

中部某醫院 vancomycin 抗藥性腸球菌之分子 生物學研究報告

劉美芳¹ 黃玉梅¹ 劉美容¹ 任新菊¹ 施智源² 胡伯賢² 劉有增²
台中榮總院內感染管制委員會¹ 感染科²

中部某醫院自 1997 年 1 月至 1998 年 9 月共收集得到 5 株萬古黴素抗藥性腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci, VRE)。依據 NCCLS 建議以肉湯稀釋法 (broth microdilution method) 作 vancomycin 及 teicoplanin 藥物敏感性試驗，它們的 vancomycin 最低抑菌濃度 (MIC) 均大於 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，teicoplanin 的 MIC 為 2 ~ 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (二株有抗藥性、三株具敏感性)。這些 VRE 菌種有一株是 *Enterococcus faecium* 及四株是 *E. faecalis*。利用 PCR 進一步分析其 vancomycin 抗藥性基因型 (genotype)，結果均為 *vanA* gene。從脈衝電泳 (pulsed-field gel electrophoresis) 的分析中，得知其並無基因相關性。從本研究結果得知，VRE 已經在台灣中部出現，令人關切的是將來會出現嚴重的院內感染問題。因此呼籲全國各醫院及早建立嚴謹的 VRE 監測系統和隔離政策，以防止 VRE 的迅速擴散。(感控雜誌 1999;9:75-80)

關鍵詞：萬古黴素抗藥性腸球菌、最低抑菌濃度、脈衝電泳、聚合酶鏈反應

前言

腸球菌屬於革蘭氏陽性球菌，是人體腸道之正常菌叢之一，通常可移生在口腔

、膽道、陰道，常引起泌尿道感染、細菌性心內膜炎、血流感染、腹內感染及傷口感染 [1]，最近已被視為院內感染之重要病原菌。

傳統上，使用青黴素和 aminoglycoside 治療腸球菌感染。由於腸球菌感染率的增加，抗生素的普遍使用，使得抗青黴素菌株產生及抗 aminoglycoside 之菌株普遍存在。萬古黴素 (vancomycin) 通常

中華民國87年12月15日受理
中華民國88年2月8日修正
中華民國88年3月15日接受刊載
聯絡人：劉美芳
聯絡地址：台中市中港路三段160號
聯絡電話：(04)3592525轉3100

用於對 beta-lactam 類藥物過敏或對於 beta-lactam 有抗藥性菌株感染之病人 [1]，由於 vancomycin 的大量使用，因此抗萬古黴素腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci, VRE) 也逐漸被發現。1969 年先有報告指出，從實驗室 (in vitro) 發現 vancomycin 最低抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ 之 VRE [2]。80 年代後，vancomycin 臨床使用增加，1986 年法國首先自病人身上分離出 VRE 菌株 [3]。此後各地陸續有 VRE 的報告。根據美國疾病管制中心在 1993 年的數據顯示，美國院內感染 VRE 之比率由 1989 年的 0.3% 到 1993 年已增加為 7.9% [4]，遽增約 26 倍。基於此，本實驗以分子生物學方式分析中部某醫院 VRE 抗藥性基因和其相關性。

材料及方法

1997 年 1 月到 1998 年 9 月中部某醫院實驗室共分離了 1505 株腸球菌，挑選對 vancomycin disc method 呈抗藥性的菌株，再做確認菌株及其 MIC，

細菌鑑定採革蘭氏染色，catalase 催化反應和 PYR-esculin(Difco) 水解反應來確認；VRE 菌株再以 API 20 Strep system(BioMerieux, France) 區分其菌種。藥物敏感性試驗是採用 NCCLS(The National Committee for Clinical Laboratory Standards) 建議的標準之肉湯稀釋法 (broth microdilution) [5]。根據 NCCLS 的建議標準，腸球菌對 vancomycin 的 MIC $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ 是具感受性、MIC $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ 則具抗藥性，teicoplanin 的 MIC $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ 是具抗藥性 [5]。脈衝電泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 的作法則參考以前發表過之文獻 [6]，使用限制酵素 (SmaI) 作用 [7]，於 25 °C、2.5 小時，以 Bio-Rad 之 CHEF-DR11 來作電泳分析，設定狀態是開始時間 1 秒、結束時間 20 秒、電壓 6V/cm、14 °C、電泳時間為 22 小時。聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) (PERKIN ELMER gene Amp PCR system 9600) 則是將細菌 DNA 萃取定量 1ng/100 μL 後，取 10 μL ，和 PCR

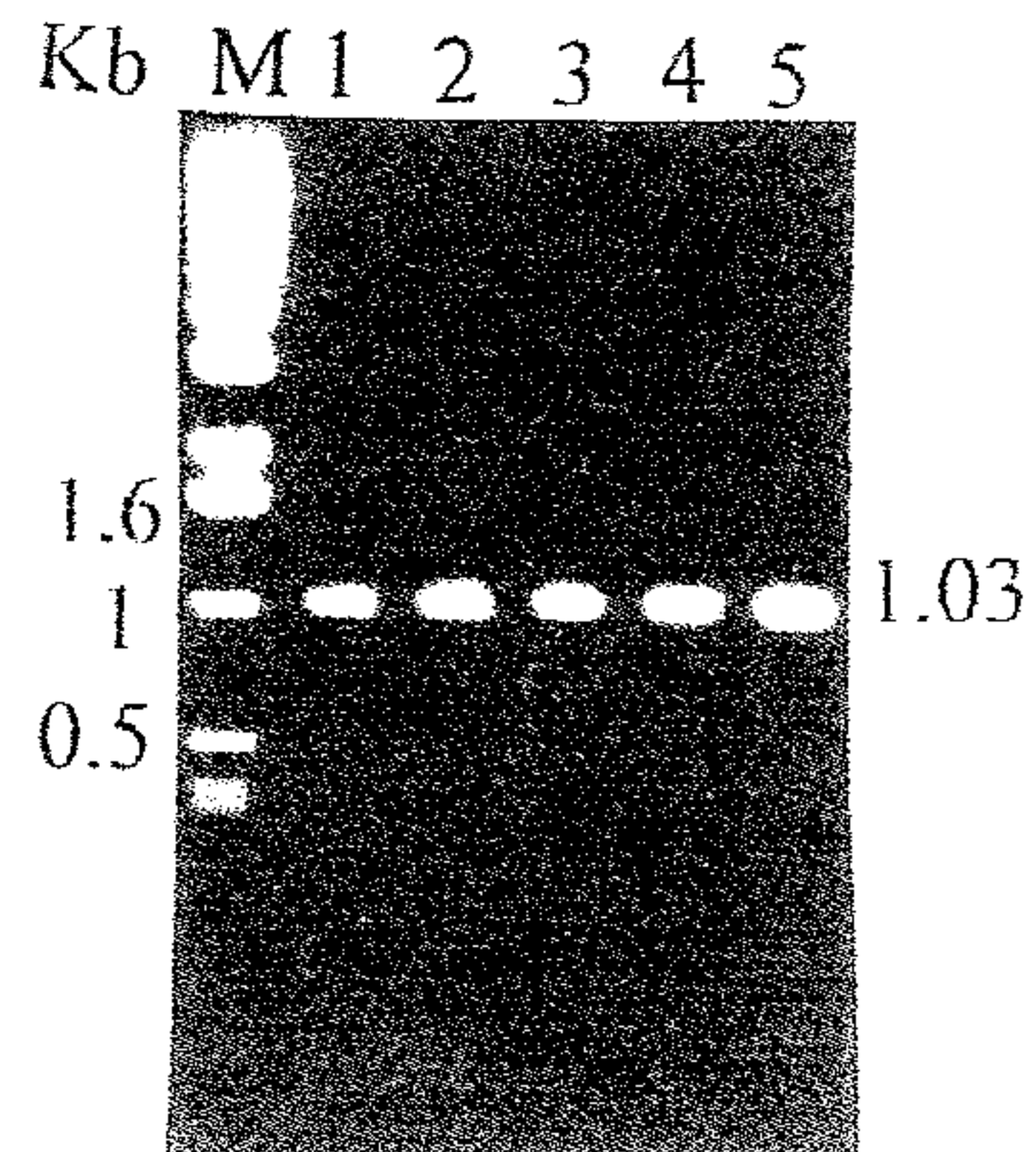
表一 5 株 VRE 其菌種、來源及 vancomycin 和 teicoplanin 的 MIC 結果

| 菌株 編號 | 菌種 | 檢體來源 | vancomycin ($\mu\text{g/mL}$) | teicoplanin ($\mu\text{g/mL}$) |
|----------|--------------------|------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | <i>E. faecalis</i> | wound | >256 | 64 |
| 2 | <i>E. faecium</i> | ascites | >256 | 2 |
| 3 | <i>E. faecalis</i> | wound | >256 | 2 |
| 4 | <i>E. faecalis</i> | joint fluid | >256 | 8 |
| 5 | <i>E. faecalis</i> | perianal abscess | >256 | 32 |

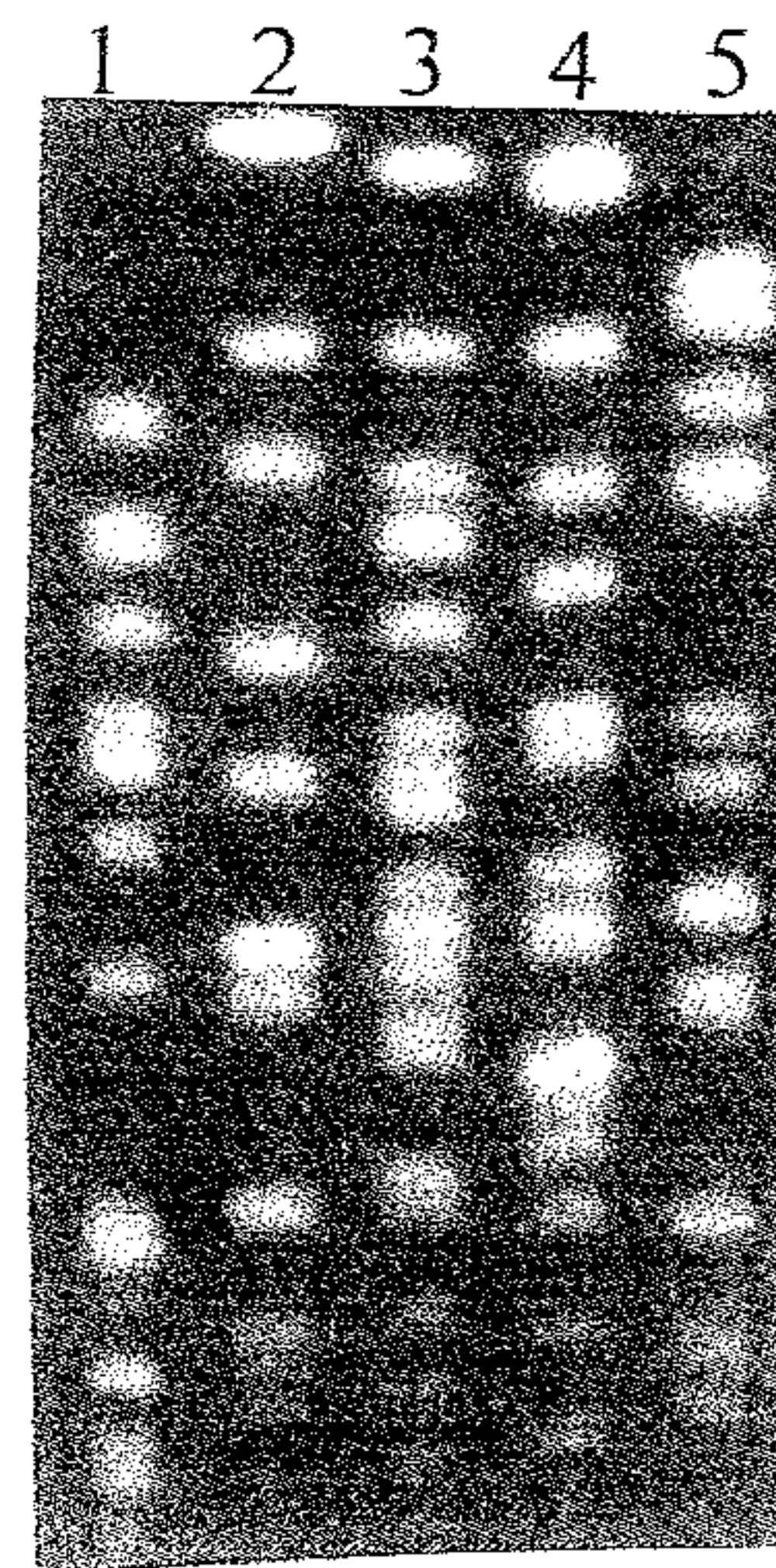
混合液 (mixture) 共同反應。在 100 μ L 反應溶液內含有：1U Taq(Super Taq, HT. Biotechnology Ltd, Cambridge, England) , 10mM Tris(pH.3) , 50mM KCL , 2.5mM MgCl₂ , 0.01% gelatin , 200 μ M deoxynucleoside triphosphate , 1 μ M 引子 (primer) 是 *vanA* 5'-CATGAATAGAA-TAAAAGTTGCAATA-3' , 5'-CCCC-TTTAACGCTAATACGATCAA-3' [8] , *vanB* 5'-GTGACAAACCGGAGGC-GAGGA-3' , 5'-CCGCCATCCTCCT-GCAAAAAA-3' [9] 。 95 °C 三分鐘使 DNA 雙股變單股 (denature) , 94 °C 一分鐘、54 °C 一分鐘、72 °C 二分鐘循環一次，重複 30 個循環。再將 PCR 之產物，以 1.6% 洋菜膠 (agarose) 作電泳分析。

結 果

在這次研究中，對 vancomycin 具抗藥性菌株共 5 株，分別屬於 *E. faecalis*(4) 及 *E. faecium*(1) 。此 5 株 VRE 的菌種及最低抑菌濃度如表一，對 teicoplanin 具抗藥性有 2 株，PCR 的結果顯示此 5 株 VRE 均帶 *vanA* 基因 (圖一)，PFGE 則顯示它們之間並無相關性 (圖二)。



圖一 VRE 的 PCR 結果由 *vanA* 當作引子 (primer) 的 PCR 結果。M 是 1Kb 的 maker , 1 ~ 5 是 VRE 菌株。



圖二 VRE 的 PFGE 基因圖利用 *SmaI* 作用後的 PFGE 基因圖，1 ~ 5 為 VRE 菌株號碼順序參考表一

討 論

中部某醫院自 1997 年 1 月至 1998 年 9 月在 1505 株腸球菌中被篩檢出 5

株 VRE，VRE 的比率為 0.33%。我們並未對所有的腸球菌再確認，也未對所有的腸球菌做 MIC。因國內並無相關數據可供評估，所以我們只是提供此醫院的數據供大家參考。三軍總醫院曾發表一株 VRE，是由中部 803 醫院所分離的，其 vancomycin 的 MIC 是 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，teicoplanin 的 MIC 是 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [11]。

一般認為帶 *vanA* gene 的 VRE 對 teicoplanin 具抗藥性 (MIC 16 ~ 512 mg/L)，而帶 *vanB* gene 的 VRE 對 teicoplanin 具感受性 (MIC 0.25 ~ 2 mg/L)[10]。而我們這五株 VRE 對 teicoplanin 有二株具抗藥性、三株具感受性，以 PCR 分析基因型 (genotype) 都是 *vanA*，和三軍總醫院曾發表的 VRE 菌株相同為帶 *vanA* gene，而對 teicoplanin 是具感受性的 [11]；*vanA* 是 10.8kb 的九個多肽 (polypeptide) 所組成：ORF1、ORF2、*vanS*、*vanH*、*vanA*、*vanX*、*vanY*、*vanZ*。部份腸球菌帶有跳躍基因 (transposon) [1]，而跳躍基因可以攜帶抗藥性基因嵌入質體 (plasmids) 上，腸球菌菌株之間可以藉質體轉移而交換基因 [10]。

PFGE 的結果顯示這些 VRE 並無相關性，所以這些 VRE 並非院內群突發所造成的。因是回溯性調查，無法即時採檢環境及相關工作人員是否有醫護人員帶菌，或環境有貯存源，或只是病人自己帶菌，如今都不得而知了。因 VRE 可在人體移生很久，必須建立檔案，並於病例首頁上示標註明，以便下次住院時，立即知道並加以隔離。這五個 VRE 均是住院病

人，需採取隔離措施，集中護理或住單人房，而照顧 VRE 病患的醫護人員，不可再同時又照顧非 VRE 的病患。另外戴手套、穿隔離衣、戴口罩及洗手都是必要的。*Enterococcus* 帶菌移生部位包括肛門、會陰部、腋下、肚臍、傷口、導尿管或大腸造瘻，其解除隔離的時機應從多處部位採檢（包括糞便、會陰部、腋下、肚臍、傷口、導尿管、腸造瘻），至少每隔一週採檢一次，連續三次培養陰性，才能解除 [12]。

從本研究結果得知，VRE 已經在台灣中部持續出現，令人關切將來會出現嚴重的院內感染問題，因此呼籲全國各醫院及早建立嚴謹的 VRE 監測系統和隔離政策，以防止 VRE 的迅速擴散。

參考文獻

1. Alfred SG, George GZ: Vancomycin-resistant enterococci. *Ann Pharmacother* 1996;30:615-24.
2. Toala P, McDonald A, Wilcox C, et al: Susceptibility of group D *Streptococcus* (*Enterococcus*) to 21 antibiotics in vitro, with special reference to species differences. *Am J Med Sci* 1969;258:416-30.
3. Leclercq R, Derlot E, Duval J, et al: Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 1988;319:157-61
4. Centers For Disease Control and Prevention: Nosocomial enterococci resistant to vancomycin—United States, 1989-1993. *MMWR* 1993;42:597-9.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A4. Villanova, PA: NCCLS 1998.
6. Liu PYF, Lau YJ, Hu BS, et al: Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:1779-83.
7. Donabedian SM, Chow JW, Boyce JM, et al: Molecular typing of ampicillin-resistant, non beta-lactamase-producing *Enterococcus faecium* isolates from diverse

- geographic areas. J. Clin. Microbiol. 1992;30:2757-61.
8. Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M: The VAMA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes. Mol Gen Genet 1990;224:364-72.
 9. Evers S, Sahm DF, Couvalin P: The vanB gene of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583 is structurally related to genes encoding D-Ala-D-Ala ligases and glycopeptide-resistance protein VanA and VanC. Gene 1993;124:143-4.
 10. Leclercq R, Courvalin P: Resistance to Glycopeptides in Enterococci. Clin. Infect. Dis. 1997;24:545-56.
 11. Ben RJ, Lu JJ, Young TG, et al: Clinical isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Taiwan. J Formos Med Assoc 1996;95:946-9.
 12. 林秀真, 王志堅, 朱夢麟: 如何預防 vancomycin 抗藥性腸球菌之擴散。感控通訊 1995;5:28-31.

Analysis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR of Vancomycin-Resistant Enterococci from a Hospital in Central Taiwan

*Meei-Fang Liu*¹, *Yu-Mei Huang*¹, *Meei-Rorng Liu*¹,
*Hsin-Jyur Rehn*¹, *Zhi-Yuan Shi*², *Bor-Shen Hu*², *Yeu-Jun Lau*²

¹Infection Control Committee,

²Section of Infection Diseases, Department of Internal Medicine, Taichung Veterans General Hospital, Taichung, Taiwan

The in-vitro susceptibility test of two antimicrobial agents (vancomycin and teicoplanin) against 165 isolates of *Enterococcus* from a hospital in central Taiwan were tested by broth dilution. Five (3.3%) isolates (1 was *Enterococcus faecium* and 4 were *E. faecalis*) were found to be resistant to vancomycin. Their MICs of vancomycin were all greater than 256 $\mu\text{g/ml}$, and those of teicoplanin ranged between 2 and 64 $\mu\text{g/ml}$ (2 were resistant and 3 were susceptible). All the 5 vancomycin-resistant enterococci (VRE) isolates were shown to have *vanA* gene by PCR. They were distantly related according to the pulsed-field gel electrophoresis analysis. This study revealed that VRE had appeared in central Taiwan. We are concerned about the serious nosocomial infections caused by VRE in the future. To prevent the spread of VRE, it is mandatory to set up surveillance of VRE and policy of isolation earlier. (Nosocom Infect Control J 1999;9:75-80)

Key words: Vancomycin-resistant enterococci, pulsed-field gel electrophoresis, polymerase chain reaction, minimum inhibitory concentration