

[総 説]

臨床細菌検査で問題になる Small-colony variants

松本竹久

群馬大学大学院保健学研究科生体情報検査科学

(令和5年01月18日受付)

Small-colony variants (SCVs) は、独特の表現型を持つ増殖の遅い細菌の亜集団である。SCVs は増殖速度が遅く、非典型的なコロニー形態と特異な生化学的特性を有しており、臨床細菌検査での同定検査や薬剤感受性検査で正しい結果を得ることが困難になることがある。また、SCVs は野生型に比べ宿主細胞内に定着しやすく、抗生物質に対する感受性が低下することなどで慢性感染症や再発性感染症を引き起こすことがあるとされている。近年においても、様々な SCVs 感染症が報告されており、その表現型に至る遺伝子変異が明らかになってきたチミジン依存性やヘミン依存性 SCVs に加えて、炭酸ガス依存性やグルタミン依存性 SCVs についても原因となる遺伝子変異が明らかになってきた。さらに薬剤耐性 SCVs も出現しており、検査室では薬剤耐性を見逃さないように注意しなくてはならない。

本総説では、臨床検体から分離される主な SCVs に関連する表現型や原因、細菌検査に関する事項について解説する。

Key words: small-colony variants, SCVs, チミジル酸生合成欠損型 SCVs, 電子伝達系欠損型 SCVs, 炭酸ガス依存性 SCVs

はじめに

Small-colony variants (SCVs) は、1910 年に *Salmonella enterica* serovar Typhi の異常型として初めて報告された¹⁾。SCV の最も顕著な特徴は、その名が示すように野生型細菌が形成するコロニーの 1/10 程度の大きさのコロニーを形成することである(図 1)。コロニーが小型になる理由は、SCV 内の何らかの代謝経路等の異常が原因となり、発育に必要な化合物等を合成できないため菌体外から取り込むなどして代謝系への供給が遅れ、SCVs の増殖速度が遅くなるからである。*S. enterica* serovar Typhi の SCV が報告されて以来、黄色ブドウ球菌²⁾³⁾や腸内細菌目細菌^{4)~7)}、ブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌^{8)~11)}、淋菌¹²⁾などの様々な病原細菌での SCVs が報告されてきた。SCVs の形成は、細菌にとっての自然な生存戦略であると考えられており、骨や膿瘍、血液、呼吸器などの臨床検体から分離された SCVs について、病原性や持続感染に及ぼすメカニズムの解明を目指して研究が試みられている^{13)~15)}。

これまでの SCVs に関する研究では、SCVs の増殖速度が遅い原因の解明に焦点が当てられ、野生型の増殖速度にまで回復させる化合物等に対する栄養要求性を特定する研究が行われてきた。また SCVs 研究は主に *S. aureus* を対象に行われており、発育にメナジオンやヘミン、チアミン、不飽和脂肪酸、CO₂といった化合物の添加を必要とする SCVs の存

在についての報告がなされ¹⁶⁾、*S. aureus* SCVs の多くはメナジオンやヘミン、チアミンのいずれかの化合物で増殖が刺激されたことや、SCVs の細胞内での酸化的リン酸化能が野生株より低下していることなどが報告されてきた¹⁷⁾。メナジオンやヘミン、チアミン依存性 SCVs は、好気呼吸の際に生じる複数の代謝系の最終段階の反応系である電子伝達系の経路に異常が生じているため発育が不良になる¹⁶⁾。メナジオンは菌体内でキノン(メナキノン)とヘミンを生合成するため用いられ、チアミンはメナジオンの生合成に必要であり、いずれも電子伝達系に関わる重要な化合物である。電子伝達系に欠陥のある SCVs は、持続性や再発性感染、抗生物質耐性に関与することが示されており、臨床的に重要性が高い¹⁶⁾。また、近年 *S. aureus* 以外にも臨床検体から分離される腸内細菌目細菌や *P. aeruginosa* など、チミジン依存性やヘミン依存性、CO₂依存性、グルタミン依存性 SCVs に関する報告が散見されている^{6)7)11)18)~23)}。

本総説では、SCVs の臨床的重要性を網羅し、電子伝達系欠損型とチミジル酸生合成欠損型、炭酸ガス依存性 SCVs を中心に、その表現型や原因、関連する情報をまとめた。

SCVs の栄養要求性表現型

細菌には様々な代謝・生合成経路が存在しているが、臨床検体から分離される SCVs では限られた代謝・生合成経路で異常が認められており、主に電子伝達系(ヘミン生合成とメナジオン生合成)とチミジル酸生合成の2つの経路に異常が認められている(図2)。電子伝達系欠損型 SCVs は、メナジオンまたはヘミンの生合成を欠損しているため、培地からメナジオンやヘミンを取り込むことで発育性を補うことができる。一方、チミジル酸生合成欠損型 SCVs は、チミジル酸

著者連絡先：〒371-8514 群馬県前橋市昭和町 3-39-22
群馬大学大学院保健学研究科生体情報検査科学
松本竹久
TEL: 027-220-8940
E-mail: tmatumoto@gunma-u.ac.jp

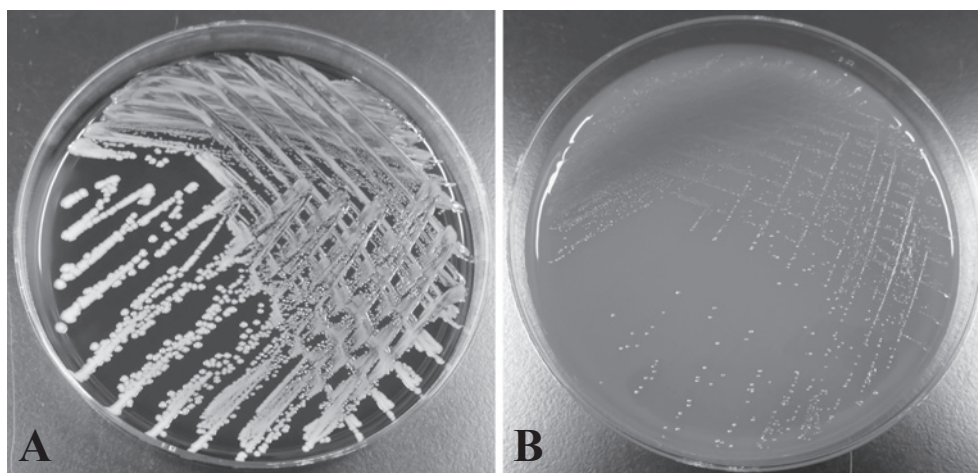


図1. Small-colony variants. ヒツジ血液寒天培地上に発育する *Staphylococcus aureus* の正常株 (A) と small-colony variant 株 (B)

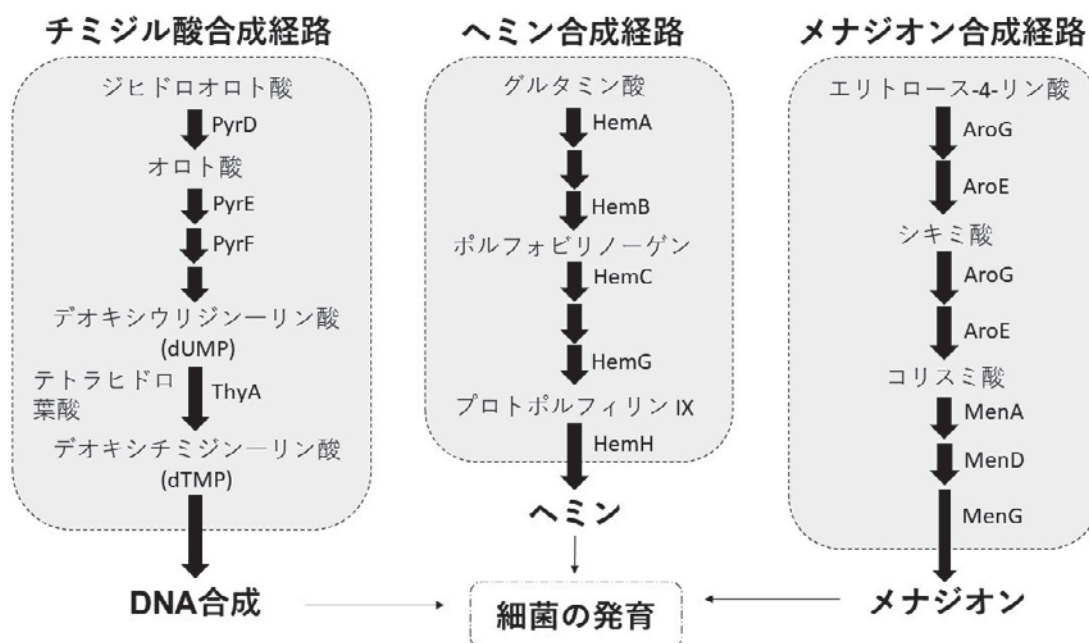


図2. Small-colony variant の形成に関与する3つの主な生合成経路

の生合成を欠損しているため、培地中のチミジンまたはチミジル酸を取り込むことにより発育が可能となる。図2に示す各生合成経路に関わる様々な酵素の内、代えがきかない役割をもつ酵素に異常が生じた場合、その生合成経路が遮断されてしまい、目的の化合物が生合成されなくなる。SCVsでは、このような特定の酵素をコードする遺伝子に変異が生じることで目的の化合物が生合成されなくなるが、菌体外の環境中からその化合物を取り込むことで発育が可能となる。培地などの菌体外の環境中に SCVs の発育に必要な化合物が量的に不足している、もしくは細胞外から取り込む速度が遅いことなどが原因で培地上で形成する SCVs のコロニーサイズが小さくなってしまふ。典型的な SCVs の表現型の特徴として、色素産生の低下や溶血活性の減少、アミノグリコシドやスルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST 合剤) の抗菌薬

に対する抵抗性の増加、および大小不同のコロニー形成などが知られている¹³⁾¹⁶⁾。*S. aureus* では、宿主細胞や組織内で正常な表現型から増殖の遅い SCV の表現型へのスイッチングが行われていると考えられている。選択圧のない状態で正常型の *S. aureus* を増殖させた際でも、わずかな数のゲンタマイシン耐性 SCV が発生していることが報告されている²⁴⁾。SCVs の出現は、細菌の正常な増殖サイクルの一部であり、抗生物質にさらされた場合、その集団全体が消滅してしまわないための保険となっているのかもしれない。

チミジル酸生合成欠損型 SCVs

チミジル酸生合成欠損型 SCVs とは、チミジル酸生合成に関わる遺伝子に異常が生じたことにより、チミジンおよびチミジル酸の生合成ができなくなり、チミジンもしくはチミジ

ル酸を菌体外から取り込むようになることで不足分を補填して発育する SCVs のことを指す (図 3)。この SCVs は一般的にチミジン依存性 SCVs と呼ばれており、これまでに臨床検体から *S. aureus* や *E. coli* など様々な菌種で報告されている⁶⁾²⁵⁾。

チミジン依存性 SCVs の重要な病原性制御因子や代謝・ストレス関連遺伝子の転写パターンは劇的に変化しており、*S. aureus* については α -ヘモリジンの発現量低下や protein A などの細胞壁関連タンパク質の発現量増加により、病原性は低いが持続性の高い表現型を持つとされている²⁶⁾。さらに、抗生物質やディフェンシンに対する耐性が高く¹³⁾²⁷⁾²⁸⁾、角化細胞や上皮・内皮細胞など様々な細胞内で生存することが報

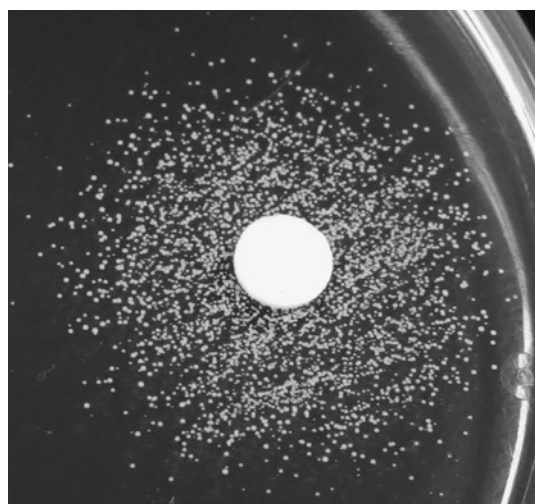


図 3. Small-colony variant に対する栄養要求試験ミューラーヒントン寒天培地上でチミジン添加ディスク周囲に形成されたコロニーを示す。

告されている²⁹⁾³⁰⁾。

臨床細菌検査で使用する各種培地の中で、ミューラーヒントン培地はチミジル酸含量を少なくした組成となっており、チミジン依存性 SCVs の発育が不良となる (図 4)。また、市販のチョコレート寒天培地では、実際の血液が含まれていないこともあり、チミジル酸があまり含まれていないため、チミジン依存性 SCVs の菌株によっては発育が不良になることがある。一方、宿主内ではチミジン依存性 *S. aureus* は感染巣の壊死細胞や膿から自身の DNase の活性などにより放出されるチミジンを回収していると考えられている。

臨床細菌検査では、チミジン依存性 SCVs は各種寒天培地でのコロニー形成が弱い特徴を有するが、中でもミューラーヒントン培地に発育しないため、薬剤感受性検査を実施した際に菌の発育不良となることで SCVs であると気付かれる。また、グラム染色所見でも正常な菌株の形態と異なり、大小異なる形態を示す特徴がある (図 5)。発育に十分なチミジンを培地に添加することで、大小異なる形態が正常化することから、大小不同の原因はチミジン不足による DNA 合成不全が細胞分裂などに影響を及ぼしているためと考えられる。

チミジン依存性 SCVs の発生のきっかけは、ST 合剤の長期投与と考えられている。ST 合剤の抗菌作用機序はテトラヒドロ葉酸合成の妨げである。チミジル酸合成酵素がデオキシウリジル酸からデオキシチミジル酸への変換を触媒する際、デオキシウリジル酸にメチル基が付与される。そのメチル基はチミジル酸合成酵素の補因子であるテトラヒドロ葉酸により供与される。要するに ST 合剤はテトラヒドロ葉酸の合成を妨げることににより、間接的に DNA の基になるチミジル酸の合成を妨げて抗菌的に作用する。チミジン依存性 SCVs に至る原因はチミジル酸合成酵素遺伝子にその活性が失われるような遺伝子変異が生じることによる。チミジル酸合成酵素の活性が失われることで菌体内でのチミジル酸の合成は停止してしまうが、菌体外からチミジンを取り込むようになりチ

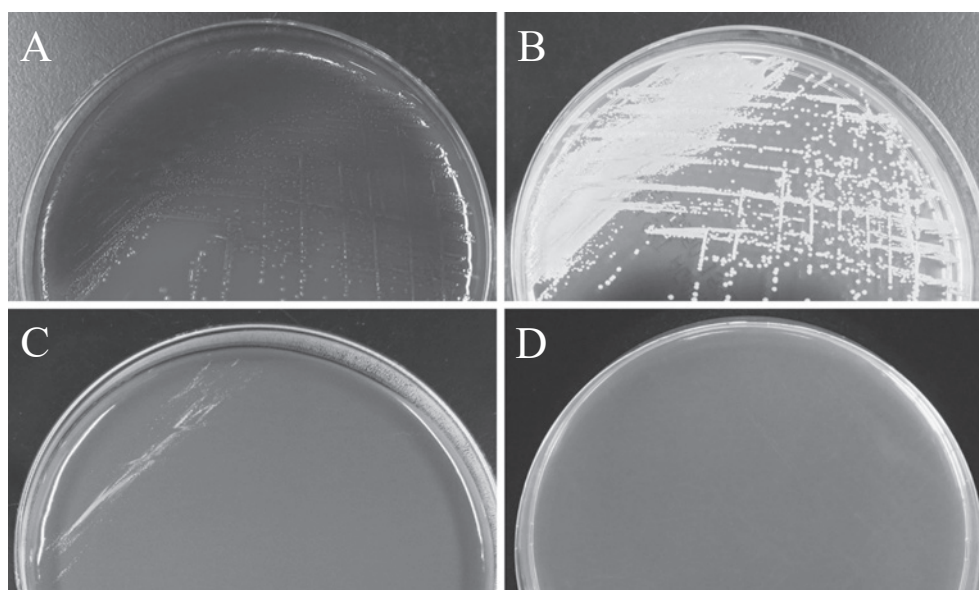


図 4. チミジン依存性 *Staphylococcus aureus* の各種培地への発育
ヒツジ血液寒天培地 (A), BTB 乳糖加寒天培地 (B), チョコレート寒天培地 (C), ミューラーヒントン寒天培地 (D)

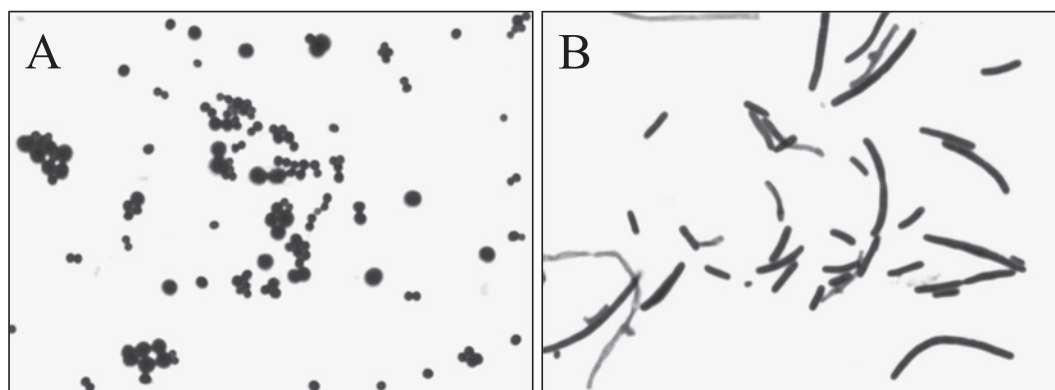


図5. チミジン依存性 small-colony variants のグラム染色像
チミジン依存性 *Staphylococcus aureus* (A) とチミジン依存性 *Escherichia coli* (B)

ミジル酸の合成が可能となり、また ST 合剤による抗菌作用を受けなくなる。つまり、臨床でのチミジン依存性 SCVs は、チミジル酸合成酵素に変異を有する SCVs が ST 合剤の長期使用により選択的に増殖して臨床検体から分離されている。このことを裏付ける研究が行われており、*S. aureus* を ST 合剤に晒すことでチミジン依存性 SCVs が生じることを実験的に確認している²⁵⁾。

電子伝達系欠損型 SCVs

電子伝達系とは、生物が好気呼吸を行う時に起こす複数の代謝系の最終段階の反応系である。電子伝達系欠損型 SCV は電子伝達系の経路に異常が生じることにより、好気条件下での発育が不良となる SCVs のことを指す¹³⁾。これまでに報告されている電子伝達系欠損型 SCVs では主にメナジオンとヘミンの生合成経路に異常を生じた SCVs が挙げられる。メナジオンはメナキノン生合成に用いられ、ヘミンはヘムとして電子伝達系に必須の役割を果たすチトクロムの補欠分子族であり、共に電子伝達系の構成要素である。また、メナジオン生合成にはチアミンが必要であることから、チアミン依存性 SCV はメナジオン依存性 SCV の亜型とされている。

メナジオンやヘミンはトリプトソイ培地やミュラーヒントン培地には豊富に含まれていないため、メナジオン依存性やヘミン依存性 SCVs は発育できないが、微小なコロニーでの発育性を示す。一方で血液が添加されている培地ではメナジオンやヘミンが供給されており、これらの SCVs は正常に近い発育性を示す³¹⁾。ミュラーヒントン培地に発育不良を示すため、これらの SCVs に対して薬剤感受性検査を実施しても辛うじて発育を確認できることもあるが、結果判定できない場合が多い。

臨床検体から検出される電子伝達系欠損型 SCVs は、メナジオン生合成経路もしくはヘム生合成経路に関わる酵素をコードする遺伝子に活性を低下させる変異が生じることで発生している。メナジオン依存性 SCVs の報告は *S. aureus* のみで報告されており³¹⁾、メナジオン生合成に関する *menB* や *menC*、*menE*、*menF* への変異が SCVs の原因であったことを報告している³²⁾³³⁾。ヘム依存性 SCVs については、*S. aureus* や *E. coli*、*P. aeruginosa*^{11)18)34)~36)} など様々な菌種で確認されているが、遺伝子解析を実施した報告は少なく、こ

れまでに *hemB* や *hemG* における変異のみが報告されている³⁷⁾。また、細菌における電子伝達系の欠陥が細胞内感染の持続性を促進することが *in vitro* で確認されており、再発性の感染症に関与していると考えられている³⁸⁾³⁹⁾。

電子伝達系欠損型 SCVs はアミノグリコシドやβ-ラクタム系抗菌薬に対して感受性が低下するとされている。アミノグリコシド系抗菌薬に対する感受性の低下は、細菌の膜電位の変化による抗菌薬の取り込みの低下が原因であること³⁸⁾⁴⁰⁾や、β-ラクタム系抗菌薬については、SCVs の発育が遅く分裂数が減ることが原因であることが示唆されている⁴¹⁾。臨床検体から電子伝達系欠損型 SCVs が分離される理由として、抗菌薬の投与による選択圧が原因と考えられてきたが、一方で、アミノグリコシド系抗生物質を投与されていない患者の検体からもメナキノン依存性やヘミン依存性 SCVs の分離が報告されている³⁵⁾。正常な細菌の発育は一過性の毒性レベルのヘムに晒されることにより発育が妨げられたものの、電子伝達系欠損型 SCVs では妨げられず発育することが実験的に確認されており、抗生物質による選択圧がない場合でも SCVs が出現することがあるとされている。

炭酸ガス依存性 SCVs

CO₂は細菌の発育における様々な代謝経路で産生されるが、一部の CO₂は細胞外へ放出されず、重炭酸イオン (HCO₃⁻) として細胞内に留まる。大気ガス環境下での細菌の発育に HCO₃⁻は必須であり、菌体内での脂肪酸の合成や pH の調整などに利用されている⁴²⁾。通常 *S. aureus* や腸内細菌目細菌では、自身で重炭酸イオンを供給することができるため大気ガス環境下でも発育可能であるが、大気ガス環境下では発育できず CO₂培養することで発育が可能となる *S. aureus*⁴³⁾⁴⁴⁾や腸内細菌目細菌⁷⁾²⁰⁾²²⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾の CO₂依存性 SCVs による感染症例が報告されている。

筆者らは、血液培養検体から分離された CO₂依存性 *E. coli* を用いて CO₂依存性となる原因機構を調べたところ、炭酸脱水素酵素をコードする *can* 遺伝子への変異が原因であることを突き止めた⁷⁾。炭酸脱水素酵素は細菌から真核生物まで様々な生物に存在し、CO₂と HCO₃⁻を相互変換する反応の触媒として作用する。細菌内での炭酸脱水素酵素は大気環境下で発育するために重要な役割を果たしており、炭酸脱水素

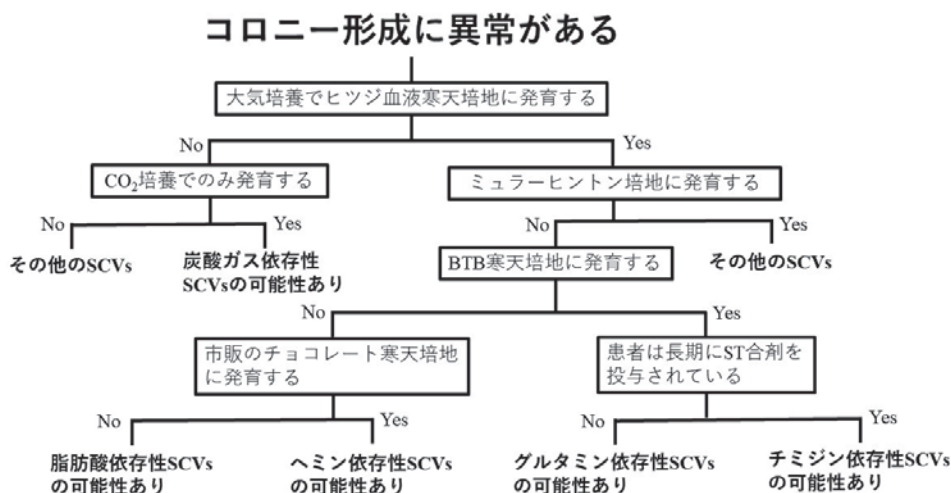


図6. 発育性から SCVs の原因を推定するフローチャート

酵素を欠失させた *E. coli* では大気環境下で発育することはできず、高濃度（5% 程度）の炭酸ガス環境下で培養しなければ発育することができない⁴⁷⁾。

一方で、*S. aureus* では炭酸脱水素酵素をコードする遺伝子の存在は確認されておらず、*E. coli* とは別の機構で菌体内に HCO_3^- を供給していることが明らかになった⁴⁸⁾。*S. aureus* では重炭酸イオントランスポーターである MpsAB が菌体内での HCO_3^- の供給に重要な役割を果たしている⁴⁹⁾。*mps* (membrane potential-generating system) A と *mpsB*, *mpsC* は *mps* オペロンとして存在し、MpsAB は Na^+ と HCO_3^- を輸送するトランスポーターとして機能していると考えられているが、MpsC の機能はまだわかっていない。炭酸脱水素酵素をコードする *can* 遺伝子をノックアウトした CO_2 依存性 *E. coli* に対して、*mpsAB* で補完すると大気環境下でも CO_2 依存性 *E. coli* を発育させることが確認されており、MpsAB は炭酸脱水素酵素と同様に菌体内での HCO_3^- の供給に重要な役割を担っていると考えられる⁴⁹⁾。

CO_2 依存性 SCVs になることで抗菌薬に対して耐性を示すようになることは、これまでに報告されていないが、 CO_2 依存性 *E. coli* を用いたマウスへの感染実験では宿主内で正常株よりも SCV 株の菌数が有意に増加したこと⁷⁾や、*mpsB* ノックアウト CO_2 依存性 *S. aureus* を用いた実験では、血清中の抗菌ペプチドに対する抵抗性が増加したことが報告されており⁵⁰⁾、今後、 CO_2 依存性の性状が及ぼす病原性や免疫への抵抗性についての影響が明らかになると考えられる。

臨床細菌検査においては、 CO_2 依存性 SCVs は大気環境下での培養で検出することができないため、検体のグラム染色所見で菌体が観察されたにも関わらず、大気培養で菌の発育が認められなかった場合には CO_2 ガス培養を実施するなどの考慮が検出に重要である。

SCVs の臨床細菌検査

臨床細菌検査において SCVs は発育の遅さからコロニーが小さく、生化学的反応の欠失もしくは低下していることがあり、正常な細菌と異なる点から見落としや誤同定につながり

やすい。培養検査で発育したコロニー形成に異常を感じた際に、発育性から各種 SCVs の可能性を考えるフローチャートを図6に示す。まだ原因が明らかになっていない SCVs が存在するが、臨床検体から分離される主な SCVs はこのフローチャートから推測できると考えている。フローチャートから推測された SCVs については、発育に必要と推測されるガス環境・化合物を用いて発育因子を確認する必要がある。また、ミュラーヒントン培地に発育不良を示す SCVs であった場合に薬剤感受性検査結果が得られず、治療抗菌薬の選択が困難になってしまうことや、感染対策が必要な薬剤耐性菌が見逃されてしまうことがある。現在、CLSI や EUCAST から SCVs に対する薬剤感受性検査法は提案されていないため、今後 SCVs に対する臨床検査法の確立が望まれる。

1) SCVs の同定検査

SCVs は発育不良や生化学的反応の欠落や低下から、生化学的性状に基づく同定検査では正しい同定結果が得られないことがある。筆者らは以前にチミジン依存性 SCVs について、API を用いた同定検査を実施したところ、半数以上は誤同定もしくは同定確率 80% 未満となる結果であったことを経験している。SCVs について生化学的性状による同定検査を実施した際には、結果の信頼性は低いことに注意する必要がある。一方で現在、同定検査に用いられている質量分析計 MALDI-TOF MS は SCVs の同定に優れた性能を有していると考えられる。筆者らはチミジン依存性 *S. aureus* SCVs に対する MALDI-TOF MS の同定性能を評価して、MALDI-TOF MS は高い同定性能を有していることを報告した⁵¹⁾。また、症例数は少ないがグラム陰性桿菌の SCVs についても MALDI-TOF MS により正しい同定結果が得られている⁷⁾¹¹⁾⁴⁵⁾。現在の日常検査における SCVs に対する同定検査法として、MALDI-TOF MS は簡便で精度の高い検査法と考えられる。

2) SCVs の薬剤感受性検査

多くの SCVs がミュラーヒントン培地に発育できないこともあり、臨床細菌検査で使用されている自動機器による薬剤感受性パネルでは、菌の発育不良により判定できないことが

ある。現在のところ CLSI や EUCAST において、SCVs についての薬剤感受性検査法は提案されていないが、ESBL 産生 *E. coli* の SCV 株の報告⁶⁾¹⁹⁾や、MRSA の SCVs 株といった薬剤耐性 SCVs の報告³⁾がなされている。SCVs が発育可能な培地を用いて ESBL や MBL などの β -ラクタマーゼ産生を確認することや、遺伝子検査などにより薬剤耐性因子の有無を調べる必要がある。チミジン依存性やメナジオン依存性、グルタミン依存性 SCVs であればヒツジ血液添加ミューラーヒントン寒天培地を用いてディスク検査法で検査を実施するか、CO₂依存性 SCVs であれば炭酸ガス環境下で検査を実施する、他には PCR 検査などの遺伝子検査による耐性遺伝子の検出を試みるなど、施設でやり易い方法で SCVs の耐性因子について確認を行っていただきたい。ただし、CLSI や EUCAST での手順に従わない薬剤感受性検査法で検査を行った場合、結果は参考値で臨床に報告することが望ましい。

また、これまでチミジン依存性 MRSA は MRSA のスクリーニング培地で検出することができなかったが、現在チミジン依存性 MRSA を検出できるように改良された日水プレート X-MRSA 寒天培地（日水製薬株式会社）とクロモアガー MRSA スクリーン培地（関東化学株式会社）が販売されており、チミジン依存性 MRSA の見逃しが減ることが期待される。一方でチミジン依存性 SCVs の ESBL 産生株については、市販の ESBL 産生菌のスクリーニング培地で検出できるか否かの検討は行われていない。今後、SCVs 株を用いたスクリーニング培地での発育性について確認する必要があり、発育に問題があるようであれば改良をご検討いただきたい。

おわりに

臨床検体から分離される主な SCVs について表現型や遺伝的メカニズム、細菌検査に関する事項について解説した。臨床検体から分離される SCVs の報告は増えつつあるが、臨床検査の現場ではもっと多くの SCVs が検出されていると考えられる。臨床細菌検査で SCVs を正しく検査し、抗菌薬耐性因子の保有を見逃さないためにも、SCVs に対する理解を深めて頂き、さらには検査法の開発や提案がなされることに期待したい。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Stokes, JL, HG Bayne. 1958. Dwarf colony mutants of *Salmonellae*. J Bacteriol 76: 136-141.
- 2) Jensen, J. 1957. Biosynthesis of hematin compounds in a hemin requiring strain of *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. I. The significance of coenzyme A for the terminal synthesis of catalase. J Bacteriol 73: 324-333.
- 3) 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.
- 4) Mowjood, M, FE Miller, J Schor, et al. 1979. Small-colony forms of enteric bacteria after exposure to aminoglycosides. Am J Clin Pathol 72: 79-81.
- 5) Silva, A, AM Sousa, D Alves, et al. 2016. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* is triggered by small colony variants sub-populations within biofilms. Pathog Dis 74: ftw036.
- 6) Negishi, T, T Matsumoto, K Horiuchi, et al. 2018. Characterization of clinically isolated thymidine-dependent small-colony variants of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase. J Med Microbiol 67: 33-39.
- 7) Matsumoto, T, M Hashimoto, CH Teng, et al. 2020. Molecular characterization of a carbon dioxide-dependent *Escherichia coli* small-colony variant isolated from blood cultures. Int J Med Microbiol 310: 151431.
- 8) Haussler, S, B Tummeler, H Weissbrodt, et al. 1999. Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Clin Infect Dis 29: 621-625.
- 9) Haussler, S, C Lehmann, C Breselge, et al. 2003. Fatal outcome of lung transplantation in cystic fibrosis patients due to small-colony variants of the *Burkholderia cepacia* complex. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22: 249-253.
- 10) Anderson, SW, JR Stapp, JL Burns, et al. 2007. Characterization of small-colony-variant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the sputum specimens of five patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 45: 529-535.
- 11) Nagano, N, H Nakaya, M Nagata, et al. 2017. Characterization of first hemin-requiring *Pseudomonas aeruginosa* small-colony variants from the blood of an octogenarian male-patient with double pneumonitis. J Infect Chemother 23: 852-855.
- 12) Morton, HE, J Shoemaker. 1945. The Identification of *Neisseria gonorrhoeae* by Means of Bacterial Variation and the Detection of Small Colony Forms in Clinical Material. J Bacteriol 50: 585-587.
- 13) 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: 295-305.
- 14) Watkins, KE, M Unnikrishnan. 2020. Evasion of host defenses by intracellular *Staphylococcus aureus*. Adv Appl Microbiol 112: 105-141.
- 15) Zhou, S, Y Rao, J Li, et al. 2022. *Staphylococcus aureus* small-colony variants: Formation, infection, and treatment. Microbiol Res 260: 127040.
- 16) Proctor, RA, P van Langevelde, M Kristjansson, et al. 1995. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 20: 95-102.
- 17) Proctor, RA, JM Balwit, O Vesga. 1994. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. Infect Agents Dis 3: 302-312.
- 18) Matsumoto, T, Y Kawakami, A Sueki, et al. 2013. Isolation of an X-factor-dependent but porphyrin-positive *Escherichia coli* from urine of a patient with hemorrhagic

- cystitis. *J Infect Chemother* 19: 764-766.
- 19) Nagano, N, Y Kawakami, T Matsumoto, et al. 2020. Isolation of thymidine-dependent and extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* small-colony variant from urine of a septuagenarian female patient with recurrent cystitis: A case report with genetic investigation. *J Infect Chemother* 26: 1066-1069.
 - 20) Soga, E, M Akiyama, Y Ohsaki, et al. 2019. Isolation of a Capnophilic and Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Proteus mirabilis* Strain from the Urine of an Octogenarian Male Patient with Acute Pyelonephritis. *Jpn J Infect Dis* 72: 193-195.
 - 21) Trapman, M, J van Ingen, J Keijman, et al. 2015. Urinary Tract Infection Caused by a Capnophilic *Proteus mirabilis* Strain. *J Clin Microbiol* 53: 1959-1960.
 - 22) Oana, K, M Yamaguchi, M Nagata, et al. 2013. First Isolation of carbon dioxide-dependent *Proteus mirabilis* from an uncomplicated cystitis patient with Sjogren's syndrome. *Jpn J Infect Dis* 66: 241-244.
 - 23) Matsumoto, T, S Hiramoto, T Niwa, et al. 2022. First description of a clinical glutamine-dependent *Escherichia coli* with a missense mutation in the *glnA*. *J Infect Chemother* 28: 1513-1518.
 - 24) Edwards, AM. 2012. Phenotype switching is a natural consequence of *Staphylococcus aureus* replication. *J Bacteriol* 194: 5404-5412.
 - 25) Kriegeskorte, A, NI Lore, A Bragonzi, et al. 2015. Thymidine-Dependent *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Induced by Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT) and Have Increased Fitness during SXT Challenge. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 7265-7272.
 - 26) Kahl, BC, G Belling, P Becker, et al. 2005. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. *Infect Immun* 73: 4119-4126.
 - 27) Sadowska, B, A Bonar, C von Eiff, et al. 2002. Characteristics of *Staphylococcus aureus*, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32: 191-197.
 - 28) Samuelsen, O, HH Haukland, BC Kahl, et al. 2005. *Staphylococcus aureus* small colony variants are resistant to the antimicrobial peptide lactoferricin B. *J Antimicrob Chemother* 56: 1126-1129.
 - 29) Kahl, B, M Herrmann, AS Everding, et al. 1998. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 177: 1023-1029.
 - 30) von Eiff, C, K Becker, D Metze, et al. 2001. Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with darier's disease. *Clin Infect Dis* 32: 1643-1647.
 - 31) Acar, JF, FW Goldstein, P Lagrange. 1978. Human infections caused by thiamine- or menadione-requiring *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 8: 142-147.
 - 32) Lannergard, J, C von Eiff, G Sander, et al. 2008. Identification of the genetic basis for clinical menadione-auxotrophic small-colony variant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 4017-4022.
 - 33) Dean, MA, RJ Olsen, SW Long, et al. 2014. Identification of point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* strains that produce small-colony variants auxotrophic for menadione. *Infect Immun* 82: 1600-1605.
 - 34) Koser, CU, MT Holden, MJ Ellington, et al. 2012. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *N Engl J Med* 366: 2267-2275.
 - 35) Herrin, BE, S Islam, KN Rentschler, et al. 2021. Haem toxicity provides a competitive advantage to the clinically relevant *Staphylococcus aureus* small colony variant phenotype. *Microbiology (Reading)* 167.
 - 36) Roggenkamp, A, A Sing, M Hornef, et al. 1998. Chronic prosthetic hip infection caused by a small-colony variant of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 36: 2530-2534.
 - 37) Proctor, R. 2019. Respiration and Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr* 7.
 - 38) Balwit, JM, P van Langevelde, JM Vann, et al. 1994. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J Infect Dis* 170: 1033-1037.
 - 39) Cano, DA, MG Pucciarelli, M Martinez-Moya, et al. 2003. Selection of small-colony variants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in nonphagocytic eucaryotic cells. *Infect Immun* 71: 3690-3698.
 - 40) von Eiff, C, C Heilmann, RA Proctor, et al. 1997. A site-directed *Staphylococcus aureus* hemB mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J Bacteriol* 179: 4706-4712.
 - 41) von Eiff, C, AW Friedrich, K Becker, et al. 2005. Comparative in vitro activity of ceftobiprole against staphylococci displaying normal and small-colony variant phenotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4372-4374.
 - 42) Guilloton, MB, AF Lamblin, EI Kozliak, et al. 1993. A physiological role for cyanate-induced carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 1443-1451.
 - 43) Gomez-Gonzalez, C, J Acosta, J Villa, et al. 2010. Clinical and molecular characteristics of infections with CO₂-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 48: 2878-2884.
 - 44) Pinto, A, J Merlino. 2011. CO₂-dependent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 66: 676-677.
 - 45) Sahuquillo-Arce, JM, R Chouman-Arcas, JM Molina-Moreno, et al. 2017. Capnophilic *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 87: 318-319.
 - 46) Essers, L, WD Heinrich, E Rosenthal. 1979. Isolation of a carbon dioxide-dependent strain of *E. coli* from the urine of a patient with chronic pyelonephritis (author's transl). *Zentralbl Bakteriol Orig A* 244: 229-232.

- 47) Hashimoto, M, J Kato. 2003. Indispensability of the *Escherichia coli* carbonic anhydrases YadF and CynT in cell proliferation at a low CO₂ partial pressure. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 919-922.
- 48) Fan, SH, E Liberini, F Gotz. 2021. *Staphylococcus aureus* Genomes Harbor Only MpsAB-Like Bicarbonate Transporter but Not Carbonic Anhydrase as Dissolved Inorganic Carbon Supply System. *Microbiol Spectr* 9: e0097021.
- 49) Fan, SH, P Ebner, S Reichert, et al. 2019. MpsAB is important for *Staphylococcus aureus* virulence and growth at atmospheric CO₂ levels. *Nat Commun* 10: 3627.
- 50) Douglas, EJA, S Duggan, T Brignoli, et al. 2021. The MpsB protein contributes to both the toxicity and immune evasion capacity of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading)* 167.
- 51) Ota, Y, T Matsumoto, M Sugano, et al. 2015. Identification of Clinical Thymidine-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rinsho Byori* 63: 683-687.

Small-colony variants that are problematic in clinical microbiology testing

Takehisa Matsumoto

Department of Laboratory Sciences, Gunma University Graduate School of Health Sciences

Small-colony variants (SCVs) are a subpopulation of slow-growing bacteria with a unique phenotype; SCVs have a slow growth rate, atypical colony morphology, and specific biochemical characteristics. Identification and drug susceptibility testing for SCVs in clinical microbiology can be difficult to obtain correct results. In addition, SCVs are more likely to become established in host cells than the wild type and may cause chronic or recurrent infections due to, for example, decreased susceptibility to antibiotics. In recent years, a variety of SCVs infections have been reported, and causative gene mutations have been identified in carbon dioxide-dependent and glutamine-dependent SCVs, in addition to thymidine-dependent and hemin-dependent, menadione-dependent SCVs. Furthermore, antimicrobial-resistant SCVs are emerging, and clinical microbiology laboratories must be careful not to miss antimicrobial resistance. This review describes the phenotypes and causes associated with the major SCVs isolated from clinical specimens, as well as matters related to microbiological testing.