

# 低頻切位聚合酶鏈鎖反應在三種 *Candida species* 分子生物分型上的 應用

蘇玲慧<sup>1</sup> 邱月璧<sup>2</sup> 賈儒馨<sup>1</sup> 郭安靜<sup>1</sup> 呂學重<sup>3</sup> 孫建峰<sup>1</sup> 吳竹蘭<sup>1</sup>

長庚醫院 林口醫學中心

<sup>1</sup> 臨床病理科 <sup>2</sup> 護理部醫品管制組 <sup>3</sup> 內科部感染醫學科

我們採用低頻切位聚合酶鏈鎖反應 (infrequent-restriction-site polymerase chain reaction, IRS-PCR) 的方法，分析三種 *Candida species* 共 28 株菌株的分子生物分型，以了解其適用性，以及這些菌株彼此間的關係。分析的菌株中，包括來自 3 個病人的 5 株 *C. albicans* 和來自 2 個病人的 8 株 *C. glabrata*，它們是分別來自不同新生兒加護病房的兩起「疑似院內血流感染群突發」的菌株。研究中並且加入由其他病房分離培養到的非院內感染菌株，包括 3 株 *C. albicans* 和 4 株 *C. glabrata*，作為比較之用。另外，我們也分析了 *C. parapsilosis*，包括 5 株院內感染菌株和 3 株非院內感染菌株，以了解該菌在院內散播的情形。結果顯示，8 株 *C. albicans* 得到 6 種分型，排除群突發的可能；12 株 *C. glabrata* 得到 5 種分型，且其中 8 株院內感染菌株屬於同一分型，證明其彼此相關。8 株 *C. parapsilosis* 的分型完全不同，表示並無交互感染的可能。由以上結果，我們證明 IRS-PCR 可以用作此三種 *Candida species* 的分型之用。以此方法的速度和通用性，它很顯然可以提供許多迅速可靠的資訊，幫助感染管制工作更有效的執行。(感控雜誌 2000; 10: 1-12)

**關鍵詞：**低頻切位聚合酶鏈鎖反應、分子生物分型、念珠菌

---

民國 88 年 11 月 13 日受理  
民國 88 年 11 月 20 日修正  
民國 88 年 11 月 27 日接受刊載  
聯絡人：吳竹蘭

聯絡地址：桃園縣龜山鄉復興街 5 號  
聯絡電話：(03)3281200 轉 2736

## 前 言

*Candida species* 是健康人體常見的移生黴菌；但在醫院中，它們所造成的院內感染也已逐漸受到重視。根據美國全國院內感染調查系統 (National Nosocomial Infection Surveillance System) 的調查，黴菌引起的院內感染發生密度，從1980年的2.0，增加到1990年的3.8，幾乎多了將近一倍 [1]。這可能與免疫不全病人，例如：AIDS 患者 [2]、器官移植病人 [3]、治療中的癌症病患等的持續增加有關。另一方面，由於醫療科技的進步，極低出生體重 (very low birth weight) 的早產兒，或是病情嚴重的嬰幼兒，現在都可以獲得很好的照顧，大大的提高了存活率，再加上各種抗生素的大量使用，新生兒加護病房 (neonatal intensive care unit, NICU) 中由 *Candida species* 造成的院內感染不斷的增加 [4-5]。研究結果也顯示，相關的危險因子包括：早產、長期靜脈導管留置、中央靜脈輸液、長期仰賴呼吸器，及使用廣效抗生素等 [6-8]。更有甚者，有關 *Candida species* 造成的院內感染群突發的報告亦不斷在增加中 [9-10]。在臺灣，北部某醫學中心亦曾報告過兩起由 *Candida species* 在不同 NICU 中造成院內血流感染群突發的案例 [11-12]。因此，實驗室內實有必要針對 *Candida species* 建立一個可靠的分型系統，以便在群突發發生時，能有效的進行流行病學

調查，分析群突發菌株間的相關性，尋找並確認可能的感染源或傳播方式，以期迅速控制群突發。根據文獻上的報告，適合用來對 *Candida species* 進行分子生物分型 (molecular typing) 分析的方法包括：巨限制酶指紋鑑定分析 (macrorestriction endonuclease fingerprint analysis) [13-14]、核型單細胞染色體電泳分型 (electrophoretic karyotyping) [15-17]、限制片段長度多型性分析 (restriction fragment length polymorphism analysis, RFLP) [17]、隨機增幅去氧核糖核酸多型性分析 (randomly amplified polymorphic DNA analysis, RAPD) [2,15,17]、內重覆聚合酶鏈鎖反應 (inter-repeat PCR, IR-PCR) [17] 等。前兩者的可信度高，分型能力亦強，但耗時費事，且需要極為昂貴的分析儀器 - 脈衝式電泳分析儀 (pulsed-field gel electrophoresis analyzer)，不是一般分生實驗室可輕易購置之設備。RFLP 得到的分型結果最少 [17]，雖然簡單卻不適合單獨用以分型。RAPD 及 IR-PCR 都屬於利用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 進行分子生物分型的方法，目的在克服前述兩種分析大分子片段耗時費事的缺點，能迅速提供分析結果。但是，RAPD 及 IR-PCR 的分型能力都稍嫌不足 [15,17]，RAPD 結果的再現性亦受到很多因素的影響 [18]。最重要的是，由於 RAPD 所使用的引子 (primer) 是任意設定的，必需經過適

當的測試，才能選定對某一種 *Candida species* 適合的引子，不同的 *Candida species* 可能需要不同的引子，才能達到最好的分型效果，也因此限制了 RAPD 在 *Candida species* 分型上的適用性。低頻切位聚合酶鏈鎖反應 (infrequent-restriction-site PCR, IRS-PCR)[19] 是 1996 年才剛被發展出來的新方法，其設計原意在提供一套可以適用於許多不同細菌的分型方法。由於前述幾種分型方式均各有優缺點，我們便採用 IRS-PCR 對幾種 *Candida species* 的菌株進行分型分析，以了解其適用性，以及這些菌株彼此間的關係。

## 材料與方法

### 菌株

本研究所分析菌株包括 8 株 *C. albicans*，12 株 *C. glabrata*，以及 8 株 *C. parapsilosis*。菌種鑑定參照 Warren 及 Hazen 的方法 [20]。在 1999 年 6 月 2 日至 20 日之間，北部某醫學中心的一個 NICU 內，先後有 3 個病童，甲、乙、丙，產生了由 *C. albicans* 引起的院內血流感染。收集到的 5 個菌株中，有 3 株來自病童丙，另兩株分別來自病童甲及乙。由於該 NICU 在回溯至 1998 年元月之間，均無此菌造成院內血流感染的記錄 ( $p < 0.05$ )，顯示這三週內連續發生的院內血流感染，可能是一個群突發。我們便將此 5 株 *C. albicans*，連同另外 3 株由其他病房分離得到的非

院內感染菌株，一起進行 IRS-PCR 的分析。

另在 1999 年 7 月 14 日至 16 日之間，上述醫學中心的另一個 NICU 內，先後有 2 個病童，丁和戊，產生了由 *C. glabrata* 引起的院內血流感染。從病童丁共收集到 4 個菌株，分別來自不同次的血液培養；從病童戊亦收集到 4 個菌株，其中 3 株分別來自不同次的血液培養，另 1 株則由其 CVP tip 培養得到。由於該 NICU 在回溯至 1998 年元月之間，亦均無此菌造成院內血流感染的記錄 ( $p < 0.05$ )，顯示此兩天內連續發生的兩個院內血流感染個案，可能也是一個群突發。感控護士馬上進行相關的感控措施，嚴格執行洗手政策，避免情況繼續惡化。我們在實驗室內也馬上將此 8 株 *C. glabrata*，連同另外 4 株由其他病房分離得到的非院內感染菌株，一起進行 IRS-PCR 的分析。

另外，我們也收集了自 1998 年 11 月至 1999 年 4 月間的所有 *C. parapsilosis* 院內血流感染菌株共 5 株，連同另外 3 株非院內感染菌株，一起進行 IRS-PCR 的分析。

### DNA 抽取

參照 Scherer 及 Stevens [21] 的作法稍加改變。生長在 Sabouraud dextrose agar 上兩天的菌落，以 1 mL 緩衝液 (pH 7.5) 調成約  $10^8$  的菌懸浮液。緩衝液成份為 1 M sorbitol，25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，20 mM EDTA，0.2% (vol/vol) 2-mercaptoethanol，及

0.2 mg/mL Zymolase (Zymo Research, CA, USA)。在 37°C 作用 30 分鐘之後，以 13,000 rpm 在 4°C 離心 10 分鐘，將沉澱物回溶於 40  $\mu$ L 的 proteinase K (1 mg/mL) 中。再在 56°C 作用 2 小時，接著在 94°C 作用 10 分鐘，以抑制剩餘的 proteinase K。經過 8,000 rpm 離心 5 分鐘後，將上清液取出備用。

### IRS-PCR

參照 Mazurek 等人 [19] 的作法稍加改變。每個菌株取 2  $\mu$ L DNA 溶液，加入各 20 U 的限制酶 *HhaI* 及 *XbaI* (New England Biolabs, MA, USA)，在 NEB2 緩衝液中進行切割。之後進一步將已切成片段的 DNA 連接上經特殊設計的兩種 adaptors，再經過少量 *HhaI* 及 *XbaI* 的再切割，將連接過程中可能重新結合的少數 DNA 片段切斷，便可進行增幅的步驟。PCR 引子序列係採用前述 adaptors 的對應序列，反應時間及溫度則與原參考文獻相同。PCR 產物再以 12.5% 的 polyacrylamide gel (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 進行電泳分析，600 V，50 分鐘之後，再以銀染 (silver staining) 呈色。

### 結果判讀

將條紋圖形 (banding pattern) 完全相同的菌株歸類於同一型；若有 3 個條紋以內的差異，則歸類於該型的亞型 (subtype)；若條紋差異有 4 個以上，則歸類為不同型。

## 結 果

所有測試菌株的分型結果見表一。經重複 2 次以上的測試，每一菌株的條紋圖形均可再現。

*C. albicans* 菌株的條紋圖形見圖一，3 個病童的菌株和另外 3 株對照菌株，分別得到不同的分型結果，但同屬病童丙的 3 株 *C. albicans* 則歸類於相同的分型。此結果顯示這些來自不同病人身上的 *C. albicans* 菌株彼此沒有基因學上的關聯性，應沒有共同的感染源，排除群突發的可能性。

*C. glabrata* 電泳的結果見圖二，2 個病童共 8 個菌株得到的條紋圖形完全一致，但與另外 4 株對照菌株彼此之間則明顯不同。此結果顯示，這 2 個病童感染的菌株具有關聯性，可能來自共同的感染源。

*C. parapsilosis* 的結果見圖三，8 個菌株的條紋圖形完全不同，代表彼此沒有基因學上的關聯性。此結果顯示，在這段觀察期間，由 *C. parapsilosis* 所引起的院內血流感染均屬個別案例，而沒有交互傳染的可能性。

## 討 論

院內感染監控無論在「疑似群突發」的初始階段的確認，或是環境調查之後，培養所得菌株必需有一個正確、可靠的細菌分型系統，以確認群突發的感染源。過去在分生技術不夠發達的時代，只能仰賴一些表現型 (phenotype) 將同一種細菌進一步分

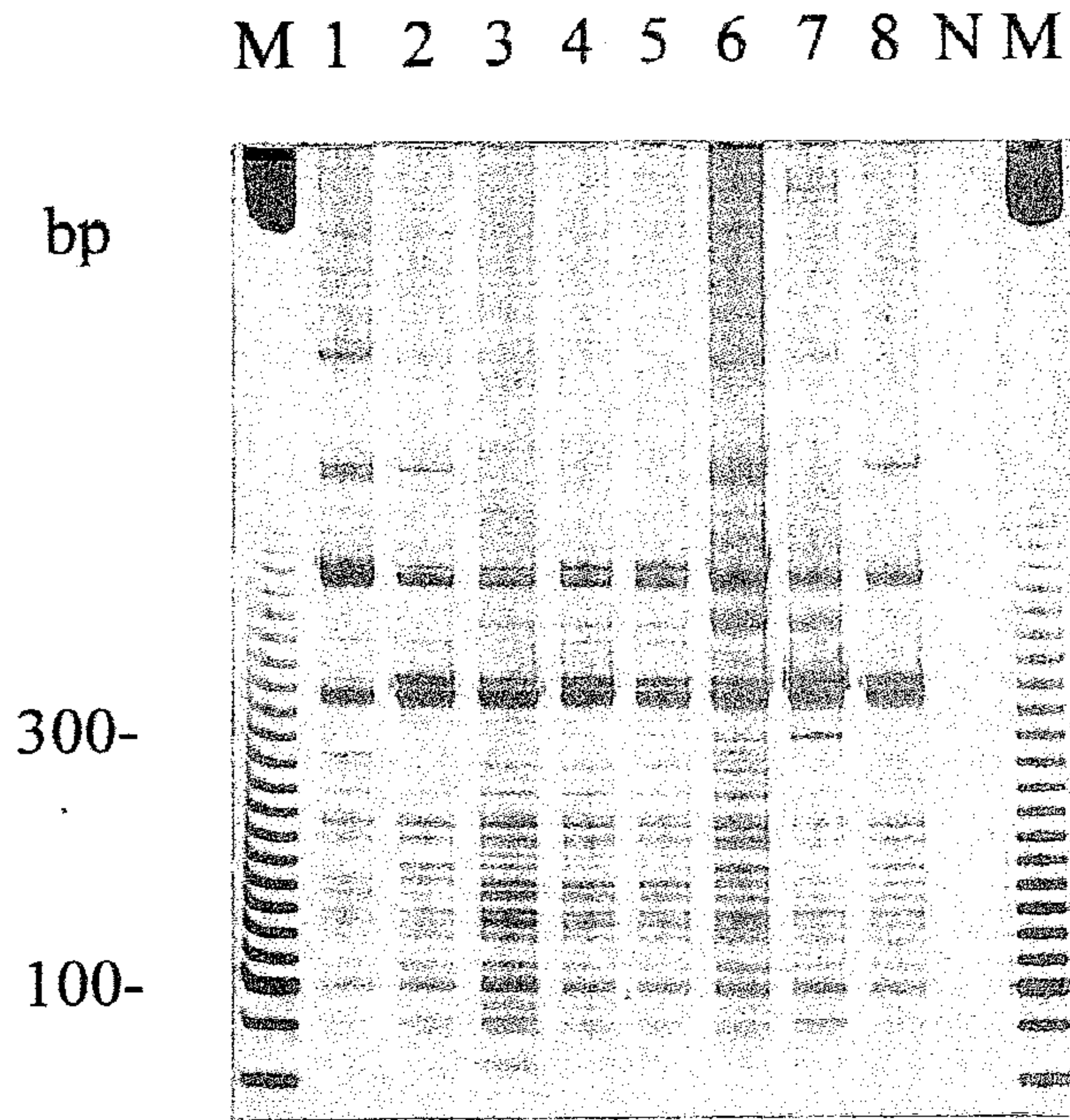
表一 28 株 *Candida species* 菌株經 IRS-PCR 分型的結果

菌種	序號	來源	分型
<i>C. albicans</i>	1	病人甲	A
	2	病人乙	B
	3	病人丙	C
	4	病人丙	C
	5	病人丙	C
	6	Control-I	D
	7	Control-II	E
	8	Control-III	F
<i>C. glabrata</i>	1	病人丁	G
	2	病人丁	G
	3	病人丁	G
	4	病人丁	G
	5	病人戊	G
	6	病人戊	G
	7	病人戊	G
	8	病人戊	G
	9	Control-IV	H
	10	Control-V	I
	11	Control-VI	J
	12	Control-VII	K
<i>C. parapsilosis</i>	1	院內感染菌株-I	L
	2	院內感染菌株-II	M
	3	院內感染菌株-III	N
	4	院內感染菌株-IV	O
	5	院內感染菌株-V	P
	6	非院內感染菌株-I	Q
	7	非院內感染菌株-II	R
	8	非院內感染菌株-III	S

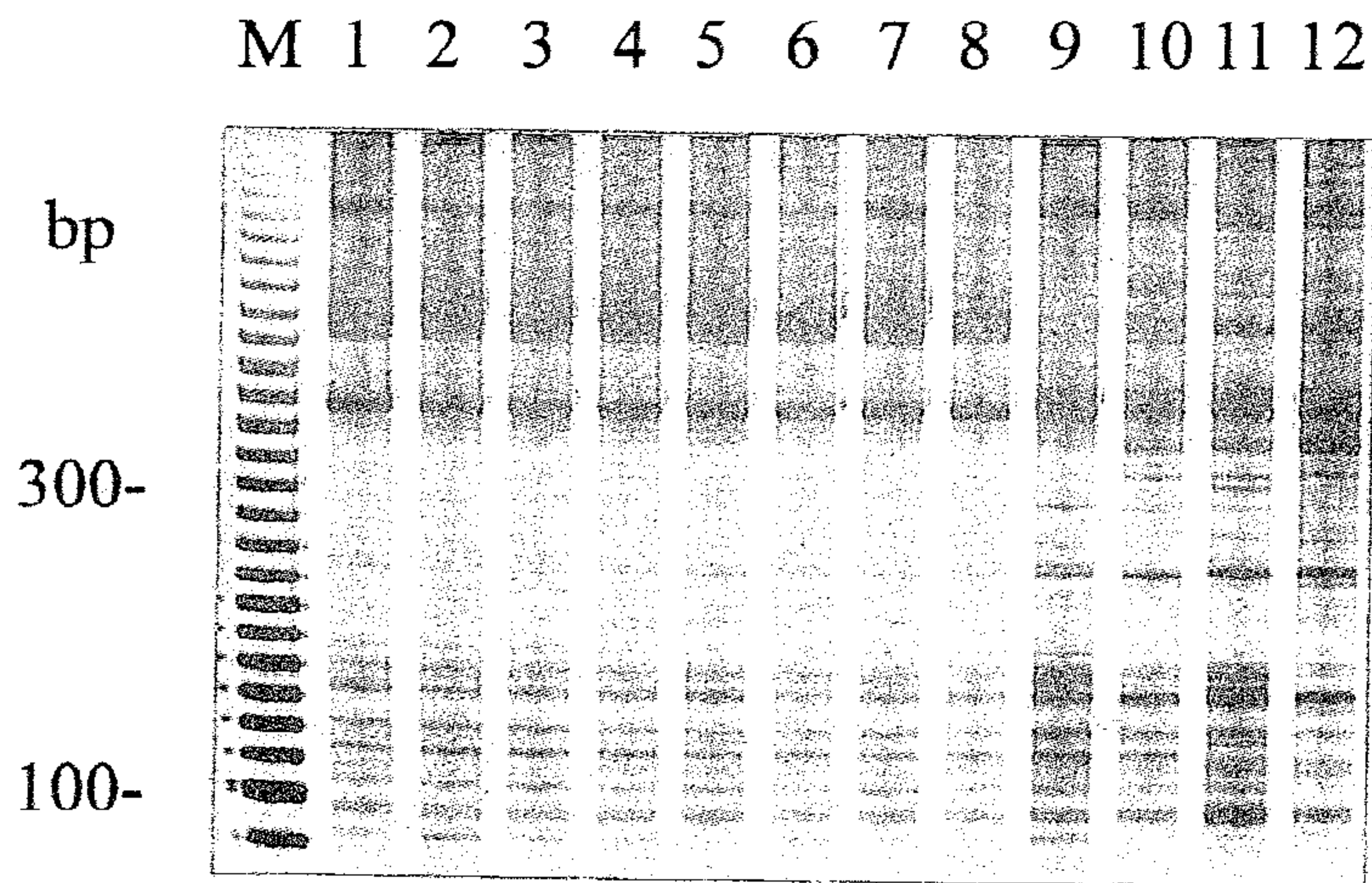
型，例如：血清分型 (serotyping)、噬菌體分型 (phagetyping)、抗藥性分型 (antibiogram) 等。但是這些方法都有其實際使用上的優缺點，僅以一般臨床微生物檢驗室均可操作的抗生素敏感性試驗來說，以目前多重抗藥性菌株的氾濫情況來看，若欲調查的對象也是一群多重抗藥性菌株，想從抗藥性分型正確了解菌株間的相關性，顯然並不容易。本次研究的 *Candida*

species，便是一個很好的例子，直到目前，仍有不少關於這類黴菌分型方法的比較 [2,10,15,17]，其目標便在於建立一套最有效率的分子生物分型系統，以供流行病學調查之用。

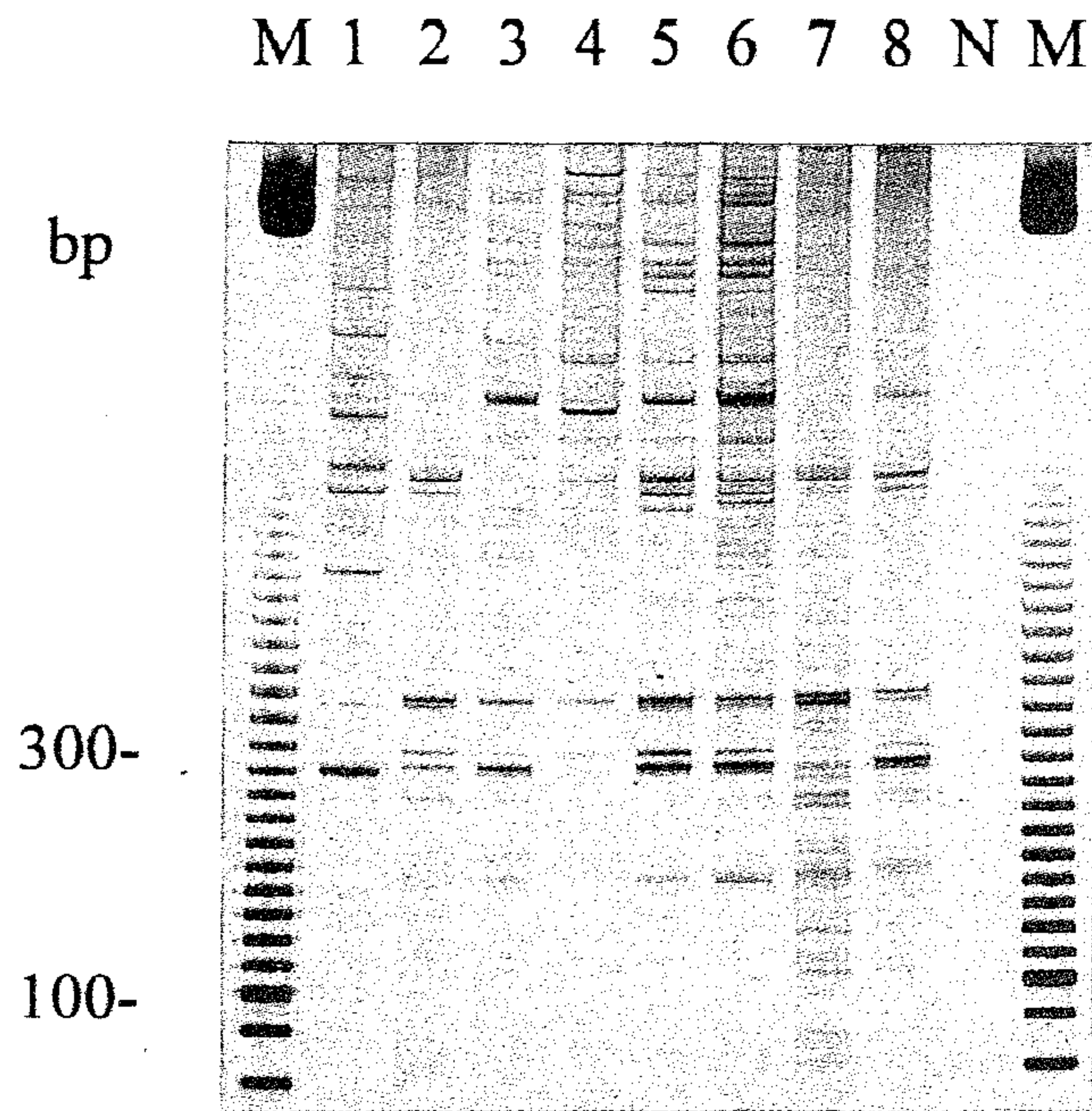
在本次研究中，我們使用一套完全相同的 IRS-PCR 操作過程，進行 3 種 *Candida species* 的分析，每一菌株都可以得到明確且可重複的條紋圖形結果，再次證明此一方法的通用性。



圖一 *C. albicans* 菌株以 IRS-PCR 分析所得的條紋圖形。  
M: 分子量標誌；N: 陰性對照；1 到 8 是菌株序號，請參考表一。



圖二 *C. glabrata* 菌株以 IRS-PCR 分析所得的條紋圖形。  
M: 分子量標誌；1 到 12 是菌株序號，請參考表一。



圖三 *C. parapsilosis* 菌株以 IRS-PCR 分析所得的條紋圖形。  
M: 分子量標誌；N: 陰性對照；1到8是菌株序號，請參考表一。

雖然截至目前為止，我們尚無法成功的利用一般公認可信度較高的 macrorestriction endonuclease fingerprint analysis 或是 electrophoretic karyotyping 的方法去分析這些菌株，但從相同來源的菌株可以得到相同的分型，以及流行病學上不相關的菌株均可以得到不同分型的結果看起來，IRS-PCR 的分型能力在 *Candida species* 的應用上，應可得到相當程度的肯定。事實上，除了原始文獻 [19] 曾經測試的 *Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa*、以及 *Mycobacterium avium-intracellulare* 之外，我們也已陸續證實，同樣一套 IRS-PCR 的操作過程，不但可以用在 *M. abscessus* [22] 以及其他多種細菌的分

型上，而且其結果均與使用脈衝式電泳分析所得到的結果相當。我們也曾經利用此一方法，成功的進行了一次 *Klebsiella pneumoniae* [23] 引起的院內血流感染群突發的調查。也由於這些成功的經驗，我們才會進行這次研究，以確認 IRS-PCR 應用在 *Candida species* 分型上的可行性，而結果也如我們所預期，的確可以達到分型的目的。

以 *C. albicans* 的案例來說，在連續 17 個月沒有任何此菌引起的院內血流感染個案記錄之後，一旦在三週內連續出現三個案例，很容易便引起「疑似群突發」的合理懷疑。但在任何臨床調查開始之前，若能在實驗室內迅速且正確的先釐清這些「疑似群

突發」的臨床菌株彼此間的關聯性，顯然可達事半功倍的效果。在本研究中的這些 *C. albicans* 的個案，因為我們能先排除群突發的可能，臨床調查的方向，便不必再盲目的朝向尋找共同感染源，或辨識交互感染管道的可能，不但提高感控工作的效率，也避免了許多醫療資源的浪費。該次案件之後，至今已將近5個月，該NICU未再有任何 *C. albicans* 引起的院內血流感染個案發生。

再以 *C. glabrata* 的案例來說，同樣在連續18個月沒有任何此菌引起的院內血流感染個案之後，一旦在兩天內連續出現兩個案例，感控人員很容易便注意到這個異常現象，在加強臨床醫護人員落實感染管制措施的同時，我們也同時提供了確切的實驗數據，證明該2案例應有共同的感染源，或有某種交互感染管道存在著。根據這樣的數據，感控人員便能迅速了解此一案件，朝向合理的方向去加強，避免再有新的案例增加，雖然我們因此並未能找到任何可能的感染源或傳染途徑，但是能迅速有效的控制一個可能有的群突發案件，也是我們最樂於見到的結果。該次案件之後，至今已將近4個月，該NICU亦未再有任何 *C. glabrata* 引起的院內血流感染個案發生。

除了群突發的調查，監控院內感染菌株在流行病學上的變化，也是感染管制工作的重要一環。在本研究中，我們也同時證明了被監控的這些

*C. parapsilosis* 菌株，彼此之間並不相關，因其數字尚在背景值，只要持續監控即可，不必加強任何措施。但若結果顯示，這些菌株彼此之間是密切相關的，即使院內感染率並未明顯增加，感控人員仍應主動調查，避免交互感染的情況繼續惡化，甚至導致群突發。而在此一監控過程中，一套可靠且效率高的微生物分型系統，便扮演一個很重要的角色，而IRS-PCR很顯然便是一個很好的選擇。

一個良好的分子生物分型系統，除了要有充分的分型能力，還必需有穩定的再現性，才可在不同次的實驗中，得到一致的比對結果。本次研究中的菌株都經過至少兩次以上的測試，其條紋圖形再現性結果良好，只是有些條紋可能會有濃度深淺的差異，但仍不影響結果判讀。另一方面，在進行臨床流行病學調查，尤其是群突發的分析時，爭取時效也是很重要的考量。IRS-PCR的整個操作流程，從新鮮菌落開始處理，只需要1天半的時間，比起脈衝式電泳分析方法需要一週以上的操作時間，顯然快速許多。再者，同樣一套操作方法，需要時便可立即進行實驗，不必如RAPD之類的方法，需要再確認適用的引子，的確非常適合臨床使用。

總括上述，一套適用的微生物分型系統，不但在群突發的調查時，可以發揮很大的功效，更是平時監控院內感染菌株變化的利器。有了這些資料，院內感染監控更能具體呈現院內



感染菌株質與量上的變化，讓感控工作可以更效率的執行。由本次研究的結果，我們證明了 IRS-PCR 在 3 種 *Candida species* 分型上的適用性。進一步的工作，我們將個別進行較大規模的測試，以及完成與脈衝式電泳分析方法的比較，以確認其結果的可信度。但以目前的資料，加上先前的使用經驗，我們認為 IRS-PCR 在細菌分型上，應會是一個方便、有效、迅速、可靠的最佳選擇。

### 致 謝

本研究仰賴林谷峻先生認真細心的實驗室工作才得以完成，謹此致謝。

### 附 記

細菌分型 (bacterial typing) 是臨床上用以分析同一種細菌的各個分離株 (bacterial isolates) 之間關聯性的一種方法，尤其在進行院內感染群突發調查時，是一種不可或缺的工具。它可以確認一群突然增加的院內感染個案，是否為由同一菌株引起的真正群突發案件，抑或只是由於疾病嚴重度或季節性等因素導致之暫時的群聚現象。在群突發確認之後，後續的追蹤調查，諸如感染源的確認、傳染途徑的追蹤等，都需要有一套準確、快速、區分能力強、再現性高的分型方法，以便鑑定環境調查所得到的細菌分離株彼此間的關係。

細菌的分型有許多方式可以進

行，一般可分為表現型 (phenotyping) 以及基因型 (genotyping) 兩種。前者已於正文中略提，因其區分能力不夠，不再贅述。基因分型，或稱為分子生物分型 (molecular typing)，包括脈衝式電泳分析 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)、聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)、質體分析 (plasmid analysis)、去氧核糖核酸序列分析 (DNA sequencing) 等。在此僅就最常見之 PFGE，以及本次研究所使用的新方法---低頻切位聚合酶鏈鎖反應 (infrequent-restriction-site PCR, IRS-PCR)，作一簡介和比較。

PFGE 是傳統上最常用來進行細菌分型分析的方法，因為它可以針對整組基因體 (genome) 的 DNA 進行分析，所以通常被視為標準參考方法，正文中所提到的巨限制酶指紋鑑定分析 (macrorestriction endonuclease fingerprint analysis) 以及核型單細胞染色體電泳分型 (electrophoretic karyotyping) 均屬於此類方法。因為酵母菌類微生物與一般細菌結構不同，處理方式也不同，因此會有不同的方法名稱，但在最後的電泳分析均是在脈衝式電泳分析儀上進行，因此可歸於同類。此類方法先將細菌懸浮液包埋在瓊脂凝膠 (agarose gel) 中，再利用一些界面活性劑和消化酵素破壞細菌外壁，進一步再選用一個適合的低頻限制酶 (infrequent restriction enzyme) 將裸露的細菌 DNA 進行切割，(酵母菌類細菌的 DNA 因係數個大片段所組

成，已在脈衝式電泳分析儀的可分析範圍，故亦可不經低頻限制酶的作用，直接進行電泳)，如此得到的大切割片段 (macrorestricted fragment) 便可利用脈衝式電泳分析儀進行分析。因為整個過程中完全避免外來物理性的隨機破壞，所以最後分析的大片段 DNA 可視為全部由所使用的低頻限制酶所切割而成，其質與量上的差異完全取決於各分析對象原始的 DNA 組成，由其電泳所得的條紋圖形 (banding pattern) 便可用來作為分型之用。此類方法雖然分型能力強，再現性高，但卻曠日費時 (>7 天)，步驟繁瑣，儀器設備成本高昂。更有甚者，並非所有細菌的所有菌株均可利用此一方法得到滿意的分型結果，有些細菌的 DNA 會在處理過程中自動崩解 (auto-degradation)，便無法以脈衝式電泳分析儀進行分析。

IRS-PCR 是在 1996 年剛被設計出來的新方法，因為只是一個步驟較多的 PCR 方法，所以在一般的分生實驗室內便可進行此一實驗。這個方法最大的優點在於，如同原始文獻所證明的，同樣一套操作過程可同時適用在許多不同細菌的分型上，而且其結果均與使用脈衝式電泳分析所得到的結果相當。能達到這樣的通用性，主要是因為原始設計者的巧思，先將細菌的 DNA 以兩種限制酶切割成片段，再將兩種事先設計好的雙股寡核糖核苷酸接合子 (double strand oligonucleotide adapter) 分別接到相對應的限制酶

切點上，如此，在接下來的 PCR 反應中，因為被拆開的單股 DNA 的起始或結束的部份核糖核苷酸 (亦即原先外接的接合子) 序列為已知，便可分別設計兩種相對的寡核糖核苷酸序列當引子 (primer)，順利進行連續增幅 (amplification) 作用。因為所使用的兩種限制酶，對於被分析的對象而言，一個是切點較少，另一個是切點較多的，所以得到的片段便如 PFGE 一般較能反應出菌株間彼此的差異，但又不至於長到需要用脈衝式電泳分析儀來分析，PCR 的產物只要用敏感度頗高的 polyacrylamide gel 來電泳，再以銀染呈色，便可目測觀察分析了。由於限制酶處理後的產物中，理論上仍包括部份是兩端均由同一種限制酶切割所造成的片段，雖然仍可被相對應的接合子接上，但在之後的 PCR 反應中卻無法順利進行增幅，最後便無法在電泳呈色後達到可目測分析的濃度。亦即，IRS-PCR 分析的仍非全部的 DNA，有部份片段會在分析過程中被忽略，因此，其單獨用來分析某種細菌的可行性，仍需與標準參考方法，例如 PFGE 等，作完整比較分析後才能確認。但是，以其省時 (約一天半)、再現性高、區分能力強、以及適用在多種細菌的特性上，IRS-PCR 應該很快會成為一個被廣為接受並使用的細菌分型方法。

## 參考文獻

1. Beck-Sague CM, Jarvis WR: National Nosoco-

- mial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* 1993; 167: 1247-51.
2. Metzgar D, van Belkum A, Field D, et al: Random amplification of polymorphic DNA and microsatellite genotyping of pre- and post-treatment isolates of *Candida* spp. from human immunodeficiency virus-infected patients on different fluconazole regimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2308-13.
  3. Van Belkum A, Mol W, van Saene R, et al: PCR-mediated genotyping of *Candida albicans* strains from bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplantation* 1994; 13: 811-5.
  4. Baley JE: Neonatal candidiasis: the current challenge. *Clin Perinatol* 1991; 18: 263-80.
  5. Waggoner-Fountain LA, Walker MW, Hollis RJ, et al: Vertical and horizontal transmission of unique *Candida* species to premature newborns. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 803-8.
  6. Weese-Mayer DE, Fondriese DW, Brouillette RT, et al: Risk factors associated with candidemia in the neonatal intensive care unit: a case-control study. *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6: 190-6.
  7. Leibovitz E, Luster-Reicher A, Amitai M, et al: Systemic *Candida* infections associated with use of peripheral venous catheters in neonates: a 9-year experience. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 485-91.
  8. Ng PC. Systemic fungal infections in neonates. *Arch Dis Child* 1994; 71: 130-5.
  9. Sherertz RJ, Gledhill KS, Hampton KD, et al: Outbreak of *Candida* bloodstream infections associated with retrograde medication administration in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr* 1992; 120: 455-61.
  10. Arif S, Barkham T, Power EG, et al: Techniques for investigation of an apparent outbreak of infections with *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2205-9.
  11. Huang Y-C, Lin T-Y, Peng H-L, et al: Outbreak of *Candida albicans* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Scand J Infect Dis* 1998; 30: 137-42.
  12. Huang Y-C, Lin T-Y, Leu H-S, et al: Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. *Infection* 1999; 27: 1-6.
  13. Pontieri E, Gregori L, Gennarelli M, et al: Correlation of *Sfi*I macrorestriction endonuclease fingerprint analysis of *Candida parapsilosis* isolates with source of isolation. *J Med Microbiol* 1996; 45: 173-8.
  14. Cormican MG, Hollis RJ, Pfaller MA: DNA macrorestriction profiles and antifungal susceptibility of *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Diag Microbiol Infect Dis* 1996; 25: 83-7.
  15. Schwab U, Chernomas F, Larcom L, et al: Molecular typing and fluconazole susceptibility of urinary *Candida glabrata* isolates from hospitalized patients. *Diag Microbiol Infect Dis* 1997; 28: 11-7.
  16. Vazquez JA, Boikov D, Boilov SG, et al: Use of electrophoretic karyotyping in the evaluation of *Candida* infections in a neonatal intensive-care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 32-7.
  17. Falconi di Francesco L, Barchiesi F, Caselli F, et al: Comparison of four methods for DNA typing of clinical isolates of *Candida glabrata*. *J Med Microbiol* 1999; 48: 955-63.
  18. Sullivan DJ, Henman MC, Moran GP, et al: Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *J Med Microbiol* 1996; 44: 399-408.
  19. Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, et al: DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2386-90.
  20. Warren NG, Hazen KC: *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1995: 723-37.
  21. Scherer S, Stevens DA: Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 675-9.
  22. Su L-H, Wu T-L, Chia J-H, et al: DNA polymorphism in *Mycobacterium chelonae* and *M. abscessus* analyzed by infrequent-restriction-site PCR. (submitted)
  23. Su L-H, Leu H-S, Chiu Y-P, et al: Epidemiological investigation of two clusters of nosocomial bacteraemia caused by multiresistant *Klebsiella pneumoniae* among premature infants using pulsed-field gel electrophoresis and infrequent-restriction-site PCR. (revised)

# Application of Infrequent-Restriction-Site PCR on the Molecular Typing of Three *Candida* Species

*Lin-Hui Su*<sup>1</sup>, *Yueh-Pi Chiu*<sup>2</sup>, *Ju-Hsin Chia*<sup>1</sup>, *An-Jing Kuo*<sup>1</sup>,  
*Hsieh-Shong Leu*<sup>3</sup>, *Chien-Feng Sun*<sup>1</sup>, *Tsu-Lan Wu*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Pathology,

<sup>2</sup> Quality Assurance Team, Nursing Department,

<sup>3</sup> Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Lin-Kou Medical Center, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan, Taiwan, R. O. C.

Infrequent-restriction-site PCR (IRS-PCR) was adopted to fingerprint the three *Candida* species in order to confirm its applicability in molecular typing in our laboratory. A total of 28 isolates were included: (1) 5 strains of *C. albicans* and 8 of *C. glabrata* isolated from the blood of 3 and 2 patients, respectively, in two clusters of infections in neonatal intensive care units (NICU), considered to be 2 separate outbreaks; (2) 3 strains of *C. albicans* and 4 of *C. glabrata* isolated from the wards at different instances; and (3) 5 nosocomial and 3 community strains of *C. parapsilosis*. Results showed that there were 6 molecular types for the 8 *C. albicans* strains tested, excluding the possibility for the presence of an outbreak. There were 5 types for 12 strains of *C. glabrata*, of which 8 isolates from the two patients in the NICU showed an identical result. As expected, all 8 strains of *C. parapsilosis* had different molecular types. IRS-PCR appears to be suitable for the typing of the three *Candida* species. The IRS-PCR can be performed relatively quickly. The method is useful in the investigation of nosocomial yeast outbreaks. (Nosocom Infect Control J 2000; 10: 1-12)

**Key words:** infrequent-restriction-site PCR, molecular typing,  
*Candida* species