

〈原 著〉

Vancomycin resistant *Enterococcus* spp. スクリーニング培地の評価上田舞衣子^{1,2)}・村谷哲郎^{1,2,3)}・朔 晴久^{1,2,3)}¹⁾ ひびき AMR 研究会²⁾ ひびき臨床微生物研究会³⁾ 愛信会小倉到津病院

(2022年9月11日受付)

VREによる院内感染に関する報告は国内でも多数あり、早期に検出し封じ込める必要がある耐性菌である。Vancomycin resistant *Enterococcus* spp. (VRE) 保菌者が見つかった時や入院時耐性菌スクリーニングとしては、全株分離同定、薬剤感受性試験を行うことは、効率的ではなく、VRE選択培地の使用が有用である。今回、カナダで既に使用されている新しいVRE選択培地である「CHROMagar™ VRE blue (CHROMagar)」(CH-blue) を評価する機会を得たので、既存の関東化学が販売している「CHROMagar™ VRE (CHROMagar)」(CH-VRE) および日本ベクトン・ディッキンソンの「BD BBL™ VRE 選択培地 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)」(BD-VRE) を対照として、各種検討を行った。*vanA*, *vanB*, *vanD* を保有する153株およびそれらを保有しない *Enterococcus gallinarum* 25株, *Enterococcus casseliflavus* 25株を含む wild type 114株の計267株を用いた。これらの菌株は、ミスラ法に準じた方法で血液寒天培地, CH-VRE, CH-blue, BD-VRE の4種類の培地を用い菌の発育を評価した。

感度は外来性VCM耐性因子 *vanA*, *vanB*, *vanD* 保有株を検出できるか否かとし、特異度は外来性VCM耐性因子を有さない株 (*vanC* 保有株を含む) を検出しないこととした。10⁸ cfu/spot では3種類の培地とも感度97%以上、10⁶ cfu/spot では93%以上であった。10³ cfu/spot では少し感度は落ちたが、82.4~85.0%であった。特異度は、CH-blueは10⁶ cfu/spot でも100%であり、CH-VREの83.3%、BD-VREの99.1%よりも優れていた。10³ cfu/spot では、CH-blueおよびBD-VREの特異度は100%であったが、CH-VREは92.1%であった。カナダでは既に使用されているCH-blueは、現在使用されているCH-VREと比較して、VanC型の発育を阻止するという点において、明らかに優れていた。また、CH-blueはVCMのMICが低い*vanB* 保有 *E. faecium* に関しては、10⁶ cfu/spot での検出感度は、CH-VREよりは劣るものの10⁸ cfu/spot では同等であり、臨床現場で使用するには優れた培地であり、BD-VREと同等の性能を有する選択培地であると考えられた。

序文

バンコマイシン (VCM) は、1956年に放線菌の *Streptomyces orientalis* の培養液中から分離されたグリコペプチド系抗生物質である。*Staphylococcus aureus* を含むグラム陽性菌に対して優れた抗菌力を有するが、腎毒性があり、有効な濃度範囲が狭いため、同様の抗菌スペクトルを有し、安全性の高い β -lactamaseに安定なペニシリンやセフェム系が存在したため、国内では使用されていなかった。1980年代の中盤以降より、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が増加したことより、欧米で使用されていた注射用VCMの使用が待望され、1991年より、国内でも使用できるようになった。その後、MRSAに有効な薬剤として、テイコプラニン、アルベカシン、リネゾリド、ダプトマイシンなどが上市されたが、VCMは現在でも重症感染症を含むMRSA感染症の第一選択薬として推奨されている¹⁾。また現在では、適応菌種も拡大され、添付文書では、MRSAだけでなく、メチシリン耐性コアグラゼ陰性ブドウ球菌 (MRCNS)、ペニシリン耐性肺炎球菌、MRSAまたはMRCNS感染が疑われる発熱性好中球減少症となっている。

VCMは、細菌の細胞膜の外側に存在する膜構造である細胞壁の構成成分であるムレインモノマーと水素結合して、細胞壁の構築を阻害する。VCMの作用機序は、細菌細胞壁のペプチドグリカンの前駆体であるペプチドグリカンモノマーのペンタペプチド l-Ala-d-Glu-l-Lys-d-Ala-d-Ala の4番目と5番目の-d-Ala-d-Ala部位に水素結合することにより、その結果ペプチドグリカンモノマーと架橋酵素の結合を阻害し、細菌の発育を阻害する。VCM-resistant *Enterococcus* spp. (VRE) とは、VCMに耐性を獲得した *Enterococcus* spp. の総称である。1988年に英国で²⁾、本邦では1996年に初

めて分離された³⁾。VREのVCM耐性機序は、ペプチドグリカンモノマーのペンタペプチド末端のd-Alaがd-Serまたはd-lactateに置換することにより、VCMの親和性が低下することによるものである。VREはLigaseのタイプにより、VanA, B, C, D, E, G, L, M, Nの9種類のタイプが報告されている⁴⁾。ペンタペプチド末端がd-lactateに置換したVanA, B, D, MタイプはVCMの耐性度が高く、VanC, E, Gはd-Serに置換したタイプであり、VCMの耐性度は低い。また、*vanC*は菌種特異的に染色体上に存在し自然耐性であるが、その他は外来遺伝子であり、様々な菌種から見出されている。VCMの耐性度が高く、院内感染に関する報告が多いのは、*vanA* および *vanB* 保有VREである。海外では *vanD* が *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum* など様々な菌種に関して報告されている^{5,6)} ことから、今後注意が必要である。

Enterococcus spp. は、腸管内常在菌であり、便から多量に排泄されるので、便から *Enterococcus* spp. が分離されても、通常は薬剤感受性試験はもちろん、同定も行わない。したがって、VREが見つかるのは、尿や血液培養などから分離された場合に同定および薬剤感受性試験を実施した時である。腸管内では乳酸菌の一種として働いており、病原性は低いものの、臓器移植後の患者、免疫低下患者では、重症感染症の起炎菌となり得ることが知られており⁷⁾、院内感染対策が重要な耐性菌である⁸⁾。VRE保菌者が見つかった時や入院時耐性菌スクリーニングとしては、全株分離同定、薬剤感受性試験を行うことは、効率的ではなく、VRE選択培地の使用が有用である。今回、カナダで既に使用されている新しいVRE選択培地である「CHROMagar™ VRE blue (CHROMagar) (CH-blue)」を評価する機会を得たので、既存の関東化学が販売している「CHROMagar™ VRE (CHROMagar) (CH-VRE)」および日本ベクト

ン・ディッキンソンの「BD BBL™ VRE 選択培地 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)」(BD-VRE) を対照として、各種検討を行った。

材料と方法

1. 使用菌株

ひびき臨床微生物研究会共同研究として収集された1998年～2019年までに日本国内の医療機関にて分離されたVREを含む*Enterococcus* spp. を用いた。収集株の中から、同一患者同一菌種は1株とし、同時期の同一施設由来株をなるべく避け、Table 1に示す*vanA*, *vanB*, *vanD*を保有する153株およびそれらを保有しない*Enterococcus gallinarum* 25株, *Enterococcus casseliflavus* 25株を含むwild type 114株の計267株を用いた。*vanA*⁹⁾, *vanB*¹⁰⁾, *vanD*¹¹⁾, *vanC1*⁹⁾, *vanC2*¹²⁾については、

Table 2に示すprimerを用いPCR法により決定した。

2. 試験方法

凍結保存されている被検菌を血液寒天培地に接種し、35°C1晩培養した菌株を用いた。血液寒天培地, CH-VRE, CH-blue, BD-VREの4種類の培地を用い、ミスラ法¹³⁾に準じた方法で菌の発育を評価した。すなわち、被検菌を0.9%生理食塩水に懸濁し、McFarland 0.5の菌液を作成した。この菌液0.1 mLを0.9%生理食塩水0.9 mLに添加することにより、10倍希釈液5段階作成した。それぞれの培地を6分画し、4種類の培地に薄い濃度から10 μLずつ滴下した。すなわち原液は10⁶ cfu/spotとなる。35°C通常大気で48時間培養後に菌の発育を判定した。また、最高濃度で発育しなかった*vanA*および*vanB*保有株については、10⁷および

Table 1. Used strains

	No. of isolates					Total
	VanA	VanB	VanD	VanC alone	non	
<i>Enterococcus faecalis</i>	28	22	5		35	90
<i>Enterococcus faecium</i>	31	29			26	86
<i>Enterococcus avium</i>	14				1	15
<i>Enterococcus raffinosus</i>	19				2	21
<i>Enterococcus gallinarum</i>	5			25		30
<i>Enterococcus casseliflavus</i>				25		25
Total	97	51	5	50	64	267

Table 2. Primers used in this study for detection of different resistance genes by PCR-based method

Gene	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	Size of PCR product (bp)	Reference
<i>vanA</i>	VanA-173F	GAATGGGAAAACGACAATTGC	736	9
	VanA-908R	GTACAATGCGGCCGTTA		
<i>vanB</i>	VanB-148F	AAGCTATGCAAGAAGCCATG	536	10
	VanB-683R	CCGACAATCAAATCATCCTC		
<i>vanD</i>	VanD-396F	TAAGGCGCTTGCATATACCG	461	11
	VanD-856R	TGCAGCCAAGTATCCGGTAA		
<i>vanC1</i>	VanC1-139F	TGGTATTGGTATCAAGGAAACC	829	This study 9
	VanC1-967R	CTTCCGCCATCATAGCT		
<i>vanC2</i>	VanC2-318F	CGGGGAAGATGGCAGTAT	484	12
	VanC2-801R	CGCAGGGACGGTGATTTT		

10⁸ cfu/spotについても実施した。1コロニーでも発育を認めた場合は、陽性と判定した。また、CH-VREの添付文書では、*vanA*および*vanB*保有*E. faecalis*/*E. faecium*のコロニーは藤色、*E. gallinarum*/*E. casseliflavus*のコロニーは青色または発育抑制と記載されているが、*vanA*保有*E. faecalis*で青色のコロニー、*E. gallinarum*、*E. casseliflavus*でピンク色のコロニーを形成する株が複数存在し、また、ピンク色と青色の中間色を示す株も多数存在したので、CH-VREに発育するピンク色から青色のコロニーはすべて発育とし、他の2種類の培地も含め、無色のコロニーは除外した。

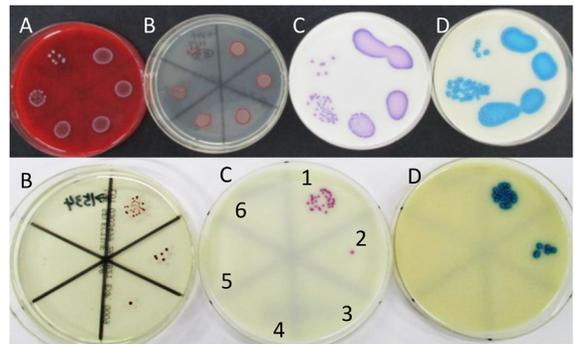
いずれかの培地に発育しなかった株については、血液寒天培地に発育したコロニーから煮沸法により、DNAを抽出し、Table 2に示す*vanA*、*vanB*、*vanD*のprimerを用いて、PCRを実施し、陰性であった場合は、プラスミド脱落株として、wild type株として集計した。

薬剤感受性測定は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準じた寒天平板希釈法で測定した¹⁴⁾。

結果

Figure 1にミスラ法実施時の結果を示す。上段はVCMのMICが256μg/mLの*vanA*保有*E. faecalis*であり、3種類いずれの培地とも10 cfu/spotまで非選択培地である血液寒天培地と同等の発育を認めているが、下段のVCMのMICが4μg/mLの*vanB*保有*Enterococcus faecalis*は、10⁴ cfu/spot以下では、BD-VREで1 colony発育を認めたが、他の2種類の培地は発育を認めていないのがわかる。これらの結果のうち、*vanA*、*vanB*、*vanD*保有株についてTable 3に示す。*vanA*保有株については、*E. faecalis*は10⁴ cfu/spotまで、*E. faecium*は10³ cfu/spotまで、*E. gallinarum*は10 cfu/spotまで

Fig. 1. Results of Misra's method.



Upper: *Enterococcus faecalis* SVR1117 (VanA type, MIC of vancomycin 256 μg/mL)

Lower: *Enterococcus faecalis* SVR1534 (VanB type, MIC of vancomycin 4 μg/mL)

A: Blood agar, B: BD BBL™ VRE selective Agar, C: CHROMagar™ VRE, D: CHROMagar™ VRE Blue

Inoculum size: 1, 10⁶ cfu/spot; 2, 10⁵ cfu/spot; 3, 10⁴ cfu/spot; 4, 10³ cfu/spot; 5, 10² cfu/spot; 6, 10 cfu/spot.

すべての培地で全株発育を認めた。*E. avium*では、CH-VRE培地で10⁵ cfu/spotまで2株発育せず、そのうち1株は、10⁸ cfu/spotでも発育しなかった。*E. raffinosus*では、CH-VREおよびCH-blueで2株は、10⁸ cfu/spotでも発育を認めなかった。

*vanB*保有株については、*E. faecalis* 22株、*E. faecium*についてはVCMのMICが2μg/mL以下の17株とVCMのMICが4μg/mL以上の12株の3群に分けて示す。*E. faecalis*では、10⁵ cfu/spotまではすべての培地で発育を認めた。VCMのMICが2μg/mL以下の*E. faecium*については、MIC 1μg/mLの1株は10⁸ cfu/spotでも3種類いずれの培地でも発育を認めなかった。これらの株について、血液寒天培地に発育したコロニーからDNA templateをとり、PCRを行ったところ、全株*vanB*陽性であった。10⁶ cfu/spotでの検出率は、3種類の培地とも*E. faecalis* 100% (22/22)、VCM 4μg/mL以上の*E. faecium* 91.7% (11/12)であった。VCMのMIC 2μg/mL以下の*E. faecium*株の10⁶ cfu/spotでの検出率は、CH-VRE 94.1%、BD-VRE 66.7%、CH-blue 55.6%の順であったが、10⁸ cfu/spotでは3種類の培地とも94.1% (16/17)と同じであった。

Table 3. Results of Misra's method for vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.

	MIC of VCM ($\mu\text{g/mL}$)	The ratio of growth strains (%)								
		Inoculum size (cfu/spot)								
		10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10	
<i>Enterococcus faecalis</i>	(n=28)									
	CH-VRE			100	100	100	100	100	100	
	CH-blue	32–1024		100	100	100	100	100	100	
	BD-VRE			100	100	100	96.4	96.4	96.4	
<i>Enterococcus faecium</i>	(n=31)									
	CH-VRE			100	100	100	100	100	93.5	
	CH-blue	128–512		100	100	100	100	100	100	
	BD-VRE			100	100	100	100	96.8	96.8	
<i>Enterococcus avium</i>	(n=14)									
	CH-VRE		92.9	92.9	92.9	85.7	85.7	85.7	85.7	78.6
	CH-blue	64–512	100	100	100	100	100	92.9	92.9	92.9
	BD-VRE		100	100	100	100	100	100	100	
<i>Enterococcus raffinosus</i>	(n=19)									
	CH-VRE		89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5
	CH-blue	64–512	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	84.2
	BD-VRE		100	100	100	100	100	94.7	94.7	
<i>Enterococcus gallinarum</i>	(n=5)									
	CH-VRE			100	100	100	100	100	100	
	CH-blue	256–512		100	100	100	100	100	100	
	BD-VRE			100	100	100	100	100	100	
<i>Enterococcus faecalis</i>	(n=22)									
	CH-VRE			100	100	95.5	95.5	95.5	90.9	
	CH-blue	4–512		100	100	95.5	95.5	90.9	90.9	
	BD-VRE			100	100	100	95.5	90.9	81.8	
<i>Enterococcus faecium</i>	(n=17)									
	CH-VRE		94.1	94.1	94.1	88.2	47.1	5.9	0	0
	CH-blue	0.5–2	94.1	82.4	58.8	52.9	35.3	5.9	0	0
	BD-VRE		94.1	76.5	70.6	58.8	47.1	17.6	0	0
<i>Enterococcus faecium</i>	(n=12)									
	CH-VRE		100	100	91.7	75.0	75.0	58.3	41.7	8.3
	CH-blue	4–32	100	91.7	91.7	83.3	58.3	41.7	16.7	16.7
	BD-VRE		100	91.7	91.7	75.0	66.7	41.7	25.0	8.3
<i>Enterococcus faecalis</i>	(n=5)									
	CH-VRE			100	100	100	100	100	100	
	CH-blue	32–512		100	100	100	100	100	100	
	BD-VRE			100	100	100	100	100	100	

CH-VRE: CHROMagar™ VRE (CHROMagar), CH-blue: CHROMagar™ VRE blue (CHROMagar), BD-VRE: BD BBL™ VRE selective agar (Becton Dickinson and Company)

今回使用した VCM $2\mu\text{g/mL}$ 以下の *vanB* 保有 *E. faecium* は、パルスフィールド電気泳動による遺伝子タイプが同じ株でも VCM の MIC が $1\sim 64\mu\text{g/mL}$ まで異なるタイプである。また、使用した全株を実施したわけではないが、CLSI に準拠した寒天平板希釈法、微量液体希釈法では VCM の MIC が $2\mu\text{g/mL}$ 前後となる株を、市販の方法で測定すると、栄研ドライプレート (栄研化学)、栄研

DPS192 (栄研化学)、BD フェニックス™ (日本 BD) ではほぼ同じ値となるが、VITEK-2 (ビオメリュー・ジャパン)、RAISUS (日水製薬) では $8\sim >16\mu\text{g/mL}$ となった。

vanD 保有 *E. faecalis* 5 株については 3 種類の培地とも 10 cfu/spot まで、非選択培地である血液寒天培地と同等の発育を認めた。

Table 4 に 10^8 cfu/spot 接種した場合でもいずれか

Table 4. The strains that did not grow on some or any medium when inoculated with 10⁸ cfu/mL

Organism	Strain No.	Resistant gene	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		No. of growth colonies at 10 ⁸ cfu/spot**		
			VCM	TEIC	CH-VRE	CH-blue	BD-VRE
<i>Enterococcus avium</i>	SVR1384*	<i>vanA</i>	256	2	0	1+	3+
<i>Enterococcus raffinosus</i>	SVR163	<i>vanA</i>	256	32	0	1	3+
<i>Enterococcus raffinosus</i>	SVR1312	<i>vanA</i>	1024	512	0	2+	3+
<i>Enterococcus faecium</i>	SVR1792	<i>vanB</i>	1	0.5	0	0	0

Abbreviations: VCM, vancomycin; TEIC, teicoplanin; the others, see footnote of Table 3.

*: *vanS* mutation strain

** : 3+, equivalent to control growth; 2+, slightly less than control growth; 1+, less than control growth, 0 and 1, number of growth colony.

Table 5. Results of Misra's method for non-possessing exogenous vancomycin-resistant factor

	MIC of VCM ($\mu\text{g/mL}$)	<i>n</i>	The ratio of growth strains (%)					
			Inoculum size (cfu/spot)					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10
<i>Enterococcus gallinarum</i>	CH-VRE	(<i>n</i> =25)	60.0	52.0	48.0	32.0	ND	ND
	CH-blue	4–16	0	0	0	0	ND	ND
	BD-VRE		0	0	0	0	ND	ND
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CH-VRE	(<i>n</i> =25)	16.0	12.0	8.0	4.0	ND	ND
	CH-blue	2–8	0	0	0	0	ND	ND
	BD-VRE		4.0	4.0	4.0	0	ND	ND
<i>Enterococcus faecalis</i>	CH-VRE	(<i>n</i> =35)	0	0	0	0	ND	ND
	CH-blue	1–4	0	0	0	0	ND	ND
	BD-VRE		0	0	0	0	ND	ND
<i>Enterococcus faecium</i>	CH-VRE	(<i>n</i> =26)	0	0	0	0	ND	ND
	CH-blue	0.5–2	0	0	0	0	ND	ND
	BD-VRE		0	0	0	0	ND	ND
<i>Enterococcus avium</i>	CH-VRE	(<i>n</i> =1)	0	0	0	0	0	0
	CH-blue	0.5	0	0	0	0	0	0
	BD-VRE		0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus raffinosus</i>	CH-VRE	(<i>n</i> =2)	0	0	0	0	0	0
	CH-blue	0.5, 4	0	0	0	0	0	0
	BD-VRE		0	0	0	0	0	0

Abbreviations: See footnote of Table 3.

ND: not done

の培地に発育しなかった4株について個別データを示す。*E. faecium* SVR1792は、VCMのMICは1 $\mu\text{g/mL}$ と低い株であるが、10⁸ cfu/spotを接種しても3種類すべての培地とも発育しなかった。対照として用いた血液寒天培地のコロニーを釣菌し、PCRを行ったところ、*vanB*は検出されたので、*vanB*を含む*vanB* gene clusterのどこかに変異があり、VCM耐性に寄与していない可能性が考えられ

る。*E. avium* SVR1384は、既報¹⁵⁾の株と同じく*vanS*の50, 54, 69番目のアミノ酸に変異を有する株であり、VCMのMICは256 $\mu\text{g/mL}$ と高い株であるが、teicoplaninのMICは2 $\mu\text{g/mL}$ と低い株である。この株に対しては、CH-blueおよびBD-VREとも接種菌量10 cfu/spotでも対照と同様の発育を認めており、発育しないのはCH-VREのみの現象であった。*E. raffinosus* SVR163株とSVR1312株

Table 6. Sensitivity and specificity for detecting vancomycin resistant *Enterococcus* spp.

	No. of isolates and its ratio										
	10 ⁸ cfu/spot		10 ⁶ cfu/spot				10 ³ cfu/spot				
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity		Specificity		Sensitivity		Specificity		
<i>n</i>	153		153	114		153	114		114		
CH-VRE	149	97.4%	ND	148	96.7%	95	83.3%	127	83.0%	105	92.1%
CH-blue	150	98.0%	ND	143	93.5%	114	100.0%	126	82.4%	114	100.0%
BD-VRE	152	99.3%	ND	147	96.1%	113	99.1%	130	85.0%	114	100.0%

Abbreviations: See footnote of Table 3.

ND: not done

Sensitivity: the ratio of the number of growth strains in number of test strains that have *vanA*, *vanB*, or *vanD*.

Spesicity: the ratio of the number of no growth strains in number of test strains that have no *vanA*, *vanB*, or *vanD*.

のVCMのMICは256および1024 μ g/mLと高い株であり、BD-VREは接種菌量10cfu/spotでも対照と同等の発育を認めたが、CH-VREは10⁸cfu/spotでも全く発育せず、CH-blueも10⁸cfu/spotでは発育を認めたが、10⁷cfu/spotでは発育を認めなかったことより、ChromAgar社の培地成分の何かがこの2株の発育に影響を与えていると考えられる。

Table 5に*vanC1*を染色体上に保有する*E. gallinarum*、*vanC2*を保有する*E. casseliflavus*を含む外来性のVCM耐性遺伝子を保有しない113株の結果を示す。CH-blueは10⁶cfu/spotにおいても、113株すべての発育を阻止した。BD-VREは*E. casseliflavus* 1株のみ10⁴cfu/spotでも発育を認めた。この株は他の2種類の培地では10⁶cfu/spotでも発育しなかった。CH-VREは、*E. gallinarum*は、10⁶cfu/spotで60.0% (15/25)、10³cfu/spotでも32.0% (8/25)の発育を認めた。CH-VREは、*E. casseliflavus* 10⁶cfu/mlで16.0% (4/25)の発育を認めた。

Table 6に10⁸、10⁶、10³cfu/spotにおける感度と特異度を示す。感度は外来性VCM耐性因子*vanA*、*vanB*、*vanD*保有株を検出できるか否かとし、特異度は外来性VCM耐性因子を有さない株(*vanC*保有株を含む)を検出しないこととした。10⁸cfu/spotでは3種類の培地とも感度97%以上、10⁶cfu/spotでは93%以上であった。10³cfu/spotでは少し感度は落ちたが、82.4~85.0%であった。特異度は、

CH-blueは10⁶cfu/spotでも100%であり、CH-VREの83.3%、BD-VREの99.1%よりも優れていた。10³cfu/spotでは、CH-blueおよびBD-VREの特異度は100%であったが、CH-VREは92.1%であった。

考察

感染症予防法では、五類感染症全数報告の対象としてバンコマイシン耐性腸球菌感染症が指定されている。2013年に*vanA*、*vanB*の検出という言葉ははずれたが、VCMのMIC 16 μ g/mL以上の*Enterococcus* spp.で感染症の起炎菌と推定された場合は、7日以内の報告が必要である。この報告は感染症発症患者のみであり、また、VanC型VREも含んでいるため、感染対策上重要なVanA型やVanB型VREの蔓延状況についてはわからない。European Centre for Disease Prevention and Controlの2020年の報告では¹⁶⁾、東ヨーロッパ諸国の*E. faecium*のVCM耐性率は30%以上であり、ドイツ、イタリアでも20%を超えている。米国では減少傾向にあるものの依然として分離数は多く、米国 Centre for Disease Prevention and Controlの驚異のレベルは2番目に高いSerious Threatsに位置づけられている¹⁷⁾。一方、JANISの2021年の入院患者由来株の報告では、VCM非感受性の*E. faecalis*は0.01% (15/137,886)、*E. faecium*は2.6% (1,680/

62,810)と報告されており、欧米よりはかなり少ない¹⁸⁾。現在では、リネゾリド、ダプトマイシンなどVREに有効な抗菌薬は複数存在するものの、院内感染に関する報告は国内でも多数あり^{19,20)}、早期に検出し封じ込める必要がある耐性菌であることは間違いない。

腸管内の常在菌である *Enterococcus* spp. をすべて同定して薬剤感受性試験を実施することは、コストおよび労力面で現実的ではないので、選択培地を使用してスクリーニングすることが有用である。VRE 選択培地に求められるのは、染色体上に *vanC* を有する *E. casseliflavus* および *E. gallinarum* の発育を抑制し、*vanA* および *vanB* など外来性のVCM耐性遺伝子を有する *Enterococcus* spp. を検出することである。以前はエスクリン培地にVCMを添加した培地も用いられていた²¹⁾が、腸管内の常在菌であるVanC型も検出してしまうため、特に便を用いたスクリーニング検査では、精査する株数が膨大となり、検査室の負担が大きかった。今回使用した3種類のVRE選択培地はこの欠点が改良されているものであり、 10^6 cfu/spot における感度は93.5~96.7%、特異度は83.3~100%と優れており、いずれの培地とも有用であると考えられた。感度の点では、VCMのMICが $2\mu\text{g/mL}$ 以下のVanB型 *E. faecium* に対しては、CH-VREの検出率が優れていた。一方、特異度に関しては、*vanC* を染色体上に有する *E. gallinarum* および *E. casseliflavus* が、CH-VREで発育する割合が多いため、他の2種類の培地よりも劣っていた。BD-VREでは良好な発育を認めたが、CH-VREおよびCH-blueでは 10^8 cfu/mLでも発育しなかった *vanA* 保有 *E. raffinosus* が2株存在した。*E. raffinosus* はこれら2株以外に17株使用したが、すべていずれの培地でも良好な発育を認めており、菌種特異的な現象ではない。これら2株のVCMのMICは、256および $1024\mu\text{g/mL}$ であり、再現性も確認できたことより、VCMではない培地成分が菌株特異

的に働いたものと考えられる。CH-VREでは、VCM $256\mu\text{g/mL}$ の *vanA* 保有 *E. avium* 1株でも同様の現象を認めた。

今回使用したCLSI標準法でVCMのMICを測定すると $2\mu\text{g/mL}$ 以下となる *vanB* 保有 *E. faecium* は、測定する機器により感染症法の基準を満たすかどうかという違いが出る株であるが、*vanB* を保有している株であり、早期検出し感染対策をとることは重要であると考えられることより、VRE選択培地で検出出来ることが望ましい。

カナダでは既に使用されているCH-blueは、現在使用されているCH-VREと比較して、VanC型の発育を阻止するという点において、明らかに優れていた。VCMのMICが低い *vanB* 保有 *E. faecium* に関しては、 10^6 cfu/spotでの検出感度は、CH-VREよりは劣るものの 10^8 cfu/spotでは同等であり、臨床現場で使用するには優れた培地であり、BD-VREと同等の性能を有する選択培地であると考えられた。

利益相反

本試験で使用した市販のVRE選択培地2種類およびCHROMagar™ VRE blue、ならびに血液寒天培地は関東化学より提供を受けた。

引用文献

- 1) MRSA感染症の治療ガイドライン作委員会編：MRSA感染症の治療ガイドライン 改訂版2019。日本化学療法学会・日本感染症学会。2019。
- 2) Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC: Vancomycin-resistant enterococci. Lancet. 1988 2-9; 1 (8575-6): 57-8.
- 3) Ishii Y, Ohno A, Kshitani S, Iwata M, Yamaguchi K: Identification of *vanB*-type vancomycin resistance in *Enterococcus gallinarum* from Japan. J Infect Chemother 1996; 2: 102-5.
- 4) Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR: Molecular characterization of

- Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel d-Ala-d-ser gene cluster, vanL. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 2667–72.
- 5) Tanimoto K, Nomura T, Maruyama H, *et al.*: First vanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus* isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 3966–7.
 - 6) Depardieu F, Foucault ML, Bell J, *et al.*: New combinations of mutations in VanD-Type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus avium* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 1952–63.
 - 7) DiazGranados CA, Jernigan JA: Impact of vancomycin resistance on mortality among patients with neutropenia and enterococcal bloodstream infection. *J Infect Dis.* 2005; 191: 588–95.
 - 8) 高田 徹, 石川崇彦, 村谷哲郎, 他: *Clostridium difficile* 関連腸炎に対し経口バンコマイシンの投与中に便よりVREが検出された症例の経過とその後の院内感染対策。環境感染誌2006; 21: 6–11.
 - 9) Dukta-Malen S, Evers S, Courvalin P: Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 24–7.
 - 10) Elsayed S, Hamilton N, Boyd D, Mulvey M: Improved primer design for multiplex PCR analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2367–8.
 - 11) Domingo M-C, Huletsky A, Giroux R, Picard FJ, Bergeron MG: vanD and vanG-like gene clusters in a Ruminococcus species isolated from human bowel flora. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 4111–7.
 - 12) Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC: Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2325–30.
 - 13) Miles AA, Misra SS, Irwin JO: The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond).* 1938; 38: 732–49.
 - 14) Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. M07. Document M07—11th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. USA.
 - 15) Hashimoto Y, Tanimoto K, Ozawa Y, Murata T, Ike Y: Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant enterococcus strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. *FEMS Microb Lett.* 2000; 185: 247–54.
 - 16) European Centre for Disease Prevention and Control: Surveillance atlas of infectious diseases. <https://www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>
 - 17) Center for disease control and prevention. Antibiotic resistance threats in the United States 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019: 85–6.
 - 18) JANIS公開情報2021年1月～12月年報(全集計対象医療機関) 院内感染対策サーベイランス検査部門【入院検体】7. 主要菌の抗菌薬感受性。
 - 19) 浅沼秀臣, 吉崎清美, 岩井中里香, 卸川絃光, 佐藤正幸: 当院におけるバンコマイシン耐性腸球菌のアウトブレイクへの対応。環境感染誌2012; 27: 226–33.
 - 20) Kitagawa D, Komatsu M, Nakamura A, *et al.*: Nosocomial infections caused by vancomycin-resistant *Enterococcus* in a Japanese general hospital and molecular genetic analysis. *J Infect Chemother.* 2021; 27: 1689–93.
 - 21) Suwantarant N, Roberts A, Prestridge J, *et al.*: Comparison of five chromogenic media for recovery of vancomycin-resistant enterococci from fecal samples. *J Clin Microb.* 2014; 52: 4039–42.

The evaluation of Vancomycin-resistant enterococci selective agar

Maiko Ueda^{1,2)}, Tetsuro Muratani^{1,2,3)} and Haruhisa Saku^{1,2,3)}

¹⁾ Hibiki AMR Laboratory

²⁾ Hibiki Research Group for Clinical Microbiology

³⁾ Aishinkai Kokura Itozu Hospital

There are some reports of nosocomial infections caused by vancomycin-resistant enterococci (VRE) in Japan, and it is an antimicrobial resistant bacterium that needs to be detected and prevention of outbreak at an early stage. As a screening method for VRE carriers, it is very inefficient to isolate and identify enterococci from clinical specimens, especially feces, and to perform antimicrobial susceptibility test. In such cases, the use of VRE selective media is a useful method. This time, we had the opportunity to evaluate “CHROMagar™ VRE blue (CHROMagar)” (CH-blue), a new VRE selective medium already in use in the United States. To evaluate the performance of CH-blue, VRE detect test were performed using “CHROMagar™ VRE (CHROMagar)” (CH-VRE) and “BD BBL™ VRE selective medium (Becton Dickinson and company)” (BD-VRE), as controls. A total of 267 strains were used, including 153 enterococcal strains having *vanA*, *vanB*, and *vanD*, and 114 wild type enterococcal strains including 25 strains of *Enterococcus gallinarum* and 25 strains of *Enterococcus casseliflavus* that do not have *vanA*, *vanB*, and *vanD*. The growth of these strains was evaluated using four types of media, blood agar medium, CH-VRE, CH-blue, and BD-VRE, according to the Misra’s method. Sensitivity was defined as whether enterococcal strains carrying the exogenous vancomycin resistance factors as *vanA*, *vanB*, and *vanD* could be detected, and specificity was defined as not detecting strains without exogenous vancomycin resistance factors including *vanC* carrying strains. At 10⁸ cfu/spot, sensitivity was over 97% for all three media, and at 10⁶ cfu/spot, sensitivity was over 93%. At 10³ cfu/spot, the sensitivity was slightly lower, but it was 82.4–85.0%. The specificity was 100% for CH-blue even at 10⁶ cfu/spot, superior to 83.3% for CH-VRE and 99.1% for BD-VRE. At 10³ cfu/spot, specificity was 100% for VRE blue and BD-VRE, but 92.1% for CH-VRE. CH-VRE blue, which is already in use in Europe and the United States, was clearly superior to the currently used CH-blue in inhibiting the development of VanC type. For VanB type *E. faecium*, which has a low MIC in vancomycin, detection sensitivity of CH-blue at 10⁶ cfu/spot was inferior to CH-VRE but comparable at 10⁸ cfu/spot. It is considered that CH-blue is an excellent VRE selective medium with performance equivalent to that of BD-VRE.