

1. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone. 1995; 199-376.
2. Sanford JP, Gilbert DN, Sande MA: The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy. 20th ed. 1996.
3. The Medical Letter on Drugs and Therapeutics: Handbook of Antimicrobial Therapy. New Rochelle: The Medical Letter, Inc. 1994.
4. Bodey GP, Milatovic D, Braveny I: The Antimicrobial Pocket Book, 2nd ed. 1995
5. Reese RE, Betts RF: Handbook of Antibiotics. 2nd ed. Boston: Little, Brown Co. 1993.

具抗藥性腸球菌

黃文貴

高雄榮民總醫院

前言

腸球菌屬 (*Enterococcus* genus) 常是造成人類嚴重感染的病原菌；例如：次亞急性心內膜炎、敗血症、尿道及生殖道的感染。最近幾年來，它在醫院內感染 (nosocomial infection) 的角色，也日益被重視，已逐漸成為住院病患醫院內感染的主因，國外有研究統計其感染率約為 15% 左右。因為腸球菌對於作用於細菌細胞壁的藥物，例如盤尼西林 (penicillin) 和 ampicillin 等 β -lactams 抗微生物藥劑，常不具感受性；至於氨基糖苷類 (aminoglycoside) 的抗微生物藥劑對於腸球菌與生就具有抑菌效果不佳的特點，其最低抑菌濃度 (MIC) 則於 8~256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間；故不能單獨使用上述兩類抗微生物藥劑治療腸球菌的感染，以避免治療失敗造成困擾。在 1946 年 Hunter 氏報告，利用盤尼西林和 streptomycin 的協同殺菌作用 (synergistic killing effect)，成功的治療一名已口服兩個月盤尼西林而治療

失敗的腸球菌感染之心內膜炎患者。Moellering 等人經實驗證實，當含有抑制細菌細胞壁合成的抗微生物藥劑存在時，腸球菌對 [^{14}C] 一氨基糖苷類藥物的穿透和吸收性會增加，這種現象可能是此兩類藥物具協同作用的機轉，故以抑制細菌細胞壁合成作用的藥物加上一種氨基糖苷類抗微生物藥物的結合式治療法，已成為治療腸球菌感染的最佳標準選擇。

但自 1971 年起陸續有人發現腸球菌具有抗藥性，而產生新的抗藥性機轉，這些菌種被命名為對高濃度氨基糖苷類具抗藥性 (high level aminoglycoside resistance; HLAR) 腸球菌，其最低抑菌濃度可高達大於 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上。由於此類細菌的發現，目前臨床醫師在治療嚴重的腸球菌感染症時，常會要求對分離菌株進行檢測是否為 HLAR 菌株，以避免合併使用細胞壁合成抑制的殺菌藥物時的協同殺菌作用無效，而導致治療失敗。

面對 HLAR 腸球菌感染症時，通常會選擇 glycopeptide 類抗微生物藥劑來治療，

因為具有抗藥性是不多見的。直到1988年在英國倫敦首次有對vancomycin具抗藥性腸球菌 (*vancomycin-resistant Enterococcus; VRE*) 的群突發感染報告，接著法國也有類似報告發表，而引起世人對於腸球菌具glycopeptide抗藥性的重視，並著手研究其偵測方法。

抗藥性機轉

對HLAR腸球菌而言，因本身已不具殺菌力，故不會有協同殺菌作用產生。HLAR腸球菌的抗藥性產生大部份是由於具有可經由質體 (plasmid) 傳遞的氨基糖苷類—修飾酵素 (aminoglycoside-modifying enzyme; AMEs) 基因而分泌酵素，進而改變氨基糖苷類抗微生物藥劑的結構；或者是因為菌種突變的原因，而造成streptomycin抗微生物藥劑與核糖體 (ribosome) 結合能力下降，亦稱為核糖體抗藥性。目前已有多種AMEs被發現，由於具有不同的基質外型 (substrate profiles)，所以產生對不同種類氨基糖苷類抗微生物藥劑的抗藥性表現。已知的AMEs酵素有下列幾種：

- AAC(6')APH(2'')——能分解除streptomycin以外的氨基糖苷類抗微生物藥劑。
- APH(3')-III——能分解kanamycin。
- ANT(4'-4'')——能分解amikacin, kanamycin及tobramycin。

詳細可以參考表一。

經由基因及臨床表現我們已經學習了許多有關腸球菌對vancomycin產生抗藥性的機轉，一般可將它們的抗藥性表現型 (phenotype) 分為三種：(1) 對高濃度vancomycin具抗藥性，其MIC值為 $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ ，且同時對teicoplanin具抗藥性，其MIC值為 $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ ；此為Van A表現型。(2) 對低至高濃度的vancomycin具有抗藥性，其MIC值為 $16-512 \mu\text{g/mL}$ ；但對teicoplanin不具抗藥性；此為Van B表現型。(3) *E. gallinerum*和*E. casseliflavus*具有內在的低濃度抗藥性，其MIC值為 $2-32 \mu\text{g/mL}$ ；此為Van C表現型。在*E. faecalis*及*E. faecium*常可見存在著Van A或Van B的抗藥性表現型，但亦有可能於其他屬中發現。根據美國臨床實驗室標準委員會 (NCCLS) 的定義，腸球菌對

表一 *E. faecalis* HLAR菌株的氨基糖苷類—修飾酵素

酵 素	作 用 藥 物				
	Gentamicin	Streptomycin	Tobramycin	Amikacin- kanamycin	Netilmicin
Streptomycin adenytransferase	—	+	—	—	—
3' Phosphotransferase	—	—	—	+	—
2'' Phosphotransferase and 6' acetyltransferase ^a	+	—	+	+	+

^aOccurs as a bifunctional enzyme.

註: AAC: Acetyltransferases; ANT: Adenytransferases; APH: Phosphotransferases.

vancomycin MIC 值 $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ 為具有感受性，MIC 值 $8-16 \mu\text{g/mL}$ 為具中度抗藥性，MIC 值 $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ 則屬於具抗藥性。

腸球菌對 β -lactams 藥物類皆因具有內因抗藥性，故對盤尼西林的MIC 值通常是 $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ ，但反觀一般的鏈球菌則盤尼西林的MIC 值通常是 $\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$ 。於臨床上與人類感染有關，且常被分離的*E. faecium*就較*E. faecalis*與生就對盤尼西林具有抗藥性；*E. faecalis*對盤尼西林的MIC 值通常為 $2-8 \mu\text{g/mL}$ ，但*E. faecium*則為 $16-32 \mu\text{g/mL}$ 。至於腸球菌對ampicillin 的MIC 值則較盤尼西林有較低一個稀釋濃度。會產生 β -lactamase 的腸球菌並不多見，該菌也可經由改變盤尼西林結合蛋白

(penicillin-binding protein; PBP) 輕易破壞ampicillin 或盤尼西林等有效藥物。

抗藥性篩檢方法

腸球菌對氨基糖苷類與抑制細菌細胞壁活性的抗微生物藥劑間的協同作用測定，可直接以費時且複雜的殺菌時間(time-killing) 方法加以研究；但亦可以較方便的篩檢方法加以測定，於臨床常規檢驗祇需測定gentamicin 及streptomycin 兩種抗微生物藥劑即可。由於對gentamicin 具有抗藥性的所有腸球菌，同時也會對除streptomycin (因產生抗藥性的機轉不同) 以外的所有氨基糖苷類抗微生物藥劑產生抗藥性；因此要與streptomycin 的抗藥性

表二 HLAR及VRE腸球菌之篩檢方法

	篩 檢 方 法			
	vancomycin	氨基糖苷類	氨基糖苷類	氨基糖苷類
	瓊脂稀釋篩檢法	瓊脂稀釋篩檢法	肉湯稀釋法	紙錠-瓊脂擴散法
培養基	BHI agar	BHI agar	BHI broth	M-H agar
接種量	10^5-10^6 CFU/spot	10^6 CFU/spot	5×10^5 CFU/mL	0.5 McFarland ^a
培養時間 (小時)	24	24 ^b	24 ^b	18-24
藥物濃度				
vancomycin	$6 \mu\text{g/mL}$	—	—	—
gentamicin	—	$500 \mu\text{g/mL}$	$500 \mu\text{g/mL}$	$120 \mu\text{g/disc}$
streptomycin	—	$200 \mu\text{g/mL}$	$1000 \mu\text{g/mL}$	$300 \mu\text{g/disc}$
判讀標準 (陽性)	>1 菌落	>1 菌落	任何生長	6mm: 抗藥性 7-9mm: 無法認定 ^c $\geq 10\text{mm}$: 感受性

a : NCCLS 紙錠—瓊脂擴散法標準。

b : 當streptomycin 於24小時陰性時，需再培養24小時。

c : 此時應以瓊脂或肉湯稀釋法加以確認。

偵測分開來進行。

臨床上分離出的*E. faecium*不論試管內試驗 (in vitro) 的結果如何，實際上對amikacin, kanamycin, tobramycin及netilmicin都具有內在抗藥性。當*E. faecalis*對gentamicin具感受性時，它可能會對kanamycin及amikacin產生抗藥性。假使考慮選擇amikacin為治療藥物時，試管試驗的amikacin結果，並不能偵測到*E. faecalis*對amikacin具抗藥性的HLAR菌株，應該使用kanamycin的試管試驗，則將可偵測到amikacin的HLAR菌株。

在1994年NCCLS對於實驗室中偵測HLAR腸球菌的方法，建議使用瓊脂稀釋篩檢法、肉湯微量稀釋法及紙錠—瓊脂擴散法；這些方法於表二中簡述之。

瓊脂稀釋篩檢法

瓊脂平板是以brain heart infusion agar (BHIA) 為基質，然後分別添加500 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin, 200 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin和6 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin等抗微生物藥劑，接種源是以經過18至24小時培養後的菌落，調至0.5 McFarland標準濃度 (1.5×10^8 CFU/mL)，然後以針狀接種頭取10 μL 的菌懸浮液接種，最終接種量為 10^6 CFU/mL。將瓊脂平板置於一般溫箱中培養達24小時後判讀，假使呈現有大於一個菌落或微量的模糊狀生長情形，皆判讀為具有抗藥性。Streptomycin於24小時觀察時，若為陰性反應，則需要再培養24小時，才做最後的判讀結果。腸球菌於Mueller-Hinton agar (MHA)，MHA加5%綿羊血或dextrose phosphate agar等培養基上由於生長得更好，故可以用來取

代BHIA (但NCCLS並不建議使用)。至於kanamycin抗藥性的篩檢試驗並沒有被廣泛的評估過，且未經標準化，但有人報告可以使用kanamycin 200 $\mu\text{g/mL}$ 濃度於BHIA內，而可以偵測到對amikacin及kanamycin具抗藥性的腸球菌。

肉湯微量稀釋法

肉湯微量稀釋法是於微量稀釋盤中，以BHI broth為基質，分別添加500 $\mu\text{g/mL}$ 的gentamicin，1,000 $\mu\text{g/mL}$ 的streptomycin，接種菌懸浮液則建議使用常規肉湯微量稀釋法中的濃度 5×10^5 CFU/mL，接種後將微量稀釋盤置於一般溫箱中培養24小時後判讀，有任何生長 (混濁) 的跡象皆判讀為具有抗藥性，streptomycin的判讀標準則與瓊脂稀釋篩檢法相同。

在肉湯微量稀釋法中，streptomycin使用的濃度為1,000 $\mu\text{g/mL}$ ，為瓊脂稀釋篩檢法中的一半濃度，是由於在常規使用的革蘭氏陽性菌肉湯微量稀釋法MIC panel中通常細菌懸浮液接種濃度為 5×10^5 CFU/mL，而於瓊脂稀釋篩檢法中 10^6 CFU/spot的濃度是肉湯稀釋法 (5×10^4 CFU/0.1 mL well) 的20倍，而且由於使用較低的細菌濃度有助於偵測HLAR的streptomycin菌株的存在，故抗微生物藥物的濃度由2,000 $\mu\text{g/mL}$ 降至1,000 $\mu\text{g/mL}$ 是必需的。在本方法中，由於生長情形不佳及低接種源濃度，故Mueller-Hinton broth並不適用，至於其他種類的胺基糖苷類抗微生物藥劑在此法則尚未有評估報告。

紙錠—瓊脂擴散法

偵測HLAR的標準操作步驟是以不含

添加物的MHA為基質，接種菌懸浮液為0.5 McFarland濃度，然後再貼上含有120 μg 的gentamicin及300 μg streptomycin紙錠，置於一般溫箱35°C培養18至24小時後判讀。當抑制圈呈現大於10mm時，則表示對該藥物具有感受性；無抑制圈呈現時，則表示具有抗藥性；但當抑制圈大小為7至9mm時，通常是代表HLAR，但也有少部份祇是代表著MIC較高而已。所以當抑制圈為7-9mm時，需要以標準的瓊脂或肉湯稀釋法來加以確認，高濃度的gentamicin及streptomycin紙錠目前祇有少數製造廠有供應。

VRE的偵測，則是以含30 μg 的vancomycin和teicoplanin紙錠，經24小時，35°C培養後判讀。由於glycopeptide類藥物於瓊脂中擴散速率緩慢，故通常會呈現小的抑制圈。根據NCCLS的判讀標準：vancomycin $\geq 17\text{mm}$ ，teicoplanin $\geq 14\text{mm}$ 表示具有感受性；vancomycin 15-16mm，teicoplanin 11-13mm為具中度感受性；當vancomycin $\leq 14\text{mm}$ ，teicoplanin $\leq 10\text{mm}$ 代表具有抗藥性。

品管菌株

上述測試方法都要使用*E. faecalis* ATCC 29212（不生長，等於具感受性）和*E. faecalis* ATCC 51299（生長，等於具抗藥性）等菌株做為實驗品質管制菌株，以確保實驗結果品質。紙錠—瓊脂擴散法祇使用*E. faecalis* ATCC 29212菌株即可，120 μg gentamicin應在16-22mm之間，300 μg streptomycin應在14-19mm之間。

目前各大醫院的實驗室大多使用紙錠

瓊脂擴散試驗法，或Vitek, Microscan等自動化儀器來進行藥物感受性試驗，但對於具有Van A及Van B基因的抗藥性腸球菌並無法完全偵測到。最近對於使用瓊脂紙錠擴散法偵測vancomycin的抗藥性，建議要延長培養時間至24小時，並於充足的傳送光線上觀察抑制圈大小的結果，將可改進此缺點。但是部份自動化儀器由於培養時間不足而無法完全偵測到對vancomycin具抗藥性的腸球菌，儀器製造廠已著手由電腦程式中修改判讀時間，且NCCLS也建議使用Wielly等人所發展的瓊脂稀釋篩選法試驗加以輔助。

結 論

由於腸球菌是屬於人體內的正常菌叢，故祇建議對於嚴重性感染，例如：血液、脊髓液或其他正常時為無菌的體液中分離出的菌株才進行HLAR及VRE的篩檢，以確保病患的抗微生物藥劑使用的療效。至於由腸胃道、泌尿生殖道或傷口感染處分離出的腸球菌，除非臨床醫師有特別要求，否則並不需要常規進行藥物感受性試驗。因為腸球菌可經由突變而產生具Van A，Van B抗藥性基因；所以是目前治療上面臨的困擾。VRE是院內感染管制措施中的重要指標菌株，當實驗室證實是VRE時，院內感染管制人員需迅速對被感染病患進行隔離措施，以避免此麻煩菌株的醫院內群突發感染產生。

目前應付VRE唯一有效的方法，仍在於院內感染之防治：例如限制vancomycin之濫用、加強VRE菌種之監測、隔離被感染者、加強醫護人員洗手習慣等措施。否

則如果VRE在醫院內散播開來，而成為常態性菌株時，則將成為該院最大的災難。

今日，對於 β -lactams、高濃度氨基糖苷類及vancomycin等抗微生物藥劑具有抗藥性的腸球菌株，它對新的一類lipopeptide抗微生物藥劑doxycycline都具有感受性，而且大部份菌株於試管內試驗，對於ciprofloxacin也同樣具有感受性。但由於doxycycline現在仍屬於早期臨床研究用藥物；而且對高濃度gentamicin具有抗藥性的腸球菌，在臨床上以ciprofloxacin治療是無效的。故doxycycline及ciprofloxacin於臨床上治療具抗藥性腸球菌感染的應用仍待進一步評估。

參考文獻

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Villanova, Pa: NCCLS, 1994.
2. Swenson JM, Clark NC, Ferraro MJ, et al: Development of a standard screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1994; 32: 1700-4.
3. Tenover FC, Tokars J, Swenson J, et al: Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1993; 31: 1695-9.
4. Hindler JA, Sahm DF: Controversies and confusion regarding antimicrobial susceptibility testing of enterococci. Antimicrob News 1992; 8: 65-74.
5. Knapp C, Moody JA: Tests to assess bactericidal activity. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook, vol. 1. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1992; 5.16.1-33.
6. Leitch C, Boonlayangoor S: Tests to detect high-level aminoglycoside resistance in enterococci. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedure Handbook, vol. 1. Washington D C: American Society for Microbiology. 1992; 5.4.1-9.
7. Moellering RC JR, Koraeniowski OM, Sande MA, et al: Species-specific resistance to antimicrobial synergism in *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis*. J Infect Dis 1979; 140: 203-8.
8. Murray BE: The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev 1990; 3: 46-65.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved standard M7-A3. Villanova, Pa: NCCLS, 1992.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard M2-A5. Villanova, Pa: NCCLS, 1993.
11. Sahm DF, Boonlayangoor S, Iwen P C, et al: Factors influencing determination of high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol 1991; 29: 1934-9.
12. Sahm DF, Boonlayangoor S, Schulz JE: Detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci other than *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol 1991; 29: 2595-8.
13. Sahm DF, Torres C: Effects of medium and inoculum variations on screening for high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol 1988; 26: 250-6.
14. Standiford HD, DeMaine JB, Kirby WMM: Antibiotic synergism of enterococci. Arch Intern Med 1970; 126: 255-9.