

診治黴菌感染的挑戰

楊昀良¹ 羅秀容²

¹ 交通大學 生物科技系暨研究所 ² 國家衛生研究院 感染症研究組

黴菌不但造成局部性的表皮感染，還會在免疫系統功能不足的病患身上引起散播性的全身感染，甚至導致死亡。由於癌症已成為國人最重要的死亡原因，隨著癌症診療的進步，癌症用藥的進展，癌症病人黴菌感染的問題也日趨增加。目前抗黴菌藥物種類雖已較二、三十年前大幅增加，但仍算不足，而且使用後副作用大，更令人擔憂的是，抗藥性的致病菌隨著大量使用藥物而增加。

依作用標的來分，目前使用的抗黴菌藥有幾大類(如表一)。以細胞膜為標的有抑制細胞膜主要成分合成的azole類的藥、破壞細胞膜的amphotericin B、抑制RNA與蛋白質合成的flucytosine、抑制細胞分裂的griseofulvin與最近發展出抑制細胞壁幾丁質合成的echinocandins。繼fluconazole在1990年代上市後，為了增加抗黴菌藥的廣效性與降低其副作用，在現有藥物的改進及新藥的開發都有不錯的進展。Voriconazole的研發成功

對Aspergillosis的治療可說是一大福音，降低amphotericin B毒性不同型的改良，使其殺菌能力amphotericin B在臨床上有更廣效的作用。但是，每種藥物可能有其限制(如表二)，例如：沒有一種藥能對所有黴菌有效：仍然沒有效力好的藥能用來治療*Scedopsorium prolificans*與Trichosporon屬所引起的疾病。

這些致病性的黴菌依型態可分為菌絲型和酵母菌型兩大類。在三十年前，酵母菌型，尤其是念珠菌屬(*Candida*)是造成人類黴菌感染的主要病原菌[1]。白色念珠菌(*Candida albicans*)、*C. tropicalis*、*C. glabrata*、*C. parapsilosis*、與*C. krusei*是五種最常引起疾病的念珠菌，其中又以白色念珠菌佔絕大多數。經過了二十年的發展與頻繁使用抗黴菌藥，雖控制了不少的黴菌感染，然而也造成感染菌種分佈的改變。目前特別需要注意的有兩種狀況：1. 在長期使用抗黴菌藥下的篩選壓力，造成對常使用的

表一 現有抗黴菌藥物

類別	藥名	使用方式
Allylamines 與非 Azole 類抑制細胞膜成分 (ergosterol) 的合成	Amorolfine	局部外表
	Butenafine	局部外表
	Naftifine	局部外表
	Terbinafine	口服與局部外表
Azole 類抑制細胞膜成分 (ergosterol) 的合成	Fluconazole	口服與注射
	Itraconazole	口服與注射
	Ketoconazole	口服與局部外表
	Posaconazole	口服
	Voriconazole	口服與注射
	Clotrimazole	局部外表
	Econazole	局部外表
	Miconazole	局部外表
	Oxiconazole	局部外表
	Sulconazole	局部外表
	Terconazole	局部外表
抑制 RNA 與蛋白質合成 抑制細胞壁幾丁質合成	Tioconazole	局部外表
	Flucytosine	口服
	Caspofungin	注射
	Micafungin	注射
破壞細胞膜	Anidulafungin	注射
	Amphotericin B (AmB)	注射與局部外表
	AmB Lipid Complex	注射
	AmB Colloidal Dispersion	注射
	Liposomal AmB	注射
	AmB Oral Suspension	口服
	Topical Nystatin	局部外表
抑制細胞分裂 其他	Pimaricin	眼部
	Griseofulvin	口服
	Ciclopirox olamine	局部外表
	Haloprogin	局部外表
	Tolnaftate	局部外表
	Undecylenate	局部外表

摘錄於 <http://www.doctorfungus.org/thedrugs/medical.htm>

表二 體外測試常用系統性抗黴菌藥物對不同菌種的有效性

黴菌	Fluconazole	Itraconazole	Posaconazole	Voriconazole	Amphotericin B	Echinocandins
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus terreus</i>	-	+/-	+	+	+/-	+
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Candida krusei</i>	-	+/-	+	+	+/-	+
<i>Candida glabrata</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	+/-
Other <i>Candida</i> species	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	+	+	+	+	-
<i>Coccidioides</i> species	+	+	+	+	+	-
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	+/-	+	+	+	+	-
<i>Histoplasma capsulatum</i>	+	+	+	+	+	-
<i>Fusarium</i> species	-	-	+/-	+/-	+/-	-
Zygomycetes	-	+/-	+	-	+	-
<i>Scedosporium apiospermum</i>	-	-	+	+	+/-	-
<i>Scedoporium prolificans</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Trichosporon</i> species	-	-	無資料	+	+/-	-

原發表於 Leventakos et al, Clin. Infect. Dis. 50; 405-415; 在體外測試結果效果好(+)、有效但不是很好(+/-)及無效(-)。

fluconazole 較具抗藥性的 *C. krusei* 及較容易產生抗藥性的 *C. glabrata* 與 *C. tropicalis* 感染比率升高 [2-6]；2. 像隱球菌屬 (*Cryptococcus*) 的非念珠菌與像曲黴菌屬 (*Aspergillus*) 的菌絲型黴菌引起的感染個例有增加的趨勢，這主要是因免疫功能低下人口數增加所造成 [5]。黴菌感染的問題不但是延長病患住院天數，更造成社會與醫療成本的額外負擔。若要有效防治黴菌感染，我們除了持續致病性酵母菌型黴菌研究外，應該也要關注菌絲型黴菌的研究。

醫學的進步，延長了嚴重免疫功能不足的病患 (如血液腫瘤病患) 的生存期，在廣效性抗細菌抗生素有效地控制細菌感染的同時，黴菌感染就成為新興的挑戰。掌握治療黃金啟始時間是決定防治成功與否的先決條件 [7, 8]。然而，抗黴菌藥物選擇不多及副作用強 [9-11]，再加上黴菌感染診斷不易，常都是造成延誤治療的主要因素，因此，在照顧這些高危險群病患，快速診斷侵入性黴菌感染已是刻不容緩的課題 [12]。

組織病理學評估和微生物培養是傳統診斷微生物感染方法，目前也只能靠這些傳統的方法才能做出明確的診斷。此外，實驗室可將培養出的微生物，做進一步確定病原菌的品種與測知其對現有抗黴菌藥的感受性，進而提供醫療所需之資訊。然而，傳統的診斷方法面臨兩個問題：1 是如何在嚴重病患體內取得適當的檢體；2

是如何從受感染的組織培養出病原菌 [13,14]。上述的問題在對菌絲型的黴菌感染，因培養不易且耗費時日更顯得嚴重。至於對於無法培養出病原菌的案例時，有研究團隊研發用原位雜交法 (in situ hybridization) 以偵測黴菌核糖體的 (ribosomal) 18S RNA 序列之方法來輔助診斷 [15,16]。簡而言之，診斷菌絲型黴菌感染具有一定程度的挑戰。

為了克服菌絲型黴菌培養不易且耗費時日的限制，以偵測病患血清中黴菌標誌物為診斷方法是最近的研發重點之一，其中以針對 *Aspergillus* 的 galactomannan 與 1,3-beta-D-glucan 的研究較為成熟，目前已經有市售的偵測試劑。其敏感度分別為 0.5 ng/mL 與 1 pg/ml [12]。此兩種測試方法仍有改良的空間，例如，接受 beta-lactam 抗細菌藥物的病人的血液在 galactomannan 測試中會有假陽性的結果；再者，預防性接受抗黴菌藥物治療和皮質類固醇引起的免疫抑制，則會降低檢測的性能 [17-20]。另外，洗腎時所使用的透析纖維素膜與抗細菌藥物，如一些 cephalosporins 類的藥、carbapenems 及 ampicillin-sulbactam 也會導致 1,3-beta-D-glucan 測試發生假陽性的結果 [21]。重要的是，beta-glucan 還與常見 *Pseudomonas aeruginosa* 致病細菌有交叉作用 [22]。最後就是 1,3-beta-D-glucan 測試無法區分造成感染是哪一種黴菌。

PCR (聚合酶鏈反應) 可以用來放

大黴菌核糖體 DNA(ribosomal DNA) 以提高偵測的準確度及速度，多年來此技術被當成一種輔助診斷侵襲性黴菌感染的方法，尤其是在偵測 *Aspergillosis* 方面。但因缺乏標準化，限制了它被接受作為臨床診斷的通用工具。有鑑於此，International Society for Human and Animal Mycoses (ISHAM) 成立 European *Aspergillus* PCR Initiative Working Group，其目的是標準化與提供最佳 *Aspergillus* PCR 的偵測方法，使 PCR 檢測能在臨床上發揮作用，進而被接受為診斷方法之一。經多年努力，最近這研究團隊發表其分析幾個研究中心進行 *Aspergillus* PCR 的結果 [23]，其內容摘要如下：1. 採血時，只用 EDTA 為抗凝劑。最好避免使用其他抗凝劑如 heparin 或 sodium citrate，因為它們不但會阻礙 PCR 反應，且可能污染樣品而導致不正確的結果 2. 使用足夠的血液檢體扮演著重要的角色。這研究團隊建議至少要有 3cc 的血液；3. 決定 *Aspergillus* PCR 效率的因子，主要是在於 DNA 萃取的步驟，PCR 的增量步驟影響並不大。因此，以下三點的目的是要確保分離出來的 DNA 的品質；4. 在打破黴菌細胞前，紅血球與白血球必須徹底溶解；5. 使用玻璃珠徹底打破黴菌細胞比用酵素方法效果好；6. DNA 最後必須回收在少量體積，建議不可多於 100 μ L；7. PCR 放大反應控制在 35 至 40 回；8. 進行 PCR 時，要用正確

的對照組來排除假陽性。假陰性的診斷將延誤病患接受治療的時間，在提高敏感度努力的同時，避免假陽性亦是一大課題。因為假陽性會使病患在無感染下接受高副作用且昂貴的抗黴菌藥，不但引起病患的不舒適，還浪費醫療資源 [24]。

雖然這些非培養性的偵測技術目前是不完善的，不過，這些技術的確可以增加我們診斷黴菌感染的能力。在 *Aspergillus* 感染初期，高解析度電腦斷層掃描也可以檢測出病患在結節 (nodules) 周圍常常有“暈徵” (halo sign) [12,25]，雖然這些“暈徵”只侷限在侵入性 *Aspergillus* 感染初期有臨床意義，但是當這些高危險群病患有“暈徵”出現時，醫療人員則需特別關注這些病患是否有被 *Aspergillus* 感染的可能。

要如何利用上述國外的經驗呢？因台灣的氣候與醫藥政策有其獨特之處，其他國家的資料未必能套用在台灣，更無法顯示出台灣本土潛在的問題。因此台灣黴菌抗藥性監測計畫 (TSARY: Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts) 在 1999 年成立，有計畫地推動相關研究，以進一步瞭解本地的情形。感謝國內各家醫院的幫忙，台灣黴菌抗藥性監測計畫方可持續定期性地進行，提供台灣致病性酵母菌型黴菌菌種分佈，及其對抗黴菌藥物的感受性的不同與變遷的資訊 [26-28]。除了致病性酵母菌型黴菌外，菌絲型黴菌如曲

黴菌屬 (*Aspergillus*) 引起的感染個例也有增加的趨勢。其中，尤其是對血液腫瘤與器官移植病患為重。

如何可以從根本做起，發展出針對本地的黴菌感染的醫療程序，有效解決問題？所謂「知己知彼，百戰百勝」。防治黴菌感染最重要的，就是加強國內黴菌之正確診斷率。而首要的第一步就是持續性、定期性地進行台灣黴菌感染的流行病學，收集與提供菌種的分佈與藥物感受性的異同與變遷的資訊。我們可以先從血液腫瘤病患開始，瞭解共生於血液腫瘤病患口腔及尿液的黴菌種類及藥物的感受性著手。並探討化療對這些黴菌種類與數量的影響。長期來看，我們必須建立檢體庫，以幫助改進及發展黴菌感染的診斷方法。

參考文獻

1. Edwards EJJ: *Candida* species. In: In Principles and Practice of Infectious Diseases. Edited by Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, 4th edn. New York: Churchill Livingstone Inc 1995;2289-306.
2. Cheng MF, Yu KW, Tang RB, et al: Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:33-7.
3. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al: Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:747-51.
4. Piemonte P, Conte G, Flores C, et al: Emergency of fluconazole-resistant infections by *Candida krusei* and *Candida glabrata* in neutropenic patients. *Rev Med Chil* 1996;124:1149.
5. Warnock DW: Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2007;48:1-12.
6. Yang YL, Cheng MF, Wang CW, et al: The distribution of species and susceptibility of amphotericin B and fluconazole of yeast pathogens isolated from sterile sites in Taiwan. *Med Mycol* 2010;48:328-9.
7. Garey KW, Rege M, Pai MP, et al: Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis* 2006;43:25-31.
8. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH: Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3640-5.
9. Marr K: Combination antifungal therapy: where are we now, and where are we going? *Oncology (Williston Park)* 2004;18:24-9.
10. White TC, Marr KA, Bowden RA: Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:382-402.
11. Yang YL, Lo HJ: Mechanisms of antifungal agent resistance. *J Microbiol Immunol Infect* 2001;34:79-86.
12. Leventakos K, Lewis RE, Kontoyiannis DP: Fungal infections in leukemia patients: how do we prevent and treat them? *Clin Infect Dis* 2010;50:405-15.
13. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, et al: Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica* 2006;91:986-9.
14. Tarrand JJ, Lichterfeld M, Warraich I, et al: Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination. *Am J Clin Pathol* 2003;119:854-8.
15. Hayden RT, Isotalo PA, Parrett T, et al: In situ hybridization for the differentiation of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Pseudallescheria* species in tissue section. *Diagn Mol Pathol* 2003;12:21-6.
16. Torres HA, Rivero GA, Lewis RE, et al: Aspergillosis caused by non-fumigatus *Aspergillus* species: risk factors and in vitro susceptibility compared with *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;46:25-8.
17. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, et al: Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of inva-

- sive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004;190:641-9.
18. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, et al: Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2005;40:1762-9.
 19. Marr KA, Leisenring W: Design issues in studies evaluating diagnostic tests for aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl 6:S381-6.
 20. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE: Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2004;4:349-57.
 21. Marty FM, Lowry CM, Lempitski SJ, et al: Reactivity of (1->3)-beta-d-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3450-3.
 22. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Verweij PE: *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity. *Clin Infect Dis* 2008;46:1930-1.
 23. White PL, Bretagne S, Klingspor L, et al: *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *J Clin Microbiol* 2010;48:1231-40.
 24. Millon L, Grenouillet F, Crouzet J, et al: False-positive *Aspergillus* real-time PCR assay due to a nutritional supplement in a bone marrow transplant recipient with GVH disease. *Med Mycol* 2010;48:661-4.
 25. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, et al: Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clin Infect Dis* 2007;44:373-9.
 26. Yang YL, Ho YA, Cheng HH, et al: Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:60-4.
 27. Yang YL, Li SY, Cheng HH, et al: Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in TSARY 2002. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51:179-83.
 28. Yang YL, Wang AH, Wang CW, et al: Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in TSARY 2006. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;61:175-80.