

台北某醫院醫療照護相關萬古黴素抗藥性屎腸球菌感染之分子流行病學分析

詹明錦^{1,2} 許松等³ 林永崇^{3,4} 方啟泰^{2,5,6*}

¹佛教慈濟醫療財團法人臺北慈濟醫院 感染管制中心

²國立台灣大學 公共衛生學院流行病學與預防醫學研究所

³國防醫學院三軍總醫院 感染管制室 ⁴內科部感染暨熱帶醫學科

⁵衛生福利部暨國立台灣大學傳染病防治研究及教育中心

⁶國立台灣大學醫學院附設醫院 內科部感染科

Vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) 於 1995 年首次在台灣被發現。近年 VRE 醫療照護相關感染逐漸增多，但流行病學研究仍然相當缺乏，迄今仍未能研擬出有效防治對策。先前國內研究聚焦在 VRE 院內血流感染，尚未對所有類型 VRE 醫療照護相關感染進行完整分析。本研究擬對台北某醫院之萬古黴素抗藥性屎腸球菌 (vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, VREfm) 醫療照護相關感染病例進行分子流行病學分析。收集 2014~2017 年間醫療照護相關感染 VREfm 病人臨床資料及 VREfm 菌株。以脈衝式電泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 分析菌株同源性，同時以聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 方式檢測抗藥性基因 *van A*、*van B*、*van C* 及毒性基因 *esp* (enterococcal surface protein gene)、*acm* (collagen adhesion gene)、*hyl* (hyaluronidase gene) 等。總共收集 54 位病例，包括：泌尿道感染 43 例 (79.6%)，血流感染 8 例 (14.8%) 及其他部位感染 3 例 (5.6%)。所有菌株的 vancomycin 最低抑菌濃度均大於 32 mg/L，對 linezolid 感受性則達 100%。PFGE 顯示部分菌株為同源，具完全相同 PFGE 型別。抗藥基因檢測顯示所有菌株皆具有 *van A*(+)，另高比例菌株同時帶有毒性基因：88.9% *esp* gene(+)、13.0% *hyl* gene(+)、100% *acm* gene(+)。分子證據顯示 VREfm 醫療照護相關感染存在兩種模式：直接院內傳播及多源來源。後者可能與大量使用 glycopeptide 類抗生素造成的選擇壓力有關，但這需要進一步探究其相關性。(**感控雜誌**

民國 110 年 7 月 15 日受理
民國 110 年 8 月 10 日修正
民國 110 年 8 月 24 日接受刊載

通訊作者：方啟泰
通訊地址：台北市中正區徐州路17號535室
連絡電話：(02) 3366-8035

2021:31:216-230)

關鍵詞：醫療照護相關感染、抗藥性細菌、抗生素使用

前 言

自 1986 年萬古黴素抗藥性腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci, VRE) 被發現後[1,2]，VRE 已成為最重要的抗藥性菌種之一。由於傳播快速、治療方式有限且具高致病力及高死亡率之特性[3]，VRE 已成為全世界造成醫療照護相關感染最重要的菌株之一[4]。雖然 VRE 於 1995 年首次在台灣被發現，但不到 7 年的時間院內 VRE 的感染已上升到 8%，而加護病房 (Intensive Care Unit, ICU) 的感染更高至 10% [5]，在目前尚無適當的藥物徹底消除 VRE 的情況下，感染管制措施是降低 VRE 移生及感染的重要方式，台大醫院曾針對 VRE 感染管制措施的介入與否進行評估，發現若有執行 VRE 嚴格的感染管制措施時，VRE 盛行率較低 (出院每千人 0.03~0.09 次)，而 2001 年後 VRE 感染管制措施放寬時，VRE 盛行率大幅增加[6]。依據台灣醫院感染管制與抗藥性監測管理系統 (Taiwan Healthcare associated infection and Antimicrobial resistance Surveillance, THAS) 資料顯示，全台灣醫學中心加護病房 *Enterococci* 院

內感染個案對 vancomycin 類抗生素具抗藥性之比例由 2007 年的 12.4% 增加至 2018 年的 44.5%，區域醫院則由 8.1% 增加至 42.4% [7]，醫學中心加護病房萬古黴素抗藥性屎腸球菌 (vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, VREfm) 之比例由 2007 年的 33.9% 增加至 2020 年的 44.8%，區域醫院則由 21.2% 增加至 44.9% [7]。

VRE 有 9 種表現型，*van A*、*van B*、*van C*、*van D*、*van E*、*van G*、*van L*、*van M*、*van N*，其中 *van A*、*van B* 為最常見的表現型[8-13]，*van A* 也是最常導致院內感染的基因型別；*van A* 基因位於細菌質體基因跳躍子 (transposon) Tn1546 上，可轉錄一個合成酶 (ligase) 產生較低鍵結性之肽鏈，影響 glycopeptide 類抗生素 (vancomycin、teicoplanin) 對於肽聚糖生成時之抑制效果，故對於此二種抗生素具有高度抗藥性，且和 VREfm 的致病最相關。另一常見表現型 *van B* 基因位於細菌質體基因跳躍子 Tn1547 上，作用機轉和 *van A* 基因類似，但對於上述二種抗生素抗性較 *van A* 低[8]。在這九種表現型中，除 *van C* 外，其他八種表

現型皆為獲得性抗藥基因 (acquired resistance)。van C 為內生性抗藥基因 (intrinsic resistance)，出現於 *E. gallinarum* 及 *E. casseliflavus* 中，對於 vancomycin 具有低度抗性；van E、van G 及 van L 較少見，目前僅於 *E. faecalis* 中出現，van N 則僅出現於特定 *E. faecium* 菌株中，對於 vancomycin 皆為低度抗性[8]。雖然現今對於 vancomycin 的抗藥原因已研究十分透徹，但對於 VREfm 的致病原因仍不清楚[9]。

大部分的 VREfm 皆帶有致病因子如 *esp* (enterococcal surface protein)、*acm* (collagen adhesion)、*hyl* (hyaluronidase)，但上述三種因子的致病功能仍不清楚；*esp* 為腸球菌表面蛋白，研究指出 *esp* 和表面附著相關，使細菌更容易進行上皮貼附及形成生物膜，增加細菌群集形成[10,11]，早期研究發現 *esp* 是造成 *E. faecalis* 出現在尿道並形成生物膜之原因，近年來則發現 *esp* 大量出現於院內環境或病人尿液中採集之 *E. faecium* 中[10]，現已將 VRE 是否帶有 *esp* 基因視為其具有高度傳染性的指標[12]。*acm* 基因所轉錄之 ACM 蛋白為可和膠原蛋白結合之黏附蛋白 (adhesion)，為目前發現 *E. faecium* 上唯一的黏附蛋白[11,13]，其 C 端並具有強化肽聚糖之功能[13]；也有研究指出，*acm* 在 VREfm 中的表現多於在 VSEfm 中[14]。*hyl* 基因位於細菌質體上，其轉錄出的 HYL 蛋白

目前推測為一種糖水解酶 (glycosyl hydrolase)，使細菌容易於腸道群集並從腹膜侵入[15]。

VRE 的危險因子可分為病人因素及環境因素[16]，病人因素包括抗生素使用[17-21]、疾病種類 (例如腎衰竭病人使用血液透析) [22,23]、住院日數[18,23-25]或接觸醫療機構設備環境表面；環境因素包括：機構中 VRE 盛行率及傳染力等。抗生素使用是 VRE 的主要危險因子，常見之抗生素為廣效型 cephalosporins 及 vancomycin [17,21,24]。病人若有慢性肝病或接受器官移植則有較高機率感染 VRE [18]；有研究指出 VRE 發生機率为 21.9/1,000 住院人日數 [26]，每多住加護中心一天，感染 VRE 之機率高 1.03 倍，也就是加護中心住越久，則感染 VRE 機率越高 [18,23,27]。近年 VRE 院內感染逐漸增多，但流行病學研究仍然相當缺乏，迄今仍未能研擬出有效防治對策。先前國內研究聚焦在院內血流感染[28]，尚未對 VRE 院內感染進行完整呈現及分析。

本研究收集某醫院得到 *E. faecium* 醫療照護相關感染且對 vancomycin 呈現抗藥性病人，進一步分析這些病人醫療照護相關感染之危險因子，更透過分子生物學方式分析對 vancomycin 呈現抗藥性 *E. faecium* 細菌之表現型特性與抗藥性基因及 *esp*、*acm*、*hyl* 等致病因子分布情形，同時以脈衝式電泳 (pulsed-

field gel electrophoresis, PFGE) 進行分析以了解菌株之間的相關性。

材料與方法

一、菌株與病例資料收集

本研究收集 2014 年起收集醫療照護相關感染 VREfm 的病人，透過感染管制護理師依據衛生福利部疾病管制署 2009 年醫療照護相關感染定義[29]，判斷病人符合收案定義後，將收集到的 VREfm 菌株先保存於 -80°C 冷凍冰箱，同時收集病人的臨床資料包含：性別、年齡、潛在疾病 (underlying disease)、侵入性醫療處置 (invasive procedure)、感染部位及抗生素使用種類 (antibiotics usage)。

二、菌種確認及抗生素感受性檢測

將收集之菌株從 -80°C 冷凍冰箱接種至 BAP agar，於 35°C 溫箱培養 18 小時，然後以 MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 作菌株確認，並依據美國國家臨床檢驗標準委員會 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 標準建議進行抗生素最低抑菌濃度 (MIC) 檢測，檢測抗生素包括 vancomycin、linezolid、penicillin G、erythromycin、tetracycline、teicoplanin、gentamicin-high-level 共七種。

三、脈衝式電泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 分析

1. PFGE 樣品製備

依據 PFGE 標準操作方法進行菌體之包埋、酵素處理及清洗，其過程簡述如下：第一天挑取單一菌落接種於 BAP 培養基於 37°C 溫箱培養 16~18 小時；第二天以棉棒刮取菌體，於 cell suspension buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8.0) 中做成懸浮液，取 300 μ l 菌液至 1.5 ml 微量離心管，加 10 μ l lysozyme (25 mg/ml) 和 5 μ l lysostaphin (2 mg/ml) 混合均勻後，放置 37°C，1 小時反應，以幫助破菌。加入 300 μ l 已回溫至 56°C 的 1% SeaKem® Gold agarose/1% SDS，快速以微量吸管混均勻後注入模具中，放置於室溫 15 min 或 4°C 5 min 使充份凝固，再將膠體自模具中推入 5 ml cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA, pH 8.0; 1% N-lauroyl-sarcosine 含 5 μ l lysozyme (25 mg/ml) 和 15 μ l lysostaphin (2 mg/ml) 及 20 μ l proteinase K (20 mg/ml)，置於 56°C 水浴器振盪 4 小時；膠體經酵素處理後，加 15 ml 預熱至 56°C 的 ddH₂O，置水浴器振盪 15 分鐘，重覆 ddH₂O 清洗兩次，再以 15 ml 預熱至 56°C 的 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 清洗四次，膠體最後保存於 5 ml 的 TE buffer 中，置於 4°C 冷藏，以供 PFGE 電泳分析使用。

2. PFGE 電泳分析 (PFGE

Analysis)

以刀片切取約 2-mm 寬含 chromosome DNA 的膠薄片 (slice)，膠薄片先置入 200 μ l 的指定之限制酶 (SmaI) 緩衝液，室溫下放置 5 分鐘，以微量吸管吸出緩衝液，再注入 200 μ l 含 30U 限制酶之緩衝液，置於 25°C 下放置 4 小時後，將膠薄片取出，用吸水紙儘量吸乾附著於膠薄片之緩衝液，再將膠薄片依序平貼於孔梳 (comb) 上，以 SmaI 切割之 Lambda Ladder PFGE Marker (reference size markers)，之後將孔梳放置於鑄膠台上，倒入融化回溫至 56°C 的 1% SeaKem® Gold agarose，放置室溫 20~30 分鐘，待 agar 凝固後，即可進行電泳。把電泳膠體 PFGE 電泳使用 Bio-Rad CHEF Mapper 脈衝式電泳儀 (Bio-Rad Laboratories Inc.)，確認冷卻系統已降溫到 14°C，將固定撐膠板用框圈上的突筍對準電泳槽中的凹洞插入定位後，放到框圈內，設定電泳條件如下：Switch time 5 秒~40 秒、angle 120°、Voltage gradient 6 volts/cm、14°C、17 小時，完成跑膠後，膠片以 15 μ l ethidium bromide (10 mg/ml) 染色 40 min，再以 ddH₂O 退染，DNA 圖譜影像再以數位影像處理系統 AlphaEase™ (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) 拍照貯存成數位檔案，以供後續比對分析。

3. 脈衝式電泳法圖譜分析 (Interpretation of PFGE Patterns)

菌株間任何一 DNA 片斷的差異皆可能具有流行病學上的意義，菌株 PFGE 圖譜只要與既有之圖譜存有一 DNA 片斷的差異，即視為不同的 PFGE 圖譜，給與 PFGE 圖譜編號。有關判讀標準與菌株間相關性之綜合判定依 Tenover 所發表之 PFGE 判定準則判定之。

4. 電腦輔助式電泳帶模式分析 (Banding pattern Analysis and Dendrogram Construction by Computer-aided Method)

脈衝場電泳法產出之電泳帶模式以電腦軟體 AlphaEase™ (Applied Math, Kortrijk, Belgium) 數位化後以 Tiff 檔儲存，電泳帶模式隨後可利用 BioNumerics software (Applied Math, Kortrijk, Belgium) 進行菌株間相似度之分析與比對。以 Jaccard-complete linkage 法將欲分析菌株群組化 (clustering)，並以樹狀圖 (dendrogram) 呈現。

四、抗藥性與毒性基因檢測

以 PCR 方式檢測 *van A*、*van B*、*van C*、*esp*、*hyl*、*acm* 基因，以期了解所收集之 VREfm 抗藥性的基因分布情形。各基因複製片段大小及引子如後述：*van A* (5'-CAT GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT A-3'、5'-CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA-3') 1,030 bp [30]、*van B* (5'-GTG ACA AAC CGG AGG CGA GGA-3'、5'-CCG CCA TCC TCC

TGC AAA AAA-3') 433 bp、*van C* (5'-GAA AGA CAA CAG GAA GAC CGC-3'、5'-ATC GCA TCA CAA GCA CCA ATC-3') 796 bp；*esp* [12] (5'-GGA ACG CCT TGG TAT G-3'、5'-CCG CTT TTG GTG ATT C-3') 800 bp；*hyl* [31] (5'-ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG-3'、5'-GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA-3') 276 bp；*acm* [13] (5'-GAT TTT TGA GAG ATG ATA TAG TAG-3')。

結 果

總計收集 54 株符合醫療照護相關感染之 *vancomycin resistant Enterococcus faecium* (VREfm)，其中罹患醫療照護相關泌尿道感染病人有 43 例 (79.6%)，醫療照護相關血流感染病人有 8 例 (14.8%)，其他感染者 3 例 (5.6%)。所有菌株對 penicillin 均呈抗藥性，對於 *vancomycin* 之抗藥性濃度檢測均大於 32 mg/L，對於 *teicoplanin* 抗藥性比例為 75.9%，對於 *gentamicin* 之抗藥性比例為 53.7%，對於 *tetracycline* 抗藥性比例為 90.7%，對於 *linzolid* 則無抗藥性菌株檢測出。

分析每位 VREfm 病人感染前是否使用抗生素，分別為 *cefepime* 有 26 例，佔 48.1%；*tapimycin* 有 18 例，佔 33.4%；*teicoplanin* 有 14 例，佔 25.9%；*ceftazidime* 有 13 例，佔 24%；*ampicillin* 有 12 例，

佔 22.2%；*vancomycin* 有 10 例，佔 18.5%；*levofloxacin* 有 9 例，佔 16.6%；*linezolid* 有 5 例，佔 9.3%；*ciprofloxacin*、*meropenem* 及 *ceftazidime* 各有 4 例，佔 7.4%；*piperacillin/tazobactam* 有 2 例，佔 3.7%；*tigecycline* 有 1 例，佔 1.8%。從侵入性醫療處置措施統計分析，分別為置放 *Foley catheter* 有 43 例，佔 79.6%；*endotracheal* 及 *respirator* 各有 38 例，佔 70.3%；*Arterial line* 有 37 例，佔 68.5%；*Central venous catheterization (CVC)* 有 35 例，佔 64.8%；*Peripheral IV* 有 28 例，佔 51.8%；*Hemodialysis (perm/double lumen)* 有 21 例，佔 38.8%；*Drainage catheter* 有 18 例，佔 33.3%；*Tracheostomy* 有 16 例，佔 29.6%；*Swan-Ganz* 有 7 例，佔 12.9%；*Total parenteral nutrition (TPN)* 有 4 例，佔 7.4%；*Hemodialysis (A-V fistula/graft)* 及 *Long term IV* 各有 2 例，佔 3.7%。從病人潛在因子來分析，有糖尿病 (*Diabetes mellitus, DM*) 22 例，佔 40.7%；腫瘤 (*Solid tumor*) 有 15 例，佔 27.7%；腦血管意外 (*Cerebrovascular Accident, CVA*) 有 14 例，佔 25.9%；類固醇 (*steroid*) 有 13 例，佔 24%；長期臥床 (*Long term bedridden*) 有 8 例，佔 14.8%；昏迷 (*Coma*) 有 6 例，佔 11.1%；尿毒症 (*Uremia*) 有 5 例，佔 9.3%；肝硬化 (*cirrhosis of liver*)、化療/放射線療法 (*Chemotherapy/Radiotherapy*)

及植入物 (Implant) 各有 2 例，佔 3.7%；血液疾病 (hematologic disorders)、慢性阻塞性肺病 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) 及系統性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus, SLE) 各有 1 例，佔 1.9% (表二)。

PFGE 對所收集醫療照護相關感染 VREfm 進行分析結果，如圖一，菌株編號 S14、S18、S24、S29、S32、S34、S37、S39、S50、S53 與 S8 在圖譜上可見具有 100% 相同度，另外 100% 相同度的族群為編號 S10 及編號 S27，除此之外其餘醫療照護相關 VREfm 菌株顯示並不相同。*van A* 有 54 例佔 100%，*van B* 及 *van C* 則無檢出。*esp* 有 48 例佔 88.8%；*hyl* 有 7 例佔 12.9%；*acm* 有 54 例佔 100%，如表一。進一步分析 PFGE 100% 相同度之菌株也均檢測出 *vanA*、*esp* 及 *acm*，但是均未檢測出 *hyl*。

討 論

研究結果發現所有收集的

表一 抗藥性基因檢測結果

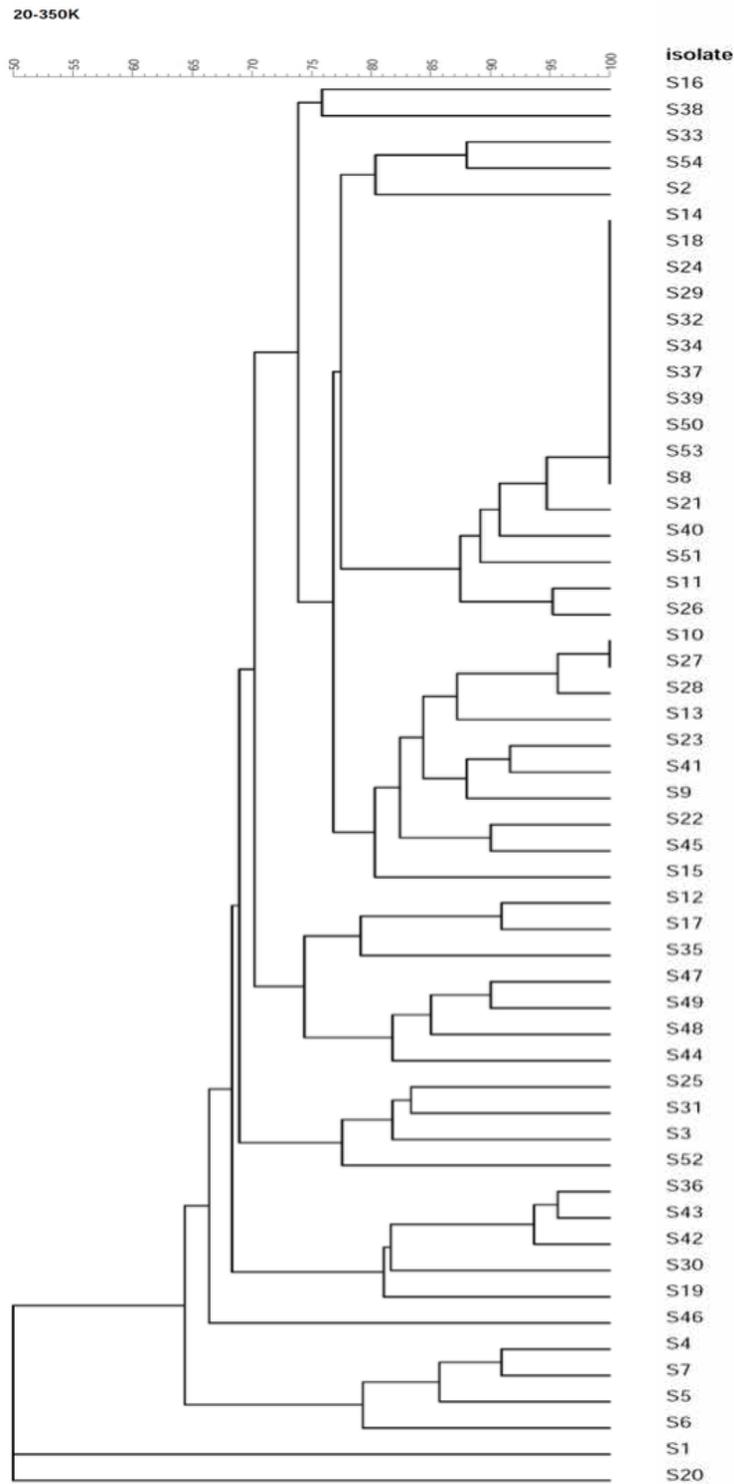
| 抗藥性基因 | Number (%) |
|--------------|------------|
| <i>van A</i> | 54 (100%) |
| <i>van B</i> | 0 |
| <i>van C</i> | 0 |
| <i>esp</i> | 48 (88.9%) |
| <i>hyl</i> | 7 (13.0%) |
| <i>acm</i> | 54 (100%) |

VREfm 菌株都含有 *van A* 基因，且具有多重抗藥性，對於 vancomycin 之抗藥性濃度檢測皆大於 32 mg/L，而依據抗生素感受性統計結果顯示 linezolid 現在是用於感染 VREfm 的患者的首選藥物，此結果與過去一篇台灣的研究報導是一致性[28]。

脈衝式電泳法 (PFGE) 為目前細菌基因分型公認的標準方法，已被廣泛應用於醫療照護相關感染群突發之調查，主要是提供判定傳播於病人間、醫護人員或醫院環境間之同種細菌是否源自同一基因型，也是建立細菌分子流行病學很重要的工具。PFGE 分型法的優點，即為其單一基因的變異具有解釋的標準，PFGE 分型法與流行病學資料結合的四種判定準則 (The criteria for interpreting PFGE patterns)：1. 當此菌株之 PFGE 型別與群突發菌株 (outbreak strain) 之 PFGE 型別完全相同時，則判定為無差異 (indistinguishable)，而應將此菌株歸為群突發菌株 (isolate is part of the outbreak)；2. 當此菌株之 PFGE 型別與群突發菌株 (outbreak strain) 之 PFGE 型別相差 2~3 個 bands 時，則判定為與群突發菌株極相似 (closely related)，而應視此菌株極可能為群突發菌株 (isolate is probably part of the outbreak)；3. 當此菌株之 PFGE 型別與群突發菌株 (outbreak strain) 之 PFGE 型別相差 4~6 個 bands 時，則判定為與群突發菌株可能相似 (possibly related)，而應視此菌株為

表二 個案基本資料統計(N=54)

| 醫療照護相關感染部位 | | Number (%) |
|---------------|--|------------|
| | UTI (urinary tract infection) | 43 (79.6%) |
| | BSI (blood stream infection) | 8 (14.8%) |
| | Other infections | 3 (5.6%) |
| 抗生素使用 | | |
| | cefepime | 26 (48.1) |
| | tapimycin | 18 (33.4) |
| | tecoplanin | 14 (25.9) |
| | ceftazidime | 13 (24) |
| | ampicillin | 12 (22.2) |
| | vancomycin | 10 (18.5) |
| | levofloxacin | 9 (16.6) |
| | linezolid | 5 (9.3) |
| | ciprofloxacin | 4 (7.4) |
| | meropenem | 4 (7.4) |
| | cefpirome | 4 (7.4) |
| | piperacillin/tazobactam | 2 (3.7) |
| | tigecycline | 1 (1.8) |
| 侵入性醫療處置措施統計分析 | | |
| | Foley catheter | 43 (79.6) |
| | Endotracheal intubation | 38 (70.3) |
| | Respirator | 38 (70.3) |
| | Arterial line | 37 (68.5) |
| | Central venous catheterization | 35 (64.8) |
| | Peripheral IV | 28 (51.8) |
| | Hemodialysis (perm/double lumen) | 21 (38.8) |
| | Drainage catheter | 18 (33.3) |
| | Tracheostomy | 16 (29.6) |
| | Swan-Ganz | 7 (12.9) |
| | Total parenteral nutrition (TPN) | 4 (7.4) |
| | Hemodialysis (A-V fistula/graft) | 2(3.7) |
| | Long term IV | 2 (3.7) |
| 病人潛在因子 | | |
| | 糖尿病 (Diabetes mellitus, DM) | 22 (40.7) |
| | 腫瘤 (Solid tumor) | 15 (27.7) |
| | 腦血管意外 (Cerebrovascular Accident, CVA) | 14 (25.9) |
| | 類固醇 (steroid) | 13 (24) |
| | 長期臥床 (long term bedridden) | 8 (14.8) |
| | 昏迷 (coma) | 6 (11.1) |
| | 尿毒症 (Uremia) | 5 (9.3) |
| | 肝硬化 (cirrhosis of liver) | 2 (3.7) |
| | 化療/放射線療法 (Chemotherapy/Radiotherapy) 及植入 (Implant) | 2 (3.7) |
| | 血液疾病 (hematologic disorders) | 1 (1.9) |
| | 慢性阻塞性肺病 (obstructive pulmonary disease, COPD) | 1 (1.9) |
| | 系統性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus, SLE) | 1 (1.9) |



圖一 脈衝式 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 電泳分析圖

可能是群突發菌株 (isolate is possibly part of the outbreak)；4. 當此菌株之 PFGE 型別與爆發流行菌株 (outbreak strain) 之 PFGE 型別相差 6 個 bands 以上時，則判定為與群突發菌株不同 (different)，而應視此菌株不是群突發菌株 (isolate is not part of the outbreak)。因此，基因變異的解釋標準與流行病學結合的判讀準則構成了 PFGE 分型法被廣泛使用的重要因素。此次調查發現醫療照護相關感染 VREfm 雖有菌株編號 S14、S18、S24、S29、S32、S34、S37、S39、S50、S53 與 S8 在圖譜上可見為同一群 100% 相同度及 S10 及 S27 為另一群 100% 相同度，進一步分析其中 S14 及 S18 為來自急診加護病房同一病人不同檢體，檢體來源為尿液與血液，可視為此次 PFGE 之品質保證，其餘 9 株 100% 相同度之來源分布在急診加護病房 2 株、呼吸照護病房 4 株及 13 病房、25 病房與 43 病房各 1 株，進一步分析呼吸照護病房 4 株菌株收集時間分別在不同月份，照顧醫護人員也不盡相同，雖無直接證據推測可能經由醫護人員照護過程中引起交互傳染，但也不排除環境清潔未落實而導致相同菌株感染。急診加護病房之相同 PFGE 結果菌株收集也分別在不同月份，結果推測也如前述狀況，而編號 S10 來自 33 病房 (位於 3 樓) 收集時間為 2015 年 1 月，編號 S27 來自一般外科加護病房 (位於 4 樓) 收集時間為 2015 年 3 月，兩者雖

然 PFGE 顯示 100% 相似度，但實際住院期間無實際相關性，除此之外其餘醫療照護相關 VREfm 菌株無 100% 相似度，雖然病人得到醫療照護相關 VREfm 感染可能與病人本身免疫能力及抗生素使用等諸多因素有關。

VRE 之抗藥基因最常見有三種基因型分別為 *van A*, *van B*, *van C*，其中 *van A* 對 vancomycin 與 teicoplanin 具高度抗藥性，且該抗藥基因可以傳遞；*van B* 基因抗藥性為中度，*van C* 抗藥性最低，台灣首度於 1995 年發現，而 *van A*、*van B* 及 *van C* 三型抗藥基因均在台灣發現，此次研究結果所有收集之 VREfm 均帶有 *van A* 基因，並無發現帶有 *van B* 或 *van C* 基因。

此研究另分析 *esp*、*hyl*、*acm* 三種 virulence genes，檢測結果顯示 54 位病人菌株分別有 48 位病人 (88.9%) 菌株檢測帶有 *esp* gene，7 位病人 (13.0%) 菌株檢測帶有 *hyl* gene，且全部病人均帶有 *acm* 基因。*esp* 蛋白被認為在表面附著中起作用，因此促進生物膜中的移生和細菌持久性，在早期的研究中，*esp* 僅在 *E. faecalis* 中發現，大多 *E. faecalis* 分離物即含有該基因；幾年後，另一項研究發現，與 *E. faecalis* 相比，臨床 *E. faecium* 分離株中帶有 *esp* 基因的發病率增加 [11,32]。Camargo 等人證明 *esp* 基因 56% 僅存在於 VREfm，在 VSEfm 中沒有發現 [33]。在歐洲醫院調查，發現在臨床 VREfm 分離株中含有

esp 者其發病率更高[34]。本次研究結果也與上述文獻報告相同，*esp* 在 VREfm 中所佔比例為 79.6%。

hyl 基因被認為是糖苷水解酶，推論有助於腸道移生和腹膜侵襲有關，研究顯示臨床感染 *E. faecium* 菌株的 *hyl* 陽性率高於非致病性 *E. faecium* 的 *hyl* 陽性率[35]。在本研究中發現所有菌株僅有 13% 帶有 *hyl* 基因。

過去研究已經證實 *acm* 在 *E. faecium* 功能為粘附於膠原蛋白[11]，在心內膜炎的發病機制中是很重要的危險因子。Nallapareddy et al 證明了 *acm* 基因座的廣泛分佈，並且認為其是幾乎唯一出現在臨床 *E. faecium* 分離株中[36]。然而 *acm* 在 *E. faecium* 感染的發病機制中的確切作用尚未得到證實。在此次研究中，*acm* 基因在所有菌株中均有檢出，值得進一步做後續探討 *acm* 基因在此次研究菌株所扮演的角色。

由此次研究透過 PFGE 100% 相同菌株及基因交叉分析，推測極可能院內交叉感染造成，可能原因為環境清潔未落實與醫護人員未落實手部衛生而導致醫療照護相關 VREfm 感染，如何有效阻斷院內傳播需要進一步研究，另外一方面大部分菌株 PFGE 顯示不同來源，可能與大量使用 glycopeptide 類抗生素造成的選擇壓力有關，是否管制 glycopeptide 類抗生素減少 VRE 的感染，未來需要進一步探究其相關性。因此，落實感

染管制措施及環境清潔與有效管制 glycopeptide 類抗生素的使用，對於預防醫療照護相關 VREfm 感染已為刻不容緩的事情。

參考文獻

1. Leclercq R, Derlot E, Duval J, et al: Plasmid-mediated resistance to Van Comycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 1988;319:157-61.
2. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, et al: Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1988;1:57-8.
3. Murray BE: Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med* 2000;342:710-21.
4. Patel R: Clinical impact of Vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:iii13-21.
5. Yeh KM, Siu LK, Chang JC, et al: Vancomycin-resistant enterococcus (VRE) carriage and infection in intensive care units. *Microb Drug Resist* 2004;10:177-83.
6. Wang JT, Chen YC, Chang SC, et al: Control of vancomycin-resistant enterococci in a hospital: a five-year experience in a Taiwanese teaching hospital. *J Hosp Infect* 2004;58:97-103.
7. 2018 年台灣院內感染監視資訊系統監視季報 (第 4 季)。
8. Cattoir V, Leclercq R: Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother* 2013;68:731-42.
9. Mascini EM, Bonten MJ: Vancomycin-resistant enterococci: consequences for therapy and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:43-56.
10. Sava IG, Heikens E, Huebner J: Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:533-40.
11. Van Wamel WJ, Hendrickx AP, Bonten MJ, et al: Growth condition-dependent *Esp* expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun* 2007;75:924-31.

12. Coque TM, Willems R, Cantón R, et al: High occurrence of esp among ampicillin-resistant and Van Comycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:1035-8.
13. Nallapareddy SR, Singh KV, Okhuysen PC, et al: A functional collagen adhesin gene, acm, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect Immun* 2008;76:4110-9.
14. Kang M, Xie Y, He C, et al: Molecular characteristics of van-comycin-resistant *Enterococcus faecium* from a tertiary care hospital in Chengdu, China: molecular characteristics of VRE in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:933-9.
15. Valdezate S, Miranda C, Navarro A, et al: Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant *Enterococcus faecium* harbouring an Inc18-like:Tn1546 plasmid in a haemo-oncology ward of a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:832-6.
16. Lin MY, Hayden MK: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus: recognition and prevention in intensive care units. *Crit Care Med* 2010;38:S335-44.
17. Carmeli Y, Eliopoulos GM, Samore MH: Antecedent treatment with different antibiotic agents as a risk factor for vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Emerg Infect Dis* 2002;8:802-7.
18. Ostrowsky BE, Venkataraman L, D'Agata EM, et al: Vancomycin-resistant enterococci in intensive care units: high frequency of stool carriage during a non-outbreak period. *Arch Intern Med* 1999;159:1467-72.
19. Bonten MJ, Hayden MK, Nathan C, et al: Epidemiology of colonisation of patients and environment with Van Comycin-resistant enterococci. *Lancet* 1996;348:1615-9.
20. Ostrowsky BE, Trick WE, Sohn AH, et al: Control of vancomycin-resistant enterococcus in health care facilities in a region. *N Engl J Med* 2001;344:1427-33.
21. Padiglione AA, Wolfe R, Grabsch EA, et al: Risk factors for new detection of vancomycin-resistant enterococci in acute-care hospitals that employ strict infection control procedures. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2492-8.
22. Batistão DW, Gontijo-Filho PP, Conceição N, et al: Risk factors for vancomycin-resistant enterococci colonisation in critically ill patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;107:57-63.
23. Warren DK, Kollef MH, Seiler SM, et al: The epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization in a medical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:257-63.
24. Furtado GH, Martins ST, Coutinho AP, et al: Prevalence and factors associated with rectal vancomycin-resistant enterococci colonization in two intensive care units in Sao Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2005;9:64-9.
25. Huang SS, Datta R, Rifas-Shiman S, et al: Colonization with antibiotic-susceptible strains protects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* but not vancomycin-resistant enterococci acquisition: a nested case-control study. *Crit Care* 2011;15:R210.
26. Pan SC, Wang JT, Chen YC, et al: Incidence of and risk factors for infection or colonization of vancomycin-resistant enterococci in patients in the intensive care unit. *PLoS One* 2012;7:e47297.
27. Se YB, Chun HJ, Yi HJ, et al: Incidence and risk factors of infection caused by vancomycin-resistant enterococcus colonization in neurosurgical intensive care unit patients. *J Korean Neurosurg Soc* 2009;46:123-9.
28. Wang JT, Chang SC, Wang HY, et al: High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:406-11.
29. 衛生福利部疾病管制署：醫療照護相關感染定義，2009。
30. Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, et al: Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2311-7.
31. Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, et al: Development of a multiplex PCR for the detection of asa1, gelE, cylA, esp, and hyl genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4473-9.
32. Sava IG, Heikens E, Huebner J: Pathogenesis

- and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:533-40.
33. Camargo IL, Gilmore MS, Darini AL: Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:1123-30.
 34. Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, et al: Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004;42:4473-9.
 35. Valdezate S, Miranda C, Navarro A, et al: Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant *Enterococcus faecium* harbouring an Inc18like::Tn1546 plasmid in a haemato-oncology ward of a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:832-6.
 36. Nallapareddy SR, Singh KV, Okhuysen PC, et al: A functional collagen adhesin gene, *acm*, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect Immun* 2008;76:4110-9.

Molecular epidemiology of healthcare-associated vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections at a hospital in Taipei

Ming-Chin Chan^{1,2}, Sung-Teng Hsu³, Jung-Chung Lin^{3,4}, Chi-Tai Fang^{2,5,6}

¹Infection Control Center, Taipei Tzu Chi Hospital, Buddhist Tzu Chi Medical Foundation, Taiwan

²Institute of Epidemiology and Preventive Medicine, College of Public Health, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

³Infection Control Office, Tri-Service General Hospital, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan

⁴Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Department of Internal Medicine, Tri-Service General Hospital, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan

⁵Infectious Diseases Research and Education Center, Ministry of Health and Welfare and National Taiwan University, Taipei, Taiwan

⁶Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, National Taiwan University Hospital, National Taiwan University College of Medicine, Taipei, Taiwan

Vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) was first detected in Taiwan in 1995, according to the data from the Taiwan Healthcare-associated infection and Antimicrobial resistance Surveillance, (THAS). Recently, healthcare-associated VRE infections have gradually increased; however, epidemiological research is still insufficient, resulting in a lack of effective prevention and control strategies so far. Previous domestic studies have focused only on nosocomial bloodstream infections, but investigation or analysis of nosocomial infections in VRE is insufficient. This study conducted a molecular epidemiological analysis of all cases with nosocomial vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) infections at a hospital in Taipei between 2014 and 2017. Since 2014, we collected clinical data and strains from patients with VREfm infection and performed molecular typing using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to investigate the role of the VREfm resistance gene in the collected strains. The VanA, VanB, VanC, enterococcal surface protein

(Esp), collagen adhesion (Acm), and hyaluronidase (hyl) genes were detected by polymerase chain reaction testing. We collected 54 cases, including 43 (79.6%) patients with urinary tract infection, eight (14.8%) with bloodstream infection, and three (5.6%) with other infections. Resistance to vancomycin was > 32 mg/L in all strains but with 100% sensitive to linezolid. The PFGE results showed that some of the strains were 100% correlated. All strains showed 100% VanA positivity, 88.9% were Esp-positive, 13.0% exhibited hyl-positivity, and 100% were Acm-positive. Molecular evidence suggests two modes of healthcare-associated infection in VREfm: direct nosocomial transmission and multiple sources under selective pressure caused by antibiotics.

Key words: Healthcare-associated infection, Drug-resistant bacteria, Antibiotic usage