

[原 著]

## チミジン依存性 Small colony variants Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* の 発育を可能にした改良クロモアガー MRSA スクリーン培地の性能評価と 各種 MRSA 選択培地の比較検討

西尾美津留・宮木祐輝・小川有里子・大杉崇人  
小牧市民病院臨床検査科

(平成 29 年 5 月 22 日受付, 平成 29 年 7 月 18 日受理)

Small colony variant (SCVs) は、非典型的なコロニー所見を示し、発育が遅いため検出に時間を要す。生化学的性状もしばしば野生型株と比べ減弱しているため、臨床微生物検査の現場で数多くの SCVs が見逃されていることが推測される。Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 選択培地であるクロモアガー MRSA スクリーン培地 (改良クロモ, 関東化学) は、チミジン依存性 SCVs-MRSA の発育が可能となるよう培地処方改良された。改良クロモと他 7 種の MRSA 選択培地において SCVs-MRSA 3 株の発育性能を比較した結果、3 株全て改良クロモにのみ発育が可能であった。Miles & Misra 法による MRSA 発育支持能試験では、改良クロモにおいて、SCVs-MRSA と通常の MRSA は同一の希釈倍率まで発育が認められており、改良クロモでは SCVs-MRSA であっても通常の MRSA に劣ることなく発育することが示された。臨床検体 150 件を用いた評価においても、改良クロモの感度/特異度/陽性的中率/陰性的中率は、推奨培養時間である 24 時間判定で 100%/100%/100%/100% であり、臨床検体における MRSA 検出の有用性が示された。改良クロモを用いる事により、SCVs-MRSA が今後容易に検出されることが期待出来る。

**Key words:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), thymidine-dependent Small colony variant (SCVs) : TD-SCVs (チミジン依存性小型集落変種), クロモアガー MRSA スクリーン培地, MRSA 選択培地

### 1 序文

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は、我が国では 1980 年代から増加し始め、現在に至っても重要な院内感染起炎菌のひとつである<sup>1)2)</sup>。MRSA はときに肺炎、術後感染症、敗血症など重篤な感染症を引き起こし、抗菌薬治療が必要となる。MRSA は多系統の抗菌薬に耐性を示すことが特徴であるため、感染症治療には適切な抗菌薬を迅速に投与する必要が

ある。そのため臨床微生物学的検査において、可能な限り速やかに MRSA を検出する事が求められ、それゆえ多くの臨床微生物学的検査室では MRSA 選択培地が頻用されている。

近年では持続性、再発性の *S. aureus* においては、抗菌薬の長期投与によりコロニーの極小化、発育の遅延などを示す Small colony variant (SCVs) を形成することが報告されている<sup>3)4)</sup>。SCVs は、その発育の遅さから検出に時間を要し、生化学的性状もしばしば野生型株と比べ減弱しているため、見落としや誤同定につながりやすい<sup>5)</sup>。SCVs はチミジンなどを要求する栄養要求性変異株の性状を示し、その出現は ST 合剤による治療に関連する事も報告されている<sup>6)</sup>。SCVs-MRSA は、MRSA 選択培地に発育しないものもあることから<sup>7)</sup>、臨床微生物検査の現場で数多くの SCVs-MRSA が見逃されていることが推測される。

---

著者連絡先：(〒485-8520) 愛知県小牧市常普請 1 丁目 20 番地  
小牧市民病院臨床検査科  
西尾美津留  
TEL: 0568-76-4131 (内線 2262)  
FAX: 0568-76-4145  
E-mail: komakihp240@gmail.com

Table 1. Classification of Specimen

Sputum	59
Bronchoalveolar Lavage	1
Pleural effusion	1
Puncture fluid	1
Blood culture	14
Swab	
Stool	25
Throat	32
Nasal cavity	7
Cheek	1
Pus	5
Skin	2
Pressure sore	2
Total	150

2017年3月よりクロモアガー MRSA スクリーン培地（関東化学）は、チミジン依存性 SCVs-MRSA の発育が可能となるよう培地処方改良された。今回我々は、改良クロモアガー MRSA スクリーン培地（以下改良クロモ）を使用し、チミジン依存性 SCVs-MRSA の発育性能ならびに日常検査への有用性を他の MRSA 選択培地と比較検討し、その有用性に関する知見を得たので報告する。

## II 材料・方法

### 1. 基礎的検討

#### 1) 各種 MRSA 選択培地における SCVs-MRSA 発育性能確認試験

供試菌株

臨床分離株：SCVs-MRSA3 株, MRSA2 株

Methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) 2 株

標準菌株：MSSA (ATCC29213) 1 株, MRSA (ATCC43300) 1 株

臨床分離株は当院微生物検査室にて別患者より分離された株であり、MALDI Biotyper（ブルカー・ダルトニクス株式会社）にて *S. aureus* と同定、スライドラテックス凝集反応による Penicillin-binding protein 2' (PBP2') 検出用キット MRSA-LA「生研」（デンカ生研）にて PBP2' 陽性が確認された株を用いた。また SCVs-MRSA3 株は、ミュラーヒントン培地（以下 MH 培地）全面に塗布し、100 µg チミジン含有ディスクを置いて 35°C、好気条件下にて 48 時間培養後にディスクの周囲にのみ発育を認め、チミジン依存性の SCVs-MRSA であることが確認された 3 株を用いた (Fig. 1)。

対象菌を滅菌生理食塩水で濁度計（MicroScan Turbidity Meter, ベックマンコールター）を用いて McFarland0.5 に調整し、培地に画線塗抹し、35°C 好気培養にて 24 時間、48 時間培養後、発育の有無を確認した。

検討対象培地は、改良クロモ、改良前のクロモアガー MRSA スクリーン培地（関東化学）、BD クロムアガー MRSAII 寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン、以下 BD クロム）、chromID MRSA (Sysmex bioMerieux)、MDRS-CI 寒天培地（極東製薬、以下 MDRS-CI）の 5 種の chromogenic media（発色酵素基質培地）と、ポアメディア MRSA 分離培地 II（栄研化学、以下ポアメディア）、MDRS-K 寒天培地（極東製薬）、MS-CFX 寒天培地（日水製薬）の 3 種のマンニット卵黄ベース選択培地を使用した。

#### 2) Miles & Misra 法による検討培地の MRSA 発育支持能試験

供試菌株

臨床分離株：SCVs-MRSA3 株, MRSA2 株

標準菌株：MRSA (ATCC43300) 1 株

検討対象培地は、改良クロモの他に、当院で日常検査において使用している chromogenic media である BD クロムと、マンニット卵黄ベース選択培地の市場において占有率が高いポアメディアの 3 種の選択培地を用いて MRSA 発育支持能試験を行った。菌液は、滅菌生理食塩水で濁度計を用いて McFarland0.5 に調整し、その後  $10^{-1}$  から  $10^{-7}$  まで段階希釈した。各菌株の菌液希釈系列より 20 µL ずつを 3 種の選択培地に滴下し、35°C 好気培養にて 24 時間、48 時間培養後、発育したコロニー数を確認した。

### 2. 臨床検体における検討

#### 1) 対象検体と比較検討培地

2016年1月の1ヶ月間に当院微生物検査室にて提出された臨床検体 150 検体を対象とした。

検体種別の内訳を Table 1 に示す。

改良クロモの他に、BD クロム、ポアメディアの 3 種の選択培地を用いて臨床材料からの MRSA 検出における有用性を比較検討した。

#### 2) 臨床検体の培地接種と培養

液状検体は、10 µL 白金耳にて、それぞれの培地に画線塗抹を実施した。

喀痰は、喀痰溶解剤で溶解処理後、10 µL 白金耳にてそれぞれの培地に画線塗抹を実施した。

スワブ採取検体は、300 µL の滅菌生理食塩水含有の 15 mL 滅菌試験管にスワブを挿入し、ボルテックスにて 10 秒間攪拌後に得られた懸濁液を検査材料と

Table 2. Comparison of various MRSA culture medium test results with detection of SCVs-MRSA

	Improved CHRO-Magaer MRSA		CHRO-Magaer MRSA		BD CHRO-Magaer MRSA II		chromID MRSA		MDRS-CI		Pourmedia MRSA II		MDRS-K		MS-CFX	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Clinical Isolate TDs SCVs MRSA 1	+	+	-	-	-	-	-	-	-※	-※	-※	-※	-	-	-※	-※
Clinical Isolate TDs SCVs MRSA 2	+	+	-	-	-	-	-	-	-※	-※	-※	-※	-	-	-	-※
Clinical Isolate TDs SCVs MRSA 3	+	+	-	-	-	-	-	-	-※	-※	-	-	-	-	-	-
Clinical Isolate MRSA 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Clinical Isolate MRSA 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Type strain MRSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Clinical Isolate MSSA 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Isolate MSSA 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type strain MSSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

※Microcolony growth which are not MRSA-like colonies.

した。それぞれの培地にピペットを用いて 30  $\mu$ L ずつ滴下し、画線培養を行った。塗抹した培地は 35°C 好気条件下で 24 時間、48 時間培養した。

### 3) MRSA 確認試験

培養 24 時間もしくは 48 時間後に検討培地上に発育した MRSA 様コロニーについては、MALDI Biotyper にて *S. aureus* であることを確認し、Microscan Walk Away 96Plus (ベックマンコールター) にて Pos ComboPanel 3.1J を用いた薬剤感受性試験を実施することにより、MRSA か否かを同定した。(複数の選択培地より *S. aureus* が分離された場合は、全ての株で MALDI Biotyper による菌同定は実施したが、Microscan パネルを用いた薬剤感受性試験はそれらのうち 1 株を対象に実施した)。菌液調整はプロンプト法により行い、MRSA の判定は CLSI の基準 (oxacillin  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  and/or cefoxitin  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ )<sup>8)</sup> に従った。

### 4) 検討培地の MRSA 検出成績の比較法

48 時間培養後の判定において検討培地のいずれか 1 つでも MRSA が検出された検体を MRSA 陽性検体、いずれの培地でも MRSA が検出されなかった検体を MRSA 陰性検体と定義し、3 種の各培地における sensitivity/specicity/positive predictive value (PPV) /negative predictive value (NPV) を求めた。MRSA 様コロニーが発育したが MALDI Biotyper による同定検査により MRSA 以外であることが判明し

た場合を該当培地の偽陽性、他の MRSA スクリーニング培地にのみ MRSA が発育した場合を該当培地の偽陰性と定義した。

### 5) MRSA 以外の菌の発育確認

培養 24 時間もしくは 48 時間後に 3 種の選択培地上に発育した MRSA 以外のコロニーについて MALDI Biotyper にて菌同定を実施した。

## III 結果

### 1. 基礎的検討結果

1) 各種 MRSA 選択培地における SCVs-MRSA 発育性能確認試験結果  
結果を Table 2 に示す。

MSSA は、臨床分離株、標準菌株ともにすべての選択培地にて発育抑制された。通常の MRSA は、臨床分離株、標準菌株ともに 24 時間培養の時点で、すべての選択培地にて MRSA と判別可能なコロニーの発育を認めた。コロニー判別能、コロニーサイズに差は認められなかった。SCVs-MRSA3 株については、改良クロモのみ MRSA と同等なコロニー形態での発育を示した。一部の培地にて微小コロニーの発育を認めた選択培地もあったが、いずれも Fig. 2 に示すような無色透明の微小コロニーであり、MRSA と判別可能なコロニーではなかった。

Table 3. MRSA growth ability results by the Miles &amp; Misra method

	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood							
Clinical Isolate SCVs MRSA 1	>100	>100	>100	14	1	0	0
Clinical Isolate SCVs MRSA 2	>100	>100	47	2	1	0	0
Clinical Isolate SCVs MRSA 3	>100	>100	>100	19	0	0	0
Clinical Isolate MRSA 1	>100	>100	>100	15	2	0	0
Clinical Isolate MRSA 2	>100	>100	>100	56	5	0	0
Type strain MRSA	>100	>100	>100	45	3	0	0
Improved CHROMagaer MRSA							
Clinical Isolate SCVs MRSA 1	>100	>100	>100	5	2	0	0
Clinical Isolate SCVs MRSA 2	>100	>100	76	11	0	0	0
Clinical Isolate SCVs MRSA 3	>100	>100	87	13	0	0	0
Clinical Isolate MRSA 1	>100	>100	>100	12	0	0	0
Clinical Isolate MRSA 2	>100	>100	>100	46	2	0	0
Type strain MRSA	>100	>100	>100	43	2	0	0
BD CHROMagaer MRSA II							
Clinical Isolate SCVs MRSA 1	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Isolate SCVs MRSA 2	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Isolate SCVs MRSA 3	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Isolate MRSA 1	>100	>100	>100	13	1	0	0
Clinical Isolate MRSA 2	>100	>100	>100	40	2	0	0
Type strain MRSA	>100	>100	>100	19	4	0	0
Pourmedia MRSaII							
Clinical Isolate SCVs MRSA 1	>100*	>100*	>100*	7*	0	0	0
Clinical Isolate SCVs MRSA 2	>100*	>100*	78*	4*	0	0	0
Clinical Isolate SCVs MRSA 3	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Isolate MRSA 1	>100	>100	>100	20	0	0	0
Clinical Isolate MRSA 2	>100	>100	>100	70	5	1	0
Type strain MRSA	>100	>100	>100	30	3	0	0

\*Microcolony growth which are not MRSA-like colonies.

## 2) Miles & Misra 法による検討培地の MRSA 発育支持能結果

試験株の培養結果を Table 3 に示す。

いずれの菌株についても 24 時間と 48 時間培養で変化はなかった。通常の MRSA に関しては、いずれの培地もほぼ同一の希釈倍率まで発育を認め、同等の発育支持能であった。改良クロモのみ発育が認められた SCVs-MRSA3 株では、通常の MRSA とほぼ同一の 10<sup>-4</sup>~10<sup>-5</sup> 希釈倍率まで発育が認められた。改良クロモにおいては、SCVs-MRSA 株であっても通常の MRSA に劣ることなく発育可能であることが示された。

## 2. 臨床検体における検討結果

1) 24 時間判定における 3 培地の MRSA 検出能の比較成績 (Table 4)

MRSA 陽性検体は全部で 22 検体あった。SCVs-MRSA の発育はいずれの培地においても認められなかった。24 時間判定では、MRSA が 22 検体中、改良クロモ、BD クロム、ポアメディア、それぞれの MRSA 陽性検体数は 22 検体、21 検体、16 検体であり、感度はそれぞれ 100%、95.5%、72.7% であった。一方 MRSA 陰性全 128 検体は、3 種の培地ですべて正しく MRSA 陰性と判定され特異度 100% であった。

2) 48 時間判定における 3 培地の MRSA 検出能の比較成績 (Table 4)

48 時間判定では、改良クロモ、BD クロム、ポアメディアそれぞれの MRSA 陽性検体数は 22 検体、22

Table 4. Comparison results of the MRSA detectability of 3 culture media

Culture medium		MRSA Positive	MRSA Negative	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive predictive value (%)	Negative predictive value (%)
24h	Improved CHRO-Magaer MRSA	Positive	22	100	100	100	100
		Negative	0				
	BD CHROMagaer MRSA II	Positive	21	95.5	100	100	99.2
		Negative	1				
	Pourmedia MRSA II	Positive	16	72.7	100	100	95.6
		Negative	6				
48h	Improved CHRO-Magaer MRSA	Positive	22	100	97.7	88	100
		Negative	0				
	BD CHROMagaer MRSA II	Positive	22	100	99.2	95.7	100
		Negative	0				
	Pourmedia MRSA II	Positive	19	86.4	100	100	97.7
		Negative	3				

Table 5. Comparison of 3 culture media test results with detection of bacteria other than MRSA among 122 specimens

	Improved CHROMagaer MRSA		BD CHROMagaer MRSA II		Pourmedia MRSA II	
	24h (n = 51)	48h (n = 72)	24h (n = 35)	48h (n = 54)	24h (n = 42)	48h (n = 63)
Coagulase negative Staphylococci	30	42	27	35	27	42
<i>Corynebacterium sp.</i>	23	32	10	25	16	25
<i>Enterococcus sp.</i>	4	6	0	0	4	4
<i>Kocuria kristinae</i>	1	3	0	0	0	0
<i>Brevibacterium celer</i>	0	1	0	0	0	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	1	0	0	0	0
Total number of isolated organisms	58	85	37	60	47	71

検体、19 検体であり、BD クロム、ポアメディアにて 1 検体、3 検体増加した。48 時間判定における改良クロモ、BD クロム、ポアメディアそれぞれの MRSA 陰性検体数は 125 検体、127 検体、128 検体であり、ポアメディアは 24 時間判定と同様であったが、改良クロモ、BD クロムではそれぞれ 3 検体および 1 検体減少した。すなわち MRSA 様コロニーであったが、MALDI Biotyper による同定検査で MRSA 以外であることが判明した偽陽性検体が、改良クロモにおいて 3 検体、BD クロムにおいて 1 検体あった。

3) chromogenic media 間で MRSA 検出に差が認められた検出株の解析結果

24 時間培養にて改良クロモ、BD クロム間で MRSA 検出に乖離が認められた検体は 1 検体あった。この培地間の結果の乖離が、検出株または培地性能に由来するものなのか否かを評価するため、結果の乖離した株

の 3 培地における発育性を確認した。

分離培養後の菌株を  $1.0 \sim 1.5 \times 10^8$  CFU/mL、 $1.0 \sim 1.5 \times 10^5$  CFU/mL、 $1.0 \sim 1.5 \times 10^4$  CFU/mL に調整し、3 培地に 20  $\mu$ L ずつ接種したところ、すべての培地に良好に発育し、典型的な MRSA 様コロニーを呈した。

4) 3 培地における MRSA 以外の菌の発育状況

MRSA 以外の菌が発育した検体数と株数、菌種内訳をそれぞれ Table 5 に示す。24 時間培養で、改良クロモでは 51 検体から 58 株の夾雑菌を検出、BD クロムでは 35 検体から 37 株、ポアメディアでは 42 検体から 47 株を検出した。48 時間培養においては、改良クロモでは 72 検体から 85 株、BD クロムでは 54 検体から 60 株、ポアメディアでは 63 検体から 71 株を検出した。24 時間、48 時間培養のどちらにおいても、BD クロムが最も夾雑菌の発育検体数が少なかった。いずれの培地でも Coagulase negative Staphylo-

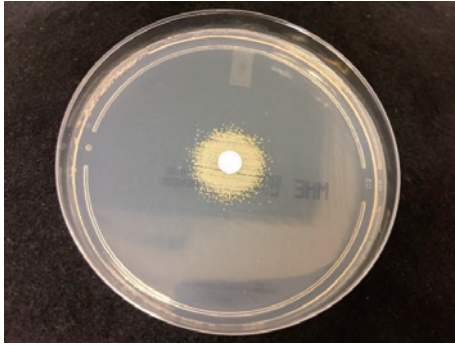


Fig. 1. Growth of the strain surrounding a thymidine-impregnated disk on Mueller-Hinton Agar

cocci や *Corynebacterium* sp.が多く、48 時間判定でより多く発育する傾向が認められた。改良クロモにおいては、他の2培地よりも発育菌種が多く、特に48時間培養で *Enterococcus* sp.の発育抑制ができていない点が目立った。

#### IV 考察

今回我々は、改良クロモアガー MRSA スクリーン培地のチミジン依存性 SCVs-MRSA の発育性能と日常検査への有用性評価を行った。

今回行った基礎的検討結果では SCVs-MRSA は、検討培地8種の中で唯一、改良クロモにのみ MRSA

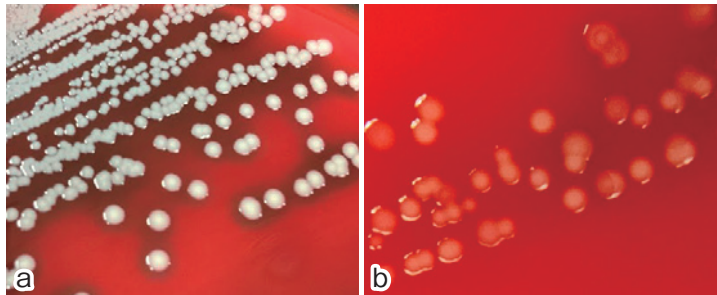


Fig. 2. Sheep Blood Agar that show the normal (a) and the small colony variant (b) phenotype of *S. aureus* are shown

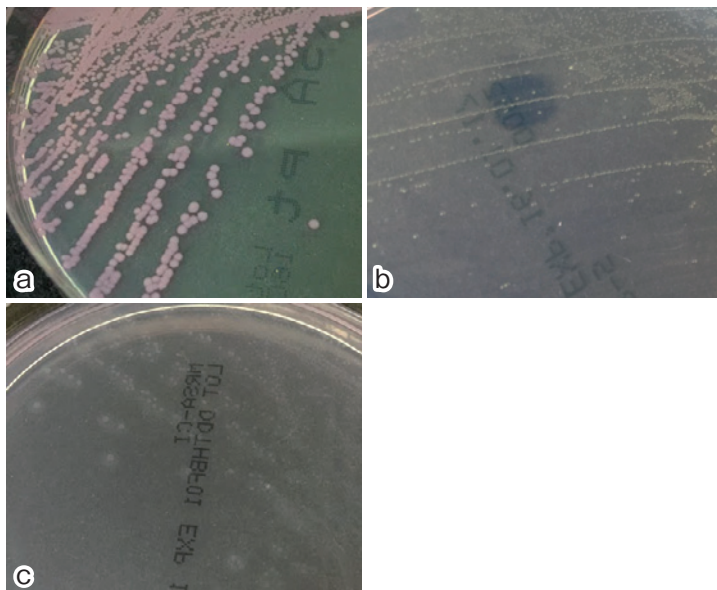


Fig. 3. SCVs-MRSA colonies of each culture medium

- a: Improved CHROMagar MRSA
- b: Pourmedia MRSA II
- c: MDRS-CI

と判別可能なコロニーでの発育が認められた。また、Miles & Misra 法による MRSA 発育支持能結果では、改良クロモにおいて SCVs-MRSA は、通常の MRSA とまったくの区別なく発育可能なことが示された。チミジン依存性 SCVs-MRSA は、チミジン合成に重要なチミジル酸シンターゼが不活性となり菌体内でのチミジン合成が行えないため、外界からチミジンを取り込まなければ DNA 合成出来ず、複製が行えない。そのためチミジンを含まない培地では発育が困難となる<sup>3)</sup>。今回の結果より、改良クロモ以外の MRSA 選択培地は、チミジン依存性 SCVs-MRSA が発育するために十分量のチミジンを含まない培地組成であり、それゆえチミジン依存性 SCVs-MRSA は改良クロモのみに典型的な MRSA コロニー所見で発育可能であったと考える。改良クロモ以外にも Fig. 3 に示すような非典型的なコロニーの発育を認めた培地もあったが、MRSA と判定する事は不可能なコロニー所見であるため、チミジン依存性 SCVs-MRSA の検出に有用ではないと考える。臨床検体より SCVs の検出自体が稀少なため、今回検討可能であった SCVs-MRSA は 3 株のみであったが、今後さらなる検討を重ねる必要があると考える。

臨床検体において、改良クロモの培地メーカー推奨時間である 24 時間培養の sensitivity/specicity/PPV/NPV は、すべて 100% と良好な結果が得られた。24 時間培養において、改良クロモと BD クロムでは 1 検体結果の乖離が認められたが、これは菌量が少ないことによる再現性の問題であると推測される。また、改良クロモとポアメディアでは 24 時間培養において 6 検体、48 時間培養において 3 検体の結果の乖離が認められた。ポアメディアはマンニト分解性や卵黄反応の有無により MRSA を推測する培地であるが、これらの性状が減弱もしくは欠損した場合、MRSA と判定困難となる。このような株が存在したことが、今回結果が乖離した要因と考える。改良クロモの MRSA 検出能は、他の MRSA 選択培地に比べ、同等、もしくは優れていると言える。48 時間培養することで specificity は 97.7%、PPV は 88.0% と低下したが、これは夾雑菌が MRSA か否か判別に迷う藤色コロニーを呈した事によるもので、BD クロムにおいても同様の傾向が認められており、発色酵素基質培地の特性と思われた。メーカー推奨時間を遵守しながら MRSA 選択培地を使用していく事が誤判定を避ける上で非常に重要だと考える。

臨床検体における改良クロモの夾雑菌抑制能は、夾雑菌発育菌数、発育菌数種のどちらにおいても他の 2

培地に比べ劣る結果となった。しかし MRSA 検出能は優れており、また何よりも SCVs-MRSA 検出能力が優れていることから、非常に有用な培地であると考えられる。

SCVs-*S. aureus* の菌種同定は、従来から行われてきた生化学的性状に基づいた同定検査方法では菌種同定に至らない可能性が高く、誤判定や見逃しの危険性については予めから指摘されてきた<sup>5)</sup>。しかし近年ヨーロッパを中心に多くの施設で導入されている<sup>9)</sup>マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI TOF MS) を用いることで、SCVs-*S. aureus* の菌種同定を的確に行えることを太田らは示している<sup>10)</sup>。また、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) が推奨する MH 培地<sup>8)</sup>は、トリメトプリムやスルホンアミドとの拮抗作用を回避するためにチミジン濃度を下げた培地であり、そのためチミジン依存性 SCVs は MH 培地には発育せず<sup>11)</sup>、CLSI 勧告法に準拠した方法では薬剤感受性検査は実施できないため、薬剤感受性試験結果より SCVs-*S. aureus* が MRSA か否かを判別することは困難であるが、改良クロモにより MRSA 様のコロニーが発育した場合、MRSA である可能性を疑い *mecA* や *PBP2'* を検出するなど、薬剤感受性試験以外の方法で MRSA を特定する糸口となる。

実際我々は、ST 合剤が定期的に内服されていた反復性誤嚥性肺炎患者の喀痰検体より、改良クロモを用いることで SCVs-MRSA を検出し得た症例を経験している。本症例の喀痰検体からは、口腔内常在菌の発育を非常に多く認めており、血液寒天培地やチョコレート寒天培地では *Staphylococci* の発育を疑っていたが、改良クロモに MRSA 様コロニーが発育したことで MRSA の検出に至っており、治療上、また感染対策上、大過なきを得た。

今後 SCVs-*S. aureus* の出現は、長期の化学療法患者や持続、再発感染者などの増加に伴い、さらに高まることが予測される。臨床検体の培養検査に改良クロモを用いることで、通常の MRSA だけでなく、チミジン依存性 SCVs-MRSA をも的確に発育させ、MALDI TOF MS による同定検査を実施することで、臨床微生物検査の現場において見落とし、同定に難渋してきたチミジン依存性 SCVs-MRSA が容易に検出・同定されることが期待出来る。

謝辞：本論文作成にあたり貴重なご助言を賜りました名古屋大学医学部附属病院 中央感染制御部 森岡悠先生に深謝いたします。

利益相反：申告すべき利益相反なし。

## 文 献

- 1) 後藤 元, 後藤美江子, 岡 慎一, 他. 1989. 本邦における多剤耐性黄色ブドウ球菌の現状. CHEMOTHERAPY 37: 1334-1341.
- 2) 伊藤輝代, 平松啓一. 1997. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の耐性遺伝子とその多様性. 日本臨床 55 (5): 188-193.
- 3) Proctor, RA, C von Eiff, BC Kahl, et al. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat Rev Microbiol 4 (4): 295-305.
- 4) 松本竹久, 堀内一樹, 根岸達哉. 2016. *Staphylococcus aureus* の small colony variants. 日臨微誌 26 (1): 1-10.
- 5) Melter, O, B Radojevic. 2010. Small colony variants of *Staphylococcus aureus* —review. Folia Microbiol (Praha) 55 (6): 548-558.
- 6) Besier, S, J Zander, E Siegel, et al. 2008. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants: human pathogens that are relevant not only in cases of cystic fibrosis lung disease. J Clin Microbiol 6 (11): 3829-3832.
- 7) Horiuchi, K, T Matsumoto, Y Ota, et al. 2015. Addition of thymidine to culture media for accurate examination of thymidine-dependent small-colony variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a pilot study. J Microbiol Methods 110: 40-44.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27th informational supplement CLSI M100-S27. CLSI.
- 9) Wieser, A, L Schneider, J Jung, et al. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). Appl Microbiol Biotechnol 93: 965-974.
- 10) 太田悠介, 松本竹久, 菅野光俊, 他. 2015. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry による *Staphylococcus aureus* Thymidine-Dependent Small-Colony Variants を対象とした同定性能の検討. 臨床病理 63 (6): 683-687.
- 11) Gilligan, PH, PA Gage, DF Welch, et al. 1987. Prevalence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 25 (7): 1258-1261.

## Evaluation of improved CHROMagar MRSA chromogenic media in the detection of thymidine-dependent small colony variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Mitsuru Nishio, Yuki Miyaki, Yuriko Ogawa, Takato Osugi  
Department of Clinical Laboratory, Komaki City Hospital

Small colony variants (SCVs) constitute a slow-growing subpopulation of bacteria with distinctive phenotypic and pathogenic traits. Phenotypically, SCVs have a typical colony morphology and unusual biochemical characteristics. Therefore, it is difficult to detect and identify SCVs. A composition of the culture media of the CHROMagar MRSA was improved so as to facilitate the growth of thymidine-dependent SCVs-MRSA. We compared the growth performance of the SCVs-MRSA3 strain in eight kinds of culture media. We found that MRSA could grow only on improved CHROMagar MRSA (improved CHROM). The MRSA growth ability was assessed using the Miles & Misra method, and the results showed that the SCVs and normal MRSA grew to similar dilution ratio on improved CHROM. We also evaluated improved CHROM using 150 clinical specimens. After 24 h of incubation, the sensitivity, specificity, positive predictive values, and negative predictive values were all found to be 100%. The MRSA detection of improved CHROM was useful in clinical specimens. We conclude that SCVs-MRSA can be easily detected using improved CHROM.