

## 萬古黴素抗藥性腸球菌之篩檢及實驗室診斷

---

王梨容 1,2 劉清泉 1,3 柯文謙 1,4

國立成功大學醫學院附設醫院

1 感染管制中心 2 病理部 3 小兒科部 4 內科部

萬古黴素抗藥性腸球菌(vancomycin-resistant enterococci)將是院內感染重要病原菌之一，常見菌種為 *Enterococcus faecalis* 及 *Enterococcus faecium*，而這些菌株能在病人間快速傳播造成院內感染，甚至群突發之發生；因此除臨床檢體檢出外，亦須採取適當監測措施，包括 VRE 移生病人監測及環境監測，再依監測結果採取適當之防護政策。利用增殖性培養液、選擇性培養基或 PCR 方法，提高臨床檢體或監測檢體中腸球菌檢出率，並依標準方法進行菌種鑑定，及體外藥物敏感性試驗，將 VRE 與其他具內源性 vancomycin 抗性之腸球菌加以正確區別，才能實際而有效執行 VRE 感染控制防護措施，避免人力、物力或成本上浪費。

### 前 言

腸球菌(*Enterococci*)是重要的院內感染病原菌，約有 17 種次菌種，臨床相關感染以 *Enterococcus faecalis* 及 *Enterococcus faecium* 為主；由於腸球菌對 glycopeptide 類抗生素，如 vancomycin 與 teicoplanin 抗藥性的浮現，使得微生物實驗室在腸球菌抗藥性菌株的篩檢及菌種的鑑定上益形重要。

在革蘭氏陽性菌中，*Lactobacilli*、*Pediococci*、*Leuconostocs* 菌屬與腸球菌中之 *E. casseliflavus*、*E. gallinarum* 均具內生性 vancomycin 抗藥性，這些低程度 vancomycin 抗藥性之菌屬/株對 glycopeptide 抗藥基因之傳遞能力很低，很少會造成臨床感染或後續傳播。其中 *E. casseliflavus* 及 *E. gallinarum* 在住院病人與長期醫療照護機構住民，腸胃道之分離率分別為 0.5-2% 與 15%，通常這類菌株之移生病人並不需要加以隔離。但另一方面，*E. faecalis* 及 *E. faecium* 對藥物之治療呈現不同反應，若獲得外源性抗藥性基因 vanA 及 vanB，便會成為對 glycopeptide 呈抗藥性之 VRE，並在病人之間快速傳播[1]。因此，臨床微生物實驗室必需針對腸球菌進行菌種鑑定及體外藥物敏感性試驗，以提供臨床治療之參考。以感染管制的角度而言，快速且正確的將 VRE 與其他具 vancomycin 內源性抗藥性之菌株加以區別，才能執行有效的感染控制防護措施，防範群突發之發生。

### VRE 之監測與環境採檢

腸球菌為腸道之正常菌叢，因此糞便或直腸拭子均可做為 VRE 帶原者篩檢之檢體。臨床檢體直接塗劃於選擇性培養基，於 37°C 培養。環境 VRE 篩檢則以棉棒浸拭法(pre-moistened swab)採集檢體，採檢後將棉棒拭子置入非選擇性增殖培養液(例如：brain heart infusion broth)中 6-18 小時後，次培養到選擇性培養基中。VRE 移生病人之篩檢，則可用選擇性培養基或選擇性培養液來培養，亦可於培養基/液中加入 6  $\mu$ g/mL vanco-mycin 來提高檢出率 [2]。一般針對 VRE 所用之選擇性培養基可為：CAN blood agar plate with vancomycin、*Campylobacter* blood agar plate with vancomycin、Columbia CAN-Va 30  $\mu$ g disc blood agar plate、*Enterococcosel* agar

with vancomycin, 選擇性培養液如： Enterococcosel broth with vancomycin；最後將選擇性培養基上長出之 vancomycin 抗性菌株，再次接種於 5% 血液培養基，並確認該菌株為革蘭氏陽性球菌後再進行後續鑑定。

## 腸球菌之鑑定流程

臨床微生物實驗室在腸球菌之菌種鑑定，基本上利用其生化學上之反應來測試，包括：革蘭氏染色、PYR 生成測試 (pyrrolidonyl arylamidase production test)、產色試驗(pigment production test)、運動性試驗 (motility test)、xylose 快速發酵試驗 (xylose rapid fermentation test)、arabinose 及 pyruvate 發酵試驗，其流程見圖一及圖二[1]；再依表一 [3]之反應結果確認腸球菌菌種。

腸球菌的色素檢測 (pigment production)需以棉棒沾取菌落並於白色背景下觀察是否有黃色 (bright yellow)出現，不可直接由培養皿觀察菌落顏色。Motility test 則將菌株置於 0.5mL 之 BHI (brain heart infusion) 或 TSB (Tryptic soy broth)中，30°C 培養 2 小時觀察。xylose 快速發酵試驗之菌株濃度需達~90 失 3 McFarland 標準濃度，以避免偽陰性結果之產生 [1]。

商用套組之鑑定系統亦可用於腸球菌之鑑定，包括 Vitek 2 automatic system(BioMerieux, Vitej, Hazelwood, MO)、MicroScan POS 6 panel (Dade MicroScan Inc., Sacramento, CA)、API 20S Streptococcus and Rapid Strep strips (BioMerieux)，但偶會有鑑定錯誤的情形 [1]。基因分型法，如 conventional multiplex PCR (m-PCR) protocol, real-time PCR (LightCycler system, Roche)，乃直接偵測 VRE 抗藥性基因的類別，可相對提高 vancomycin 抗性腸球菌鑑定之速度、特異性、及時效性[4]。

## VRE 之藥物敏感性試驗

腸球菌屬對 vancomycin 之體外藥物敏感性試驗，以 30  $\mu$ g 之紙錠進行測試，所用培養基為 Mueller-Hinton agar，菌液濃度為 0.5 McFarland 標準濃度 (可用生長期方式或直接調菌方式調配菌液)，置於 35°C  $\pm$ 2 度之恆溫培養箱中達 24 小時後 (其餘紙錠培養 16-18 小時即可)，以透視光 (transmitted light)觀察判讀；抑制圈大小之判讀標準為： $\leq$ 14 mm、S (susceptible, 敏感性)；15-16 mm、I(Intermediate, 中程度抗性)； $\geq$ 17 mm、R(resistant, 抗性)，抑制圈中有薄膜狀或菌落出現其結果均判讀為抗性[5]。判讀為中程度抗性之菌株，須依 CLSI/NCCLS 文件 (M100-S15)之標準方法 [5]，再次進行 vancomycin 抗性試驗及 MIC 測試。(表一)

## Vancomycin 抗藥性篩檢試驗

將菌落接種於含 6  $\mu$ g/mL van-comycin 之 BHI agar 上，18 及 24 小時均判讀一次，長出菌株若鑑定為非 E. casseliflavus 及 E. gallinarum 之腸球菌則判定為 VRE (表二)[5]。若菌株篩檢結果為 "nonsusceptibile"，則必須保留菌株，並送至可依 NCCLS/CLSI 標準進行菌種及藥物敏感性試驗之參考實驗室進行確認。

要確認 VRE 之 glycopeptide 抗藥性，可採用 broth dilution test, agar dilution test(表三)，或 Etest (ABB-IODISK, Solna, Sweden)。需注意的是須培養 24 小時後，才可判讀 vancomycin 之 MIC 值；判讀標準為： $\leq$ 4  $\mu$ g/mL、S(susceptible)；8-16  $\mu$ g/mL、I(intermediate)； $\geq$ 32  $\mu$ g/mL、R(resistant)。

## 討 論

依美國疾病管制局標準作業準則[6]，必須對 VRE 病人採取適當的監測及防護政策；因此 VRE 監測培養結果之敏感性相對的會影響到管束管制政策執行之有效性。VRE(移生)病人之腸胃道是 VRE 院內傳播之貯存窩，因此監測培養之檢體來源可以為糞便檢體或直腸拭子(rectalswab)；直腸拭子培養之敏感性雖比糞便培養來的低[7]，但基於採檢時間點及便利性之考量，一般仍以直腸拭子為主。研究報告[8]指出，直腸週邊拭子(perirectal swab)在 VRE 腸道移生篩檢之敏感性及特異性，與直腸拭子並無差異性，因此對白血球低下病人或在病人採檢舒適性的考量上，也可以用直腸週邊拭子送檢。

環境篩檢方面，由於 VRE 可在乾燥的環境表面存活數天至數月[9]，因此 VRE 可能由具菌株傳播能力之採檢點，包括工作人員之衣服、器械、病人週邊環境等分離出，例如：醫護人員使用之攜帶式器械(如：脈帶、止血帶)、環境中之床欄、輪椅、血氧偵測器(pulse oximeter)、門鈕、床旁桌、布簾、電子耳溫槍、治療床等分離出[9]。以實際經驗而言，monitor 面版、病床遙控器、床欄、換藥車台面、床上體重計之面布、床上磅秤墊子及按鍵、烤燈架、工作車、耳溫槍、氧氣筒架子之扶手及流量表旋鈕等，都是環境 VRE 陽性採檢點。因此在進行 VRE 環境篩檢時，陽性個案之週邊環境、鄰近區環境及醫護人員經常碰觸之公用物，都是須考量之採檢點，以提供單位環境清潔消毒時之參考。

糞便檢體約需具  $10^3$  CFU/mL 之 VRE 菌落濃度才能於直接塗劃之培養基培養出[10]；但當帶菌者之排出菌落數低時，則必須配合培養液(broth)之增菌作用來提高檢出率[10]，否則 GRE (glycopeptide-resistant enterococci)的分離率會有低估之可能性。用於 VRE 篩檢之培養基/液可以有種選擇，並可在選擇性培養基/液中加入之 vancomycin 以增加 VRE 的篩檢度，其添加濃度可由 4 到  $64 \mu\text{g/mL}$ ，雖然高濃度較易偵測出高程度的 vancomycin 抗性菌株同時可將 *E. casseliflavus* 及 *E. gallinarum* 排除，但因有的 vanB-VRE 菌株之 MIC 可低到  $4 \mu\text{g/mL}$  而可能因此被忽略，因此一般以加入  $6 \mu\text{g/mL}$  來將低程度 glycopeptide 抗性菌株偵測出。

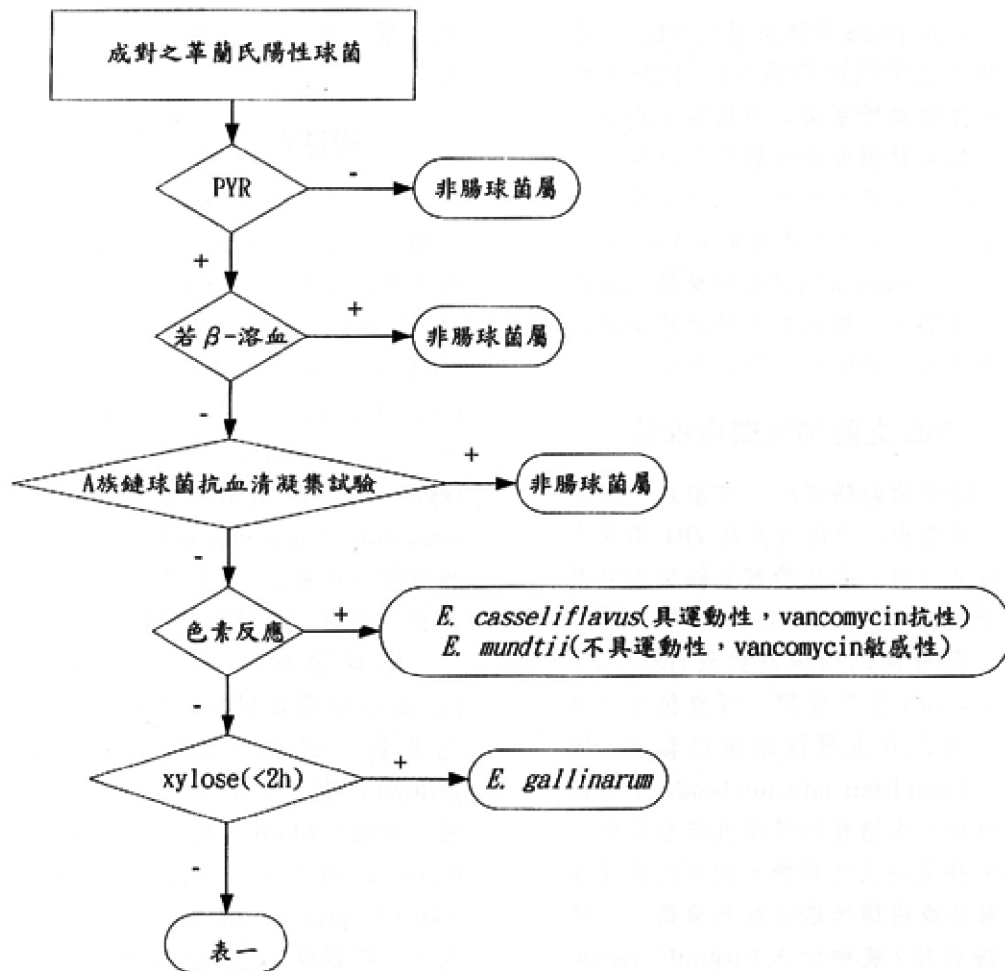
病人腸胃道 VRE 移生篩檢之培養通常約需 48-72 小時，甚至 5 天才能得知結果，報告發出時病人可能已經離院；利用 PCR 分析法可在 8 小時內偵測出 vancomycin 抗藥性基因 vanA 及 vanB[11]，研究結果顯示在有 VRE 移生之病人，其後續以 PCR 分法偵測出陽性機率之敏感性比以直腸拭子培養高，報告時間也縮短[12]；而將直腸拭子接種入 EV broth (enterococcosel enrichment broth with  $8 \mu\text{g/mL}$  vancomycin)，再利用 real-time multiplex PCR 分析法監測則可更提高 VRE 篩檢之檢出率[13]。

依美國疾病管制局標準作業準則，VRE 隔離病人需在隔週連續三次檢測篩檢均為陰性時才可解除隔離。Karin 等人依 CDC 準則針對 116 位 VRE 帶菌者進行監測培養，連續五週監測培養結果之陰性比例分別為 64%、92%、95%、100%、100%[14]，驗證了 CDC 針對 VRE 病人解除接觸性隔離之作業準則；Green 等人研究中指出，糞便檢體中之 VRE 濃度若  $>10^6$  CFU/mL，可能與病人腸道 VRE 之持續性移生有關[15]，而 VRE 菌落密度低之糞便相對的在環境污染之效力也會降低[7]。但 VRE 病人追蹤監測結果陰性並不表示已將 VRE 由病人之腸胃道移除，只能代表菌落數降低到可偵測範圍。一旦再度因抗生素使用抑制了正常菌株的競爭作用，此類病人仍會有 VRE 再次復發之可能。

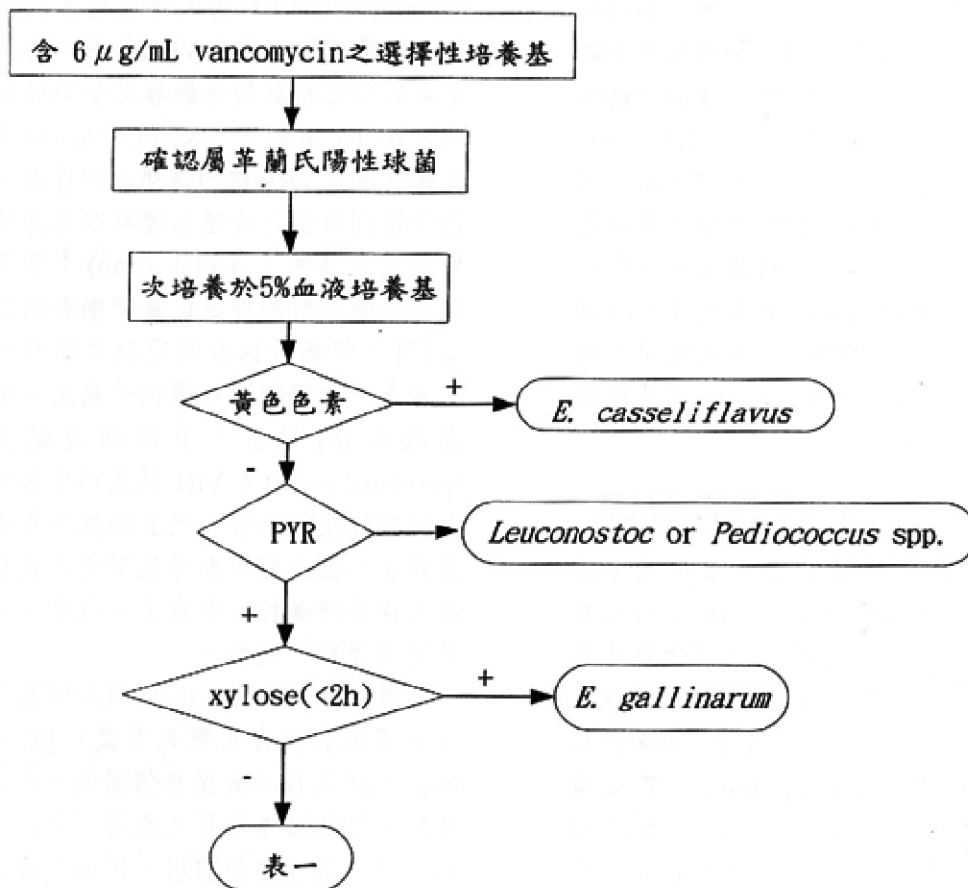
## 結 論

檢體 VRE 篩檢所使用之培養基/液對檢測結果之敏感性、特異性、人力及時間之花費上均有所差異，由於低程度 vancomycin 抗藥性之腸球菌 *E. casseliflavus*、*E. gallinarum* 亦可由腸球菌之選擇性培養基/液中分離出，因

此臨床實驗室應建立臨床檢體與監測檢體之 VRE 篩檢方法，快速且正確的鑑定出 *E. faecium* 或 *E. faecalis* 之 VRE 菌株，才能有助於 VRE 感染管制政策之確實執行。



圖一 臨床檢體於非選擇性培養基中腸球菌之菌種檢測流程  
註：摘自參考文獻 [1]



圖二 VRE 監測檢體之腸球菌菌種檢測流程  
 註：摘自參考文獻 [1]

表一 腸球菌屬之生化鑑定反應

	Ribose	Arabinose	Motility	Pyruvate	Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside
<i>E. faecium</i>	+	+	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	-	+
<i>E. mundtii</i>	+	+	-	-	-
<i>E. flavescens</i>	-	+	+	-	+
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	-	+

註：摘自參考文獻 [3]

表二 腸球菌 Vancomycin 抗藥性之篩檢測試

篩檢項目	Vancomycin 抗藥性試驗
培養基	BHI(brain heart infusion) agar
抗生素濃度	6 µg/mL
菌株接種	利用生長期方式或直接調菌方式，將菌液濃度調配至 McFarland 標準濃度 0.5，再將將 1-10µL 之菌液滴劃於培養基表面
培養時間	24 小時
培養條件	35 °C；一般環境下
結果判讀	培養基上長出的菌落即屬疑似抗性菌株，再進一步執行最低抑菌濃度 (MIC) 測試、色素產生試驗及運動性試驗，來區分出可在 vancomycin 篩檢培養皿生長之外源性 (VanA 及 VanB) 菌株與 <i>E. gallinarum</i> ， <i>E. casseliflavus</i> 等內源性 vancomycin 中程度抗性腸球菌。 <i>E. gallinarum</i> 及 <i>E. casseliflavus</i> 之 vancomycin MICs 為 8-16µg/mL，與造成院內感染之 vancomycin 抗性腸球菌有所不同。
建議之標準菌株	<i>E. faecalis</i> ATCCR 29212 - 屬敏感性 <i>E. faecium</i> ATCCR 51299 - 屬抗藥性

表三 腸球菌 MIC 之測試條件

培養基	培養液析釋法：經陽離子校正之 Mueller-Hinton 培養液 (Cation-adjusted Mueller-Hinton broth, CAMHB) 培養基析釋法：Mueller-Hinton 培養基 (Muller-Hinton agar, MHA)
菌液濃度	生長期方式 (growth method) 或直接調菌方式 (direct colony suspension)，最終菌液濃度為 0.5 McFarland standard
培養溫度	35 °C ± 2 度；一般環境下
培養時間	Vancomycin 需至 24 小時
建議之標準菌株	<i>E. faecalis</i> ATCC <sup>®</sup> 29212 - 屬敏感性

註：摘自參考文獻 [5]

### 參考文獻

1. Willey BM, Jones RN, McGeer A, et al: Practical approach to the identification of clinically relevant Enterococcus species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34:165-71.
2. Horn KGV, Gedris CA, Rodney KM: Selective isolation of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996;34:924-7.

3. Isenberg HD: Clinical Microbiology Procedure Handbook. 2nd edition. ASM press Volume 1, 2004.

4. Eisner A, Gorkiewicz G, Feierl G, et al: Identification of glycopeptide-resistant enterococci by VITEK 2 system and conventional and realtime polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53:17-21.

5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. M100-S15, 2005.

6. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance: recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR* 1995;44:1-13.

7. D'Agata EM, Gautam S, Green WK, et al: High rate of false-negative results of the rectal swab culture method in detection of gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 2002;34:167-72.

8. Weinstein JW, Tallapragada S, Farrel P, et al: Comparison of rectal and perirectal swab for detection of colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996;34:210-2.

9. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, et al: SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:362-86.
10. Ieven M, Vercauteren E, Descheemaeker P, et al: Comparison of direct plating and broth enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptide-resistant enterococci among hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 1999;37:1436-40.
11. Satake S, Clark N, Rimland D, et al: Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1997;35:2325-30.
12. Paule SM, Trick WE, Tenover FC, et al: Comparison of PCR assay to culture for surveillance detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2003;41:4805-7.
13. Palladini S, Kay ID, Flexman JP, et al: Rapid detection of vanA and vanB genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:2483-6.
14. Byers KE, Anglim AM, Anneski CJ, et al: Duration of colonization with vancomycin-resistant enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:207-11.
15. Green M, Barbadora K, Michaels M: Recovery of vancomycin-resistant gram-positive cocci



from pediatric liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1991;29:2503-6.