

計畫編號：DOH95-DC-2014

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

利用全基因體技術發展病原真菌及特殊病原先  
進檢驗及流病分型技術-I

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：李淑英

研究人員：李淑英、陳國緯、林啟揚、周曉慧、廖美惠、林鈺棋、  
黃仲德

執行期間：95年01月01日至95年12月31日

\*本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見\*

目 錄	頁 碼
1. 封面	1
2. 目錄	2
3. 計畫摘要	3
4. 本文	7
一、 前言	7
二、 材料與方法	18
三、 結果	28
四、 討論	40
五、 結論與建議	56
六、 參考文獻	57
七、 圖、表	68
八、 附錄	100
九、 誌謝	107

計畫摘要：

(1)中文摘要：

中文關鍵詞：念珠菌、全基因體分型、抗藥性

侵襲性念珠菌感染在重症孱弱及免疫缺損病患族群中造成之合併症及死亡率仍居高不下，並持續成為公衛上的隱憂。快速精確檢驗及分子流行病學之研究，有助於釐清病原真菌傳播特性，針對不同侵襲致病力、抗藥性樣式及流行病學特性之菌株進行分子層次特異性之探討，有助於瞭解菌株不同表現型及地理趨適之成因，進而研擬更精確之防治對策。

我們過去的努力在分子分型應用於分子流行病學研究上已奠定了良好基礎，今年則希望發展快速精確鑑定種別、標準化方法、擴大收集國內及國際菌株、建立整合臨床、流病及分子型別之資料庫，鑑別出統計上具顯著意義之類緣分群，以利針對進行分子層次特異性之探討。我們的主要進展有六：第一、成功發展出新穎微珠多重快速檢驗平台，能單管快速鑑定臨床常見的 *Candida albicans*、*C. guilliermondii*、*C. lusitaniae*、*C. glabrata*、*C. tropicalis*、*C. glabrata*、*C. parapsilosis*、*C. krusei* 和 *Cryptococcus neoformans* 九種病原酵母菌。第二、在 1999 年台灣似乎有多株系抗藥性 *C. tropicalis* 菌株崛起之情形，而在 2002 年卻不復見，而這一群抗藥性 *C. tropicalis* 菌株類

緣上有集中成群之情形，值得進一步探討其抗藥性崛起之機制。**第**

**三**、我們應用 MLST 分型方法分析台灣及國寄的 *C. albicans* 型別，發現國內型別與廣大的歐美幾乎沒有吻合的型別，相反的，目前雖僅分析 19 株日本菌株，卻已發現發現二個相同之型別，值得進一步調查流病關聯性，及地理趨適性的分子機轉。**第四**、某些來自 HIV 患者的 *C. glabrata* 菌株似乎有獨立成群之情形值得進一步追蹤其是否有在 HIV 患者間傳播之情形，以及這些型別的特異性。**第五**、*C. tropicalis* PFGE 分型的最適限制酶上 *Nae* I 優於 *Rsr* II 及 *Bss* III，建議做為未來標準化推廣之參考。**第六**、應用 RAPD 分型找出不同表現型之特異性片段，並加以選殖定序。將進一步設計 PCR 引子，測試該片段之區分鑑別力。

本年度研究至少產出十篇 SCI 論文三篇已發表，一篇已接受，三篇已投寄，三篇投寄中，還有三篇論文在撰寫中即將投寄至 SCI 期刊。此外，亦有多篇經合作衍生的成果。更重要的是，這些型別資料將回饋給臨床醫師，合作持續分型及統計分群並與臨床及流病資料整合建立資料庫，並進而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。

## (2)Abstract:

Keywords : *Candida spp.*, whole genomic typing, resistance

Invasive *Candida* infections 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. Further analysis of differences of virulence, antifungal resistance profiles and epidemiological behaviour will help to elucidate the underlying mechanisms of such phenotypic and geographic differences. All of these can help to fine tuning the control strategy.

Through our previous efforts, we have laid a sound foundation in applying molecular typing to the study of molecular epidemiology. The research in this year will further develop rapid species identification method, standardize 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. Our major findings can be summarized into five points: **Firstly**, we have developed a novel multiplex beads array system to identify 9 clinically important yeasts, including *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *Cryptococcus neoformans*. **Secondly**, one or more closely related fluconazole resistant *C. tropicalis* clones seemed to have evolved in 1999 and subsequently vanished in 2002. It is worthwhile to further

investigate the molecular mechanisms of their evolution. **Thirdly**, the Taiwanese isolates thus far analysed showed no identical MLST genotypes with the vast western isolates. However, with the only 19 Japanese isolates analyzed we already identify 2 MLST genotypes identical to Taiwanese isolates. More studies will be conducted to find out their epidemiological links and the underlying mechanisms of geographical preferences. **Fourthly**, some *C. glabrata* isolates from AIDS patients phylogenetically form distinct clusters. The possibility of horizontal transmission among HIV infected patients deserves further investigation. **Fifthly**, *Nae* I is superior to *Rsr* II and *Bss* HII as the best restriction enzyme for PFGE typing of *C. tropicalis*. **Sixthly**, we use RAPD typing to identify specific bands and subject them to cloning and sequencing. PCR primers for these specific bands will be designed to further testing the discriminatory power of these specific fragments.

At least 10 SCI papers have been generated: 3 papers are already published, 1 paper has been accepted, 3 have been submitted, and 3 articles are finished and will be submit to SCI journals soon, 4 manuscripts are in preparation and will be submitted to SCI journals. Further publications derived from collaboration are also underway. Furthermore, we will feedback the subtyping data to clinicians and collaborate to establish databases integrating typing results with clinical and epidemiological data. 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，使得侵襲性念珠菌感染在重症孱弱及免疫缺損病患族群中造成之合併症(morbidity)及死亡率(mortality)仍居高不下，並持續成為公衛上的隱憂<sup>1-5</sup>。除上述機緣性感染之案例外，肇因於都市發展、人口遷移及自然災害等因素<sup>6</sup>，病原真菌對於健康個體之威脅性亦與日俱增。而新的致病原崛起<sup>7</sup>及抗藥性菌株的浮現更增加問題的棘手性。

自1989年起在美國念珠菌*Candida spp.* 感染已躍居院內血流性感染的第四位<sup>8</sup>。其中白色念珠菌(*C. albicans*)佔系統性念珠菌屬的50%且為最具病原性的念珠菌<sup>9</sup>。根據美國院內感染監視系統NNISS之傳染病死亡案例統計亦顯示，真菌性病害的排名已由1980的第十位躍升至1997年的第七位<sup>10</sup>。其他歐美國家之調查報告亦指向病原真菌漸趨嚴重之事實<sup>11</sup>。在國內的真菌盛行率居高不下情形也極類似。在台灣某大教學醫院念珠菌高居院內感染致病菌的榜首，而其中又以白色念珠菌為最<sup>12,13</sup>。依據該醫院統計1981至1993年院內感染真菌菌種分析方面，前四名分別為*C. albicans* 50.8%、*C. tropicalis* 17.6%、*C. parapsilosis* 11.7%及*C. glabrata* 8.2%。其中，*C. parapsilosis*

與 *C. glabrata* 更攀升了4-6倍的<sup>14</sup>。而另一教學醫院新生兒加護病房在過去的三年半內，也發生了50多次的念珠菌血症，其中甚至發生了三次院內念珠菌血流感染的流行，而其中一次醫護人員手上所帶真菌被鑑定為該加護病房爆發感染的來源<sup>15-17</sup>。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>18,19</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。

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。例如在在美國猶他州以南及南美等地的coccidioidomycosis、histoplasmosis及blastomycosis等雙型性高致病性真菌病原流行有顯著增加之趨勢<sup>20</sup>。Coccidioidomycosis曾見在考古隊挖掘洞穴時因灰塵揚起而爆發感染<sup>21</sup>。因整建鳥類棲息地<sup>22</sup>、老舊旅館工程<sup>23</sup>、探索蝙蝠洞穴<sup>24</sup>導致Histoplasmosis感染亦屢見報導。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>25</sup>。以日本為例，



基於日本在南美經貿觀光活躍，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。

抗真菌藥物仍有許多改善的空間<sup>26,27</sup>。這是因為早期診斷不易，延誤投藥時機。藥物選擇少且副作用大、對有些真菌無效及產生抗藥性等缺點。近來多種具有不同作用範疇的替代藥物如 voriconazole, posaconazole, echinocandin, caspofungin 的上市，具有低腎毒性、可口服及廣效性之優點，使得醫師在針對不同種別真菌用藥時有更多選擇。自從azole類藥物尤其 fluconazole 上市以來，使其漸成為抗真菌用藥的首選之一。然而，具有抗藥性的菌株卻逐漸浮現，尤其是對azole藥物抗藥性亦已成為真菌感染的重要議題，其他諸如 amphotericin B, flucytosine, itraconazole, ravuconazole 及 voriconazole 對不同黴菌的抑菌濃度也有顯著不同<sup>28</sup>，更增加問題的棘手性。如 *C. lusitaniae* 對 amphotericin B 容易產生抗藥性<sup>29</sup>。*C. krusei* 對於azole先天具有抗藥性，*C. glabrata* 已經有研究顯示在 *in vitro* 及 *in vivo* 易獲得抗藥性<sup>30</sup>，*C. dubliniensis* 和 *C. tropicalis* 非常容易產生 fluconazole 的抗藥性<sup>31-35</sup>。*C. parapsilosis* 和 *C. guilliermondii* 對 echinocandins 的最低抑菌濃度 (MIC)

比其他的 *Candida* spp. 的濃度高。以 amphotericin B 治療 *C. glabrata* 和 *C. krusei* 需要較大的劑量，*C. glabrata* 和 *C. krusei* 對 itraconazole 具有抗藥性，voriconazole 的最低抑菌濃度 (MIC) 也較高。是以鑑定造成感染的真菌種類，可稍預測其對抗真菌藥物抗藥性以提供治療的參考<sup>36</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. lusitanae*, *C. lipolytica*) 時<sup>37</sup>。不同種別發展出深層器官感染機率及其嚴重程度亦有異。例如，*C. tropicalis* 在嗜中性白血球減少症的病人造成侵入性感染但在肝臟移植的病人則不會<sup>38</sup>。可見早期及正確的診斷有助於病害診療及防治<sup>39,40</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。許多較罕見的真菌在近年來被發現引發感染。病原真菌之傳統鑑別診斷方法一般結合培養法如用 SDA、BHI、CHROMagar 培養及染色法如用 KOH、India Ink<sup>41</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>42</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>43</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>44</sup>。例如，利用樹脂凝集試驗法(LA)檢測*C. neoformans* 抗原<sup>45</sup>，以三明治酵素免疫反應(EIA)<sup>46</sup>，免疫螢光染色(IF)<sup>47</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>48</sup>。利用抗體檢測來診斷全身性的念珠菌症(candidiasis)是有限制的，在免疫機能障礙的病人因抗體產生較低或是抗體濃度達不到檢測得濃度會造成偽陰性，病人有表皮的移生(superficial colonization)會造成偽陽性。是以抗原檢測可能是比較有用的方法。血液循環中多數的抗原可當成診斷全身性的念珠菌症的標的。Mannan是*C. albicans*主要的細胞壁mannoprotein，為一個有潛力的診斷抗原。此外，Secreted aspartyl proteinase (Sap)是一毒力因子<sup>49-52</sup>，且因Sap為組織受侵襲過程產生與單純的移生無關，因此被推測可當成診斷抗原<sup>53,54</sup>。

病原真菌在診斷上頗為困難。且相較於細菌菌血症與病毒菌血

症，真菌菌血症之菌量一般低很多。因此，高敏感度的偵測甚為重要。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>39,55</sup>。以PCR配合酵素免疫檢測法EIA或RFLP技術<sup>56,57</sup>以及核酸雜合法<sup>58,59</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>60</sup>之文獻。此外如應用在*Aspergillus spp*<sup>61</sup>，*Candida spp.*<sup>62,63</sup>，*C. neoformans*<sup>64</sup>，*Penicillium marneffeii*及重要的雙型性酵母菌<sup>65</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>66</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>67</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>68</sup>。晚近在2000年，日本Notomi等人研發出一種名為Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)的新型核酸增幅技術快速精確<sup>69</sup>，藉由精密的引子及反應設計大幅提昇了鑑別力，並簡化了反應的過程，被認為具有可加快醫療措施及防疫的啟動之潛力，然而其引子設計複雜普及性及應用型仍有待觀察。新崛起的Pyrosequencing快速及時定序技術<sup>70</sup>，亦提供短序列快速種別鑑定

(50bp左右)<sup>71</sup>、real-time PCR增幅產物確認<sup>72</sup>或SNP單點基因序列突變分析之新選擇。新發展的全基因體Pyrosequencing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。

隨著序列分析的重要性增加，有許多研究者以菌種之間序列的核苷酸組成或長度差異來鑑定菌種<sup>73,74</sup>，針對基因標的為ITS2或large subunit ribosomal DNA，可鑑定臨床重要真菌<sup>75,76</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>77</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>78</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。

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>79</sup>，甚可納入可能變種及人畜共通病原，如此一來，可以極少量檢體做較全面且快速的檢驗鑑定。微陣列能單管同時多重檢驗的優勢，對於檢體內菌量往往稀微的真菌檢驗，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>80</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>81</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(圖十七)。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>82</sup>、*Malassezia species*<sup>83</sup>種別及*Cryptococcus neoformans*種群鑑定<sup>84</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>85</sup>及9種臨床常見及6種罕見之子囊酵母菌的Luminex技術<sup>86</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>87</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。

各種病原真菌分子分型(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>88</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>89</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 (type1~7)<sup>90</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>91</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>92</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，每一條不同的序列皆被歸於一特定的alleles。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。最早應用於MLST的菌是*Neisseria meningitidis*以後陸續有*Compylobacter spp.*及*Streptococcus spp...*等菌，至於可供比對資料數，目前以*N. meningitidis*最多，有超過60個國家共計有2840 STs (sequence types)。 *C. albicans*目前比對資料庫涵括世界各大洲以及台灣(由本研究計畫貢獻52筆資料)等共有549個STs， *C. glabrata*的目前比對資料庫僅有36個STs，未來資料庫會陸續地增加。至於另一個比對平台(<http://www.pubmlst.org>)也建構了*C. tropicalis*87筆STs的比對資料，範圍涵蓋美洲、歐洲及大洋洲等國家，可見MLST發展的國際化之趨勢。MLST具有穩定、鑑別力高<sup>93</sup>，利於實驗室間資料交換比對等優點<sup>94</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>95</sup>。其他如針對重複性序列DNA的分析，如rep-PCR<sup>96</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>97,98</sup>。

常用的全基因體分型方法如RFLP<sup>99</sup>，或RFLP結合探針雜交<sup>100</sup>  
<sup>101,102</sup>、被廣泛用來做流病爆發追蹤傳播途徑之調查，堪稱為是流行  
病學分子分型分析的黃金標準的EK、PFGE<sup>103 104</sup>分子分型方法。全  
部基因組的PCR-fingerprinting尚包括RAPD<sup>105</sup>或者是AFLP<sup>106</sup>，二者  
除分型外可用於建立菌株相關性及鑑別菌株特殊標記片段。

本計畫重點在於發展標準化方法及建立結合臨床、流病、抗藥  
性及分子型別資料庫平台，協助國內相關單位建立技術，提供教育  
訓練及分型服務，參與全球監測及防治網絡。更希望能提升研究深  
度，針對不同侵襲致病力、抗藥性樣式及流行病學特性之菌株進行  
分子層次特異性之探討，有助於瞭解菌株不同表現型及地理趨適之  
成因，進而研擬更精確之防治對策。

## 二、材料與方法：

### (一)、菌株來源及培養：

包括從疾病管制局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。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。

*C. albicans* 之 MLST 試驗的 *C. albicans* 臨床分離菌株可分為三個部份：第一部份包含自同一家醫院於 1999、2001 及 2002 等 3 年，從 37 個愛滋病人所分離的菌株共 101 株。第二部份包含 19 株自 1994 至 2005 年日本非愛滋病人菌株，台灣 2001 與 2002 年非愛滋病人的 35 株菌株，及自英國與美國分離的菌株 30 株，共計有 84 株菌。第三部份包含 27 株自 2004 至 2005 年奈及利亞菌株（11 株來自愛滋病人，16 株來自非愛滋病），台灣菌株 23 株（13 株來自愛滋病人，10 株來自非愛滋病），及自英國與美國分離的菌株 30 株，共計有 80 株菌。每一株臨床菌株包含的資訊有 fluconazol 抗藥性測試、地域來源和由身體何部分分離，還包含是否為院內感染<sup>107</sup>。主治醫生根據美國疾病管制局制訂標準決定是否為院內感染<sup>108</sup>。每次院內感染事件僅取一株代表性菌株。*C. albicans* 分離株的 fluconazol 抗藥性 MICs 測試用 microdilution broth 的方法，根據 NCCLS 公布文件 M27-A<sup>109</sup>。

*C. glabrata* 菌株來源由台大醫院及國家衛生研究院提供，在 MLST 共分析 131 株包含 1996-1997 年國內台大醫院臨床菌株 57 株，2001-2002 年國內愛滋病患(YH 編號)24 株，其他 1999 年台灣南北不等的零星醫院 21 株，另經由國外 MLST 資料庫取得代表不同地理區域（美洲，歐洲和日本）之菌株 29 株(CG1-CG29)以作為後續國際地理間流行病學的比較。

*C. tropicalis* 菌株有 52 菌株來自國衛院 TSARY 1999 及 2002 年，不同區域的 10 家醫院所收集，分別為北部 4 家，南部 3 家，西部 2 家與中部一間，每株菌株都來自於不同病人，分離部位有尿液、唾液與血液，其中有來自 1999 年中 22 株分離株的 fluconazole minimum

inhibitory concentrations (MICs)  $\geq 64 \text{ mg l}^{-1}$ , 表示其對 fluconazole 有抗藥性, 除了四株分離株 (YM990236、990275、990579 與 990649) 所測的 MICs  $\geq 64 \text{ mg/l}$  在 24 小時之外, 其他十九株菌株測 MICs  $\geq 64 \text{ mg/l}$  的時間是 48 小時, 此種需要 48 小時才能測得 MICs  $\geq 64 \text{ mg/l}$  菌株被稱為蔓延性成長表現型 (trailing growth phenotype) (表一); 另有 35 株台大醫院臨床菌株是從 1996 年 9 月收集到 1997 年 3 月, 來自於 12 位病人, 分離部位來自肛門拭子、鼻咽拭子、尿液、唾液、直腸拭子、糞便、主靜脈管及喉頭拭子 (表二)。

## (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 2ml PBS 內, 加入 10-15  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  of DNA Hydration Solution 讓 DNA 溶水。以分光光度計 ( $A_{260}$ ) 測 DNA 的質量, 保存於 -80°C。

## (三)、瓊脂膠體電泳分析 (agarose gel electrophoresis):

使用 2.0% (wt/vol) 的瓊脂膠體搭配 0.5X 的 TBE 緩衝溶液 (0.1 M Tris, 0.09 M boric acid, 1 mM EDTA [pH 8.4]) 100V 進行電泳 1 小時; 染膠 15 分鐘, 接者以蒸餾水去染數次。

## (四)、脈衝式電泳 (PFGE) 及 *Bss*HIII 限制酶切片段分析.

PFGE 及 *Bss*HIII 限制酶片段分析之操作細節詳見已發表之論文<sup>110</sup>。以 IS-1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Calif.) 之照相系統照相並存取圖形。利用 Bionumerics 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) 分析軟體擷取影像檔, 並且以樹狀圖比較各菌株間之類緣關係。位置差異範圍在 1% 可忍受, 而最佳化是設在 3%。使用擲骰子係數 (Dice Coefficient) 去分析片段相似度 ( $S_{AB}$ ), 樹狀圖分析採用 UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic average) 的方式。當分離株片段相似度小於 95% 時, 被認為

是不同的 PFGE genotypes<sup>111</sup>。

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

### 1. *Candida albicans*

依據選擇最少持家基因得到最大的 discriminatory power 的原則，自十個持家基因 (housekeeping gene loci) 選出七個 *AAT1a*、*ACC1*、*VPS13*、*MPIb*、*ADP1*、*ZWF1b* 及 *SYA1*<sup>112</sup>。而每個 locus 之 primer 的使用為 fragment 經 PCR 反應增幅 (詳見表三)。以 PTC-200 96-well thermal cycler (MJ Research) 進行 PCR 反應。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°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。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. *Candida glabrata*

選擇六個 housekeeping loci 分別為 *FKS*、*LEU2*、*NMT1*、*TRP1*、*UGP1* 及 *URA3*，而每個 locus 之 primer 的使用為 fragment 經 PCR 反應增幅 (詳見表四)。

PCR 反應容積為 20  $\mu$ l，內含有 10ng DNA、每種 primer 50pmol、1.25U Taq DNA polymerase、5  $\mu$ l 的 10X buffer 及 200  $\mu$ M deoxynucleoside triphosphate。PCR 反應條件為 95°C, 5min 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, 1min → 72°C, 1min 的反應，最後為 72°C, 4min 的反應。

### 3. *Candida tropicalis*

選擇六個 loci 分別為 *ICL1*、*MDR1*、*SAPT2*、*SAPT4*、*XYR1* 及 *ZWF1a*，而每個 locus 之 primer 的使用為 fragment 經 PCR 反應增幅 (詳見表五)。

以 PTC-200 96-well thermal cycler (MJ Research) 進行 PCR 反應。反應試劑包含 6  $\mu$ l DNA (10ng/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l primer (5  $\mu$ M), 5  $\mu$ l 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 4.0 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)、MLT and ABC typing

**MLT typing** 使用之 primers 如下：

*MLT $\alpha$*  為 Fwd (5'-GAATTCACATCTGGAGGC-3') 及 Rev

(5'-CAAAGCAGCCAACTCAGG-3')，

*MLT $\alpha$*  為 Fwd (5'-ACCTGCATGAAGAAACAG-3') 及 Rev

(5'-GTGGCTAGGTTGAATTTG-3')。

PCR 反應，50  $\mu$ l 試劑包含 100 ng 的 genomic DNA，2.5 U 的 DyNAzyme™ II DNA polymerase (Finnzymes)，5  $\mu$ l 的 10 $\times$  reaction buffer (supplied with the enzyme)，200  $\mu$ M 的 deoxynucleoside triphosphate mix，及 5  $\mu$ M 的 primers。反應條件為 94°C, 3 min denature，接著進行 30 cycle 94°C，1 min→52°C，1 min→72°C，1 min 的反應，最後為 72°C，10 min。

**ABC typing** 增幅 25S rRNA 轉錄間隔區 PCR 依循已發表之方法並稍加修改<sup>113</sup>。使用之 primers 為 CA-INT-L (5'-ATA AGG GAA GTC GGC AAA ATA GAT CCG TAA-3') and CA-INT-R (5'-CCT TGG CTG TGG TTT CGC TAG ATA GTA GAT-3')。PCR 反應，50  $\mu$ l 試劑包含 100 ng 的 genomic DNA，2.5 U 的 DyNAzyme™ II DNA polymerase (Finnzymes)，5  $\mu$ l 的 10 $\times$  reaction buffer (supplied with the enzyme)，200  $\mu$ M 的 dNTP mix，及 1  $\mu$ M 的 primers。反應條件為 94°C, 3 min，接著進行 30 cycle 94°C，1 min→65°C，1 min→72°C，2.5 min 的反應。

應，最後為 72°C，10 min。 *C. albicans* 基因分型依 PCR 產物大小來決定： A 型 (~ 450 bp)， B 型 (~ 840 bp)， C 型則有二個 PCR 產物 (~ 450 & ~ 840 bp)。

#### (八) *C. glabrata* mating typing:

由於有性型別(mating type)，可能對病原毒性與抗藥性有關，故有必要對國內 *C. glabrata* 做相關調查。雖然目前無人發現在 *C. glabrata* 的生活始中存在有性過程(mating)，但在基因體的研究上卻發現三個類似的 mating type -like loci (*MTL1*, *MTL2*, 和 *MTL3*)，經由臨床調查 *MTL $\alpha$*  與 *MTL $\alpha$*  在三個 loci 的排列情形可分為 4 類(class I, II, III, IV)，其中以 class I, II, III 為主要型態。由於辨識 mating type 過程繁瑣，故在調查追蹤中以 PCR 作為快速辨別方法，但也只能辨識 class I, II, IV，期望可以找出國內菌株的主要型態以提供對國內醫院的參考。PCR 主要以三對引子來辨識 class I, II 和 IV，分別為 CgAR1 (CAACACggTAggTTTACgATA) 和 \_AIRACE1 (gAACTTgATTggTggTgATCCCA)，可在 class I 和 II 增幅出 300 bp；二對引子對 12.36F1 (ATgTCAgTCTgAACTAgTgAATA)，PIRACE1 (gCCATCAAaggTAggTCTgAAT) 和 CgPIR2 (CTgAgAgAATgACggAgAgTgTA)，PIRACE1 則在 class II 和 IV 分別增幅出 560 bp 與 1.3kb 之 DNA 產物。PCR 反應，反應容積為 40  $\mu$ l，內含有 40 ng DNA、每種 primer 50pmol、1.25U Taq DNA polymerase、5  $\mu$ l 的 10X buffer 及 200  $\mu$  M deoxynucleoside triphosphate，反應條件為 94°C, 5min，接著進行 35 cycle 94°C，1 min→52°C，1min→72°C，1 min 的反應，最後為 72°C，7 min。

#### (八)、鑑別力的計算：

四種分型法的個別識別力指數(discriminatory index, DI)由辛普森多樣性指數(Simpson's Index)決定<sup>114</sup>。測試族群中兩個不相干的種被放入不同型族群中，DI 數值如果是 1.0，表示此種與此族群可區分；相反的，DI 值為 0.0，表示此種與此族群為同一種。

#### (九)、流式微珠陣列檢測(圖二十)：

### I、ITS3&ITS4之聚合酶鏈反應(PCR)：

以 F63 (59-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-39) 和 R635 (59-GGTCCGTGTTTCAAGACG-39) 引子對增幅(LSU) D1/D2 (LrRNA) 區域 (~600 bp)。另一選擇為以 ITS5 (59-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-39) 和 ITS4 (59-TCCTCCGCTTATTGATATGC-39)引子對增幅ITS (internal transcribed spacer) 約650~ 800 bp大小之片段，PCR反應，總容積為50 $\mu$ l，內含2 $\mu$ l待測DNA，5 $\mu$ l 10XPCR緩衝液，4 $\mu$ l各四種dNTP(0.1mM)，0.8 $\mu$ l各種引子 (50pmol) 及0.4 $\mu$ l (2.0U) Taq DNA polymerase，其餘加蒸餾水混勻。反應初始以94 $^{\circ}$ C 4分鐘溫度，30次循環的變性反應94 $^{\circ}$ C 30秒→黏和55 $^{\circ}$ C 30秒→72 $^{\circ}$ C 1分鐘聚合延長反應，最後為72 $^{\circ}$ C 4分鐘聚合延長反應。PCR機器使用PTC-200(MJ research)。

### II、鏈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 0.1M 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<sup>115</sup>。加入3  $\mu$ l現配製1-ethyl-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。

### III、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°C 反應5分鐘，接著於40°C反應30分鐘。以8000 rpm離心2分鐘，去除上清液，加入70 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ELISA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。

## (十)、隨機擴增多形性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD)

### I、*Candida albicans*的RAPD

*Candida albicans* 的RAPD 依據文獻<sup>116</sup>並稍加修改。使用增幅引子各為OPE-03 (CCAGATGCAC) 和OPE-04 (GTGACATGCC) primer。增幅反應 (25 µl)為：內含有10 ng DNA、每種primer 0.4 µM、2 U Taq DNA polymerase、2.5 µl 的10X buffer及200 µM deoxynucleoside triphosphate。反應條件為94°C, 5min，接著進行45 循環反應，94°C，1 min；36°C，1min；73°C，2 min的反應，最後為72°C，7 min。取10 µl的增幅產物於 1.5% agarose gel 含 0.5x TBE及ethidium bromide (0.4 µg/ml)進行電泳。

### II、*Candida glabrata*的RAPD

*Candida glabrata* 的RAPD 依據文獻並稍加修改<sup>117,118</sup>。使用增幅引子各為EDP-4 (AAGAGCCCTT) 和NS-2 (GGCTGCTGGCACCAGACTTGC) primer。增幅反應 (20 µl)為：內含有20 ng DNA、每種primer 0.4 µM、1.5U Taq DNA polymerase、2 µl 的10X buffer及200 µM deoxynucleoside triphosphate。反應條件為94°C, 5min，接著進行45 循環反應，



94°C, 1 min; 36°C, 2min; 72°C, 2 min的反應，最後為72°C, 7 min。取10 µl的增幅產物於 1.5% agarose gel 含 0.5x TBE及ethidium bromide (0.4 µg/ml)進行電泳。

### III、*Candida tropicalis* 的RAPD

*Candida tropicalis* 的RAPD 依據文獻並稍加修改<sup>119</sup>。使用增幅引子為RP02 (5' GCG ATC CCC A 3')。primer增幅反應(50 µl)為：內含有1 µl genomic DNA、20 ng DNA、每種primer 0.4 µM、5 U of *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs)、2 µl 的10X buffer及200 µM deoxynucleoside triphosphate。PCR反應條件為94°C, 5min, 接著進行4個 循環反應的36°C, 5 min 和 72°C, 5 min; 94°C for 1 min., 30個 循環反應的36°C, 1 min, 和 72°C, 2 min; 最後為72°C, 10 min 的延長反應。取10 µl的增幅產物於 2% agarose gel 含 0.5x TBE及ethidium bromide (0.4 µg/ml)進行電泳。

### (十一)、特異性片段之純化、轉殖及定序

#### I、片段純化

將目標基因放大後的片段以1.5% agarose gel電泳分離後，在UV下切出所需的片段，置於微量離心管中，進行膠體純化，在微量離心管中加入0.8ml buffer QG，置於50°C乾浴器5-8分鐘，使膠體溶解，將溶液注入純化管柱內，以10,000g離心1分鐘，倒除離心下來的液體，再加入0.8ml buffer PE至管柱內，以10,000g離心1分鐘，倒除離心下來的液體，將管柱換至新的離心管，加入30µl二次水至管柱中，室溫下靜置1小時，使DNA溶解，以10,000g離心1分鐘，離心後收集DNA保存，取少量稀釋後測量波長260nm吸光值以定量DNA濃度。

#### (4) 接合反應

將純化後的片段與轉殖質體TOPO vector進行TA接合反應，取2 $\mu$ l PCR product，1 $\mu$ l salt solution及1 $\mu$ l TOPO vector，總體積為5 $\mu$ l，將溶液混合後，置於室溫10分鐘，完成接合反應。

#### (5) 轉型勝任細胞製備

接種大腸桿菌TOP 10單一菌落至1ml含有50 $\mu$ g/ml tetracyclin的LB培養液中，於37 $^{\circ}$ C培養箱中震盪培養，隔夜取出菌液，倒入50ml 含有50 $\mu$ g/ml tetracyclin的LB培養液中，置於37 $^{\circ}$ C培養3-4小時，直到OD600約為0.4-0.5，將菌液平分至兩個離心管，冰上15分鐘後，以4 $^{\circ}$ C,2200g離心10分鐘，去除上清液，加入8ml冰的0.1M CaCl<sub>2</sub>回溶，冰上15分鐘後，以4 $^{\circ}$ C,2200g離心10分鐘，去除上清液，加入1ml冰的0.1M CaCl<sub>2</sub> (含 10% glycerol) 回溶，均勻懸浮菌液，分裝並保存於-80 $^{\circ}$ C，並取少量測量轉型效率。BL21/DE3/pLys及BLR轉型勝任細胞的製作方式亦相同。

#### (6) 轉型作用

由-80 $^{\circ}$ C取出轉型勝任細胞TOP 10在冰上解凍，加入5 $\mu$ l已接合完成的重組質體DNA，均勻混合後，冰上作用30分鐘，置於42 $^{\circ}$ C水浴槽中熱休克(heat shock)45秒，在冰上冷卻2分鐘後，加入0.5ml的LB培養液，於37 $^{\circ}$ C水浴槽中培養1小時，取100 $\mu$ l菌液至含有100 $\mu$ g/ml ampicilin的LB培養盤，將培養盤倒置於37 $^{\circ}$ C培養箱中15-18小時。

#### (7) 質體DNA小量製備

由LB培養盤中挑出數個白色單一菌落，劃在含有100 $\mu$ g/ml ampicilin的LB培養盤中保

留菌種，同時取少量養於1ml含有100 $\mu$ g/ml ampicilin的LB培養液，於37 $^{\circ}$ C培養箱中震盪培養，隔夜取出菌液，以10,000g離心1分鐘，去除上清液，以QIAprep spin miniprep kit抽取質體DNA，加入250 $\mu$ l buffer P1，震盪數次使菌液完全懸浮，加入250 $\mu$ l buffer P2打破菌體，翻轉混勻數次，再加入350 $\mu$ l buffer N3中和後，以10,000g離心15分鐘，取上清液注入QIAprep spin column中，以10,000g離心1分鐘，倒去液體，加入500 $\mu$ l buffer PB至管柱中，以10,000g離心1分鐘，倒去液體，加入750 $\mu$ l buffer PE至管柱中，以10,000g離心1分鐘，倒去液體，將管柱換至新的離心管，加入30 $\mu$ l二次水至管柱中，室溫下靜置1小時，使DNA溶解，以10,000g離心1分鐘，收集DNA保存，取2 $\mu$ l進行0.8% agarose gel電泳分析，挑選出片段大小正確的質體後，以限制酵素切割檢查插入片段大小是否正確，並將質體送交定序。

### 三、結果：

#### (一) 利用 PFGE 分型探討國內念珠菌之分子流行病學

##### 1. *C. glabrata*

PFGE-*Bss*HIII 分型法廣泛應用在 *Candida* spp. 以探討流行病趨勢。因此為與 MLST 同步，使用分析之菌株來源亦與 MLST 菌株來源相同。使用 UPGMA 分群系統，在類緣關係 90% 下可將菌株分成 14 群 (A- N) (圖一)。除了 P4, P5, P8, P11, P13 和 P16 發現不同部位之分離株不屬於同一群，其他大致上同一病人的分離株多歸於同一群，與不同部位、醫院病房與採檢日期並無相關。A, B, D, F, H, M 和 N 群有愛滋病患分佈其中，其中群 B, M 和 N 純粹以愛滋病患為主。而 PFGE 在國際地理的分佈上與 MLST 所分析之有一致性，此外在 mating type 的分佈上，67% 屬於 classII，其餘為 classI。classI 及 classII 在親原關係圖上可以被明顯的區分出來，對照 MLST 之地理分佈親原關係圖，以 classI 為主的群 I 及 J 其地理親緣上座落在前人所歸納之以歐洲為主的群落中，群 H 和 N 則屬於台灣區域，群 M 則為美日混合區；classII 則以群 A-G 和群 K 及 L 為主，其中群 D 屬於台灣所特有。而分群與抗藥性高低及感染部位無顯著關係。

## 2. *C. tropicalis*

利用 PFGE- *Bss*HII 分型分析 1999 年與 2002 年 TSARY 收集的 52 株從全省獲得的 *C. tropicalis* 分離株中，在 2002 年所採的，17 株分離株都無抗 fluconazole，1999 年中有 22 株是抗 fluconazole，13 株無抗 fluconazole，每株分離株通通來自不同病人。

此 52 株主要分成六群（表一），有 43 個 DNA 片段型，識別力為 0.985。此六群不論醫院或分離部位都是獨立無相關，但卻與 fluconazole 抗藥性有關係，在第二群 22 株中有 6 株是非抗藥性，16 株為抗藥性，佔了此次族群（sub-group）的 72.7%（圖二）。

台大醫院採樣中，從 12 位病人分離出 35 株分離株（表二），PFGE-*Bss*HII 分出 24 型（識別力是 0.946）。除了病人 P5 與 P8 外，同一病人的分離株幾乎都在同一群與一樣，而與分離部位與採樣時間無關（圖三）。

從網路文獻中獲得不同菌株酶切片段平均大小

(<http://www.neb.com/nebecomm/products/category1.asp?#2>)，因為無 *C. tropicalis* 資料，所以我們選擇與其相似的 *Saccharomyces cerevisiae* 作為選擇標準。有文獻指出 BssHII 是一個好的分型酵素，所以我們用 BssHII 酶切片段平均大小 (27000bp) 為指標，我們再另外選擇 11 種酵素與其比較。圖四為我們選用 *C. tropicalis* 標準菌株 ATCC13803，利用 PFGE 分型結果。由圖可以看出 *Bbv* CI、*Nhe* I、*Pac* I 和 *Pme* I 產生的片段大小大多集中在 33.3 kb 到 244.4 kb，較不易判讀；而 *Sbf* I 和 *Sfi* I 所產生的片段太少，不利於分型；*Eag* I 切不出來，無法分析；*Sma* I 與 *Bss* HII 切出來片段相似，但是分佈偏低分子量處，所以不予考慮；剩下 *Nae* I、*Rsr* II 與 *Sgr* AI 分佈廣泛，所以拿來跟 *Bss* HII 做比較。

採用國衛院 TSARY 1999 年所分離出的菌株作分析，利用 PFGE 分法分析 *Bss* HII、*Nae* I 和 *Rsr* II 結果 (表六)，顯示三種酵素都有高識別力 ( $D \geq 0.98$ )，其中 *Nae* I 有最高的識別力，其他兩個酵素雖識別力與 *Nae* I 相似，但價格卻比 *Nae* I 貴。而 *Sgr* AI 在實驗過程中發現其辨識度差而被排除 (資料沒顯示)。

另外在從台大醫院中選取 9 株 *C. tropicalis* 分離株來做實驗

(圖五)，清楚可見三種酵素做出來的結果，同一病人都分在同一群，表示此三中酵素有一定的準確度。

## (二) 利用 MLST 分型分析類緣性及與國際菌株之關係

### 1. *C. albicans*

定序分析 7 個持家基因(*AAT1a*, *ACCI*, *ADP1*, *MPIb*, *SYA1*, *VPS13*, *ZWF1b*)共計 2883bp 的結果共發現 147 個多型性變異。每一個基因座上出現 16-30 個不同等位基因(表三)。

來自同一個醫院 37 個 HIV 病人 101 個 strains，分離的年代包括 1999, 2001 及 2002，皆為低抗藥性菌株，其 Fluconazole、Amphotercin B 及 Voriconazole 均為 susceptible。病人中除了 P2, P6, P31 及 P34 外均給予 HARRT 治療，而 P6, P7, P9, P15, P16, P18, P23 有 candidiasis 感染。(圖六)經由 UPGMA 所顯示之類緣關係，相關係數皆在 85.5%以上，再依 Bootstrap 值 70 以上之標準區分之結果共分為 14 個 Group，不同的分離年代並無個別群聚之現象。第一個 Group 中有不同年代有相同的 DST type，P10-3 (1999), P19-1~P19-3 (2001) 及 P26-1 (2002) 均為 DST695，第十四個 Group 的 P7-2 (1999), P17-2 (2001) 及

P31-1, P31-3 (2002) 有相同的 DST type 但為新的 DST type。就 MLT type 及 ABC type 而言，不同 ABC type 有分群之現象，Group3, 8, 11, 14 全為 Het A type，Group1, 4~7, 12~13 全為 Het B type，Group10 全為 a A type。個型之比例 A type(44.6%)、B type (44.6%) 及 C type (10.8%)。圖七 MST 區分為 12 個 Group，其分群之結果與樹狀圖之結果大致吻合，僅有少數差異。例如 MST 之 Group2 在樹狀圖被拆分為 Group 3&11。來自相同病人的不同菌株，大多數也具有相同的 DSTs，僅有少數病人有些許的差異 (1-2 個 alleles 的不同)。

經由 UPGMA 所顯示之類緣關係，相關係數皆在 82.5% 以上，當中的高 Fluconazole 抗藥性菌株 (TW5、TW9 及 TW10) 無集中於一群。19 株日本分離之菌株比對共可找出 5 株對應之 DST type (JP2 及 JP3 為 DST574，而 JP5、JP8 及 JP15 對應分別為 DST66、DST540 及 DST69) (圖八)。MST 可分成 15 個 Group，其中 Group1 包含日本及歐、美菌株，Group2 包含台灣及日本之菌株，其餘日本的菌株分散於各次要之 Group 中 (圖九)。ABC type 及 serotype 全為 A type，ALTS 大多為



第 3 type，僅有 JP7 及 JP14 為第 7 type，其結果與台灣分離的菌株類似。

27 株自奈及利亞分離之菌株比對共可找出 7 株對應之 DST type (NE-36 及 NE-46 為 DST254 而 NE-1, NE-17, NE-29, NE-32 及 NE-40 對應分別為 DST69、DST79、DST437、DST611 及 DST170) (圖十) MST 可分成 10 個 Group，其中 Group1 除了 UK7、UK10 外全是奈及利亞分離株，共有 11 株菌(佔 40%)，其餘奈及利亞的菌株分散於各次要之 Group 中，且 NE-32 與其他奈及利亞菌株關係最遠 (圖十一)。台灣菌株的所有 DST 與網路上 *C. albicans* DST 資料庫 (test1.mlst.net) 比對結果與日本及奈及利亞比較可發現新的 DST type 比例較高。

比較台灣與國際的菌株其 ABC 分型，結果顯示台灣的菌株 B type 比例 (49.5%) 相較於世界各地明顯地偏高，比同樣位於亞洲的日本 (21%) 及印度 (7.3%) 亦為偏高。就 A type 的結果觀之，英國 (67.6%)、美國 (85.2%)、印度 (70.9%) 及非洲 (61.5%) 的比例皆遠超過台灣 (35.7%) 的比例 (圖十二)。

## 2. *C. glabrata*

本次 *C. glabrata* 菌株共分析 131 株包含 1996-1997 年國內臨床菌株 57 株，2001-2002 年國內愛滋病患 (YH 編號) 24 株並與國外歸納之菌株型別 29 型 CG1-CG36 (CG5, CG9, CG31-CG35 資料尚未公開)作親緣關係之比較。國內菌株經 MLST 分析，主要的 Sequence type 可分為 18 型，其中 6 型(ST 3, 7, 10, 15, 19 和 26) 與目前國外資料庫 (<http://cglabrata.mlst.net/sql/sthtml.asp>)所公布的 29 型中較為相似，其他 12 型則為台灣所發現的型別。對於分析總長度為 3,345bp 所連結之 6 個基因型分別為 *FKS*, 7 型; *LEU2*, 8 型; *NMT1*, 9 型; *TRP1*, 9 型; *UGP1*, 4 型; *URA3*, 8 型(表四)。在個別基因其變異率分別為 *FKS*, 1.2%; *LEU2*, 1.8%; *NMT1*, 2.3%; *TRP1*, 2.6%; *UGP1*, 0.9%; *URA3*, 1.7%(表四)，對應於總共 1,111 個氨基酸的變異率上，造成氨基酸的改變僅佔 1.4%。根據不同 Sequence Type，使用 UPGMA 分群系統，在類緣關係下，依據分離菌株，可在最低 99.8%的相似度及 bootstrap >78%下分成 8 群 (groupI-VIII) (圖十三) 一般同一個病患之分離株在劃分上屬於同一群，但與 PFGE 比較共同發現 P4, P5, P8, P11, P13 和 P16 之不同部位分離株分群上有跨區

域的現象(10.3%)。由學者<sup>120</sup>針對從世界不同地理位置所收集之 *C. glabrata* 以 MLST 所做的型別調查，總共可分為 7 大群 (group I-VII)，在亞洲方面以日本菌株為代表（目前亞洲只有日本參與資料庫的建立）主要分佈在 group III 和 IV 中，而 group III 則是日本與美洲共同分佈的群聚。台灣目前所收集分析之菌株經與國際之基因資料庫比對 (<http://www.mlst.net/>)，發現 group IV, V 和 VI (73%) 與美日共同群落及日本為主之群落有較近的親緣性，另外(32%) group VIII 則座落在以歐洲菌株為主的地理區。在八群中，group II, III, VII 獨立於所發表之地理區外，對應之 ST 為 T1, 2 和 9-12；而 T3-8 則在分群中和已知 ST 屬於同一地理區在國內愛滋病患分離株的分析中發現 P31, P32, P34, P35 屬於台灣區域，而 P28, P29, P30, P33, P36, P37 則與美洲和日本親緣關係較近，而目前並未發現分類上屬於歐洲區域的 HIV 分離株。經由 Minimum Spanning Trees 系統分析國內外分離株之間的差異以更瞭解國內 *C. glabrata* 與國外之交互關係(圖十四)。在 mating type 的分佈，group I, II, IV-VI 以 class II 為主，其中 group II 地理分佈與 ST 屬於台灣特有；另一 group III, VII 和 VIII 則以 class I 為主，其中 group III, VII 地理分佈與 ST 屬於台灣特有。而分群與抗藥性高低及感染部位無

顯著關係。整體而言 MLST 分離株的分佈與 PFGE 所呈現的大致相同，且與地理的分佈具有相關性 ( $P < 0.05$ )。

### 3. *C. tropicalis*

國衛院的 52 株利用 6 個序列片段分出 33 種 DST 型 (表一)。其分離部位分別是尿液 26 株有 18 個 DST 型，唾液 14 株有 14 個 DST 型，血液 10 株有 9 個 DST 型。而每對引子所夾出來的型態從多到少分別是：*SAPT4* 有 15 型；*MDR1* 有 13 型；*XYR1* 有 12 型；*ZWF1a* 有 5 型；*ICL1* 與 *SAPT2* 分別有 3 型。其基因變異位置數量由多到少分別是：*XYR1* 有 25 個；*MDR1* 有 15 個；*SAPT4* 有 12 個；*ZWF1a* 有 10 個；*SAPT2* 有 7 個和 *ICL1* 有 4 個。在 MLST 實驗中的六對引子中，*SAPT2* 顯示了最高的分群效率，3 個變異位置有 7 個基因型態，比例為 2.33%；而 *SAPT4* 則是效果最差的，12 個變異位置有 15 個基因型態，比例為 0.80%。

35 分離株利用 MLST 的六對引子分出 19 個 DST 型 (如表二)，其識別力為 0.903。其中有 2 株分離株來自肛門拭子，有 2 個 DST 型；1 株分離株來自鼻咽拭子，有 1 個 DST 型；11 株分離株來自尿液，有 8 個 DST 型；7 株分離株來自唾液，有 4 個 DST 型；6 株分離株來自直腸拭子，有 5 個 DST 型；1 株

分離株來自糞便，有 1 個 DST 型；2 株分離株來自咽喉拭子，有 2 個 DST 型；5 株分離株來自主靜脈管，有 2 個 DST 型。在 MLST 的六對引子片段中，*SAPT2* 有最高的分群效率，2 個變異點分出 5 個基因型；*SAPT4* 分型效率最低，13 個變異點分出 8 個基因型。

利用 e-Burst 方法將 MLST 結果分成 3 型（圖十五）。而與 Tavanti 等人所發表文獻<sup>121</sup> 中菌株比較，發現我們的第一群與其來自美國與英國的第二群相近，而我們的第二群有 20 株，其中有 14 株對 fluconazole 有抗藥性，佔了 70%。在第二群中的 20 株只分出了四個 DST 型，其中 DST98 有兩株、DST137 有一株、DST140 有 15 株及 DST144 有 2 株，特別值得注意的是，第二群中抗藥性菌株一共有 14 株，而在 DST140 中就佔了 11 株，以及在 DST140 中來自同一家醫院（N2）的有六株，包含了 1 株沒有抗藥性跟 5 株有抗藥性，且六株來源來自尿液的分離就佔了 5 株（83.3%）。

在台大醫院 35 株中分出 19DST 型（圖十六），且其與 Tavanti 等人所做出國外 87DST 型做比較，台灣的 19 個 DST 型中，除 DST 134、175 和 178 與 Tavanti 等人的第二群有相近外，其他都不在對方所分的三大類中。

### (三)RAPD

*Candida albicans* 使用 OPE-03 與 OPE-04 等兩條 primer 比較不同之菌株 pattern 之差異，其 RAPD 結果詳見圖十七。OPE-03 與 OPE-04 各有 3 個不同之差異位置，目前已完成之結果顯示，OPE-03 第二個差異位置經定序比對之結果為假設性蛋白(hypothetical protein CaO19\_13188 或 CaO19\_5765)；另外 OPE-04 第三個差異位置經定序比對之結果為假設性蛋白(hypothetical protein CaO19\_2703)。

*C. glabrata* 引子測試各個引子後，結果顯示 EDP4- RAPD，對於愛滋與非愛滋族群，能夠產生一定程度的區分力(圖十八)。在愛滋族群 RAPD 圖譜中，發現小於 700bp 的 DNA 產物明顯缺乏或不如非愛滋族群。另外屬於 mating type I 且達 fluconazole (MIC 128 mg/l)抗藥性之分離株 P11-1 和 P22，在圖譜中約 280bp 的位置出現特異性之 DNA 片段(圖十八，箭頭所示)。利用引子 NS-2 所呈現之 RADP 圖譜中，對於 ST3 (地理分佈上屬於歐洲)產生一特異性 DNA 片段且在 850bp 中則缺乏一般性 DNA 片段(箭頭所示)，而在愛滋與非愛滋族群以及抗藥性中並未發現任何的區分力(圖十九)。

*C. tropicalis* 引子測試結果顯示對 fluconazole 具抗藥性及感受性之分離株間，也有若干出現特異性之 DNA 片段(圖二十)。

#### (四) 利用微珠多重陣列檢測平台鑑定 9 種臨床重要病原真菌

表七顯示設計之探針利用微珠陣列測試鑑定標準菌珠之特異性甚高。進一步檢測臨床菌珠、模擬 Spiked 檢體及菌血症檢體，三種檢體也都得到很好的特異性(表八)。以序列稀釋之菌株 DNA 測試檢測靈敏度，靈敏度可達 1-5pg，以 spiked 的血液測試，靈敏度則可達 100 顆/c.c.。

#### 四、討論:

侵襲性念珠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。近年來，病原菌隨著國際旅行、候鳥的遷徙或全球食物供應鏈，甚且生物恐怖蓄意釋放傳播的案例日益增加，如SARS，禽流感，MRSA, 和食因性病原如*E. coli*與*C. jejuni*<sup>122</sup>等，開發分型技術，並建立廣泛具代表性之資料庫，有助於瞭解病原間之類緣性及分子流行病學，進而釐清病原之傳播途徑及跨國傳播之情形，有助於國際疫情監測及共同防治。美國CDC建立以PFGE技術的PulseNet於食物中毒流病調查上之應用情形，示範了PFGE技術作為食因性病原追溯感染源頭及發揮預警效果，避免疫情擴大之實例探討。台灣疾管局邱乾順研究員建立之PulseNet-Taiwan PFGE網絡亦成功追蹤*Shigella sonnei*在偏遠地區隨交通路徑傳播擴散之情形，並得以協助啟動更精確的疫調及防治作為。

非 *C. albicans* 的感染如 *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* 和 *C. lusitaniae* 已經顯著增加。其中 *C. tropicalis* 和 *C. glabrata* 往往高居二或三位。而且，非 *C. albicans* 的菌種往往比 *C. albicans* 對 fluconazole 抗藥性及致死率更高。本研究除持續探討 *C. albicans* 分子流行病學外，亦擴充探討其他非 *C. albicans* 的 *Candida spp.* 之分子流行病學。



在泰國的 AIDS 患者研究顯示共同感染新型隱球菌患者感染之 HIV 亞型多為 CRF01\_AE (舊稱亞型 E)。

*Candida spp.* 的感染流行特性依種別而異，在 *C. albicans* 病人本身菌株的移生菌株被認為是感染的可能來源，例如來自口咽、腸胃道、生殖泌尿道等部位移生的病原。製作人工血管時植入的中央靜脈導管 (central venous catheters, CVCs) 或長時間全靜脈營養 (total parenteral nutrition, TPN) 注射也常是 *C. albicans* 血流感染的來源。曾見報導 *C. albicans* 在伴侶及家族成員間分離的菌株類源性較近，顯現其間平行傳播之可能性。外源性感染如醫護人員的手部攜帶，工作檯面、器械、管路污染等，亦屢見報導。

台灣所分離 *C. albicans* 菌株的 DST 與英國及美國的菌株利用 UPGMA 和 minimal spanning tree 分析比對，結果顯示就台灣國內分離菌株的 DNA type 具為病人專屬，與 ABC type，愛滋族群與否、分離年代有關；而與分離部位，醫院來源及 fluconazole 抗藥性無關，這與前人的研究報告相當一致。但就較廣大地理區域而言，DST type 與國別則具相關性。台灣的臨床分離株，僅少數與歐美的主要菌群具類緣相關性。我們與日本千葉大學交換來的 20 株 *C. albicans* 菌株，分析結果顯示我們的菌株與日本類緣性較近。基於台日地理上鄰近且

二國互動頻繁，這也是可預期的結果。

*C. glabrata* 的PFGE核型分型初步分析與醫院別、fluconazole MIC、院內感染與否較無關性。相同病人的菌株其關聯性高，如六名HIV病人和三名ICU病人的菌株。源自HIV病人的菌株似乎也有聚集成群的傾向。*C. glabrata*的染色體核型分型與MLST方法具一致性，相同病人的菌株其關聯性高。與我們*C. albicans*的結果相同的是，由同一HIV病人長期分離菌株感受性的改變，但其型別類緣性仍十分近似，顯現可能由於內源性菌株產生突變而非抗藥性菌株在病人間的平行傳播。*C. glabrata*的染色體分析顯示，在1.4~2.2Mbp間的第12及13條染色體或稱L及M染色體因為內含rDNA重複序列，故會因重複序列數目之多寡，分子量有極大之變異性。但目前看來，此變異性並不影響分型之準確性，故分析時不需要加以剔除。

瞭解抗藥性菌株基因型的變化可能有助於抗真菌的治療療法，我們針對*C. albicans*的研究，清楚地顯示每個菌株的DNA型別是病人特有的，與個別病人有關而和院內感染與否，分離部位，醫院來源，並無引起院內感染能力或血流感染的特別基因型占優勢。型別與抗藥性之間並無相關性這這與前人的研究相當一致<sup>123,124</sup>。可能*C. albicans*對fluconazole藥物敏感性的變化是由於染色體DNA相關抗藥性基因

的微小變化有關<sup>125</sup>。若想偵測突變、缺失或者插入是否與抗藥性有關，基因定序分析應該比基因指紋法更適合<sup>126</sup>。反之，*C. tropicalis* 對 fluconazole 感受株和抗藥株(MIC>64µg/ml)間及侵襲感染株和移生株間屬同類緣株系。分子分型方法可反映出 *C. tropicalis* 抗藥性造成的染色體改變。我們回溯分析某些醫院菌株疑似曾發生過院內感染的現象。然而代表不同地域代表性不同醫院基因型廣泛分散，顯現基因型與醫院別兩者間並無相關性，而且不同分離部位分離株基因型也分散。顯示 *C. tropicalis* 的 DNA 型別與個別病人、HIV 感染與否、對 fluconazole 的抗藥性有關而和院內感染與否、分離部位、醫院來源等無關。

以 PFGE 為調查工具，韓國 *C. tropicalis* 的研究報告中指出，在兩間醫院 *C. tropicalis* 菌株類緣性低，屬於個別獨立感染事件。而在台大醫院發表文章發現在 *C. albicans*、*C. glabrata* 及 *C. parasilosis* 菌株 PFGE 核型(EK)分型結果，證明主要在同一病人不同部位有相同的片段組成，但卻在 *C. tropicalis* 無明顯此特徵，利用台大醫院提供的 *C. tropicalis* 菌株與國衛院的比對樹圖發現，與國衛院一樣主要分成兩群，或許同一病人卻非在同一族群內，是因為受抗藥性影響。將進一步對台大醫院的 75 株分離株做 fluconazole 的抗藥性測驗，看是否與其有關。雖然圖七大致來看，分離來源、是否為院內感染及採樣醫

院，其實分佈相當廣泛，但由 W6 與 N8 的分群推測，其實菌株還是有區域性的分佈。而抗藥性菌株大多座落在第一群，表示菌株有受抗藥性影響。而在第一群中 W6 相似度為 100% 四株的分離株，有三株為院內感染，一株不是；而第二群中 N8 相似度為 100% 三株的分離株，有兩株為非院內感染，另一株為院內感染，此外，分離來源分佈亦相當廣泛，所以推測基因型別與醫院來源有關，而是否為院內感染則有待回溯探討。

PFGE 相關方法主要在於在區別全基因體 DNA 的指紋片段，主要原理乃基於個別酶切多型、易位，或不包含 rDNA 染色體的重組或 rDNA 作用子(cistron)非互補的重組<sup>127</sup>的結果。PFGE 方法需有嚴格的標準化程序，以保證實驗室間比對的品質及再現性。MLST 分型方法的原理是基於 *Candida* 的持家基因突變或重組產生變異，可據多個等位基因樣式組合以定義每株菌株的基因型，並比較菌株間之類緣關係及菌株間核苷酸置換改變的情形<sup>128,129</sup>。MLST 的資料明確並利於儲存在中心資料庫，並可很方便地經由網路交換分子型別資訊，有利於全球監測資料之建立。如 MLST 已被用於追蹤 MRSA 病原獲致抗藥性和跨洲傳播演化的歷程<sup>130,131</sup>。

我們的 *C. albicans* MLST 分型結果顯示，某些來自同一病人具

相同 PFGE-*Bss*HII 基因型的菌株可再分為不同的 MLST 的 DST，具有 1-2 個等位基因之差異。在 *C. albicans* 上，MLST 分型方法確實可追蹤菌株在同一病人上的微演化。*C. albicans* 分型實驗結果顯示，基因型別為病人專屬，且與 ABC 型別及分離年代有關，而與分離部位、醫院來源或 fluconazole 抗藥性無關。ABC 型別之分佈依不同地理區有異，高、英、美、非洲、印度等國菌株以 A 型居多(高達 67~85%)，台日二國 A 型則僅分佔 42 及 51%，前人研究顯示 A 型對 flucytocine 具有抗藥性的比例較高。台灣最特別的是 B 型比例(46%)較諸其他國家(僅 7~22%)高。

在目前 *C. glabrata* 菌株的 MLST 分型分析中，發現國內的分離株分佈大多仍以亞洲（較親近日本）為主，依據學者的分群與我們 MLST 與 PFGE 發現，ST7，10，15，26 以及 T3-8 可能為亞洲主要 *C. glabrata* 的 ST 型別，另外我國也包含歐洲（37%）與美國（與日本相重疊）相關之型別，不像日本較集中，推測此為經由人類活動所造成的，尤其不當人類接觸，如性行為，可能會造成除院內感染以外的傳播，因此積極建立並監測我國 *C. glabrata* 基因體資料庫有其必要性，經由 ST 型別的變化瞭解大區域的傳播途徑，提供在流行病學上對於病原傳播模式及防治策略擬定之參考依據。在個別基因變異度上，基因 *NMT1*，*TRP1* 在六個基因中為較高與前人之研究符合，而

核苷酸變異點位置對於氨基酸的改變影響不大(1.4%)，因為 MLST 所分析的基因主要以持家基因(housekeeping genes)主，因此若產生足以改變氨基酸性質可能需經過一段長時間的微演化(microevolution)，故長期監測變異點對菌株的影響(如，生態或病原性的改變等)是一個可以反應人，時和地理變化有效評估點。經由 MLST 國內菌株分型結果，在 18 型中有 12 型目前屬於台灣本土型，將來可以藉由親外國型別與本土型別之間個數的消長，並利用時間作為依據來判斷流行傳播趨勢(如境外移入，演化速率等)。

除此之外抗藥性的變化也是值得關注，不過整體而言在 PFGE 及 MLST 分群中並無發現與抗藥性關連性，主要因為國內菌株的抗藥性並不多，fluconazole (MIC,  $\geq 64$  mg/l, 8.8%)，voriconazole (MIC,  $\geq 4$  mg/l, 1.0%)，amphotericin B (MIC,  $>1$  mg/l, 0)因此無顯著性差異，但隨著人時地物的遷移，抗藥性菌株的興起是一種潛在性的危機，唯有不斷監測用藥的行為才是預防之道。雖然在本研究中只發現零星的抗藥性菌株，但是在 P06-1 的分離株上卻顯示同時抗同屬 azole 藥物的抗藥性，fluconazole (MIC, =128 mg/l)，voriconazole (MIC, =8 mg/l)，同期也發現有二株也具有雙重抗藥性 fluconazole (MIC, =128 mg/l)，voriconazole (MIC, =4 mg/l) (數據未公布)，這是一個警訊，可能形成醫院中優勢菌株，故需清查近期內的 *C. glabrata* 已瞭解是否有普遍化

的趨勢。此外我們在關注於愛滋病患上的變異性中發現，其分離株對於 amphotericin B MIC 值上雖未達抗性標準(MIC,  $\geq 1$  mg/l)，但確有高比例（75%）對照非愛滋病患（47%）(P,  $< 0.05$ )，達到抗性的臨界值(MIC, =1 mg/l)。其主要原因為 amphotericin B 在一般愛滋病患預防伺機性真菌感染時所使用的首選。故在用藥上可能需要考慮替代可行性，尤其愛滋病患數正節節升高的當下，勢必是下一個帶動台灣感染族群菌株變異的源頭之一。

在綜合二種類緣關係比較中發現 6 個個體在不同部位的分離株產生較大的歧異度，推測可能原因為：1. 複合感染，感染過程中因為天擇的關係（如：免疫力反應，營養的改變，醫療行為等）造成不適者淘汰；2. 同一病患上的單一菌相為適應環境而進行長時間微演化(microevolution)或短時間微改變(microvariation)造成分支形成不同菌株。而在愛滋病患所感染之 *C. glabrata* 的分析中發現與國際上已知分類之型別中，除了歐洲外屬於美日皆有的型別，而只有 P32 不管在 MLST 還是 PFGE 分群中，皆屬於獨立一群，其他則與常人所感染之菌株無任何差別，而這獨樹一格則需分析更多的病患才能有顯著上的意義。

Mating type 目前在 *C. glabrata* 中發現 classI 為歐洲主要型別。

而在台灣以 classII 為主 (67%)，無發現 mating type 與臨床特性的關連。不過在 P33 與 P35 則應證同一菌株在於一個感染點會進行微演化 (microevolution)，造成 mating type 的轉換，但其意義則需進一步研究。

在傳播途徑上依據地理區及群落的分佈推測一部份屬於本土 *C. glabrata* ；一部份則是由外傳入，菌相的分佈多樣，這是值的留意。由於 *C. glabrata* 不管在國際上還是國內，資料的收集已逐步累積中，因此國內也必須同步建立相關分子資訊並與國際交流以獲得更多的流行病學資訊，而本計畫至目前對 *C. glabrata* 的調查已提供一個良好的基礎。

欲探討 *C. glabrata* PFGE-BssHII 分型法與 MLST 分型之鑑別程度，計算得：PFGE-BssHII，0.99；MLST，0.85，認為這是因應不同的需求採用不同方法的結果。在 *C. glabrata* 目前的分類而言，MLST 適用於大範圍區域的調查牽涉到微演化 (microevolution)；PFGE 因著重全基因體不同限制酶切位與 DNA 長度的變化，因此在針對微變化 (microvariation) 較為敏銳適合於小區域的傳染途徑調查。對照於 *C. albicans* 分型比較結果恰好相反 (MLST，優於 PFGE)。可能原因為 *C. glabrata* 的染色體為單倍體 (haploid) 而 *C. albicans* 為雙倍體 (diploid)。

在 *C. tropicalis* 實驗中，利用 MLST 與用 PFGE- BssHII 方法比



較國衛院 52 株分離菌株，發現此兩個方法有高的相關性。其中 MLST 分出 33DSTs，識別力 (discriminatory index, DI) 是 0.916，而 PFGE-*Bss*HII 有 43 DNA 片段型，識別力比 MLST 較高一點，為 0.985。

52 株 *C. tropicalis* 分離株利用 PFGE 方法分成六群 (圖二)。此六群不論醫院或分離部位都是獨立無相關，但卻與 fluconazole 抗藥性有關係，在第二群 22 株中有 6 株是非抗藥性，16 株為抗藥性，佔了此次族群 (sub-group) 的 72.7%。

52 株利用 MLST 分型法分出 33 種 DST 型，且用此方法比較台灣與其他國家的分離菌株，發現除第一群與國外的第二群 (英國與美國) 較相似外，其他兩群與國外都不一樣。而且在我們的第二群中，抗 fluconazole 的菌株比例高，佔了 61.9%。

在 *C. albicans* 實驗<sup>132</sup> 並無中發現分型與分離部位來源、醫院或者是對 fluconazole 的抗藥性有關，而在國衛院採集的 *C. tropicalis* 中卻發現，分型一樣與分離部位來源、醫院無關，但是卻與 fluconazole 的抗藥性有關。在 1999 年從 10 間醫院收集到的 52 株菌株中，有 22 株在 48 小時候，其 fluconazole 的 MIC 值  $\geq 64$  mg/l，主要分佈屬於 DST 140 型，而其中一間醫院 N2 似乎有院感爆發的情形，也有可能因此導致台灣在 1999 年時菌株傳播擴散。

而在台大醫院的 *C. tropicalis* 實驗中，比較 35 株 *C. tropicalis* 的 PFGE-BssHII 與 MLST，結果發現 MLST 分出 19 型(識別力是 0.903)，而 PFGE-BssHII 則分出 24 型(識別力是 0.946)。此兩方法所做出來的結果有高相似性，除了病人 P5 與 P8 外(見圖三與圖十六)。

在 35 株 *C. tropicalis* 中有，沒有任何一株是抗 fluconazole，只有一株來自病人 P1 的 DOH86g091，是抗 flucytosine 菌株，但卻不在 Tavanti 等人的實驗中<sup>121</sup> 的抗 flucytosine 菌群中，但作者也有說因菌株太少，所以不能概括全部，因此我們唯一一株抗 flucytosine 不在其中是正常的。

此結論發現 35 株 ICU 病人分離株的 PFGE-BssHII 識別力 ( $D \geq 0.946$ ) 比 MLST 的識別力 ( $D \geq 0.903$ ) 高(表二)。而有趣的是，我們發現不論是 PFGE-Bss HII 或者 MLST 分型結果，除了病人 P5 與 P8 外，都與病人有高度相關性，而與分離時間、部位來源無關(見圖三與圖十六)。實驗結果發現此兩方法結果有高相關性，而在 MLST 無法分型出來的，PFGE-BssHII 可以進一步加以區分。

不論國衛院或者是台大醫院，所做出來的結果都是，SAPT2 有最高的分群效率，SAPT4 分型效率最低。SAPT2 表現了最高的分型效率，而 Tavanti 等人的實驗中<sup>121</sup> 卻顯示為最低的效率，或許這就是我

們所分離出 52 個 DST 型中有 51 個都是目前台灣獨有的原因。在國衛院與台大醫院 MLST 做出來結果，發現台灣的菌株與 Tavanti 等人的實驗中<sup>121</sup>，屬於美國與英國的菌株的第二群有相似或者無相關。

而不同酶切結果證明了，*Bss* HIII、*Nae* I 和 *Rsr* II 都是有利於 *C. tropicalis* 的 PFGE 分型，可被當作標準分型的酵素。考慮酵素花費、識別力跟酶切片段範圍，*Nae* I 的確是比 *Bss* HIII 和 *Rsr* II 更適合當 PFGE 的標準酵素。而且據我們所知，尚未有研究利用 *Nae* I 來做 PFGE 的研究分型。所以我們建議可以選擇 *Nae* I 當作 PFGE 分析 *C. tropicalis* 的第一分型酵素，而 *Bss*HIII 作為第二分型酵素。

依據我們針對 *C. albicans* 酵母菌的研究結果，MLST 分型方法較諸 PFGE-限制酶切分型方法有較高之鑑別能力。多數的細菌分型研究顯示，PFGE-限制酶切法較諸 MLST 法有較高之鑑別能力。這可能因為 *C. albicans* 的基因體較大 (是雙倍體約為 16 Mb)，約為一般細菌基因體的 4-8 倍 (格蘭陽性細菌約 4.5 Mb, 格蘭陰性細菌約 2.2 Mb)。PFGE 的最佳解析度約在某特定分子量範圍及片段數量(例如 30-35 個片段)。這可能使得 PFGE 對 *C. albicans* 分型較不利。反之，*C. albicans* 雙倍體的特性使得 MLST 變異組合更形增加。有趣的是，這在 *C. glabrata* 的 PFGE-*Bss*HIII 分型法較諸 MLST 分型之鑑別

力高上又得到印證，因為 *C. glabrata* 的染色體為單倍體(haploid)。不過，*C. tropicalis* 為雙倍體，在 *C. tropicalis* 的分型中，不論是國衛院或者是台大醫院菌珠，發現 PFGE-BssHII 都比 MLST 識別力較高，但 MLST 可以直接提供標準化及方便的優點，所以 PFGE-Bss HII 或 MLST 都是很好的分型方法。

以核酸定序為原理的分型方法如 MLST 的優點為資訊明確，比對簡易，在追蹤病原微演化上十分有利，更符合標準化及國際資訊交換之未來趨勢，未來隨著更低成本更高通量 DNA 定序技術之出現，將可獲得全球的共識且利於普及<sup>120</sup>。近年來，本研究針對國內數種重要念珠菌 *C. albicans*、*C. tropicalis* 及 *C. glabrata* 的 MLST 資料，陸續在國際期刊上發表後，將對於國際上念珠菌全球流行病學之探討有所助益。這些研究資料均是台灣甚至亞洲首度報導。目前資料顯示台灣的念珠菌株具有高度多型性且多半不歸屬於歐美已發表的主要菌群，由於亞洲資料十分有限，目前初步顯示台灣與日本菌株類緣性較相關。隨著低成本、高通量定序方法的出現，MLST 的成本及效率可再大幅提昇。未來 MLST 若與微陣列等高通量、快速偵測平台結合，如 MLST-like array<sup>133</sup>、MLST 與 MALDI-TOF 或最近發展相當有潛力的 MLST-pyrosequencing 結合之發展可望進一步擴大化分型的通量<sup>134,135</sup>。

成功發展出新穎微珠多重快速檢驗平台，能單管快速鑑定臨床常見的 *Candida albicans*、*C. guilliermondii*、*C. lusitaniae*、*C. glabrata*、*C. tropicalis*、*C. glabrata*、*C. parapsilosis*、*C. krusei* 和 *Cryptococcus neoformans* 九種病原酵母菌。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 1pg，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。由於臨床上多重病原混合感染可達 5-22%<sup>136,137</sup>，如 HIV 感染、性病感染、重病孱弱免疫低下之患者，故單管多重檢測若能應用於實際臨床檢體之檢測，較諸傳統培養及生化鑑定方法更能反映臨床感染之現況。面對國際輸入及新興病原之不斷崛起，高效率之快速多重檢測方法已為未來趨勢，在特殊病原細菌方面我們也發展成功微珠多重快速核酸檢驗針對砂眼披衣菌分子分型及鮑式不動桿菌種別區分之研究成果，目前陸續投寄國際期刊。未來可擴大此多重檢測平台技術廣納院內感染及性病之真菌及細菌病原。蛋白質為主的抗原/抗體平台也在建置設計中。待成果發表後亦將不吝將實驗流程細節及經驗在國內加以推廣分享

利用 RAPD 圖譜希望找出不同分離株間在流行病學或基因體學中相對的特異性，並分析其分子結構，以作為區分依據的分子標誌或用於追蹤流行途徑。*Candida albicans* 使用 OPE-03 與 OPE-04 等兩條 primer 比較不同之菌株 pattern 之差異，目前已完成之結果顯示，OPE-03 第二個差異位置經定序比對之結果為假設性蛋白(hypothetical protein CaO19\_13188 或 CaO19\_5765)；另外 OPE-04 第三個差異位置經定序比對之結果為假設性蛋白(hypothetical protein CaO19\_2703)。將進一步設計 PCR 引子，確認此基因片段之鑑別能力。*Candida glabrata* 在各個引子中，EDP4- RAPD，對於愛滋與非愛滋族群，能夠產生一定程度的區分力。在愛滋族群 RAPD 圖譜中，發現小於 700bp 的 DNA 產物明顯缺乏或不如非愛滋族群。另外屬於 mating type I 且達 fluconazole (MIC 128 mg/l)抗藥性之分離株 P11-1 和 P22，在圖譜中約 280bp 的位置出現特異性之 DNA 片段。利用引子 NS-2 所呈現之 RAPD 圖譜中，對於 ST3 (地理分佈上屬於歐洲)產生一特異性 DNA 片段且在 850bp 中則缺乏一般性 DNA 片段，而在愛滋與非愛滋族群以及抗藥性中並未發現任何的區分力。目前所測試的引子中，EDP4 所呈現的族群鑑別性與可能和抗藥性相關的特異性，均是一個值得深入研究的目標，後續利用基因定序來確定其差異，並用於抗藥性與愛滋族群的監測，以及調查 *C. glabrata* 在愛滋與非愛滋

族群中遺傳物質的改變是否與病患免疫力或其他可能行為，如醫療行為，性行為，毒品接觸有關來與其他疾病做全面性對照。而引子 NS-2 則顯示有可能在 MLST 分群下屬於歐洲地理之菌株有特異性，此一類分離株目前占所調查總數約 22.4%，是一個不可忽視的族群，因此藉由探討其基因結構來開發快速的檢測方法，達到快速追蹤病患之生活史，或許也可快速鑑別出地理來源。 *C. tropicalis* 引子測試結果顯示對 fluconazole 具抗藥性及感受性之分離株間，也有若干出現特異性之 DNA 片段。這些片段均將進一步選殖定序，資料庫比對瞭解基因特性，並據以設計鑑別性 PCR。

## 五、結論與建議

侵襲性念珠菌感染持續成為公衛上的隱憂。快速精確檢驗及分子流行病學之研究，有助於釐清病原真菌傳播特性，針對不同侵襲致病力、抗藥性樣式及流行病學特性之菌株進行分子層次特異性之探討，有助於瞭解菌株不同表現型及地理趨適之成因，進而研擬更精確之防治對策。我們持續建立可國際接軌之全國性分型資料庫平台，可成為國內、國際型別交流比較之參考。我們將持續積極於國內推廣這些標準化技術，提供分型服務及技術支援，協助相關醫療單位釐清院感、抗藥性及治療等問題。我們持續進行國際合作，更將研究成果發表於國際SCI期刊，與國際社會分享台灣經驗。

具體建議有三：

1. 擴大應用快速多重流式微珠陣列鑑定方法於院內感染及性病真菌及細菌病原之鑑定。
2. 以疾管局為中心，建立主動監測擴大收集菌株及流病資料之網絡、型別基因資料庫平台，並與國際進行型別資訊交換機制。
3. 由疾管局主動提供分型服務，教育訓練及技術推廣。



## References

1. Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, et al: The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-albicans *Candida* isolates from blood. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:679-82.
2. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, et al: Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 2004;42:1519-27.
3. 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. *Clin Infect Dis* 2004;39:309-17.
4. Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, et al: The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* 1999;29:1164-70.
5. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al: Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003;37:1172-7.
6. Schneider E, Hajjeh RA, Spiegel RA, et al: A coccidioidomycosis outbreak following the Northridge, Calif, earthquake. *JAMA* 1997;277:904-8.
7. Ponton J, Ruchel R, Clemons KV, et al: Emerging pathogens. *Med Mycol* 2000;38 Suppl 1:225-36.
8. 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.
9. 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.
10. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, et al: Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis* 2001;33:641-7.
11. Lamagni TL, Evans BG, Shigenatsu M et al. Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales(1990-9). *Epidemiol.Infect* 126, 397-414. 2001.
12. Chen YC, Chang SC, Luh KT, et al: Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:71-7.

13. 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.
14. Hung CC, Chen YC, Chang SC, et al: Nosocomial candidemia in a university hospital in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1996;95:19-28.
15. Huang YC, Lin TY, Leu HS, et al: Yeast carriage on hands of hospital personnel working in intensive care units. *J Hosp Infect* 1998;39:47-51.
16. Huang YC, Lin TY, Peng HL, et al: Outbreak of *Candida albicans* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Scand J Infect Dis* 1998;30:137-42.
17. Huang YC, Lin TY, Leu HS, et al: Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. *Infection* 1999;27:97-102.
18. Sheng WH, Wang JT, Lu DC, et al: Comparative impact of hospital-acquired infections on medical costs, length of hospital stay and outcome between community hospitals and medical centres. *J Hosp Infect* 2005;59:205-14.
19. Rentz AM, Halpern MT, Bowden R: The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clin Infect Dis* 1998;27:781-8.
20. Park BJ, Sigel K, Vaz V, et al: An epidemic of coccidioidomycosis in Arizona associated with climatic changes, 1998-2001. *J Infect Dis* 2005;191:1981-7.
21. Petersen LR, Marshall SL, Barton-Dickson C, et al: Coccidioidomycosis among workers at an archeological site, northeastern Utah. *Emerg Infect Dis* 2004;10:637-42.
22. Chamany S, Mirza SA, Fleming JW, et al: A large histoplasmosis outbreak among high school students in Indiana, 2001. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:909-14.
23. Morgan J, Cano MV, Feikin DR, et al: A large outbreak of histoplasmosis among American travelers associated with a hotel in Acapulco, Mexico, spring 2001. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69:663-9.
24. Lyon GM, Bravo AV, Espino A, et al: Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998-1999. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:438-42.
25. Panackal AA, Hajjeh RA, Cetron MS, et al: Fungal infections among returning travelers. *Clin Infect Dis* 2002;35:1088-95.
26. Bartlett JG: Aspergillosis update. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:281-2.

27. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, et al: Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 Aspergillus Study Group. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:250-60.
28. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, et al: International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol* 2001;39:3254-9.
29. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, et al: In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 2003;41:78-83.
30. Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, et al: Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2645-9.
31. Wingard JR: Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 1995;20:115-25.
32. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, et al: Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:617-23.
33. Pfaller MA, Messer SA, Gee S, et al: In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J Clin Microbiol* 1999;37:870-2.
34. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, et al: Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 2002;35:627-30.
35. Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, et al: Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1578-84.
36. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, et al: Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 2004;38:161-89.
37. Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA: British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 2003;3:230-40.
38. Rabkin JM, Orolloff SL, Corless CL, et al: Association of fungal infection and increased mortality in liver transplant recipients. *Am J Surg* 2000;179:426-30.
39. Kobayashi GS: Molecular genetics and the diagnostic mycology laboratory. *Arch Med Res*

- 1995;26:293-6.
40. Denning DW: Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* 2000;355:423-4.
  41. Sato Y, Osabe S, Kuno H, et al: Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by microscopic examination of centrifuged cerebrospinal fluid sediment. *J Neurol Sci* 1999;164:72-5.
  42. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, et al: Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 1999;37:3533-9.
  43. 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. *J Clin Microbiol* 2002;40:2483-9.
  44. Reiss E, Obayashi T, Orle K, et al: Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Med Mycol* 2000;38 Suppl 1:147-59.
  45. 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. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:477-85.
  46. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, et al: Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998;26:1407-12.
  47. 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.
  48. Klein BS, Vergeront JM, Kaufman L, et al: Serological tests for blastomycosis: assessments during a large point-source outbreak in Wisconsin. *J Infect Dis* 1987;155:262-8.
  49. Staib F: Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* 1965;4:187-93.
  50. Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good C, et al: Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1985;49:571-5.
  51. Hube B: *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 1996;7:55-69.
  52. Morrison CJ, Hurst SF, Reiss E: Competitive binding inhibition enzyme-linked immunosorbent assay that uses the secreted aspartyl proteinase of *Candida albicans* as an antigenic marker for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:835-48.

53. Macdonald F, Odds FC: Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* 1983;129:431-8.
54. Ray TL, Payne CD: Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. *Infect Immun* 1988;56:1942-9.
55. Niesters HG, Goessens WH, Meis JF, et al: Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1993;31:904-10.
56. Jackson CJ, Barton RC, Evans EG: Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J Clin Microbiol* 1999;37:931-6.
57. Velegriaki A, Kambouris ME, Skiniotis G, et al: Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;23:303-12.
58. Hendolin PH, Paulin L, Koukila-Kahkola P, et al: Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *J Clin Microbiol* 2000;38:4186-92.
59. 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.
60. Park S, Wong M, Marras SA, et al: Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. *J Clin Microbiol* 2000;38:2829-36.
61. Golbang N, Burnie JP, Matthews RC: A polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosing infection caused by *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Pathol* 1999;52:419-23.
62. Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, et al: Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:228-31.
63. Rand KH, Houck H, Wolff M: Detection of candidemia by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1994;8:215-21.
64. Chaturvedi S, Rodeghier B, Fan J, et al: Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT $\alpha$  and MAT $\alpha$  pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *J Clin Microbiol* 2000;38:2007-9.
65. Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, et al: Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 2001;39:3505-11.
66. 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. *J Clin Microbiol*

- 2002;40:490-4.
67. Li SY, Liao MH, Lin YH, et al: Rapid identification of clinically important fungi by use of PCR-EIA. *Epidemiol Bulletin* 2003.
  68. Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, et al: Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *J Med Microbiol* 2003;52:1071-6.
  69. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, et al: Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clin Chem* 2001;47:1742-3.
  70. Ahmadian A, Ehn M, Hober S: Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* 2006;363:83-94.
  71. Gharizadeh B, Norberg E, Loffler J, et al: Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology. *Mycoses* 2004;47:29-33.
  72. Trama JP, Mordechai E, Adelson ME: Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing. *Mol Cell Probes* 2005;19:145-52.
  73. 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. *J Clin Microbiol* 2000;38:2302-10.
  74. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH: Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol* 2000;38:1510-5.
  75. Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, et al: Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J Med Vet Mycol* 1995;33:319-25.
  76. Zhao J, Kong F, Li R, et al: Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol* 2001;39:2261-6.
  77. 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. *J Clin Microbiol* 1999;37:1985-93.
  78. 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.
  79. 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. *J Clin Microbiol* 2003;41:5127-33.
80. Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, et al: Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J Clin Microbiol* 2005;43:4943-53.
81. Hsiao CR, Huang L, Bouchara JP, et al: Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2005;43:3760-8.
82. Diaz MR, Fell JW: High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus trichosporon. *J Clin Microbiol* 2004;42:3696-706.
83. Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, et al: Microcoding and flow cytometry as a high-throughput fungal identification system for *Malassezia* species. *J Med Microbiol* 2006;55:1197-209.
84. Diaz MR, Fell JW: Use of a suspension array for rapid identification of the varieties and genotypes of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *J Clin Microbiol* 2005;43:3662-72.
85. Page BT, Kurtzman CP: Rapid identification of *Candida* species and other clinically important yeast species by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 2005;43:4507-14.
86. 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. *J Clin Microbiol* 2006;44:3167-71.
87. 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 Immunol Med Microbiol* 2006;46:244-50.
88. Howell SA, Barnard RJ, Humphreys F: Application of molecular typing methods to dermatophyte species that cause skin and nail infections. *J Med Microbiol* 1999;48:33-40.
89. Soll DR: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:332-70.
90. 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 Res* 2004;4:377-88.
91. 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.

92. 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.
93. Robles JC, Koreen L, Park S, et al: Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2004;42:2480-8.
94. Bougnoux ME, Tavanti A, Bouchier C, et al: Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2003;41:5265-6.
95. Bougnoux ME, Aanensen DM, Morand S, et al: Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. *Infect Genet Evol* 2004;4:243-52.
96. Redkar RJ, Dube MP, McCleskey FK, et al: DNA fingerprinting of *Candida rugosa* via repetitive sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34:1677-81.
97. Fundyga RE, Lott TJ, Arnold J: Population structure of *Candida albicans*, a member of the human flora, as determined by microsatellite loci. *Infect Genet Evol* 2002;2:57-68.
98. Lott TJ, Fundyga RE, Brandt ME, et al: Stability of allelic frequencies and distributions of *Candida albicans* microsatellite loci from U.S. population-based surveillance isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:1316-21.
99. Poikonen E, Vuopio-Varkila J, Kaukoranta-Tolvanen SS, et al: Epidemiological typing of *Candida albicans* from bloodstream infections by restriction enzyme analysis. *Scand J Infect Dis* 2001;33:140-4.
100. Makarova NU, Pokrowsky VV, Kravchenko AV, et al: Persistence of oropharyngeal *Candida albicans* strains with reduced susceptibilities to fluconazole among human immunodeficiency virus-seropositive children and adults in a long-term care facility. *J Clin Microbiol* 2003;41:1833-7.
101. Pujol C, Pfaller MA, Soll DR: Flucytosine resistance is restricted to a single genetic clade of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:262-6.
102. Soll DR, Pujol C: *Candida albicans* clades. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;39:1-7.
103. Taylor BN, Harrer T, Pscheidl E, et al: Surveillance of nosocomial transmission of *Candida albicans* in an intensive care unit by DNA fingerprinting. *J Hosp Infect* 2003;55:283-9.
104. Riederer K, Fozo P, Khatib R: Typing of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*: species-related limitations of electrophoretic karyotyping and restriction endonuclease analysis of genomic DNA. *Mycoses* 1998;41:397-402.



105. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Dassanayake RS, et al: 'Genotypic shuffling' of sequential clones of *Candida albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. *J Med Microbiol* 2003;52:349-59.
106. Ball LM, Bes MA, Theelen B, et al: Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida* species colonization in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 2004;42:1673-9.
107. 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.
108. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, et al: CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988;16:128-40.
109. NCCLS. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 1997. NCCLS document M27-A (ISBN 1-56238-328-0), 940 West valley road, suite 1400, wayne, pennsylvania 19087.
110. Chen KW, Lo HJ, Lin YH, et al: Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *J Med Microbiol* 2005;54:249-58.
111. Voss A, Pfaller MA, Hollis RJ, et al: Evaluation of the discriminatory power of pulsed-field gel electrophoresis and PCR fingerprinting for epidemiologic typing of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:82-7.
112. Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C: Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2002;40:1290-7.
113. McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA: Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol* 1999;37:417-21.
114. Hunter PR, Fraser CA: Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1989;27:2156-60.
115. Chen J, Iannone MA, Li MS, et al: A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension. *Genome Res* 2000;10:549-57.
116. Pujol C, Joly S, Lockhart SR, et al: Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1997;35:2348-58.

117. Boldo XM, Villa-Tanaca L, Zuniga G, et al: Genetic diversity among clinical isolates of *Candida glabrata* analyzed by randomly amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis analyses. *J Clin Microbiol* 2003;41:4799-804.
118. Valerio HM, Weikert-Oliveira RC, Resende MA: Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39:174-8.
119. Roilides E, Farmaki E, Evdoridou J, et al: *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *J Clin Microbiol* 2003;41:735-41.
120. Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, et al: Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *J Clin Microbiol* 2003;41:5709-17.
121. Tavanti A, Davidson AD, Johnson EM, et al: Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *J Clin Microbiol* 2005;43:5593-600.
122. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, et al: PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001;7:382-9.
123. Lasker BA, Elie CM, Lott TJ, et al: Molecular epidemiology of *Candida albicans* strains isolated from the oropharynx of HIV-positive patients at successive clinic visits. *Med Mycol* 2001;39:341-52.
124. Dassanayake RS, Ellepola AN, Samaranyake YH, et al: Molecular heterogeneity of fluconazole-resistant and -susceptible oral *Candida albicans* isolates within a single geographic locale. *APMIS* 2002;110:315-24.
125. Franz R, Kelly SL, Lamb DC, et al: Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3065-72.
126. Lee MK, Williams LE, Warnock DW, et al: Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:217-24.
127. Ramsey H, Morrow B, Soll DR: An increase in switching frequency correlates with an increase in recombination of the ribosomal chromosomes of *Candida albicans* strain 3153A. *Microbiology* 1994;140 ( Pt 7):1525-31.
128. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al: Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3140-5.

129. Spratt BG: Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:312-6.
130. Enright MC: The evolution of a resistant pathogen--the case of MRSA. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:474-9.
131. Enright MC, Robinson DA, Randle G, et al: The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7687-92.
132. Chen KW, Chen YC, Lo HJ, et al: Multilocus sequence typing for analyses of clonality of *Candida albicans* strains in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2006;44:2172-8.
133. Swiderek H, Claus H, Frosch M, et al: Evaluation of custom-made DNA microarrays for multilocus sequence typing of *Neisseria meningitidis*. *Int J Med Microbiol* 2005;295:39-45.
134. von Wintzingerode F, Bocker S, Schlotelburg C, et al: Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analyzed by mass spectrometry: a tool for rapid bacterial identification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7039-44.
135. Ecker DJ, Sampath R, Blyn LB, et al: Rapid identification and strain-typing of respiratory pathogens for epidemic surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8012-7.
136. Rello J, Quintana E, Mirelis B, et al: Polymicrobial bacteremia in critically ill patients. *Intensive Care Med* 1993;19:22-5.
137. Weinstein MP, Murphy JR, Reller LB, et al: The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. *Rev Infect Dis* 1983;5:54-70.

表一、國衛院各菌株之資料

Strain no.	Hosp. <sup>s</sup>	Source	MIC*	collection date	DST	MLST clonal cluster	PFGE pulsotype
YM020273	E2	Sputum	4	2002/7/31	140	2-2	
YM020274	E2	Sputum	0.3	2002/7/31	153	1-2	III-1
YM020287	M1	Urine	0.3	2002/7/3	154		
YM020291	M1	Sputum	0.3	2002/7/6	155	1-4	III-5
YM020294	M1	Urine	16	2002/7/11	144	2-1	II-1
YM020309	M1	Urine	4	2002/8/3	140	2-2	
YM020311	M1	Urine	16	2002/8/5	90	1-3	
YM020649	S1	others	8	2002/8/19	156		I-4
YM020659	S1	Sputum	0.1	2002/8/25	157		V-2
YM020671	S1	Blood	8	2002/7/17	158		IV-2
YM020693	S1	Blood	0.5	2002/8/26	90	1-3	III-4
YM020709	S2	Sputum	8	2002/8/6	159		
YM020715	S2	Urine	0.3	2002/8/23	160		V-1
YM020725	S2	Urine	8	2002/9/3	161		II-12
YM020743	S2	Blood	0.1	2002/8/9	134	1-5	III-2
YM020919	S3	Sputum	1	2002/7/16	140	2-2	II-14
YM020948	S3	Blood	1	2002/9/2	162		I-5
Ym990131	E2	Urine	64	1999/5/10	98	2-4	II-7
Ym990135	E2	Sputum	64	1999/5/14	98	2-4	II-3
Ym990136	E2	Blood	64	1999/5/15	133		IV-1
Ym990138	E2	Sputum	0.5	1999/5/18	134	1-5	II-9
Ym990144	E2	Urine	64	1999/5/20	135		
Ym990145	E2	Sputum	64	1999/5/21	136		II-5
Ym990148	E2	Urine	0.5	1999/5/24	137	2-3	
Ym990236	N3	Urine	64	1999/5/11	138	3-1	VI-2
Ym990268	S2	Urine	0.5	1999/5/15	139	3-2	I-2
Ym990275	S2	Urine	64	1999/5/24	140	2-2	II-1
Ym990323	M1	Sputum	64	1999/4/26	141		
Ym990329	M1	Urine	1	1999/4/7	142		IV-3
Ym990444	N1	Blood	2	1999/5/1	143		II-10
Ym990458	N1	Blood	64	1999/5/10	144	2-1	II-8
Ym990488	S1	Urine	0.3	1999/5/12	163		I-3

Ym990490	S1	Urine	64	1999/5/13	140	2-2	II-6
Ym990533	E1	Sputum	0.5	1999/5/17	145	1-1	I-1
Ym990537	E1	Urine	64	1999/6/5	140	2-2	II-3
Ym990553	N4	Urine	1	1999/4/21	146		
Ym990554	N4	Urine	64	1999/4/23	147		II-13
Ym990574	N4	Blood	2	1999/5/12	148		V-3
Ym990577	N4	Sputum	64	1999/5/21	140	2-2	II-4
Ym990579	N4	Urine	64	1999/6/1	149		VI-1
Ym990592	S3	Blood	64	1999/5/5	140	2-2	II-1
Ym990593	S3	Wound	0.5	1999/5/7	150		
Ym990598	S3	Sputum	64	1999/5/19	90	1-3	III-3
Ym990599	S3	Urine	2	1999/5/20	151		V-1
Ym990603	S3	Sputum	64	1999/6/8	140	2-2	II-2
Ym990645	N2	Urine	64	1999/4/2	140	2-2	II-11
Ym990647	N2	Urine	0.1	1999/4/8	140	2-2	II-11
Ym990649	N2	Urine	64	1999/4/13	140	2-2	II-11
Ym990652	N2	Urine	1	1999/4/23	152		VI-3
Ym990659	N2	Blood	64	1999/5/17	140	2-2	II-11
Ym990660	N2	Urine	64	1999/5/20	140	2-2	II-11
Ym990662	N2	Urine	64	1999/5/31	140	2-2	II-11

表二、台大各菌株之資料

Source Clinical*	Time Y/m/d	Strain code	Patient origin (reference)	DST	PFGE types
P1	1997/1/27	DOH86g091	rectal swab	164	D1
P1	1997/1/31	DOH86g041	urine	164	D1
P1	1997/2/1	DOH86g055	CVC*	164	D1
P1	1997/2/1	DOH86g063	CVC*	164	D1
P1	1997/2/3	DOH86g074	urine	164	D1
P1	1997/2/11	DOH86g012	CVC*	164	D1
P1	1997/2/11	DOH86g061	CVC*	164	D1
P1	1997/2/17	DOH86g071	rectal swab	164	D1
P2	1996/12/6	DOH86g099	urine	173	A8
P2	1996/12/9	DOH86g018	urine	165	A7
P2	1996/12/16	DOH86g082	urine	165	A7
P3	1996/9/11	DOH86g035	sputum	140	A1
P3	1996/9/13	DOH86g057	sputum	140	A1
P4	1996/9/21	DOH86g037	sputum	166	A5
P5	1996/12/6	DOH86g038	urine	167	A4
P5	1996/12/6	DOH86g078	sputum	134	E2
P5	1996/12/6	DOH86g089	throat swab	171	A9
P6	1996/10/8	DOH86g076	rectal swab	170	C1
P6	1996/10/11	DOH86g070	STOOL	169	C2
P7	1996/12/24	DOH86g097	rectal swab	172	B1
P7	1996/12/26	DOH86g092	rectal swab	172	B1
P8	1996/11/30	DOH86g036	urine	176	A6
P8	1996/12/2	DOH86g086	anal swab	98	A2
P9	1997/1/23	DOH86g003	rectal swab	140	A3
P9	1997/1/23	DOH86g033	throat swab	140	A3
P10	1996/12/26	DOH86g051	urine	164	D3
P10	1996/12/27	DOH86g062	urine	164	D4
P10	1996/12/28	DOH86g058	urine	177	C4
P10	1997/1/20	DOH86f018	urine	174	C3
P11	1997/1/21	DOH86g023	sputum	100	D5
P11	1997/1/29	DOH86g004	anal swab	175	E1
P11	1997/1/29	DOH86g024	sputum	134	D2
P11	1997/2/1	DOH86g075	CVC*	178	E4
P11	1997/3/2	DOH86g002	sputum	134	E3
P12	1996/11/6	DOH86g094	nasal swab	98	B2

● CVC, central venous catheter.

表三、 *C. albicans* MLST 所用的基因及其引子

Locus	Primer	Sequence (5'→3')	Fragment size (bp)	Polymorphism site (SNPs)
<i>AAT1a</i>	forward	ACTCAAGCTAGATTTTTGGC	373	16
	reverse	CAGCAACATGATTAGCCC		
<i>ACC1</i>	forward	GCAAGAGAAATTTTAATTCAATG	407	17
	reverse	TTCATCAACATCATCCAAGTG		
<i>ADP1</i>	forward	GAGCCAAGTATGAATGATTTG	443	22
	reverse	TTGATCAACAAACCCGATAAT		
<i>MPIb</i>	forward	ACCAGAAATGGCCATTGC	375	30
	reverse	GCAGCCATGCATTCAATTAT		
<i>SYA1</i>	forward	AGAAGAATTGTTGCTGTTACTG	391	24
	reverse	GTTACCTTTACCACCAGCTTT		
<i>VPS13</i>	forward	TCGTTGAGAGATATTCGACTT	403	22
	reverse	ACGGATGGATCTCCAGTCC		
<i>ZWF1b</i>	forward	GTTTCATTTGATCCTGAAGC	491	16
	reverse	GCCATTGATAAGTACCTGGAT		
Total			2883	147

表四、*C. glabrata* MLST 之基因和引子以及基因變化分析

Locus	Gene Product	Primer	Sequence (5'→3')	Annealing temp.(°C)	NO. of bp sequenced	No. of genotypes identified	No(%) of polymorphic nucleotide sites
<i>FKS</i>	1,3-Beta-glucan synthase	forward reverse	GTCAAATGCCACAACAACAACCT AGCACTTCAGCAGCGTCTTCAG	55.0	589	7	7 (1.2)
<i>LEU2</i>	3-Isopropylmalate dehydrogenase	forward reverse	TTTCTTGATCCTCCCATTGTTCA ATAGGTAAAGGTGGGTGTGTTGC	54.0	512	8	9 (1.8)
<i>NMT1</i>	Myristoyl-CoA, protein <i>N</i> -myristoyltransferase <sup>a</sup>	forward reverse	GCCGGTGTGGTGTTGCCTGCTC CGTACTGCGGTGCTCGGTGTCG	59.0	607	9	14 (2.3)
<i>TRP1</i>	Phosphoribosyl-anthranilate isomerase	forward reverse	AATTGTTCCAGCGTTTTTGT GACCAGTCCAGCTCTTTCAC	50.0	419	9	11 (2.6)
<i>UGP1</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	forward reverse	TTTCAACACCGACAAGGACACAGA TCGGACTTCACTAGCAGCAAATCA	57.0	616	4	6 (0.9)
<i>URA3</i>	Orotidine-5_-phosphate decarboxylase	forward reverse	AGCGAATTGTTGAAGTTGGTTGA AATTCGGTTGTAAGATGATGTTGC	53.0	602	8	10 (1.7)



表五、 *C. tropicalis* MLST 所用的基因及其引子

Locus	Primer	Sequence (5'→3')	Fragment size (bp)	No. of genotypes identified	No(%) of polymorphic nucleotide sites	No. of genotypes/polymerphism
<i>ICL1</i>	forward	CAACAGATTGGTTGCCATCAGAGC	447	7	5(1.12%)	1.4
	reverse	CGAAGTCATCAACAGCCAAAGCAG				
<i>MDR1</i>	forward	TGTTGGCATTACCCCTTCCT	425	17	15(3.53%)	1.13
	reverse	TGGAGCACCAAACAATGGGA				
<i>SAPT2</i>	forward	CAACGATCGTGGTGCTG	525	7	3(0.57%)	2.33
	reverse	CACTGGTAGCTGAAGGAG				
<i>SAPT4</i>	forward	TGCTTCTCCTACAACCTCACCTCC	390	13	15(3.85%)	0.87
	reverse	ATTCCCATGACTCCCTGAGCAACA				
<i>XYR1</i>	forward	AGTTGGTTTCGGATGTTG	370	29	13(3.51%)	2.23
	reverse	TCGTAAATCAAAGCACCAGT				
<i>ZWF1a</i>	forward	GGTGCTTCAGGAGATTTAGC	520	9	5(0.96%)	1.8
	reverse	ACCTTCAGTACCAAAAAGCTTC				
Total			2677	82	56(2.09%)	1.46

表六、*C. tropicalis* 三種酶切酵素之比較

Restriction enzyme	No. effective band*	No. PFGE type	Discriminatory index	Unit used	Price US \$ per 10 U	Price US \$ per reaction
<i>Bss</i> HII	24-32	29	0.98	4	\$ 2.9	1.16
<i>Nae</i> I	42-56	31	0.99	10	\$ 1.06	1.06
<i>Rsr</i> II	35-42	29	0.98	4	\$ 3.15	1.26

\*Number of resolved DNA bands with sizes within the range of size standards in the *C. tropicalis* isolates tested.

表七、利用微珠陣列測試鑑定標準菌珠

Description	CAB5 (26)	CDU1 (30)	CGL1 (34)	CK3 (42)	CLU1 (56)	CP6 (63)	CT3c (65)	CGU2 (38)	CN4b (67)	S/N <sup>#</sup>
Blank	46	50	53	51	48	50	48	46.5	48.5	
Blank	43	50	53	42	45	49	51	35	44	
<i>C. albicans</i> ATCC14053	1403.5	45.5	47	48	35	42.5	44.5	48	48	31.539
<i>C. albicans</i> BCRC20512T	849	46.5	45	43	49	45.5	53.5	43.5	57	19.079
<i>C. albicans</i> BCRC20513	796	42	39.5	40	45	51	41.5	47	50.5	17.888
<i>C. dubliniensis</i> CBS7987	61.5	502	38	46	42.5	44	48	43.5	42	10.040
<i>C. dubliniensis</i> CBS7988	62.5	490	49	42	45	39.5	44	40.5	51	9.800
<i>C. dubliniensis</i> CBS2747	54	378	43.5	38.5	43	41	42	43	41	7.560
<i>C. glabrata</i> ATCC90030	44.5	45	439	32	40.5	51	51	41	48.5	8.283
<i>C. glabrata</i> CBS860	45	38	484.5	42	44	44	48	47.5	47.5	9.142
<i>C. glabrata</i> BCRC20586T	43	39.5	481.5	40.5	40.5	45.5	47	37.5	41	10.467
<i>C. krusei</i> ATCC6258	38	34	37	308	35.5	36	38	37	42	6.624
<i>C. krusei</i> BCRC21321	45	37.5	51.5	240	45	46.5	46	50	44	5.246
<i>C. krusei</i> BCRC21720	43	48	41	229	43	44	43	33	40.5	5.005
<i>C. lusitaniae</i> BCRC21740	38	44	41.5	53	2669	45	48.5	45.5	44	57.398
<i>C. lusitaniae</i> BCRC21387T	42	49	38.5	40	2401	41	46	45	41	51.634
<i>C. lusitaniae</i> BCRC26362	41	46.5	42	40	2309.5	43	46.5	37.5	46.5	49.667
<i>C. parapsilosis</i> ATCC90018	41.5	41	39	37	37	3497	43	44.5	62.5	70.646
<i>C. parapsilosis</i> BCRC20515T	32	43	46	37	39	2911	37	43	48	58.808
<i>C. parapsilosis</i> BCRC20865	42	47	39.5	40	44	2225	42	53	52	44.949

<i>C. tropicalis</i> ATCC13083	33	33	38.5	34	32	48	1661.5	38	41.5	33.566
<i>C. tropicalis</i> BCRC20520T	43.5	33	38	39	45	41.5	1342	38.5	48	27.111
<i>C. tropicalis</i> BCRC21437	40.5	40	38	44.5	41	44	1167.5	31	39	23.586
<i>C. guilliermondii</i> BCRC21599	44	47	40	50	66	39.5	50	1819.5	44	44.650
<i>C. guilliermondii</i> BCRC20862	49	48.5	47	51	105	42	52	2279	44	54.262
<i>C. guilliermondii</i> BCRC21500	44.5	42	37	45	47.5	50	44	620	37.5	15.215
<i>C. neoformans</i> BCRC22874	42	55.5	43.5	43.5	35	40	40	45.5	876	18.941
<i>C. neoformans</i> BCRC20530	38	52.5	39.5	43	32.5	46	45.5	37	983.5	21.265
<i>C. neoformans</i> BCRC20528	42.5	52.5	36	37	30	45	44	35	1043	22.551
NC	38	38	32	37	36	37	36	42	41	
NC	36	38.5	40.5	44.5	34	44	41	39	34	
NC	41.5	44	36.5	39	40	35.5	45.5	47	33	

# S/N: signal/noise ratio

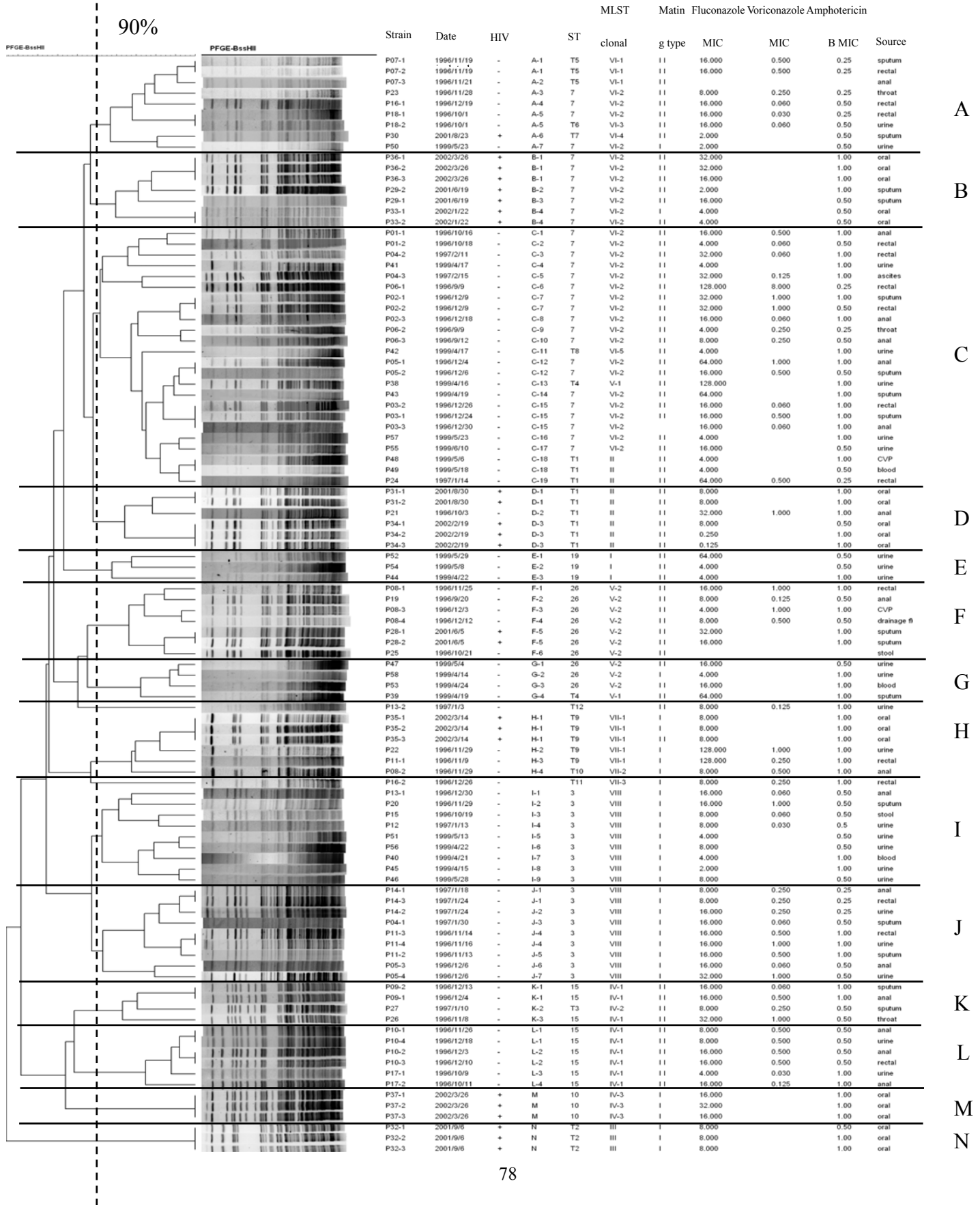
表八、利用微珠陣列測試鑑定臨床菌株及菌血症檢體

Description	測試臨床菌株數	訊號值平均值	S/N 範圍	測試菌血症檢體數	訊號值平均值	S/N 範圍
<i>C. albicans</i>	20	380.625	5.345-12.521	20	724.400	9.538-20.560
<i>C. dubliniensis</i>						
<i>C. glabrata</i>	18	331.344	5.100-9.862	7	396.000	4.984-10.066
<i>C. krusei</i>	3	523.833	9.512-12.431	9	403.778	2.531-14.837
<i>C. lusitaniae</i>	3	3013.167	60.868-69.814			
<i>C. parapsilosis</i>	11	3742.733	71.489-87.932	7	3745.571	59.118-84.373
<i>C. tropicalis</i>	11	1942.818	35.063-48.219	12	2157.083	32.959-61.500
<i>C. guilliermondii</i>	6	2555.583	49.162-60.462	3	2472.500	44.807-68.259
<i>C. neoformans</i>	5	433.500	4.824-16.022	4	1431.000	23.177-40.692

# S/N: signal/noise ratio

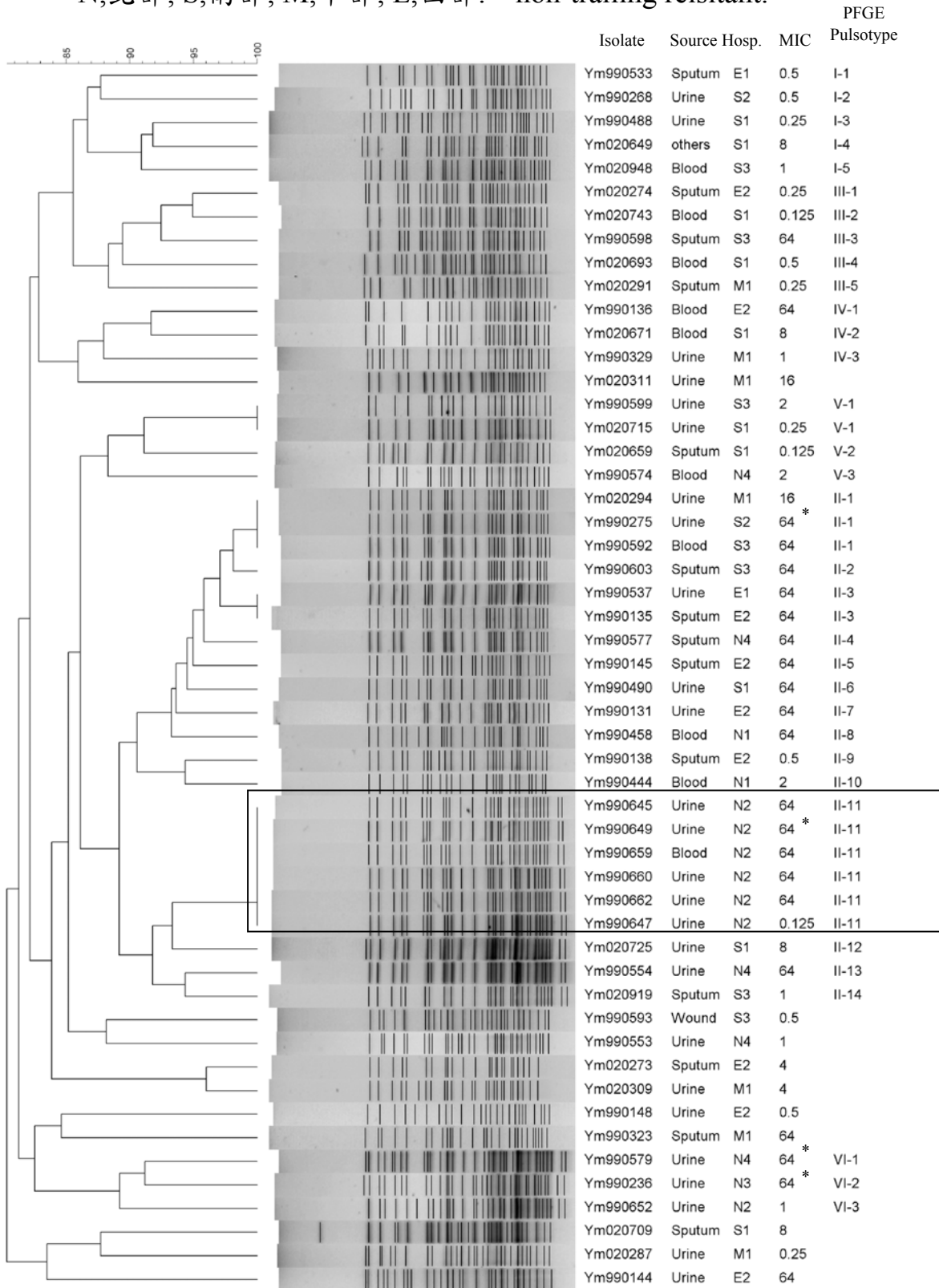
圖一、以 PFGE-BssH II 分子分型法分析 102 株 *C. glabrata* 臨床菌株。在

類緣關係 90.0% 為基準

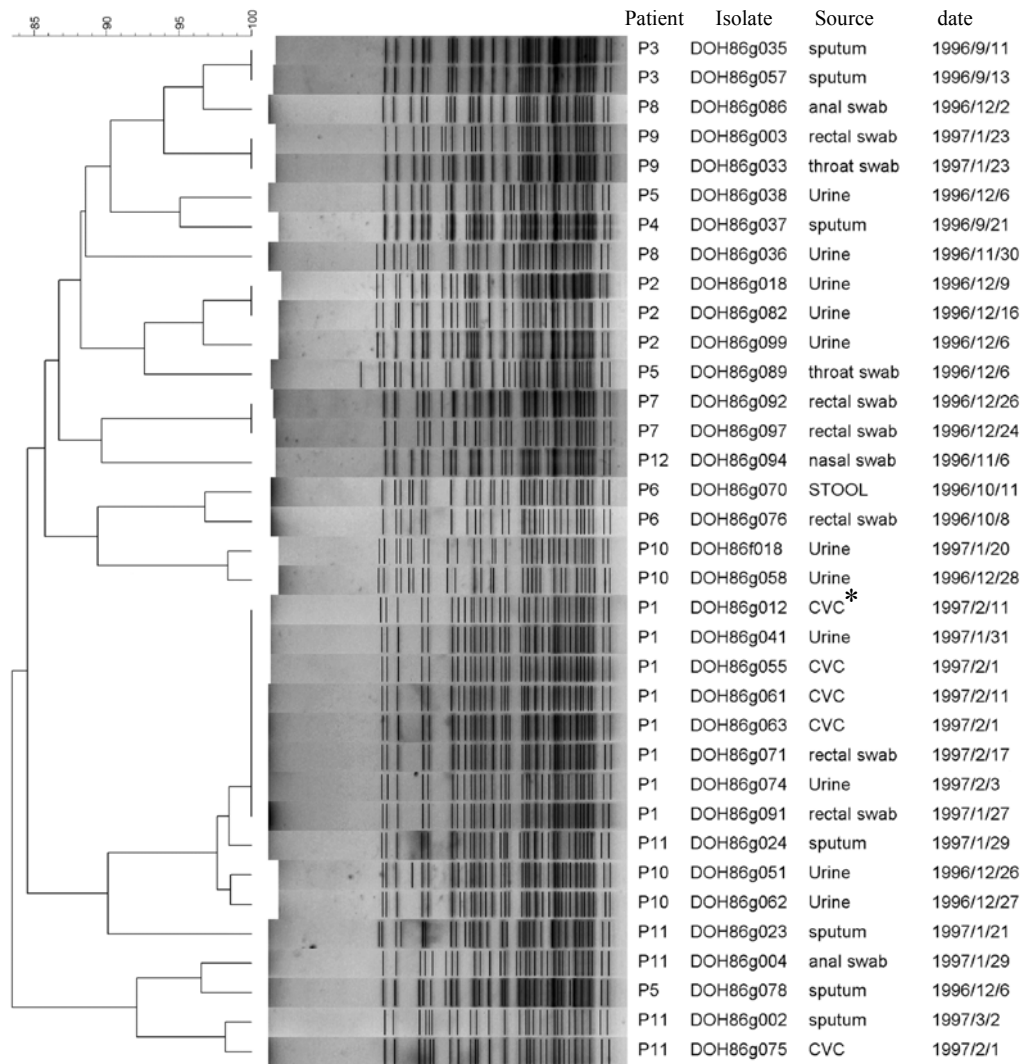


圖二、以 PFGE-*BssH* II 分子分型法分析 52 株 *C. tropicalis* 菌株。

N, 北部; S, 南部; M, 中部; E, 西部. \* non-trailing reisantant.

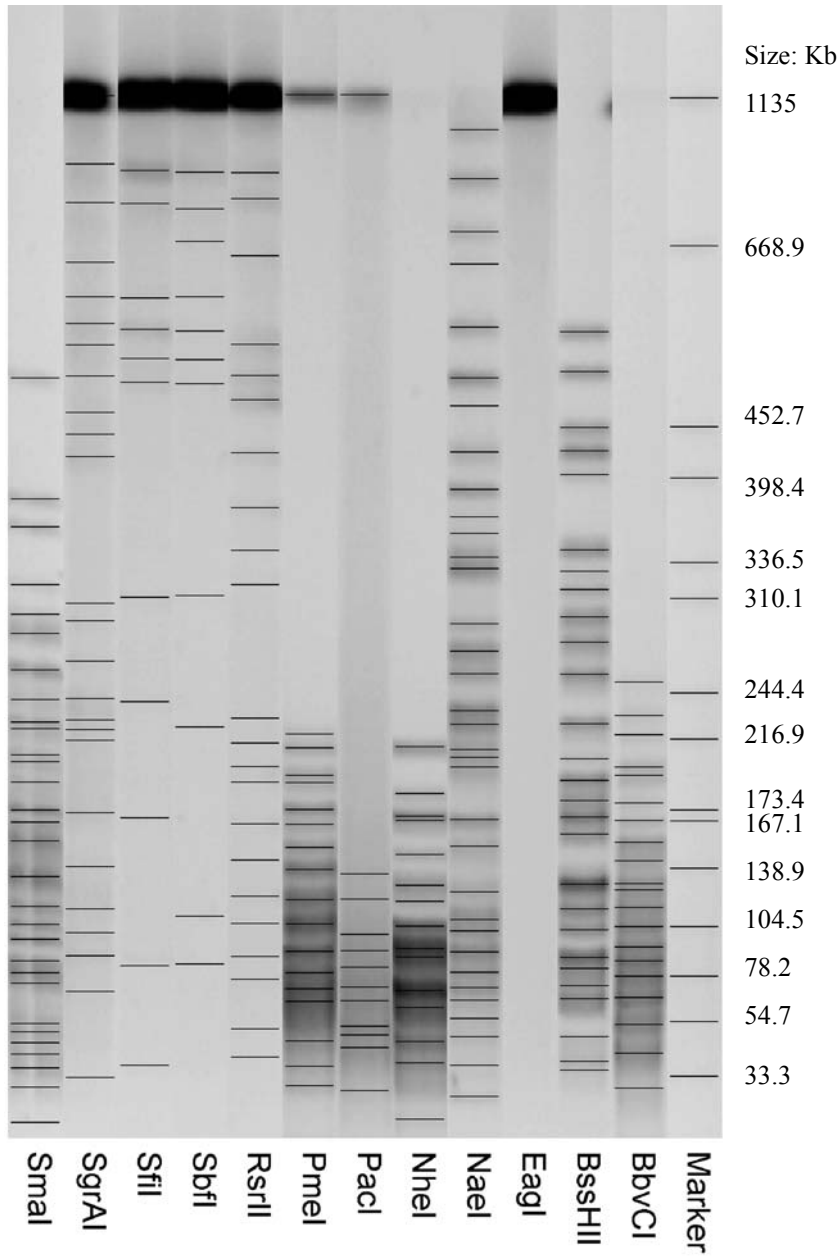


圖三、以 PFGE-*BssH* II 分子分型法分析 35 株 *C. tropicalis* 菌株。



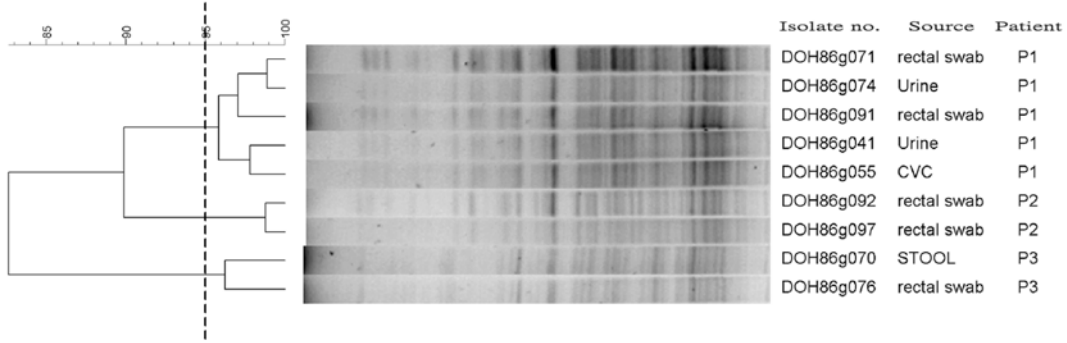


圖四、不同酵素之 PFGE 分析結果。C. tropicalis 標準菌株 ATCC13803，  
Land Maker, Xba I-restricted genomic DNA of S. Braenderup strain  
H9812.

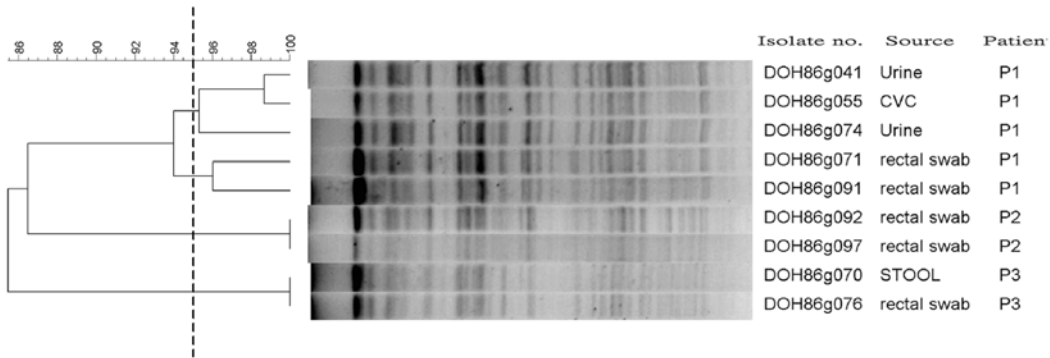


圖五、Dendrogram of the genetic relationship between 9 isolates of *C. tropicalis*. a) *Nae* I, b) *Rsr* II, c) *Bss* HII.

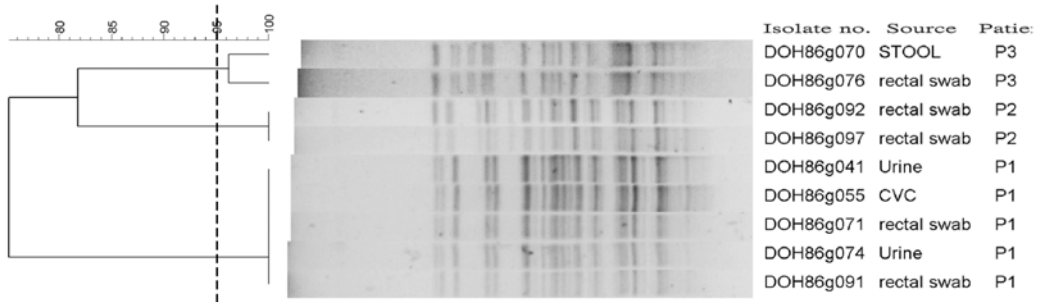
a) *Nae*I



b) *Rsr*II

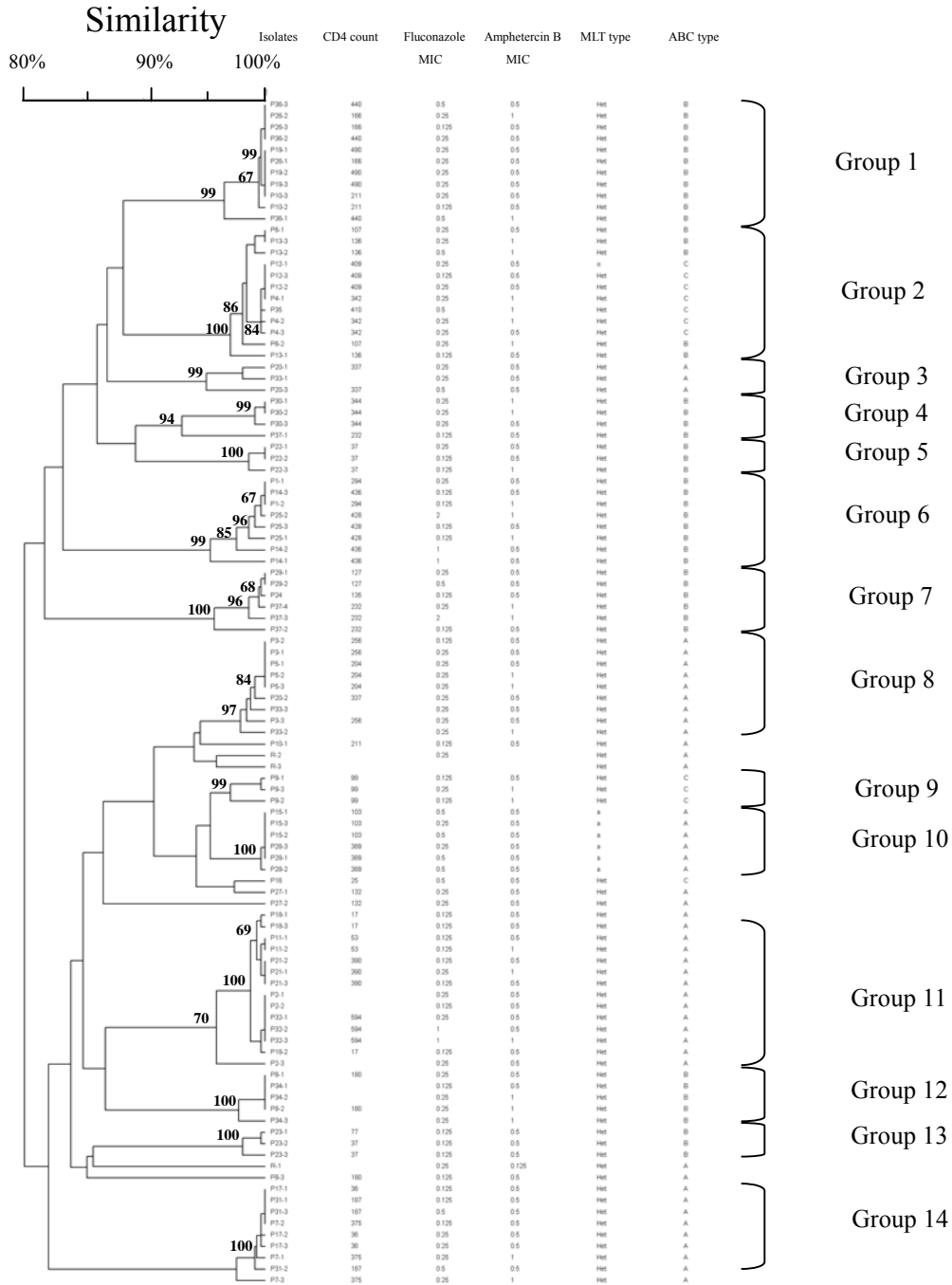


c) *Bss*HII



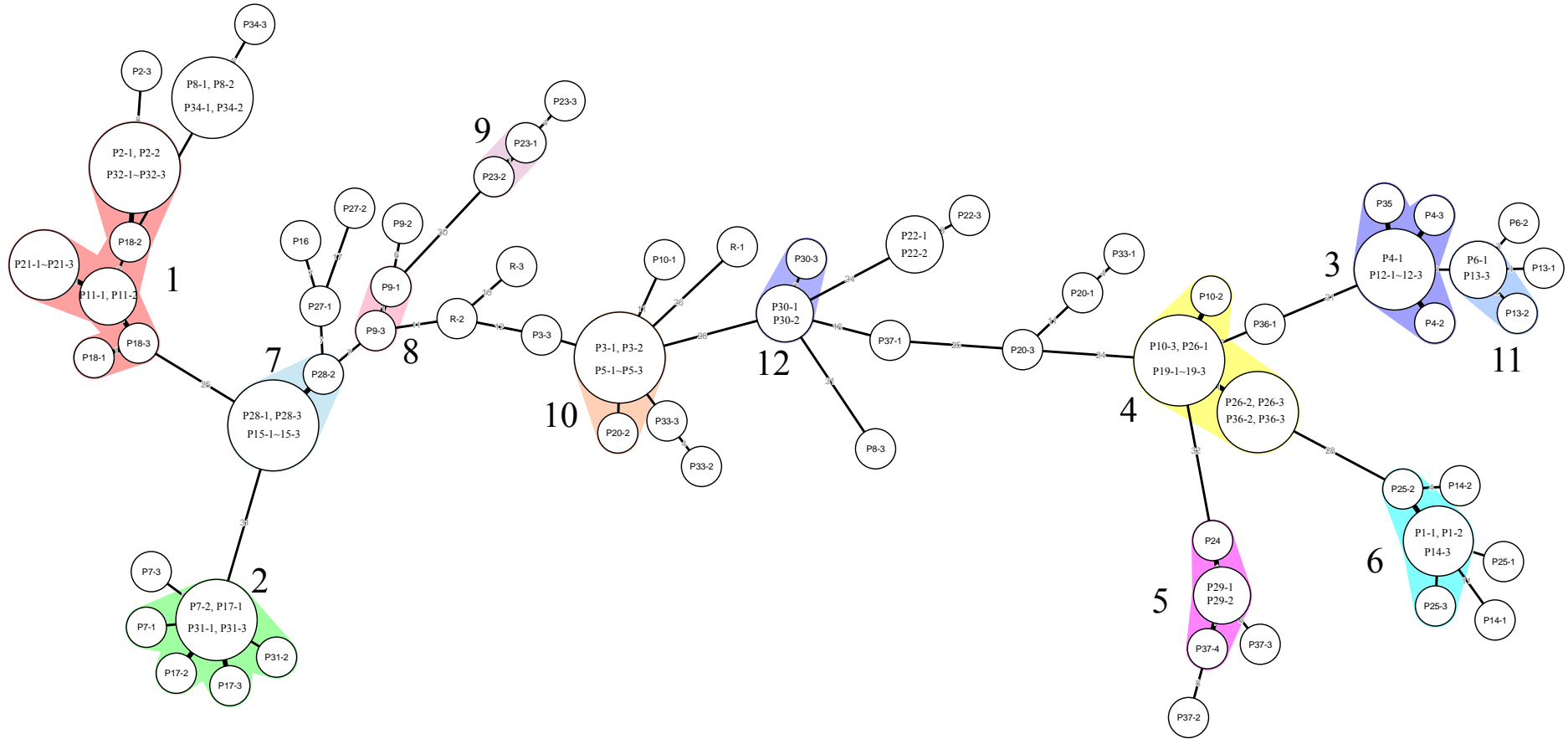
圖六、親緣性樹狀圖(dendrogram)顯示出利用 7 條持家基因所做 MLST 決

定 101 株從 HIV 病人分離出 *C. albicans* 臨床菌株間之類緣關係



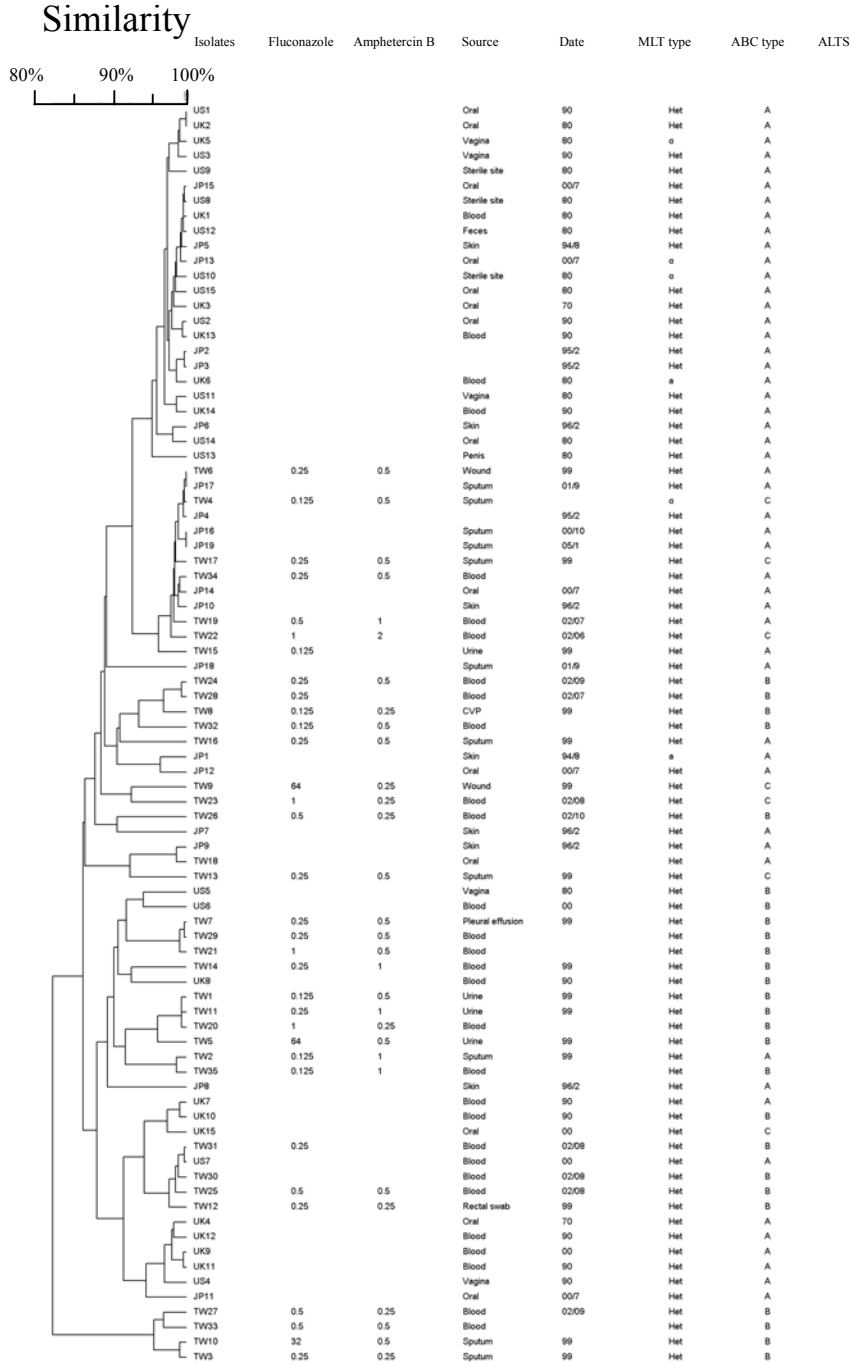
圖七、將 101 株從 HIV 病人分離出 *C. albicans* 的資料進行 Minimal spanning tree 運算。每一個圓圈代表一株菌株。

連接線條及其長度代表菌株間關係及其類緣性親疏。



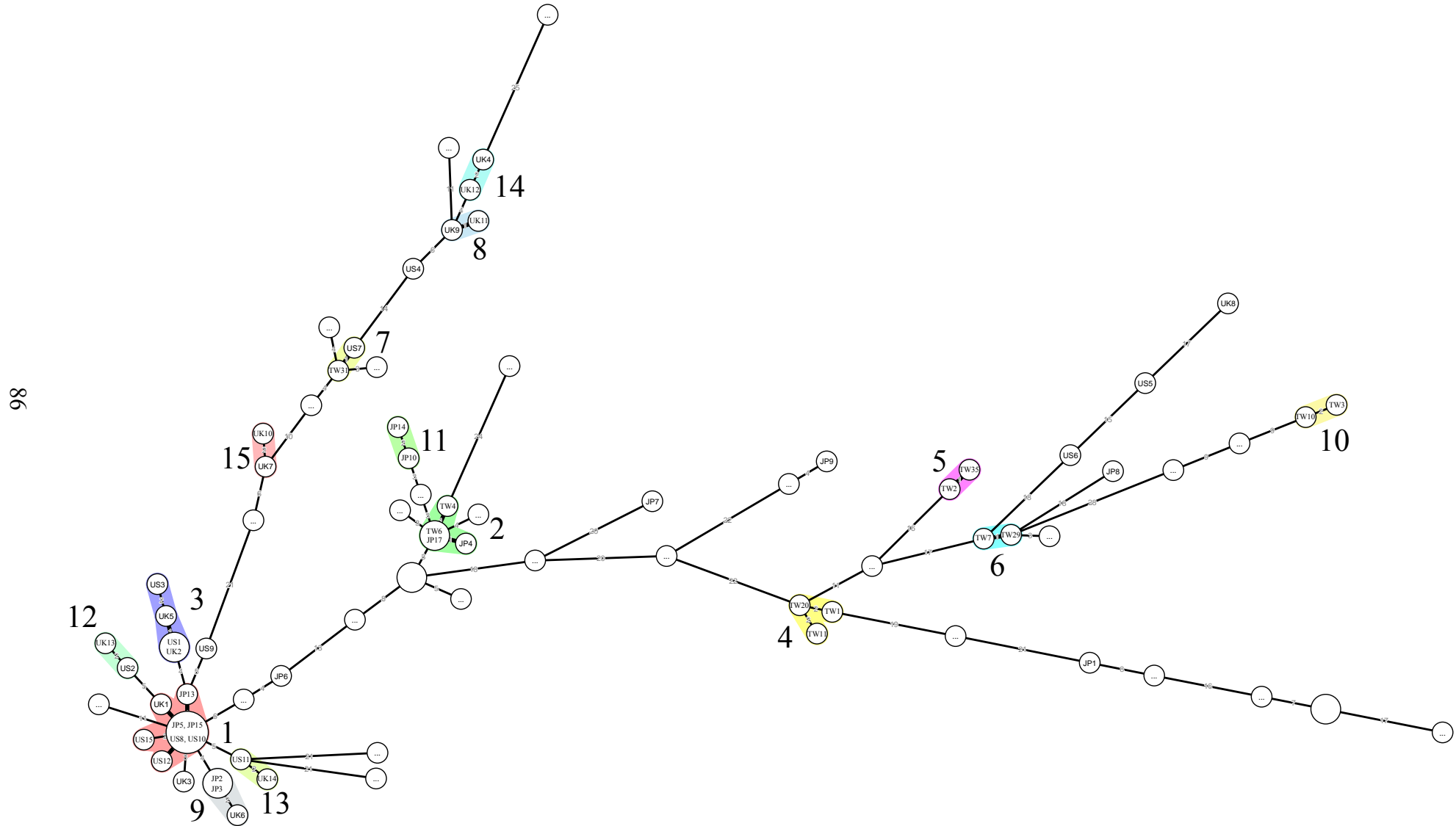
圖八、親緣性樹狀圖(dendrogram)顯示出利用 7 條持家基因所做 MLST 決定

從日本病人分離出 *C. albicans* 與國際菌株比對之類緣關係

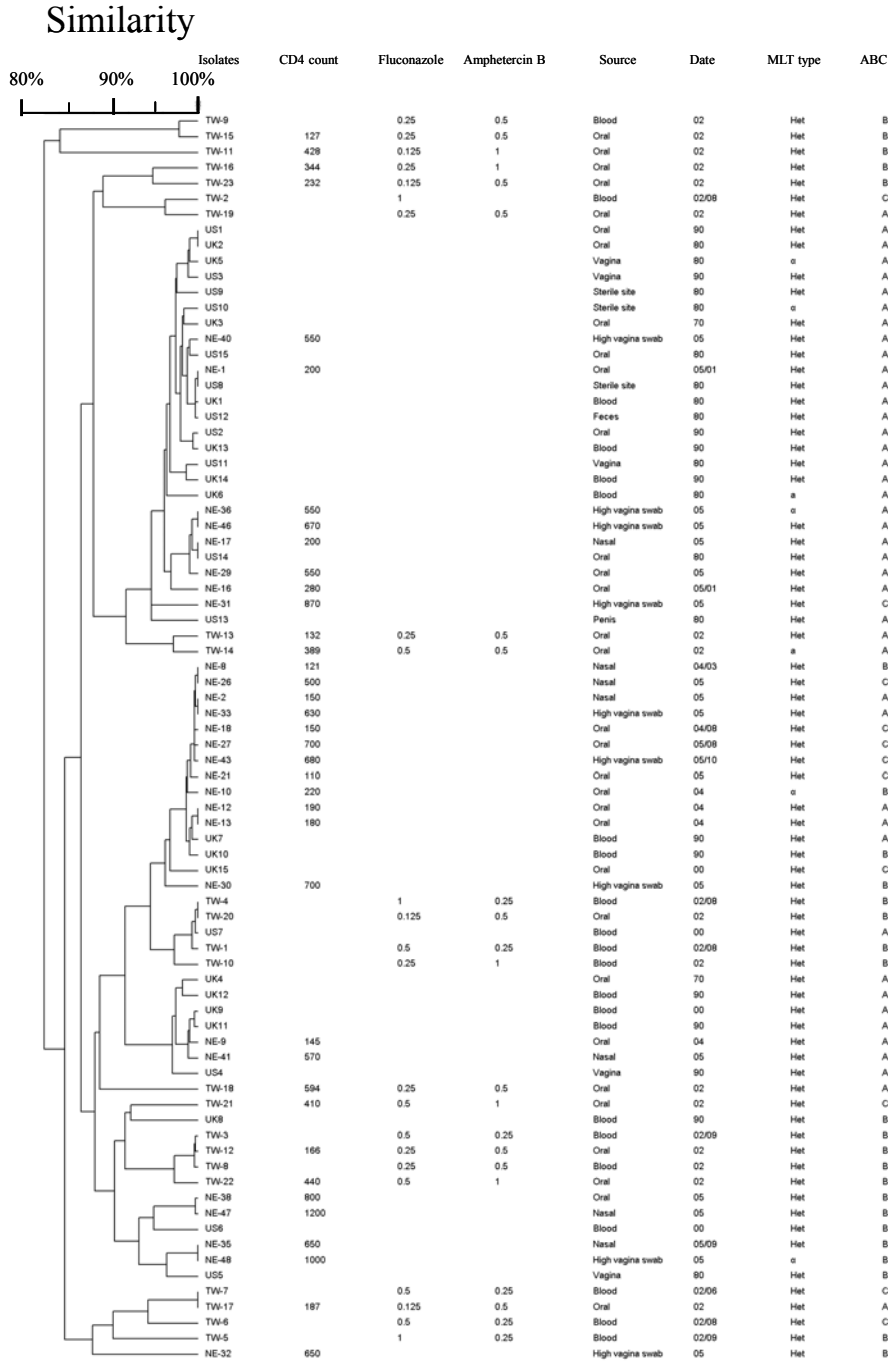


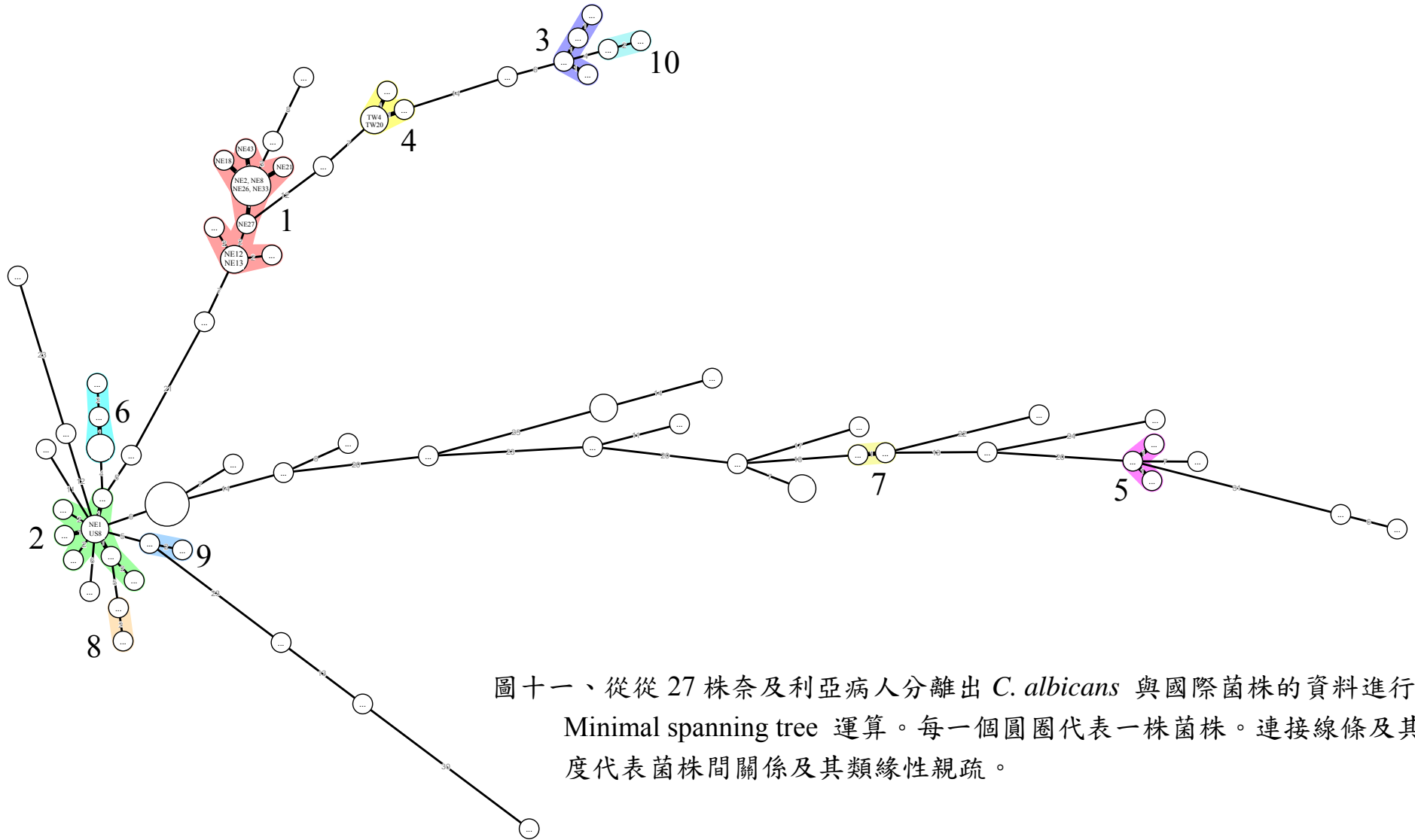
圖九、從日本病人分離出 *C. albicans* 與國際菌株比對的資料進行 Minimal spanning tree 運

算。每一個圓圈代表一株菌株。連接線條及其長度代表菌株間關係及其類緣性親疏。



十、親緣性樹狀圖(dendrogram)顯示出利用 7 條持家基因所做 MLST 決定從 27 株奈及利亞病人分離出 *C. albicans* 與國際菌株之類緣關係





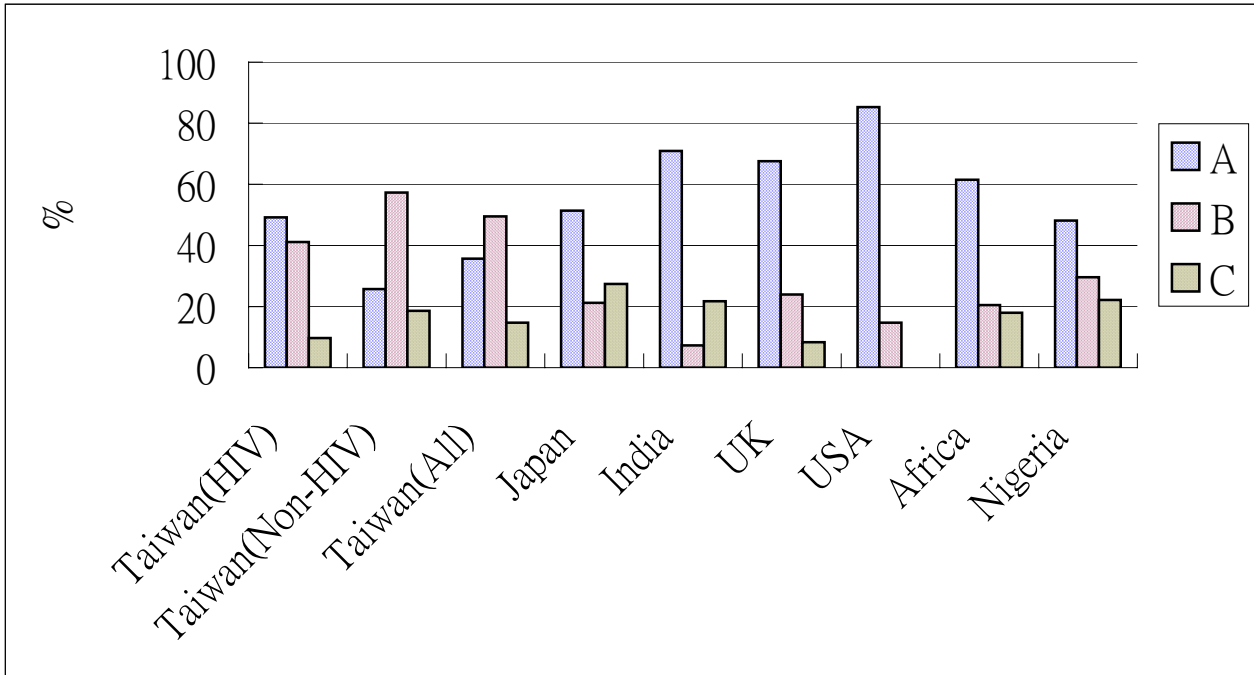
圖十一、從從 27 株奈及利亞病人分離出 *C. albicans* 與國際菌株的資料進行 Minimal spanning tree 運算。每一個圓圈代表一株菌株。連接線條及其長度代表菌株間關係及其類緣性親疏。



圖十二、利用 25s rRNA 基因轉錄間隔區(transcribed spacer region)長度

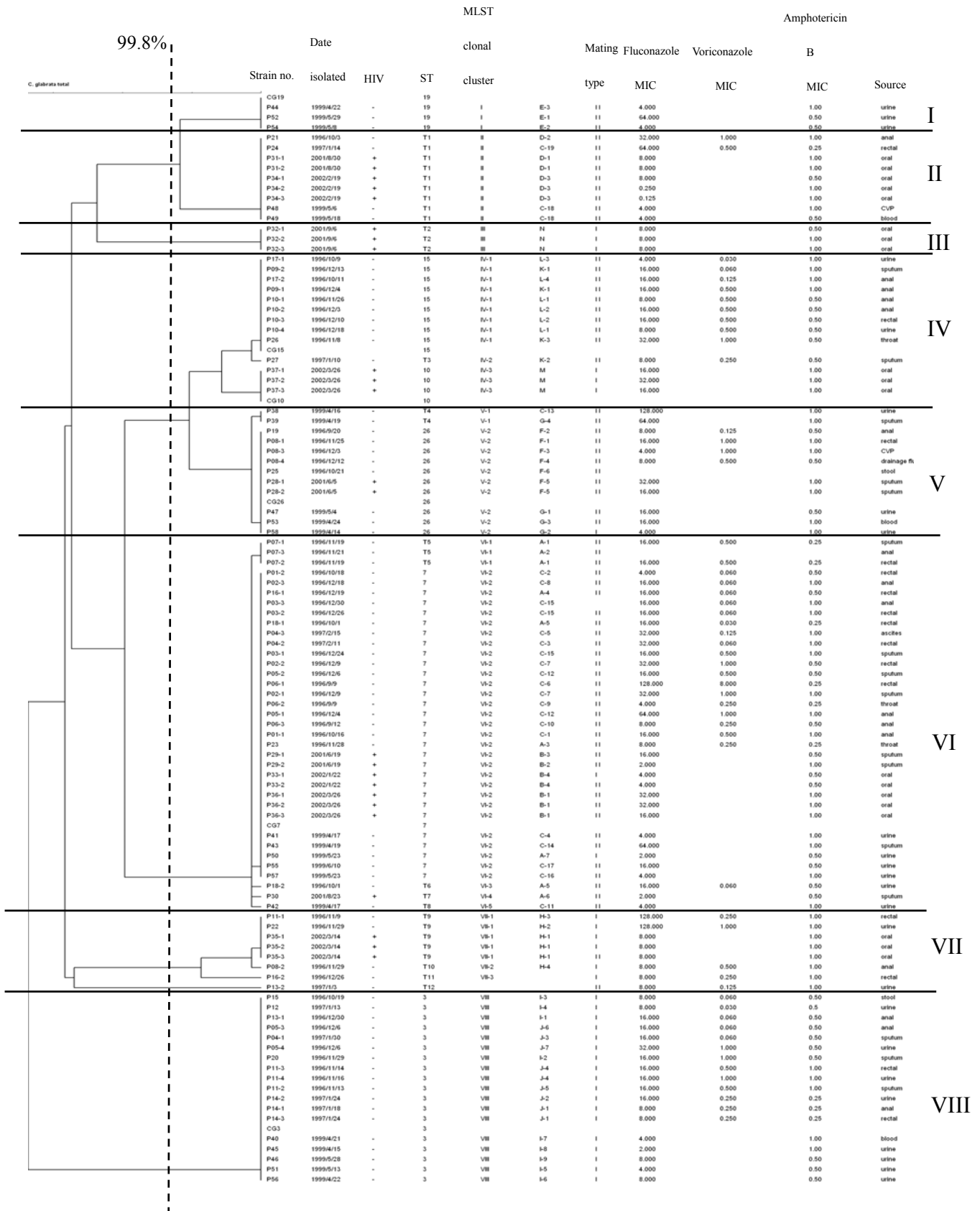
多型性區分 *C. albicans* ABC 基因型，並比較台灣與其他各國

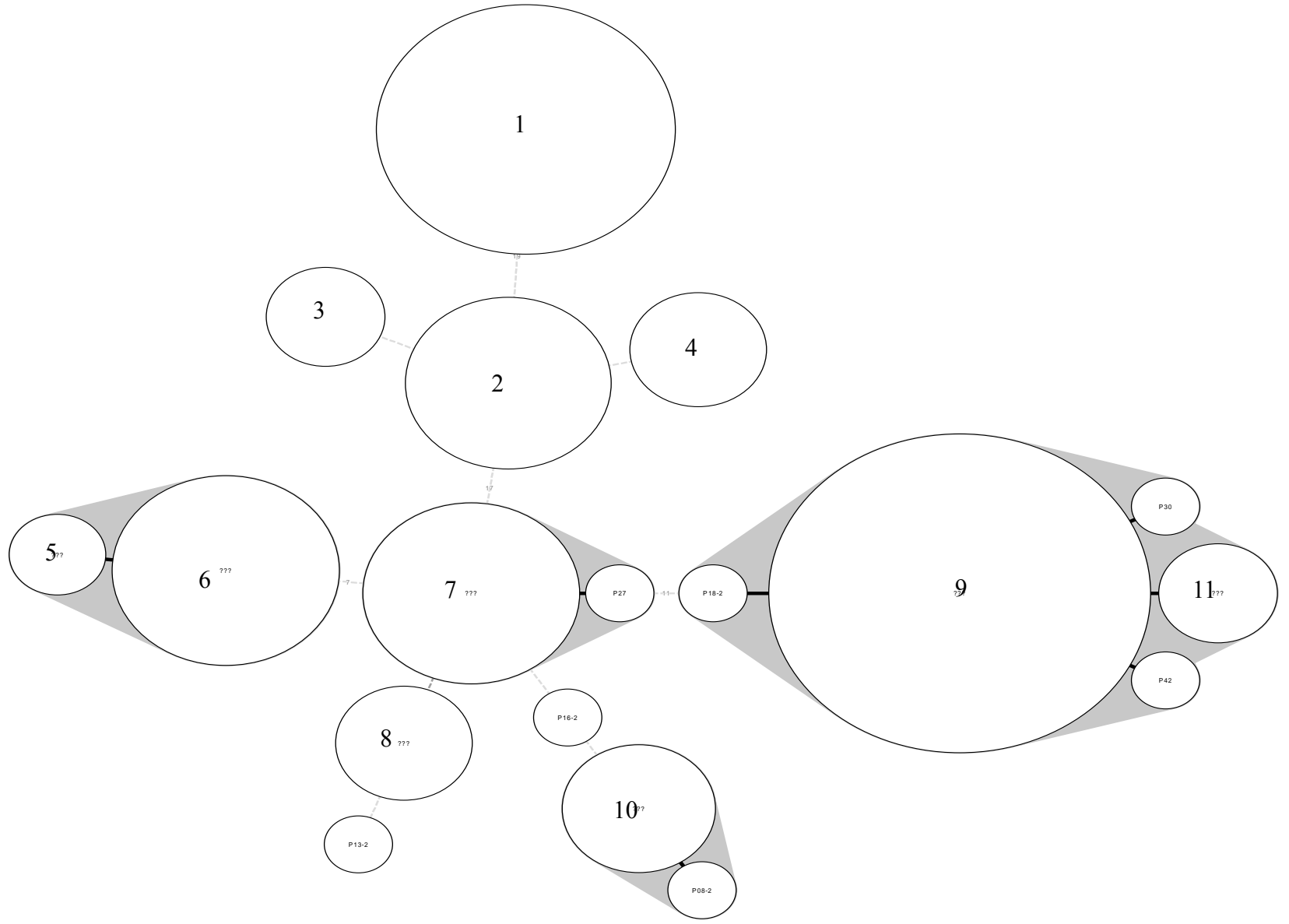
ABC 型分佈之差異性



\* 台灣以外其他國家 ABC 型別分佈資料取材自發表文獻

圖十三、親緣性樹狀圖顯示出利用 6 條持家基因所做 MLST 決定 102 株 *C. glabrata* 臨床菌株間與國外歸納之菌株型別 29 型(CG1-CG36)作比較，在 bootstrap value > 78%，類緣關係 99.8% 基準下

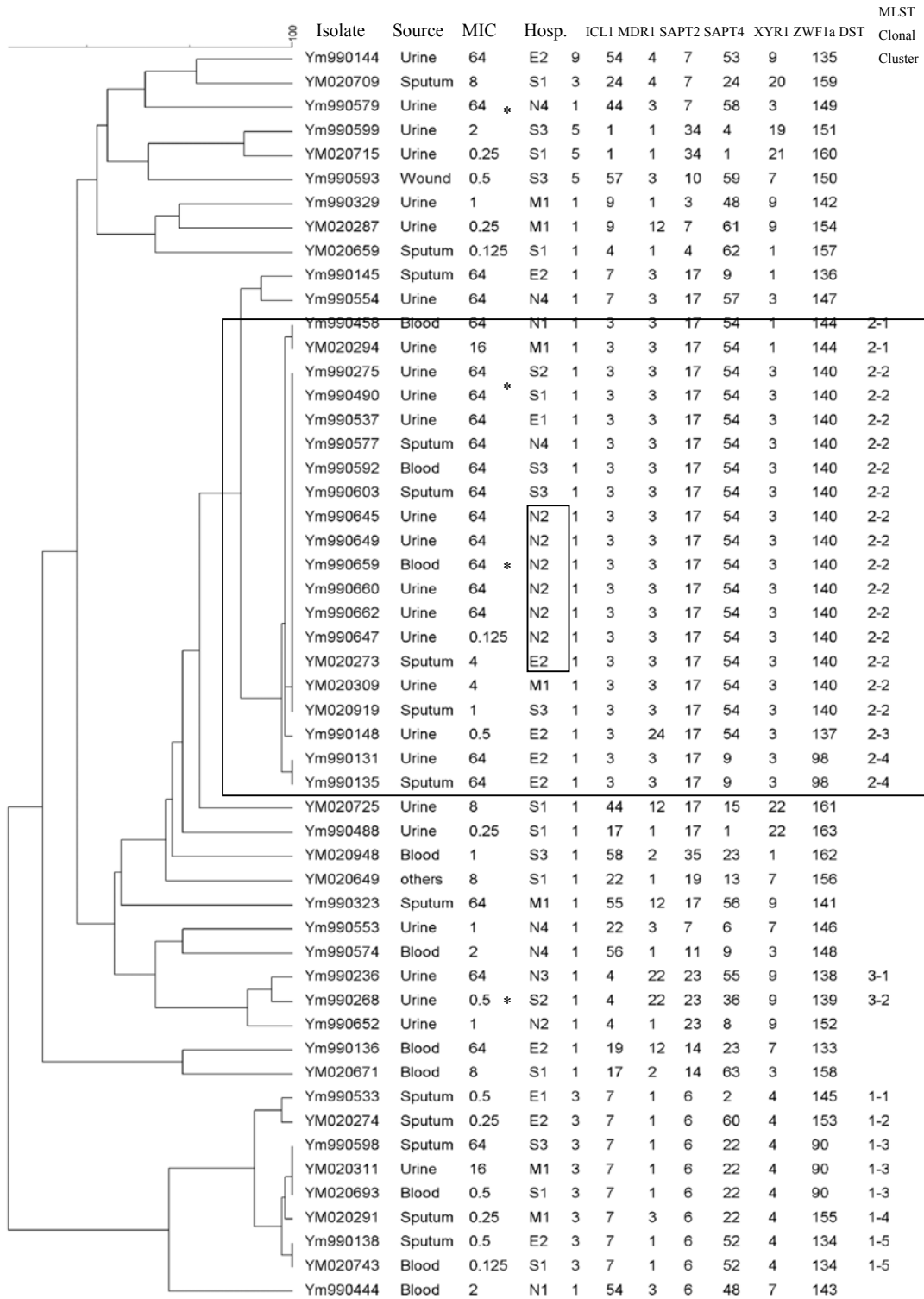




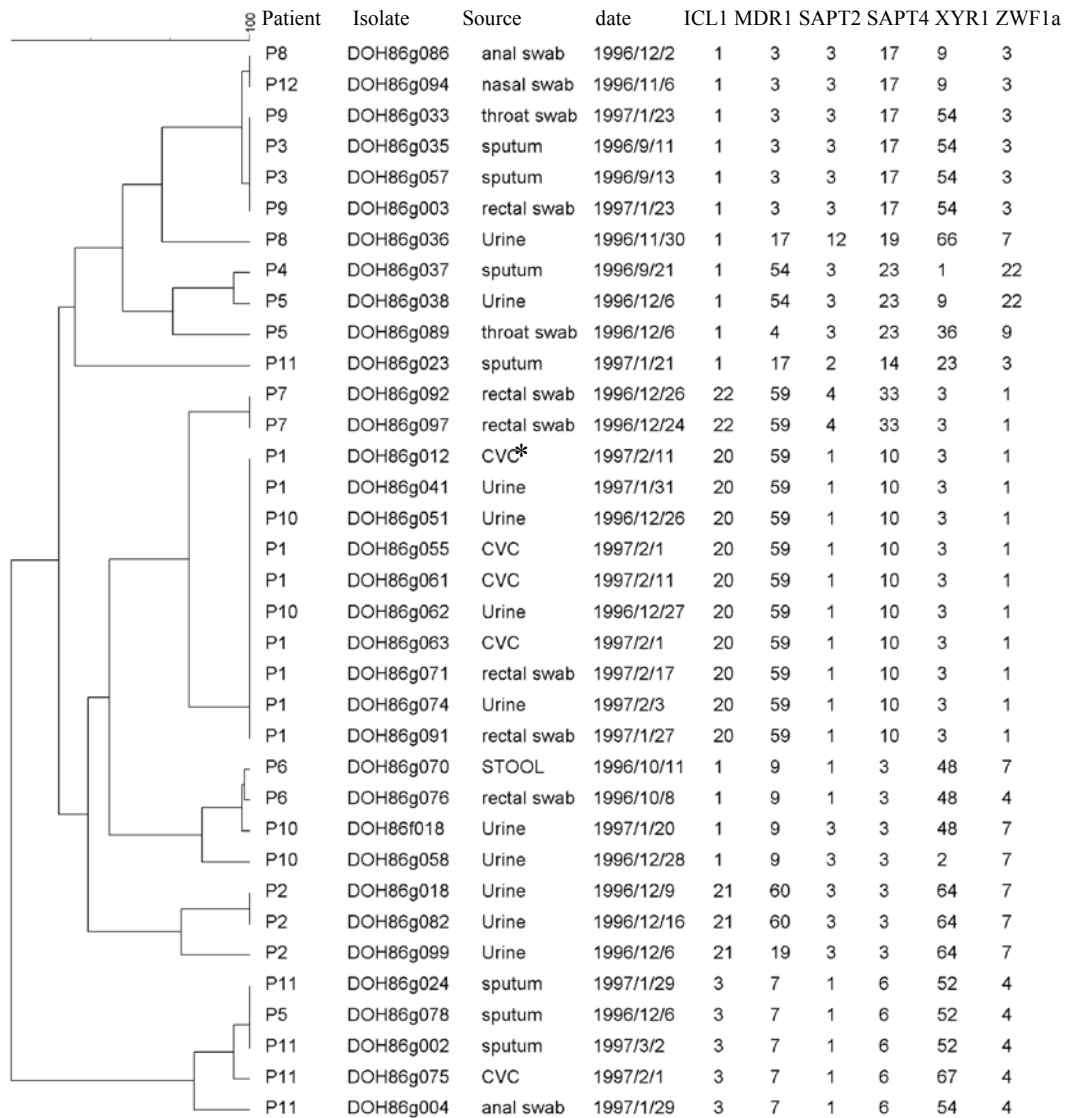
圖十四、將台灣 102 株臨床菌株與國外歸納之 *C. glabrata* 菌株型別 29 型

(CG1-CG36)的資料進行 Minimal spanning tree 運算。每一個圓圈代表一株或一群菌株。連接線條及其長度代表菌株間關係及其類緣性親疏。1: P15, P12, P13-1, P05-3, P04-1, P05-4, P20, P11-3, P11-4, P11-2, P14-2, P14-1, P14-3, P40, P45, P46, P51, P56 CG3 ; 2: P21, P24, P31-1, P31-2, P34-1, P34-2, P34-3, P48, P49 ; 3: P32-1, P32-2, P32-3 ; 4: P44, P52, P54, CG19 ; 5: P38, P39 ; 6: P19, P08-1, P08-3, P08-4, P25, P28-1, P28-2, P47, P53, P58, CG26 ; 7: P17-1, P09-2, P17-2, P09-1, P10-1, P10-2, P10-3, P10-4, P26, CG15 ; 8: P37-1, P37-2, P37-3, CG10 ; 9: CG7, P01-1, P01-2, P02-1, P02-2, P02-3, P03-1, P03-2, P03-3, P04-2, P04-3, P05-1, P05-2, P06-1, P06-2, P06-3, P16-1, P18-1, P23, P29-1, P29-2, P33-1, P33-2, P36-1, P36-2, P36-3, P41, P43, P50, P55, P57 ; 10: P11-1, P22, P35-1, P35-2, P35-3 ; 11: P07-1, P07-2, P07-3.

圖十五、親緣性樹狀圖(dendrogram)顯示出利用 6 條持家基因所做 MLST 決定從 52 株國衛院 *C. tropicalis* 分離株之類緣關係 N,北部; S,南部; M,中部; E,西部. \* non-trailing reisolant.



圖十六、親緣性樹狀圖(dendrogram)顯示出利用 6 條持家基因所做 MLST 決定從 35 株台大醫院 *C. tropicalis* 分離株之類緣關係。



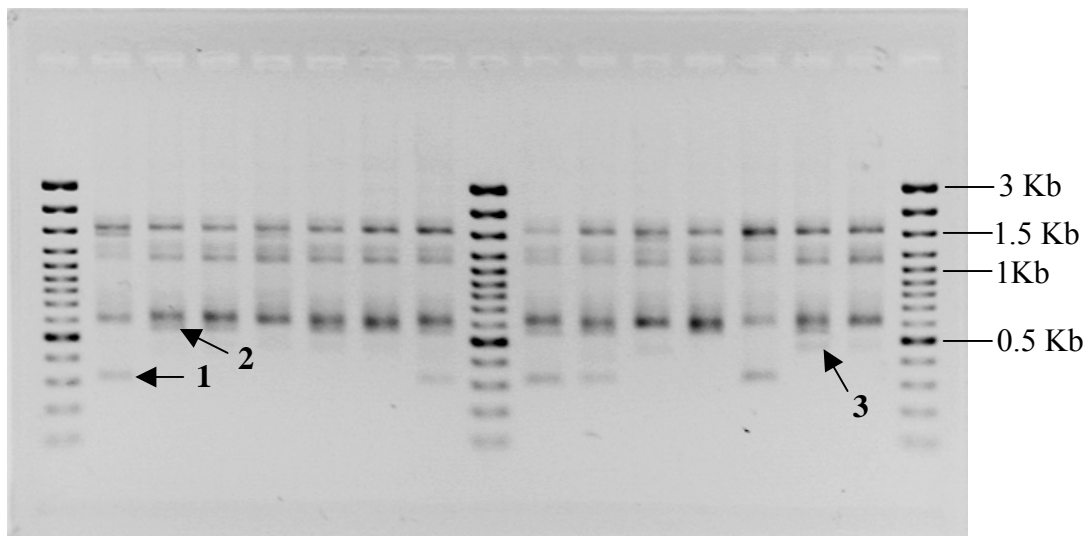
圖十七 *Candida albicans* 之 RAPD 電泳圖

(A) 圖是使用 OPE-03 primer

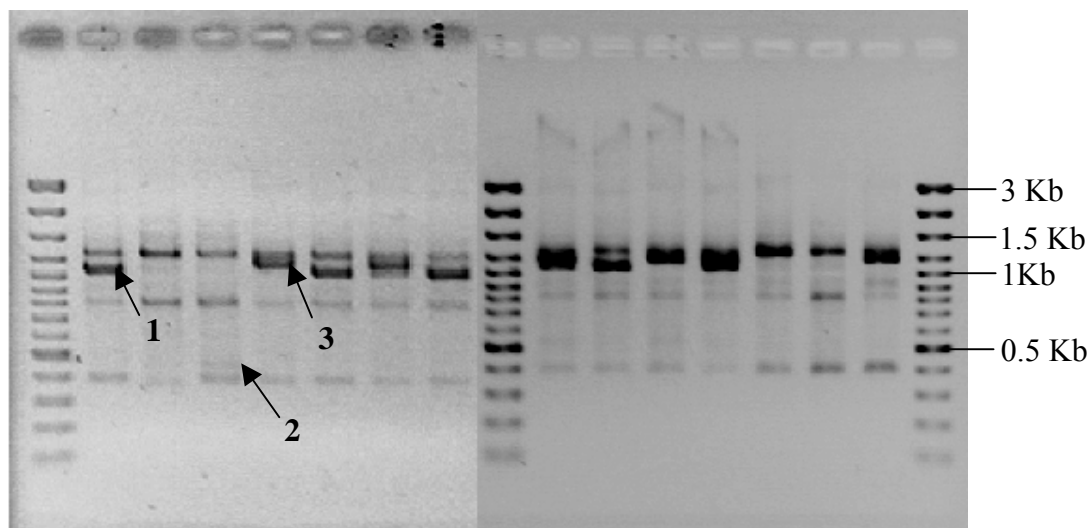
(B) 圖是使用 OPE-04 primer

箭號表示不同菌株間有差異的位置，將這些片段加以選殖至載體並定序。

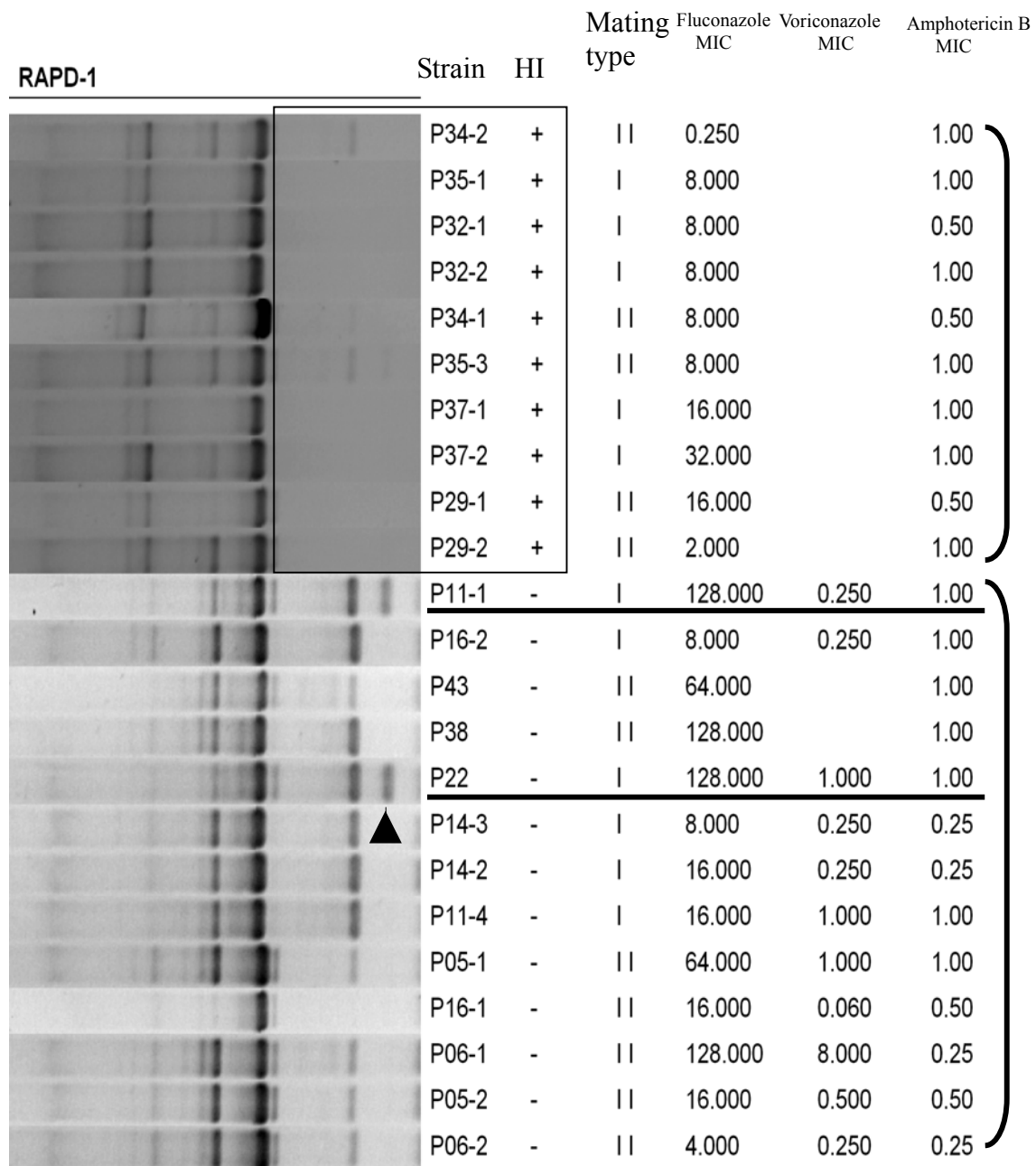
(A) OPE-03



(B) OPE-04

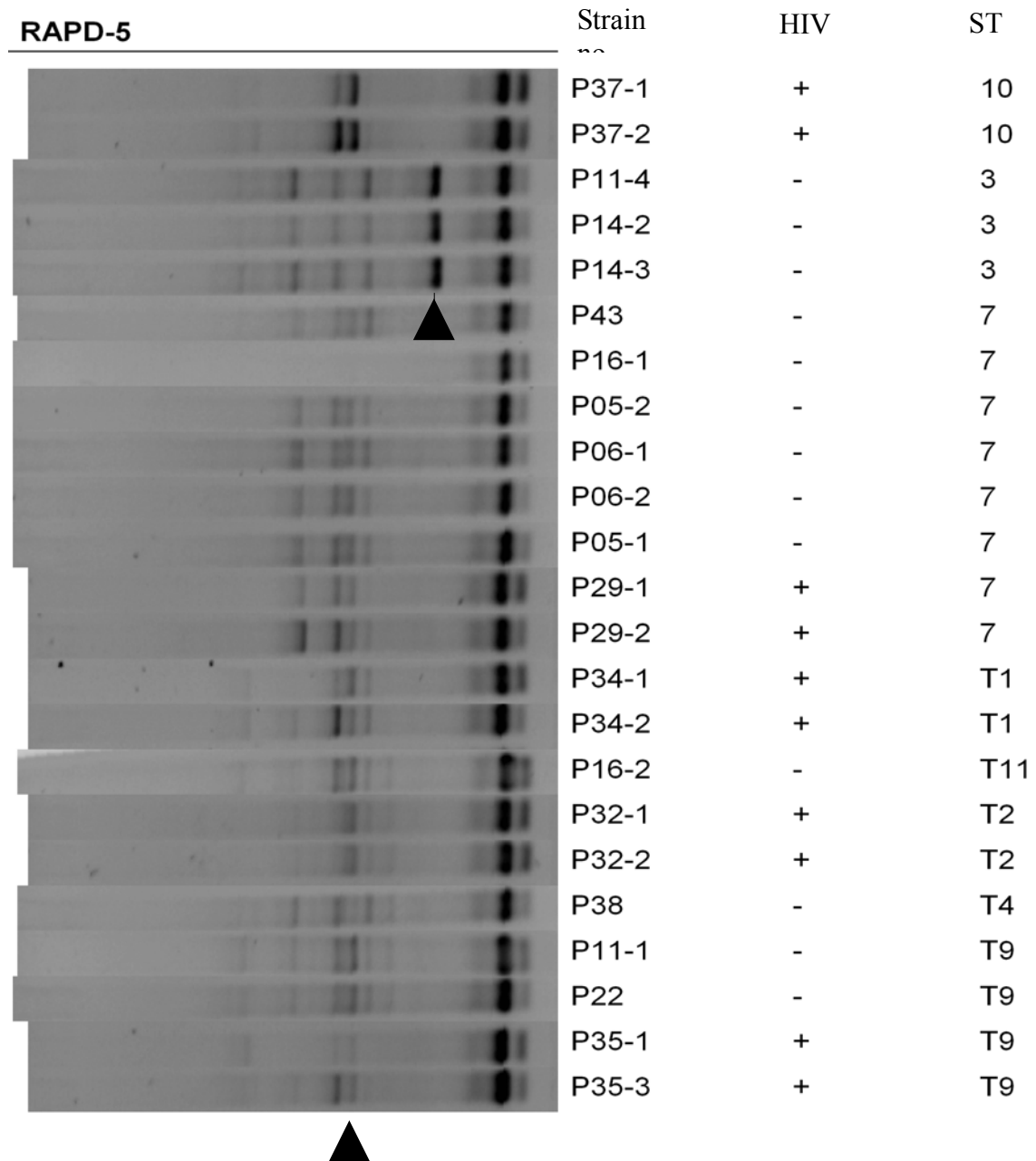


圖十八 *Candida glabrata* 之 EDP4- RAPD 電泳圖，對於愛滋與非愛滋族群，能夠產生一定程度的區分力。在愛滋族群 RAPD 圖譜中，發現小於 700bp 的 DNA 產物明顯缺乏或不如非愛滋族群。另外屬於 mating type I 且達 fluconazole (MIC 128 mg/l) 抗藥性之分離株 P11-1 和 P22，在圖譜中約 280bp 的位置出現特異性之 DNA 片段(箭頭所示)。已將這些片段加以選殖至載體並定序。

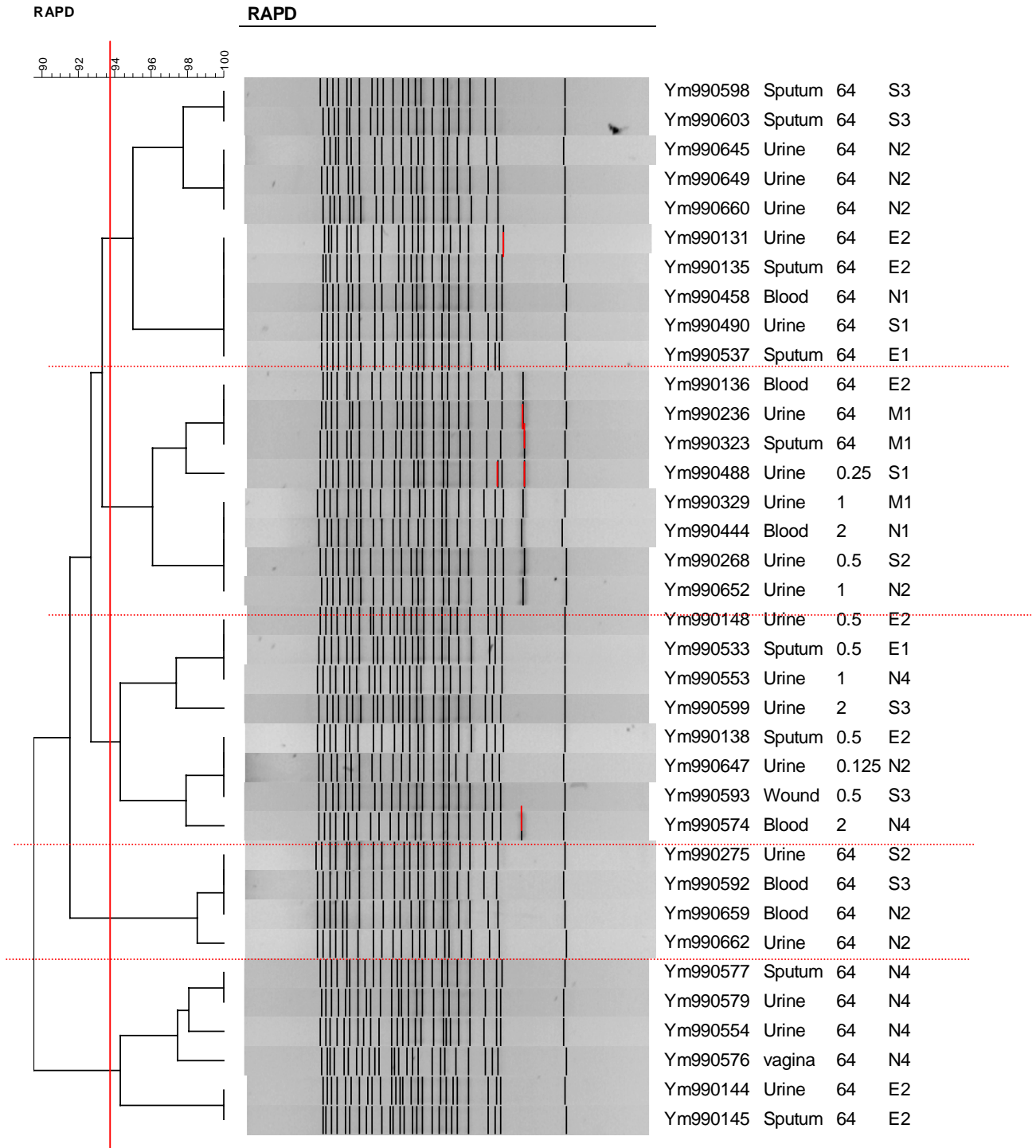




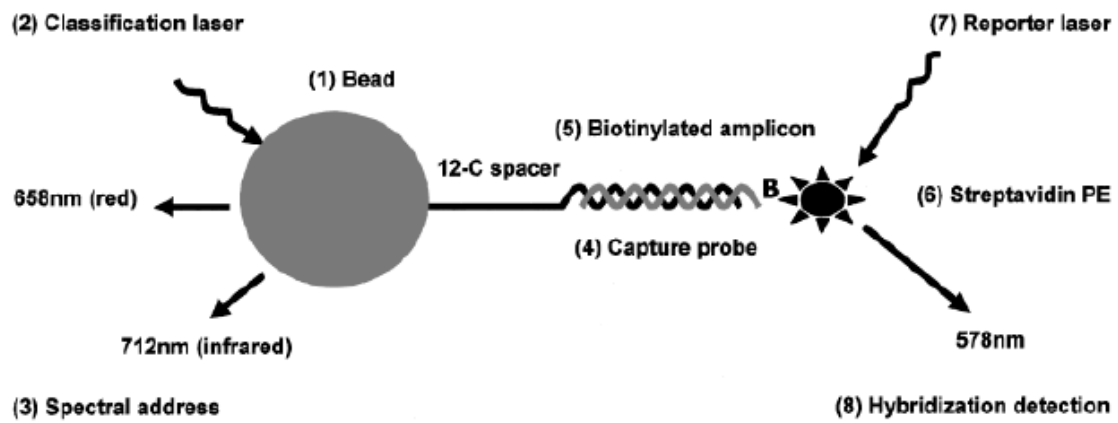
圖十九、利用引子 NS-2 所呈現之 RAPD 圖譜中，對於 ST3 (地理分佈上屬於歐洲)產生一特異性 DNA 片段且在 850bp 中則缺乏一般性 DNA 片段(箭頭所示)，而在愛滋與非愛滋族群以及抗藥性中並未發現任何的區分力。



圖二十、利用引子 RP02 所呈現之 RAPD 圖譜中，對於 36 株 *C. tropicalis* 抗藥性及非抗藥性菌株間之差異片段。



圖二十一、流式微珠陣列之反應原理(圖例摘自<sup>87</sup>)



#### 八、附錄：本計畫產出著作發表成果

本年度著作產出成果共有 SCI 論文十篇(三篇已發表，一篇已接受，三篇已投寄，三篇投寄中)，還有三篇 SCI 論文在撰寫中。

1. Hsiao-Hui Chou, Chien-Shun Chiou, Kuo-Wei Chen, **Shu-Ying Li\*** (2007) The suitable restriction enzymes for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Candida tropicalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* (in press, 通訊作者 Impact factor (IF):2.738, Ranking (Rank) Microbiology 28/86, 32.6%).
2. Kuo-Wei Chen, Yee-Chun Chen, Hsiu-Jung Lo, Frank C. Odds, Tzu-Hui Wang, Chi-Yang Lin, **Shu-Ying Li\*** (2006) Multilocus Sequence Typing for Analyses of Clonality of *Candida albicans* strains in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 44(6):2172-2178 (通訊作者, IF:3.439, Rank Microbiology 20/84, 23.8%)
3. **Li Shu-Ying**, Yang YL, Chen KW, Cheng HH, Chiou CS, Wang TH, Lauderdale TL, Hung CC, Lo HJ. (2006) Molecular Epidemiology of Long-term Colonization of *Candida albicans* Strains from HIV-infected Patients. *Epidemiology and Infection* 134(2):265-9 (第一作者, IF:1.636, Rank Public Health 35/93, 37.6%)
4. JS Wang, **Shu-Ying Li**, Y-L Yang, Hsiao-Hui Chou, H-J Lo (2007) Close Relatedness among Fluconazole Resistant *Candida tropicalis* Isolated from Different Hospitals in Taiwan. *J Med. Microbiol.* (accepted, IF:2.318, Rank. Microbiology 38/86, 44.2%).
5. Hsiao-Hui Chou, Hsiu-Jung Lo, Kuo-Wei Chen, **Shu-Ying Li\*** (2007) Multilocus Sequence Typing of *Candida tropicalis* Shows Clonal Cluster Enriched in Isolates with Resistance or Trailing growth to Fluconazole *Diagn Microbiol Infect Dis.* (通訊作者, submitted).
6. Mei-Hui Liao, Shiang-Ning Leaw, Tsung-Chain Chang, Cheng-Hsiang Hsiao, **Shu-Ying Li\*** (2007) Flow Cytometry/multianalyte profiling system as a High-throughput Fungal Identification System for Medically Important Yeast Species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* (通訊作者, submitted).
7. Mei-Hui Liao, **Shu-Ying Li\*** (2007) Differentiation of fungal species with various fluconazol resistance by PCR-EIA. *Mol. Cell. Probe* (通訊作者, submitted)
8. Kuo-Wei Chen, Yuruzu Mikami, Ayako Sano, **Shu-Ying Li\*** (2007) MLST of *C. albicans* in Taiwan and Japan (通訊作者, submitting).
9. Chi-Yang Lin, Yee-Chun Chen, Hsiu-Jung Lo, Kuo-Wei Chen, **Shu-Ying Li\*** (2007) MLST of *Candida glabrata* in Taiwan (通訊作者, submitting).
10. Hsiao-Hui Chou, Yee-Chun Chen, Kuo-Wei Chen, **Shu-Ying Li\*** (2007) Multilocus Sequence Typing to Study the Molecular Epidemiology of *Candida tropicalis* in ICU Patients (通訊作者, submitting).

11. Yee-Chun Chen, **Shu-Ying Li**, Chih-Yang Lin, Chi-Tai Fang, WH Sheng, SH Liang, Yu-Tsung Huang, Hsin-Yun Sun, Jiun-Ling Wang, Shan-Chwen Chang (2007) Use of A Quantitative Real-Time PCR to Study the Kinetics of *Cryptococcus neoformans* in Blood and CSF
12. Yee-Chun Chen, Kuo-Wei Chen, **Shu-Ying Li**\* (2007) Comparison of 4 molecular typing methods in study of molecular epidemiology of *C. albicans* in ICU (通訊作者).
13. Kuo-Wei Chen, Hsiu-Jung Lo, Yee-Chun Chen, **Shu-Ying Li**\* (2007) MLST of *C. albicans* in HIV patients (submitting) (通訊作者).

## Multilocus Sequence Typing for Analyses of Clonality of *Candida albicans* Strains in Taiwan

Kuo-Wei Chen,<sup>1</sup> Yee-Chun Chen,<sup>2</sup> Hsiu-Jung Lo,<sup>3</sup> Frank C. Odds,<sup>4</sup> Tzu-Hui Wang,<sup>1</sup>  
Chi-Yang Lin,<sup>1</sup> and Shu-Ying Li<sup>1\*</sup>

Laboratory for Mycology, Division of Research and Diagnostics, Center for Disease Control, Taipei, Taiwan<sup>1</sup>; Department of Internal Medicine, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan<sup>2</sup>; Division of Clinical Research, National Health Research Institutes, Taipei, Taiwan<sup>3</sup>; and Aberdeen Fungal Group, Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen AB25 2ZD, United Kingdom<sup>4</sup>

Received 14 February 2006/Returned for modification 22 March 2006/Accepted 1 April 2006

Multilocus sequence typing (MLST) was used to characterize the genetic profiles of 51 *Candida albicans* isolates collected from 12 hospitals in Taiwan. Among the 51 isolates, 16 were epidemiologically unrelated, 28 were isolates from 11 critically ill, human immunodeficiency virus (HIV)-negative patients, and 7 were long-term serial isolates from 3 HIV-positive patients. Internal regions of seven housekeeping genes were sequenced. A total of 83 polymorphic nucleotide sites were identified. Ten to 20 different genotypes were observed at the different loci, resulting, when combined, in 45 unique genotype combinations or diploid sequence types (DSTs). Thirty (36.1%) of the 83 individual changes were synonymous and 53 (63.9%) were nonsynonymous. Due to the diploid nature of *C. albicans*, MLST was more discriminatory than the pulsed-field gel electrophoresis–BssHII-restricted fragment method in discriminating epidemiologically related strains. MLST is able to trace the microevolution over time of *C. albicans* isolates in the same patient. All but one of the DSTs of our Taiwanese strain collections were novel to the internet *C. albicans* DST database (<http://test1.mlst.net/>). The DSTs of *C. albicans* in Taiwan were analyzed together with those of the reference strains and of the strains from the United Kingdom and United States by unweighted-pair group method using average linkages and minimum spanning tree. Our result showed that the DNA type of each isolate was patient specific and associated with ABC type and decade of isolation but not associated with mating type, anatomical source of isolation, hospital origin, or fluconazole resistance patterns.

Invasive *Candida* infections continue to cause major problems of morbidity and mortality in a diverse range of debilitated and immunocompromised hosts and constitute an important public health problem (12, 13, 20, 41, 42). *Candida* species were the leading pathogens of nosocomial bloodstream infection in a large teaching hospital in Taiwan, with *Candida albicans* being the leading cause of *Candida* infections (5, 6). The infections caused by *C. albicans* result in increased lengths of hospital stays and medical costs (31, 34). Furthermore, an outbreak of *C. albicans* fungemia in a neonatal intensive care unit (16) and yeast carriage on hands of healthcare workers in that intensive care unit were identified (15). The increasing frequency of invasive candidal infections in Taiwan and their severe outcome has underscored the importance of the understanding of the molecular epidemiology of fungal infections.

Molecular typing methods used to assess clonality of *C. albicans* include pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)-based typing methods (4), restriction fragment length polymorphism (10, 29), restriction fragment length polymorphism followed by Ca3 probe hybridization (19, 40), and randomly amplified polymorphic DNA analysis (33). More recently developed typing methods include amplified fragment length polymorphism (1), multilocus microsatellite gene analysis (11, 25), and analysis of variable numbers of tandem repeats (24). The choice of ap-

propriate typing methods depends on the purpose of the study. Molecular typing methods should be reproducible, discriminatory, digitally portable, and amenable to standardization and have high throughput (35).

Recently, multilocus sequence typing (MLST) has been developed to meet the increasing need for global surveillance and comparison of genotypes in a central database via the internet. MLST is based on the sequencing of 6 to 7 selected housekeeping genes and identification of polymorphic nucleotide sites. Combination of the alleles at the different loci results in unique diploid sequence types (DSTs) that can be used to discriminate *C. albicans* strains (2, 3, 37). MLST provides a robust and unambiguous characterization system to evaluate the worldwide diversity and epidemiology of pathogens and is truly portable between laboratories. MLST for typing of pathogenic fungal species has been developed, such as *Candida glabrata* (9), *Candida tropicalis* (38), *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus flavus*, *Coccidioides immitis* (21), and the *Fusarium oxysporum* complex (28). A consensus set of 7 genes encoding housekeeping functions comprising the fragments *AAT1a*, *ACC1*, *ADP1*, *MPIb*, *SYA1*, *VPS13*, and *ZWF1b* is recommended for MLST with *C. albicans* ([http://test1.mlst.net](http://test1.mlst.net/)) (3).

In this study, we use MLST to assess the clonality of *C. albicans* and to ascertain whether different characteristics (e.g., fluconazole resistance, patient or hospital origin, source, or decade of isolation) can be attributed to certain specific MLST DSTs in Taiwan. The purpose of this study was to evaluate the usefulness of MLST relative to PFGE–BssHII fingerprinting tools for discriminating among strains of *C. albicans*. The data

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratory for Mycology, Division of Research and Diagnostics, Center for Disease Control, No. 161, Kun-Yang Street, Taipei, Taiwan. Phone: 886 2 26531388. Fax: 886 2 26513572. E-mail: syl@cdc.gov.tw.

## SHORT REPORT

# Molecular epidemiology of long-term colonization of *Candida albicans* strains from HIV-infected patients

S. Y. LI<sup>1</sup>, Y. L. YANG<sup>2</sup>, K. W. CHEN<sup>1</sup>, H. H. CHENG<sup>3</sup>, C. S. CHIOU<sup>1</sup>, T. H. WANG<sup>1</sup>,  
T. L. LAUDERDALE<sup>3</sup>, C. C. HUNG<sup>4</sup> AND H. J. LO<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Division of Laboratory Research and Development, Center for Disease Control, Taipei, Taiwan, ROC

<sup>2</sup> Department of Biological Science and Technology, National Chiao Tung University, Hsinchu, Taiwan, ROC

<sup>3</sup> Division of Clinical Research, National Health Research Institutes, Miaoli, Taiwan, ROC

<sup>4</sup> Section of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, National Taiwan University Hospital and Department of Parasitology, National Taiwan University College of Medicine, Taipei, Taiwan, ROC

(Accepted 9 May 2005)

## SUMMARY

Twenty-one *Candida albicans* isolates from three HIV-infected patients were collected over a period of 3 years and characterized for fluconazole susceptibility, infectivity and genetic relatedness. Fluconazole resistance was found in five isolates, four exhibited dose-dependent susceptibility and the remainder were fully susceptible to this agent. Pulsed-field gel electrophoresis of *Sfi*I restriction digests of the genomic DNA from the isolates revealed that isolates from the same swab specimen were identical despite differences in susceptibility to fluconazole and isolates recovered over time from the three patients retained clonally related DNA fingerprints within each patient. This small-scale study confirms the persistence of oral colonization of *C. albicans* strains in HIV-infected patients. Clinical data also suggests that the primary infecting strain may become a persistent colonist in the oral cavity once the immune function of the patient has been restored.

*Candida albicans* and other opportunistic fungal pathogens are frequent colonizers of human mucosal surfaces. They are often harmless commensals in immunocompetent individuals but may be associated with minor infections such as thrush in babies and vaginal infections in women. However, in immunocompromised patients *C. albicans* can cause systemic infections with high mortality rates [1].

The advent of the AIDS epidemic together with improvements in therapeutics and other medical procedures have increased the size of the immunocompromised population and this has resulted in dramatic increases in the prevalence of fungal

infections [2, 3]. For instance, in the United States yeast infections as a group was reported to rank as the fourth most common cause of nosocomial bloodstream infections [4, 5]. Similarly in a Taiwan hospital the prevalence of nosocomial candidemia increased 27-fold from 1981 to 1993 [6].

Oral candidiasis has been recognized as an early expression of the immunodeficiency that occurs in HIV-infected patients [7]. Indeed, unexplained oral candidiasis is considered as a clinical predictor of AIDS in previously healthy adults or worsening immunodeficiency in HIV-infected patients [8]. Oropharyngeal candidiasis due to drug-resistant fungi is a major problem for HIV-infected patients [9]. In addition, horizontal transmission of drug-resistant *C. albicans* has been demonstrated within a family [10, 11]. Hence, alteration of susceptibility of isolates

\* Author for correspondence: Dr H. J. Lo, Division of Clinical Research, National Health Research Institutes, 35 Keyan Road, Zhunan Town, Miaoli County, 350, Taiwan, ROC.  
(Email: hjlo@nhri.org.tw)





## Suitable restriction enzymes for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Candida tropicalis*

Hsiao-Hui Chou<sup>a</sup>, Chien-Shun Chiou<sup>b</sup>, Kuo-Wei Chen<sup>a</sup>, Shu-Ying Li<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Mycotic Diseases Laboratory, Center of Research and Diagnostics, Centers for Disease Control, Taipei 11561, Taiwan

<sup>b</sup>The Central Region Laboratory, Centers for Disease Control, Taichung 40855, Taiwan

Received 21 July 2006; accepted 26 September 2006

### Abstract

This study was designed to pursue the identification of optimal restriction enzyme for pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *Candida tropicalis*. Twelve restriction enzymes were tested on *C. tropicalis* strains. Our results indicate that *Bss*HIII, *Nae*I, and *Rsr*II were useful enzymes for PFGE analysis, and *Nae*I was the best for PFGE analysis of *C. tropicalis* isolates.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** *Candida tropicalis*; PFGE; Restriction enzyme; Molecular typing

*Candida tropicalis* is one of the most commonly isolated *Candida* spp. other than *Candida albicans* (Cheng et al., 2004; Pfäler et al., 2000; Yang et al., 2005). In Taiwan, *C. tropicalis* was ranked the 2nd most frequently isolated *Candida* spp. and was also observed to be highly resistant to fluconazole (Yang et al., 2005). Standardization of molecular subtyping methods for *C. tropicalis* strains is necessary to gain insight into explanations for the increase of *C. tropicalis*, as well as to establish a surveillance network. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is a highly discriminatory subtyping method for outbreak investigation and for studies of genetic relatedness of fungal pathogens, including *C. tropicalis* (Doebbeling et al., 1993; Jang et al., 2005). The choice of restriction enzyme(s) is the key for standardizing the PFGE protocol for a fungal species. Among the restriction enzymes for PFGE of *C. tropicalis* is the *Sfi*I, which has been used for studies of *C. tropicalis* isolates in the intensive care unit (ICU) (Kanellopoulou et al., 2001). In another study, *Bss*HIII has been recommended (Rho et al., 2004). However, no systemic comparison studies were done as to the choice of the optimal enzyme for PFGE of *C. tropicalis*.

To identify the optimal restriction enzyme for PFGE analysis of *C. tropicalis*, we selected a set of restriction enzymes based on the predicted average fragment sizes for *Saccharomyces cerevisiae*, which has an AT-rich genome, similar to *C. tropicalis*. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbicommons/products/category1.asp?#2>). The index of average fragment size of *Bss*HIII is 27000 bp. We selected 11 enzymes yielding fragments comparable with *Bss*HIII. The results of the PFGE analysis of *C. tropicalis* reference strain (ATCC13803) using different restriction enzymes are shown in Fig. 1. The numbers of fragments generated by different restriction enzymes is shown in Fig. 1. Digestion with 4 enzymes (*Bbv*CI, *Nhe*I, *Pae*I, and *Pme*I) generated many bands, with sizes ranging between 33.3 and 244.4 kb, that were not clearly resolved in the gel. Chromosomal DNA digested with *Sbf*I and *Sfi*I generated few bands. No digestion occurred with *Eag*I. The number of fragments yielded by digestion with *Sma*I was comparable with that of *Bss*HIII; however, most of the *Sma*I-digested fragments were crowded into the lower molecular weight range. Because the digestion with *Nae*I, *Rsr*II, and *Sgr*AI were evenly distributed over a wider molecular weight range, we decided to use them to compare with *Bss*HIII.

A total number of 34 *C. tropicalis* clinical strains were used for further evaluation. This panel of clinical isolates was collected from 10 hospitals in different geographic regions of Taiwan during 1999 (Yang et al., 2003). The strains were inoculated on Sabouraud Dextrose Agar (Difco

\* Corresponding author. Mycotic Diseases Laboratory, Center of Research and Diagnostics, Centers for Disease Control, No. 161, Kun-Yang Street, Taipei, Taiwan. Tel.: +886-2-26531388; fax: +886-2-26513572.

E-mail address: syl@cdc.gov.tw (S.-Y. Li).



Multilocus Sequence Typing of *Candida tropicalis* Shows Clonal Cluster Enriched in Isolates  
with Resistance or Trailing growth of Fluconazole

Hsiao-Hui Chou<sup>1</sup>, Hsiu-Jung Lo<sup>2</sup>, Kuo-Wei Chen<sup>1</sup>, Mei-Hui Liao<sup>1</sup>, Shu-Ying Li<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Mycotic Diseases Laboratory, Center of Research and Diagnostics, No. 161, Kun-Yang Street, 11561 Taipei, Centers for Disease Control, Taipei 11561, Taiwan.*

<sup>2</sup> *Division of Clinical Research, National Health Research Institutes, 35 Keyan Road, Zhunan Town, Miaoli County 35053, Taiwan.*

***Abstract***

Multilocus sequence typing (MLST) was used to characterize the genetic profiles of 52 *Candida tropicalis* isolates collected from 10 hospitals in Taiwan. A total of 33 DSTs were differentiated among the 52 isolates and all were novel to the Internet *C. tropicalis* DST database ([pubmlst.org/ctropicalis/](http://pubmlst.org/ctropicalis/)). Eleven (33.3%) of the 33 DSTs could be assigned to three major clonal clusters (1-3) based on e-Burst calculation. Only clonal cluster 1 co-clustered isolates from UK and USA. Clonal cluster 2 was enriched with isolates with resistance or trailing growth of fluconazole (14/20, 70%). Furthermore, there are a number of pulsotypes associated with the isolates in this cluster, demonstrating that possibly more than one clones with resistant or trailing property have emerged and spread in Taiwan in 1999.

**Association between Fluconazole Susceptibility and Genetic Relatedness among *Candida tropicalis* Isolates in Taiwan**

Jang-Shiun Wang<sup>1,2</sup>, **Shu-Ying Li**<sup>3</sup>, Yun-Liang Yang<sup>4</sup>, Hsiao-Hui Chou<sup>3</sup>, Hsiu-Jung Lo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Institute of Life Sciences, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan,  
Republic of China

<sup>2</sup>Division of Clinical Research, National Health Research Institutes, Miaoli County, Taiwan,  
Republic of China

<sup>3</sup>Division of Laboratory Research and Development, Center for Disease Control, Taipei,  
Taiwan, Republic of China

<sup>4</sup>Department of Biological Science and Technology, National Chiao Tung University, Hsinchu,  
Taiwan, Republic of China

**SUMMARY**

Among the 162 *Candida tropicalis* isolates collected in Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts (TSARY) in 1999, 23 (14.2%) isolates had fluconazole minimum inhibitory concentrations (MICs)  $\geq 64 \text{ mg l}^{-1}$ , and thus fulfilling the definition as resistant ones. Random amplified polymorphic DNA assay showed that all 23 fluconazole resistant *C. tropicalis* isolates collected from different hospitals around Taiwan were closely related. Two distinguish pulsotypes associated with fluconazole susceptibility were identified when these 23 resistant isolates along with 13 susceptible ones were analyzed by pulsed field gel electrophoresis.

## 誌謝

本計畫擬向提供臨床酵母菌株及其相關資料之日本千葉大學病原真菌研究所所長三上襄教授(Director, Prof. Yuzuru Mikami)、奈及利亞大學微生物學研究所Dr. Nweze Emeka Innocent、台大醫院陳宜君醫生及國家衛生研究院羅秀容博士及國內22家醫院致最大謝意，這22家醫院為：台大醫院，林口長庚醫院，基隆長庚醫院，新竹醫院，羅東博愛醫院，聖瑪麗醫院，台北市立陽明醫院，台北市立仁愛醫院，桃園綜合醫院，台安醫院，辜基金會孫逸仙癌症中心，三軍總醫院，光田綜合醫院，台中榮民總醫院，仁愛綜合醫院，奇美醫院，高雄醫學院附設醫院，高雄三軍醫院，台南市立醫院，高雄榮民總醫院，花蓮佛教慈濟綜合醫院，馬偕醫院台東分院。以及成大張長泉教授提供之探針序列設計參考及菌血症檢體。在此亦感謝本局315核心實驗室同仁在核酸定序相關試驗上之協助。