

計畫編號：MOHW105-CDC-C-315-112118

衛生福利部疾病管制署 105 年科技研究計畫

真菌及特殊病原菌檢驗、監測與流行病學研究

年度研究報告

執行機構：行政院衛生福利部疾病管制署

計畫主持人：李淑英

研究人員：李淑英、廖美惠、陳國緯、黃彥康、陳育辰

執行期間：105 年 1 月 1 日至 105 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意\*

## 目 錄

計畫摘要 .....	1
一、中文摘要 .....	1
二、英文摘要 .....	4
本文 .....	6
一、前言 .....	6
二、材料與方法 .....	13
三、結果 .....	19
四、討論 .....	24
五、結論與建議 .....	27
六、計畫重要研究成果及具體建議 .....	28
七、參考文獻 .....	30
八、圖與表 .....	34
附錄：圖表目錄 .....	44

## 計畫摘要

### 一、中文摘要

關鍵詞：社區感染真菌、院內感染真菌、新興真菌感染、雙型性輸入性真菌、奴卡菌、路鄧葡萄球菌、分子流行病學、快速多重檢測、流式微珠陣列

近年來因愛滋病毒的肆虐及先進醫療行為等因素，使得侵襲性真菌感染居高不下，導致高合併症(morbidity)及死亡(mortality)，並持續成為公衛上的隱憂。本署 TNIS 資料及多家醫院反映真菌在院內感染病原中近年來比率逐年往上竄升；Azole 類廣效性抗真菌藥物的廣泛使用，造成流行菌種的推移變化，如 *non-albicans Candida spp.*，*aspergillus*，*mucormycetes* 的盛行率增加。在接受癌症或器官移植的患者、免疫抑制的化療病患族群真菌感染也漸趨重要。造除了上述伺機性感染案例外，病原真菌在社區對於健康個體之威脅性亦與日俱增。例如，肇因於都市發展、人口遷移及環境之變遷、地震及氣候之異象，助長了真菌如 *coccidioidomycosis*、*histoplasmosis* 及 *blastomycosis* 等雙型性高致病性真菌之感染趨勢；海嘯、颶風等天災引發 *mucormycosis* 之類棘手真菌的爆發感染案例。新興真菌的崛起、社區及院內感染的增加及抗真菌藥物菌株的浮現更增加問題的棘手性。而這些新興及社區感染病原真菌其流行傳播途徑不明、好發危險因子及抗藥性特性有待釐清。真菌的感染對醫療花費成本形成沈重的負擔，這是由於患者住院期長，且抗真菌用藥價昂。未來費用可能隨著更昂貴藥物的出現而更形增加。因此有必要建立參考實驗室，協助正確鑑定，進行實驗室監測，並發展快速及精確的鑑定病原種別，協助釐清感染源，進而落實公衛防治措施。

本研究計畫旨在建立參考實驗室，提供鑑定服務及教育訓練；進行實

驗室監測，追蹤國內真菌流行病學變遷；並發展快速及精確的鑑定病原種別，針對新興及社區感染真菌建立新穎流式微珠陣列種別鑑定；研發先進分子分型技術；並探討抗藥性機制。期能達到及早確定菌種，釐清國內流行概況及原因，及抗藥性崛起之分子機制，以提供防治策略研擬之參考依據。於本研究中，我們亦擬投入新穎全基因體分析將台灣臨床具代表性菌株與已知全基因序列的標準菌株做分析比較差異，希望可以藉由全基因體的技術讓我們對於病原致病及抗藥性有更深入的了解，以求在學術上及實務應用上有所突破和貢獻。找出更好的檢驗及流病標記應用於快速診斷及分子流病分析，並進而有助於抗真菌藥物、檢驗試劑、疫苗、抗藥性及致病機轉研發工作之進展。

我們的主要進展有四：**第一**、發展可單管同時偵測酵母菌麴菌、鐮胞菌、青黴菌、接合菌等臨床重要病原真菌的微珠陣列系統(MSA；microsphere-based suspension array)如 *Candida* spp.，*Aspergillus* spp.，*Fusarium* spp.，*Mucor* spp.，*Rhizopus* spp.，*Coccidioides* spp.，*Rhizomucor pusillus*，*Penicillium marneffeii*，*Paecilomyces javanicus*，*Saksenaea vasiformis*，*Apophysomyces elegans*，*Absidia corymbifera* 和 *Syncephalastrum racemosum*。此方法特異性高，僅 *Mucor racemosus* (Murac)的探針會與 *Mucor hiemalis* 和 *Mucor ramosissimus* 交叉反應。敏感度為 100 fg ~ 1 ng、模擬血液檢體檢測敏感度為  $10^2$  cells/ ml。整個流程包含核酸增幅可於5小時內完成。**第二**、開發偵測臨床重要酵母菌和絲狀真菌的real-time PCR檢測方法。整合應用微珠陣列和 real-time PCR檢測方法，應用於血液腫瘤病人及小兒感染檢體等高危險族群之偵測。**第三**、由臨床病理學及對抗生素抗藥性的特性從2011-2016 分析 48 株 *Staphylococcus lugdunensis*的分子流行病學。**第四**、*Candida albicans* MALDI-TOF與Fluconazole抗藥性並無明顯的關聯性。

我們將致力於建立真菌參考實驗室。相關型別資料將回饋給臨床醫師，合作持續分型並與臨床及流病資料整合建立資料庫。國際上持續建立合作關係，交換型別資訊或提供訓練。希望藉由持續努力瞭解病原可能傳播流行及特定高抗藥性/高致病性株系崛起之情形。甚且探勘出特異性流病、檢驗及疫苗標誌分子。

## 二、英文摘要

Keywords : community-acquired fungal infections, nosocomial fungal infections, newly emerging fungi, dimorphic imported fungi, *Nocardia* spp., *Staphylococcus lugdunensis*, molecular epidemiology, rapid and multiplex detection, suspension bead array

Invasive infections caused by *Candida* spp. and nosocomial pathogens continue to cause high morbidity and mortality in a diverse range of debilitated and immunocompromised hosts and constitute an important public health problem. Rapid species identification and molecular epidemiology studies is important in elucidating transmission characteristics of pathogens and can help to fine tuning the control strategy. Continuous surveillance of type prevalence is also important for the adoption and development of vaccines and diagnostic assays. Investigation on resistance and resistance mechanism could help development of vaccines and diagnostics.

This research is aiming at developing rapid species identification method, standardized typing methods, systematically collect more domestic and international isolates, integrate clinical, epidemiological data with typing data to establish a database. Identify significant clonal clusters and explore the specific differences at molecular levels. We also try to study the resistance and resistance mechanisms to have more scientific impact. Our major findings can be summarized into four points: **Firstly**, We have developed a microsphere-based suspension array (MSA) for the identification of clinically important yeast and mold pathogens including *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Coccidioides* spp., *Rhizomucor pusillus*, *Penicillium marneffeii*, *Paecilomyces javanicuss*, *Saksenaea vasiformis*, *Apophysomyces elegans*, *Absidia corymbifera*, and *Syncephalastrum racemosum*. Twenty-three

oligonucleotide probes were designed based on the internal transcribed spacer(ITS2)region for species level identification of molds. No cross-reactivity was identified except for probes of *Mucor racemosus* (Murac)which cross react with *Mucor hiemalis* and *Mucor ramosissimus*. The sensitivity of MSA is 100 fg to 1 ng and  $10^2$  cells/ml in simulated blood specimens. The whole procedure can be finished within 5 hours. **Secondly**, we have developed real-time PCR detection methods for clinically important yeast and mold pathogens and integrated the beads array and real-time detection methods and applied in the detection of various specimens from high-risk groups such as hematological and neonatal patients. **Thirdly**, we carry out the molecular epidemiology study of *Staphylococcus lugdunensis* in Taiwan. **Fourthly**, MALDI-TOF is not associated to MLST in *Candida albicans*.

We will establish a fungal reference laboratory in Taiwan. Our research results and typing data will be feedback to clinicians for refining their therapy regimen and collaborate to establish databases integrating typing results with clinical and epidemiological data.and provide research findings to control divisions for fine-tuning of their control strategies. Our continous efforts will eventually help to identify crucial points for disease intervention and display our strength and commitment in global participation and international collaboration. Such continuous efforts will help to understand the epidemiology as well as the evolution mechanisms of some high resistant/virulent clones, which can potentially help to identify specific diagnostic, vaccine, and epidemiological marker molecules.

## 本文

### 一、前言

近年來因愛滋病毒的肆虐及先進醫療行為等因素，使得侵襲性真菌感染造成接受癌症或器官移植的患者免疫抑制的化療和免疫缺損病患族群造合併症 (morbidity) 及死亡 (mortality) 的主要原因<sup>1</sup>，並持續成為公衛上的隱憂<sup>2</sup>。除了上述主要為院內感染案例外，病原真菌在社區對於健康個體之威脅性亦與日俱增。例如，肇因於都市發展、人口遷移及環境之變遷、地震等天災及氣候之異象，助長了真菌如 *coccidioidomycosis*<sup>3</sup>、*histoplasmosis*<sup>4</sup> 及 *blastomycosis* 等雙型性高致病性真菌之感染趨勢<sup>5</sup>。新興真菌的崛起<sup>6</sup>、社區病感染的增加及抗真菌藥物菌株的浮現更增加問題的棘手性。而這些新興及社區感染病原真菌其流行傳播途徑不明、好發危險因子及抗藥性特性有待釐清。真菌的感染加長了住院期，並增加醫療花費成本，這是由於患者住院期長，且抗真菌用藥價昂。未來費用可能隨著更昂貴藥物的出現而更形增加<sup>7</sup>。影響真菌感染的二個里程碑，一個為強效抗愛滋療法 (HAART，即俗稱的雞尾酒療法)，的出現及普及；其二為 *fluconazole* 之上市問世。這固然稍有阻遏了病原真菌感染竄升之趨勢，然而感染流行病學卻以另一面貌出現，例如抗 *fluconazole* 的非 *albicans* 的念珠菌有逐年增加的趨勢。因此有必要建立監測網，並發展快速及精確的鑑定病原種別，協助釐清感染源，進而落實公衛防治措施。依據 TNIS 本署資料從 2006 至 2015 年醫學中心加護病房常見之醫療照護相關感染菌種排名如圖一。*Candida species* 排名由 2006 年的第 4 名，之後於 2007 至 2013 年始終維持在第 1 名。

環境之變遷、地震等天災及氣候之異象，亦助長了真菌之感染趨勢。在美國猶他州以南及南美等地，是 *coccidioidomycosis*、*histoplasmosis* 及



blastomycosis 等雙型性高致病性 BSL3 真菌病原流行區。依據美國 NETSS (National Electronic Telecommunications System for Surveillance) 電子監測系統結合地理資訊系統及氣象資訊，分析 1998-2001 年資料顯示近來 coccidioidomycosis 有顯著增加之趨勢，並因氣候異象常見於冬季爆發感染，並分別有在鳳凰城及 65 歲以上老人聚集之流病特性<sup>3</sup>。Coccidioidomycosis 曾見在建築工地<sup>8</sup>或在考古隊挖掘洞穴時<sup>9</sup>因灰塵揚起而爆發感染，或因國際運動賽事，選手於疫區感染返國後各自紛紛發病<sup>10</sup>。Histoplasmosis 在因整建曾為鳥類棲息地的工程中灰塵揚起，而爆發此鄰該工地操場教室的學生流行感染<sup>11</sup>；亦有因探索蝙蝠洞穴接觸塵土而爆發感染<sup>4</sup>；或有至南美洲旅遊旅客感染<sup>12</sup>。Promed 亦有英國熱帶醫學專家報導最近爆發由來自各國（英國、澳洲、瑞士、荷蘭、瑞典、波蘭、南非、馬達加斯加）組成大學生生態研究團隊，至肯亞因暴露到蝙蝠棲息過的腐敗樹幹，截至 201109 調查已知 24 中至少有 8 人回國後因 histoplasmosis 發病 (<http://www.promedmail.org> 7 Sep 2011 Cottle et. al.)。國人國際經商旅遊頻繁，遊蹤遍佈全球各地，對於返國旅客發病之鑑別診斷，尤其是去過流行地區之國人，也應將上述病原列為考慮之中<sup>13</sup>。以日本為例，基於日本在南美經貿觀光活躍，移民者眾，近十餘年來其返國僑民之 coccidioidomycosis 及 histoplasmosis 等報告病例有逐年上升之趨勢。質是之故，日本早在 1990 年代已將二者列為法定報告傳染病。鑑於我國與日本國情近似，台灣亦應就這類疾病之診斷及分子流行病學等及早建立預應機制。

路鄧葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)在人體皮膚共生並經常導致皮膚和軟組織感染<sup>14</sup>。在凝固酶陰性葡萄球菌(CNS)中它是毒性最強的，致病性和毒力類似於金黃色葡萄球菌<sup>15</sup>。近日，已經越來越多地報導路鄧葡萄球菌感染導致嚴重高侵襲性感染且死亡率高，如骨髓炎，關節炎，腦膜

炎，菌血症，敗血症和心內膜炎等<sup>15</sup>。

早期精確鑑定出種別，對醫師選擇藥劑種類及劑量十分必要，此舉可望有助於精確投藥，節約昂貴藥物的治療費用，並避免產生副作用及抗藥性。除此而外，真菌種別的鑑定在流行病學上也是重要的，例如在醫院的病房或場所反覆鑑定出特定的菌種可能顯示是爆發的來源，尤其這個菌種的發生率比平時高或為罕見菌種(如 *C. lusitaniae*, *C. lipolytica*)時<sup>16</sup>。早期及正確的診斷有助於病害診療及防治<sup>17</sup>。真菌種類繁多可大分為酵母菌及黴菌兩類，而會引起疾病的真菌大約在 100-200 種。一般較常見的人類致病菌包括 *Candida* spp. 如 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, 和 *C. glabrata* 以及 *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., *A. fumigatus* 及 *A. niger* 等。病原真菌之傳統鑑別診斷方法如用 SDA、BHI、CHROM agar 培養及染色法如用 KOH、India Ink<sup>18</sup>，觀察型態為主。培養法費時久、過程複雜、需累積的經驗，且敏感度不夠高。生化生理檢測法如用 API ID32C (bioMérieux Inc., France)、VitekII、Rapid 檢測法等商業化快速鑑定的套組<sup>19</sup>，雖然操作上比較簡單，但須培養 48 小時才可以判斷結果，並僅能對其資料庫所收羅之常見菌種，才能有正確鑑定結果<sup>20</sup>。近來，一些檢測檢體之真菌細胞壁成份、抗原、抗體之非培養分析法應運而生<sup>21</sup>。例如，利用樹脂凝集試驗法(LA)檢測 *C. neoformans* 抗原<sup>22</sup>，以三明治酵素免疫反應(EIA)<sup>23</sup>，免疫螢光染色(IF)<sup>24</sup>偵測麴菌和念珠菌抗原、或利用 EIA、免疫擴散法(ID)或補體固定反應(CF)測 blastomycosis, coccidioidomycosis, paracoccidioidomycosis 及 histoplasmosis 等之抗體力價<sup>25</sup>。

目前應用在 *Aspergillus* 類的 POC 檢測方法，例如 immuno-chromatographic lateral-flow device(LFD) 是一種利用 *Aspergillus*-specific MAb 做檢驗偵測 Invasive aspergillus(IA)<sup>26</sup>。目前應用在

*candida* 類的 Vaginal Yeast Test，POC 檢測方法，例如 Savvycheck rapid yeast test<sup>27</sup>。

晚近，核酸檢測技術如各種 PCR 方法之崛起提供快速、精確及敏感鑑別之利器<sup>28</sup>。以 PCR 配合酵素免疫檢測法 EIA 或 RFLP 技術<sup>29</sup>以及核酸雜合法<sup>30</sup>檢測真菌已有不少報告，在 *Candida* 方面，已有先以 PCR 增幅 ITS2 區段，再以專一性 molecular beacons 探針鑑定 *C. dubliniensis*<sup>31</sup> 之文獻。此外如應用在 *Aspergillus spp.*<sup>32</sup>，*Candida spp.*<sup>33</sup>，*C. neoformans*<sup>34</sup>，*Penicillium marneffeii* 及重要的雙型性酵母菌<sup>35</sup>等之鑑別。針對檢驗病原真菌中 *Coccidioides immitis*、*Histoplasma capsulatum* 及 *Blastomyces dermatitidis* 的標準化核酸檢驗試劑 GenProbe 已成功上市。PCR 的最新發展則是利用及時 PCR 偵測法(real-time PCR)，具有快速(45min-2hr)、敏感度更高、可定量及避免污染等優點<sup>36</sup>。吾人日前發展出可鑑定7種臨床上常見真菌種別之 PCR-EIA<sup>37</sup>。也發展以 Light-Cycler Real-time PCR及時偵測7種臨床上常見真菌病原之檢驗系統<sup>38</sup>，針對基因標的為 ITS2 或 large subunit ribosomal DNA，可鑑定臨床重要真菌<sup>39</sup>。Sugita 等已經建立一個 ITS 序列資料庫來鑑定臨床重要的 *Trichosporon spp.*，需時24小時以下<sup>40</sup>。Ninet等發展一套利用28S 核酸序列來鑑定皮膚真菌菌種(dermatophytes species)的商業套組；ABI 公司則發展出針對真菌的 D2 LSU rDNA 片段可全自動化分析序列的系統，並經由資料庫比對鑑別種別。定序粒腺體的 large subunit ribosomal RNA 基因，亦可提供作為除細胞核 rDNA 外另一比較類緣及區別鑑定之標的<sup>41</sup>。這些真菌菌株基因序列資料若能更臻完備，不但可作為分類鑑定之依據，更可提供引子、探針設計的寶貴資料。各種新發展的全基因體快速定序技術平台，標榜數小時內完成全基因體定序，更將提供了令人矚目的豐富資訊。

此領域之進一步應用則是發展高通量之核酸檢測技術，如核酸微陣列晶片和流式微珠陣列，可廣納大量特異性探針(上百至數萬)，且可依臨床檢驗或防疫分子流行病學需求，設計種別、型別等特異性探針，除可廣泛涵蓋臨床上常見病原<sup>42</sup>，甚可納入可能變種及人畜共通病原，如此一來，可以極少量檢體做多重且快速的檢驗鑑定。對於檢體內菌量往往稀微的檢驗如真菌甚為有用。真菌的核酸陣列方面，針對臨床常見真菌包括念珠菌屬及麴菌屬(*Aspergillus* spp.)已有發表<sup>43</sup>。國內成大張長泉教授最近亦已發展出檢驗 64 種黴菌之核酸陣列<sup>44</sup>。目前在全球漸受矚目的流式微珠陣列，主要原理為二種螢光染劑以不同比例混合出 100 種微珠，其上可固定化偵測用探針或抗原/抗體，與經適當 PCR 反應或免疫反應前處理之待測物產生特異性結合後，這些微珠會流經流式細胞儀裝置，並逐一被雙股雷射光束，以便同時辨識微珠編碼及目標信號強弱。如此可高通量、快速、精確地同步偵測 100 種不同特定目標物。這對於時常需面對多種未知傳染病原的防疫及反生恐單位確實頗具潛在應用性。Diaz 和 Fell 近三年利用 Luminex 流式細胞儀高通量多重快速檢測平台，分別發展出針對 *Trichosporon* genus(絲孢酵母屬)種別<sup>45</sup>、*Malassezia* species<sup>46</sup>種別及 *Cryptococcus neoformans* 種群鑑定<sup>47</sup>之新穎技術。Page 和 Kurzman 最近則發表利用 Luminex 平台發展鑑定念珠菌<sup>48</sup>及 9 種臨床常見及 6 種罕見之子囊酵母菌的 Luminex 技術<sup>49</sup>最新應用。美國 CDC 真菌部門發表利用 Luminex 鑑定 *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* 六種臨床重要酵母菌，靈敏度可達 0.5 pg 的 DNA，PCR 增幅後僅需不到 1 小時的時間<sup>50</sup>。這類技術對於防疫檢驗上甚感棘手的未知病原檢體之檢驗，或許亦可提供部分解決之道。國內晶片技術平台經數年研發以來，各種 macro-/microarray 乃至

lab-on-a-chip 技術已漸趨成熟，文獻上發表各種探針之資訊亦急速成長，因此這類高通量之核酸檢測技術發展應用於快速鑑定致病性真菌應是甚為可行之方向。本計畫持續目標之一即是建立或加強更快速、精確度更高的病原真菌檢測，測試 multiplex PCR 對於病原真菌檢驗及種別鑑定的可行性，並與教學醫院合作收集從病患連續採集的血清或全血檢體測試並比較各核酸及免疫檢驗方法的便利、敏感與特異性的卓越度，評估推廣普及的可行性。

各種分子分型(molecular typing)的方法應運而出，除了有助於種別鑑定、病原性、傳播途徑、院內感控、療效追蹤、菌株消長<sup>51</sup>外，亦可應用於致病力、抗藥性及地理趨勢性等問題分子層次機轉之闡明。適當分子分型工具依菌種特性和探討的目的而定，理想上必須具再現性、識別力、容易使用，且需朝向高通量、可數位交換、網路化、標準化與建立資料庫<sup>52</sup>。針對基因序列分型的 rDNA 序列，分析比對新型隱球菌的 ITS1-5.8S-ITS2 region 序列中的八個位置的核苷酸(10, 11, 15, 108, (ITS1), 221(5.8S), 298, 346(ITS2)可將新型隱球菌三個變種(varieties)分成 7 個type(type 1~7)<sup>53</sup>，各有其全球地理分佈特性。利用 *C. parapsilosis* ITS1-5.8S-ITS2 region 序列分析，*C. parapsilosis* 可分為四群(group I, II, III, IV)<sup>54</sup>。*C. albicans* 以 25S rRNA 基因為標的進行 PCR 反應，依增幅產物片段大小可分為 genotype A(450 bp)，genotype B(840 bp)，genotype C(450 bp and 840 bp)，genotype E(1,400 bp)，*C. dubinienesis*(1,080 bp)<sup>55</sup>。2002 年法國學者倡議建立 MLST(multi-locus sequence typing)做為病原菌國際化比對的平台(<http://www.mlst.net>)。MLST原理為針對 6-8 個約 500bp 的持家基因(house-keeping genes)定序，每一條不同(multi-antigen sequence typing)，砂眼披衣菌則可針對 omp1 變異區的 VS1-VS4 進行分型。每株菌株則依其這

些特定持家基因 locus 上 alleles 的組合樣式形成其特定的序列樣式 (sequence type, ST) 以茲比較。MLST 具有穩定、鑑別力高，利於實驗室間資料交換比對等優點<sup>56</sup>，並被成功應用於探討 *C. albicans* 的院內感染流行病學及評估全球菌株之多樣性及菌株間類緣關係<sup>57</sup>。其他如針對重複性序列 DNA 的分析，如 rep-PCR<sup>58</sup> 與 Multilocus microsatellite genes 分析。如針對高變化頻率的 satellite DNA 上的 micro- 及 minisatellite 所發展的 VNTR (variable number of tandem repeats) 或 MLVA (multiple-locus VNTR) 分型技術則被用來探討 *C. albicans* 的演化和族群遺傳結構<sup>59</sup>。

路鄧葡萄球菌普遍對許多抗菌藥物呈現感受性。然而，在過去的二十年裡，青黴素抗性的速度不斷增加，且苯唑西林耐藥性出現已經成為一個主要關注的問題。在台灣北部，在凝固酶陰性葡萄球菌菌血症中路鄧葡萄球菌發生率被認為是 0.87% 且死亡率超過 20%。10 株 (20.8%) 分離株耐苯唑西林和 8 株金黃色葡萄球菌懷有第 V 型盒式染色體 MEC (SCCmec)<sup>60</sup>。可用脈衝場凝膠電泳和 AGR 附屬基因分型分析路鄧葡萄球菌血症菌株表現型和基因型之關連性<sup>61</sup>。

本研究計畫旨在建立鑑定、及先進分子分型技術，並探討抗藥性機制。期能達到及早確定菌種，釐清國內流行概況及原因，及抗藥性崛起之分子機制，以提供防治策略研擬之參考依據。細菌與真菌之間差異更大，用藥選擇更不能夠混而一談，因此精確的鑑定菌種有助於臨床更精準地投藥，避免藥物濫用減緩抗藥性菌株之崛起。

## 二、材料與方法

### (一)、 菌株來源及培養

真菌菌株來源包括從疾病管制署例行檢驗檢體分離之菌株，並與醫院合作收集國內臨床菌株及國衛院 Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts Project(TSARY)1999 及 2002 菌株。*C. albicans* 收集自十年間(1997-2006)全省 25 家醫院時間分離菌株共 201 株。菌株之分離培養採用 Sabouraud dextrose agar(SDA)。菌株之型態及生理生化鑑定採用發芽管試驗 Germ-tube assay，接著採用常用之 API-32 或 VITEK2 酵母菌生化卡片自動鑑定系統。

絲狀黴菌共 52 株包括麴菌、鐮胞菌、青黴菌、接合菌標準菌株購買自生物資源保存及研究中心(表一)，*Exophiala dermatitidis*、*Sporothrix schenckii*、*Trichosporon asahii*、*Microsporum gypseum*、*Chrysosporium* spp.、*Saccharomyces cerevisiae* 則收集自 2007 年、2008 年 CAP 能力測試菌株，全部的菌株培養採用 Sabouraud dextrose agar(SDA)。

真菌培養陽性之鼻咽拭子及痰液檢體收集自通報不明原因肺炎檢驗檢體，共計 244 件。

奴卡菌菌株和路鄧葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)來源為與中山醫院皮膚科合作 43 個病人 48 個分離菌株，菌株來源為 pus 及 Nasopharyngeal。

### (二)、 真菌分離株 DNA 的萃取

真菌分離株培養後用 PUREGENE DNA Purification Kit(Gentra，Minneapolis，Minnesota，USA)萃取 DNA。簡言之，在 SDA 上培養 2~3 天後，取兩個接種環的真菌量攪散於 2 ml PBS 內，加入 10-15  $\mu$ l 分解酵

素，置於 37°C 過夜。13,000 x g 離心 3 分鐘之後，去除上清液；加入 2 ml Cell Lysis Solution，將細胞胚累沖散以達到分解細胞的效果。之後加入 1 ml Protein Precipitation Solution，高速震盪 20 秒；13,000 x g 離心 10 分鐘。取上清液加入 100% 異丙醇使 DNA 沉澱；以 70% 酒精洗過後，加入 50  $\mu$ l DNA Hydration Solution 溶 DNA。以  $A_{260}$  測 DNA 的質量，保存於 -80 °C。絲狀真菌以 Sabouraud dextrose broth 培養於 25°C 培養箱，直到菌絲體長出後萃取 DNA。將菌絲體加入含有 300 mg 的 glass beads(Biospec Products, Bartlesville, Okla.)及 600 ml 的 Tissue and Cell Lysis Solution 的 2 ml screw cap tube 後放入 Mini- Beadbeate 以 4,200 rpm 轉速，振動 5 分鐘破壞細胞，然後將細胞懸浮液取至 1.5 ml centrifuge tube 以 MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit(EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, Wisconsin)萃取 DNA。以以分光光度計測 DNA 的質量，後保存 -80°C。

### (三)、咽喉拭子及痰液檢體 DNA 的萃取

鼻咽拭子及痰液檢體以 QIAamp Viral RNA Min Kit(QIGEN)依照試劑說明書萃取 DNA。

### (四)、流式微珠陣列系統 (MSA ; microsphere-based suspension array) 檢測

#### 1. 引子及探針之設計及合成

所有病原真菌的 species-specific 或 groups-specific 探針設計是根據 GenBank 資料庫 ITS2 region 的序列利用 BioEdit 7.0 版進行多序列比對。這些 species-specific 或 groups-specific 探針有些是新設計的有些是參考以前報告或作修改。

#### 2. 真菌 ITS3 & ITS4 之聚合酶鏈反應(PCR)



以 ITS3(5' GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC 3' )和 ITS4(5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' )引子對增幅 ITS2(internal transcribed spacer)區域，PCR 反應，總容積為 50  $\mu$ l，內含 10 ng 待測 DNA，25 $\mu$ l 2X Master Mix(Fermentas)，及 50 nM of ITS3(forward primer)，200 nM of ITS4(reverse primer)，其餘加蒸餾水混勻。反應初始以 95 $^{\circ}$ C 5 分鐘溫度，35 次循環的變性反應 95 $^{\circ}$ C 30 秒  $\rightarrow$  黏和 58 $^{\circ}$ C 30 秒  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 1 分鐘聚合延長反應，最後為 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘聚合延長反應。PCR 機器使用 PTC-200(MJ research)。

### 3. 鍵結固定化探針於微珠上

取  $2.5 \times 10^6$  磁珠 (Luminex，TX)，加入 50  $\mu$ l 0.1 M 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(MES)buffer pH 4.5(Sigma)與 1 mM 探針 oligonucleotide。序列的設計為在 5' amino 端加上 12-carbon linker。加入 3  $\mu$ l 現配製 1-ethyl-3-(3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDC)solution(10 mg/ml)(Pierce Biotechnology)，可將探針與磁珠結合，置於室溫反應 30 分鐘。之後再加入 3  $\mu$ l 現配製的 EDC 反應 30 分鐘。EDC 反應後，加入 0.5 ml 0.02% Tween 20，混合均勻，8000 rpm 離心 2 分鐘，去除上清液，加入 0.5 ml of 0.1% SDS 清洗後，再以 8000 rpm 離心 2 分鐘，去除上清液。最後磁珠以 50  $\mu$ l Tris-EDTA 回溶，置於 4  $^{\circ}$ C 暗房保存。

### 4. 增幅產物與探針專一性雜交

磁珠以 1.5X tetramethylammonium chloride(TMAC)solution(Sigma，St. Louis，MO)稀釋。TMAC solution 包含 4.5 M TMAC、0.15% Sarkosyl、75 mM Tris-HCl pH 8.0 與 6 mM EDTA(pH 8.0)。取 33  $\mu$ l 1.5X TMAC 包含 5,000 顆磁珠與 17  $\mu$ l 增幅產物混合均勻，置於暗室於 95 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，

接著於 45°C 反應 30 分鐘。以 6000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 75 µl 1X TMAC solution 包含 10 ng/µl streptavidin-R-phycoerythrin(Molecular Probes, Eugene, OR)，置於暗房 40 °C 10 分鐘。最後將樣本分別加至 96 孔 ELIS A 盤，以 Bio-Plex 200 Suspension Array System(Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA)檢測。螢光強度中位數值(Median fluorescent intensity, MFI)為測量 100 個訊號數值之中位數，再由 Bio-Plex Manager 4.1.1 軟體分析結果。

## 5. 流式微珠陣列系統之靈敏度測試

抽取標準菌株 DNA 以 10 倍序列稀釋，濃度由 10 µg/ml 至 10 pg/ml，由其中取 1 µl 做為 template DNA 進行流式微珠陣列檢測。

### (五)、多位基因序列分析法(Multilocus Sequence Typing, MLST)

#### 1. 病原酵母菌持家基因及PCR條件

*Candida albicans* 選出七個 *AAT1a*、*ACC1*、*VPS13*、*MPIb*、*ADP1*、*ZWF1* 及 *SYA1*。以 PTC-200 96-well thermal cycler(MJ Research)進行 PCR 反應。*C. albicans* 反應試劑包含 2 µl DNA(10ng/µl)，4 µl primer(5 µM)，10 µl distilled water，及 TEMPLY PCR kit(LTK BioLaboratories)。反應條件為 94 °C，2 min denature，接著進行 25 cycle 94°C，1 min → 52°C，1 min → 72 °C，1 min 的反應，最後為 72°C，10 min。*C. glabrata* PCR 反應容積為 20 µl，內含有 10 ng DNA、每種 primer 50 pmol、1.25U Taq DNA polymerase、5 µl 的 10X buffer 及 200 µM deoxynucleoside triphosphate。PCR 反應條件為 95°C，5 min denature，接著進行 30 cycle 93°C，30S → 依據增幅基因片段的不同，黏合溫度範圍從 50-57°C 不等，1 min → 72°C，1 min 的反應，最後為 72°C，4 min 的反應。反應試劑包含 6 µl DNA(10ng/µl)，2 µl

primer(5  $\mu$ M) , 5  $\mu$ l distilled water , 及 TEMPLY PCR kit (LTK BioLaboratories)。反應條件為 94 $^{\circ}$ C , 7 min denature , 接著進行 30 cycle 94 $^{\circ}$ C , 1 min  $\rightarrow$  52 $^{\circ}$ C , 1 min  $\rightarrow$  74 $^{\circ}$ C , 1 min 5 seconds 的反應 , 最後為 74 $^{\circ}$ C , 10 min。定序反應使用的引子與 PCR 反應相同 , 並定序正反二股 , 反應之分析使用 ABI 3100 avant(PE Applied Biosystems)。

## 2. 路鄧葡萄球菌MLST持家基因及PCR條件

*S. lugdunensis* 選出七個 *aroE* (*shikimate dehydrogenase*) , *dat* (*D-amino acid aminotransferase*) , *ddl* (*D-alanine:D-alanine ligase*) , *gmk* (*guanylate kinase*) , *ldh* (*L-lactate dehydrogenase*) , *recA* (*recombinase*) , and *yqiL* (*acetyl-coenzyme A acetyltransferase*)<sup>62</sup>。PCR 反應容積為 25  $\mu$ l , 試劑包含 20 ng 的 genomic DNA , 各 1  $\mu$ l 的正向及反向 primer(5  $\mu$ M)及 12.5  $\mu$ l of Master Mix(2X)(Fermentas, Hanover, MD)。增幅條件為 94 $^{\circ}$ C , 5 min denature , 接著進行 25 cycle 94 $^{\circ}$ C 30 sec , 30 min  $\rightarrow$  50 $^{\circ}$ C , 1 mi  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C , 1 min 的反應 , 最後為 72 $^{\circ}$ C , 7 min。反應之儀器使用 T3000 thermal cycler(Biometra , Gottingen, Germany)。

## 3. PCR反應

以 PTC-200 96-well thermal cycler(MJ Research)進行 PCR 反應。*Candida albicans* 反應試劑包含 2  $\mu$ l DNA(10ng/ $\mu$ l) , 4  $\mu$ l primer(5  $\mu$ M) , 10  $\mu$ l distilled water , 及 TEMPLY PCR kit(LTK BioLaboratories)。反應條件為 94 $^{\circ}$ C , 2 min denature , 接著進行 25 cycle 94 $^{\circ}$ C , 1 min  $\rightarrow$  52 $^{\circ}$ C , 1 mi  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C , 1 min 的反應 , 最後為 72 $^{\circ}$ C , 10 min。*Candida glabrata* PCR 反應容積為 20  $\mu$ l , 內含有 10 ng DNA、每種 primer 50 pmol、1.25U Taq DNA polymerase、5  $\mu$ l 的 10X buffer 及 200  $\mu$ M deoxynucleoside triphosphate。PCR 反應條件為 95 $^{\circ}$ C , 5 min denature , 接著進行 30 cycle 93 $^{\circ}$ C , 30S  $\rightarrow$

依據增幅基因片段的不同，黏合溫度範圍從 50-57°C 不等，1 min → 72°C，1 min 的反應，最後為 72°C，4 min 的反應。反應試劑包含 6 µl DNA(10ng/µl)，2 µl primer(5 µM)，5 µl distilled water，及 TEMPLY PCR kit (LTK BioLaboratories)。反應條件為 94°C，7 min denature，接著進行 30 cycle 94°C，1 min → 52°C，1 min → 74°C，1 min 5 seconds 的反應，最後為 74°C，10 min。定序反應使用的引子與 PCR 反應相同，並定序正反二股，反應之分析使用 ABI 3100 avant(PE Applied Biosystems)。

#### (六)、核酸序列比對分析、運算及資料庫建立

將定序後的圖形檔轉入 Bionumerics 6.6 分析軟體，在軟體上比對每個 locus 的序列後，上網(<http://www.mlst.net>)比對各 locus 的基因型。並且將所有菌株所有 loci 的型別組合為個別的 sequence types(STs)，建立台灣念珠菌菌株之資料庫。台灣不同區域所分離之菌株與國際菌株比對。各菌株間類緣關係是以 UPGMA 的方式比對基因的序列。以 Minimum Spanning Tree(MST)運算建立本土菌株及國外菌株間之類緣關係。

#### (七)、*Candida albicans* MALDI-TOF

*Candida* spp.於 SDA 培養 over night 後取單一菌落置入 300 µl 純水的微量離心管，並使菌體充分均質化於水中，再加入 900 µl 無水酒精後並混合均勻。離心(13000rpm, 2min)去除上清液，再次離心(13000rpm, 2min)，將剩餘的上清液盡量去除並風乾 1-2min。加入 50 µl 70% 蟻酸並均質化菌體，再加入 100% CAN 混勻後 13000rpm，2min 離心。取 1 µl 上清液置於 MALDI 樣品盤上於室溫風乾，再取 1 µl HCCA 基質溶液加於樣本上並且風乾，之後置於 MALDI-TOF 質譜儀進行讀取與分析。

### 三、結果

#### (一)、真菌培養鑑定

99 年至 105 年 11 月共計 244 不明原因肺炎檢體經培養鑑定含病原真菌，其中鑑定出 1 種菌種有 212 件(*Candida* spp. 210 件、*Aspergillus fumigatus* 2 件、*Geotrichum capitatum* 1 件)，2 種菌種有 32 件(*Candida* spp. 29 件 *Candida albicans* 及 *Aspergillus flavus* 2 件、*Candida albicans* 及 *Scopulariopsis croci* 1 件)。

#### (二)、流式微珠陣列系統鑑定真菌之測試

##### 1. 探針專一性

圖二顯示設計之探針利用微珠陣列測試鑑定絲狀真菌專一性甚高。陽性結果的 S/B 比值(sample fluorescence intensity to background fluorescence intensity ratio)範圍為 7.9 至 123.4。

##### 2. 敏感性與再現性分析

為試驗微珠陣列系統在鑑定檢測絲狀真菌的敏感性，將麴菌、鐮胞菌、青黴菌、接合菌的染色體濃度從 10 ng 連續稀釋至  $10^{-5}$  ng，經測試結果顯示，本系統可以檢測範圍為 1ng (*Absidia corymbifera*、*Syncephalastrum racemosum*)至  $10^{-4}$  ng (*Aspergillus niger*、*Aspergillus terreus*、*Fusarium moniliforme*、*Fusarium pallidoroseum*、*Penicillium marneffeii*) (表二)。

再現性分析，針對絲狀真菌 49 個標準菌株進行三次微珠陣列重複測試，可得到相同的結果，支持流式微珠陣列的高再現性優勢。

##### 3. 多重菌種混合偵測

欲評估微珠陣列偵測多重菌種之可行性，設定不同的 *Aspergillus*

*flavus* 染色體濃度(1 ng、100 pg、10 pg、1 pg)與 *Aspergillus fumigatus* (1 ng) 和 *Rhizopus oryzae* (1 ng) 混合進行分析。結果顯示當 *A. fumigatus*、*R. oryzae* 染色體濃度為 *A. flavus* 的 100 倍時，利用流式微珠陣列仍可偵測出 *A. fumigatus* 訊號，表示微珠陣列可有效的區分出多重菌種(圖三)。

#### 4. 微珠陣列系統運用於臨床檢體之可行性

為試驗微珠陣列系統運用於臨床檢體鑑定之可行性及的敏感性，將  $10^5$  cells/ml *Aspergillus nidulans* 分生孢子(conidia)與血液混合均勻後連續稀釋至  $10^0$  cell/ml 後萃取 DNA，測試微珠陣列系統敏感性結果顯示檢測範圍為  $10^2$  cells/ml(圖四)。

#### 5. 微珠陣列系統臨床檢體之檢測

233 件經培養確認含病原真菌不明原因肺炎之檢體，以 *Candida species*、*Aspergillus species*(*C. albicans*，*C. dubliniensis*，*C. glabrata*，*C. krusei*，*C. lusitaniae*，*C. parapsilosis*，*C. tropicalis*，*C. guilliermondii*，*Aspergillus species*(*A. flavus*，*A. fumigatus*，*A. nidulans*，*A. niger*，*A. terreus*)及 *Cryptococcus neoformans* 微珠陣列系統檢測模組進行檢測，194 件檢測出含有病原真菌，(*Candida spp.*193 件 *Aspergillus spp.* 4 件)

#### (三)、 Real time PCR 臨床檢體之檢測

233 件不明原因肺炎之檢體依據菌培養分離鑑定及微珠陣列系統檢測以專一性引子進行檢測，203 件檢測出含有病原真菌(*Candida spp.* 202 件檢測出，5 件 *Aspergillus spp.*)

#### (四)、 真菌培養鑑定、微珠陣列系統檢測及 Real-time PCR 檢測結果比較

267 件不明原因肺炎檢體以微珠陣列系統與培養鑑定、in-house real-time PCR 二種參考方法檢測鑑定病原真菌，在這些檢體中有 206 件至少

檢測鑑定出1種病原真菌 (149件(72.3%) 檢測定出1種菌種，46件(22.3%) 2種菌種，10件(4.9%) 3種菌種，1件(0.4%) 1種菌種)，培養鑑定與微珠陣列系統檢測結果一致有189 targets不一致有91 targets。

### 1. 真菌培養鑑定與微珠陣列系統檢測之一致性

264件不明原因肺炎檢體以微珠陣列系統與培養鑑定檢測出 *Candida albicans* 一致性為 83.0% (K=0.54)，*Candida glabrata* 一致性為 93.6% (K=0.66)，*Candida tropicalis* 一致性為92.8% (K=0.59) (表三)。

### 2. Real-time PCR與微珠陣列系統檢測之一致性

237件不明原因肺炎檢體以微珠陣列系統與培養鑑定檢測出 *Candida albicans* 一致性為 85.2% (K=0.56)，*Candida glabrata* 一致性為 96.6% (K=0.86)，*Candida tropicalis* 一致性為99.2% (K=0.96) (表四)。

由上述檢測結果顯示微珠陣列系統檢測可做為疑似病原真菌感染篩檢測方法，再以Real time PCR以專一性引子進行檢測確認。珠陣列系統檢測可檢測出多重病原，而真菌培養分離鑑定雖可分離出多種病原但所需時間較長，故微珠陣列系統檢測可作為快速多重檢測平台。

## (五)、利用 MLST 或 PFGE 分型探討國內及國際念珠菌、奴卡菌及路鄧葡萄球菌之分子流行病學

### 1. *Candida albicans*

就 Clade 的分佈而言，台灣 201 分離株區大致分為 14 個 Clade(圖五)，Clade 1(37 isolates)，Clade 4(35)，Clade 16(26)，Clade 3(15)，Clade 17(14)，Clade 9(11)，Clade 10(10)，Clade 8 and Clade 11(7)及其他較為次要的 Clade。Fluconazole 的 MIC 大多為 susceptible，值得注意的是 Clade 10 有 50%的高比例為 resistant。地理區的分布，由於收集的菌株大多是

來自北部，當中南部較高的 Clade 為 4 與 10。另外azole 類(fluconazole，voriconazole及itraconazole)的抗藥性 resistant 的比例高於 5%，其他種類的藥 amphotricin B 及 Flucytosine 比例不高於 1%。

## 2. 路鄧葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)

48 株路鄧葡萄球菌的MLST(<http://www.pasteur.fr/mlst>) UPGMA 分析圖 (圖六)。來自43個病人48個菌株可區分為9個 ST及以bootstraps70%的標準分界可區分為5群(CG 1-5)。以Penicillin-G resistant rate而言，各別Group 依序為Group 1(3/5)，Group 2(7/10)，Group 3(3/6)，Group 4(0/3)，Group 5(10/13)等。其中Group 1及Group 5有較高比例的Penicillin-G resistant rate (超過70%以上)。三株Oxacillin resistant P28-2, P28-3及P41均分群在Group5，且SCCmec分型為TypeV。所有分離株的SCCmec分型，TypeII有11株，TypeV有6株。其中TypeII分散於各Group，而TypeV2當中5株屬於Group5(5/6)。

來自同一病人的菌株分析P2-1，P2-2及P2-3分離的年代由2011至2013年，從P2-1的ST N1型別變化為P2-2&P2-3的ST6，七個alleles中只有yqiL基因型別的差異，但是還是同樣被分到Group 2中。就抗生素抗藥性而言，從P2-1對於Erythromycin與Clindimycin產生抗藥性一直到P2-3對於Amikacin, Gentamycin與Tetracyclin產生抗藥性。P28-1, P28-2及P28-3分離的年代除了P28-1為2013年外其餘為2016年，從P28-1的ST N2型別變化為P28-2&P28-3的ST3，除了型別的差異外Oxacillin的抗性也有差異(P28-2&P28-3為resistant)。P38-1及P38-2同屬於ST 6型及Group 1，其他的抗生素Penicillin-G及Oxacillin均為susceptible。

### (六)、*Candida albicans* MALDI-TOF 與 Fluconazole 抗藥性之比較

為了解MALDI-TOF是否可應用於*Candida albicans*的Fluconazole抗藥



性的差異，我們選擇從201株MLSTCandida albicans選出13株以區分為Fluconazole resistant及susceptible的菌株。依據CLSI M27-S4標準其中7株為Fluconazole resistant，另外6株為Fluconazole susceptible。進行MALDI-TOF實驗並以Biotyper用principal component analysis分析並畫dendrogram。經由MALDI-TOF PCA cluster分群如圖七，結果可區分為3個Group，以Fluconazole resistant rate而言，各別Group依序為Group 1(1/5), Group 2(3/6), Group 3(2/2)。由初步的結果而言，不同分群其Fluconazole resistant rate有所不同。

#### 四、討論

侵襲性真菌感染身體病弱及免疫缺損病患族群中造成高合併症及致死率而成為公衛上的隱憂。成功發展出新穎微珠多重快速檢驗平台，能快速鑑定臨床常見的麴菌、鐮胞菌、青黴菌、接合菌等絲狀黴菌。於臨床檢體上之應用，在全血等檢體的檢測上靈敏度均約達到約  $10^2$  cells/ml，檢驗時間也控制在 1 小時之內，如此可望增加檢測效率。顯現本方法確能有助於臨床診斷、投藥之參考。此方法若能與血清、培養、鏡檢等傳統方法做整合，有助於增加檢驗之準確性並使得檢驗實驗室之工作流程更形精簡流暢，更有助於臨床投藥防治之參考。

為了快速多重偵測病原真菌，我們發展了一套由 ITS 序列與流式微珠陣列結合而成的偵測平台，可有效率的區分病原真菌菌種。成功建構流式微珠陣列要件如下：(1)選擇一個適合的標的作為區分這些常見院內感染菌種的依據；(2)利用專一性雜交將具有鑑別力的標的產物與磁珠鍵結(3)提高磁珠所鍵結螢光之敏感性供流式細胞儀偵測。

傳統鑑別系統主要依照菌株之表現型作為區分菌種的依據，如市售的 API20 NE<sup>63</sup> 與 Viteck 2<sup>64</sup> 兩種表現型鑑定系統系統。近年來拜分子生物學的發展，許多以分子生物為基礎的方法可提供較高的鑑別力，參考前人的研究顯示，ITS 序列能有效地區分菌種，鑑別力高，支持 ITS 序列較 16S rRNA 為一適合之標的<sup>65</sup>。

新穎流式微珠陣列多重鑑定方法能單管快速偵測多達 100 種病原，並可半定量。相較於核苷酸定序過程繁雜且至少須一天工時，流式微珠陣列僅需 8.5 個小時即可得到結果<sup>66</sup>。在成本估算方面亦較定序來得低。可見流式微珠陣列確有速度快、高通量及摺節成本之優勢。Probes 設計之初皆

參照已發表的標準菌株序列做設計，因此以流式微珠陣列檢測標準菌株的結果如同預測， positive 的訊號強度明顯高於背景值，確認整個實驗之正確性。

Luminex xMAP technology 的技術應用廣泛，核酸偵測常見的形式有三種，包含 direct hybridization、competitive hybridization 以及 Solution-based chemistries with microsphere capture 這三種方式，其中又以 direct hybridization 最為常見。本實驗室微株陣列所使用之方法多屬第一種 direct hybridization，其優勢為實驗方式簡單，需時較短，敏感性亦佳，符合檢體檢驗之需求。Luminex 系統在核酸偵測應用業已發展出許多的商品試劑，包含囊狀纖維化(Cystic fibrosis;簡稱 CF)遺傳疾病的檢測、Y 染測體的 SNP 檢測、粒線體 DNA 的多型性檢測、流感病毒多重檢驗等，由於核酸偵測平台都與 PCR 反應連結，因此其敏感度也都很高，可達到 10 copies/reaction。未來隨著技術的進步與整合，以 Luminex xMAP 技術發展的核酸偵測商品勢必越來越多，加上成本價格尚屬合理，作為實驗室高速度高通量的常規檢驗業務儀器是可預期的，本實驗室對此技術熟捻，於本計劃開始初期就發展相關檢驗分型檢驗技術，歷年來具有豐碩的研究成果(可見歷年發表 SCI 論文)，期望未來能有所突破開發出經過認證的檢驗試劑組。

目前在 *Candida* spp. 之分型方法中，MLST 具有直接提供標準化及方便的優點，相當受到國際間各實驗室所青睞，本實驗室也成功將 MLST 應用至 *Candida albicans*、*Candida glabrata*、*Candida tropicalis* 及 *Candida krusei* 之分型。在我們的研究成果中以及已有多篇發表之論文利用 MLST 的序列資料來解釋 *Candida* spp.包括 *Candida albicans*、*Candida glabrata*、*Candida tropicalis* 等微演化現象。目前在 *Candida* spp. 之分型方法中，

MLST 具有直接提供標準化及方便的優點，相當受到國際間各實驗室所青睞，本實驗室也成功將 MLST 應用至 *Candida albicans*、*Candida glabrata*、*Candida tropicalis* 及 *Candida krusei* 之分型。但已有報告指出，MLST 並不適用於 *C. parapsilosis* 的分型，因為其核苷酸多型性(nucleotide polymorphism)數量太少，以至於無法辨識不同亞種間的分型。

MALDI-TOF 已廣泛應用於微生物種的鑑定，至於分子分型及其他應用還處於試驗階段。近期其他學者的研究，在分型方面 *Candida albicans* 無法確認 MALDI-TOF 與 microsatellite 的關聯性<sup>67</sup>。就抗藥性方面結果顯示 MALDI-TOF 可區分比較 *Candida albicans*、*Candida glabrata* 及 *Candida tropicalis* 等 species 的 triazoles 的抗藥性<sup>68</sup>，另外 *Candida albicans* 及 *Aspergillus spp.*可區分比較 echinocandins 的抗藥性<sup>69</sup>。雖然比較 *Candida albicans* MALDI-TOF 及 MLST 的分型方法沒有明顯的關聯性，但是之後持續進行 MALDI-TOF 與抗真菌藥的抗藥性關聯之研究。

抗藥性及分子型別資訊的判別需依病原種別及特性、病患高危險族群類別、治療投藥歷程做綜合研判，將與合作醫師建立整合資料庫，以協助釐清傳播途徑及可能防範之道。

## 五、結論與建議

我們的主要進展有七：**第一**、發展可單管同時偵測酵母菌、麴菌、鐮胞菌、青黴菌、接合菌等臨床重要病原真菌的微珠陣列如 *Candida* spp. , *Aspergillus* spp. , *Fusarium* spp. , *Mucor* spp. , *Rhizopus* spp. , *Coccidioides* spp. , *Rhizomucor pusillus* , *Penicillium marneffeii* , *Paecilomyces javanicuss* , *Saksenaea vasiformis* , *Apophysomyces elegans* , *Absidia corymbifera* 和 *Syncephalastrum racemosum*。此方法特異性高，僅 *Mucor racemosus*(*Murac*) 的探針會與 *Mucor hiemalis* 和 *Mucor ramosissimus* 交叉反應。敏感度為 100 fg ~ 1 ng、模擬血液檢體檢測敏感度為  $10^2$  cells/ ml。整個流程包含核酸增幅可於5小時內完成。**第二**、開發偵測臨床重要酵母菌和絲狀真菌的 real-time PCR 檢測方法。整合應用微珠陣列和 real-time PCR 檢測方法，應用於血液腫瘤病人及小兒感染檢體等高危險族群之偵測。**第三**、由臨床病理學及對抗生素抗藥性的特性從 2011-2015 分析 48 株 *Staphylococcus lugdunensis* 的 MLST 分子流行病學，發現分群與 Penicillin 及 Oxacillin 有關聯。**第四**、建立 *Candida albicans* MALDI-TOF 分型方法。

我們將致力於建立真菌參考實驗室。相關型別資料將回饋給臨床醫師，合作持續分型並與臨床及流病資料整合建立資料庫。國際上持續建立合作關係，交換型別資訊或提供訓練。希望藉由持續努力瞭解病原可能傳播流行及特定高抗藥性/高致病性株系崛起之情形。甚且探勘出特異性流病、檢驗及疫苗標誌分子。

## 六、計畫重要研究成果及具體建議

具體建議有十二：

1. 預應可能新興及罕見病原爆發流行或境外移入疫情，建立參考實驗室鑑定架構。強化絲狀真菌鑑定能力，並提供鑑定服務及教育訓練。
2. 建立高致病性雙型性真菌鑑定方法，並提供鑑定服務。
3. 整合並精進真菌及特殊病原快速、多重檢驗流程，擴大應用各種鑑定及分型方法於各種高危險族群之檢驗及鑑別，如血液腫瘤、早產兒、皮膚科病患優先防治。將研究成果及型別資料將回饋給送檢單位及臨床醫師，協助釐清病原於病程及療程中之變化，並持續合作與臨床及流病資料整合建立資料庫。與醫院合作轉譯醫學，探討實際臨床應用之可行性。
4. 持續監測抗藥性的趨勢，適時提供抗真菌及抗生素治療建議。
5. 發展可國際接軌之分型方法，追蹤型別、抗藥性基因盛行及變遷情形，提供防治及未來疫苗選擇的參採。
6. 深入探討抗藥性病原真菌及院內感染病原之抗藥性機制，以提供預防因應之道。
7. 評估新世代技術，並加以建置、落實、推廣。發展全基因體分析技術，探討國內具代表性臨床菌株的特性及其致病機轉。
8. 與臨床醫師及公衛人員密切合作，釐清真菌及特殊病原感染之分子流行病學。回饋資料提供擬定防治策略，治療及諮詢之參考。
9. 藉由建立可國際接軌之分型方法參與國際監測，與其他國家進行菌株及型別資料之交流，持續進行實質國際交流，並共同合作發表論文。
10. 由疾管署主動提供鑑定及分型服務，教育訓練及技術推廣：本實驗室發

展之快速多重流式微珠陣列方法實驗細節已提供多個署內外相關單位參考，協助其建立技術。最適化的 PFGE 分子分型流程，也有多名相關研究助理來學習研習，將持續以寬闊的胸襟分享所知，發揮公僕服務奉獻之精神，並建立國際聲譽。

11. 教育民眾如何落實防治，自我保護。

12. 持續努力提升國際SCI論文發表的質與量，分享台灣經驗，展現實力。

## 七、參考文獻

1. Luo GZ, Mitchell TG: Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40:2860-5.
2. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al: Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* 2004;39:309-17.
3. Park BJ, Sigel K, Vaz V, et al: An epidemic of coccidioidomycosis in Arizona associated with climatic changes, 1998-2001. *Journal of Infectious Diseases* 2005;191:1981-7.
4. Lyon GM, Bravo AV, Espino A, et al: Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998-1999. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004;70:438-42.
5. Schneider E, Hajjeh RA, Spiegel RA, et al: A coccidioidomycosis outbreak following the Northridge, Calif, earthquake. *Jama-Journal of the American Medical Association* 1997;277:904-8.
6. Ponton J, Ruchel R, Clemons KV, et al: Emerging pathogens. *Medical Mycology* 2000;38:225-36.
7. Sheng WH, Wang JT, Lu DCT, et al: Comparative impact of hospital-acquired infections on medical costs, length of hospital stay and outcome between community hospitals and medical centres. *Journal of Hospital Infection* 2005;59:205-14.
8. Cummings KC, McDowell A, Wheeler C, et al: Point-source outbreak of coccidioidomycosis in construction workers. *Epidemiol Infect* 2010;138:507-11.
9. Petersen LR, Marshall SL, Barton-Dickson C, et al: Coccidioidomycosis among workers at an archeological site, northeastern Utah. *Emerging Infectious Diseases* 2004;10:637-42.
10. Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, et al: Evaluation of a reformulated CHROMagar *Candida*. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:2015-6.
11. Chamany S, Mirza SA, Fleming JW, et al: A large histoplasmosis outbreak among high school students in Indiana, 2001. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2004;23:909-14.
12. Weinberg M, Weeks J, Lance-Parker S, et al: Severe histoplasmosis in travelers to Nicaragua. *Emerging Infectious Diseases* 2003;9:1322-5.
13. Panackal AA, Hajjeh RA, Cetron MS, et al: Fungal infections among returning travelers. *Clinical Infectious Diseases* 2002;35:1088-95.
14. Wu AB, Wang MC, Tseng CC, et al: Clinical and microbiological characteristics of community-acquired *Staphylococcus lugdunensis* infections in Southern Taiwan. *Journal of clinical microbiology* 2011;49:3015-8.
15. Liu PY, Huang YF, Tang CW, et al: *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: a literature review and analysis of risk factors. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 2010;43:478-84.
16. Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA, et al: British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infectious Diseases* 2003;3:230-40.
17. Denning DW: Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* 2000;355:423-4.
18. Sato Y, Osabe S, Kuno H, et al: Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by microscopic examination of centrifuged cerebrospinal fluid sediment. *Journal of the Neurological Sciences* 1999;164:72-5.
19. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, et al: Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:3533-9.
20. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, et al: Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40:2483-9.
21. Reiss E, Obayashi T, Orle K, et al: Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Medical Mycology* 2000;38:147-59.
22. Hurst SF, Reyes GH, McLaughlin DW, et al: Comparison of commercial latex agglutination and



- sandwich enzyme immunoassays with a competitive binding inhibition enzyme immunoassay for detection of antigenemia and antigenuria in a rabbit model of invasive aspergillosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2000;7:477-85.
23. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, et al: Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* 1998;26:1407-12.
  24. Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, et al: Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1982;16:22-9.
  25. Klein BS, Vergeront JM, DiSalvo AF, et al: Two outbreaks of blastomycosis along rivers in Wisconsin. Isolation of *Blastomyces dermatitidis* from riverbank soil and evidence of its transmission along waterways. *AmRevRespirDis* 1987;136:1333-8.
  26. Dufresne SF, Datta K, Li XM, et al: Detection of Urinary Excreted Fungal Galactomannan-like Antigens for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Plos One* 2012;7.
  27. Dan M, Leshem YYeshaya A: Performance of a rapid yeast test in detecting *Candida* spp. in the vagina. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2010;67:52-5.
  28. Kobayashi GS: Molecular genetics and the diagnostic mycology laboratory. *Arch Med Res* 1995;26:293-6.
  29. Velegraki A, Kambouris ME, Skiniotis G, et al: Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 1999;23:303-12.
  30. Martin C, Roberts D, van der Weide M, et al: Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:3735-42.
  31. Park S, Wong M, Marras SAE, et al: Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:2829-36.
  32. Golbang N, Burnie JPMatthews RC: A polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosing infection caused by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Pathology* 1999;52:419-23.
  33. Rand KH, Houck HWolff M: Detection of candidemia by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1994;8:215-21.
  34. Chaturvedi S, Rodeghier B, Fan JJ, et al: Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT alpha and MATa pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:2007-9.
  35. Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, et al: Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:3505-11.
  36. Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, et al: Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40:490-4.
  37. Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, et al: Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *Journal of Medical Microbiology* 2003;52:1071-6.
  38. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, et al: Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:2302-10.
  39. Zhao J, Kong FR, Li R, et al: Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:2261-6.
  40. Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, et al: Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:1985-93.
  41. Yamada Y, Makimura K, Uchida K, et al: Phylogenetic relationships among medically important yeasts based on sequences of mitochondrial large subunit ribosomal RNA gene. *Mycoses* 2004;47:24-8.
  42. Marlowe EM, Hogan JJ, Hindler JF, et al: Application of an rRNA probe matrix for rapid identification of bacteria and fungi from routine blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*

- 2003;41:5127-33.
43. Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, et al: Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:4943-53.
  44. Hsiao CR, Huang LY, Bouchara JP, et al: Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:3760-8.
  45. Diaz MRFell JW: High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus *Trichosporon*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:3696-706.
  46. Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, et al: Microcoding and flow cytometry as a high-throughput fungal identification system for *Malassezia* species. *Journal of Medical Microbiology* 2006;55:1197-209.
  47. Diaz MRFell JW: Use of a suspension array for rapid identification of the varieties and genotypes of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:3662-72.
  48. Page BTKurtzman CP: Rapid identification of *Candida* species and other clinically important yeast species by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:4507-14.
  49. Page BT, Shields CE, Merz WG, et al: Rapid identification of ascomycetous yeasts from clinical specimens by a molecular method based on flow cytometry and comparison with identifications from phenotypic assays. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:3167-71.
  50. Das S, Brown TM, Kellar KL, et al: DNA probes for the rapid identification of medically important *Candida* species using a multianalyte profiling system. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 2006;46:244-50.
  51. Howell SA, Barnard RJHumphreys F: Application of molecular typing methods to dermatophyte species that cause skin and nail infections. *Journal of Medical Microbiology* 1999;48:33-40.
  52. Soll DR: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 2000;13:332-+.
  53. Katsu M, Kidd S, Ando A, et al: The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Fems Yeast Research* 2004;4:377-88.
  54. Iida S, Imai T, Oguri T, et al: Genetic diversity of the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S rRNA genes among the clinical isolates of *Candida parapsilosis* in Brazil and Japan. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2005;46:133-7.
  55. Tamura M, Watanabe K, Imai T, et al: New PCR primer pairs specific for *Candida dubliniensis* and detection of the fungi from the *Candida albicans* clinical isolates in Japan. *Clin Lab* 2000;46:33-40.
  56. Bounoux ME, Tavanti A, Bouchier C, et al: Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:5265-6.
  57. Bounoux M-E, Aanensen DM, Morand S, et al: Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. *Infection Genetics and Evolution* 2004;4:243-52.
  58. Redkar RJ, Dube MP, McCleskey FK, et al: DNA fingerprinting of *Candida rugosa* via repetitive sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1996;34:1677-81.
  59. Fundyga RE, Lott TJArnold J: Population structure of *Candida albicans*, a member of the human flora, as determined by microsatellite loci. *Infection Genetics and Evolution* 2002;2:57-68.
  60. Lin JF, Cheng CW, Kuo AJ, et al: Clinical experience and microbiologic characteristics of invasive *Staphylococcus lugdunensis* infection in a tertiary center in northern Taiwan. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 2014.
  61. Tseng SP, Lin YT, Tsai JC, et al: Genotypes and phenotypes of *Staphylococcus lugdunensis* isolates recovered from bacteremia. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 2013.
  62. Chassain B, Lemee L, Didi J, et al: Multilocus sequence typing analysis of *Staphylococcus lugdunensis* implies a clonal population structure. *Journal of clinical microbiology* 2012;50:3003-9.
  63. Towner KJChopade BA: BIOTYPING OF ACINETOBACTER-CALCOACETICUS USING

- THE API 2 ONE SYSTEM. *Journal of Hospital Infection* 1987;10:145-51.
64. Ling TKW, Tam PC, Liu ZK, et al: Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against Gram-negative clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:2964-6.
  65. Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, et al: Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:1632-9.
  66. Lee SH, Walker DR, Cregan PB, et al: Comparison of four flow cytometric SNP detection assays and their use in plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 2004;110:167-74.
  67. Dhieb C, Normand AC, L'Ollivier C, et al: Comparison of MALDI-TOF mass spectra with microsatellite length polymorphisms in *Candida albicans*. *Journal of Mass Spectrometry* 2015;50:371-7.
  68. Dhieb C, Normand A, Al-Yasiri M, et al: MALDI-TOF typing highlights geographical and fluconazole resistance clusters in *Candida glabrata*. *Medical Mycology* 2015;53:462-9.
  69. De Carolis E, Vella A, Florio AR, et al: Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Caspofungin Susceptibility Testing of *Candida* and *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 2012;50:2479-83.

## 八、圖與表

表一、流式微珠陣列系統試驗菌株

Organism	Identification no
<i>Aspergillus clavatus</i>	BCRC 31136
	BCRC 30007
<i>Aspergillus flavus</i>	BCRC 30008
	BCRC 30144
	BCRC 33516
	BCRC 30099
<i>Aspergillus fumigatus</i>	BCRC 30502
	BCRC 33380
	BCRC 30100
<i>Aspergillus nidulans</i>	BCRC 31120
	BCRC 33355
	ATCC 10074
	BCRC 30506
<i>Aspergillus niger</i>	BCRC 31512
	BCRC 32731
	BCRC 32734
	BCRC 32735
	ATCC 16404
<i>Aspergillus terreus</i>	BCRC 30135
	BCRC 31128
<i>Aspergillus versicolor</i>	BCRC 32068
	BCRC 30225
<i>Fusarium moniliforme</i>	BCRC 31492
	BCRC 31611
<i>Fusarium oxysporum</i>	BCRC 32107
	BCRC 32139
	BCRC 33554
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	BCRC 33555
	BCRC 32448
<i>Fusarium solani</i>	ATCC 36031
<i>Paecilomyces javanicus</i>	BCRC 35511
<i>Penicillium marneffeii</i>	CBS 344.59
	CBS 549.77
<i>Absidia corymbifera</i>	BCRC 33078
<i>Apophysomyces elegans</i>	BCRC 33107
<i>Mucor hiemalis f. corticola</i>	BCRC 32109

表一、流式微珠陣列系統試驗菌株（續）

Organism	Identification no
<i>Mucor racemosus</i>	BCRC 30186
<i>Mucor racemosus f. chibinensis</i>	BCRC 32162
<i>Mucor racemosus</i>	BCRC 32586
<i>Mucor ramosissimus</i>	BCRC 32160
<i>Rhizomucor pusillus</i>	BCRC 33122
<i>Rhizopus azygosporus</i>	BCRC 31158
<i>Rhizopus microsporus</i>	BCRC 31995
<i>Rhizopus oryzae</i>	BCRC 31145
<i>Saksenaea vasiformis</i>	BCRC 33074
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	BCRC 31638
<i>Coccidioides immitis</i> RS	
<i>Coccidioides posadasii</i> C735	
<i>Absidia coerulea</i>	BCRC 30897
<i>Rhizopus homothallicus</i>	BCRC 31146
<i>Mucor flavus</i>	BCRC 32478
<i>Absidia cuneospora</i>	BCRC 32943
<i>Absidia fusca</i>	BCRC 33045
<i>Exophiala dermatitidis</i>	
<i>Sporothrix schenckii</i>	
<i>Trichosporon asahii</i>	
<i>Trichophyton rubrum</i>	
<i>Microsporum gypseum</i>	
<i>Chrysosporium spp.</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

表二、微珠陣列系統 (MSA) 偵測絲狀真菌 DNA 的最低濃度

Fungal strain		DNA detection limit
<i>Aspergillus clavatus</i>	BCRC 31136	10 pg
<i>Aspergillus flavus</i>	BCRC 30008	10 pg
<i>Aspergillus fumigatus</i>	BCRC 30502	10 pg
<i>Aspergillus nidulans</i>	ATCC 10074	100 pg
<i>Aspergillus niger</i>	BCRC 30506	100 fg
<i>Aspergillus terreus</i>	BCRC 30135	100 fg
<i>Aspergillus versicolor</i>	BCRC 30225	1 pg
<i>Fusarium moniliforme</i>	BCRC 31492	100 fg
<i>Fusarium oxysporum</i>	BCRC 32107	10 pg
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	BCRC 33554	100 pg
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	BCRC 33555	100 fg
<i>Fusarium solani</i>	BCRC 32448	10 pg
<i>Paecilomyces javanicus</i>	BCRC 35511	1 pg
<i>Penicillium marneffei</i>	CBS 344.59	100 fg
<i>Mucor hiemalis</i>	BCRC 32109	1 pg
<i>Mucor racemosus</i>	BCRC 32162	100 pg
<i>Mucor ramosissimus</i>	BCRC 32160	100 pg
<i>Rhizomucor pusillus</i>	BCRC 33122	100 pg
<i>Rhizopus azygosporus</i>	BCRC 31158	100 pg
<i>Rhizopus microsporus</i>	BCRC 31995	100 pg
<i>Rhizopus oryzae</i>	BCRC 31145	100 pg
<i>Absidia corymbifera</i>	BCRC 33078	1 ng
<i>Apophysomyces elegans</i>	BCRC 33107	100 pg
<i>Saksenaea vasiformis</i>	BCRC 33074	10 pg
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	BCRC 31638	1 ng
<i>Coccidioides immitis</i> RS		10 pg
<i>Coccidioides posadasii</i> C735		10 pg

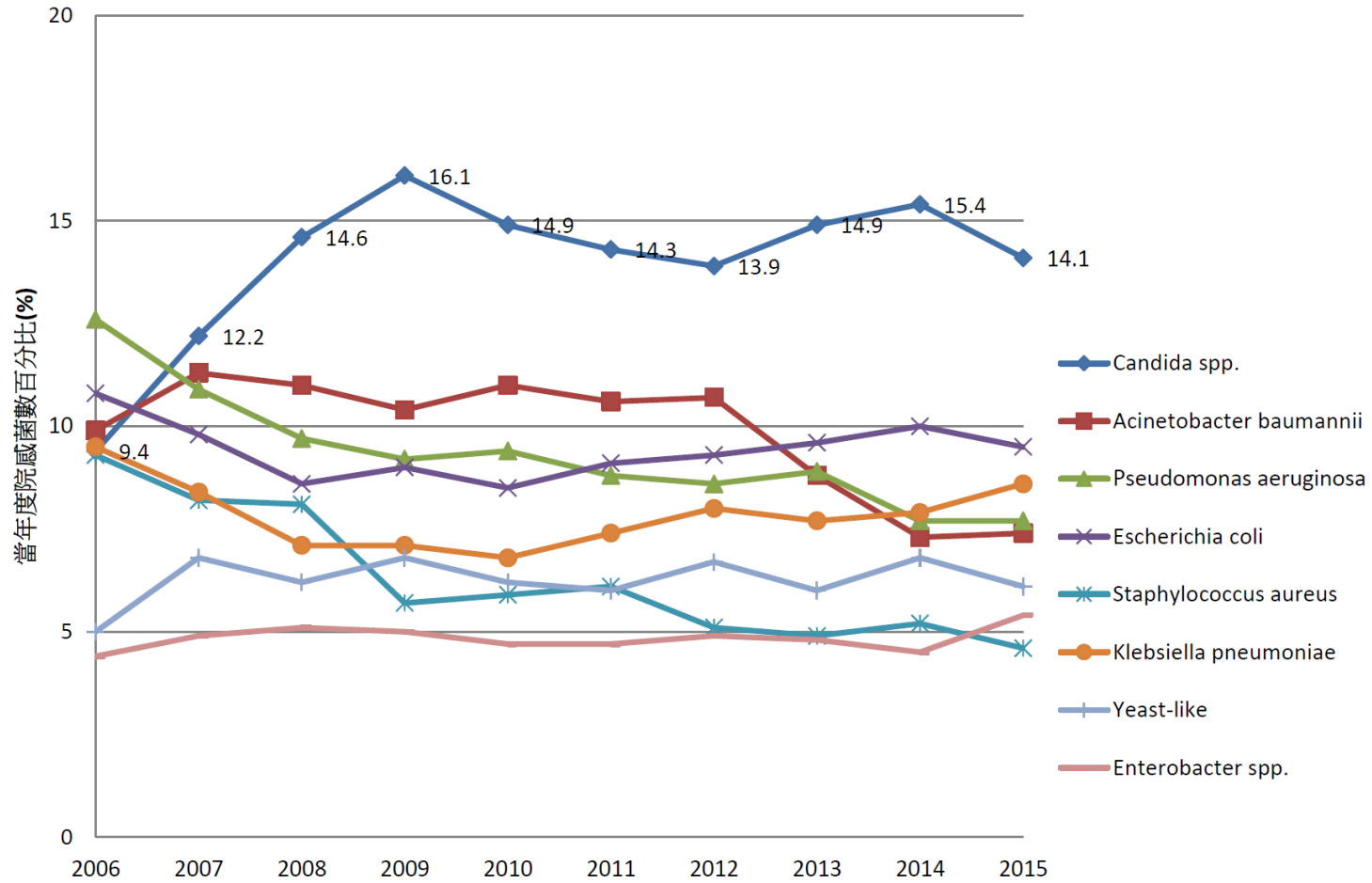
表三、Agreement between culture and MSA Fungal Panel

Pathogens	Both Positive	Culture only	MSA only	Both Negative	Total	Overall agreement	Unweighted kappa
<i>Candida albicans</i>	177	34	11	42	264	83.0%	0.54
<i>Candida glabrata</i>	19	1	16	228	264	93.6%	0.66
<i>Candida tropicalis</i>	16	3	16	229	264	92.8%	0.59

表四、Agreement between Real-Time PCR and MSA Fungal Panel

Pathogens	Both Positive	Real-Time PCR only	MSA only	Both Negative	Total	Overall agreement	Unweighted kappa
<i>Candida albicans</i>	171	17	17	32	237	85.2%	0.56
<i>Candida glabrata</i>	28	1	7	201	237	96.6%	0.86
<i>Candida tropicalis</i>	31	1	1	204	237	99.2%	0.96

圖一、醫學中心加護病房的院感菌逐年趨勢 2006-2015



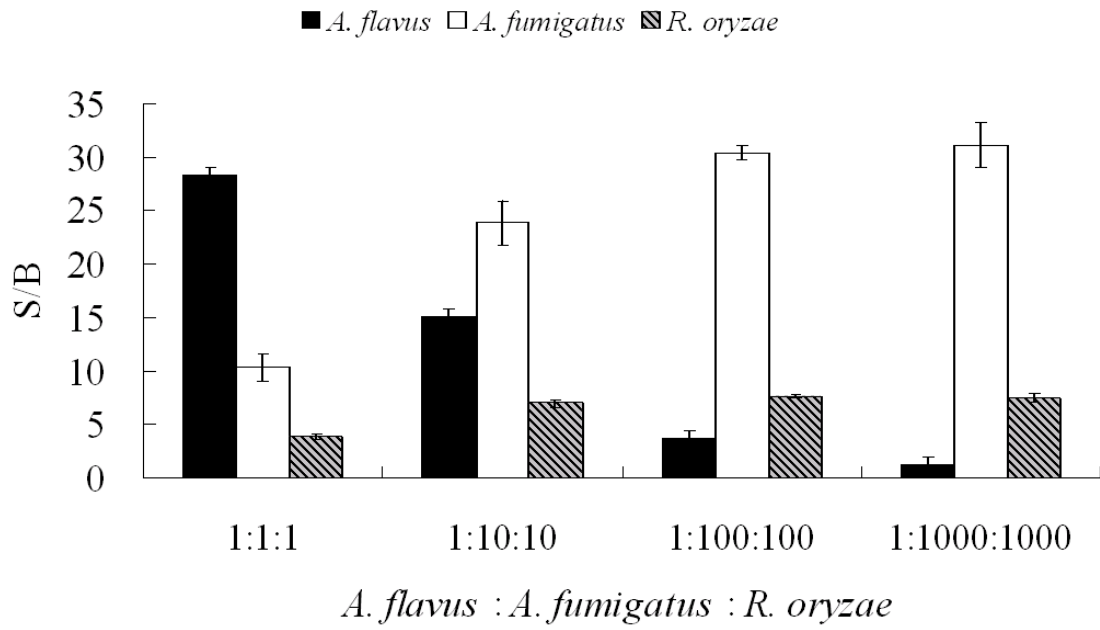


圖二、利用微珠陣列系統測試鑑定絲狀真菌菌株

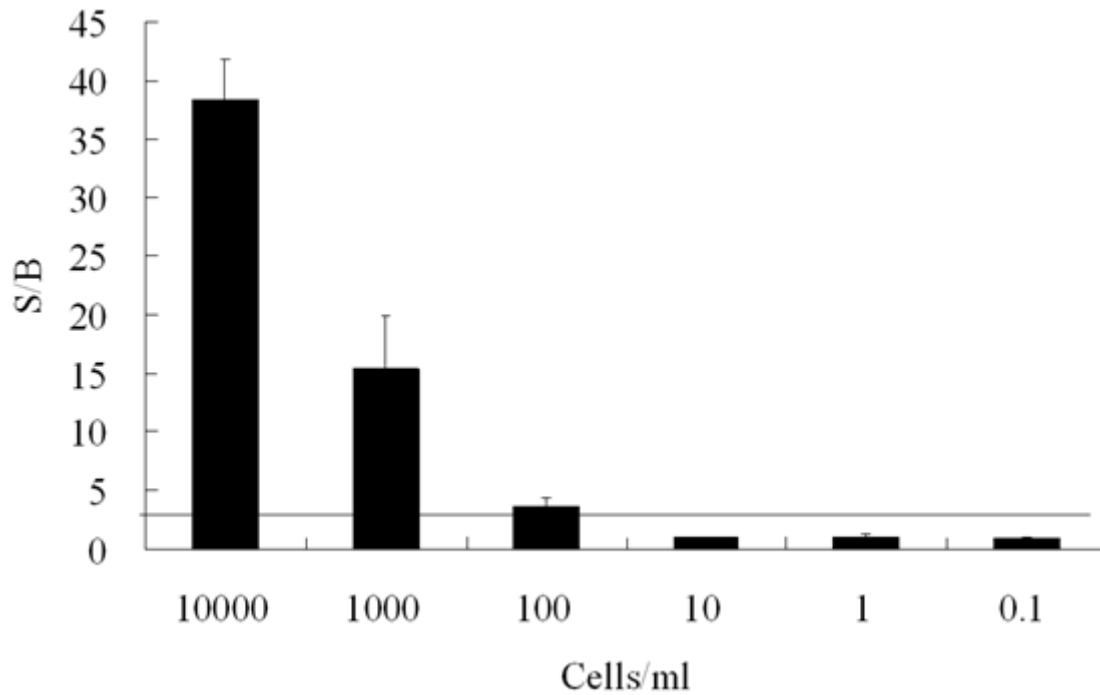
Organism	Identification no	S/B ratio																										
		Ascia	Asfla	Asfum	Asnid	Asnig	Aster	Asver	Fumop	Fuoxy	Fusol	Pajav	Pemar	Abcor	Apele	Mithc	Murac	Muram	Rmpus	Rpam	Rpory	Savas	Syrc	Cocci				
<i>Aspergillus clavatus</i>	BCRC 31136	■																										
<i>Aspergillus flavus</i>	BCRC 30007		■																									
	BCRC 30008		■																									
	BCRC 30144		■																									
<i>Aspergillus fumigatus</i>	BCRC 33516		■																									
	BCRC 30099			■																								
	BCRC 30502			■																								
<i>Aspergillus nidulans</i>	BCRC 33380				■																							
	BCRC 30100				■																							
	BCRC 31120				■																							
<i>Aspergillus niger</i>	BCRC 33355				■																							
	ATCC 10074				■																							
	BCRC 30506					■																						
	BCRC 31512					■																						
	BCRC 32731					■																						
<i>Aspergillus terreus</i>	BCRC 32734					■																						
	BCRC 32735					■																						
	ATCC 16404					■																						
	BCRC 30135						■																					
	BCRC 31128						■																					
BCRC 32068						■																						
<i>Aspergillus versicolor</i>	BCRC 30225						■																					
<i>Fusarium moniliforme</i>	BCRC 31492							■																				
<i>Fusarium oxysporum</i>	BCRC 31611							■																				
	BCRC 32107							■																				
	BCRC 32139							■																				
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	BCRC 33554							■																				
	BCRC 33555							■																				
<i>Fusarium solani</i>	BCRC 32448								■																			
<i>Paecilomyces javanicus</i>	BCRC 35511									■																		
<i>Penicillium marneffeii</i>	CBS 344.59										■																	
	CBS 549.77										■																	
<i>Absidia corymbifera</i>	BCRC 33078											■																
<i>Apophysomyces elegans</i>	BCRC 33107												■															
<i>Mucor hiemalis f. corticola</i>	BCRC 32109													■														
<i>Mucor racemosus</i>	BCRC 30186														■													
<i>Mucor racemosus f. chibinensis</i>	BCRC 32162														■													
<i>Mucor racemosus</i>	BCRC 32586															■												
	BCRC 32160															■												
<i>Rhizomucor pusillus</i>	BCRC 33122																■											
	BCRC 31510																■											
<i>Rhizopus azygosporus</i>	BCRC 31158																	■										
<i>Rhizopus microsporus</i>	BCRC 31995																		■									
<i>Rhizopus oryzae</i>	BCRC 31145																			■								
<i>Saksenaea vasiformis</i>	BCRC 33074																				■							
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	BCRC 31638																					■						
<i>Coccidioides immitis</i>	RS																										■	
<i>Coccidioides posadasii</i>	C735																										■	
<i>Absidia coerulea</i>	BCRC 30897																											■
<i>Rhizopus homothallicus</i>	BCRC 31146																											■
<i>Mucor flavus</i>	BCRC 32478																											■
<i>Absidia cuneospora</i>	BCRC 32943																											■
<i>Absidia fusca</i>	BCRC 33045																											■
<i>Exophiala dermatitidis</i>	2007 F-02																											■
<i>Sporothrix schenckii</i>	2007 F-03																											■
<i>Trichosporon asahii</i>	2007 F-04																											■
<i>Trichophyton rubrum</i>	2007 F-05																											■
<i>Microsporium gypseum</i>	2008 F-09																											■
<i>Chrysosporium spp.</i>	2008 F-10																											■
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2008 F1-09																											■

□ S/B ratio < 3   ■ S/B ratio ≥ 3 , < 50   ■ S/B ratio ≥ 50 , < 100   ■ S/B ratio ≥ 100

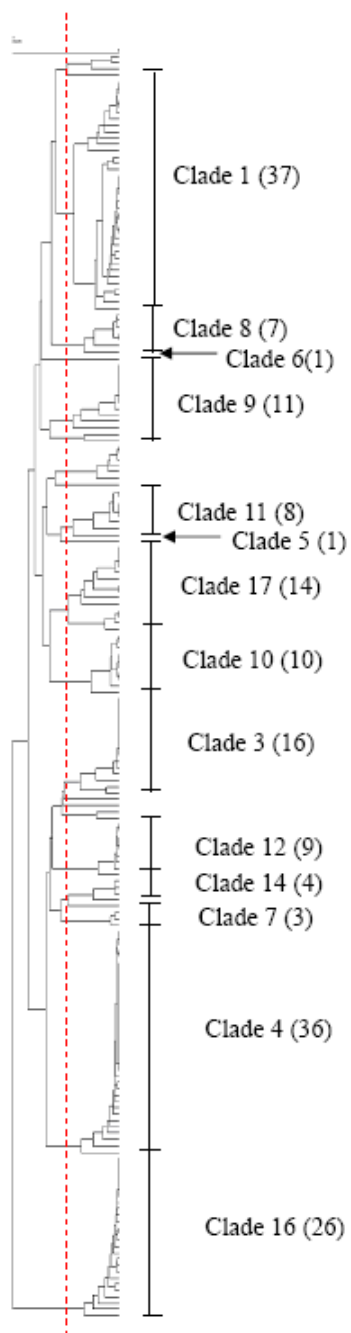
圖三、以微珠陣列系統偵測多重絲狀真菌混合實驗



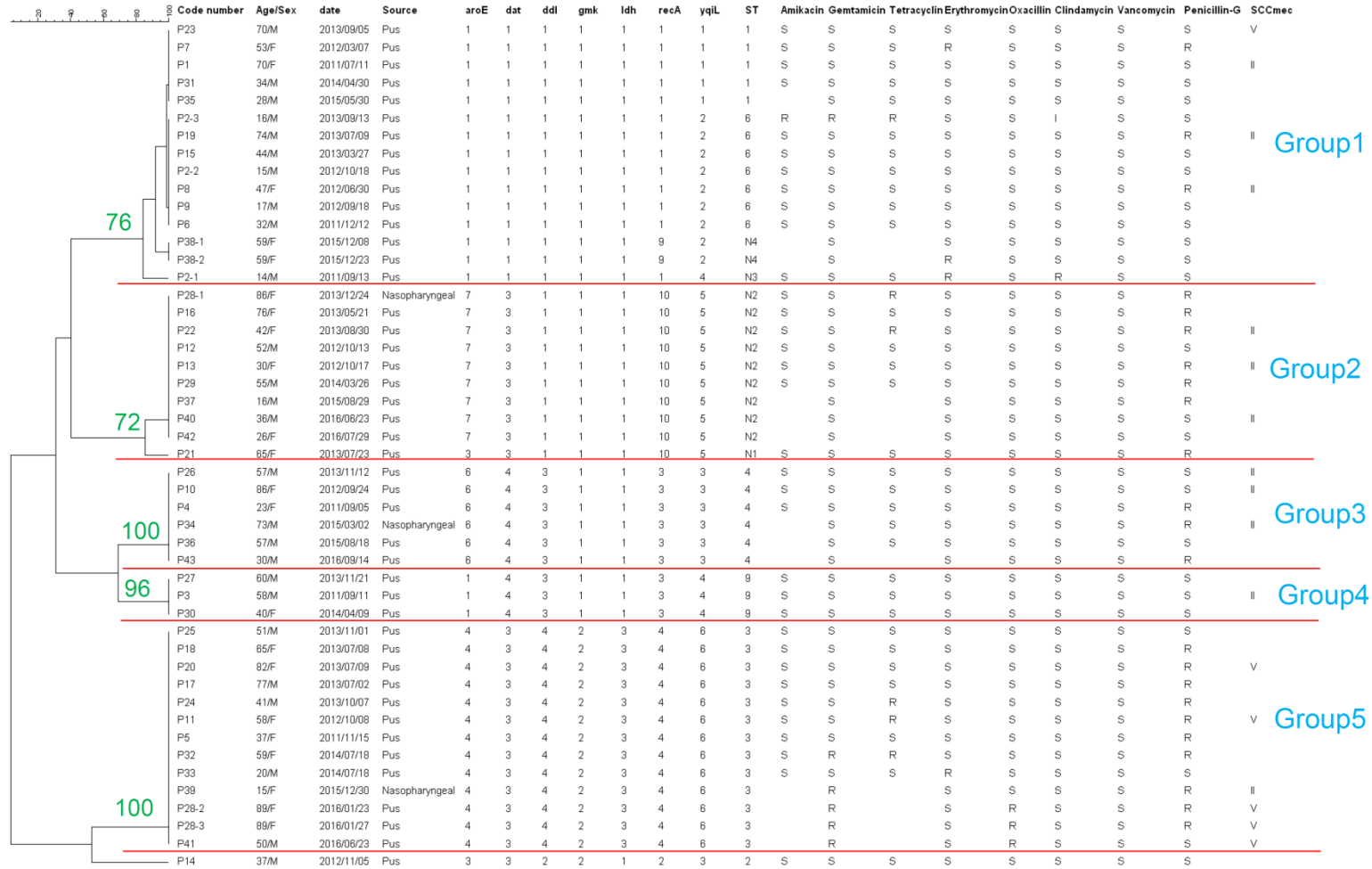
圖四、以 spiked 的血液測試微珠陣列系統運用臨床檢驗可行性及靈敏度



圖五、台灣 201 株 (1997-2006) *Candida albicans* 的 UPGMA tree  
(Clade number 後括弧數為菌株數)



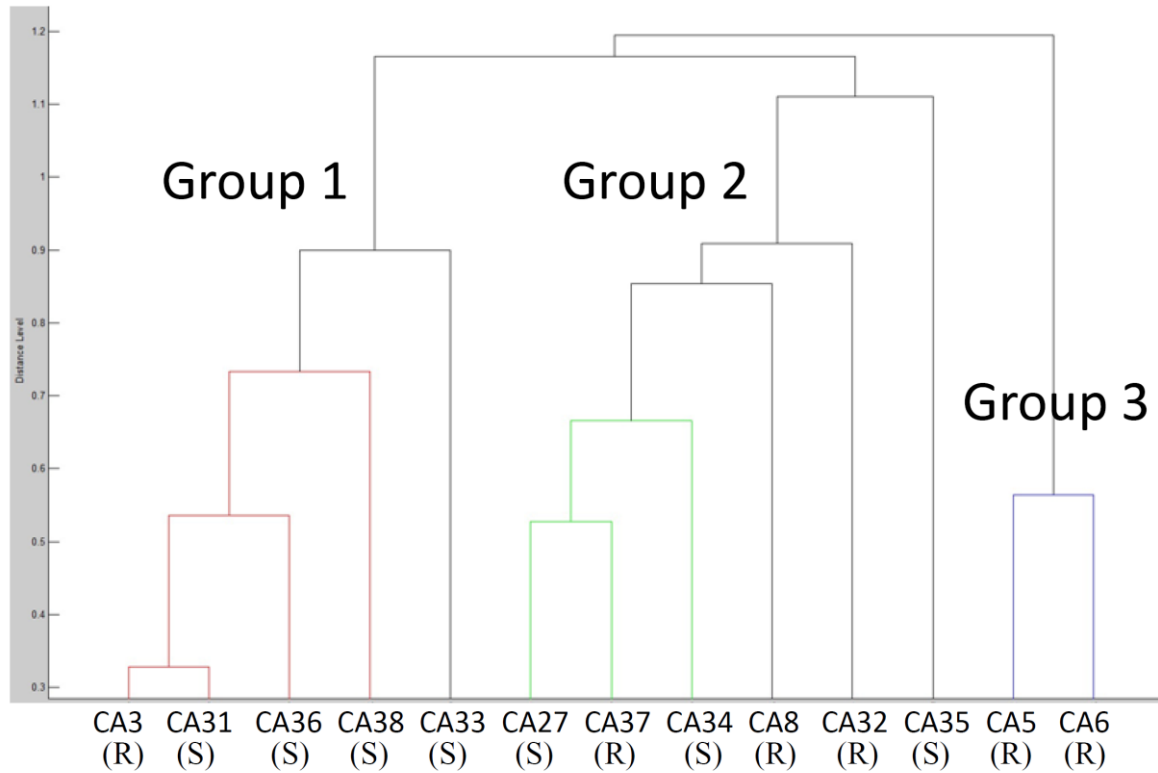
圖六、*Staphylococcus lugdunensis* MLST 類緣關係圖 (43 個病人 48 個菌株)



樹狀圖所表示的數值為 UPGMA, bootstap 1000 replication, 的 bootstrap value

ST 的型別 N1, N2, N3 及 N4 表示 MLST 網站無法比對到的新型別

圖七、13 株 *Candida albicans* fluconazole 抗藥性 MALDI-TOF PCA 樹狀圖分析



R: fluconazole resistant ; S: fluconazole susceptible

橫軸數字為菌株編號，數字旁有\*為 Fluconazole resistant 的菌株

( )內的數字代表該菌株的 MLST clade

## 附錄：圖表目錄

表一、流式微珠陣列系統試驗菌株 .....	34
表二、微珠陣列系統 (MSA) 偵測絲狀真菌 DNA 的最低濃度 .....	36
表三、Agreement between culture and MSA Fungal Panel .....	37
表四、Agreement between Real-Time PCR and MSA Fungal Panel ....	37
圖一、醫學中心加護病房的院感菌逐年趨勢 2006-2015 .....	38
圖二、利用微珠陣列系統測試鑑定絲狀真菌菌株 .....	39
圖三、以微珠陣列系統偵測多重絲狀真菌混合實驗 .....	40
圖四、以 spiked 的血液測試微珠陣列系統運用臨床檢驗可行性及靈 敏度 .....	40
圖五、台灣 201 株 (1997-2006) <i>Candida albicans</i> 的 UPGMA tree	41
圖六、 <i>Staphylococcus lugdunensis</i> MLST 類緣關係圖 (43 個病人 48 個菌株) .....	42
圖七、13 株 <i>Candida albicans</i> fluconazole 抗藥性 MALDI-TOF PCA 樹狀圖分析 .....	43