

## 常見抗藥性細菌之篩檢方法

---

李東穎<sup>1</sup> 林明滢<sup>1</sup> 王復德<sup>1,2,3</sup>

臺北榮民總醫院 1 感染管制室 2 內科部感染科 3 陽明大學醫學系

抗藥性細菌對感染控制與臨床治療造成沈重的負擔，傳統的微生物培養、鑑定、抗生素敏感性試驗需要耗費相當的時間，就群突發事件處理與主動採檢的時效性會有相當的延遲。本文將介紹篩檢 Methicillin resistant staphylococcus aureus(MRSA)、Vancomycin resistant enterococci(VRE)、extended-spectrum- $\beta$ -lactamase(ESBL)等抗藥性細菌的方法，利用含 ciprofloxacin 的 Baird-Parker medium、有 clindamycin phosphate 的 Campylobacter blood agar 或添加 vancomycin 的 Enterococcosel agar，與由含 cefotaxime 的 Drigalski agar，和有 ceftazidime 的 MacConkey agar 組成的 bi-plate 分別篩檢常見的抗藥性細菌，期望能夠協助相關感控工作的推展。

### 前 言

抗藥性細菌引起的院內感染日益增加，對感染控制與臨床治療造成沈重的負擔。台灣微生物抗藥性監測 (Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance V, TSAR V) 在 2006 年 7 月到 9 月對醫學中心、區域醫院的調查顯示，院內感染的 Staphylococcus aureus 中有 80% 為 MRSA，Klebsiella pneumoniae；中有 34.4% 具有 extend-ed-spectrum- $\beta$ -lactamase(ESBL)，而 Escherichia coli 則有 16.7% 為 ESBL。根據台大醫院的統計，Vancomycin resistant enterococci(VRE)院內感染的發生率也已經從 1996 年的 1.2% 上升到 2003 年的 6.1%[1]。

為了控制抗藥性細菌在醫院中散播，許多國外指引皆建議在抗藥性細菌移生的高危險群病人入院時進行主動採檢(active surveillance)，並搭配適當的隔離與感控措施[2,3]。但是，傳統的微生物培養、鑑定、抗生素敏感性試驗需要耗費相當的時間，就群突發事件處理與主動採檢的時效性來講，會有相當的延遲，而在流程操作、結果判讀上也都需要相當的技巧與經驗。為了減輕群突發事件、主動採檢的大量檢體對檢驗室造成的工作負荷，本文將介紹利用添加抗生素的選擇性培養基篩檢 MRSA、VRE、ESBL 抗藥性細菌的方法，期望能夠簡化檢驗流程，提高工作效率，協助相關感控工作的推展。

### Methicillin 抗藥性金黃色葡萄球菌(MRSA)

金黃色葡萄球菌(S. aureus)是革蘭氏陽性球菌，觸酶(catalase)、凝固酶(coagulase)皆為陽性反應。青黴素(penicillin)可以和青黴素結合蛋白(penicillin-binding-protein; PBP)結合，使 PBP 失去催化細菌細胞壁中形成聚糖(peptidoglycan)鏈結的能力。而金黃色葡萄球菌抗藥性來自改變 PBP，使 PBP 與 penicillin 的親和力降低，或是產生能夠分解 penicillin 的乙內醯胺( $\beta$ -lactamase)。

MRSA 在台灣醫療院所中相當普遍，而 MRSA 同時對 ciprofloxacin 具抗藥性的比例也在 70% 以上[4]，此外，院內感染的 MRSA 菌株對 ciprofloxacin 具抗藥性比例高於社區感染的 MRSA 菌株[5]，而從美國住院病人身上分離出的 MRSA 菌株中，也有 84.9% 同時對 ciprofloxacin 具抗藥性。

目前市面上有多種針對 MRSA 所設計的選擇性培養基，如 Mannitol salt agar oxacillin (MSAO) [6,7]，Baird-Parker medium with ciprofloxacin (BPC) [6-8]，Oxacillin resistance screening agar (ORSAB) [9]等。大部分都是利用金黃色葡萄球菌代謝醣類(如：mannitol)產酸使酸鹼指示劑(如：phenol red)變色，來判讀金黃色葡萄球菌的存在。選擇性培養基中同時會含有抑制其他細菌生長的抑制劑，常見的抑制劑包括氯化鈉(NaCl)、亞碲酸鹽(tellurite)等，而 oxacillin、ciprofloxacin 等抗生素則可以選擇出抗藥性的菌株。近年來，也有廠商針對 MRSA 研發包含特殊發色原(chromogen)的培養基，如：MRSA-ID，CHROMagar MRSA，MRSA-Select 等，利用顏色的變化來判斷 MRSA，有研究指出其敏感度在 51%-65%，特異性為 99%-100%[10]，不過這些發色原培養基分離 MRSA 的效果仍然需要進一步的評估。

由於英國的 MRSA 有 90%以上同時對 ciprofloxacin 具有抗藥性，因此英國衛生部所屬抗生素抗藥性特別諮詢委員會(Special Advisory Committee on Antimicrobial Resistance;SACAR)在 2005 年建議醫療院所利用 BPC 來對病人作篩檢，而 BPC 上生長的菌落則以乳膠凝集試驗加以確認[8]。BPC 利用丙酮酸鈉(sodium pyruvate)促進金黃色葡萄球菌的生長，tellurite 除了抑制其他細菌的生長之外，也會被金黃色葡萄球菌還原而產生黑色菌落，同時具有抑制劑與指示劑的作用。而金黃色葡萄球菌的卵磷脂酶(licithinase)會使菌落周圍出現 2mm 到 5mm 的透明帶(clear zone)，雖然凝固陰性葡萄球菌也可能會在 BPC 上生長，但是在菌落周圍不會出現透明帶，可以用來區分是否為金黃色葡萄球菌。

BPC 的主要優點有：敏感度可以達到 81%，而且大部分的 MRSA 菌株都會在培養後 24 小時內生長，很快就可以得到初步結果[6,7]。需要注意的是，BPC 是利用 ciprofloxacin 來篩選抗藥性菌株，但是並非所有的 MRSA 同時都對 ciprofloxacin 具有抗藥性，所以在採用時必須考慮醫院 MRSA 菌株的特性。

## 萬古黴素抗藥性腸球菌(VRE)

腸球菌為革蘭氏陽性的兼性厭氧球菌，catalase 陰性，能夠在 6.5% NaCl 環境下生長，對 40%的膽鹽(bile salt)與疊氮化鈉(sodium azide)有耐受性。vancomycin 可干擾細菌細胞壁中的 peptidoglycan 形成鏈結，過去被視為革蘭氏陽性菌最後一線的用藥，而 vancomycin 分子量太大無法穿過革蘭氏陰性菌的外膜，因此 vancomycin 對革蘭氏陰性菌無效。VRE 有可能將帶有抗藥性的基因在不同菌株之間相互傳遞，甚至將抗藥性傳遞給其他菌種。

根據 2004 年美國 NNIS 的統計，引起加護病房院內感染的腸球菌中有 28.5%為 VRE[11]，雖然國內醫院的腸球菌中 VRE 所佔的比例目前還不像美國那麼高，但是有逐漸上升的趨勢，台大醫院 VRE 院內感染的發生率已經由 1996 年的 1.2%上升到 2003 年的 6.1%[1]。到目前為止，VRE 可以依據對萬古黴素及 teicoplanin 的抗藥性強度、抗藥性基因表現可否被誘發、以及抗藥性基因可否轉移而區分為 VanA、VanB、VanC、VanD、VanE、VanG 六種表現型。在臨床上，則是以 VanA、VanB 較為重要。美國 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)在 2006 年建議以 6mg/L 的 vancomycin 篩檢 VRE，此濃度的 vancomycin 可以篩選出所有表現型為 VanA，VanB 的菌株。

考量到培養基是否容易取得，當檢體量少時，可以利用現成的 Campylobacter blood agar 來進行篩檢。Campylobacter blood agar 含有 amphotericin B、cephalothin、trimethoprim、polymyxin B 以及 10 mg/L 的 vancomycin 可以抑制包含 VSE (vancomycin-susceptible enterococci)在內的腸內菌生長，但是 VRE 與乳酸桿菌(Lactobacilli

spp.)都可以正常生長。爲了抑制乳酸桿菌生長，可以先將自藥局取得的 clindamycin phosphate 注射液以蒸餾水稀釋到 75 mg/L，在每一個培養基加入 1mL 的 clindamycin phosphate 稀釋液，待稀釋液完全被培養基吸收後，再開始接種檢體。培養 18 個小時後進行判讀，生長出來的菌落需要進一步加做 PYR 生成測試(pyrrolidonyl arylamidase production test)、與膽汁七葉靈快速測試(rapid bile esculin test)，若是皆爲陽性，則可以初步認定爲 VRE[12]。

若是檢體數量很多時，可以使用加入 6 mg/L vancomycin 的 Enterococcosel agar。Enterococcosel agar 含有牛膽汁(oxgall)可以抑制 D 群葡萄球菌、腸球菌以外的革蘭氏陽性菌，而疊氮化鈉 sodium azide 則可以抑制革蘭氏陰性菌的生長，指示劑是七葉靈(esculin)，當 esculin 被 D 群葡萄球菌、腸球菌水解後會在菌落周圍產生棕黑色沈澱。額外添加 6 mg/L 的 vancomycin 可以抑制 D 群葡萄球菌與 VSE 生長。隔夜培養後，在 Enterococcosel agar 上生長的棕黑色菌落經革蘭氏染色爲陽性球菌者即可初步認定爲 VRE[13]。

### 具超廣效乙內醯胺(ESBL)的抗藥性細菌

腸桿菌科(Enterobacteriaceae)是屬於革蘭氏陰性桿菌，其中，K. pneumoniae 是嗜氧性，在 MacConkey agar 上呈現粉紅色黏稠狀菌落，引朵試驗(indole test)爲陰性反應，尿素試驗(urease test)則爲陽性反應。而 E. coli 爲嗜氧性或兼性厭氧菌，MacConkey agar 上呈現紅色或粉紅色菌落，indole test 爲陽性反應，而不產氣和乳糖發酵遲緩的不典型菌落在 MacConkey agar 上則爲無色菌落。

ESBL 可以分爲：TEM、SHV、OXA、CTX-M、PER、VEB、GES、TLA、BES、SFO 等大類，隨著胺基酸序列不同對於各種  $\beta$ -lactam 也會有不同的活性。 $\beta$ -lactam 可以使 PBP 失去催化細菌細胞壁中形成 peptidoglycan 鏈結的能力，而 ESBL 可分解大部分的  $\beta$ -lactam。但是 ESBL 對  $\beta$ -lactam 的活性具有變異性，所以要正確地篩檢 ESBL 通常需要兩種以上的抗生素。2006 年 CLSI 建議篩檢的抗生素應該同時包括 2 種  $\beta$ -lactam，如：cefepodoxime、ceftazidime、aztreonam、cefotaxime、ceftriaxone 等，若是對其中一種抗生素有抗藥性，就應該懷疑該菌可能具有 ESBL。若實驗證實產生 ESBL，則所有的 cephalosporin 類、penicillin 類與 aztreonam 均需改發報告爲具抗藥性。

目前的研究通常會同時採用含有 2 種  $\beta$ -lactam 的區分性培養基來篩檢 ESBL，可以利用的培養基包含 Drigalski agar、MacConkey agar。Drigalski agar 以去氧膽酸鈉(sodium deoxycholate)和結晶紫(crystal violet)抑制革蘭氏陽性菌的生長，而乳糖發酵後會使溴瑞香草藍(bromothymol blue)變成黃色。MacConkey agar 含有 crystal violet 與 bile salt 可以抑制革蘭氏陽性菌，培養基中的乳糖發酵後會使中性紅(neutral red)變成粉紅色至紅色，bilesalt 遇酸有時也會在菌落周圍形成混濁沈澱。

要快速篩檢 ESBL 的抗藥細菌，可以利用特製的 bi-plate，其中一半含 1.5 mg/L cefotaxime 的 Drigalski agar，另一半爲有 2 mg/L ceftazidime 的 MacConkey agar。培養 18-24 個小時後，只要細菌能夠在 bi-plate 的任一邊生長，即有可能爲 ESBL 的抗藥性菌株[14]。但是對 cefotaxime、ceftazidime 的抗藥性也可能是由其他抗藥性機轉獲得的，因此還是需要根據 CLSI 標準做確認試驗。目前 Drigalski agar 在國內可能較難取得，可以考慮以 MacConkey agar 取代。

### 建 議

以上 3 種抗藥性細菌之篩選培養基彙整如表一，利用含抗生素的選擇性培養基進行篩檢時，如果能夠針對抗藥性細菌增菌(enrichment)後再行接種可以有效提高敏感度，但是究竟何種培養液增菌的效果較好還需要進一步的評估[8,15]。同時，許多篩檢方法都需要適當的試驗加以確認，如 MRSA 需要以乳膠凝集試驗確認，而 VRE、ESBL 都需要以 CLSI 的藥物敏感性試驗來確認。未來如果能夠考慮國內細菌的特性，對抗藥性細菌篩檢的操作流程作適度調整，搭配適當的確認試驗，對檢驗室的工作效率會有相當大的幫助。

中華民國 97 年 4 月第十八卷第二期

表一 篩選抗藥性細菌所用培養基及添加抗生素

細菌	培養基	抑制劑	指示劑	添加抗生素	敏感度	特異性	文獻
MRSA	Baird-Parker medium	tellurite	tellurite	8 mg/L ciprofloxacin	81%	NA	[6-8]
MRSA	Mannitol salt agar	NaCl	phenol red	2 mg/L oxacillin	42%	NA	[6,7]
MRSA	Oxacillin resistance screening agar	NaCl, oxacillin, polymyxin B	aniline blue		50.8%	95.6%	[9]
VRE	Campylobacter blood agar	amphotericin B, cephalothin, trimethoprim, vancomycin, polymyxin B		75 mg/L clindamycin phosphate	NA	NA	[12]
VRE	Enterococcosel agar	oxgall, sodium azide	esculin	6 mg/L vancomycin	85%	NA	[13]
ESBL	Drigalski agar	crystal violet sodium, deoxycholate	bromothymol blue	1.5 mg/L cefotaxime	86%	60%	[14]
ESBL	MacConkey agar	crystal violet, bile salt	neutral red	2 mg/L ceftazidime	74%	80%	[14]

註：以上培養基國內皆可購得

## 參考文獻

- 1.Hsueh PR, Chen WH, Teng LJ, et al: Nosocomial infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci at a university hospital in Taiwan from 1991 to 2003: resistance trends, antibiotic usage and in vitro activities of newer antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26:43-9.
- 2.Coia JE, Duckworth GJ, Edwards DI, et al: Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *J Hosp Infect* 2006;63:1-44.
- 3.Siegel J, Rhinehart E, Jackson M, et al: Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings, 2006. *Infection Control in Healthcare Settings*. Available [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroGuideline\\_2006.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroGuideline_2006.pdf).
- 4.王宗曦，張上淳，陳主慈等：台灣醫學中心及區域醫院 2001 年-2003 年金黃色葡萄球菌之抗藥性情形。 *感控雜誌* 2006;16:1-8。

- 5.楊采菱：疾病管制局專欄 MRSA 國際研討會後記。感控雜誌 2007;17:177-81。
- 6.Davies S, Zadik PM, Mason CM, et al: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation of five selective media. *Br J Biomed Sci* 2000;57:269-72.
- 7.Zadik PM, Davies S, Whittaker S, et al: Evaluation of a new selective medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 2001;50:476-9.
- 8.Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, et al: Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 2005;56:1000-18.
- 9.Apfalter P, Assadian O, Kalczyk A, et al: Performance of a new chromogenic oxacillin resistance screen medium (Oxoid) in the detection and presumptive identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44:209-11.
- 10.Nahimana I, Francioli P, Blanc DS: Evaluation of three chromogenic media (MRSA-ID, MRSA-Select and CHROMagar MRSA) and ORSAB for surveillance cultures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:1168-74.
- 11.National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004;32:470-85.
- 12.Edberg SC, Hardalo CJ, Kontnick C, et al: Rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1994;32:2182-4.
- 13.van Horn KG, Gedris CA, Rodney KM: Selective isolation of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996;34:924-7.
- 14.Sturenburg E, Sobottka I, Laufs R, et al: Evaluation of a new screen agar plate for detection and presumptive identification of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51:51-5.
- 15.Nelson RR: Selective isolation of vancomycin-resistant enterococci. *J Hosp Infect* 1998;39:13-8.