

【原著・基礎】

血液分離 *Enterococcus* spp. のアミノ配糖体系薬高度耐性株の性状

金山 明子¹⁾・高橋 裕子¹⁾・内野卯津樹¹⁾・長谷川美幸¹⁾
佐藤 弓枝¹⁾・小林 真喆¹⁾・金子 明寛²⁾

¹⁾三菱化学ピーシーエル化学療法研究室*

²⁾東海大学医学部外科学系口腔外科

(平成 16 年 10 月 27 日受付・平成 17 年 1 月 5 日受理)

Enterococcus はヒトの腸内常在菌として知られているが、日和見感染症を起こすことも報告され時には敗血症を惹起する。本菌による菌血症の治療にはアミノ配糖体系薬とペニシリン系薬の併用療法が一つの治療方法として用いられている。今回は血液由来 *Enterococcus* におけるアミノ配糖体系高度耐性 (high-level aminoglycoside-resistant: HLAR) 株の薬剤感受性および耐性遺伝子について検討した。

2001 年 2 月から 2002 年 2 月に採取された血液検体 6,730 検体より *Enterococcus* 149 株 (2.2%) を検出した。内訳は *Enterococcus faecalis* が 94 株 (63.1%) と最も多く、次いで *Enterococcus faecium* 41 株 (27.5%) と両菌種で 90.6% を占めた。*Enterococcus* 149 株中 HLAR 株は計 54 株 (36.2%) 認められ、*E. faecalis* の耐性率 50.0% に比較し *E. faecium* は 4.9% と低く、菌種による差がみられた。アミノ配糖体系修飾酵素遺伝子を PCR により検索し、54 株中 49 株 (90.7%) に *aac(6')-aph(2'')* 遺伝子が検出された。また今回検討したいずれの耐性遺伝子も検出されなかった 5 株を用い gentamicin (GM) 不活性化能に関する検討を行った結果、GM の失活を認めた。これら HLAR 54 株に対する penicillin G (PCG), vancomycin (VCM), teicoplanin (TEIC), linezolid (LZD), telithromycin (TEL), gatifloxacin (GFLX) の MIC 測定では、耐性株は PCG, TEL, GFLX に約 4~44% 認められた。今回の検討では VCM, TEIC, LZD に対して耐性株は認められず、HLAR による感染症においてこれらは重要な治療薬となると示唆された。

Key words: *Enterococcus* spp., high-level resistance, aminoglycoside-modifying enzyme, gene analysis

Enterococcus はヒトの腸内常在菌として知られているが造血管腫瘍患者や高齢者などに日和見感染症を起こすことがあり、本菌による尿路感染症や腹腔内感染症に敗血症が続発するケースも古くから報告されている¹⁾。特に欧米では VCM 耐性 *Enterococcus* (VRE) による院内感染が問題となっている²⁾。

Enterococcus や *Streptococcus* による菌血症の抗菌治療薬として gentamicin (GM) などのアミノ配糖体系薬は penicillin G あるいは ampicillin との併用投与により短時間で優れた殺菌作用を示すことから感染性心内膜炎や敗血症の治療に用いられている。しかし、これらの菌種の一部でアミノ配糖体系薬に対する耐性化が進行しており化学療法が無効になる場合がある。

今までにわれわれは GM 等のアミノ配糖体系薬に高度耐性を示す口腔内連鎖球菌などについて報告してきた³⁾。今回は血液由来 *Enterococcus* 多数株におけるアミノ配糖体系高度耐性株の薬剤感受性および耐性遺伝子について検討した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

2001 年 2 月から 2002 年 2 月において、主に関東地方を中心とした日本全国の 196 施設より血液培養検査を目的として当検査室に搬入された血液検体 6,730 検体より検出された *Enterococcus* 149 株を用いた。菌種の同定はグラム染色にてグラム陽性球菌、カタラーゼ試験陰性およびエスクリン加水分解陽性であることを確認後、EF 寒天培地 (日水製薬) でのコロニー色調および VITEK GPI (日本ビオメリュー), api 20 strep (日本ビオメリュー) を用いて実施した。

2. 薬剤感受性測定

各菌株の MIC を National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ガイドライン M7-A6⁴⁾ に従い、寒天平板希釈法にて測定した。薬剤は gentamicin (GM, Sigma), penicillin G (PCG, Sigma), vancomycin (VCM, Sigma), teicoplanin (TEIC, アベンティスファーマ), linezolid (LZD, ファルマシア), telithromy-

Table 1. PCR primer used to amplify the aminoglycoside resistance gene

Gene	Enzyme		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)
<i>aac(6)-aph(2)</i>	AAC(6)-APH(2)	<i>aac1/aac2^a</i>	ATATGATTATGAAAAAGGTGA/ATAATCAATCTTTATAAGTCC ⁶⁾	1472
		<i>aac3/aac8</i>	ACTGATGAGATAGTCTATGGTA/CAGAATCCCTAAAATCAAT	922
		<i>aac4/aac8</i>	ATTTGCCAGAACATGAATTACA/CAGAATCCCTAAAATCAAT	720
		<i>aac1/aac8</i>	ATATGATTATGAAAAAGGTGA/CAGAATCCCTAAAATCAAT	1222
		<i>aac4/aac2</i>	ATTTGCCAGAACATGAATTACA/ATAATCAATCTTTATAAGTCC	972
		<i>aac5/aac2</i>	TTAGAAAATGTAAAAATTC/ATAATCAATCTTTATAAGTCC	694
<i>aph(2)-Ib</i>	APH(2)-Ib	<i>aphb1/aphb2</i>	TATGGATCCATGGTTAACTTGGACGCTGAG/ ATTAAGCTTCCTGCTAAAATATAAACATCTCTGCT ⁷⁾	857
		<i>aphb3/aphb4</i>	AGAAGGCCAAATGGCACAGTATAA/TCACATCATCTTTTCCTGCTAA	1000
<i>aph(2)-Ic</i>	APH(2)-Ic	<i>aphc1/aphc2</i>	TGACTCAGTTCACAGAT/AGCACTGTTCGCACCAAA ⁸⁾	846
		<i>aphc3/aphc4</i>	AAACAGTAGCACCCACGAT/AGAAAAGCCGATTTTTCTACGC	1270
<i>aph(2)-Id</i>	APH(2)-Id	<i>aphd1/aphd2</i>	GGTGGTTTTTACAGGAATGCCATC/ CCCTCTCATACCAATCCATATAACC ⁷⁾	591
		<i>aphd3/aphd4</i>	AAAATGCTGCAGAGATAGG/GATTCCGGATCCTAAAAAAGGA	1100
<i>aac(6)-Ii</i>	AAC(6)-I	<i>aac6IF/aac6IR</i>	TGGCCGGAAGAATATGGAGA/GCATTGGTAAGACACCTACG ⁹⁾	410
<i>ant(4)-Ia</i>	ANT(4)-I	<i>ant4F/ant4R</i>	GGAAGCAGAGTTCAGCCATG/TGCCATCATTTCAAACAGC ⁹⁾	266
<i>ant(6)-Ia</i>	ANT(6)-I	<i>ant6F/ant6R</i>	CGGGAGAATGGGAGACTTTG/CTGTGGCTCCACAATCTGAT ⁹⁾	563
<i>ant(9)-Ia</i>	ANT(9)-I	<i>ant9F/ant9R</i>	GGTTCAGCAGTAAATGGTGGT/TGCCACATTCGAGCTAGGGTT ⁹⁾	476
<i>aph(2)-Ic</i>	APH(2)-Ic	<i>aph2 I cF/aph I cR</i>	ATACAATCCGTCGAGTCGCT/GTTGGCCTTATCCTCTTCCA ⁹⁾	837
<i>aph(3)-IIIa</i>	APH(3)-III	<i>aph3^{IIIa}F/aphIIIaR</i>	CTGATCGAAAAATACCGCT/ACAATCCGATATGTTCGATGGAG ⁹⁾	354
		<i>aph3AF/aph3AR</i>	GCCGATGTGGATTGCGAAAA/ACTGAATGACCCTAGTTCG ¹⁰⁾	292

^aForward/ Reverse primer

6) 7) 8) 9) 10) reference No.

cit(TEL, アベンチスス(アーク), gatihoxacin(GFLX, 杏林製薬) の力価が明らかなら薬剤を使用した。また, 同剤イブライン M2-A8[®] に従いアーク拡散法にて Gentamicin120 (120 μg 含有, センシ・アークス[®], 日本ベクトン・ディッキンソン) を使用し high-level aminoglycosides-resistant(HLAR) スクリーニングを行った。

3. アミノ配糖体修飾酵素遺伝子の検出
各種アミノ配糖体修飾酵素遺伝子の検出を PCR 法に

より実施した。Table 1 に検出遺伝子およびその primer を示す。各遺伝子の PCR は aac(6)-aph(2) の検出において Kaufhold^ら の報告および GenBank accession M13711 を参考にアークス[®] を設計し実施した。aph(2)-Ib, aph(2)-Ic, aph(2)-Id の検出において aphb1/aphb2, aphd1/aphd2, aphd3/aphd4 を使用したものは Donabedian^ら の方法により実施した。また aphc1/aphc2 のアークス[®] を使用したものは Chow^ら の方法に基づき実施した。

aphb3/aphb4, aphc3/aphc4, apbd3/apbd4 は GenBank データベースを参考に設計し, 94 3分, 94 1分, 50 1分, 72 1分, 72 10分, 35 サイクルで PCR を行った。

aac(6')-Ii, *an(4')-Ia*, *an(6')-Ia*, *an(9')-Ia*, *apk(2'')-Ic* の検出は Kobayashi ら⁹⁾の方法に, *apk(3')-IIIa* の検出は Kobayashi ら⁹⁾および Braak ら¹⁰⁾の方法に従い実施した。得られた PCR 産物は 3% agarose gel にて電気泳動を行い目的のサイズのバンドが得られたことを確認した。

4. Bioassay 法による GM 不活化活性の検討

供試菌株を LB ブロス (Difco) で 35 にて一夜培養を行った後, 菌液に GM を 50 µg/mL となるように添加した。35 にて 3 時間反応後, 0.45 µm フィルターユニットにてろ過し菌体の除去を行った液をサンプルとし, GM 残存濃度を Bioassay 法により測定した。Bioassay 法はサンプル 100 µL をしみこませた直径 8 mm ディスクを *Bacillus subtilis* ATCC6633 を検定菌としたクエン酸ナトリウム培地 (Nutrient agar [Difco] 23 g/1,000 mL, クエン酸三ナトリウム [関東化学] 10 g/1,000 mL) 上にはりつけ, 35 にて 18 時間培養後, 阻止円径を測定した。GM 濃度 100 ~ 0.39 µg/mL の範囲で検量線を作製し, サンプルの GM 濃度を算出した。

II. 結 果

血液検体 6,730 検体より検出した *Enterococcus* は 149

株 (2.2%) であった。それらの菌株の内訳を Table 2 に示した。*E. faecalis* が 94 株 (63.1%) と最も多く, ついで *E. faecium* 41 株 (27.5%) と両菌種で 90.6% を占めていた。またこれ以外の菌種は *Enterococcus avium* が 6 株, *Enterococcus gallinarum* が 1 株, 菌種名を確定できなかった株が 7 株であった。

Disk 法の HLAR スクリーニングによる感受性分布 (Table 3) は 149 株中, 感性 (S) が 95 株 (63.8%), 中等度耐性 (I) が 6 株 (4.0%), 耐性 (R) が 48 株 (32.2%) であった。その内訳は *E. faecalis* 94 株では S が 47 株 (50.0%), I が 5 株 (5.3%), R が 42 株 (44.7%), *E. faecium* 41 株では S が 39 株 (95.1%), I は認められず, R が 2 株 (4.9%), その他の *Enterococcus* 14 株では S が 9 株 (64.3%), I が 1 株 (7.1%), R が 4 株 (28.6%) であり, *E. faecalis* の耐性率 44.7% に比較し *E. faecium* は 4.9% と低かった。

HLAR スクリーニングによる成績と寒天平板希釈法による GM の MIC 成績を比較すると (Table 3), disk 法で S と判定された 95 株は MIC 法ではすべて 256 µg/mL となり, disk 法で R となった 48 株の MIC 値は 512 ~ > 8,192 µg/mL で HLAR と判定された。しかし disk 法で I と判定された 6 株の MIC 値は 5 株が 512 µg/mL, 1 株が 1,024 µg/mL を示し MIC 法ではすべて HLAR と判定された。HLAR スクリーニングで R と判定された菌株が MIC 法で HLAR 以外となった例, 逆に HLAR スクリーニングで S と判定された菌株が MIC 法で HLAR となった例は認められなかった。

アミノ配糖体修飾酵素遺伝子の検出では HLAR 54 株のうち 49 株 (90.7%) に *aac(6')-apk(2'')* 遺伝子が検出された (Table 4)。*aac(6')-apk(2'')* が検出されなかった 5 株 (9.3%) の内訳は *E. faecium* 1 株, *E. avium* 2 株, *Enterococcus* species 2 株で, この 5 株に対し *aac3/aac8*, *aac4/aac8*, *aac1/aac8*, *aac4/aac2*, *aac5/aac2* の 5 種類のプライマーを用いて検索したがいずれも PCR 産物を認めなかった。さらに *apk(2'')-Ib*, *apk(2'')-Ic*, *apk(2'')-Id* の各遺伝子についてそれぞれ 2 組のプライ

Table 2. Distribution of *Enterococcus* isolates from 6,730 blood specimens

	No. of isolates (%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	94 (63.1)
<i>Enterococcus faecium</i>	41 (27.5)
Other <i>Enterococcus</i> ^a	14 (9.4)
Total	149 ^b (100)

^a6 *Enterococcus avium*, 1 *Enterococcus gallinarum*, 7 *Enterococcus* species

^bdetection rate: 149 isolates/6,730 samples (2.2%)

Table 3. Comparison of susceptibility test results obtained by HLAR screening and MICs for 149 *Enterococcus* isolates

Bacteria	HLAR screening ^a			HLAR ^b	
	Susceptible	Intermediate	Resistant		
<i>Enterococcus faecalis</i>	94	47 (50.0)	5 (5.3)	42 (44.7)	47 (50.0)
<i>Enterococcus faecium</i>	41	39 (95.1)	0	2 (4.9)	2 (4.9)
Other <i>Enterococcus</i>	14	9 (64.3)	1 (7.1)	4 (28.6)	5 (35.7)
Total	149	95 (63.8)	6 (4.0)	48 (32.2)	54 (36.2)

No. of strains (%)

^aZone diameter of gentamicin HLAR disk (containing 120 µg)

Susceptible: 10 mm, Intermediate: 7-9 mm, Resistant: 6 mm

^bAgar dilution method: 512 µg/mL

マーを用い検索を行ったがいずれの遺伝子の PCR 産物も得られなかった。aa(6')-Ii, an(4')-Ia, an(6')-Ia, an(9')-Ia, aph(2'')-Ic, aph(3'')-IIIa 遺伝子についても実施したが検出されなかった。

いずれの遺伝子も検出されなかった 5 株を用い GM 不活性化に関する検討を行った。試験菌株を GM 50 µg/mL に作用させ残存濃度を bioassay 法にて測定した結果、すべて検出限界以下 (<0.39 µg/mL) となり GM の失活が認められた。

Table 5 に MIC 値より HLAR と判定した 54 株の各抗菌薬に対する感受性成績を示した。耐性株は PCG に 6 株 (11.1%), TEL に 2 株 (3.7%), GFLX に 24 株 (44.4%) 認められ、特に PCG に対しては 4,096 µg/mL と高度耐性を示す株が存在した。一方、VCM, TEIC, LZD に対して HLAR 54 株はすべて感性を示し、これらの薬剤は HLAR に強い抗菌活性を示した。

III. 考 察

1991 年に American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) 合同コンセンサス会議にて Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) が提唱された¹¹⁾。SIRS の定義の大きな特徴は必ずしも病原体の検出を必要としないことである。

ここでいう病原体は細菌、真菌、寄生虫、ウイルスを含み、病原体菌症の証明を不要としたのはその努力をしても証明不可能なことがあるとの前提による。しかし提唱は培養検査を否定するものではなく、血流感染症において血液培養を実施し起炎菌を検出することは、化学療法薬の選定のみならず院内感染の有無など疫学調査においても重要である。

起炎菌を臨床検体から分離、同定し、抗菌薬に対する感受性を測定することは感染症の治療に不可欠である。われわれは過去に口腔連鎖球菌および *Aerococcus* の HLAR 株について検討を行い報告した³⁾。今回は血液由来 *Enterococcus* 多数株についてその検出頻度、薬剤耐性機構について検討した。*Enterococcus* はヒトの腸内細菌叢を形成する常在菌であるが、造血器腫瘍患者や高齢者における日和見感染症原因菌の一つとされ、尿路感染症や腹腔内感染症に敗血症が続発する国内の症例も報告されている¹⁾。特に欧米では VCM 耐性 *Enterococcus* (VRE) による院内感染が問題となっている²⁾。国内においても本菌による院内感染事例が報告され¹²⁾、2003 年に改定された感染症法では VRE による感染症は五類感染症 (全数把握の対象) に指定されている。一方、1970 年に Moellering ら¹³⁾は臨床検体から分離した *Enterococcus* に HLAR 株が存在することを報告しており、その出現は VRE よりはるかに古い。今回の検討は血流感染症が疑われた患者血液由来の *Enterococcus* に焦点をあて解析した。

今回検討した血液由来 *Enterococcus* 149 株の内訳は *E. faecalis* 94 株 (63.1%), *E. faecium* 41 株 (27.5%), その他の *Enterococcus* 14 株 (9.4%) となり、上位 2 菌種で 90% 以上を占め、その他の病巣同様 *E. faecalis* が最も多かった。これら各種血液由来株 149 株中 48 株 (32.2%) が HLAR スクリーニングで R と判定された。Disk 法である HLAR スクリーニングで I と判定された 6 株 (4.0%) は MIC 測定の結果、HLAR に再分類された。逆にスクリーニングで I と判定した株が MIC 測定で

Table 4. Detection of the aminoglycoside modifying enzyme gene in 54 HLAR strains

	No. of strains (%)	
	aa(6')-aph(2'')	Other ^a
+	49 (90.7)	NT ^b
-	5 (9.3)	ND ^d

^aaph(2'')-Ib, aph(2'')-Ic, aph(2'')-Id, aa(6')-Ii, an(4')-Ia, an(6')-Ia, an(9')-Ia, aph(2'')-Ic, aph(3'')-IIIa

^bnot tested

^c1 *Enterococcus faecium*, 2 *Enterococcus avium*,

2 *Enterococcus* species

^dnot detected

Table 5. Susceptibilities to 7 antimicrobial agents of 54 HLAR strains

Antimicrobial agent	MIC (µg/mL)			Interpretation		
	50%	90%	range	Susceptible	Intermediate	Resistant
Gentamicin	> 8,192	> 8,192	512- > 8,192	NA ^b	NA	54 ^c (100) [†]
Penicillin G	4	16	1-4,096	48 (88.9)	NA	6 (11.1)
Vancomycin	1	4	0.12-4	54 (100)	0	0
Teicoplanin	0.25	0.5	0.06-0.5	54 (100)	0	0
Linezolid	1	1	0.5-2	54 (100)	0	0
Telithromycin ^a	0.25	2	0.06-128	33 (61.1)	19 (35.2)	2 (3.7)
Gatifloxacin	4	16	0.25-32	22 (40.7)	8 (14.8)	24 (44.4)

^asubstitute criteria of erythromycin

^bno adaptation

^cNo. of strains (%)

[†]HLAR

HLAR 以外となる例は認められなかった。またこの 6 株以外で HLAR の判定が異なることはなく disk 法によるスクリーニングには偽感性、偽耐性の重大な誤判定は認められなかった。検査法が簡便で判定エラーも少ないことから、HLAR スクリーニングは有用な検査成績を臨床にフィードバックすることが可能である。MIC 法で判定された HLAR は *E. faecalis* が 47 株 (50.0%) と最も高い頻度で耐性を示し、一方、*E. faecium* の耐性頻度は 2 株 (4.9%) と低く、その他の *Enterococcus* は 5 株 (35.7%) と菌種により HLAR の検出率には大きな差異が認められた。一般に *E. faecium* は *E. faecalis* に比較し β -lactam 薬やニューキノロン薬などの各種抗菌薬に耐性傾向を示すといわれる¹⁴⁾。しかし福田ら¹⁵⁾は血液疾患患者 55 例の糞便中から検出した耐性 *Enterococcus* 23 株の多くは *E. faecium* で 1 株のみが *E. faecalis* であり、また 19 株 (82.6%) は GM に $> 2,000 \mu\text{g}/\text{mL}$ と高度耐性を示したと報告している。福田らの検討ではキノロン系抗菌薬を予防投与された患者から piperacillin と amikacin を用いて耐性菌株を分離・検出しており、今回の血液感染症を疑う患者検体の検討とは一概に比較はできないが、これらの菌種に GM 高度耐性株が高頻度に検出されることは抗菌化学療法における脅威となる。

また今回検討した HLAR 54 株中 49 株は耐性遺伝子 *aad(6')*-*aph(2')* をもち、不活化酵素 AAC(6')-APH(2') による GM の修飾が主な耐性要因と考えられた。さらに本遺伝子が認められない 5 株に対しその他の各種耐性遺伝子の検出試験を行ったがいずれの遺伝子も認められなかった。GM 不活化活性の検討で反応後の GM 濃度は $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ から検出限界以下 ($< 0.39 \mu\text{g}/\text{mL}$) と 1/100 以下に低下した。このため今回検討した耐性遺伝子が検出されなかった 5 株の GM 耐性の機構は何らかの不活化修飾酵素によるものと推測された。

各種微生物のアミノ配糖体系薬に対する抵抗性の獲得は酵素による不活・修飾化、標的部位の変異、菌体内濃度の低下 (浸透量低下) などが報告され、*Enterococcus* がアミノ配糖体系薬に自然耐性を示すのは菌体内への薬剤透過性が低いためであるとされている^{16,17)}。しかし *Enterococcus* および *Streptococcus* による菌血症の治療には殺菌力の強さからペニシリン系薬剤とアミノ配糖体系薬の併用が推奨されている。HLAR は菌血症の治療として用いられるアミノ配糖体系薬およびペニシリン系薬の併用療法に抵抗性を示し予後不良となりかねないので注意を要する。アミノ配糖体系薬以外の抗菌薬では PCG, TEL および GFLX に対して耐性を示す株が一部に認められたが、VCM, TEIC, LZD に対して耐性株は認められず、アミノ配糖体系薬高度耐性菌による感染症においてこれらは重要な治療薬となると示唆された。また多剤に耐性化した *Enterococcus* が腸管内に定着し、宿主側の抵抗力低下などの問題とともに菌血症を起こす可能性もあるこ

とから薬剤感受性の動向調査は今後も重要と考える。

文 献

- 岡 慎一, 島田 馨, 稲松孝忠, 他: 腸球菌敗血症に関する研究, 第 2 報, 腸球菌敗血症 46 例の臨床的検討. 感染症学雑誌 59: 545 ~ 550, 1985
- Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. Recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). MMWR Recomm Rep 44 (RR-12): 1 ~ 13, 1995
- Kobayashi I, Kanayama A, Matsuzaki K, et al: High-level gentamicin-resistant isolates of oral streptococci and *Aerococcus* from blood specimens. J Infect Chemother 9: 21 ~ 24, 2003
- NCCLS: Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically; Approved standard sixth edition M7-A6: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2003
- NCCLS: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard eighth edition M2-A8: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2003
- Kaufhold A, Podbielski A, Haraud T, et al: Identical genes confer high-level resistance to gentamicin upon *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Streptococcus agalactiae*. Antimicrob Agents Chemother 36: 1215 ~ 1218, 1992
- Donabedian S M, Thal L A, Hershberger E, et al: Molecular characterization of gentamicin-resistant *Enterococci* in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. J Clin Microbiol 41: 1109 ~ 1113, 2003
- Chow J W, Zervos M J, Lerner S A, et al: A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. Antimicrob Agents Chemother 41: 511 ~ 514, 1997
- Kobayashi N, Alam M, Nishimoto Y, et al: Distribution of aminoglycoside resistance gene in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. Epidemiol Infect 126: 197 ~ 204, 2001
- van Den Braak N, van Belkum A, Kreft D, et al: The prevalence and clonal expansion of high-level gentamicin-resistant enterococci isolated from blood cultures in a Dutch university hospital. J Antimicrob Chemother 44: 795 ~ 798, 1999
- American college of chest physicians/Society of critical care medicine consensus conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 20: 864 ~ 874, 1992
- 新 謙一, 吉澤靖之: 当院で経験した VRE 定着 24 症例の予後の検討. 第 75 回日本感染症学会講演抄録 93, 2001
- Moellering R C Jr, Wennersten C, Medrek T, et al: Prevalence of high-level resistance to aminoglycosides in clinical isolates of enterococci. Antimicrob Agents Chemother 10: 335 ~ 340, 1970
- Gordon S, Swenson J M, Hill B C, et al: Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual spe-

- cies of enterococci causing infections in the United States. Enterococcal Study Group. J Clin Microbiol 30: 2373 ~ 2378, 1992
- 15) 福田哲也, 秋山秀樹, 正司 房, 他: キノロン系抗菌薬の予防投与中の血液疾患患者の便培養にみられた *Enterococcus faecium* について。感染症学雑誌 68: 486 ~ 490, 1994
- 16) 井田孝志: アミノ配糖体薬耐性。化学療法の領域 12: 1265 ~ 1273, 1996
- 17) 西野武志: アミノ配糖体抗生物質の耐性機構。臨床と微生物 22: 535 ~ 541, 1995

High-level aminoglycoside-resistant *Enterococcus* from blood specimens

Akiko Kanayama¹⁾, Yuko Takahashi¹⁾, Utsuki Uchino¹⁾, Miyuki Hasegawa¹⁾,
Yumie Sato¹⁾, Intetsu Kobayashi¹⁾ and Akihiro Kaneko²⁾

¹⁾Chemotherapy Division, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc.,
3 30 1 Shimura, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

²⁾Department of Oral Surgery, School of Medicine, Tokai University

Enterococcus is a normal constituent of the intestinal bacterial flora in humans, which occasionally causes opportunistic infections and induces sepsis in case of serious infections. The combination of aminoglycosides with penicillins is generally known to be one of the regimens for bacteremia due to *Enterococcus*. The drug susceptibility of high-level aminoglycoside-resistant (HLAR) isolates which were detected in part of the *Enterococcus* isolates derived from blood specimens and the resistance genes were investigated in the present study.

One hundred and forty-nine isolates of *Enterococcus* (2.2%) were detected in 6,730 blood specimens taken between February 2001 and February 2002. The details are as follows: *Enterococcus faecalis* strains accounted for 94 (63.1%) followed by *Enterococcus faecium* strains at 41 (27.5%), and both organisms accounted for 90.6% of all organisms. A total of 54 HLAR strains (36.2%) were detected in 149 strains of *Enterococcus* and the resistance rate of *E. faecium* was low, 4.9%, as compared with that of *E. faecalis* (50.0%). There were differences between *E. faecium* and *E. faecalis* in the resistance rate. The *aac(6)-aph(2)* gene was detected in 49 of the 54 strains (90.7%) with PCR. In addition, the inactivation of gentamicin (GM) was investigated in the 5 isolates without resistant genes. As a result, these isolates inactivated GM. The MICs of penicillin G (PCG), vancomycin (VCM), teicoplanin (TEIC), linezolid (LZD), telithromycin (TEL) and gatifloxacin (GFLX) for 54 isolates of HLAR were determined. The strains resistant to PCG, TEL and GFLX were about 4 to 44%. In the present study there were no strains resistant to VCM, TEIC or LZD, which suggests that these antibiotics are usefully therapeutic drugs for the treatment of infections caused by HLAR strains.