

# 首例在治療病患過程中分離出對 amphotericin B 具高抗藥性之耳念珠菌並發現其作用機制

【蔡德君 曾國望 謝禮雲 羅秀容】

耳念珠菌 (*Candida auris*) 最早在耳道被發現，現今已被美國疾病管制與預防中心緊急列為威脅到公眾健康之黴菌病原體，已超過 45 個國家/地區爆發耳念珠菌感染疫情。耳念珠菌非常容易在病患體內定植且在醫療設施環境傳播，因此改變醫療保健黴菌感染的趨勢。至今流行病學與臨床結果數據並無法評估耳念珠菌對抗黴菌藥感受性試驗臨床指標，美國疾病管制與預防中心蒐集來自數百個臨床耳念珠菌分離株的藥敏數據和藥物動力學及藥效學數據，暫時定義耳念珠菌的抗黴菌藥指標。應用這些暫定指標發現超過 90% 的耳念珠菌分離株對氟康唑 (fluconazole) 具抗藥性 (最低抑制濃度為  $\geq 256$  mg/L)，30% 至 50% 對 amphotericin B 具抗藥性，大約 5% 對棘白菌素 (echinocandins) 具抗藥性。

臨床研究發現耳念珠菌分離株

對氟康唑具抗藥性主要與 *ERG11* 和 *TAC1B* 的突變有關，對棘白菌素具抗藥性則與 *FKSI* 的突變有關。本篇率先發表臨床耳念珠菌對 amphotericin B 具抗藥性的機制。

本篇報告一個臨床病例，一名 33 歲女性患者治療霍奇金淋巴瘤和晚期結節性硬化症期間因呼吸窘迫而住院。經胸部電腦斷層掃描發現雙側瀰漫性肺泡病變、毛玻璃混濁和輕度右側氣胸。依照經驗先給予廣效抗生素 (包括美羅培南 (meropenem)、利奈唑胺 (linezolid) 及 5 mg/kg 微脂粒劑型 (liposomal) 的 amphotericin B) 治療患者。後續將支氣管肺泡灌洗液和氣管內管進行培養，發現白色念珠菌的存在。繼而改用微脂粒劑型的 amphotericin B 持續治療 3 週，患者的病情逐漸好轉，恢復後開始繼續化療。隨後，患者出現呼吸困難和肺泡出血，開始使用美羅培南及甲基培

尼皮質醇 (methylprednisolone)。將氣管導管分泌物進行培養後的菌落再以 Vitek2 和核醣體 DNA (rDNA) 內轉錄間隔區 (internal transcribed spacers, ITS) 進行定序，經鑑定發現為耳念珠菌 (分離株1)，依照美國疾病管制與預防中心對抗黴菌藥物的最小抑菌濃度暫定判斷標準，發現分離株1 對氟康唑 (256 mg/L) 具抗藥性，對卡泊芬淨 (caspofungin) (0.75 mg/L) 和 amphotericin B (0.75 mg/L) 呈感受性。接著以卡泊芬淨進行為期兩週的治療，治療後再將氣管導管進行培養發現還有耳念珠菌存在，繼而改以微脂粒劑型的 amphotericin B 再治療兩週後，呼吸道便無再分離出耳念珠菌。一個月後，患者出現泌尿道感染，經培養和基因型鑑定發現為耳念珠菌 (分離株2)，此分離株2 對氟康唑 (96 mg/L) 及 amphotericin B (> 32 mg/L) 具高抗藥性，但仍對卡泊芬淨 (0.38 mg/L) 呈敏感性。因此首先以卡泊芬淨進行治療兩週後，再採集尿液進行培養依舊發現耳念珠菌存活 (分離株3)，接著改用微脂粒劑型的 amphotericin B (5 mg/kg/天) 治療3週。評估分離株2 和3 對抗黴菌藥物的感受性結果相似。治療十天後，尿液培養物仍發現耳念珠菌存活 (分離株4)。雖然分離株4 對氟康唑 (256 mg/L) 和卡泊芬淨 (4 mg/L) 均具有抗藥性，幸運的是，對 amphotericin B (0.75 mg/L) 呈敏感性。經 amphotericin B 治療完成後不

久，患者已轉院至另一家醫療機構便無再繼續追蹤。

作者進一步將這4株耳念珠菌進行全基因組定序、以質譜分析綜合固醇和利用 Cas9 基因編輯技術分析相關研究。經由全基因組定序分析發現，所有耳念珠菌 *ERG11* 和 *TAC1B* 基因均發生突變，分別在 Y132F 和 A583S 胺基酸被取代，而這兩個基因分別與氟康唑抗藥性有關。分離株2 與分離株3 對 amphotericin B 均具有高抗藥性，經分析發現與 *ERG6* 固醇甲基轉移酶 (sterol-methyltransferase) 相關基因中第 97 (R97fs) 位置同時發生胺基酸突變與提前形成終止密碼 (*ERG6*<sup>YY98V\*</sup>)，造成轉錄作用無法進行而影響蛋白質的功能。有趣的是，分離株4 對 amphotericin B 呈現敏感性，經分析發現在 *ERG6* 第 97 (R97fs) 與 98 (Y98fs) 這位置發生突變 (*ERG6*<sup>RYY97LVS</sup>)，導致 *ERG6* 上有3個胺基酸發生改變。其在本研究當中，新發現  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖合成酶相關基因 *FKS1* 突變為 D642Y，可增加耳念珠菌抵抗抗生素的能力，此突變點與先前研究報導耳念珠菌 *FKS1* 突變 (S639, S639P, S639Y) 相關文章不同。

為了測試耳念珠菌 *ERG6* 突變對 amphotericin B 影響其感受性，所以利用 Cas9 基因編輯技術將耳念珠菌分離株1 和4 之 *ERG6* 基因置換成 YY98V\*，造成這兩株菌對 amphotericin B 最低抑菌濃度增加為

≥ 32 mg/L。相反的是將分離株2 和分離株3 置換成野生型 *ERG6*，發現對 amphotericin B 呈感受性，因此證實 *ERG6* 突變對 amphotericin B 是有影響的。此外，在所有分離株中觀察 *ERG6* 等位基因突變為 *ERG6*<sup>YY98V\*</sup> 會造成生長速率下降。

已知 amphotericin B 作用於真菌上麥角固醇，為了證實 *ERG6* 中 YY98V\* 編碼突變影響固醇甲基轉移酶活性導致麥角固醇合成降低。因此進一步分析 4 株耳念珠菌分離株所有固醇代謝產物的變化，發現對 amphotericin B 呈敏感性的分離株，麥角固醇含量佔 > 60%。相反，發現對 amphotericin B 具抗藥性的菌株 (*ERG6*<sup>YY98V\*</sup>)，完全無麥角固醇產物，而是 cholesta-5,7,24-trienol 產物佔居多，因此，發現對 amphotericin B 的抗性與麥角固醇生成是有直接相關性[1]。

【譯者評】耳念珠菌近年因其

具有高抗藥性、高傳播力及難以被檢驗的特性，已在全球多個國家造成危害，被世界上多個國家的衛生單位高度重視。經美國 CDC 的統計發現 2018 年的病例數相對於 2015 至 2017 年的平均值成長了 300%。如此可見耳念珠菌需我們高度重視。所幸，台灣目前只發現一株 CDC 分離的臨床菌株，本實驗室從 1999 年至 2018 年的 TSARY 計劃中，尚無分離出耳念珠菌。本篇首次證實臨床耳念珠菌分離株 *ERG6* 的突變與 amphotericin B 產生抗藥性機制之相關性，由此讓我們更進一步了解耳念珠菌對公共衛生和人類健康造成嚴重的威脅及成為新興傳染病演變。

## 參考文獻

1. Rybak JM, Barker KS, Muñoz JF, et al: In vivo emergence of high-level resistance during treatment reveals the first identified mechanism of amphotericin B resistance in *Candida auris*. Clin Microbiol Infect 2021;13:1198-743.