

茨城県で分離されたバンコマイシン耐性腸球菌の耐性型と分子疫学解析

○伊師 拓哉、織戸 優、石川 加奈子、金崎 雅子

要旨

2022年4月～7月の間にバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）として県内医療機関から搬入された10株を対象に、PCR及びMALDI-TOF-MSによる菌種同定、ディスク拡散法によるバンコマイシン耐性型の推定、並びにPCRによるバンコマイシン耐性遺伝子の確認を実施した。また、短期間で同一医療機関からの搬入であったことから、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）による分子疫学解析を実施した。その結果、10株すべてが *vanB* を保有する *Enterococcus faecium* であり、PFGEにおいて類似のパターンを示した。

キーワード：VRE、*vanB*、PCR、PFGE、MALDI-TOF-MS

1 はじめに

腸球菌はヒト腸管常在菌叢の一つであり、健康人の便培養から分離される。日和見感染症の病原体として易感染宿主に菌血症、心内膜炎、尿路感染症などを引き起こす¹⁾。バンコマイシンに耐性を示す腸球菌をバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）と呼ぶ。バンコマイシン耐性遺伝子は複数知られているが、中でも *vanA*、*vanB* はプラスミド上にも存在しうることから、異なる菌種間に伝播する可能性がある。臨床的、疫学的に問題となるVREの多くは *vanA*、*vanB* を獲得した *Enterococcus faecium*、*E. faecalis* である²⁾。

VRE感染症は1999年4月の感染症法施行以降、全数把握疾患として、診断したすべての医師に報告が義務づけられている。本県においては2016年を最後に報告されていなかったが、2022年に同一医療機関から2例報告された。1例目（A）と2例目（B）の患者に同室期間があったことから、院内感染疑いとして当該患者周辺のVREスクリーニング検査が実施された。Aはすでに退院していたため、第一円としてBと同室期間があった患者13名についてスクリーニングした結果、新たに2名からVREが分

離された（C及びD）。さらに第二円として、Bが入院する病棟全体（対象患者23名）をスクリーニングした結果、さらに新たに2名からVREが分離された（E及びF）。

本事例で当所に搬入されたVRE10株（届出患者由来株及び保菌者由来株、同一患者で分離材料違いの菌株については別菌株扱いとした）を対象に、菌種同定、バンコマイシン耐性型の推定、バンコマイシン耐性遺伝子の確認及びパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）による分子疫学解析を実施したので、その結果を報告する。

2 材料と方法

2-1 供試菌株

2022年4月から7月までの間にVREとして当所に搬入された10株を検査材料とした。

2-2 菌種の同定

国立感染症研究所が示す病原体検出マニュアル²⁾に従い、Multiplex PCRにより *E. faecium* と *E. faecalis* の *ddl* 遺伝子を検索した。また、MALDI-TOF-MS (Bruker) を用い、セルスマア法により菌種同定を行った。

2-3 ディスク拡散法によるバンコマイシン耐性型の推定

国立感染症研究所が示す病原体検出マニュアルを参考に、バンコマイシン及びテイコプラニンのディスクを用いディスク拡散法を実施した。

2-4 PCRによるバンコマイシン耐性遺伝子の確認

国立感染症研究所が示す病原体検出マニュアルに従い、Multiplex PCR により *vanA*、*vanB*、*vanC1* 及び *vanC2/3* の検索を実施した。

2-5 PFGE による分子疫学解析

Mueller Hinton 寒天平板培地上の菌株を滅菌蒸留水 200 μ L に懸濁する。これと 1.0% SeaKem Gold Agarose (Lonza) 200 μ L を混和後、プラグキャスターに分注しプラグを作成する。プラグを 1mL のリゾチーム処理液 (Tris-base 36.3mg、0.5M EDTA <pH8.0> 10mL、NaCl 2.922g、Sodium Deoxycholate 100mg、N-lauroylsarcosine 250mg、滅菌蒸留水 40mL で作成した溶解用バッファーにリゾチームを 2mg/mL で溶解し作成) に入れ、37°C で 20 時間インキュベートする。リゾチーム処理液を除去し、TE buffer (pH8.0) で洗浄する。プラグを Proteinase K 処理液 1mL (0.5M EDTA <pH8.0> 50mL、N-lauroylsarcosine 500mg で作成した溶解用バッファーに Proteinase K を 1mg/mL で溶解し作成) に入れ、55°C で 20 時間インキュ

ベートする。Proteinase K 処理液を除去し、TE buffer (pH8.0) で洗浄する。プラグを Pefabloc SC 溶液 1mL (24mg の Pefabloc SC <Roche> を滅菌蒸留水 1mL に溶解し、TE buffer 24mL を添加し作成) に入れて、50°C で 20 分間振盪する。Pefabloc SC 溶液を除去し、同様の操作をもう一度行う。Pefabloc SC 溶液を除去し、プラグを TE buffer 1mL に入れて氷上で 20 分間振盪する。制限酵素は *Sma* I (Roche) を使用するため、プラグを 4mm \times 4mm にカットし作成したブロックに SuRE/Cut buffer A (Roche) を 200 μ L 添加し、室温で 1 時間平衡化する。SuRE/Cut buffer A を除去し、ブロックを制限酵素処理液 (SuRE/Cut buffer A で *Sma* I 20U/sample となるよう調整) 100 μ L に入れて 4°C で 3 時間静置後、25°C で一晩インキュベートする。コーム上にブロックを置き、1.0% SeaKem Gold Agarose 100mL で包埋してゲルを作成する。泳動用バッファーは 0.5 \times TBE を使用する。電気泳動には CHEF MAPPER (BIO-RAD) を用い、泳動条件は、泳動時間：19 時間、電圧勾配：6V/cm、スイッチタイム：2.8sec - 17.4sec、内角：120°、バッファー温度：14°C で実施した。泳動後はエチジウムブロマイドで染色し、UV 撮影を実施した。結果はバンドパターンの直接比較により、Tenover³⁾らの基準に従い判定した。

3 結果

菌株情報及び検査結果を表 1 にまとめた。

表 1 VRE 菌株情報及び検査結果

菌株番号	患者	症状	菌株情報			検査結果		
			分離材料	検体採取日	菌種	ディスク拡散法 (mm)		バンコマイシン耐性遺伝子
						VCM	TEIC	
1	A (届出患者)	発熱 後腹膜潰瘍	腹水	2022/05/08	<i>E. faecium</i>	12	19	<i>vanB</i>
胆汁			2022/04/25	<i>E. faecium</i>	11	19	<i>vanB</i>	
CVカテーテル先端			2022/05/02	<i>E. faecium</i>	11	19	<i>vanB</i>	
4	B (届出患者)	発熱	CVカテーテル先端	2022/06/20	<i>E. faecium</i>	11	18	<i>vanB</i>
喀痰			2022/06/20	<i>E. faecium</i>	17	18	<i>vanB</i>	
便			2022/06/20	<i>E. faecium</i>	17	19	<i>vanB</i>	
7	C (保菌者)	なし	便	2022/06/30	<i>E. faecium</i>	17	19	<i>vanB</i>
8	D (保菌者)	なし	便	2022/06/30	<i>E. faecium</i>	17	19	<i>vanB</i>
9	E (保菌者)	なし	便	2022/07/05	<i>E. faecium</i>	15	19	<i>vanB</i>
10	F (保菌者)	なし	便	2022/07/05	<i>E. faecium</i>	13	19	<i>vanB</i>

※VCM：バンコマイシンディスク
TEIC：テイコプラニンディスク

3-1 菌種の同定

PCRの結果、10株すべてが *E. faecium* であった。また、MALDI-TOF-MSにおいても、10株すべてが Score Value 2.0 以上で *E. faecium* と同定されたため、10株すべて *E. faecium* と判定した。

3-2 ディスク拡散法によるバンコマイシン耐性型の推定

ディスク拡散法の結果、10株すべてがバンコマイシン及びテイコプラニンの両方に阻止円を形成したが、阻止円径を比較するといずれの株においてもテイコプラニンの方が大きかったことから、VanB型の特徴¹⁾と大きな矛盾はないと判定した。また、同一患者で分離材料違いの株において、バンコマイシンの感受性が異なるものがあった。

3-3 PCRによるバンコマイシン耐性遺伝子の確認

PCRの結果、10株すべてが *vanB* を保有しており、ディスク拡散法による耐性型推定の結果と一致した。

3-4 PFGEによる分子疫学解析

PFGEの結果を図1に示す。10株中7株が完全一致、2株が1~2バンド違い、1株が4バンド違いであった。

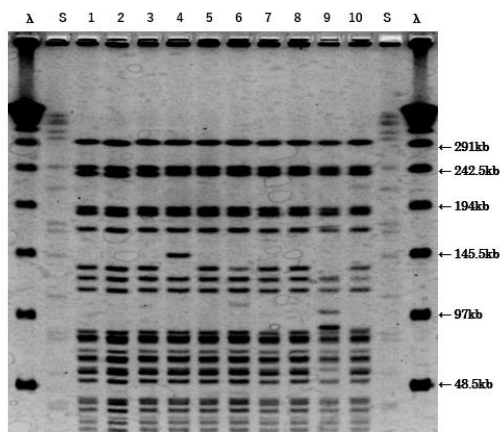


図1 *vanB* 遺伝子保有 VRE PFGE パターン
S : *Salmonella braendrup* H9812 株
*Xba*I 処理標準マーカー
λ : Lambda Ladder 標準マーカー

4 考察

2022年に当所に搬入された VRE10株は、すべて *vanB* 保有の *E. faecium* であり、PFGEによるバンドパターンに多少の差異はみられたものの類似していたことから、同一菌株由来であると考えられた。ディスク拡散法による耐性型推定では、同一患者で分離材料違いの株においてバンコマイシンに対する感受性が異なるものがあり、これは抗菌薬への曝露や継代等の環境により耐性が変化した可能性が考えられた。

5 まとめ

感染症サーベイランスシステムによる VRE 感染症届出患者数は近年増加傾向である¹⁾。本県においても6年ぶりの届出となり、引き続き警戒が必要である。今後も菌株の収集及び解析に努め、院内感染や疫学調査の一助としたい。

謝辞

検査法及び解析についてご助言をいただきました国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター 松井真理先生に深謝いたします。また、菌株収集等にご尽力いただいた関係保健所及び医療機関の方々に厚くお礼申し上げます。

文献

- 1) 国立感染症研究所. 病原微生物検出情報 IASR 42: 155-156, 2021
- 2) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌. 2020
- 3) Tenover FC *et al.* 1995. J Clin Microbiol. 33: 2233-2239