

[原 著]

培地のイオン濃度が黄色ブドウ球菌のMRSA判定に及ぼす影響

山口哲央¹⁾・東條浩幸²⁾・千葉勝己³⁾・松本哲哉¹⁾¹⁾東京医科大学微生物学講座²⁾栄研化学株式会社品質管理部³⁾東京医科大学病院中央検査部

(平成23年10月19日受付, 平成23年12月13日受理)

われわれは、微量液体希釈法に用いる培地中のCa²⁺濃度を変えると、Oxacillin (MPIPC) の薬剤感受性が大きく変化することを経験した。MPIPCのMICがbreak pointに近い菌株では培地中のCa²⁺濃度によってMRSA判定が変わる可能性がある。そこで今回、東京医科大学病院で2007年7月から2009年3月までの期間に分離されたIPMのMIC≤1μg/mlの条件を満たすMRSA 40株、2010年6月に分離されたMSSA 50株およびMSSA標準株2株(ATCC29213およびATCC25923)を対象とし、イオン濃度の異なる培地を使用して微量液体希釈法にてMPIPCのMICを測定した。臨床分離MRSA株を対象とした解析では、Mueller-Hinton Broth (MHB)を用いた場合と比較すると、陽イオン調整MHB (CAMHB)を用いた場合、すべての株でMPIPCのMICの上昇が認められ、最大でMICが7管上昇する菌株も存在した。MSSAでは52株中、48株でMICの上昇を認めた。また、CLSIより推奨されているCAMHBのCa²⁺濃度(20~25mg/L)では、MRSA (*mecA*⁺) 40株中5株がMSSAと判定されたが、Ca²⁺濃度を50mg/Lに調整するとすべての株がMRSAと判定された。Mg²⁺においても、Ca²⁺ほどの影響は認めなかったものの、同様の傾向が示された。微量液体希釈法を用いて*Staphylococcus aureus*の薬剤感受性を測定する場合、培地のCa²⁺濃度がMPIPCのMICに強く影響することが示された。MRSA判定にも影響する事象であり、正確な薬剤感受性検査を行ううえで、培地の適正Ca²⁺濃度は再検討する必要がある。

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, cation, MPIPC, Mueller-Hinton Broth

序 文

*Staphylococcus aureus*はヒトに常在し、特に鼻咽腔、鼻前庭、口腔および咽頭に多く分布している。一般的に*S. aureus*は*Staphylococcus*属の中で最も病原性が強い菌種と考えられており、皮膚感染症、軟部組織感染症、壊死性筋膜炎、毒素性ショック症候群、骨髄炎、関節炎、心内膜炎および化膿性髄膜炎などを引き起こす。

また、多様な耐性メカニズムも特徴的で、抗菌薬の発展に伴い*S. aureus*の薬剤耐性化も進んできた。特に

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は、院内感染症の代表的な原因菌であり、院内で分離される*S. aureus*のおよそ6~7割を占め¹⁾、临床上遭遇する機会が最も多い耐性菌である。MRSAは*mecA*遺伝子を持つことでMethicillinを含めたβ-ラクタム系抗菌薬をはじめ多くの抗菌薬に耐性を示し、感染症を引き起こした場合は治療薬に限られ治療に難渋することが多い。このため、感染症の原因菌が*S. aureus*、特にMRSAであるか否かは患者の予後や治療薬の選択にかかわる重要なポイントである。

通常、検査室では*S. aureus*が検体から検出された場合、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)の推奨する方法に従い²⁾、微量液体希釈法でOxacillin (MPIPC)のMIC≥4μg/mlもしくはディスク法でCefoxitin (CFX)≤21mmを示した場合、MRSAと判定する。この方法は感度、特異度ともに良好で優れた検

著者連絡先：(〒160-8402) 東京都新宿区新宿6-1-1
東京医科大学微生物学講座
山口哲央
TEL: 03-3351-6141 (241)
FAX: 03-3351-6160
E-mail: t_yama@tokyo-med.ac.jp

査法ではあるが、MRSA (*mecA*⁺)であっても、MIPICへの耐性度が低い場合、Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) と判定してしまう場合がある³⁾。また近年、市中で健康人に感染する市中感染型MRSA (CA-MRSA)の出現が問題となっているが、CA-MRSAはImipenem (IPM)など従来の院内感染型MRSA (HA-MRSA)では耐性と判定される抗菌薬に感性を示す株が多い^{4,5)}。また、CA-MRSAはMIPICに対しても耐性度が比較的低いことが言われており、HA-MRSAのMIC50%が128 µg/ml (32-≥256 µg/ml)であるのに対し、CA-MRSAのMIC50は16 µg/ml (0.25 ~ 128 µg/ml) という報告もある⁴⁾。MIPICのMICが0.25 µg/mlを示すCA-MRSA株も存在し、こうした菌株が増加すると、現在の検査法ではMRSAの検出が困難になる可能性がある。

われわれは、微量液体希釈法で*S. aureus*の薬剤感受性を測定する際、培地中のCa²⁺濃度およびMg²⁺濃度が薬剤感受性に大きく影響することを経験した。そこで今回、MRSAと判定された菌株の中で、IPMに感性的なものをBBP2'の発現が少ないと疑われる株として収集し、各種イオン濃度が薬剤感受性とMRSA判定に与える影響について検討した。

I. 材料と方法

1. 対象菌株

東京医科大学病院において2007年7月から2009年3月までの期間に分離された臨床分離MRSA株のうち、IPMのMIC ≤ 1 µg/mlの条件を満たすMRSA40株および2010年6月に分離されたMSSA50株を用いた。同一患者からの検体は除外した。MSSAの標準株ATCC 25923およびATCC29213の2株をコントロールとして用いた。対象菌株はすべて、PCR法にて*mecA*遺伝子の有無を確認した⁶⁾。

2. 微量液体希釈法による薬剤感受性の測定と陽イオン調整の影響 (MRSA)

臨床分離MRSA40株を対象にCLSIに準拠した微量液体希釈法にてMICを測定した。市販のMRSA用ドライプレート (栄研化学: DP32) を用い、MIPIC, Ampicillin (ABPC), CFX, Cefazolin (CEZ), Cefmetazole (CMZ), Flomoxef (FMOX), IPM, Gentamicin (GM), Arbekacin (ABK), Minomycin (MINO), Erythromycin (EM), Clindamycin (CLDM), Fosfomycin (FOM), Sulfamethoxazole/Trimethoprim (ST), Levofloxacin (LVFX), Vancomycin (VCM), Teicoplanin (TEIC) および Linezolid (LZD) のMICを測定した。CLSIでは、培地のCa²⁺濃度を20 ~ 25 mg/L, Mg²⁺濃度を10 ~ 12.5 mg/Lに

調整したCation-adjusted Mueller-Hinton Broth (CAM-HB)の使用を推奨している。陽イオン調整の影響を確認するため、CAMHBを使用した場合と陽イオン未調整のMueller-Hinton Broth (MHB)を使用した場合のMICを比較した。

3. Ca²⁺ およびMg²⁺のMIPIC感受性に対する影響 (MRSA)

栄研化学株式会社と共同でMIPICの薬剤濃度範囲を広げたドライプレート (0.12 ~ 64 µg/ml) を作成し、臨床分離MRSA40株を対象にMIPICのMICを測定した。培地はMHB, CAMHB (Ca²⁺: 25 mg/L および Mg²⁺: 12.5 mg/L), Ca²⁺のみ調整されたMHB (Ca²⁺: 25 mg/L), Mg²⁺のみ調整されたMHB (Mg²⁺: 12.5 mg/L) および陽イオン濃度を2倍にしたModified-CAMHB (Ca²⁺: 50 mg/L および Mg²⁺: 25 mg/ml) を用意し、各陽イオンの影響について検討した。なお、NaClはCLSIに準拠し2%で統一した。

4. 各Ca²⁺濃度におけるMIPICのMIC測定 (MRSA)

培地のCa²⁺濃度のみを段階的に設定 (3.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 mg/L および 50 mg/L) し、MRSA 40株を対象に培地のCa²⁺濃度がMIPICのMICに与える影響を検討した。NaClは2%, Mg²⁺濃度は12.5 mg/Lで統一した。

5. 各Ca²⁺濃度におけるMIPICのMIC測定 (MSSA)

臨床分離MSSA50株およびMSSA標準株 (ATCC 25923 および ATCC29213) を対象に、MIPICの薬剤濃度範囲を変更し (0.004 ~ 4 µg/ml), 4. と同様の解析を行った。

6. MIPICのMICによるMRSA判定

MIPICのMICをもとにMRSA40株およびMSSA52株のMRSA判定を行い、使用培地 (MHB, CAMHB および M-CAMHB) による判定結果の違いを比較検討した。判定基準はCLSIに準拠し、MIPICのMIC ≥ 4 µg/mlを示した場合MRSAと判定した。

7. ディスク法における培地のCa²⁺濃度がMRSA判定に及ぼす影響

MRSA40株およびMSSA52株を対象に、ディスク法において培地の陽イオン濃度が薬剤感受性に及ぼす影響について検討した。培地は陽イオン未調整のMueller-Hinton Agar (MHA), Ca²⁺濃度を50 mg/L, Mg²⁺濃度を12.5 mg/Lに調整したCation-adjusted MHA (CAMHA), NaClのみ調整したMHA (2%NaCl) およびNaClを調整したCAMHA (2%NaCl, Ca²⁺: 50 mg/L および Mg²⁺: 12.5 mg/L) を用いた。MIPICディスク

法およびCFXディスク法にて阻止円径をそれぞれ測定し、MRSA判定を行った。判定基準はCLSIに準拠し、MPIPCディスク法では ≤ 10 mmを示した場合、CFXディスク法では ≤ 21 mmを示した場合MRSAと判定した。

II. 結 果

1. 対象菌株の *mecA* 遺伝子の確認

臨床分離MRSA全40株で *mecA* 遺伝子が検出され、臨床分離MSSA全50株および標準株 (ATCC25923およびATCC29213) では *mecA* 遺伝子が検出されなかった。

2. 微量液体希釈法による薬剤感受性の測定とイオン調整の影響 (MRSA)

臨床分離MRSA40株を対象とした各種抗菌薬のMICを表1に示す。抗MRSA薬である、VCM, TEIC, LZDおよびABKとともに、IPM, STおよびMINOの感受性が特に良好であった。MHBを用いた場合とCAMHBを用いた場合のMICの比較では、MPIPCにおいて有意差が認められたが ($p < 0.01$)、ほかの17薬剤に関しては有意差が認められなかった。以上より、培地中の陽イオン (Ca^{2+} および Mg^{2+}) の存在が

MPIPCのMICに強く影響することが示唆された。

3. Ca^{2+} および Mg^{2+} のMPIPC感受性に対する影響 (MRSA)

検討薬剤をMPIPCのみとし、濃度範囲を広げ、より詳細なMICの変化を確認した。図1にMIC累積分布を示す。 Mg^{2+} のみの調整では、MICの上昇傾向を認めるものの軽度であった。これに対し、 Ca^{2+} のみ調整した培地を用いた場合、CAMHBを用いた場合と同程度のMICの上昇を認め、より Ca^{2+} がMICに影響することが示された。CAMHBを用いた場合のMICは、MHBを用いた場合のMICと比べ、すべての株でMICが上昇した。菌株ごとに見ると、最大でMICが7管上昇する菌株も存在した。また、 Ca^{2+} 濃度および Mg^{2+} 濃度をそれぞれ倍にした場合、さらにMICの上昇を認め、イオン濃度依存的にMICが上昇した。

4. 各 Ca^{2+} 濃度におけるMPIPCのMIC測定 (MRSA)

Ca^{2+} の濃度依存性の影響を明確にするため、培地の Ca^{2+} 濃度を段階的に設定し、MICを測定した (図2)。 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴いMICの上昇を認め、 Ca^{2+} 濃度の影響を強く示唆した。

表1. MHBおよびCAMHBを使用した際の各種抗菌薬MIC50 (MRSA)

抗菌薬	MHB		CAMHB	
	MIC50	Range	MIC50	Range
MPIPC	1	$\leq 0.12 - \geq 8$	≥ 8	$2 - \geq 8$
ABPC	16	$0.5 - \geq 32$	8	$4 - \geq 32$
CEZ	2	$\leq 0.5 - \geq 32$	2	$\leq 0.5 - \geq 32$
CFX	8	$\leq 4 - \geq 32$	8	$\leq 4 - \geq 32$
CMZ	4	2-32	4	1-16
FMOX	4	$\leq 0.5 - 16$	2	$\leq 0.5 - 8$
IPM	≤ 0.25	$\leq 0.25 - 1$	≤ 0.25	$\leq 0.25 - 1$
GM	≥ 16	$\leq 0.25 - \geq 16$	≥ 16	$\leq 0.25 - \geq 16$
ABK	1	$\leq 0.25 - 8$	0.5	$\leq 0.25 - 4$
EM	≥ 8	$\leq 0.12 - \geq 8$	≥ 8	$\leq 0.12 - \geq 8$
CLDM	0.12	$\leq 0.06 - \geq 4$	0.12	$\leq 0.06 - \geq 4$
FOM	≤ 32	$\leq 32 - \geq 256$	≤ 32	$\leq 32 - \geq 256$
LVFX	≤ 0.25	$\leq 0.25 - \geq 8$	≤ 0.25	$\leq 0.25 - \geq 8$
MINO	≤ 2	$\leq 2 - 4$	≤ 2	$\leq 2 - \geq 16$
ST	$\leq 9.5/0.5$	$\leq 9.5/0.5 - \geq 76/4$	$\leq 9.5/0.5$	$\leq 9.5/0.5 - \geq 38/2$
VCM	1	$\leq 0.5 - 2$	1	$\leq 0.5 - 2$
TEIC	0.5	$\leq 0.5 - 2$	0.5	$\leq 0.5 - 2$
LZD	1	$\leq 0.5 - 2$	1	$\leq 0.5 - 2$

MHB, Mueller-Hinton Broth; CAMHB, Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth (Ca^{2+} : 25 mg/L, Mg^{2+} : 12.5 mg/L); MPIPC, Oxacillin; ABPC, Ampicillin; CFX, Cefoxitin; CEZ, Cefazolin; CMZ, Cefmetazole; FMOX, Flomoxef; IPM, Imipenem; GM, Gentamicin; ABK, Arbekacin; MINO, Minomycin; EM, Erythromycin; CLDM, Clindamycin; FOM, Fosfomycin; ST, Sulfamethoxazole/Trimethoprim; LVFX, Levofloxacin; VCM, Vancomycin; TEIC, Teicoplanin; LZD, Linezolid.

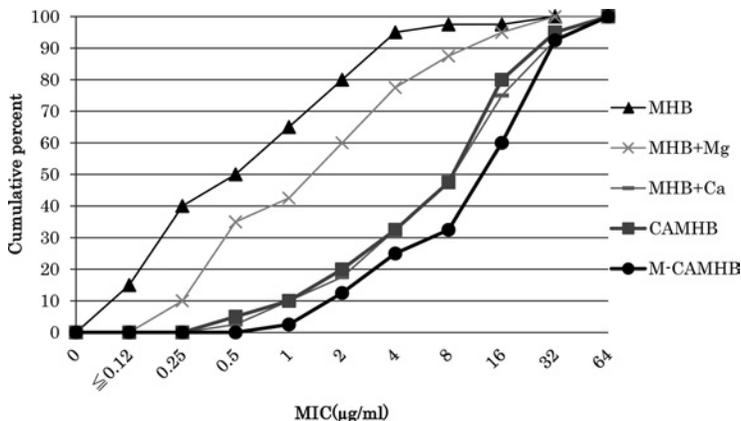


図1. MRSAを対象とした各種培地におけるMIPICのMIC累積分布
MHB, Mueller-Hinton Broth; CAMHB, Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth (Ca^{2+} : 25 mg/L, Mg^{2+} : 12.5 mg/L); M-CAMHB, Modified-CAMHB (Ca^{2+} : 50 mg/L, Mg^{2+} : 25 mg/L)

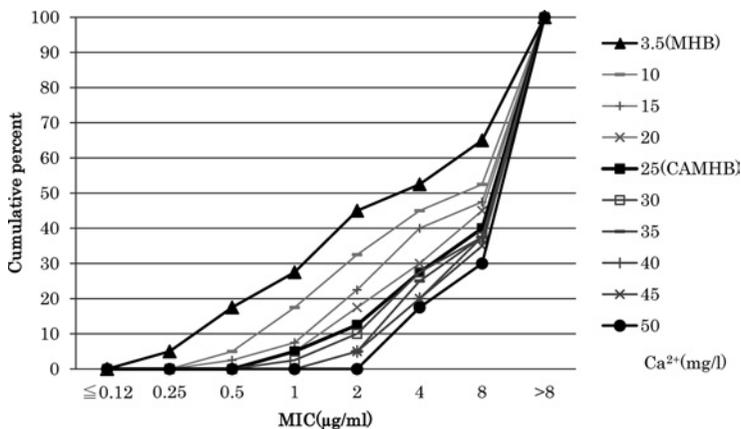


図2. MRSAを対象とした各 Ca^{2+} 濃度におけるMIPICのMICの累積分布

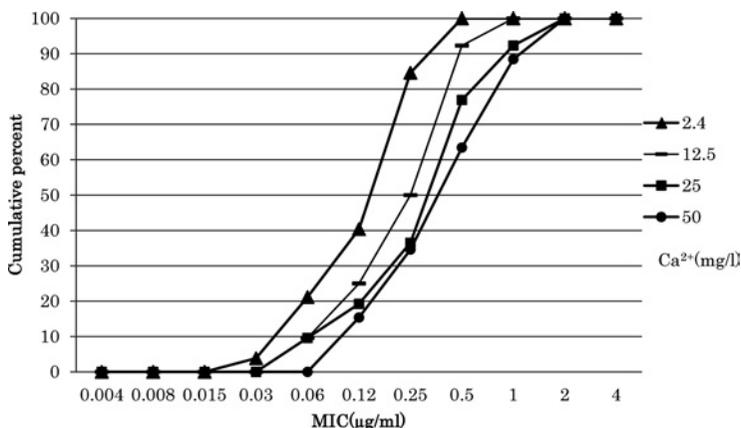


図3. MSSAを対象とした各 Ca^{2+} 濃度におけるMIPICのMIC累積分布

5. 各Ca²⁺濃度におけるMPIPCのMIC測定 (MSSA)

MSSA (*mecA*⁻)においても、培地のCa²⁺濃度依存性にMICの上昇が認められた (図3)。

6. MPIPCのMICによるMRSA判定

MHB (Ca²⁺: 3.5 mg/l) を用いた場合、MRSA (*mecA*⁺) 40株のうちMRSAと判定されたのは22株(55%)のみであったのに対し、CAMHB (Ca²⁺: 25 mg/L)を用いた場合では35株(87.5%)がMRSAと判定され、M-CAMHB (Ca²⁺: 50 mg/L)を用いた場合ではすべての株(100%)がMRSAと判定された (表2-1)。CAMHB使用時、5株の*mecA*陽性株がMSSAと判定された (MPIPCのMICは0.5 ~ 2 µg/ml)。MSSA (*mecA*⁻) 52株においては、MRSAと同様に、CAMHBを用いるよりもM-CAMHBを用いたほうがMICは高く測定されたが、M-CAMHBを用いた場合にMRSAと判定され

た株は存在しなかった (表2-1)。

7. ディスク法における培地のCa²⁺濃度がMRSA判定に及ぼす影響

MRSA40株を対象としたMPIPCディスク法では、MHAを用いた場合、耐性(≤10 mm)と判定されたのは29株(72.5%)であり、CAMHAを用いた場合も耐性と判定されたのは27株(67.5%)のみであった (表2-2)。これに対し、MHA + NaClおよびCAMHA + NaClを用いた場合、35株(87.5%)が耐性と判定され、MRSA判定の感度が上がった。CFXディスク法ではどの培地を用いた場合も、すべての株が耐性(≤21 mm)と判定された。MSSAを対象としたCFXディスク法ではすべての培地で感性と判定されたが、MPIPCディスク法においてはMHA + NaClを使用した場合、1株が耐性と判定された。

表2. 各Ca²⁺濃度におけるMRSAの判定

表2-1. MPIPCのMICによるMRSA判定 (S; ≤2, R; ≥4)

培地の種類	MRSA判定			
	MRSA (<i>mecA</i> ⁺) 40株		MSSA (<i>mecA</i> ⁻) 52株	
	S	R	S	R
MHB	18 (45)	22 (55)	52 (100)	0 (0)
CAMHB	5 (12.5)	35 (87.5)	52 (100)	0 (0)
M-CAMHB	0 (0)	40 (100)	52 (100)	0 (0)

MHB, Mueller-Hinton Broth; CAMHB, Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth (Ca²⁺: 25 mg/L, Mg²⁺: 12.5 mg/L); M-CAMHB, Modified-CAMHB (Ca²⁺: 50 mg/L, Mg²⁺: 25 mg/L)

表2-2. MPIPCディスク法によるMRSA判定 (S; ≥13 mm, I; 11-12 mm, R; ≤10 mm)

培地の種類	MRSA判定					
	MRSA (<i>mecA</i> ⁺) 40株			MSSA (<i>mecA</i> ⁻) 52株		
	S	I	R	S	I	R
MHA	8 (20)	3 (7.5)	29 (72.5)	52 (100)	0 (0)	0 (0)
CAMHA	11 (27.5)	2 (5)	27 (67.5)	51 (98.1)	1 (1.9)	0 (0)
MHA + 2%NaCl	4 (10)	1 (2.5)	35 (87.5)	50 (96.2)	1 (1.9)	1 (1.9)
CAMHA + 2%NaCl	5 (12.5)	0 (0)	35 (87.5)	52 (100)	0 (0)	0 (0)

MHA, Mueller-Hinton Agar; CAMHA, Cation-adjusted Mueller-Hinton Agar (Ca²⁺: 50 mg/L, Mg²⁺: 12.5 mg/L)

考 察

現在、検査室で最も行われている薬剤感受性検査は、微量液体希釈法およびディスク法である。特に微量液体希釈法ではMICが測定でき、それをもとに耐性の有無を判断し、抗菌薬の選択が行われるため、その測定値は感染症治療に重要な示唆を与える。CLSIでは、検査の手順はもちろんのこと、使用する培地や成分に関する情報が細かく設定されており、CLSIが定めた共通の基準で検査を行うことで、安定した検査結果を導き出すことができると考えられている。

今回われわれは、微量液体希釈法に用いる培地のイオン濃度に焦点を当てた。CLSIでは微量液体希釈法を行う際、培地はCAMHB (Ca^{2+} : 25 mg/Lおよび Mg^{2+} : 12.5 mg/L)の使用を推奨している。これらの陽イオン濃度は、*Pseudomonas aeruginosa*のAmikacin (AMK)感受性に陽イオン濃度が影響するという報告を参考にしている^{7,8)}。これらの報告では、培地の Ca^{2+} 濃度を25 mg/Lに設定するよりも50 mg/Lに設定したほうがAMKのMICが高いことが示されているが、最終的に他のディスク法などの結果も踏まえたうえで、培地の Ca^{2+} 濃度は25 mg/Lが適切であると結論づけている。また、一方で*S. aureus*に対するDaptomycin感受性に、 Ca^{2+} が影響するという報告もある^{9,10)}。*S. aureus*に対してDaptomycinが作用する際 Ca^{2+} を必要とするため、 Ca^{2+} 濃度が低いとDaptomycinの効果が下がりMICは高くなるというものである。CLSIではDaptomycinのMIC測定時に限り、培地の Ca^{2+} 濃度を生体内に近い50 mg/Lに設定することを推奨している。

今回、微量液体希釈法を用いて*S. aureus*の薬剤感受性を測定する際、培地の Ca^{2+} および Mg^{2+} 濃度がMPIPCのMICに影響することが示された。特に Ca^{2+} 濃度の影響は強く、 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴いMICの上昇を認めた。詳細な機序は不明だが、影響する薬剤はMPIPCのみであること、*mecA*遺伝子の有無にかかわらずMSSAでも影響を与えたことから、*mecA*遺伝子発現への関与は考えにくく、イオン交換に関連したポンプ機構に影響を与えていると筆者らは考えている。ディスク法においても Ca^{2+} 濃度およびNaCl濃度の影響が示唆されたが、 Ca^{2+} やNaClの影響を受けない菌株も多く存在した。MHA + NaClを用いてMPIPCディスク法を行った際、MRSAと判定されたMSSA (*mecA*⁻)が存在したが、この菌株はNaClを加えることで阻止円径が小さくなり耐性と判定された。CAMHAを用いた際も阻止円径が縮小したが、CAMHA + NaClを用いた際は阻止円径の縮小は軽度

であった。菌株毎に陽イオンの影響の受け方が異なる可能性もあるため、今後検討の余地がある。

実際の現場では耐性度の高いHA-MRSAを扱うことが多く、こうした菌株に対しても Ca^{2+} は影響を及ぼすことが予測されるが、耐性度の高いHA-MRSAはMICが多少変化してもMRSA判定には影響がない。注意すべきはMPIPC耐性度の低い*mecA*陽性株のMRSA判定やMPIPCをMSSA治療薬として考えた場合のMIC測定である。まず、MPIPCのMICを用いたMRSA判定は、数多く存在するMRSA判定法の中でも最も普及している判定方法である。しかし、*mecA*遺伝子を保持していてもMSSAと判定される菌株が検出されることがあり、今回も Ca^{2+} 濃度が25 mg/Lの培地を用いた場合、*mecA*遺伝子を保持しているにもかかわらずMPIPCのMIC \leq 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった菌株が5/40株存在した。こうした菌株を確実にMRSAと判定するには耐性遺伝子である*mecA*遺伝子の検出や耐性機構であるPBP2'の確認が必要になるが、人手もコストも限られた臨床の検査室で全ての菌株についてこれらの解析を行うのは困難である。今回の解析では、MPIPCのMICでMRSAの判定を行う場合、培地の Ca^{2+} 濃度設定は25 mg/Lよりも50 mg/Lのほうが優れていることが示された。MSSAをMRSAと誤判定することもなく、感度・特異度ともに良好な結果であったことを考えると、培地の Ca^{2+} 濃度は50 mg/Lに設定すべきと考える。

また、今回の解析ではMSSAにおいても培地の Ca^{2+} 濃度がMPIPCのMICに影響することが明らかになった。日本においてはMRSA判定のみに使用される薬剤であるが、米国などにおいてはMSSA感染症の治療薬として用いられており、MPIPCのMICは治療の有効性に影響する。抗菌薬が実際に働く場所である生体内の Ca^{2+} 濃度は約50 mg/Lであり、これに近い条件の培地を用いたほうがより生体内に近いMIC値を測定できると考える。

薬剤感受性検査の方法は長い月日をかけて築き上げられてきたものであり、蓄積された過去の膨大なデータが存在する。検査方法を変えるということは、容易に行えるものではない。しかし、検査データを実際の感染症治療により有効に活用するためには今後の改良が必要と考えられる。これまで*S. aureus*、特にMRSAではNaClとの関係を示す報告はあったが¹¹⁾、 Ca^{2+} やほかのイオンとの関与を示す報告はなく、*S. aureus*に対する Ca^{2+} 濃度の影響についてあまり深く議論はされてこなかった。しかし、今回の検討から、培地の Ca^{2+} 濃度がMPIPCのMICに影響を与えることは明ら

かであり、微量液体希釈法でMPIPCのMICを測定する際は培地のCa²⁺濃度を50 mg/Lに調整する必要があると考える。

文 献

- 1) Niki, Y., H. Hanaki, T. Matsumoto, et al. 2009. Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the Japanese Society of Chemotherapy in 2007: General view of the pathogens' antibacterial susceptibility. *J. Infect. Chemother.* 15(3): 156–167.
- 2) CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—8th Edition. CLSI document M07-A8. CLSI, 2009.
- 3) Witte, W., B. Pasemann, C. Cuny. 2007. Detection of low-level oxacillin resistance in *mecA*⁺ positive *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13(4): 408–412.
- 4) Takano, T., W. Higuchi, T. Yamamoto. 2009. Superior *in vitro* activity of carbapenems over anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and some related antimicrobial agents for community-acquired MRSA but not for hospital-acquired MRSA. *J. Infect. Chemother.* 15(1): 54–57.
- 5) M. Motoshima, K. Yanagihara, Y. Morinaga, et al. 2010. Genetic diagnosis of community-acquired MRSA: A multiplex real-time PCR method for staphylococcal cassette chromosome *mec* typing and detecting toxin genes. *Tohoku J. Exp. Med.* 220(2): 165–170.
- 6) Kondo, Y., T. Ito, X. X. Ma, et al. 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: Rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(1): 264–274.
- 7) Zuravleff J. J., V. L. Yu, R. B. Yee, M. K. Zaphyr, W. Diven, F. B. Taylor. 1982. Effect of calcium, magnesium, and zinc on ticarcillin and tobramycin alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22(5): 839–843.
- 8) Barry, A. L., G. H. Miller, C. Thornberry, et al. 1987. Influence of cation supplements on activity of netilmicin against *Pseudomonas aeruginosa in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31(10): 1514–1518.
- 9) Ho, S. W., D. Jung, J. R. Calhoun, et al. 2008. Effect of divalent cations on the structure of the antibiotic daptomycin. *Eur. Biophys. J.* 37(4): 421–433.
- 10) Barry, A. L., P. C. Fuchs, S. D. Brown. 2001. *In vitro* activities of daptomycin against 2,789 clinical isolates from 11 North American medical centers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(6): 1919–1922.
- 11) Huang, M. B., T. E. Gay, C. N. Baker, S. N. Banerjee, F. C. Tenover. 1993. Two percent sodium chloride is required for susceptibility testing of staphylococci with oxacillin when using agar-based dilution methods. *J. Clin. Microbiol.* 31(10): 2683–2688.

Influence of Cation Supplements on Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*

Tetsuo Yamaguchi,¹⁾ Hiroyuki Tojo,²⁾ Katsumi Chiba,³⁾ Tetsuya Matsumoto¹⁾

¹⁾ Department of Microbiology, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan

²⁾ Microbiology group, Eiken Chemical Co., Ltd., Tochigi, Japan

³⁾ Department of Microbiology Laboratory, Tokyo Medical University Hospital, Tokyo, Japan

The purpose of this study was to examine the influence of calcium (Ca²⁺) concentration on *in vitro* activity of oxacillin (MPIPC) using various concentrations of Ca²⁺ (3.5–50 mg/L) against *Staphylococcus aureus* clinical isolates. The activity of MPIPC was compared with the activities of 17 other agents against 50 strains of methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) and 40 strains of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) which were isolated at microbiology laboratory of Tokyo Medical University Hospital. Susceptibility testing was performed by the CLSI broth microdilution method, with

one exception: Mueller–Hinton Broth (MHB) was supplemented to various levels of Ca^{2+} . All MRSA isolates showed increase in MICs of MIPIC when Cation-adjusted MHB (CAMHB, Ca^{2+} : 25 mg/L) were used compared to the MICs of MHB. Similar results were observed with MSSA strains. Five of forty strains (12.5%) of *mecA*⁻ positive isolates have been diagnosed as MIPIC susceptible strains by using CAMHB, whereas all of the strains were adequately diagnosed as MIPIC resistant strains by using the modified-CAMRSA (Ca^{2+} : 50 mg/L). Increases of MICs against MIPIC by adding Ca^{2+} to the media were observed in a dose-dependent manner. These results suggest that accurate detection of MIPIC resistance would have failed if we use MHB with lower concentration of Ca^{2+} .