

[短 報]

Staphylococcus aureus 検出ラテックス凝集キット
ドライスポット スタフィテクトプラスの
結果に影響した培地と培養時間

田澤庸子¹⁾・佐々木裕美¹⁾・古畑由紀江¹⁾・菊地勇治¹⁾
堀内 啓¹⁾・久保亮一²⁾・花木秀明³⁾・岡田 淳⁴⁾

- ¹⁾ NTT 東日本関東病院 臨床検査部
²⁾ 関東化学株式会社ライフサイエンス部
³⁾ 北里研究所抗感染薬研究センター/北里大学医学部 感染症学
⁴⁾ 大東文化大学 スポーツ・健康科学部 健康科学科

(平成 20 年 5 月 14 日受付, 平成 22 年 1 月 25 日受理)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は、細胞壁上に存在するポリサッカライドのために、結合型コアグララーゼやプロテイン A を反応の標的とした従来のラテックス凝集試薬では判定が偽陰性となる場合がある。近年、これらの標的に加え、ポリサッカライドの膜も抗原として認識できるラテックス凝集試薬「ドライスポットスタフィテクトプラス (ドライスポット: 関東化学)」が市販された。著者らは従来のラテックス凝集試薬である PS ラテックス‘栄研’ (PS ラテックス: 栄研化学) で陰性となった MRSA40 株を被検菌として用い、ヒツジ血液寒天培地 (T) (血液寒天培地: 日本 BD) と CHROMagar MRSA (CHROMagar: 関東化学) に分離し、その 18 時間, 24 時間および 48 時間培養コロニーで、PS ラテックスとドライスポットにおける反応性を比較検討した。その結果、PS ラテックスにおいては培地、培養時間を変更しても 40 株すべて陰性であった。一方、ドライスポットにおいては血液寒天培地の 18 時間培養コロニーで 40 株中 3 株に陽性反応がみられ、24 時間培養コロニーでも変わらなかったが、CHROMagar では 18 時間培養コロニーで 15 株に陽性反応がみられ、24 時間で新たに 23 株が加わり、陽性株は合計 38 株となった。以上のことから、ドライスポットは従来のラテックス試薬では陰性となる MRSA の検出にも有用な試薬であり、使用する際には CHROMagar で 24 時間以上培養したコロニーを用いることが有効な方法であると考えられた。

Key words: ポリサッカライド, MRSA, コアグララーゼテスト, ラテックス凝集反応

コアグララーゼテストは *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) とその他のブドウ球菌を鑑別、同定するための重要な性状試験の一つであり、その方法には遊離型コアグララーゼを検出する試験管法と、クランピングファクター (結合型コアグララーゼ) を検出するスライド法がある。しかしウサギプラズマを用いるこれらの

方法は現在では日常的に使用されることは少なく、代わりに結合型コアグララーゼとプロテイン A に対する抗体をラテックス粒子に感作させたラテックス試薬が汎用されている。ところが、*S. aureus* の中でラテックス凝集反応が陰性を示す株が時折みられることがある。この原因は *S. aureus* の細胞壁上に多量に合成されたポリサッカライドが、細胞壁上に存在する結合型コアグララーゼとプロテイン A の表面を膜のように覆うことによりラテックス凝集反応が阻害されると考えられている¹⁾。特に methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) では、methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) より多量に合成されるため²⁾ 従来のラテックス試薬に対して偽陰性を示す

著者連絡先: (〒141-8625) 東京都品川区東五反田
5-9-22
NTT 東日本関東病院 臨床検査部
田澤庸子
TEL: 03-3448-6412
FAX: 03-3448-6413
E-mail: ytazawa@east.ntt.co.jp

ことが報告されている^{1,3,4}。ポリサッカライドは *S. aureus* の病原因子の一つであり^{5,6}、抗原性により 1~11 型の血清型に分類され、臨床材料から分離されるポリサッカライド保有の *S. aureus* では 5 型と 8 型が全体の 70~80% を占める^{2,7}。ラテックス凝集反応が陰性を示す MRSA においては特に 5 型の血清型が多いことが報告されている³。このような状況から、近年結合型コアグラーゼ、プロテイン A および 5 型と 8 型のポリサッカライドの膜に対して特異的に反応する新しいラテックス試薬「ドライスポット スタフィテクトプラス (ドライスポット; 関東化学)」が発売された。著者らは従来のラテックス試薬の反応の標的に加えてポリサッカライドの膜も標的として反応するドライスポットの性能を評価するために、従来のラテックス試薬である PS ラテックス ‘栄研’ (PS ラテックス; 栄研化学) で陰性を示した MRSA 株について、ヒツジ血液寒天培地 (T) (血液寒天培地; 日本 BD) で 24 時間培養した発育コロニーで凝集反応を試みた。しかし陽性反応を示したのは一部の株のみであった。ところがこの試みと同時期に MRSA スクリーニング培地である CHROMagar MRSA (CHROMagar; 関東化学) の評価を行っていたことから、前述の MRSA 株を同培地に培養し、その 24 時間培養のコロニーでドライスポットの凝集反応を試したところ、血液寒天培地では陰性であった株が陽性反応を示した。このように、菌株の培養方法によりラテックス試薬の凝集に差が認められたことから、今回ドライスポットと PS ラテックスを培地と培養時間の観点から比較し、従来のラテックス試薬で陰性を示す MRSA 検出に対する有用性を検討した。

被検菌株には 2006 年 1 月~8 月に当院において臨床材料から分離され、日常検査時に PS ラテックスの凝集反応が陰性を示した MRSA 40 株を用いた。これらの株は血液寒天培地で培養後、グラム陽性球菌、カタラーゼ試験陽性、ウサギブラズマ ‘栄研’ (栄研化学) を用いた試験管法のコアグラーゼ試験陽性 (1 株のみ弱陽性) であることを確認した。さらに Mi-

croScan Pos Combo61J (PC61J) パネル (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス) を使用し、MicroScan WalkAway96SI (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス) での生化学的同定結果が *S. aureus*, *oxacillin* の MIC > 2 $\mu\text{g/ml}$ であることを確認した。ラテックス試薬には、PS ラテックスとドライスポットを用いた。ラテックス試薬の陽性コントロールとして *S. aureus* ATCC43300(MRSA), *S. aureus* ATCC29213 (MSSA), 陰性コントロールとして、*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 を用いた。被検菌株とコントロール菌株を血液寒天培地および CHROMagar に塗布後、35°C で好気培養を行った。培養時間は、18 時間 (ドライスポットの添付文書の最短培養時間)、24 時間 (CHROMagar で MRSA を判定する際の培養時間)、および 48 時間に設定した。各培養時間後に血液寒天培地と CHROMagar に発育したコロニーを用いて、PS ラテックスとドライスポットそれぞれについて添付文書に従って凝集反応を行った。なお、ドライスポットの判定の際には、毎回自己凝集が認められないことを確認した。

結果を表 1 に示した。分離培地およびラテックス試薬により反応性に差が認められた。すなわち血液寒天培地の発育コロニーを用いた場合、PS ラテックスは 40 株すべて陰性であったが、ドライスポットでは 40 株中 3 株が陽性を示し、二つの試薬間には有意差は認められなかった (Fisher の直接確率検定: $p > 0.01$)。一方、CHROMagar の発育コロニーを用いた場合の PS ラテックスの結果は血液寒天培地の場合と同様に培養時間に関係なくすべて陰性であったのに対して、ドライスポットでは 18 時間培養コロニーに対して 15 株、24 時間および 48 時間培養コロニーで新たに 23 株が加わり、合計で 38 株が陽性となった。この 18 時間培養コロニーと 24 時間培養コロニーのドライスポット陽性株数の間には有意な差が認められた (Fisher の直接確率検定: $p < 0.01$)。なお、表 1 の血液寒天培地の培養コロニーでドライスポットが陽性を示した 3 株は、CHROMagar の培養コロニーでもド

表 1. 各培地の培養コロニーに対するラテックス凝集試薬の判定結果

n=40 株

	ヒツジ血液寒天培地						CHROMagar MRSA					
	PS ラテックス			ドライスポット			PS ラテックス			ドライスポット		
培養時間	18 h	24 h	48 h	18 h	24 h	48 h	18 h	24 h	48 h	18 h	24 h	48 h
陽 性	0	0	0	3	3	3	0	0	0	15	38	38
陰 性	40	40	40	37	37	37	40	40	40	25	2	2

ライスポットで陽性を示した。コントロール菌株の *S. aureus* ATCC43300 (MRSA) は培養時間、培地の種類、ラテックス試薬の種類にかかわらず凝集が確認された。*S. aureus* ATCC29213 (MSSA) と *S. epidermidis* ATCC12228 は CHROMagar で発育が抑制されたが、血液寒天培地上の培養コロニーではラテックス凝集試薬で前者は陽性、後者は陰性を示した。

ドライスポットの添付文書では、検査に使用する培養コロニーの推奨培地は、血液寒天培地、コロンビア血液寒天培地、ニュートリエント寒天培地、コロンビア CNA 寒天培地、トリプトンソーヤ寒天培地、血液 5% 添加ミューラーヒントン寒天培地、血液 5% 添加トリプトンソーヤ寒天培地、ベアドパーカー寒天培地、マンニット食塩寒天培地、CLED 寒天培地、アイソ-センシテスト寒天培地、5% 血液添加アイソ-センシテスト寒天培地、オキサシリン耐性スクリーニング寒天培地 (ORSA) と記載されている。一方、PS ラテックスの添付文書では非選択培地の培養コロニーを使用するように記載されている。今回の検討において、推奨培地の一つである血液寒天培地の培養コロニーを用いたドライスポットの凝集反応は、従来のラテックス試薬に対して偽陰性を示す報告や Weist らの評価⁹⁾ から PS ラテックスで検出されなかった MRSA がドライスポットで検出されることを期待したが、二つのラテックス凝集試薬間に陽性株数の有意差は認められなかった。ところが MRSA スクリーニング培地の一つである CHROMagar の培養コロニーを用いた場合、ドライスポットの検出結果は有意に陽性数の増加がみられた。このような結果は、*S. aureus* のポリサッカライドの膜の合成が培養環境要因によって促進されると報告^{9~11)} があることから、本来表層のポリサッカライドの膜の形成能力が弱いもしくは不十分な MRSA が選択培地の成分によって影響を受け、ポリサッカライドの膜が構築されることでドライスポットとの反応性が高まったのではないかと推察された。なお、CHROMagar 上で 48 時間培養後でも陰性となった 2 株については、ポリサッカライドの膜などの表面抗原の構築が不十分であった可能性と、表面抗原以外の要因により抗体との親和性が低下した MRSA であったためにドライスポットと反応しなかった可能性が考えられる。このように検出できない株が少数認められたが、今回の検討により、ドライスポットと CHROMagar を組み合わせることにより、これまでのラテックス凝集反応で検出できなかった MRSA が検出され、全体としての MRSA 検出率が上がる効果が期待された。

当院の日常検査において、PS ラテックス試薬の凝集で陰性を示し、同定・感受性自動測定検査機器により *S. aureus* と同定された場合は、さらに簡易生化学同定キットと試験管法によるコアグラゼテストを追加し菌名の確認を行っている。最初のラテックス凝集反応に偽陰性を示す *S. aureus* は、薬剤感受性結果から MRSA であることを多く経験している。今回の結果から、ラテックス凝集試薬を従来の試薬からドライスポットに変更しても、血液寒天培地の培養コロニーを用いているかぎり従来のラテックス凝集試薬で陰性を示す MRSA に対する *S. aureus* の鑑別同定はあまり改善されないことが明らかとなった。しかし、CHROMagar の培養コロニーをドライスポットの凝集反応を用いることにより、*S. aureus* を鑑別同定することが可能となることが確認された。さらに 18 時間よりも 24 時間培養したコロニーで有意に陽性株数が増加したことから、日常検査において従来のラテックス凝集試薬で陰性を示す MRSA を同定・感受性自動測定検査機器で検出した際には、CHROMagar で 24 時間以上培養したコロニーを用いてドライスポットを実施する方法が、簡便に *S. aureus* を確認する方法として活用できると考えられた。

文 献

- 1) Ruane, P. J., M. A. Morgan, D. M. Citron, et al. 1986. Failure of rapid agglutination methods to detect oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 24: 490-492.
- 2) Hochkeppel, H. K., D. G. Braun, W. Vischer, et al. 1987. Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide type 5 and 8. *J. Clin. Microbiol.* 25: 526-530.
- 3) Fournier, J. M., A. Boutonnier, A. Bouvet. 1989. *Staphylococcus aureus* strains which are not identified by rapid agglutination methods are of capsular serotype 5. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1372-1374.
- 4) Risley, A. L., A. Loughman, C. Cywes-Bentley, et al. 2007. Capsular polysaccharide masks clumping factor A-mediated adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrinogen and platelets. *J. Infect. Dis.* 196: 919-927.
- 5) Dassy, B., J.-M. Fournier. 1996. Respiratory activity is essential for post-exponential-phase production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 64: 2408-2414.
- 6) Thakker, M., J.-S. Park, V. Carey, et al. 1998.

- Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect. Immun.* 66: 5183–5189.
- 7) Arbeit, R. D., W. W. Karakawa, W. F. Vann, et al. 1984. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2: 85–91.
- 8) Weist, K., A.-K. Cimbali, C. Lecke, et al. 2006. Evaluation of six agglutination tests for *Staphylococcus aureus* identification depending upon local prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). *J. Med. Microbiol.* 55: 283–290.
- 9) Herbert, S., D. Worlitzsch, B. Dassy, et al. 1997. Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5: CO₂ inhibition *in vitro* and *in vivo*. *J. Infect. Dis.* 176: 431–438.
- 10) Stringfellow, W. T., B. Dassy, M. Lieb, et al. 1991. *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 618–621.
- 11) Pöhlmann-Dietze, P., M. Ulrich, K. B. Kiser, et al. 2000. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator *agr*, and bacterial growth phase. *Infect. Immun.* 68: 4865–4871.

Latex Agglutination Kit Using Dryspot Staphytest Plus for *Staphylococcus aureus* Detection: Effects of Culture Medium and Time

Yoko Tazawa,¹⁾ Hiromi Sasaki,¹⁾ Yukie Furuhata,¹⁾ Yuji Kikuchi,¹⁾ Hajime Horiuchi,¹⁾
Ryoichi Kubo,²⁾ Hideaki Hanaki,³⁾ Jun Okada⁴⁾

¹⁾ Clinical Laboratory, NTT Medical Center Tokyo

²⁾ Life Science Department, Kanto Chemical Co., Inc.

³⁾ Kitasato Research Center for Anti-infection Drugs, Kitasato Medical University

⁴⁾ Faculty of Sports and Health Science, Daito Bunka University

As polysaccharides are present on the cell wall of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), this bacterium may yield false negatives on latex agglutination tests which use conventional reagents that detect bound coagulase or protein A. Dryspot Staphytest Plus has recently become commercially available as a latex reagent that can recognize both coagulase and protein A, as well as capsular polysaccharides, as antigens. We obtained isolates from 40 MRSA strains are known to have negative reactivity to the conventional latex reagent PS LATEX 'Eiken,' and compared their reactivity to PS LATEX with Dryspot after 18, 24, and 48 h incubation in sheep blood agar or in CHROMagar MRSA. For reactivity of PS LATEX alone, all 40 strains were confirmed to be negative regardless of culture medium and incubation time. For PS LATEX with Dryspot reactivity, three of the 40 strains were positive in both the 18- and 24-h blood agar cultures, while 15 and 23 strains were positive in the 18- and 24-h CHROMagar cultures, respectively, for a total of 38 positive strains. These results suggest that Dryspot is a useful reagent for detecting MRSA strains that cannot be detected with conventional latex reagents and is effective for cultures incubated over 24 h in CHROMagar.