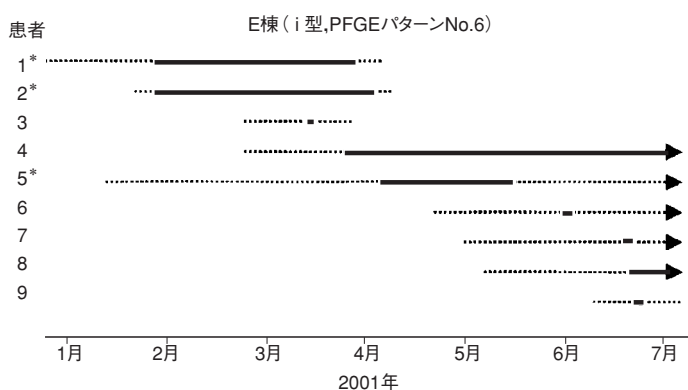


図3 病棟Eにおける9人の患者のMRSA排菌状況

点線は入院期間、実線はMRSA排菌期間を示す。患者3, 6, 7, および9の細菌検査はそれぞれ、便、腹部ドレーン、腹部ドレーン、および喀痰で1回のみであった。

*臨床的MRSAの感染症（肺炎）と診断された。

MRSAの交差感染・定着がどのような状況にあるかを把握するために、臨床検査材料から分離された185株のMRSAについて、PFGEによる分子疫学的解析と共に同一のPFGEパターンが最も多く検出された病棟Eにおける患者の入院期間、排菌期間、感染症の有無などの調査を行った。病棟EではPFGEパターンNo.6を示すMRSAが分離された患者は9名であったが、その中でMRSA感染症と判定されたのは3名であった。このことから臨床的MRSA感染症がみられた背景には広くMRSAの伝播・定着が生じていた可能性が示唆された。我々は以前に当院におけるMRSA分離株の分子疫学的調査を行い、MRSAの特定の株が特定の病棟に集中していたことを報告した⁶⁾。この報告をもとに院内感染対策が強化され、特定のDNA型の優勢株を減らすことができた¹⁵⁾。今回は新たな病棟で特定のPFGEパターンを示す株による伝播・定着・感染の可能性が示唆され、本実験データを院内感染対策委員会に提出して医療スタッフに注意を促し、院内感染対策として手洗い、スタンダードプリコーションおよびMRSA患者の処置を最後に施行する等の注意の再徹底を行った結果、病棟Eではその後の半年間で臨床検査材料から分離されたMRSA株のうちPFGEパターンNo.6を示す株の割合が前半年の55% (11/20株) から15.8% (3/19株) に減少した（データ未発表）。また2001年10月以降12月まで病棟EではPFGEパターンNo.6株は全く分離されず、加えて他の特定PFGEパターン株の集中もなかった（データ未発表）。

本研究で行ったPFGEによる分子疫学的解析は、MRSAの株数が多いとコスト、労力、結果を得るまでの時間がかかるという問題もあるが、臨床的アウトブレイクがみられる前段階で伝播・定着・感染の事実を示すことで、医療スタッフにMRSAの交差感染の危険性を認識させたことは大変意義あることであった。結果として院内アウトブレイクの防止につながる事が期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、TSST-1対照株をご提供下さいました都立衛生研究所の松下秀博士に深謝致します。

[本論文の要旨は第13回日本微生物学会総会（東京：2002年1月25日）にて発表した]

文献

- 1) 後藤 元, 後藤恵美子, 岡 真一, 他: 本邦における多剤耐性黄色ブドウ球菌の現状, *Chemotherapy*, 37: 1334~1341, 1989.
- 2) 岩本雅典, 高瀬登美子, 迎 寛, 他: 当院におけるMRSAによる呼吸器感染症および敗血症の検討, *感染症誌*, 67: 1190~1197, 1993.
- 3) 伊藤玲子, 満田年宏, 森雄 亮, 他: 小児科病棟におけるメチシリン耐性ブドウ球菌伝播様式のパルスフィールドゲル電気泳動法による分子疫学的解析, *日本小児科学会雑誌*, 104: 851~855, 2000.
- 4) Todd, J., M. Fishaut, F. Kapral, et al.: Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci. *Lancet*, 25: 1116~1118, 1978.

- 5) 藤原葉一郎, 遠藤紫穂: 乳腺炎が原因と考えられた MRSA による toxic shock syndrome (TSS) の一例, 感染症誌, 75: 898~903, 2001.
- 6) Ishimoto, T., T. Chida, N. Okamura: Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university teaching hospital. J. Jpn. Assoc. Infect. Dis., 73: 225~232, 1999.
- 7) Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, et al.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol., 33: 2233~2239, 1995.
- 8) 満田年宏: 第14回 応用編 (8) 分子疫学的解析の実践 分子疫学的解析法を感染管理の現場でどう生かすか? Infection Control, 11: 590~601, 2002.
- 9) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard, 5th ed. M7-A5, NCCLS, Wayne, USA, 2000.
- 10) Mehrotra, M., G. Wang, W.M. Johnson: Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxin, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol., 38: 1032~1035, 2000.
- 11) Johnson, W.M., S.D. Tyler, E.P. Ewan: Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxin, and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 29: 426~430, 1991.
- 12) 花木秀明, 平松啓一: MRSA の変遷とバンコマイシン耐性 MRSA の出現, 臨床科学, 33: 1052~1059, 1997.
- 13) Bartley J.: First case of VRSA identified in Michigan. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 23: 480, 2002.
- 14) 岡田陸滋, 牧本 敦, 北村明子, 他: 毒素産生 MRSA による新たな新生児発疹性疾患—局所, 血中毒素およびサイトカインからみた病態—, 感染症誌, 74: 573~579, 2000.
- 15) Osawa, K., C. Baba, T. Ishimoto, et al.: Significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) survey in a university teaching hospital. J. Infect. Chemother. 印刷中.

Molecular Epidemiological Analysis and Antimicrobial Susceptibility of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in the University Teaching Hospital

Toshio Chida¹⁾, Noboru Okamura¹⁾, Shizu Yoneyama¹⁾, Kayo Osawa²⁾, Chiemi Baba¹⁾, Etsuko Sawabe^{1,3)}, Noriko Furuhata³⁾, Hatsuko Tori³⁾, Isao Takebe³⁾, Chino Sumita³⁾, Masahiro Nishibori³⁾, Nobuo Nara³⁾, Shuji Miyake⁴⁾, Yasuyuki Yoshizawa⁴⁾

¹⁾Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Allied Health Sciences, Tokyo Medical and Dental University

²⁾Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kobe University School of Medicine

³⁾Department of Clinical Laboratory, Tokyo Medical and Dental University Hospital

⁴⁾Department of Geriatric and Pulmonary Medicine, Tokyo Medical and Dental University Hospital

The 185 strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated in the Tokyo Medical and Dental University Teaching Hospital from January to June in 2001 were examined for *Sma* I macrorestriction patterns of genomic DNA by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) method, antimicrobial susceptibility by the agar dilution method and detection of toxic shock syndrome toxin (TSST-1) gene by the PCR method. Among 185 strains of MRSA, 79 PFGE patterns were detected. These PFGE patterns were classified into 16 (types a to p) DNA types by the Dice similarity index of more than 80%. The type i was the most common type (42%, 77 strains out of all MRSA strains). All of the isolates were sensitive to vancomycin and rifampin. Although we had never experienced arbekacin resistance before, 3 arbekacin-resistant strains were isolated for the first time in this hospital. TSST-1 gene was detected in 89% of the isolates. As for the spread of these strains over the hospital wards, 26 strains with a particular PFGE pattern were distributed in the particular wards. Examination of these wards on patients' period of admission and excretion of MRSA suggested that cross-infection or colonization had occurred in these wards. Our results suggested that molecular epidemiological analysis of the MRSA combined with patients' clinical information was one of the effective means for warning the hospital staff of the possible cross-infection and keeping the patients from the outbreak of MRSA infection.