

【原著・基礎】

Vancomycin に対する *Staphylococcus aureus* のヘテロ耐性メカニズムと簡易検出法の検討

稲葉 陽子・花木 秀明・高橋 順子・杉本奈扶美
 桑原 京子・崔 龍沫・平松 啓一

順天堂大学医学部細菌学教室*

(平成 10 年 8 月 21 日受付・平成 11 年 4 月 28 日受理)

Vancomycin (VCM) 感性 *Staphylococcus aureus* ATCC6538P 株, 臨床分離 VCM 感性 Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) H-1 株, heterogeneously vancomycin-resistant *S. aureus* (Hetero-VRSA) Mu 3 株, vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) Mu50 株の VCM に対する感受性を MIC, population analysis を用いて解析した結果, VCM に対する MIC 値はそれぞれ 0.5, 0.5, 1, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。また population analysis で 10^7 CFU の細胞増殖を完全に阻止する VCM 濃度はそれぞれ 3, 4, 10, 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。また Mu 3 株の ^{14}C -N-acetylglucosamine (^{14}C -GluNAc) の細胞壁取り込みを, ATCC6538P 株, H-1 株および Mu 50 株と比較した結果, hetero-VRSA Mu 3 株の取り込み量は VRSA Mu 50 株の取り込み量の 80% で, VCM 感性株と比較した場合, 2.6~14.4 倍増加していた。さらに Mu 3 株に対する VCM と aminobenzylpenicillin, ceftizoxime (CZX), cefpirome および sulbactam/aminobenzylpenicillin の併用効果は, すべて拮抗を示した。さらに, Mu 3 株が生育できない VCM 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有の BHIB に段階希釈した CZX を添加すると CZX の 0.0078~0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 共存下で Mu 3 株の生育が認められた。この VCM と β -ラクタム薬の拮抗現象を利用して hetero-VRSA の簡易検出法を検討したところ, Mu 3 株が生育できない VCM 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有寒天平板上の β -ラクタム薬含有 paper disk 周囲にのみ生育円が観察された。この方法を用いて全国の臨床分離 MRSA1673 株のスクリーニングを行ったところ, 6.5% (108 株) が検出された。

Key words: VRSA, hetero-VRSA, vancomycin, 検出法

Vancomycin (VCM) 治療の奏功しなかった MRSA 感染症の患者より VCM 低感受性 MRSA Mu 3 株 (hetero-VRSA)¹⁾, VCM 耐性 MRSA Mu 50 株 (VRSA)^{1~3)} を分離した。

Mu 3 株に代表されるバンコマイシンヘテロ耐性黄色ブドウ球菌 (hetero-VRSA) は, VCM との接触により VCM 耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) Mu 50 株と同等の耐性を獲得することが報告されている¹⁾。ヘテロ耐性菌はその細胞集団内に少数の耐性菌を含むため, 薬剤によって感性菌が除菌され耐性菌のみの細胞集団へと容易に変わる^{4,5)}。しかし hetero-VRSA は MIC, disk 拡散法, E-test などの臨床検査室で通常行われる感受性試験において耐性と判断されないため, 感性株として扱われてきた。そのため VCM 治療が継続に行われると, 最終的に VRSA のみが選択され, VCM 長期治療もしくは VCM 治療失敗となっている可能性がある^{1,2)}。VCM は 1991 年にわが国で注射薬として導入され, 現在でも MRSA 感染症に対する優れた治療薬として繁用されている。しかし hetero-VRSA に VCM が使用されると VRSA に変化する可能性も考えられるため, VRSA 増加の要因になりかねない。そのため将来的に VCM の MRSA に対する有効性を保全するためにも hetero-VRSA の検出は重要であると

考えられる。本報では, hetero-VRSA Mu 3 株および VRSA Mu 50 株の VCM 耐性メカニズム^{6~9)} としてわれわれが報告した細胞壁合成の亢進が, hetero-VRSA Mu 3 株においては β -ラクタム薬の存在下でさらに誘導増強すること, その現象を利用して hetero-VRSA の簡易検出法を考案したこと, さらにその方法を用いた臨床分離 MRSA 株からの hetero-VRSA 検出のスクリーニング結果を報告する。

I. 材料と方法

1. 供試菌株

VRSA Mu 50 株³⁾, VCM 治療の奏功しなかった術後肺炎患者の喀痰から分離された MRSA Mu 3 株¹⁾, VCM 感性 MRSA H-1 株³⁾ および VCM 感性 Methicillin 感性 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P 株を使用した。1995 年から 1996 年にかけて 16 施設から分離された Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 1673 株を用いた。

2. 使用薬剤

VCM, flomoxef (FMOX), latamoxef (LMOX), ceftibuten (CETB) は塩野義製薬, imipenem (IPM) は萬有製薬, aminobenzylpenicillin (ABPC) と sulbactam/aminobenzylpenicillin (SBT/ABPC) はファイザ

一製薬, cefpirome (CPR) はヘキスト・マリオン・ルセル, ceftizoxime (CZX), cefazolin (CEZ), cefixime (CFIX) は藤沢製薬, cefmetazole (CMZ) は三共, clarithromycin (CAM) は大正製薬, ciprofloxacin (CPFX) はバイエル薬品工業より分与された純度の明確な原末を用いた。

3. ^{14}C -N-acetylglucosamine (^{14}C -GluNAc) 細胞壁取り込み

Tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) で一夜培養した菌液を新鮮 TSB 25 ml に 5% 接種し, 37°C で OD_{578nm} の 0.7 まで振盪培養した。遠心集菌後, 25 ml の resting medium¹⁰⁾ で洗浄し, 再度 25 ml の resting medium に懸濁した。その 8 ml の resting medium 中に ^{14}C -N-acetylglucosamine (^{14}C -GluNAc, 1.85 MBq/ml, 2.04 GBq/mmo, Amersham, Arlington Heights, Ill) を 16 μl と 20 倍量の cold-GluNAc を添加し, 37°C で振盪しながら経時的に 0.5 ml のサンプリングを行った。得られた菌体を 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, Sigma Chemical Company, Missouly, USA) で 2 回洗浄し, 菌体中の放射能活性を測定した。

4. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

最小発育阻止濃度 (MIC) は, NCCLS 法に従った agar dilution 法を用いた。培地は Mueller hinton agar (MHA, Difco) の他に Heart infusion agar (HIA, 栄研, 東京, 日本), Brain heart infusion agar (BHIA, Difco) を用いての検討も行った。

上記菌株の培養は Mueller hinton broth (MHB, Difco) を使い, 37°C で 20 時間の培養を行った後, OD_{578nm} で 0.3 に調整し, 新鮮 MHB で 10 倍希釈した菌液を 10⁷ CFU/ml として用いた。接種はマイクロプランター (佐久間製作所) を用いた。判定は 20 時間培養後の生育の有無を肉眼で確認した。

5. Population analysis

TSB で一夜培養した菌液を OD_{578nm} で 0.3 に調整後, その 10 倍希釈系列液の 50 μl を VCM 含有 BHIA に塗抹した。37°C で 48 時間培養後, 生育したコロニー数を測定した。

6. 併用効果の検討

Population analysis と同様の方法で OD_{578nm} の 0.3 に調整し, その 100 倍希釈液を VCM と ABPC, VCM と CPR, VCM と SBT/ABPC, VCM と CZX を含む MHA にマイクロプランター (佐久間製作所, 東京, 日本) を用いて接種した。37°C で 20 時間培養し, チェッカーボード法で両薬剤の相互作用を fractional inhibitory concentration (FIC) index (下記計算式) より算出した¹¹⁾。

FICindex =

$$\frac{\text{併用時 MIC 値 (A 薬剤)}}{\text{単剤時 MIC 値 (A 薬剤)}} + \frac{\text{併用時 MIC 値 (B 薬剤)}}{\text{単剤時 MIC 値 (B 薬剤)}}$$

7. Broth dilution 法による VCM と CZX の拮抗

Population analysis と同様の方法で OD_{578nm} の 0.3 に調整し, 最終接種菌量を 5 \times 10⁵ CFU/ml に調整した VCM 5 $\mu\text{g/ml}$ 含有 BHIB に最終濃度 128 $\mu\text{g/ml}$ から 0.0078 $\mu\text{g/ml}$ までの 2 段階希釈した CZX を添加した。37°C で 20 時間培養し, MHA で菌数をカウントした。

8. 抗菌薬含有 paper disk を用いた hetero-VRSA の検出方法

被検菌株を TSB で一夜培養後, OD_{578nm} で 0.3 に調整し, VCM 4 $\mu\text{g/ml}$ 含有 BHIA に滅菌綿棒で塗抹した。その上に抗菌薬の 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 含有 paper disk を置き 37°C で 20 時間培養した。

9. Hetero-VRSA のスクリーニング

1995 年から 1996 年に 16 施設から分離された MRSA 1673 株について, CZX 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 含有 paper disk と VCM 4 $\mu\text{g/ml}$ 含有 BHIA を用いた上記検出方法で hetero-VRSA の検出率を調査した。

II. 結 果

1. ^{14}C -GluNAc の取り込み

VCM 感性 MSSA ATCC 6538 P 株, MRSA H-1 株と hetero-VRSA Mu 3 株の ^{14}C -GluNAc 取り込み量を 60 分値で比較すると, ATCC 6538 P 株の 14.4 倍, H-1 株の 2.6 倍多かった。同様に VRSA Mu 50 株と比較したところ, Mu 50 株は Mu 3 株の 1.2 倍多かった。したがって, VCM 感性株 ATCC 6538 P 株の ^{14}C -GluNAc 取り込み量を 1.0 とした場合, MRSA H-1 株は 5.6 倍, Mu 3 株は 14.4 倍, Mu 50 株は 17.9 倍それぞれ取り込み量が増加していたことになる (Fig. 1)。

2. VCM に対する感受性

NCCLS 法に準じた agar dilution 法による VCM の MIC 値を Table 1 に示した。MHA を用いた VCM の MIC 値は, ATCC 6538 P 株は 0.5 $\mu\text{g/ml}$, MRSA H-1 株は 0.5 $\mu\text{g/ml}$, Mu 3 株は 1 $\mu\text{g/ml}$, Mu 50 株は 8 $\mu\text{g/ml}$ であった。HIA および BHIA を用いた場合の MIC 値は ATCC 6538 P 株, MRSA H-1 株, Mu 3 株, Mu 50 株の順に 1, 1, 2, 8 $\mu\text{g/ml}$ であった。

ATCC 6538 P 株, MRSA H-1 株, Mu 3 株, Mu 50 株の population curve を Fig. 2 に示す。VCM で完全に増殖が阻害される濃度は, VCM 感性株である ATCC 6538 P 株, MRSA H-1 株は 3, 4 $\mu\text{g/ml}$, Mu 50 株は 13 $\mu\text{g/ml}$ の濃度が必要であったが, Mu 3 株は VCM 感性株と VRSA Mu 50 株のほぼ中間である 10 $\mu\text{g/ml}$ であった。

3. VCM と β -ラクタム薬の併用効果の検討

VCM と β -ラクタム薬の併用効果の結果を Table 2 に示す。Mu 3 株の VCM と ABPC, VCM と SBT/ABPC, VCM と CPR, VCM と CZX の FICindex はそれぞれ 2.016, 2.016, 2.004 および 2.016 を示し拮抗であった。しかし, VCM 感性菌である MRSA H-1 株は

いずれも 1 を示し、相加効果が認められた。

4. Broth dilution 法による VCM と CZX の拮抗

Mu 3 株の生育が認められない VCM 5 $\mu\text{g/ml}$ 含有 BHI に 2 段階希釈した CZX の 128 $\mu\text{g/ml}$ から 0.0078 $\mu\text{g/ml}$ を添加した結果、CZX の 0.0078 $\mu\text{g/ml}$ から生育が認められ (4.00×10^8 CFU/ml), CZX の 0.03125 $\mu\text{g/ml}$ 添加で 1.95×10^9 CFU/ml まで生育が認められた (Fig. 3)。この生育は CZX の 0.125 $\mu\text{g/ml}$ の濃度まで認められたが、それ以上の濃度では認められなかった。

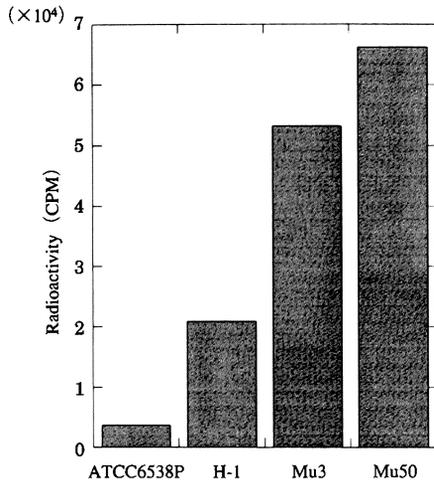


Fig. 1. Incorporation of ^{14}C -GluNAc into the cell wall. ^{14}C -GluNAc was detected in the cell wall by tracer experiment of ^{14}C -GluNAc.

Table 1. Effect of various mediums on Hetero-VRSA Mu 3 strain

	MHA	HIA	BHIA
ATCC 6538 P	0.5	1	1
H-1	0.5	1	1
Mu 3	1	2	2
Mu 50	8	8	8

Inoculum size: 2×10^4 CFU/spot

Table 2. FIC index of vancomycin and β -lactam antibiotics against Mu 3 strain

	ABPC		SBT ABPC		CZX		CPR	
	H-1	Mu 3	H-1	Mu 3	H-1	Mu 3	H-1	Mu 3
MIC* of VCM alone	1	2	1	2	1	2	1	2
MIC of B alone	32	32	32	32	512	256	64	128
Combined MIC of VCM	0.5	4	0.5	4	0.5	4	0.5	4
Combined MIC of B	16	0.5	16	0.5	256	1	32	2
FIC index	1	2.016	1	2.016	1	2.004	1	2.016

*MIC ($\mu\text{g/ml}$)

ABPC: aminobenzylpenicillin, SBT/ABPC: sulbactam/aminobenzylpenicillin, CZX: ceftizoxime, CPR: cefpirome, VCM: vancomycin

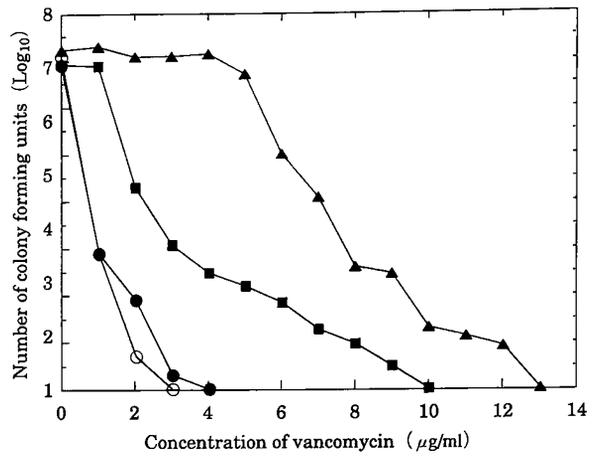


Fig. 2. Population analysis of hetero-VRSA and VRSA. Symbols: \circ : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, \bullet : MRSA H-1, \blacktriangle : Mu 3

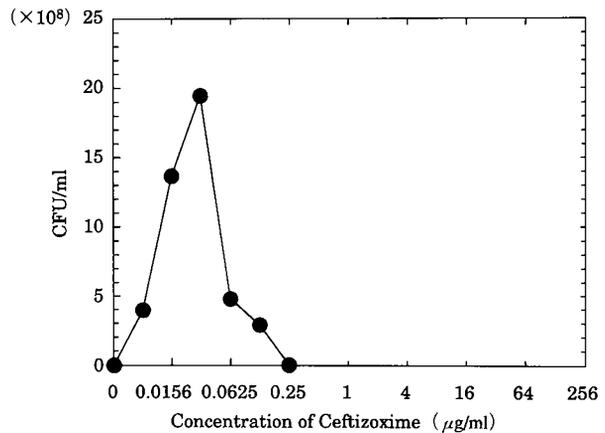


Fig. 3. Combination effects between 5 $\mu\text{g/ml}$ of vancomycin and various concentrations of ceftizoxime (CZX) against Mu 3 strain.

Mu 3 was inhibited in BHI broth containing 5 mg/l of vancomycin. However, in combination with low concentrations of CZX (between 0.008 and 0.125 mg/l) the cells grew.

5. 抗菌薬含有 paper disk を用いた hetero-VRSA の検出

VCM 4 $\mu\text{g/ml}$ 含有 BHIA に hetero-VRSA である Mu 3 株を塗抹後, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ のいずれかの 3 濃度の CZX, CMZ, ABPC, CEZ, LMOX, FMOX, CETB, CFIX, IPM, CPFX, CAM 含有 paper disk を置き, 37°C で 20 時間培養した結果, 用いた β -ラクタム薬すべてのいずれかの濃度において, disk 周辺に生育円が認められた。しかし, DNA gyrase 阻害剤である

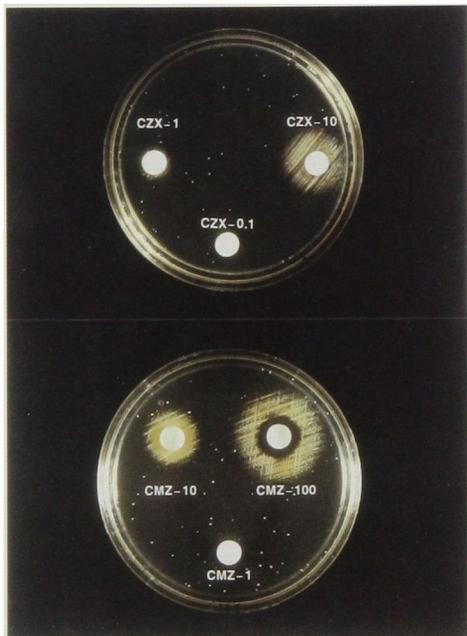


Fig. 4. Antagonism effects between vancomycin and β -lactam antibiotics against a hetero-VRSA strain Mu 3 by disk diffusion method.

Mu 3 cells were spread on brain-heart infusion agar plates containing 4 $\mu\text{g/ml}$ of vancomycin. The disks containing 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$, respectively of ceftizoxime (CZX) (upper) and 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$, respectively of CMZ (lower) were plated, and the plate was incubated at 37°C for 48 h. Note dense growth of cells around the disks.

CPFEX, 蛋白合成阻害剤の CAM では生育円は認められなかった。Fig. 4 に, CZX と CMZ で認められた生育円を示す。

6. Hetero-VRSA のスクリーニング

1995 年から 1996 年に全国 16 施設から分離された MRSA 1673 株についてスクリーニングを行った (Table 3)。CZX の 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 含有ペーパーディスク周辺のみ生育円が出現した株は 2 株 (1.85%), 0.1 と 1 $\mu\text{g/ml}$ 含有ペーパーディスク周辺に生育円が出現した株は 22 株 (20.37%), 1 と 10 $\mu\text{g/ml}$ 含有ペーパーディスク周辺に生育円が出現した株は 77 株 (71.29%), 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 含有ペーパーディスク周辺に生育円が出現した株は 7 株 (6.48%) であった。また, 検出率は病院間で差があり, 多いところでは 33.3% であったが, 4 つの病院ではまったく検出されなかった。全施設の平均は 6.5% であった。

III. 考 察

VRSA Mu 50 株および hetero-VRSA Mu 3 株の耐性メカニズムは, 細胞壁合成の亢進が関与していると考えられる⁶⁻⁹⁾。しかし, Mu 3 株の VCM に対する MIC 値はいずれの培地を用いても感受性域の 1 から 2 $\mu\text{g/ml}$ であるため MIC 値のみでは感受性株との区別はきわめて難しい。感受性株と Mu 3 株の違いについては MIC よりも感度の優れている population analysis を用いて検討すると, Mu 3 株は VCM の 4 もしくは 8 $\mu\text{g/ml}$ 存在下でも増殖可能な VRSA のサブポピュレーションを含んでいる¹⁾。したがってこの菌に感染した場合, VCM の低い組織移行性のために¹²⁾, VCM 投与によって完全な除菌を行うことは期待できない。現在の MRSA のほとんどが多剤耐性 MRSA であるため, VCM までも効力を失った場合, それらの治療には多大な困難が伴うことは容易に想像できる。このような VRSA を増やさないためにも, いまの段階で hetero-VRSA を検出する必要がある。Hetero-VRSA 検出のもっとも確実な方法は population analysis であるが, 細菌検査室で行うには

Table 3. Detection ratio (%) of hetero-VRSA using simple detection method

Facility	Number of strains	Rate of detection (%)	Facility	Number of strains	Rate of detection (%)
A univ. hospital	20	5.0	I univ. hospital	21	9.5
B hospital	20	10.0	J univ. hospital	17	0.0
C univ. hospital	21	33.3	K civic hospital	10	0.0
D center	20	15.0	L univ. hospital	113	18.6
E univ. hospital	20	0.0	M univ. hospital	404	3.5
F univ. hospital	19	5.3	N univ. hospital	293	3.8
G univ. hospital	20	5.0	O clin. lab	515	8.7
H univ. hospital	20	5.0	P clin. lab	140	0.0

Average of detection ratio 6.5% for 24 hours.

煩雑すぎる欠点がある。そのため population analysis に代わる細菌検査室でも対応可能な hetero-VRSA の検出方法を試みた。まず, hetero-VRSA の検出に適した培地は MIC 測定結果より HIA, BHIA が適している結果を得た。これはすでに報告されている VRSA Mu 50 株の培地の検討でもっとも VCM に感受性が低かった培地 (BHIA) と一致していた³⁾。また, これまで VCM と β -ラクタム薬の併用の多くは相乗, 相加または不関と報告されており, 拮抗の報告はあまり見あたらない¹³⁻¹⁵⁾。しかし, Mu 3 株の生育を完全に阻害する MIC 値以上の VCM 濃度 (5 μ g/ml) を使用した broth dilution 法により, VCM と β -ラクタム薬のある濃度で明らかな拮抗が確認された。これは hetero-VRSA の特徴の 1 つであると考えられる。この性質を寒天に応用した簡易検出法を検討したが, VCM 耐性を誘導する β -ラクタム薬の至適誘導濃度は菌株によって異なっているため, 簡易検出法では, その問題に対応するために CZX の 0.1, 1, 10 μ g/ml の 3 段階濃度を用いた。その結果, VCM 含有寒天平板上に試験菌を塗抹後, β -ラクタム薬含有 paper disk を置くことにより, VCM に対する耐性が誘導され paper disk 周辺に生育円が出現する現象を見出した。最近の研究でこの検出法で検出された株は Mu 3 株と同様の population pattern を示す結果を得ている^{6,7)}。つまり, この検出法で検出される株は VCM に対して Mu 3 株と同等の性質を有す hetero-VRSA と考えられる。また, 全面に生育した場合は Mu 3 株よりもさらに耐性度の強い菌であり, VRSA としての確認をするためには MIC 値の測定が必要になる¹²⁾。この検出法を用いて全国の MRSA (1,673 株) をスクリーニングした結果, 6.5% (108 株) が検出された。検出された hetero-VRSA 株は VCM と β -ラクタム薬の併用に拮抗を示すため, 少なくとも VCM と β -ラクタム薬の併用はさける必要があると考えられる。またこの方法で paper disk 周辺に生育してきた菌を再度 population analysis を行っても親株同様の pattern を示す (data not shown)。このことは, この検出方法で生育してくる細胞はあくまで β -ラクタム薬によって VCM 耐性が誘導 (拮抗) されたために生育しているのであり, VCM によって VRSA を選択しているものではない^{6,7)}。少なくともこのような検出方法を使って hetero-VRSA を検出し, 適切な治療薬を選択すべきである。

本論文の要旨は平成 9 年 6 月 13 日, 第 45 回日本化学療法学会総会において発表した。

本研究にあたり多大のご協力を頂いた佐々木和美氏に感謝する。

文 献

1) Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al.: Dissemi-

nation in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 350: 1668, 1997

- 2) Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, et al.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother 40: 135, 1997
- 3) 花本秀明, 平松啓一: バンコマイシン低感受性 MRSA・Mu 50 に対する VCM の抗菌力について。Jap. J. Antibiot. 50: 794~798, 1998
- 4) Hiramatsu K: Molecular Evolution of MRSA. Microbiol. Immunol. 39: 531~543, 1995
- 5) 花本秀明, 平松啓一: バンコマイシンヘテロ耐性黄色ブドウ球菌の検出方法。Jap. J. Antibiot. 51: 521~530, 1998
- 6) Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, et al.: Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) strain Mu 50. J. Antimicrob. Chemothe. in press.
- 7) Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, et al.: Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu 3 and Mu 50. J. Antimicrob. Chemother. 42: 199~209, 1998
- 8) 花本秀明, Labischinski H, 佐々木和美, 他: バンコマイシン耐性 MRSA・Mu 50 のバンコマイシン耐性メカニズムについて その-1。Jap. J. Antibiot. 51: 237~247, 1998
- 9) 花本秀明, Labischinski H, 稲葉陽子, 他: バンコマイシン耐性 MRSA・Mu 50 のバンコマイシン耐性メカニズムについて その-2。Jap. J. Antibiot. 51: 272~280, 1998
- 10) Riley S, Toennies G: Nutritional requirements for bacterial cell wall synthesis.: Nutrition and cell wall. 81: 44~50, 1960
- 11) Elion G B, Singer S, Hitchinga G H: Antagonists of nucleic acid derivatives VIII. Sinergism in combinations of biochemically related antimetabolites. J. Biol. Chem. 208: 477~488, 1954
- 12) Nitsuma K, Saito M: Vancomycin inhalation therapy—a pharmacokinetic and clinical study of vancomycin. Antibiot. Chemother 122: 123~135, 1996
- 13) 出口浩一, 横田のぞみ, 吉田昌美, 他: β -lactams と Vancomycin の抗菌併用効果 1. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を対象とした成績。Jap. J. Antibiot. 46: 939~945, 1993
- 14) 佐藤 征, 三浦富智, 工藤恵美, 他: Carbapenem 剤耐性 MRSA に対する Vancomycin と Carbapenem 剤の *in vitro* 併用効果。Jap. J. Antibiot. 50: 711~716, 1997
- 15) 福岡 隆, 上門春樹, 角田正代, 他: メチシリン耐性高度耐性黄色ブドウ球菌に対するバンコマイシンとバンコマイシンの併用効果。Jap. J. Antibiot. 50: 411~419, 1997

Study on the mechanism and detection method of heterogeneously resistant
Staphylococcus aureus to vancomycin

Yoko Inaba, Hideaki Hanaki, Junko Takahashi, Naomi Sugimoto,
Kyoko Kuwahara-Arai, Longzhu Cui and Keiichi Hiramatsu

Juntendo University, 2-1-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

Vancomycin susceptibilities of three methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains Mu 3, Mu 50, H-1 and a methicillin-susceptible *S. aureus* strain ATCC 6538 P were compared by determining MIC and population analysis, which showed that their MIC values were 1, 8, 0.5 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively, while the vancomycin concentrations required to inhibit 1×10^7 cells of these strains were 10, 13, 4, and 3 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Population analysis of Mu 3 showed a typical hetero-type vancomycin resistance. The profiles of ^{14}C -N-acetylglucosamine incorporation into the cell demonstrated that the incorporation to Mu 3 cells was 2.6 and 14.4-fold higher than those to H-1 and ATCC 6538 P, respectively, and was 0.8-fold lower than that to Mu 50 cells. In vitro synergy studies with a combination of vancomycin and aminobenzylpenicillin, cefpirome, ceftizoxime or aminobenzylpenicillin/sulbactam demonstrated an antagonism for the heterogeneous vancomycin-resistant *S. aureus* (hetero-VRSA) Mu 3, with a fractional inhibitory concentration (FIC) index of >2 . Subsequently, a hetero-VRSA detection method was developed by means of detecting the antagonism vancomycin and ceftizoxime. 1,673 clinical MRSA strains isolated from 1995 through 1996 in sixteen medical facilities all over Japan were screened for hetero-VRSA, which showed that the frequency of hetero-VRSA was 6.5% among the all MRSA clinical isolates.