

【短報】

北部九州・山口地区における oxacillin 低感受性
および感受性 *Staphylococcus aureus* の *mecA* 遺伝子の保有状況和田 明子^{1,2)}・村谷 哲郎^{2,3)}・小林とも子²⁾・後藤 令子²⁾
木戸 直徳²⁾・古賀 一将²⁾・松本 哲朗³⁾¹⁾ 小倉医師会北九州中央臨床検査センター*²⁾ ひびき臨床微生物研究会³⁾ 産業医科大学医学部泌尿器科

(平成 19 年 3 月 19 日受付・平成 19 年 6 月 19 日受理)

2005 年に北部九州・山口地区において、oxacillin (MPIPC) の MIC $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下を示す *Staphylococcus aureus* を対象とし、*mecA* 保有の有無を検討した。さらに Kirby Bauer disk を用い cefoxitin (CFX) の阻止円径および寒天平板希釈法による MIC の測定も実施した。収集された 323 株の微量液体希釈法による MPIPC の MIC は $\leq 0.25 \sim 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。*mecA* 保有株は 9 株 (2.8%) 検出され、そのうち 8 株は、CFX の阻止円径 21 mm 以下であり、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の基準により MRSA と判定可能であった。*mecA* 保有株の 23.5% (4/17) は、外来患者皮膚材料由来株であり年齢別では、5 歳以下の株が 12.2% (5/41) を占めた。これら 9 株のうち外来患者由来 7 株は pulsed field gel electrophoresis (PFGE) により 4 パターンに分類され、数種類の MPIPC 感受性 *mecA* 陽性クローンが市中に広がっていると考えられた。*mecA* 陽性で MPIPC により MSSA と判定された株は、CLSI の推奨する CFX disk を用いることにより、2.8% から 0.3% まで減少した。しかし、MPIPC, CFX を用いても検出できない *mecA* 保有株が存在したことから、選択培地の使用なども考慮する必要がある。

Key words: MRSA, *mecA*, *Staphylococcus aureus*, cefoxitin

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は、病院感染を引き起こしやすいことから、早期検出および報告が重要な耐性菌である。また、有効な薬剤は、vancomycin, teicoplanin, arbekacin, linezolid などいわゆる抗 MRSA 薬に限られており、 β -lactam 系薬は MIC が低い場合でも使用することにより、PBP2' の誘導産生が起こり無効となるため、治療上も正確な報告が必要とされる耐性菌でもある。これまで MRSA の判定には、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 旧 NCCLS) に従い、微量液体希釈法の場合、2% NaCl 添加 Cation Adjusted Mueller Hinton Broth を用いて、24 時間培養した場合の oxacillin (MPIPC) の MIC が $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ を超えるものを MRSA と報告してきた。しかし、CLSI 2004 年版¹⁾では、新たに cefoxitin (CFX) disk によるスクリーニング法の追加が推奨された。これは近年、MPIPC の MIC は $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であるが、*mecA* 遺伝子を保有している *S. aureus* が特に市中を中心に増加していることがその理由であると思われる²⁾。このような株による感染症患者に対して経口セフェム系薬などを処方すると PBP2' の産生が誘導され、臨床的にも無効と

なる可能性が高い。したがって、早期に検出し、治療薬剤の変更を検討することは重要であると考えられる。そこで今回、われわれは共同研究として、北部九州・山口地区における MPIPC 感受性で *mecA* 遺伝子を保有する *S. aureus* の実態調査および CFX disk の有用性を検討する目的で、本研究を実施した。

菌株は、2005 年 7 月 28 日からの 5 週間に北部九州および山口地区の医療機関において、臨床材料より分離され、微量液体希釈法による MPIPC の MIC が $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下を示す *S. aureus* を対象とした。結果として、MPIPC $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ を示す株は分離されず、収集された株の MPIPC の MIC は $\leq 0.25 \sim 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。使用した菌株は、北九州市 60 施設 170 株、その他福岡県 9 施設 32 株、山口県 39 施設 94 株、長崎県 10 施設 25 株、佐賀県 1 施設 2 株の計 119 施設 323 株である。施設規模別では、19 床以下が 83 施設 170 株、20~299 床が 30 施設 116 株、300 床以上が 6 施設 37 株という内訳であった。薬剤感受性測定は、微量液体希釈法だけでなく、Kirby Bauer 法に準拠した CFX $30 \mu\text{g}$ 含有 disk を用い阻止円径の測定、さらに他の薬剤感受性測定との比較を行う目的で CLSI

*福岡県北九州市小倉北区中島 1-19-17

Table 1. Antimicrobial susceptibility of oxacillin and cefoxitin against oxacillin-susceptible *S. aureus*

	Hospital ID (in/out) ^a	Date (d/mo/y)	PFGE pattern	Specimen/ Age (yo)	Susceptibility				Inter- pretation ^e	<i>mecA</i> ^f
					Oxacillin		Cefoxitin			
					BD ^b (μ g/mL)	AD ^c (μ g/mL)	disk ^d (mm)	AD ^c (μ g/mL)		
ISA 19	1405 (out)	30/07/2005	A	skin/1	2	2	18	8	MRSA	+
ISA 134	8291 (out)	11/08/2005	A	skin/2	2	4	18	16	MRSA	+
ISA 180	Pm (in)	02/08/2005	C	sputum/72	2	4	19	4	MRSA	+
ISA 193	8291 (out)	17/08/2005	D	skin/2	2	1	20	8	MRSA ^h	+
ISA 210	8291 (out)	18/08/2005	D	skin/5	2	1	19	8	MRSA	+
ISA 218	8330 (out)	17/08/2005	F	pus/4	2	4	18	16	MRSA	+
ISA 299	8030 (out)	29/08/2005	G	sputum/66	2	4	18	16	MRSA	+
ISA 307	Pm (in)	29/08/2005	H	sputum/91	≤ 0.25	1	22	16	MSSA	+
Rsa 7544	0100 (out)	28/07/2005	G	otorrhea/43	2	4	19	16	MRSA	+
others (n = 314)				various ^g /0-106	$\leq 0.25-2$	0.06-2	22 <	0.5-2	MSSA	-

All isolates tested were Staphylococcal protein A-positive and Panton-Valentine leucocidin-negative by PCR.

a: Inpatient/outpatient.

b: Broth microdilution with 2% NaCl-cation adjusted Mueller Hinton broth.

c: Agar dilution with 2%NaCl-Mueller Hinton agar.

d: Kirby Bauer disk diffusion test.

e: The BD MIC of oxacillin exceeded 4 μ g/mL or the zone diameter of the cefoxitin disk was less than 19 mm were reported routinely as MRSA.

f: Detected by PCR.

g: Respiratory tract: 112; otorrhea: 75; pus: 38; feces 33; skin: 13; genital: 15; urine: 14; eye: 9; others: 9.

h: Based on CLSI M100-S17. If based on CLSI until M100-S16, the isolate is judged as MSSA.

Table 2. Isolation frequency of oxacillin-susceptible and *mecA*-positive *S. aureus*

	No. of isolates (<i>mecA</i> + /all)			<i>mecA</i> + (%)
	Inpatient	Outpatient	Total	
Respiratory tract	2/71	1/44	3/115	2.6
Otorrhea	0/1	1/75	1/76	1.3
Pus	0/13	1/26	1/39	2.6
Feces	0/5	0/28	0/33	0
Skin		4/17	4/17	23.5
Genital	0/2	0/13	0/15	0
Urine	0/2	0/12	0/14	0
Eye		0/5	0/5	0
Others	0/7	0/2	0/9	0
Total	2/101	7/222	9/323	2.8

に準拠した寒天平板希釈法による測定も追加した。*mecA* 保有の有無, *S. aureus* であることの確認を目的として Staphylococcal protein A (SPA), Panton-Valentin Leucocidin (PVL) 保有の有無を確認する目的でそれぞれ既報に従い, それぞれの遺伝子に設定した primer を作成³⁾ し PCR を行った。全株 SPA 陽性, PVL 陰性であった。感受性測定の結果と *mecA* 保有の有無を Table 1 に示す。323 株中 *mecA* 陽性となった株は 9 株 (2.8%) であった。保存株について, 微量液体希釈法, 寒天平板希釈法, ディスク拡散法とも再測定したところ, 同一結果を示し再現性は良好であった。9 株の MPIPC の MIC は微量液体希釈法では 1 株 ≤ 0.25 μ g/mL を示す株が存在し, その

他の 8 株は 2 μ g/mL であったが, 寒天平板希釈法では, 5 株が 4 μ g/mL, 3 株が 1 μ g/mL, 1 株が 2 μ g/mL を示した。CFX disk の阻止円径は, 9 株中 7 株が 19 mm 以下を示し, CLSI の 2006 年までの基準に従い, MRSA と判定することができた。さらに CLSI は 2007 年に CFX disk の基準を 21 mm まで引き上げた⁴⁾。*mecA* 陰性株の CFX disk 阻止円径は 22 mm 以上であり, この基準においても偽陽性となる株は認めず, 今回のデータからも支持できる基準である。21 mm 以下という基準を用いると偽陰性を示す株は 1 株 (0.3%) のみとなった。*mecA* 陽性株の年齢分布は, 5 歳以下では 5/41 株 (12.2%), 6~64 歳では 1/130 株 (0.8%), 65 歳以上では 3/149 株 (2.0%) であり, 低年齢で高率であった。また, 病床数別では 7 株がクリニック由来株であり, 残りの 2 株は同一施設由来であり, 約 230 床の病院の入院患者由来株であった。検査材料別分離頻度を入院患者と外来患者に分けて Table 2 に示す。外来患者皮膚材料由来株の頻度が最も高く, 23.5% であった。Table 1 に, これら 9 株の染色体 DNA を *Sma* I で切断した時の Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) の結果を示す。PFGE は既報に従い実施した⁵⁾。同一のパターンを示した ISA193 と ISA 210 は 2 歳と 5 歳の皮膚由来株であり分離日も近く, 外来患者ではあるが同一施設であり, 患者間の接触があった可能性も考えられるが, ISA 19 と ISA134 は山口地区と北九州地区の施設より分離された株であるが, 全く同一のパターンを示し, さらに同一パターンを示した ISA

299 と Rsa7544 は分離日も約 1 カ月異なっており、施設も異なっていた。同一施設の入院患者由来株である ISA 180 と ISA307 は異なるパターンを示した。これらの結果より MIPIC 感受性 *mecA* 陽性を示す数種類のクローンが、市中に広がっている可能性が示唆された。

欧米だけでなくアジア・オセアニア地域においても市中感染型 MRSA が問題となっている。市中感染型 MRSA の多くは PVL を産生し病原性が強いことが知られており、本邦においてもその分離が報告されている⁶⁾。しかし本邦で分離される市中感染型 MRSA は PVL 陰性株がほとんどを占めることが報告されており⁷⁾、今回分離された株も全株 PVL 陰性であった。一方、borderline oxacillin-resistant MRSA (BORSA) は種々の論文のなかで異なった解釈で使用されているが^{8,9)}、通常は *mecA* 陰性 MIPIC 耐性または低感受性株を指す。したがって、現在問題となっているのは、BORSA ではなく、*mecA* は保有しているが、MIPIC の MIC が 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下を示し、通常の検査では MSSA と判定されてしまう株である。CLSI では MRSA 判定には感受性測定の結果だけでなく、*mecA* の存在または PBP2' 蛋白の存在を挙げており、少なくとも重症感染症患者由来株の場合には、これらの検出を行い、陽性の場合には MRSA であると正確に報告することを推奨している。PBP2' 検出キット (デンカ生研) はラテックス凝集反応でその蛋白の存在を知ることができる簡便有用な試薬であるが、非特異的凝集反応を示す株がある¹⁰⁾ ため、その結果の解釈には注意を要する。また、*mecA* 検出キットも市販されているが、人的および試薬のコストを考えるとルチンで実施することは難しい。CLSI M100-S14 (2004 年版) より推奨された CFX 30 μg disk 拡散法は検査室でも通常業務で実施可能な方法である。さらに 2007 年に改定された CLSI M100-S17 の基準 21 mm を使用することにより、今回の検討では *mecA* 陽性で MSSA と判定されてしまう株は、CFX disk を用いることにより、2.8% から 0.3% まで減少した。今回の検討では偽陽性を示す株は認めなかったがこの点についても注目する必要がある。また、MIPIC でも CFX でも検出できない *mecA* 保有株もなお存在することから、今後このような株が増加するのであれば、日常の検査で選択培地の使用など有用な検査法の導入も考慮する必要がある。このような株の分離状況を今後とも研究として調査を継続し、公表していく必要があると考える。

文 献

1) Clinical and Laboratory Standards Institute: Table

2C. Disk diffusion screening test for prediction of *mecA*-mediated resistance in staphylococci. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (M100-S13) 2004; 24: 47

- 2) Yamazumi T, Marshall S A, Wilke W W, Diekema D J, Pfaller M A, Jones R N: Comparison of the Vitek Gram-Positive Susceptibility 106 card and the MRSA-screen latex agglutination test for determining oxacillin resistance in clinical bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2001; 39: 53-6
- 3) Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M O, Gauduchon V, et al: Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29: 1128-32
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute: Table 2C. Disk diffusion screening test for prediction of *mecA*-mediated resistance in staphylococci. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (M100-S17) 2007; 27: 51
- 5) Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K, Kato N, Takeuchi J: Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1991; 29: 2690-5
- 6) Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, Oishi T, Nishihara Y, Iwakura N, et al: A Pantone-Valentine leukocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan. J Clin Microbiol 2005; 43: 3356-63
- 7) 山本達男, 種池郁恵, 中川沙織, 岩倉信弘: Pantone-Valentine ロイコジン陽性の市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の出現。日化療会誌 2004; 52: 635-53
- 8) Liu H, Lewis N: Comparison of ampicillin/sulbactam and amoxicillin/clavulanic acid for detection of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11: 47-51
- 9) 金山明子, 高橋裕子, 松崎 薫, 小林真詰: 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。日化療会誌 2005; 53: 727-31
- 10) Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, et al: Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 379-82

Ratio of *mecA* gene in oxacillin-insusceptible and susceptible *Staphylococcus aureus*

Akiko Wada^{1,2)}, Tetsuro Muratani^{2,3)}, Tomoko Kobayashi²⁾, Ryoko Gotoh²⁾,
Naonori Kido²⁾, Kazumasa Koga²⁾ and Tetsuro Matsumoto³⁾

¹⁾ Kokura Medical Association in Kitakyushu City, 1-19-17 Nakashima, Kokurakita-ku, Kitakyushu, Fukuoka, Japan

²⁾ Hibiki Research Group for Clinical Microbiology

³⁾ Department of Urology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health

In northern Kyushu and Yamaguchi, 323 *Staphylococcus aureus* isolates which MIC of oxacillin was less than 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by broth microdilution method were collected in 2005. The susceptibility of isolates was examined using Kirby Bauer disk diffusion test of cefoxitin and MIC determination by agar dilution method. The MIC range of oxacillin against all 323 isolates was $\leq 0.25\text{--}2\ \mu\text{g}/\text{mL}$. *mecA* was detected from 9 (2.8%) of all isolates. In this 9, the inhibitory zone diameter of cefoxitin ranged from 18 to 22 mm. According to Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S17, if the zone diameter of the cefoxitin disk is less than 21 mm, the isolate is judged as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Eight of the 9 isolates were judged as MRSA by the cefoxitin disk diffusion test. Among specimens, isolates from skin had *mecA* most frequently at a ratio of 23.5% (4/17). Regarding patient age, isolates having *mecA* from patients who were less than 5 years old accounted for 12.2% (5/41) among patients in the corresponding age group. Seven of the 9 isolates that were *mecA*-positive and oxacillin-susceptible were outpatients. Since these 7 isolates were divided into 4 groups by *Sma* I-digested DNA pattern, the result suggested that some clone of *mecA*-positive and oxacillin-resistant *S. aureus* may have spread in this area.

Though *mecA*-positive and oxacillin-susceptible (MIC $\leq 2\ \mu\text{g}/\text{mL}$) isolates were detected 2.8% of all isolates, the ratio was reduced by using cefoxitin disk diffusion test until 0.3%. The frequency of *mecA*-positive, oxacillin-susceptible, and cefoxitin-susceptible *S. aureus* isolates is yet very low, but it is important to continue studying its ratio.