

【原著・基礎】

ブレイクポイント付近の oxacillin 感性を示す *Staphylococcus aureus* における MRSA の判定

金山 明子・高橋 裕子・松崎 薫・小林 寅喆

三菱化学ビーシーエル化学療法研究室*

(平成 17 年 9 月 8 日受付・平成 17 年 11 月 1 日受理)

Oxacillin の MIC 値が 1, 2, 4, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) 79 株について, NCCLS(現 CLSI) M100-S14(2004 年)に新たに追加された cefoxitin disk を用いた oxacillin スクリーニング法(cefexitin テスト)を含む各種方法にて methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の判定を実施した。その結果, *mecA* 保有と oxacillin の MIC が一致しない例が認められ, oxacillin 感受性と判定された 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 30 株では 1 株, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 30 株では 5 株が *mecA*(+)であった。一方 oxacillin 耐性株である 4, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では *mecA*(-)株は認めなかった。同様に oxacillin 感受性株に penicillin-binding protein 2'(PBP2')産生株が認められたが, 耐性株に非産生株は認められなかった。54 株の *mecA*(-)株に 12 株の PBP2'産生株が存在し, このうち 7 株は反応が弱く, 弱陽性と判定した。しかしこれら 12 株は oxacillin 感受性, cefoxitin テストともに感受性を示すことから PBP2'の結果は非特異的反応によるものと推察された。Cefoxitin テストによる成績では oxacillin 感受性株 60 株中 53 株が cefoxitin においても感受性を示したが, 7 株が耐性を示し阻止円径は判定境界付近の値であった。Oxacillin 耐性株 19 株のうち 1 株が cefoxitin テストで感受性であったが, その他はすべて耐性となった。Cefoxitin テストのエラー頻度は very major error:1.3%, major error: 8.9% であり良好な結果であったが, BORSA の場合は判定境界付近の阻止円径を示すことがあり, 他の方法での追加確認が必要であると考えられた。

Key words: MRSA, cefoxitin, PBP2', *mecA*, oxacillin susceptible *Staphylococcus aureus*

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の判定方法は一般的に oxacillin 感受性測定, penicillin-binding protein 2 [PBP2 (=PBP2a)]産生性, *mecA* の検出など複数の方法が用いられている。これらに加え, NCCLS(現 CLSI) M100-S14(2004 年)ではセファマイシン系の薬剤である cefoxitin disk を用いた oxacillin 感受性スクリーニング法が追加された。

諸外国の報告では *mecA* の検出または PBP2'産生性が MRSA の判定における gold standard²⁻⁴⁾とされており, NCCLS においても *mecA* または PBP2'産生のいずれかを認める場合は oxacillin 耐性株であると報告すべきとコメントしている。しかしながら, どの方法を用いるかは各施設に委ねられているのが現状であり, わが国においても同様である。

われわれは日常の細菌検査の現場において, しばしば oxacillin におけるブレイクポイント付近のボーダーラインの MIC 値を示す株において, 判定法により成績に乖離が認められるケースに遭遇する。そこで今回われわれは測定法により MRSA の判定成績にばらつきが認められることが多いと考えられるブレイクポイント付近の MIC 値(1, 2, 4, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を示す株を borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*(BORSA)⁵⁾と定義し, これらの株について各種測定法

により MRSA の判定を実施することにより, 測定法による成績から BORSA に対する MRSA の判定について検討した。

I. 材料と方法

1. 供試菌株

各種臨床検体より分離, 同定を行った *S. aureus* について oxacillin の MIC を測定後, 1, 2, 4 および 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示した 79 株を BORSA とし供試菌株とした。なお, oxacillin の MIC 測定は NCCLS M100-S14¹⁾に準拠した微量液体希釈法により少なくとも 2 回実施後, 一致した値を採用した。

2. MRSA の判定

MRSA の判定は *mecA* 遺伝子の検出, PBP2'産生性, cefoxitin テストおよび VITEK2 感受性カードグラム陽性菌 AST-P525(日本ビオメリュー)を用いて実施した。なお, *mecA* はジーンカラー[®] *mecA*・*spa*(湧永製薬)を用いた PCR 法により実施し, PBP2'産生性は PBP2'検出キット(MRSA-LA「生研」, デンカ生研)を用いて実施した。Cefoxitin テストは NCCLS standard M100-S14(2004 年)¹⁾に準じ cefoxitin disk(日本ベクトン・ディッキンソン)を用いた disk 拡散法で測定し, 各菌株について 3 回実施し阻止円径の平均値を求めた。判定は同 standard

Table 1. Results of testing 79 BORSA strains by VITEK2, *mecA*, PBP2' and cefoxitin screening tests

Oxacillin MIC (µg/mL)	No. of strains	VITEK 2		<i>mecA</i>		PBP2'			Zone diameter of cefoxitin disk (mm)						
		R	S	+	-	+	-	W ^a	resistant			susceptible			
									14	17	18	19	20	24	
1	30		30	1	29	6	19	5					1		29
2	30		30	5	25	5	23	2		1	4	1			24
4	6	6		6		6				5					1
8	13	13		13		13				13					
Total	79	19	60	25 ^b	54	30	42	7		18		7		1	53

^a Weakly positive.^b All 25 strains produced PBP2'.

Table 2. Discrepancies between the oxacillin MIC and results of the cefoxitin disk screening test among 79 BORSA

Strain No.	Oxacillin MIC (µg/mL)	Cefoxitin disk screen test		<i>mecA</i>	PBP2'
		Zone diameter (mm)	Interpretation		
30	1	19	R	+	+
58	2	17	R	+	+
51	2	18	R	-	-
57	2	18	R	+	+
59	2	18	R	+	+
60	2	18	R	+	+
56	2	19	R	+	+
61	4	20	S	+	+

に従い、阻止円径 19 mm を oxacillin 耐性、20 mm の場合を oxacillin 感受性と判定した。

II. 結 果

本検討に用いた BORSA 79 株の oxacillin の MIC および株数は、NCCLS の基準により感受性 (susceptible) と判定される 1 または 2 µg/mL を示す株が各 30 株、合計 60 株、耐性 (resistant) と判定される 4 または 8 µg/mL を示す株が 6 株および 13 株、合計 19 株であった。

各種測定法による MRSA の判定成績を Table 1 に示した。VITEK2 による oxacillin 感受性成績と oxacillin MIC は完全に一致した。*mecA* 保有株 (+) は 79 株中 25 株であった。Oxacillin の MIC 値が 4 および 8 µg/mL の株はすべて *mecA* (+) であり非保有株 (-) は認めなかった。1 µg/mL の株で 1 株、2 µg/mL では 5 株が *mecA* (+) で、残りの 54 株は *mecA* (-) であった。PBP2' 産生性は oxacillin の MIC が 4 および 8 µg/mL の株では *mecA* と同様にすべての株で産生 (+) となった。一方、1 µg/mL の株で 6 株、2 µg/mL で 5 株が PBP2' (+) となり、*mecA*、PBP2' とともに oxacillin の MIC が感受性を示す場合に成績の乖離が認められた。

Cefoxitin テストでは oxacillin の MIC が 4 および 8 µg/mL の株のうち 1 株が 20 mm の感受性と判定される阻止円径を示し、1 および 2 µg/mL の株では 7 株が

17~19 mm の耐性と判定される阻止円径を示し oxacillin の MIC と乖離が認められた。他の株については oxacillin の MIC 値と一致し、その阻止円径は感受性株の場合は 24 mm、耐性株の場合は 14 mm であり、判定境界付近の阻止円径を示した前述の 8 株とは明らかに異なっていた。Cefoxitin テストによる判定と oxacillin の MIC 値による判定が乖離した 8 株の詳細を Table 2 に示した。*mecA*、PBP2' の成績より No. 51 は MSSA、その他 7 株は MRSA と考えられたが oxacillin MIC および cefoxitin テストでは異なる成績が得られた。

mecA (-) 54 株のうち PBP2' (+) が 5 株、弱陽性が 7 株存在した。この 7 株はラテックス粒子との凝集反応が弱く認められたため弱陽性と判定した。これらの合計 12 株は *mecA* (-) だけではなく、oxacillin の MIC および cefoxitin テストの成績においても MSSA の性状を示した (Table 3)。

Oxacillin の MIC、*mecA* 保有および PBP2' 産生性を基準とした場合の cefoxitin disk によるスクリーニング法のエラー検出頻度を Table 4 に示した。Oxacillin の MIC が耐性を示し cefoxitin テストで感受性であった very major error (VME) が 1.3%、oxacillin の MIC が感受性であり cefoxitin テストで耐性を示した major error (ME) が 8.9% であった。同様に *mecA* については VME、ME

Table 3. Results for PBP2 ' production and two methods of interpreting MRSA among 54 *mecA* negative strains

Strain No.	PBP2 '	Oxacillin MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Cefoxitin disk screen test	
			Zone diameter (mm)	Interpretation
12	W ^a	1	29	S
13	W	1	26	S
14	W	1	26	S
15	W	1	29	S
27	W	1	27	S
48	W	2	26	S
55	W	2	27	S
16	+	1	27	S
17	+	1	29	S
18	+	1	27	S
28	+	1	26	S
29	+	1	26	S

^a Weakly positive.

Table 4. Discordant between the results of the cefoxitin screening test and three reference methods

Reference methods	Error Rates (%)	
	Very major error ^a	Major error ^b
Oxacillin MIC	1.3	8.9
<i>mecA</i>	1.3	1.3
PBP2 '	7.6	1.3

^a Sensitive by the cefoxitin screening test and resistant by the reference method.^b Resistant by the cefoxitin screening test and sensitive by the reference method.

とも 1.3% , PBP2 '産生性では VME 7.6% , ME 1.3% であった。

III. 考 察

MRSA の β -lactam 系薬耐性は本菌が産生する細胞壁合成酵素 PBP2 'に起因する。PBP2 'はメチシリンをはじめとする β -lactam 系薬に対する結合親和性が他の PBP に比べると低く、このため、 β -lactam 系薬の存在下においても細胞壁合成が進行するため耐性になると報告されている^{5,6)}。この PBP2 '産生性については、近年ラテックス凝集反応による検出キットが発売され手軽に検査ができるようになった。一方、PBP2 'をコードしている遺伝子は *mecA* であるため、*S. aureus* の *mecA* 遺伝子の検出をすることで MRSA と MSSA の判別が可能であり^{7,8)}、両法とも gold standard とされている²⁻⁴⁾。しかし、世界的に各種の薬剤感受性測定用の自動機器が普及しているため、oxacillin または cefoxitin に対する感受性試験により MRSA が判定され、PBP2 '産生性や *mecA* 遺伝子の成績と一致しないケースが認められる。

本研究では oxacillin の MIC 値がブレイクポイント前後の 1 , 2 , 4 , 8 $\mu\text{g/mL}$ を示す BORSA について各種測定法により MRSA の判定を行った。まず、微量液体希釈

法による oxacillin の MIC 測定および VITEK2 による感受性測定により MSSA と判定された株のなかに 6 株の *mecA* (+) , PBP2 ' (+) 株が認められた。これらは oxacillin を用いた薬剤感受性試験のみの判定では MRSA を見逃してしまう可能性を示している。一方、oxacillin の感受性測定で MRSA と判定された株ではその他の性状より MSSA とすべき株は存在しなかった。

Louie らは oxacillin の MIC が 2 ~ 8 $\mu\text{g/mL}$ の *S. aureus* 37 株のすべてが PBP2 (-) , *mecA* (-) であったと報告し²⁾、ブレイクポイント付近の MIC 値を示す場合、測定法により成績に乖離が認められることを示した。また、Felten らは oxacillin の MIC が NCCLS の基準で感受性となる株のなかに *mecA* (+) 株が含まれていることを報告している⁹⁾。今回の成績も同様に oxacillin の薬剤感受性成績で MSSA とされた株に cefoxitin テスト、PBP2 ' および *mecA* の成績より MRSA と判定されるべき株が存在することが判明した。

今回 MRSA 判定に実施した cefoxitin テストは 2004 年に NCCLS より提唱された *mecA* 関連の耐性を検出する方法で、cefoxitin disk の阻止円径が 19 mm の場合 oxacillin 耐性、20 mm の場合 oxacillin 感受性と判定する。Felten らも cefoxitin を用いることにより *mecA* 保有であるにもかかわらず表現型で MSSA を示す株の PBP2 '産生性を誘導し oxacillin 耐性を容易に検出できると報告している^{4,9,10,11)}。表現型 MSSA においても *mecA* 保有の場合は薬剤との接触により耐性化が進み MRSA と同様に β -lactam 系抗菌薬に効果がないため MRSA として報告すべきである。本検討において各測定法間で MRSA , MSSA の判定が一致した株における cefoxitin disk の阻止円径は感受性株のグループでは 14 mm , 耐性株では 24 mm であった。一方、cefoxitin テストのみ耐性でその他の成績は MSSA と判定された株お

よび cefoxitin テスト以外の測定法で耐性となった株が各 1 株ずつ認められ, cefoxitin disk の阻止円径はそれぞれ 18 mm, 20 mm と判定境界値を示していた。また, 前述の oxacillin に対する感受性測定で MSSA を示し *mecA* (+), PBP2 (+) であった 6 株における cefoxitin disk の阻止円径は 17 ~ 19 mm で同様に判定境界値付近であった。以上の成績より cefoxitin テストは oxacillin 耐性を効率よく検出可能であるが 20 mm 前後の判定境界付近の阻止円径を認める場合はエラーが起こる可能性があるため, 他法の併用が望ましいと考える。

mecA (-) 株に PBP2 (+) 株が 5 株, 弱陽性株が 7 株認められた。PBP2 産生性は *mecA* によりコードされていること^{7,8)}, またその他の性状が感受性株の性状を示すことから, これらの株の PBP2 の成績は非特異的な反応によるものであると考えられ, 同様な現象が報告されている^{11,12)}。PBP2 産生性は菌体よりアルカリ抽出法で PBP2 を抽出し, 抗 PBP2 'モノクローナル抗体感作ラテックスと反応させ凝集を判定するキットで, ラテックスとの反応時間は約 3 分間と短時間で測定可能である。*mecA* の検出には PCR の設備を必要とするが, 本キットは一般の細菌検査室においても比較的容易に実施可能である。また, 欧米においてもスタンダードな方法として利用されている¹¹⁻¹³⁾。わが国においても今後さらに普及していくことが予想されるが, 非特異凝集が起こる可能性を考慮し使用すべきである。

以上, BORSA を中心に MRSA の各種判定方法について述べたが, *S. aureus* について明らかな MRSA の判定を行うことは難しいことではなく, oxacillin または cefoxitin 感受性, *mecA* の検出などいずれかの測定法を単独で用いても問題はない。しかし, BORSA に限っては oxacillin 感受性のみでは判断せず, *mecA* または cefoxitin テストなどを追加し最終判定を行うべきであると考え。また cefoxitin テストにおいても BORSA と同様に判定境界値付近を示した場合は他法による確認が必要であると考え。

文 献

- 1) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fourteenth informational supplement, M100-S14. NCCLS, Wayne, P.A., 2004
- 2) Louie L, Matsumura S O, Choi E, et al: Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 38: 2170 ~ 2173, 2000
- 3) Sakoulas G, Gold H S, Venkataraman L, et al: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. J Clin Microbiol 39: 3946 ~ 3951, 2001
- 4) Skov R, Smyth R, Clausen M, et al: Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 52: 204 ~ 207, 2003
- 5) Utsui Y, Yokota T: Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 28: 397 ~ 403, 1985
- 6) Song M D, Wachi M, Doi M, et al: Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS Lett 221: 167 ~ 171, 1987
- 7) Ubukata K, Nonoguchi R, Matsuhashi M, et al: Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. J Bacteriol 171: 2882 ~ 2885, 1989
- 8) Mitsuhashi M, Song M D, Ishino F, et al: Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 167: 975 ~ 980, 1986
- 9) Felten A, Grandry B, Lagrange P H, et al: Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol 40: 2766 ~ 2771, 2002
- 10) Fernandes C J, Fernandes L A, Collignon P, et al: Cefoxitin resistance as a surrogate maker for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 55: 506 ~ 510, 2005
- 11) Velasco D, Tomas M M, Cartelle M, et al: Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 55: 379 ~ 382, 2005
- 12) Cavassini M, Wenger A, Jatton K, et al: Evaluation of MRSA-screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 37: 1591 ~ 1594, 1999
- 13) Swenson J M, Williams P P, Killgore G, et al: Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. J Clin Microbiol 39: 3785 ~ 3788, 2001

Identification of MRSA by various methods to detect borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Akiko Kanayama, Yuko Takahashi, Kaoru Matsuzaki and Intetsu Kobayashi

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

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was identified by various methods, including the disk diffusion test, to predict *mecA*-mediated resistance by *Staphylococcus* with a cefoxitin disk, which was newly described in NCCLS (at present CLSI M100-S14 2004), among 79 strains of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) whose oxacillin MIC values were 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The results of the susceptibility testing of strains containing *mecA* did not agree with the oxacillin MIC values, and *mecA* (+) was present in 1 of the 30 strains and in 5 of the 30 strains that were susceptible to oxacillin at 1 and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. There were 12 PBP2'-producing strains among the 54 *mecA*(-) strains, and since the reaction of 7 of these strains to latex particles was weak, their susceptibility to oxacillin was judged to be weakly positive. However, since these 12 strains were susceptible to oxacillin and cefoxitin, the results of the PBP2' test were presumed to be due to a nonspecific reaction. The test results with the cefoxitin disk indicated that 53 of the 60 strains susceptible to oxacillin were also susceptible to cefoxitin, but the remaining 7 strains were resistant to cefoxitin, and the diameters of the inhibition zone were around the borderline values for identification. The frequency of errors in the cefoxitin susceptibility test were low, i.e., 1.3% for very major error and 8.9% for major error, but since the diameters of the inhibition zone in case of BORSA may be around the borderline values for identification, it is concluded that it is necessary to confirm the susceptibility of these strains to oxacillin by other methods in addition.