

黴菌的鑑定

黴菌的鑑定

陳佳君 羅秀容

國家衛生研究院 臨床研究組

目前估計對人類和動物有威脅的黴菌約有 150 種。這些病原菌不但會造成局部性的表皮感染，還會引起致命的全身性感染。近年由於免疫系統功能缺陷患者(如：愛滋病患、接受化學治療或器官移植的病人、老年人、早產兒和糖尿病患)的壽命延長，使得遭受伺機性病原菌感染患者大量增加。此外，各種侵入性醫療器材和抗生素的不當使用，導致黴菌感染在院內感染中已成為不可被忽視的問題。以美國為例，自 1989 年起，念珠菌(*Candida*)已晉升為院內感染病原菌的第四位[1,2]。在國內也不例外，根據某醫學中心之研究，其院內感染中的黴菌感染個例，由 1981 年的 1.8% 上升為 1994 年的 15%，而且念珠菌自 1993 年起已成為該院最常見的院內感染致病原[3,4]。因此，如何防治黴菌感染已是一個刻不容緩的課題。

防治黴菌感染的第一步是瞭解黴菌在台灣分佈的情形，進而快速且正確地鑑定出病原菌；其次分析台灣黴菌的特性，發展一套能將體外測定之抗黴菌藥物對黴菌最低抑菌濃度(minimum inhibitory concentration; MIC)與體內臨床的治療反應達到良好相關性的方法，以利臨床醫師參考，給予患者最適當的處方。目前抗黴菌藥物的種類不多，且更嚴重的問題是抗藥性的致病黴菌隨著藥物的大量使用而增加。為了發展更有效的抗黴菌藥物，我們除了以分子生物學方法探討黴菌的致病因子外，還要了解黴菌的抗藥機制。致病性的黴菌依型態可分為兩大類--菌絲型和酵母菌型。本篇係針對酵母菌型病原菌(yeast pathogen)的鑑定做進一步的探討。

在致病性黴菌中，念珠菌最常引起黴菌感染。Fluconazole 和 amphotericin B 對一般的念珠菌感染具有治療的效果。然而，*Candida krusei* 和 *Candida glabrata* 對 fluconazole 常具有抗藥性[5,6]；Amphotericin B 治療 *Candida lusitanae* 感染的失敗率亦較高[6,7]。有鑑於同屬(genus)不同種(species)的念珠菌對抗黴菌藥物的感受性差異性高，為了能有效地制止黴菌感染，我們必須發展一套既快速又簡便的方法能將病原菌鑑定到種的層次。

特有的形態和化學反應是鑑定酵母菌型病原菌的準則。目前台灣各醫療院大多利用發芽管測試、cornmeal agar window test、CHROM agar test、API 和 VITEK-YBC(yeast biochemical card)等方法來鑑定酵母菌型病原菌[8]。在酵母菌型病原菌中，只有 *Candida albicans* 和 *Candida dubliniensis* 在發芽管測試中會長出發芽管[9,10]，而此兩種菌株可依其它特性來進一步鑑定[9,10]。如 *C. albicans* 可在 42°C 環境下生長，而 *C. dubliniensis* 在 42°C 的環境下卻無法生存。在發芽管測試中不形成發芽管的病原菌可進一步用其它方法鑑定，如 cornmeal agar window test 及 CHROM agar。基本上，這些方法是觀察不形成發芽管的病原菌在生長 18 至 48 小時後的形態與顏色。*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C.*

tropicalis 在 CHROM agar 分別呈現綠、暗紅、粉紅、及藍紫色；而 *Rhodotorula* spp.的菌落在 cornmeal tween 80 agar 則呈現黃至橘紅色。無論是以孢子及菌絲的形態為基礎的 cornmeal agar window test 或以呈色為指標的 CHROM agar，最後還是需要以生化反應來作最後確認。此外，商品化的 API 系列及 VITEK-YBC 則是依據生化反應所設計的快速鑑定方法。

雖然這類方法可以降低鑑定所需的時間與勞力，但其商品化的產品成本較高[8]。

國家衛生研究院在 1999 年 4 月 15 日到 6 月 15 日進行了第一次的全國黴菌抗藥性監測計劃[Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts (TSARY)][8]。台灣的 22 家醫院總共提供了 660 株臨床酵母菌。在此 22 家醫院中，77.7%的醫院使用發芽管測試作為鑑定臨床酵母菌的第一步。API-32 與 cornmeal agar window test 是醫院繼發芽管測試後較常使用的方法。以國衛院菌株鑑定的經驗為例，有無菌株鑑定經驗的執行者會明顯地影響鑑定的正確率。以國衛院新聘的研究助理而言，最初的 50 株酵母菌型病原菌中，有 5 株 *C. tropicalis* 被誤判為 *C. albicans*。經檢討後，接下來的 150 株菌中只有 1 株 *C. tropicalis* 被誤判為 *C. albicans*。經再次檢討後，剩下的 460 株菌就沒有發生此類的誤判。此種的誤判是因為 *C. tropicalis* 有形狀較長的子芽，在發芽測試中容易被誤以為是發芽管；而且 *C. tropicalis* 長時間培養亦會形成類似發芽管的構造。為了避免此誤判，發芽管測試的結果應在 3 小時之內觀察[8]，並對有疑問的菌株需進一步以生化反應測試結果做確認。

在此監測計劃的 22 家醫院中，有 3 家醫院沒有鑑定到種的層次，因此只取 19 家醫院的鑑定結果與國衛院的結果做比較。在 574 株菌中，其中的 52 株鑑定的結果不同。在 15 家利用發芽管測試作為初步菌株鑑定的醫院中，有 7.4%的菌株鑑定結果與國衛院的結果不同，而另外 4 家沒用發芽管測試的醫院則有 15.1%的菌株鑑定結果與國衛院的結果不同。因為 *C. albicans* 是造成黴菌感染頻率最高的病原菌，因此，有效率的鑑定步驟是先分辨出 *C. albicans* 和 non-*albicans* *Candida* species，故發芽管測試應是鑑定酵母菌型病原菌的第一步。

在臨床上，把握治療的黃金時間是第一要件。基因體計畫為現代科技帶來新希望與新想法，因此病原菌的快速鑑定目前亦往基因層次發展。以聚合西每連鎖反應(polymerase chain reaction; PCR) 將病原菌的一段基因放大(amplify)，再加以比較分類[11-14]。即時定量聚合西每連鎖反應(real-time PCR)則是以更快速及定量為目的所設計的方法[15]，只是此即時定量聚合西每連鎖反應機器比一般聚合西每連鎖反應機器昂貴許多，因此，目前尚未普及化。要符合病原菌快速鑑定的個別基因必須是病原菌所共有，而此基因在不同種間的變異性不會小到無法分辨，也不能大到同種菌也有差別。目前念珠菌中有 18S rDNA、粒腺體的 DNA 及 ITS(internal transcribed spacer)等做為偵測的標的。

最後我們必須強調，沒有任何一個鑑定方法可以鑑定出所有的病原菌，尤其是針對新興的病原菌。除了應用多種方法共同確認外，還需要一位有經驗、細心的好醫檢師。因此，為了正確地鑑定出致病菌並將其消滅，醫院應不吝惜地培訓好的醫檢師。

參考文獻

1. Beck-Sague C, Jarvis WR: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis* 1993;167:1247-51.
2. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, et al: National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. SCOPE Participant Group. *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic. Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;30:121-9.
3. Chen YC, Chang SC, Sun CC, et al: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:369-75.
4. Hung CC, Chen YC, Chang SC, et al: Nosocomial candidemia in an university hospital in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1996;95:19-28.
5. Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, et al: Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2645-9.
6. Yang YL, Lo H-J: Mechanisms of antifungal agent resistance. *J Microbiol Immunol Infect* 2001;34:79-86.
7. Hadfield TL, Smith MB, Winn RE, et al: Mycoses caused by *Candida lusitanae*. *Rev Infect Dis* 1987;9:1006-12.
8. Lo HJ, Ho AH, Ho M: Factors accounting for mis-identification of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect* 2001;34:171-7.
9. Sullivan D, Coleman D: *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen. *Curr Top Med Mycol* 1997;8:15-25.
10. Sullivan D, Coleman D: *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998;36:329-34.
11. Hopfer RL, Walden P, Setterquist S, et al: Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *J Med Vet Mycol* 1993;31:65-75.

12.Kanbe T, Horii T, Arishima T, et al: PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast* 2002;19:973-89.

13.Martin C, Roberts D, van Der WM, et al: Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2000;38:3735-42.

14.Yamada Y, Makimura K, Merhendi H, et al: Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn J Infect Dis* 2002;55:122-5.

15.White PL, Shetty A, Barnes RA: Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *J Med Microbiol* 2003;52:229-38.