

計畫編號：DOH98-DC-2005

行政院衛生署疾病管制局九十八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-IV

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、林郁欣、林鈺棋、廖美惠、夏可強、
黃仲德、林昆彥

執行期間：98年01月01日至98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	13
一、 前言	13
二、 材料與方法	35
三、 結果	45
四、 討論	67
五、 結論與建議	81
六、 參考文獻	90
七、 圖、表	103
八、 附錄	146

共 147 頁

計畫摘要：

(1)中文摘要：

中文關鍵詞：念珠菌、院內感染病原菌、鮑氏不動桿菌、金黃色葡萄球菌、綠膿桿菌、肺炎黴漿菌、抗藥性基因、快速多重檢測、流式微珠陣列

病原真菌及多種院內感染病原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，有助於釐清各類病原菌傳播特性，進而研擬更精確之防治對策。此外，持續監測並即時展現國內病原之型別及特性（病原性、抗藥性）數據，參與全球病原型別及其特性調查。深入探討抗藥性及致病病性機制，可為未來疫苗的參採或檢驗試劑開發之參考。

本計畫針對真菌及院內感染抗藥性病原及擴大收集國內及國際菌株，發展快速精確鑑定及分型方法。臨床上建立整合臨床、流病及分子型別之資料庫。防治方面參與國際型別資料監測及交換並針對流行案例進行調查，以鑑別國內高危險族群特性，瞭解國內流行概況及與國際疫情之相關性並作為防治策略擬定之參考。為增加科學貢獻，深入探討抗藥性及致病病性機制，能有助於試劑藥物之

研發。

我們的主要進展有八：**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26種臨床重要絲狀黴菌的種別如 *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Coccidioides* spp., *Rhizomucor pusillus*, *Penicillium marneffeii*, *Paecilomyces javanicus*, *Saksenaea vasiformis*, *Apophysomyces elegans*, *Absidia corymbifera* 和 *Syncephalastrum racemosum*。此方法特異性高，僅 *Mucor racemosus* (Murac)的探針會與 *Mucor hiemalis* 和 *Mucor ramosissimus* 交叉反應。敏感度為 100 fg ~ 1 ng。整個流程包含核酸增幅可於5小時內完成。**第二**、成功開發流式微珠陣列系統，可單管快速正確地鑑定台灣院內感染最重要三種病原細菌：不動桿菌、金黃色葡萄球菌以及綠膿桿菌及一種真菌：白色念珠菌，敏感度可高達1-10 pg DNA。**第三**、發展院內感染多重抗藥性細菌抗藥性基因的快速多重檢測平台。方法為利用單步驟巢式多重PCR 從methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)、community associated MRSA (CA-MRSA)、methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE)、vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE)、carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA)、carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. (CRAB)和 ciprofloxacin-resistant (CipR)

Enterobacteriaceae等院內感染細菌增幅*gyrA*、*mecA*、*vanA*、*blaIMP*、*blaVIM*、*ISAbal-blaOXA-23*和 *ISAbal-blaOXA-51-like*等7種所謂最後線抗藥性基因(last resort antibiotic-resistant genes)，外加 *pvl* 基因。此方法敏感度及特異性均高，整個流程可於4小時內完成。準確快速的鑑別這些抗藥性基因可望有助於治療及防治。第四、發展快速鑑定不動桿菌對ciprofloxacin 抗藥性針對*gyrA*基因點突變之real-time PCR方法。本研究同時也鑑定出不種別的*Acinetobacter* spp.具有不同形式的carbapenemase相關基因。進而發現外膜蛋白中OprD的缺失可能造成 *Acinetobacter* genospecies 13TU減少對於imipenem的敏感度。並調查台灣不同不動桿菌基因型抗藥性機的分佈情形。第五、分析熱帶念珠菌的分子流行病學，顯示同一病人的多重菌株雖有些有微演化，但多半維持同一型別。且我們發現對flucytosine降低感受性的熱帶念珠菌菌株(DST164)在不同病人同時出現。第六、分析來自71病人的97株副禿髮念珠菌的分子流行病學，分析ITS2序列發現其中實際台灣的*C. parapsilosis* 實際上85.9% (61/71)是*C. parapsilosis sensu stricto*，8.5% (6/71)是*Candida orthopsilosis*而 5.6% (4/71)是*Candida metapsilosis*。此區分也與BssHII-PFGE 的類緣分析吻合。*C. metapsilosis* 的菌株對fluconazole 較有抗藥性；*C. parapsilosis sensu stricto* 對echinocandins 降低感受性。此3基因型好感染的部位似乎也

不同，顯現3者的精確區分具有臨床及治療意義。**第七**、持續應用 MLST分析台灣菌株外，並與國際菌株進行類緣性分析，以進一步調查流病關聯性，及地理趨適性的分子機轉。**第八**、使用光學圖譜(optical mapping)技術針對鮑氏不動桿菌多重抗藥性菌株進行全基因體分析，由於這項技術可以建構完整且原位排序基因限制酵素圖譜，並與已知全基因序列的七株標準菌株共做分析比較，觀察基因的重組排列，包含插入序列(insertion)、遺失序列(deletion)、反轉序列(inversions)或者雙倍序列(duplications)等情況。

本年度研究成果至少有 SCI 論文十一篇(3 篇已發表，1 篇列印中中，1 篇修改接受中，3 篇已投寄，2 篇投寄中，1 篇撰寫中)，專利一篇(申請中)。我們的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。國際上持續建立合作關係，交換型別資訊或提供訓練。希望藉由持續努力瞭解病原可能傳播流行及特定高抗藥性/高致病性株系崛起之情形。甚且探勘出特異性流病、檢驗及疫苗標誌分子。

(2)Abstract :

Keywords : *Candida* spp., Nosocomial pathogens, *Staphylococcus aureus*,
Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter baumannii*,
Mycoplasma pneumoniae, suspension bead array

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

This research is aiming at developing rapid species identification method, standardized typing methods, systematically collect more domestic and international isolates, integrate clinical, epidemiological data with typing data to establish a database.

Identify significant clonal clusters and explore the specific differences at molecular levels. We also try to study the resistance and resistance mechanisms to have more scientific impact. Our major findings can be summarized into seven points: **Firstly**, We

have developed a microsphere-based suspension array (MSA) for the identification of 26 medically important mold pathogens including *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Coccidioides* spp., *Rhizomucor pusillus*, *Penicillium marneffeii*, *Paecilomyces javanicuss*, *Saksenaea vasiformis*, *Apophysomyces elegans*, *Absidia corymbifera*, and *Syncephalastrum racemosum*. Twenty-three oligonucleotide probes were designed based on the internal transcribed spacer (ITS2) region for species level identification of molds. Among the 23 probes, 3 probes are shared by more than one species due to low or absence of sequence variability, i.e. Coci for *Coccidioides immitis/ Coccidioides posadasii*, Rpam for *Rhizopus azygosporus/Rhizopus microsporus* and Fumop for *Fusarium moniliforme/F. oxysporum/ F. pallidoroseum*. No cross-reactivity was identified except for probes of *Mucor racemosus* (Murac) which cross react with *Mucor hiemalis* and *Mucor ramosissimus*. The sensitivity of MSA is 100 fg to 1 ng. The whole procedure including DNA extraction and PCR amplification can be finished within 5 hours. The MSA is simple, rapid, specific, high throughput and capable of multiple species

detection of clinically important molds, and can complement existing diagnostic methods and be integrated in clinical diagnostic workflow at a low cost. **Secondly**, we develop a microsphere suspension array assay for rapid and accurate identification of four most important nosocomial pathogens, namely *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*. The sensitivity of detection is 1-10 pg DNA.

Thirdly, we developed a one-step nested multiplex PCR for amplification the 7 last resort antibiotic-resistant genes, including *gyrA*, *mecA*, *vanA*, *blaIMP*, *blaVIM*, IS*Aba1-blaOXA-23*, and IS*Aba1-blaOXA-51*-like genes in addition to the *pvl* gene, from the commonly nosocomial bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), community associated MRSA (CA-MRSA), methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE), carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA), carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. (CRAB), and ciprofloxacin-resistant (CipR) Enterobacteriaceae. A Luminex array system was used to detect these multiplex PCR products. This

platform has high sensitivity, specificity and can be completed within 4 h. Rapid and accurate identification of these last resort antibiotic-resistant genes is potential to help therapy regimen and prevent further dissemination of antibiotic-resistant bacteria.

Fourthly, we develop a real-time PCR targeting the mutation of *gyrA* gene of *Acinetobacter* spp. to detect the Ciprofloxacin resistant *Acinetobacter* spp. isolates. Differences in carbapenemase-associated genes in distinct *Acinetobacter* spp were identified. In addition, we found that loss of OprD porin may be associated with a reduced susceptibility to imipenem in *Acinetobacter* genospecies 13TU. We also investigated distribution of resistance genes among different *Acinetobacter* spp. **Fifthly**, we conduct study on the molecular epidemiology of *Candida tropicalis* in ICU patients and found that same DST persist in each patients with microevolution. Furthermore, one DST (DST 164) of *C. tropicalis* with reduced susceptibility to flucytosine was identified from different patients.

Sixthly, Among the 71 non-duplicate isolates of the *C. parapsilosis* species complex, 85.9% (61/71) were identified as *C. parapsilosis* sensu stricto, 5.6% (4/71) as *C. metapsilosis* and 8.5% (6/71) as *C.*

orthopsilosis species based on sequences of ITS 2. The delineation of the three species could also be achieved by *Bss*HIII-PFGE at 75% similarity. Antifungal susceptibility tests showed that most isolates were susceptible to flucytosine, fluconazole, voriconazole and amphotericin B, with 2 *C. metapsilosis* isolates showing resistance to fluconazole and 1 susceptible dose dependent. In contrast, the *C. parapsilosis* sensu stricto isolates in this study were less susceptible to echinocandins, with a MIC borderline (MICs ≥ 2) in all isolates totaling to 80% (78/97) for caspofungin and 32% (31/97) for micafungin. The blood specimens (60.8%, 59/97) were the predominant specimen type especially for *C. parapsilosis* sensu stricto (66.7%, 54/81). Additionally, it is notable that a higher proportion (42.8%, 3/7) of *C. orthopsilosis* was found to be associated with skin related anatomic origin. **Seventhly**, we continue strain typing of *Candida* spp. by MLST and analyse the strain relatedness with international data to find out the epidemiological links and the geographical preferences. **Eighthly**, we use novel optical mapping technique to map whole genome of a multiple drug resistant *A. baumanei* strain. The in situ restriction map was compared to

7 in silico restriction maps of the reference strains which are already whole genome sequenced to identify gene rearrangement such as insertion, deletion, inversions or duplications.

At least 11 SCI papers have been generated: 3 papers have already been published, 1 in press , 1 revised , 3 submitted , 2 submitting and 1 in preparation. One patent application is ongoing. Furthermore, we will feedback the subtyping data to clinicians for refining their therapy regimen and collaborate to establish databases integrating typing results with clinical and epidemiological data.and provide research findings to control divisions for fine-tuning of their control strategies. Our continuous efforts will eventually help to identify crucial points for disease intervention and display our strength and commitment in global participation and international collaboration. Such continuous efforts will help to understand the epidemiology as well as the evolution mechanisms of some high resistant/virulent clones, which can potentially help to identify specific diagnostic, vaccine, and epidemiological marker molecules.

本文

一、前言：

近年來因愛滋病毒的肆虐及先進醫療行為等因素，使得侵襲性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¹⁻⁵。侵襲性真菌感染造成接受癌症或器官移植的患者免疫抑制的化療和免疫缺損病患族群造成合併症(morbidity)及死亡(mortality)的主要原因⁶⁻¹⁰。除上述機緣性感染之案例外，肇因於都市發展、人口遷移及環境之變遷、地震等天災及氣候之異象，亦助長了真菌如 *coccidioidomycosis*^{11,12}、*histoplasmosis*¹³⁻¹⁵ 及 *blastomycosis* 等雙型性高致病性真菌之感染趨勢¹⁶。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¹⁷ 及抗藥性菌株的浮現更增加問題的棘手性。由於抗生素大量使用、重病孱弱及免疫低下患者的增加、長期住院、院感措施鬆懈均助長院內感染之發生及抗藥性菌株之增加。不同的院內感染病原有其獨特流行傳播途徑、好發危險因子及抗藥性特性。快速及精確的鑑定院內感染病原種別，可協助釐清感染源，進而有助於落實感控措施。

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¹⁸。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¹⁹。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²⁰。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²¹。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^{22,23}。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²⁴。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^{25,26}。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^{27,28}。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。

抗真菌藥物仍有許多改善的空間^{29,30}。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³¹，更增加問題的棘手性。如 *C. lusitaniae* 對 amphotericin B 容易產生抗藥性³²。*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³³，*C. dubliniensis* 和 *C. tropicalis* 非常容易產生 fluconazole 的抗藥性^{14,34-37}。*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³⁸。早期精確鑑定出種

別，對醫師選擇藥劑種類及劑量十分必要，此舉可望有助於精確投藥，節約昂貴藥物的治療費用，並避免產生副作用及抗藥性。除此而外，真菌種別的鑑定在流行病學上也是重要的，例如在醫院的病房或場所反覆鑑定出特定的菌種可能顯示是爆發的來源，尤其這個菌種的發生率比平時高或為罕見菌種(如 *C. lusitaniae*, *C. lipolytica*)時³⁹。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⁴⁰。可見早期及正確的診斷有助於病害診療及防治^{41,42}。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 Ink⁴³，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⁴⁴，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

⁴⁵。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⁴⁶。例如，利用樹脂凝集試驗法(LA)檢測 *C. neoformans* 抗原⁴⁷，以三明治酵素免疫反應(EIA)⁴⁸，免疫螢光染色(IF)⁴⁹ 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⁵⁰。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⁵¹⁻⁵⁴，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^{55,56}。

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^{42,57}。以PCR配合酵素免疫檢測法EIA或RFLP技術^{58,59}以及核酸雜合法^{60,61} 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*⁶² 之文獻。此外如應用在*Aspergillus spp*⁶³ , *Candida spp.*^{64,65} , *C. neoformans*⁶⁶ , *Penicillium marneffeii*及重要的雙型性酵母菌⁶⁷ 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⁶⁸。吾人日前發展出可鑑定7種臨床上常見真菌種別之PCR-EIA⁶⁹。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⁷⁰。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^{71,72}，針對基因標的為ITS2或large subunit ribosomal DNA，可鑑定臨床重要真菌^{73,74}。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⁷⁵。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⁷⁶。這些真菌菌株基因序列資料若能更臻完備，不

但可作為分類鑑定之依據，更可提供引子、探針設計的寶貴資料。
各種新發展的全基因體快速定序技術平台，標榜數小時內完成全基因體定序，更將提供了令人矚目的豐富資訊。

此領域之進一步應用則是發展高通量之核酸檢測技術，如核酸微陣列晶片和流式微珠陣列，可廣納大量特異性探針(上百至數萬)，且可依臨床檢驗或防疫分子流行病學需求，設計種別、型別等特異性探針，除可廣泛涵蓋臨床上常見病原⁷⁷，甚可納入可能變種及人畜共通病原，如此一來，可以極少量檢體做多重且快速的檢驗鑑定。對於檢體內菌量往往稀微的檢驗如真菌甚為有用。真菌的核酸陣列方面，針對臨床常見真菌包括念珠菌屬及麴菌屬(*Aspergillus spp.*)已有發表⁷⁸。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⁷⁹。目前在全球漸受矚目的流式微珠陣列，主要原理為二種螢光染劑以不同比例混合出100種微珠，其上可固定化偵測用探針或抗原/抗體，與經適當PCR反應或免疫反應前處理之待測物產生特異性結合後，這些微珠會流經流式細胞儀裝置，並逐一被雙股雷射光束，以便同時辨識微珠編碼及目標信號強弱。如此可高通量、快速、精確地同步偵測 100 種不同特定目標物。這對於時常需面對多種未知傳染病原的防疫及反生恐單位確實頗具潛在應用性。Diaz和Fell近三年利用Luminex流式細胞儀高通量多重快速檢測平台，分別發展出針對

Trichosporon genus (絲孢酵母屬)種別⁸⁰、*Malassezia species*⁸¹ 種別及 *Cryptococcus neoformans*種群鑑定⁸² 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⁸³ 及9種臨床常見及6種罕見之子囊酵母菌的Luminex技術⁸⁴ 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⁸⁵。

砂眼披衣菌基因型的分子流行病學研究在鑑定高危險族群與追蹤性接觸者方面是相當重要的，因此擬藉本計畫開發針對omp1 gene的VS2片段具多重檢測的核酸增幅技術，進行快速分子分型。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⁸⁶ 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⁸⁷。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)⁸⁸，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)⁸⁹。 *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. dubiniensis* (1,080 bp)⁹⁰。2002年法國學者倡議建立MLST(multi-locus sequence typing)做為病原菌國際化比對的平台(<http://www.mlst.net>)。MLST原理為針對6-8個約500bp的持家基因 (house-keeping genes) 定序，每一條不同 (multi-antigen sequence typing)，砂眼披衣菌則可針對omp1變異區的VS1-VS4進行分型。每株菌株則依其這些特定持家基因locus上alleles的組合樣式形成其特定的序列樣式(sequence type, ST) 以茲比較。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、鑑別力高的序列皆被歸於一特定的alleles。百日咳、淋病則有MAST⁹¹，利於實驗室間資料交換比對等優點⁹²，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⁹³。其他如針對重複性序列DNA的分析，如rep-PCR⁹⁴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⁹⁵。

常用的全基因體分型方法如RFLP⁹⁶，或RFLP結合探針雜交⁹⁷⁻⁹⁹、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^{100,101}分子分型方法。全部基因組的PCR-fingerprinting尚包括RAPD¹⁰²或者是AFLP¹⁰³，二者

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。

細菌之抗藥性已成為目前世界性公共衛生之問題¹⁰⁴。免疫抑制病人的增加、侵入性儀器的使用以及抗生素日與遽增的消耗，皆促使抗藥性細菌的崛起而造成院內感染。於近二十年中，許多新式及後線抗生素，包括 glycopeptides、fluoroquinolones 與 carbapenems 等已陸續開發用以治療抗藥性細菌。然而，methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)、community-associated MRSA (CA-MRSA)、methicillin-resistant *S. epidermidis* (MRSE)、vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE)、carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA)、carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. (CRAB) 與 ciprofloxacin-resistant (CipR) Enterobacteriaceae 等含有可對抗後線抗生素之抗藥性基因，已對全球的公共衛生與醫療方面造成衝擊¹⁰⁵⁻¹⁰⁸。

面對抗藥性細菌崛起的挑戰，發展具有快速、靈敏、專一、可多套式與高通量等特性的技術以檢測抗藥性基因實為當務之急。監測細菌之抗藥性基因不但在臨床治療已日顯重要，且可提供未來治療用藥方針之參考。許多利用 PCR 為基礎以偵測抗藥性基因的方法已經被開發，主要用來預測細菌之抗藥性，但技術層面往往侷限在無法進行多套式分析^{109,110}。然而，微陣列(microarray)分析雖具有多套式分析

之優勢，但其高經費、受限的靈敏度與技術上的複雜性使其無法廣泛應用¹¹¹⁻¹¹³。流式微珠陣列(suspension bead array)提供可同時進行 100 個多套式分析，此外亦利用寡核苷酸雜交反應與流式細胞儀之特性，提供快速且高靈敏度之優勢⁷²。此技術已被運用於菌種鑑定¹¹⁴⁻¹¹⁶、病原體基因型分析^{117,118}與突變之檢測¹¹⁹。於本研究中，我們發展一多套式聚合酶鏈反應(multiplex PCR)以合成 11 種院內感染細菌之 7 個”後線”之抗藥性基因與 *pvl* 基因。此外亦利用流式微珠陣列偵測 multiplex PCR 之產物以鑑定細菌所具有的抗藥性基因。抗藥性基因的檢測不但有助於增加正確治療的機會，對於細菌抗藥性的監測及未來用藥方針亦提供莫大的助益。

多重抗藥性細菌是全世界所共同面臨的問題，臺灣地區受其影響尤其嚴重。近年來快速崛起的多重抗藥性鮑氏不動桿菌 (multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*，簡稱 MDRAB) 為最重要的抗藥性革蘭氏陰性菌之一，影響了治療用藥的選擇，對臨床的衝擊甚為嚴重¹²⁰。值得注意的是，受到 MDRAB 感染的病患若接受無敏感性效果的抗生素治療，在臨床上常具有較高的死亡率¹²¹。自 1991 年美國爆發由 multidrug-resistant *A.baumannii* (MRAB) 所造成的院內感染案例後，其他國家也陸續分離出 MRAB¹²²⁻¹²⁴。1998 年五月，臺大醫院自白血病病人身上發現第一株全抗藥性之 *A.*

baumannii，命名為 pandrug-resistant *A.baumannii* (MDRAB)，可抵抗目前所有使用的抗生素，包括 cephalosporins、aztreonam、aminoglycosides 和 ciprofloxacin 等¹²⁵。於 1999 年一月之間也陸續自普通病房的三位病患發現三株以上 MDRAB; 1999 年四月後，MDRAB 已逐漸擴散至遍佈醫院，其中尤以 ICU 病房最為嚴重。2002 年十二月，又於台大醫院分離出 15 株具有不同表現型及 PFGE 型別的 MDRAB¹²⁶。以上結果顯示出台灣的 *A. baumannii* 抗藥性問題日趨嚴重，尤其是針對乙內醯胺類(β -lactam)藥物之抗藥性菌株的出現，更增加治療的棘手性。抗生素的合理使用、正確鑑別種別、瞭解病原抗藥性特性及崛起之分子機制，醫院間傳播之流行病學、追溯環境之感染源、施行衛生消毒措施對於控制 *Acinetobacter spp.* 之感染十分重要¹²⁷。

A. baumannii 為非發酵性革蘭氏陰性桿菌，普遍存活於自然環境中，為常見於人類皮膚、咽喉及腸道的共生菌¹²⁸，引發的疾病包括尿道感染、細菌菌血症、腦膜炎¹²⁹、傷口及燒傷感染...等。此菌常著生於住院病患之皮膚黏膜、咽喉呼吸道和腸胃道，且具有耐旱、抗消毒殺菌劑之特殊生物特性，故可在環境中長時期存在^{130,131}。曾有研究，在 31% 相對濕度下，*A. radioresistens*、*A. baumannii* 及 *A. lwoffii* 可分別在環境中存活 157、20 及 3 天¹³²。於溫暖潮濕的環境中更助長

其孳生，因此經常存活在呼吸治療裝備，如呼吸器的蛇形管或集水瓶等環境，導管相關感染(catheter-related infection)、清瘡用的高壓灌流脈衝式沖洗系統(Pulsatile lavage system)及呼吸器相關感染之肺炎(ventilator-associated nosocomial pneumonia) 為常見之院內感染來源^{133,134}，感染住院之病患，尤其以加護病房(ICU)最為嚴重^{125,135}。其中醫護人員雙手被認為是最主要之傳播途徑¹³⁶。由於就感染部位而言以呼吸道感染最常見，受到*A. baumannii*感染後，可從痰液、尿液、血液、傷口滲出液等處培養檢驗。若在病患痰液中檢出，有可能是受到汙染，不一定需要治療，但若從患者的尿液、血液或傷口滲出液等培養出，表示已受到感染，尤其血液中培養出者，感染情況最為嚴重，甚至有引發敗血症致死的可能。一項調查針對*Acinetobacter* 在人類皮膚及黏膜分佈之研究顯示，住院病患確實較健康對照有較高的帶菌率，且帶菌率隨病人住院時間的增加而增高¹³⁷。

乙內醯胺類(β -lactam) 抗生素是目前全球使用最廣泛的抗生素，包括盤尼西林類(penicillin)、頭孢菌素類(cephalosporin)、單環胺基類(monobactams)、碳醯胺機類(carbapenem)等。目前台灣的MDRAB除了碳醯胺機類之外，對於其他三類乙內醯胺類抗生素均高達95%以上的抗藥性¹²⁵。不幸的是，MDRAB對碳醯胺機類中的meropenem與imipenem也分別有92%與38%抗藥性，表示未來治療MDRAB可

能將面臨無藥可用的窘境。碳醯胺機類目前對於 *A. baumannii* 曾被提及的抗藥性機轉如下：(1) 細胞外膜通透性降低^{138,139}；(2) penicillin 結合蛋白(penicillin-binding protein, PBP)改變¹⁴⁰；(3) 排出幫浦(efflux pump)表現量的增加¹⁴¹；(4) 產生 class B metallo- β -lactamase (MBL) 及 class D OXA carbapenemase^{142,143}。值得一提的是除了外膜的低通透性是內因性機轉，其他的抗藥機轉可能都是因為使用抗生素而誘發的抗藥性機制。

近年來致病菌自外在環境中獲取 MBL 而抵抗 carbapenem 已造成治療上相當程度的問題¹⁴⁴。MBL 具有高度分解 carbapenem 的活性，其中以 IMP-1 與 VIM-2 為二個最常見的 MBL，目前已陸續出現在許多國家中¹⁴⁴⁻¹⁴⁷。至於 class D OXA carbapenemase 則具有四個亞型，分別為 OXA-23、OXA-24、OXA-51 與 OXA-58，已被證實和 *Acinetobacter* spp. 的 carbapenem 抗藥性有關^{122,142,148-150}。OXA-51 為固有存在於所有的 *A. baumannii* 中¹⁴⁹。然而，*bla*_{OXA-23} 和 *bla*_{OXA-51} 基因的上游常發現一段 ISAbal 序列，可能作為啟動子而與其下游基因的表現有關^{151,152}。至於 *bla*_{OXA-58} 基因的上游則發現 ISAb3 的存在，另外也有文獻指出在上游發現其他插入序列，包括 ISAb3-like、ISAb1、ISAb2 與 IS18¹⁵³。一些文獻指出，對於 carbapenem 具抗藥性的 *Acinetobacter* spp. 和外膜蛋白(outer membrane proteins, OMPs)

的缺失有關，包括 CarO、33-36kDa OMP 與 OprD 亦曾被提及^{138,154,155}，但目前尚未有明確的證據解釋這些 OMPs 的缺失原因。

最近一些國際文獻研究指出，在臨床上所分離的 *A. baumannii* 菌株大多為 MDRAB，僅對 carbapenems 類的抗生素具部分敏感性。然而，對於在臨床上分離的 *A. genospecies* 3 和 13TU 菌株，儘管部分菌株具有 MBL 對 carbapenem 具有抗藥性，大部分的菌株對於 ciprofloxacin 皆具有很高的敏感度^{145,146}。因此，檢測不動桿菌的 ciprofloxacin 藥敏試驗對於在臨床上治療不動桿菌感染症提供有助益的訊息。Ciprofloxacin 是對於革蘭氏陽性及革蘭氏陰性病原菌具廣效性抗菌活性之一種氟化奎林酮類(Fluoroquinolone)衍生物，尤其在治療呼吸道感染症，更是扮演極重要角色¹⁵⁶。最近臺大醫院統計研究從 1991 到 2003 年各種抗生素使用趨勢與抗藥性細菌分佈的相關結果中，ciprofloxacin 為一明顯逐年增加使用的抗生素。不幸的是，ciprofloxacin 其廣泛抗菌的效果卻也造成許多細菌具有抗藥性。ciprofloxacin 在革蘭氏陰性細菌的主要作用目標是結合在 DNA 旋轉酶(DNA gyrase A, GyrA)上，以抑制細菌 DNA 的複製。DNA 旋轉酶是一個細菌複製 DNA 過程中所必需的酵素。目前研究 ciprofloxacin 抗藥性最清楚的機制為 DNA 旋轉酶(DNA gyrase A, GyrA)的突變，導致藥物與其目標之間的親和力降低而產生抗藥性。許多研究報導在

GyrA 的 quinolone 抗藥性決定區(quinolone resistance-determining region, QRDR)發生單一鹼基突變，即可導致細菌對 quinolone 類的抗生素具有減少敏感性或抗藥性¹⁵⁷。此外，efflux pump 表現量的增加也為細菌增加抵抗氟化奎林酮類的抗藥能力^{158,159}。目前對於 *A. baumannii* 曾被提及的氟化奎林酮類抗藥性機轉，除了 *gyrA* 及 *parC* 基因抗藥性決定區的突變¹⁶⁰⁻¹⁶³，efflux pump 表現量的增加亦開始被討論^{141,164}。

金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)為革蘭氏陽性球菌，在顯微鏡下之形態常以葡萄串狀聚集。葡萄球菌普遍存在於自然環境中，亦存於人體皮膚表面及上呼吸道黏膜的正常菌叢 (normal flora)，然而仍會造成重病孱弱及免疫低下患者的感染，對象通常為院內術後或重症患者，可引起皮膚、傷口、骨髓炎、肺炎及菌血症的感染。抗甲氧苯青黴素的金黃色葡萄球菌(MRSA)在 1960 年初次被報告以來¹⁶⁵，就快速的散佈至全世界而造成醫療上的一個大問題。MRSA 之產生是經金黃色葡萄球菌獲得一移動性的基因片段，稱為 staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)¹⁶⁶，而對 methicillin 產生抗性。MRSA 可製造一種對 β -lactam 類抗生素之親和性都降低的蛋白質，導致 MRSA 對 β -lactam 類抗生素幾乎全具抗性，包含所有青黴素類及頭孢子素類抗生素。同時，大多 MRSA 菌對不同非 β -lactam 類之

抗生素亦具抗藥性，包含分子類(如紅黴素)、四環黴素、克林達黴素 (clindamycin)、胺基糖苷類(如 gentamicin)、氟化恩甯類(如 ciprofloxacin)、及複方磺胺類。近年來日本、美國及其他國家已發現了對使用於治療嚴重 MRSA 感染病患的最後線抗生素萬古黴素 (vancomycin) 已具有感受性降低及具抗藥性的菌。雖然近年來已有對 MRSA 的新抗生素被研發出來，但 MRSA 仍是全球臨床上極受重視的多重抗藥菌。

Pseudomonas aeruginosa (綠膿桿菌) 在分類上屬於假單胞菌科 (Pseudomonadaceae) 之假單胞菌屬 (*Pseudomonas*)，此菌屬種類高達 140 種以上，大部分為腐生菌或能導致植物病害，約有二十五種會感染人類，但多屬伺機性感染。綠膿桿菌是本屬之中研究最多最重要的院內感染致病菌。能伺機感染任何部位，如燒傷處傷口、角膜、尿道及肺部等，並引起細菌性心內膜炎及腸胃炎。引起敗血症，死亡率超過 80%，引起肺炎死亡率甚高，尤其是白血病患者。因為它的外型呈棒狀，所以在 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 中把它分類在 Aerobic Gram-Negative Rods and Cocci 部門中。綠膿桿菌的致病機制為：綠膿桿菌經由傷口或呼吸道黏膜組織入侵宿主後，首先利用菌體表面的纖毛附著於細胞表面，菌體開始生長、繁殖，同時分泌許多毒素以及蛋白水解酵素。例如蛋白質水解酵素不斷分解有免

疫抗菌作用的血清蛋白，再加上內毒素的影響使感染綠膿桿菌的死亡率高於其他常見的伺機性感染細菌，除此之外，他的高抗藥性源自於本身的抗藥能力以及感染過程中形成的生物膜，以侵襲囊性纖維變性(cystic fibrosis)為例，即使施以長期抗生素治療，綠膿桿菌仍能存活於病患體內，學者研究發現是由於綠膿桿菌的相位變異的蛋白質 PvrR (phenotype variant regulator)，主宰綠膿桿菌在具抗藥性及不具抗藥性變異種間的轉換頻率，使抗藥性菌株高頻率增生，才會使綠膿桿菌成為醫院中極為棘手的致病菌。

在眾多菌種鑑定方法中，16S-23S rRNA ITS 序列分析具有低種內變異度(intraspecies diversity)與高種間變異度(interspecies diversity)之優點，故 16S-23S rRNA ITS 序列分析為一適合作為細菌分類依據之標的^{167,168}。近年來分子即時偵測鑑定方法的發展不但可提供快速的結果，也可提高檢測的正確性，包括利用 LightCycler real-timePCR 方法^{169,170} 及利 16SrDNA 寡核苷酸陣列鑑定¹⁷¹ 系統等。然而，大部分的分子檢測方法皆須經過多試管 PCR 放大，過程多繁瑣且所需檢體量較多；流式微珠陣列系統(suspension bead array system)，可於一次反應中，同時偵測 100 種不同的反應強弱並同時鑑別標的，故提供高通量、單管檢測多重標的、快速、高專一性及節省檢體之優點^{22,172}。目前尚未有利用流式微珠陣列檢測平台多重快速鑑定四種常

見院內感染病原菌 *Staphylococcus aureus* , *P. aeruginosa* , *A. baumannii* , *Candida albicans* , 以及鑑定不動桿菌屬三種 species , *Acinetobacter baumannii* 和 genomic species 3 及 13TU 等相關報告。流式微珠陣列可依特定核苷酸序列上的差異, 設計專一探針, 利用不同序列與探針產生相異的黏合度, 達到鑑別菌種之目的, 此有別於已發展之鑑定技術, 提供快速及便利性的優勢。由於臨床上多重病原混合感染頗常見, 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或許更能反映臨床感染之現況。

為求對於鮑氏不動桿菌(*Acinetobacter baumannii*)可能的抗藥性機制以及具有臨床意義的基因能有更深的了解和研究, 我們使用光學圖譜(optical mapping)技術進行分析。光學圖譜是一個研究基因體學的一個新方法, 由 Opgen 生技公司提供這項服務。Optical mapping 利用特殊的方式使微生物染色體帶電荷, 通過晶片通道後, 使得單一染色體分子能夠拉開並且固定, 接著以限制酵素(restriction enzyme)作用, 再加以染色和照相, 就可以得到高解析度、具有順序的 whole genome restriction maps¹⁷³。由於這項技術可以建構完整且具有順序的基因限制酵素圖譜, 故可應用於許多方面, 包括輔助全基因定序(sequencing finishing)、分子分型(strain typing)以及基因分析比較(Comparative

Genomics)；(1)在全基因定序中，genome sequence 若帶有許多短片段的重複序列，會造成定序結果出現許多無法比對組合的序列片段 (contig)，亦或富含 GC 的部分，也會造成定序的困難¹⁷⁴，如果搭配現制圖譜的技術加以比對，則可以解決這個問題；(2)在分子分型的應用上，與傳統 PFGE 做比較，由於解析度很高，可達到 1.6kb，加上具有順序的特性，分型效果會遠比 PFGE 來的好，且傳統 PFGE 在不同實驗室或者不同人操作所造成的差異或也不會發生在 optical mapping 的技術上；(3)具有順序的全基因體限制酵素切位圖譜可以觀察基因的重組排列，包含插入序列(insertion)、遺失序列(deletion)、反轉序列(inversions)或者雙倍序列(duplications)等情況，藉由基因層面的變化推測可能造成的生理代謝改變、抗藥性的發生、或者毒力的增減等現象^{175,176}。本實驗將台灣臨床抗藥性不動桿菌與已知全基因序列的標準菌株共七株做分析比較，差異甚大，故選差異最小的標準菌株 *Acinetobacter baumannii* ACICU，希望可以藉由 optical mapping 的技術讓我們對於不動桿菌有更深入的了解，以期解決嚴重抗藥性所造成的醫療問題。

於本研究中，我們發展一多套式聚合酶鏈反應(multiplex PCR)以合成 11 種院內感染細菌之 7 個”後線”之抗藥性基因與 *pvl* 基因。此外亦利用流式微珠陣列偵測 multiplex PCR 之產物以鑑定細菌所具有的

抗藥性基因。抗藥性基因的檢測不但有助於增加正確治療的機會，對於細菌抗藥性的監測及未來用藥方針亦提供莫大的助益。除此之外亦投入新穎全基因體分析的光學圖譜技術，進行更深入的研究，以求在學術上及實務應用上有所突破和貢獻。

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

二、材料與方法：

(一)、菌株來源及培養：

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

金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)和鮑氏不動桿菌(*Acinetobacter baumannii*, AB)，除由生物資源研究及保存中心(BCRC)購買的標準菌株外尚有與醫院合作收集之臨床分離株：*A. baumannii* 84 株，methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) 66 株，methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) 10 株，*P. aeruginosa* 63 株，coagulase negative Staphylococci (CNS) 10 株，其中包含 6 株 *S. epidermidis*，3 株 *S. capitis*，一株 *S. haemolyticus*，所有菌株皆以 TSA (tryptone soy agar) plate 作分離培養。並以 API 及 VitekII 標準方法加以鑑定，確認種別。

共 55 株 *Acinetobacter* spp. 臨床菌株由台大醫院提供，分離年代為 2005 年，大部分從血液與痰分離，經 API20NE system 鑑定皆為 *Acinetobacter* spp.。利用 ITS 序列鑑定菌種，鑑定出共 34 株 *A. baumannii*、10 株 genospecies 3 與 11 株 genospecies 13TU。全部的 *Acinetobacter* 菌株皆培養於 Mueller-Hinton 固體培養基中，於 37°C 培養 20 小時。

共 81 株 *Acinetobacter* spp. 臨床菌株來源由台大醫院提供，分離年代為 2005 年，經 API20NE system 鑑定皆為 *Acinetobacter* spp.。另外利用 ITS 序列鑑定菌種。

菌株來源除了自生物資源研究及保存中心(BCRC)購買的標準菌株外尚有與醫院合作收集之臨床分離株：金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 13 株、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) 6 株、糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) 9 株、腸球菌 (*Enterococcus faecium*) 9 株、綠膿桿菌 (*P. aeruginosa*) 10 株、不動桿菌(*Acinetobacter* spp.) 10 株、克雷伯氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 6 株、產酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*) 4 株、大腸桿菌(*Escherichia*

coli) 4 株、產氣腸桿菌(*Enterobacter aerogenes*) 4 株與陰溝腸桿菌(*Enterobacter cloacae*) 5 株。所有菌株皆以 TSA (tryptone soy agar) plate 作分離培養。並以經 API 20 NE system 方法加以鑑定，確認種別。

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。

(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 μ 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 μ l DNA Hydration Solution 溶 DNA。以 A_{260} 測 DNA 的質量，保存於 -80°C。絲狀真菌以 Sabouraud dextrose broth 培養於 25°C 培養箱，直到菌絲體長出後萃取 DNA。將菌絲體加入含有 300 mg 的 glass beads (Biospec Products, Bartlesville, Okla.) 及 600 μ l 的 Tissue and Cell Lysis Solution 的 2 ml screw cap tube 後放入 Mini-Beadbeater 以 4,200 rpm 轉速，振動 5 分鐘破壞細胞，然後將細胞懸浮液取至 1.5 ml centrifuge tube 以 MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, Wisconsin). 萃取 DNA。以分光光度計測 DNA 的質量，後保存 -80°C。

(三)、細菌分離株 DNA 萃取：

細菌菌株經過隔夜培養後，以無菌移殖環挑取菌體。綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 和鮑氏不動桿菌(*Acinetobacter baumannii*) 菌株用 QIAamp DNA mini kit 抽取 DNA。金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 用 PUREGENE DNA Purification Kit (Gentra, Minneapolis,

Minnesota, USA)萃取 DNA。加入含有 lysozyme (終濃度 2.5mg/ml)之細胞懸浮緩衝液中，37°C 培養隔夜後，加入 1ml 的 cell lysis Solution，將細胞胚累沖散以達到分解細胞的效果。之後加入 340 ul 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(Isopropanol)DNA 沉澱；以 99%酒精洗過後，加入 50 μ l water 溶解 DNA，以分光光度計測 DNA 的質量，後保存於-30°C。

(四)、抗藥性基因之分析與多種抗藥性基因之聚合酶鏈反應：

抗藥性基因分析所使用的引子與對應的標的如(表十一)所示。在 GyrA 中，與 quinolone 抗藥性相關的 quinolone 抗藥性決定區(the relative quinolone resistance-determining region, QRDR) 等同於 *E. coli* GyrA 中的第 83 個胺基酸，即對等 *gyrA* 基因的第 247-249 個核苷酸序列。設計兩條簡併性引子(degenerate primers)，GyrA-F 和 GyrA-R，以合成 11 種院內感染細菌之 *gyrA* 基因部分片段。放大的 *gyrA* 片段直接定序以鑑定 QRDR。設計其他基因的專一性引子，包括針對 MRSA 和 MRSE 的 *mecA* 基因、CA-MRSA 的 *pvl* 基因、VRE 的 *vanA* 基因、CRPA 和 CRAB 的 *bla_{IMP}* 與 *bla_{VIM}* 基因以及 CRAB 的 *ISAbal-bla_{OXA-23}* 與 *ISAbal-bla_{OXA-51-like}* 基因，以合成對應之產物。PCR 反應與下列的多套式聚合酶鏈反應(multiplex PCR)相同，將於下列加以描述。Multiplex PCR 可以同時合成放大 11 種院內感染細菌之 7 個抗藥性基因與 *pvl* 基因。此外，兩條 25-bp 長的巢式引子，Nest-1 和 Nest-2，設計於每個引子的 5'端，以統一 multiplex PCR 過程時的黏合溫度。Multiplex PCR 反應總容積為 20 μ l，內含 10ng 細菌的 chromosome DNA，2 μ l 的 10X PCR buffer，5 mM MgCl₂，250 μ M dNTP，1 U Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA)，1 μ M GyrA-F，1.5 μ M GyrA-R，250 nM Nest-1 與 Nest-2 及 50 nM 的其他引子。Multiplex PCR 的反應初始以 95°C 2 分鐘，10 次循環的變性反應 95°C 1 秒→黏和 40°C 5 秒→72°C 10 秒的聚合延長反應，之後再進行另一 30 次循環的變性反應 95°C 1 秒→60°C 15 秒的黏合與延長反應。最後的 PCR 產物保存於 4°C。

(五)、流式微珠陣列檢測：

1. 引子及探針之設計及合成：

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

自行定序細菌的 ITS 和 16S 基因序列並蒐集 NCBI 上病原細菌及病原真菌 rDNA 序列，並以 Microsoft Access 2000 建立序列的資料庫。用 Squencher 軟體進行多重核酸序列比對，經人工修正後，找出各種共通兼具有鑑別性的序列，據以設計引子和探針。

泛細菌 ITS 引子可利用 PCR 反應增殖出包含部分 16S rRNA 基因、ITS 與部分 23S rRNA 基因之片段。其序列如下：Forward primer：5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3

Reverse primer：5'-(T/G)A(C/G)TGCCAAGGCATCCACC-3

2. 真菌 ITS3&ITS4 之聚合酶鏈反應(PCR)

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

3. 細菌 ITS 之聚合酶鏈反應(PCR)：

將標準菌株及待測臨床菌株進行 PCR 反應。反應總容積為 50 μ l，內含 1 μ l 的細菌

chromosome DNA (concentration $< 10^2 \mu\text{g/ml}$), forward primer $1 \mu\text{l}$, reverse primer $1 \mu\text{l}$ ($10 \mu\text{M}$), $22 \mu\text{l}$ 純水, $25 \mu\text{l}$ 之兩倍 master mix (Fermentas)。反應初始以 94°C 10 分鐘溫度, 34 次循環的變性反應 94°C 30 秒 \rightarrow 黏和 55°C 20 秒 \rightarrow 72°C 1 分鐘聚合延長反應, 最後為 72°C 10 分鐘聚合延長反應。PCR 機器使用 PTC-200 (MJ research)。

4. 瓊脂膠體電泳分析 (agarose gel electrophoresis):

以 1.5% 甲醛瓊脂膠體進行 DNA 電泳分析, 使用 1.5% (wt/vol) 的瓊脂膠體: 秤取 0.6g 的 agarose 放置於 100ml 的錐形瓶中, 並加入 40ml 蒸餾水。以微波加熱溶解, 輕輕搖勻避免氣泡產生。此時膠體之總體積為 40ml, 將膠體導入膠體鑄模中並插入膠梳, 靜置約 45 分鐘讓膠體完全凝固。將已完全凝固的膠體移至 0.5X 的 TBE (0.1M Tris, 0.09M boric acid, 1mM EDTA) 跑電泳功率設定為 120V/cm, 35 分鐘, 經過 EtBr 染色 15 分鐘後, 接者以蒸餾水去染數次。於紫外光下確認 PCR 之結果, 以 100-bp DNA 分子量標準片段同時跑做對照。

5. 鍵結固定化探針於微珠上:

取 2.5×10^6 磁珠 (Luminex, TX), 加入 $50 \mu\text{l}$ 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。加入 $3 \mu\text{l}$ 現配製 1-ethyl-3-(3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) solution (10 mg/ml) (Pierce Biotechnology), 可將探針與磁珠結合, 置於室溫反應 30 分鐘。之後再加入 $3 \mu\text{l}$ 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 $50 \mu\text{l}$ Tris-EDTA 回溶, 置於

4°C 暗房保存。

6. 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 μ l 1.5X TMAC 包含 5,000 顆磁珠與 17 μ l 增幅產物混合均勻，置於暗室於 95°C 反應 10 分鐘，接著於 45°C 反應 30 分鐘。以 6000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 75 μ l 1X TMAC solution 包含 10 ng/ μ l 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。

(六)、流式微珠陣列檢測之靈敏度測試：

抽取標準菌株 DNA 以十倍序列稀釋，濃度由 10 μ g/ml 至 10pg/ml，由其中取 1 μ l 做為 template DNA 進行流式微珠陣列檢測，實驗流程如(三)。

(七)、微珠陣列反應成本估算

一個編號的 bead 共有 1.25×10^7 的 7 次方個 beads 價錢是 12000 元，一次反應 5000 顆，所以共可做 2500 次反應，單組微珠一次反應便是 4.8 元，因此微珠成本即為 4.8 乘以 beads 組數，PE 呈色劑成本則為每次反應 3 元。所以一次反應的價錢=4.8*(beads 組數)+3 元

(八)、抗生素感受性試驗

根據美國臨床與實驗室標準研究(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)所發表的準則來偵測 oxacillin、vancomycin、imipenem 和 ciprofloxacin 抗生素在體外對每一菌株之最低抑制濃度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。使用方法為瓊脂稀釋法(agar dilution method)。

(九)、gyrA 基因之即時聚合酶鏈反應(Real-time PCR)：

即時聚合酶鏈反應之內容如下：總容積為10 μ l，內含0.5 μ l待測DNA，2 μ l LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe mix (Roche Diagnostics)，0.25 μ l引子Ab-GF和Ab-GR (2.5 μ mol) 及0.5 μ l探針Ab-FL3和Ab-LC3 (0.5 μ mol)，其餘加蒸餾水混勻。反應初始以95 $^{\circ}$ C 10分鐘溫度，40次循環的變性反應95 $^{\circ}$ C 10秒 \rightarrow 黏和60 $^{\circ}$ C 10秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10秒聚合延長反應。之後進行解離曲線分析(Melting Curve Analysis)：反應初始以95 $^{\circ}$ C 0秒溫度，快速降低到40 $^{\circ}$ C 停留30秒，再以每秒增加0.1 $^{\circ}$ C的速率升溫到95 $^{\circ}$ C。最後利用 LightCycler software (Roche Diagnostics)分析Melting curve analysis。

(十)、分析 carbapenemase 相關基因

利用 PCR 合成 carbapenemase 相關之基因，包括 *bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{OXA-23}、*bla*_{OXA-24}、*bla*_{OXA-51} 與 *bla*_{OXA-58}。分析在 *bla*_{OXA-51} 與 *bla*_{OXA-58} 基因上游之插入序列則使用一端為 *bla* 基因的引子，另一端為插入序列的引子，包括 *ISAbal*、*ISAb2* 或 *ISAb3*，再利用 PCR 合成。利用 E-test MBL (AB Biodisk, Solna, Sweden)以分析菌株是否具有 MBL 活性。

(十一)、脈衝式電泳分析(PFGE)及 *ApaI* 限制酶切片段分析：

將菌溶於 TE buffer (10mM Tris-HCl、1mM EDTA pH8.0) 溶液中，利用濁度計 (Vitek

colormeter) 調整菌量至 15 %T, 取菌液 300 μ L 將此溶液與預熱 56 $^{\circ}$ C 之 300 μ L 洋菜膠溶液 (1.2% SeaKem Gold agarose/1% SDS) 混合, 注入模型內待凝結, 取出置於 5 mL Cell Lysis Buffer (50mM Tris-HCl、50mM EDTA、1% sarcosine、0.15mg/mL proteinase K) 溶液內, 置於 54 $^{\circ}$ C 水浴震盪約 2 小時後、倒掉此溶液終止反應, 並開始清洗已包埋菌體 chromosomal DNA 的洋菜膠塊 (plug), 清洗步驟如下所述, 用 15 mL ddH₂O 54 $^{\circ}$ C 水浴震盪 15min 後倒掉溶液, 重複此步驟一次, 再以 15 mL TE buffer 54 $^{\circ}$ C 水浴震盪 15min 清洗, 重複此步驟四次, 分別以 10U *Apa* I¹⁷⁷ 來進行限制酶切割反應。利用脈衝電泳分析, 經酵素切割後的 plug 置入 1% SeaKem Gold agarose, 在 0.5 倍 TBE 緩衝液中以 2-20 秒的轉換時間, 旋轉角度 120 度, 溫度 14 $^{\circ}$ C, 電場 6V/cm, 進行 20 小時後經 ethidium bromide 染色觀察 DNA 條帶, 使用數位照相系統拍照儲存後, 以影像分析系統 BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) 比對分析。

(十二)、反轉錄聚合酶鏈反應 RT-PCR

利用 Qiagen RNeasy (Qiagen) 萃取 *Acinetobacter* spp. 的 RNA。取 1mg 的 RNA 加入 iScript reverse transcriptase (Bio-Rad) 和 hexanucleotide Mix (Roche), 經 RT-PCR 反應以合成 cDNA。利用 Roche LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics) 和 LightCycler Faststart DNA master SYBR Green I (Roche) 以分析 *bla*_{VIM-11} 和 *bla*_{OXA-58} 的表現量。16sRNA 基因作為相對定量之控制組。所使用的引子如下:

16sRNA forward : 5'-GGCCTTATGGTTGTAAAGCAC-3'

16sRNA reverse : 5'-TTATTCTGCGAGT AACGTCCAC-3'

***bla*_{VIM-11} forward : 5'-TCGGTCCAGTAGAACTCTT-3'**

***bla*_{VIM-11} reverse : 5'-TAGTGTTGTTGAATCCGCT-3'**

***bla*_{OXA-58} forward : 5'-GCTGATGCTG TGTTTGTC-3'**

***bla*_{OXA-58} reverse : 5'-GGCTTTCATCCCACCTT-3'**

即時聚合酶鏈反應之內容如下：反應初始以95°C 10分鐘溫度，40次循環的變性反應95°C 10秒→黏和60°C 10秒→72°C 10秒聚合延長反應。之後進行解離曲線分析 (Melting Curve Analysis)：反應初始以95°C 0秒溫度，快速降低到60°C 停留15秒，再以每秒增加0.1°C的速率升溫到95°C。最後利用LightCycler software (Roche Diagnostics)進行相對定量分析。

(十三)、imipenem 水解試驗

將細菌培養隔夜，以 8000g 離心 5 分鐘收集菌體，再以 10mM 冰磷酸緩衝液均勻打散菌體，並以高頻聲波打破細菌取得全部蛋白質。蛋白質的濃度利用 **BCATM** protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) 檢測。將全部蛋白質與 0.1 mM 的 imipenem 混合，並以 297nm 雷射偵測水解活性。活性抑制試驗則加入 2mM EDTA 與全部蛋白質在 30°C 反應 15 分鐘再檢測其活性。

(十四)、外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)分析

1. 外膜蛋白萃取

於 37°C 以試管少量震盪培養(3 ml tryptic soy broth medium)隔夜。第二天以百倍稀釋後 37°C 培養三小時，離心完(6000 rpm 5 min)以 1M 濃度的氯化鈉以及 PBS 清洗菌體，再回溶於 1.5 ml 的溶解緩衝液[lysis buffer, 0.1 mM PMSF (phenylmethyl sulfony fluoride), 1 mM DTT in PBS]，以超音波震盪器打破菌體，12000 rpm 離心十分鐘後，取上清液(supernatant)加入 N-lauroyl sarcosinate 水溶液(終濃度 2.2%)，超高速離心(100000G)一小時，移除上清液，以 2.2%之 N-lauroyl sarcosinate 清洗蛋白質沉澱，再次離心(100000G)一小時後，用緩衝溶液(TE buffer)45µl 回溶膜蛋白，測量蛋白質濃度(Lowry methods)並分裝保存於-80°C。

2. SDS 膠體電泳

取 2µg 已配製之外膜蛋白，進行 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 膠體電泳分析。使用 12% acryl-bisacrylamide，配製如下：Running gel 每 10 ml 中包含有 3.3 ml 的水、4 ml 30% acryl-bisacrylamide、2.5 ml 1.5M Tris (pH=8.8)、0.1 ml 10%SDS、0.1 ml 10% ammonium persulfate 以及 0.004 ml 的 TEMED。Stacking gel 每 10 ml 中則有 6.8 ml 的水、1.7 ml 30% acryl-bisacrylamide、1.25 ml 1.5M Tris (pH=6.8)、0.1 ml 10% SDS、0.1 ml 10% ammonium persulfate 以及 0.01 ml 的 TEMED。蛋白質需經過平衡濃度以及體積，每管樣品固定總體積為 10µl，蛋白 2µg，loading dye 2µl。實驗前以 95°C 加熱十分鐘 denature，接著進行膠體電泳分析，80 伏特 30 分鐘後改為 120 伏特電壓直至實驗完成。

3. 銀染分析(Silver stain)

以 silver stain 染色[30 分鐘 fixing(酒精 100 ml、醋酸 25 ml、水 125 ml)，30 分鐘 sensitizing(酒精 75 ml、醋酸鈉 17 克、水 163.75 ml、sodium thiosulphate 10 ml，25%

glutardialdehyde 1.25 ml), 清洗三次, 銀染(silver nitrate 2.5%), 清洗, 呈色(sodium carbonate 120 mM), 停止反應(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mM)。], 分析各菌株膜蛋白之異同。

(十五)、質譜儀分析

1. 退染

針對膠體電泳分析後有差異之蛋白, 作酵素切割之後以質譜儀分析。首先以二次水清洗膠體, 將有興趣的蛋白以小刀片或是吸管尖頭(tip)挖取下來, 放入微量離心管中, 加入 100 μl 的退染溶液(50mM sodium thiosulfate, 15 mM potassium ferricyanide)直到咖啡色褪去, 接著移除退染溶液加入 100 μl CH_3CN 反應 8 分鐘, 重複此二步驟, 使用真空抽乾儀將膠塊抽乾。

2. 烷基化(Reduction/Alkylation)

加入 100 μl 的 10 mM DTT 水溶液於 57 $^\circ\text{C}$ 至少反應一小時, 之後移除 DTT 溶液加入 100 μl 55 mM Iodoacetamide solution 在室溫避光反應一小時, 以 100 μl 25 mM 的 ammonium carbonate 清洗 8 分鐘, 移除清洗溶液後用 CH_3CN 將膠塊脫水, 此二步驟重複兩次, 移除溶液後真空抽乾。

3. 膠體內水解(In gel digestion)

加入足夠覆蓋過膠塊的 trypsin 溶液(12ng/ μl trypsin /25 mM ammonium carbonate solution) 於 30 $^\circ\text{C}$ 反應隔夜。加入 5 μl $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$, 隔水超音波震盪 10 分鐘, 即可離心取上清液作 MALDI MS 分析, 或是離心後加入 10-20 μl 的 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$, 利用真空抽乾後, 做 ES-LC/MS/MS 分析。

(十六)、*oprD* 基因分析與 accession number

下列引子為利用 PCR 合成完整 *oprD* 基因的引子：

oprD forward : 5'- ATGCTAAAAGCACAAAACTTAC-3'

oprD reverse : 5'- TTAGAATAATTTACAGGAATATC-3'

No.6 菌珠的 1320bp 的 *oprD* 基因序列已上傳至 Genbank database 編號 EU808010；No.5 菌珠的 1317bp 的 *oprD* 基因序列已上傳至 Genbank database 編號 EU808008；No.7 菌珠的 1286bp 的 *oprD* 基因序列已上傳至 Genbank database 編號 EU808009。

(十七)、真菌脈衝式電泳(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¹⁷⁵。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 5.1(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。

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

1. 病原酵母菌及持家基因

Candida albicans 選出七個 AAT1a、ACC1、VPS13、MPIb、ADP1、ZWF1b 及 SYA1。

Candida glabrata 選擇六個 housekeeping loci (housekeeping gene loci)分別為 FKS、LEU2、

NMT1、TRP1、UGP1 及 URA3。 *Candida tropicalis* 選擇六個 loci 分別為 ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, XYR1 及 ZWF1a。 *Candida krusei* 選擇六個 loci 分別為 ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, NMT1 及 TRP1。

2. PCR反應

以 PTC-200 96-well thermal cycler (MJ Research) 進行 PCR 反應。 *Candida albicans* 反應試劑包含 2 μ l DNA (10ng/ μ l), 4 μ l primer (5 μ M), 10 μ 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 \rightarrow 52°C, 1 min \rightarrow 72°C, 1 min 的反應, 最後為 72°C, 10 min。 *Candida glabrata* PCR 反應容積為 20 μ l, 內含有 10ng DNA、每種 primer 50pmol、1.25U Taq DNA polymerase、5 μ l 的 10X buffer 及 200 μ M deoxynucleoside triphosphate。PCR 反應條件為 95°C, 5min denature, 接著進行 30 cycle 93°C, 30S \rightarrow 依據增幅基因片段的的不同, 黏合溫度範圍從 50-57°C 不等, 1min \rightarrow 72°C, 1min 的反應, 最後為 72°C, 4min 的反應。反應試劑包含 6 μ l DNA (10ng/ μ l), 2 μ l primer (5 μ M), 5 μ 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 \rightarrow 52°C, 1 min \rightarrow 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)。

(十九)、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 5.1 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。

三、結果：

(一) 微珠陣列測試鑑定絲狀真菌

1. 探針專一性

圖一顯示設計之探針利用微珠陣列測試鑑定絲狀真菌專一性甚高。陽性結果的 S/B 比值 (sample fluorescence intensity to background fluorescence intensity ratio) 範圍為 7.9 至 123.4。

2. 敏感性與再現性分析

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

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

3. 多重菌種混合偵測

欲評估微珠陣列偵測多重菌種之可行性，設定不同的 *Aspergillus flavus* 染色體濃度 (1 ng、100 pg、10 pg、1 pg) 與

Aspergillus fumigatus (1 ng) 和 *Rhizopus oryzae* (1 ng) 混合進行分析。結果顯示當 *A. fumigatus*、*R. oryzae* 染色體濃度為 *A. flavus* 的 100 倍時，利用流式微珠陣列仍可偵測出 *A. fumigatus* 訊號，表示微珠陣列可有效的區分出多重菌種（圖二）。

4. 微珠陣列系統運用於臨床檢體之可行性

為試驗微珠陣列系統運用於臨床檢體鑑定之可行性及的敏感性，將 10^5 cells/ml *Aspergillus nidulans* 分生孢子（conidia）與血液混合均勻後連續稀釋至 10^0 cell/ml 後萃取 DNA，測試微珠陣列系統敏感性結果顯示檢測範圍為 10^2 cells/ml（圖三）。

(二) 微珠陣列測試鑑定常見院內感染菌

1. 探針設計與專一性測試

（表三）為本實驗中所使用的臨床菌株數目以及相對應的標準菌株。（表四）則為所使用的兩對引子，分別針對真菌病原菌以及細菌病原菌，同時使用於單管聚合酶反應中。圖三為 multiplex pcr 的電泳膠圖，分別針對單一的病原菌以及兩種病原菌混合的反應，電泳膠圖中 lane 2 為單一 *C. albican*, lane 3 為 *A. baumannii*, lane 4 為 *P. aeruginosa*, lane 5 為 *S. aureus*, lane 6 則是 *C. albican* 加上 *A. baumannii*, lane 7 為 *C. albican*

加上 *P. aeruginosa*, lane 8 為 *C. albican* 加上 *S. aureus*, lane 9 為 *A. baumannii* 加上 *P. aeruginosa*, lane 10 為 *P. aeruginosa* 加上 *S. aureus*, lane 11 為 *A. baumannii* 加上 *S. aureus*。由圖中可清楚看見相對應的基因片段皆有正確的被放大出來，經過純化的步驟後再進行微珠陣列測試。

以其他常見的院感細菌標準菌株作測試，並沒有任何 positive signal，minimum ratio 皆小於1，確認探針的專一性高，無偽陽性發生。進一步測試臨床菌株，包含有MSSA、MRSA、綠膿桿菌、鮑氏不動桿菌、產氣腸桿菌、大腸桿菌、皮膚葡萄球菌以及其他念珠菌等...，各微珠探針仍具高專一性，minimum ratio 值都高於2.7，而negative 值皆小於1。確認實驗中所設計的探針以及微珠系統之正確性。測試sensitivity 為使用DNA 濃度範圍由10ng~1fg (可使用1ul的10ng濃度DNA做PCR後測得結果)。

(三) 流式微珠陣列鑑定 11 種院內感染細菌之抗藥性基因

1. 院內感染細菌之藥敏測試與抗藥性基因檢測

11種院內感染細菌之藥敏測試與檢測之抗藥性基因如表三至表五所示。表三列出4種革蘭氏陽性菌，包括*S. aureus*、*S.*

epidermidis、*E. faecalis*與*E. faecium*。在7株 *S. aureus* (ATCC 29213、ATCC6538、ATCC6538P、Sa1、2、9和10)中，具有野生型 QRDR(wild-type QRDR, wtQRDR) (Ser83, TCA) 皆對 ciprofloxacin敏感(CipS)，然而其他5株(Sa3-6和Sa8) 具有突變型 QRDR(mutant-type QRDR, mtQRDR) (Leu83, TTA)則皆對 ciprofloxacin具有抗藥性(CipR)。Sa7為唯一CipR *S. aureus*的菌株且具有wtQRDR；此抗藥性產生可能由其他機制所導致，例如topoisomerase IV的ParC亞基發生突變與efflux pumps的作用(cite)。此外，全部的*S. aureus*菌株皆對vancomycin敏感，而8株(Sa1-Sa8)含mecA 對oxacillin具抗藥性則判定為MRSA。Sa1和Sa2兩菌株包含mecA與pvl則判定為CA-MRSA。在*S. epidermidis*中，ATCC 14990和2株臨床菌株(Se2和5) 具有wtQRDR (Ser83, TCT)皆為CipS，而3株菌株(Se1、3和4)具有mQRDR (Tyr83, TAT)或(Phe83, TTT)則皆為CipR。本研究全部的*S. epidermidis*菌株皆對vancomycin敏感，而4株菌株(Se1、3、4和5)含mecA對oxacillin具抗藥性則判定為MRSE。在*E. faecalis*中，ATCC 19433與5株菌株(Efas2-6)具有wtQRDR (Ser83, AGT)為CipS，而3株CipR菌株(Efas1、7和8)則包含mtQRDR (Ile83, ATT)。在*E. faecium*中，3株菌株(Efam4、7和8)含mtQRDR (Ile83,

ATT)與Efam3含另一種mtQRDR (Arg83, AGG)皆為CipR。然而 ATCC 19434與Efam2雖含有wtQRDR，但卻為低程度(low-level)的CipR (MIC = 4 mg/L)。相同情形在之前的研究亦觀察到，在 *E. faecium*的一些菌株中即使沒有ParC或GyrA的胺基酸發生改變，仍可對ciprofloxacin產生低程度的抗藥性，顯示有其他機制的參與(cite)。4株菌株(Efas7-8和Efam7-8)包含vanA且對vancomycin具有抗藥性則判定為VRE。

表四列出*P. aeruginosa* 和*Acinetobacter* spp.菌株的特性。在*P. aeruginosa*中，全部的CipS菌株皆含有wtQRDR (Thr83, ACC)，反之其他4株菌株(Pa2、4、5和6)含mtQRDR (Ile83, ATC)則為CipR。Pa4菌株含blaVIM則判定為CRPA，反之Pa2菌株缺乏blaIMP或blaVIM則對imipenem為中間性(MIC = 12 mg/L)。在*Acinetobacter* spp.中，全部的CipS菌株皆包含wtQRDR (Ser83, TCA)，而全部具有mtQRDR (Leu83, TTA)的菌株則為CipR。Aci5菌株為唯一具有另一種mtQRDR (Phe83, TTT)的菌株且對ciprofloxacin為中間性(MIC = 3 mg/L)。此外，Aci1 (包含ISAbal-blaOXA51-like)和Aci2菌株(包含ISAbal-blaOXA23與ISAbal-blaOXA51-like)皆對imipenem具抗藥性。Aci3 (包含blaIMP)和Aci4菌株(包含blaVIM)亦皆對imipenem具抗藥性。然

而，Aci5和Aci6菌株分別包含blaVIM與ISAba1-blaOXA23則對 imipenem為中間性 (MIC = 8-12 mg/L)。以上包含blaIMP、blaVIM、ISAba1-blaOXA23與ISAba1-blaOXA51-like的所有 *Acinetobacter* spp.菌株皆判定為CRAB，即使其中有部分僅對 imipenem為中間性。

表五列出5種常見院內感染之腸道菌 (*Enterobacteriaceae*)，包括*K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*E. coli*、*E. aerogenes*和*E. cloacae*的菌株特性。在*K. pneumoniae*中，全部CipS菌株皆包含wtQRDR (Ser83, TCC)，而其他2株CipR菌株 (Kp1和2)則含有mtQRDR (Ile83, ATC)。全部的*K. oxytoca* 和*E. aerogenes*菌株皆分別含wtQRDR (Thr83, ACT)及(Thr83, ACC)且為CipS。在*E. coli*中，ATCC13048菌株含wtQRDR (Ser83, TCG)為CipS，反之其他3株菌株(Eco1-3)具有mtQRDR (Leu83, TTG) 則為CipR。全部的CipS *E. cloacae*菌株包含 wtQRDR (Ser83, TCC)，而Ecl4為唯一的CipR菌株具有mtQRDR (Tyr83, TAC)。由以上結果得知，這些院內感染細菌所包含的抗藥性基因與其所對應的抗藥性呈高度正相關。

2. 流式微珠陣列鑑定

實驗流程如圖四，利用流式微珠陣列以鑑定11種院內感染細菌之7個抗藥性基因與pvl基因之multiplex PCR產物，如圖五至圖七所示。欲鑑別gram-positive和gram-negative細菌，與區分11種院內感染細菌gyrA的wtQRDR和mtQRDR，在ASPE引子的5'端設計4種不同的ZipCode來區分下列4種gyrA的QRDR：gram-positive細菌的wtQRDR (GP-gyrA-S)、gram-positive細菌的 mtQRDR (GP-gyrA-R)、 gram-negative 細菌的 wtQRDR (GN-gyrA-S)與gram-negative細菌的mtQRDR (GN-gyrA-R)。在 gram-positive細菌中，利用此技術可有效鑑定*S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. faecalis*和*E. faecium* gyrA的QRDR，MRSA和MRSE的mecA，CA-MRSA的pvl與VRE的vanA，然而只有Efam3菌株的gyrA 具有一個突變在QRDR的第3個鹼基上(Arg83, AGG)，故無法由GyrA-R1 APSE引子所偵測，如圖八所示。圖六展示此技術可鑑定*P. aeruginosa*與*Acinetobacter* spp. gyrA 的 QRDR，以及分別偵測blaIMP、blaVIM、ISAbal-blaOXA-23與ISAbal-blaOXA-51-like的存在。僅Aci5菌株無法由GyrA-AbR ASPE引子偵測，因其具有一個突變在QRDR的第3個鹼基上(Phe83, TTT)。該技術亦可鑑別5種

Enterobacteriaceae，包括 *K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*E. coli*、*E. aerogenes* 和 *E. cloacae* *gyrA* 的 QRDR，除了 Ecl 菌株包含另一個 mtQRDR (Tyr83, TAC) 無法藉由 GyrA-R5 ASPE 引子所偵測，如圖九所示。此外，所使用的 ASPE 引子之間無明顯的交叉性反應，顯示該技術對於同時偵測多重標的物具有高度的專一性。

表六顯示此技術對於偵測 7 個抗藥性基因與 *pvl* 基因的靈敏度，實驗 DNA 濃度範圍介於 5 到 1000 pg/μl。結果顯示偵測 GP-*gyrA*-S、GN-*gyrA*-S、GN-*gyrA*-R、*vanA* 與 *pvl* 具有低於 5 pg/μl 之較高的靈敏度。偵測 *mecA*、*blaIMP*、*blaVIM*、ISAbal-*blaOXA*-23 和 ISAbal-*blaOXA*-51-like 的靈敏度則分別介於 100-500、100-500、5-10、10-50 和 100-500 pg/μl 之間。然而，偵測 GP-*gyrA*-R 之靈敏度僅介於 500-1000 pg/μl。

(四) Real-time PCR 快速鑑別不動桿菌對 ciprofloxacin 之抗藥性

1. Real-time PCR 分析臨床 55 株不動桿菌

比對四個 *Acinetobacter* spp. *gyrA* 基因的序列，分別為：*A. baumannii* SDF (CU468230)、MDR *A. baumannii* AYE (CU459141)、*A. genospecies 3* (AY204699) 與 *A. genospecies 13TU* (AY204701)。依上述比對結果，設計合成 *gyrA* 基因所使用的引子

與探針：引子：Ab-GF (5'-A CAAGAAATCTGCCCCGT-3'), Ab-GR (5'-CGAAGTTACCCTGACCATC- 3'); 探針：Ab-FL3 (5'-CATGGTGA CT CAGCTGTTT-3'-fluorescein), Ab-LC3(5'-Red640-GAAACCATTGTWCGTATGGCTCA-3'-phosphorylated), 此引子可利用 PCR 反應增殖出長 145 個鹼基的 *gyrA* 基因部分片段(圖十)。

針對收集的臺大醫院55株臨床 *Acinetobacter* spp. 進行 Real-time PCR分析。利用已設計的探針Ab-FL3和Ab-LC3，可將 *gyrA* 基因的QRDR藉分析Melting curve區分為47、50和52°C 的T_m值(圖十一)。其中31株 *A. baumannii* 的T_m值鑑定為47°C。然而3株 *A. baumannii*、6株 *genospecies 3* 以及11株 *genospecies 13TU* 的T_m值分別鑑定為52°C。此外，4株 *genospecies 3* 的T_m值鑑定為50°C。

2. *gyrA* 基因定序分析及 ciprofloxacin 藥敏試驗

為確定Real-time PCR的鑑定結果之正確性，將該55株臨床 *Acinetobacter* spp. 的 *gyrA* 基因定序及進行對ciprofloxacin之感受性試驗。表七顯示大部分的(91%，31/34株) *A. baumannii* 在 *gyrA* 胺基酸序列中第83個胺基酸皆由Ser突變為Leu (Ser83→

Leu83)，且該全部菌株對於ciprofloxacin具抗藥性(MIC \geq 4 mg/L)；然而，其他3株*A. baumannii*、10株genospecies 3 以及11株genospecies 13TU在*gyrA*胺基酸序列中第83個胺基酸則Ser83，且皆對於ciprofloxacin具有敏感性(MIC $<$ 4 mg/L)。這些結果和Real-time PCR的結果具有高度一致性：大部分對ciprofloxacin敏感性的*Acinetobacter* spp. 菌株，其T_m值為52°C；然而全部對ciprofloxacin有抗藥性的*Acinetobacter* spp. 菌株，其T_m值皆為47°C。除此之外，另外4株對ciprofloxacin敏感的genospecies 3，由於在第264個核酸具有一個A的鹼基，故其T_m值為50°C。因此，利用Real-time PCR分析*gyrA*基因的QRDR可有效的鑑定*Acinetobacter* spp. 菌株對於ciprofloxacin是否具有抗藥性。

(五) 探討不同種別 *Acinetobacter* Carbapenemase 相關基因之特性

1. Carbapenemase 相關基因之偵測

針對收集的臺大醫院81株臨床*Acinetobacter* spp. 進行分析，其中含53株*A. baumannii*、13株genospecies 3 以及15株genospecies 13TU (表八)。偵測carbapenemase相關基因，除了*bla*_{OXA-51}基因外，其他包括*bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{OXA-23}、*bla*_{OXA-24}與*bla*_{OXA-58}等皆不存在於任何*A. baumannii*菌株中。大部分

(88.7%，47/53 菌株)的*A. baumannii* 菌株具有IS*Aba1*-*bla*_{OXA-51}結構，對於imipenem具有減少敏感性甚至抗藥性(MICs = 2-32 mg/L)。然而，不具有IS*Aba1*在*bla*_{OXA-51}基因上游的其他6株*A. baumannii*，對於imipenem有較高的敏感度(MICs = 0.5-1 mg/L)。另外在13株genospecies 3 以及15株genospecies 13TU中，只有*bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、與*bla*_{OXA-58}等carbapenemase相關基因被測出。全部4株抗imipenem的genospecies 3皆含有一個*bla*_{IMP}基因。共1株含*bla*_{IMP}基因的genospecies 13TU對imipenem有抗藥性，而兩株含*bla*_{VIM}基因的genospecies 13TU則對imipenem敏感性。全部7株含MBL基因的*Acinetobacter* spp.皆具有一個*bla*_{OXA-58}基因。

2. MBL 的分析

進一步分析該7株含MBL基因之*Acinetobacter* spp.。PFGE的結果顯示此7株*Acinetobacter* spp.為非同源的菌株(圖十二)。由定序結果發現，在*bla*_{OXA-58}基因的上游部分只有一個IS*Aba3*結構，而*bla*_{IMP}與*bla*_{VIM}也分別被鑑定為*bla*_{IMP-1}與*bla*_{VIM-11}基因(表九)。E-test MBL的結果顯示，5株具*bla*_{IMP-1}基因的菌株(No.1-5)皆對imipenem有抗藥性，且當EDTA的存在下，對imipenem的MIC有明顯減少的情況發生。然而，兩株具*bla*_{VIM-11}

基因的菌株 (No.6和7)對imipenem敏感，但是由E-test MBL的結果顯示未受到EDTA的影響(圖十三)。

3. Imipenem 水解活性分析

欲比較含 bla_{IMP-1} 與 bla_{VIM-11} 基因的菌株間在E-test MBL結果的差異性，備製該7株含MBL基因之*Acinetobacter* spp.的全細胞萃取物以測量對Imipenem的水解活性，同時也測試受EDTA的抑制效果(表九)。具 bla_{IMP-1} 基因的5株菌株(No.1-5)具有明顯的imipenem水解活性(499-1001 nmol/min/mg of protein)，且在EDTA存在下該水解活性明顯受到抑制 (1.06-2.32 nmol/min/mg of protein)。然而，具 bla_{VIM-11} 基因的2株菌株(No.6和7)，其imipenem水解活性明顯較低(0.48-0.84 nmol/min/mg of protein)，而在EDTA的存在下無法測得。此外，經由RT-PCR的結果發現，該7株含MBL基因之*Acinetobacter* spp.的 bla_{VIM-11} 和 bla_{OXA-58} 基因似乎沒有表現(結果未呈現)。

4. 外膜蛋白分析

欲研究為何No.7對imipenem的MIC大於No.6儘管具有相同的IS*Aba3*- bla_{OXA-58} 和 bla_{VIM-11} 基因，我們分析三株genospecies 13TU的外膜蛋白(圖十四)。六個條紋，編號從A到F，自膠體中

切下並進行後續LC-MS/MS分析。(表十)顯示自LC-MS/MS胜肽鑑定的結果。依據NCBI資料庫，條紋A鑑定為OprD-like (CAM88440)，條紋B和C鑑定為OmpA (ABO13246)，條紋D鑑定為34 kDa OMP (CAJ01528)，而條紋E和F則分別鑑定為CarO (ABG27025和ABR68804)。

進一步探討在No.5和No.7菌株中造成OprD-like (條紋A)缺失的可能原因。利用PCR合成No.5和No.7菌株的完整*oprD*基因，並進行定序。比較*oprD*基因的核苷酸與胺基酸序列的結果顯示，在No.5菌株中，其*oprD*基因在第1015個核苷酸處由G轉變為T，因此造成第339個胺基酸變成終止密碼導致無意義突變。此外，在No.7菌株中，其*oprD*基因在第176個核苷酸處被5個鹼基(TTATG)插入，造成在第71個胺基酸處變成終止密碼而導致無意義突變。因此，No.5和No.7菌株的*oprD*基因皆因無意義突變而形成不完整蛋白。

(六) 利用 MLST 分型探討國內及國際念珠菌之分子流行病學

1. *C. tropicalis*

以MLST分析台大醫院14位ICU病人之多重分離菌株共50株*C. tropicalis*，共有21種diploid sequence types (DSTs) 產生。以UPGMA樹狀圖分析，使序列相似度大於74%，所有菌株可

分為三個clonal groups (圖十五)，clonal group I (13株) 及II (26株) 各有8種DST，而clonal group III (11株) 則包含5種DST。PFGE-NaeI 區分為六個 clusters(cluster A至F) 及三個 minor groups(minor group I至III)。MLST與PFGE-NaeI高度相關性 ($p < 0.05$)。

與Jacobsen等人以eBURST分析其所收集242株其他各國*C. tropicalis* 菌株¹⁷⁸相比，台灣目前所收集的菌株共分屬於7個 eBURST clusters，而本研究的菌株則主要分布於3個clusters中，其中包括clonal group III (包含DST 134、175與178)屬於主要來自英國及美洲菌株的eBURST clusters 1，clonal group I的菌株 (包含DST 98及140)分屬於大多來自台灣菌株 (少數來自英國及哥倫比亞) 的eBURST clusters 4，而clonal group II中包括DST 169、174及177菌株則囊括於全部為台灣菌株之eBURST clusters 7。

由於*C. tropicalis*為雙倍體 (diploid) 酵母菌，其不同對偶基因 (alleles) 上SNP (single nucleotide polymorphism) 位點變化可產生不同heterozygosity / homozygosity (heterozygous / homozygous SNPs)。本研究中，由單一病人所分離出之多重菌株可藉由MLST序列上SNP變化之特點，進一步追蹤這些菌株

在病人個體上進行置換 (replacement)、微演化 (microevolution) 或維持不變 (maintenance) 等情形。分離自P2病人的3株菌株中，DOH86g018 與 DOH86g082具有相同的DST165，其包含了 16 個 heterozygosity，而 DOH86g099 為 DST173 則有 7 個 heterozygosity。此兩種DST的*C. tropicalis*菌株，在*MDR1* 基因上具有9個heterozygosity的差異。來自P6的菌株，DOH86g070 (屬於 DST169) 與 DOH86g076 (DST170) 各具有 7 及 8 個 heterozygosity，只在*ZWF1a*基因上具有1個heterozygosity的差異。同樣的，DOH86g095 (屬於DST134) and DOH86g031 (屬於 DST TW1) 分離自P13也在*SAPT2*基因上具有1個heterozygosity 的差異。另外，由多株來自P10與P11的菌株中，菌株間於單一基因上其heterozygosity的變化也呈現多樣性。以上結果可提供我們了解關於*C. tropicalis*在病人身上產生微演化的現象。這種在單一基因上產生heterozygous SNP的現象於本研究中只見於 clonal group II及III。來自病人P4、P5、P7、P8、P9、P10、P11 與P12的各同一病人之分離株則在多個基因上產生不同的 heterozygosity 變異，此情形也發現於*C. albicans*¹⁷⁹及*C. glabrata*¹⁸⁰。而來自P1、P3與P14的多重菌株則都維持一相同 DST於同一病人身上 (圖十六)。

菌株抗藥性分析方面，其MICs結果如表十二所示。在50株*C. tropicalis*菌株中，只有一株對voriconazole具抗性，其他菌株對於azole類藥物包括voriconazole及fluconazole皆為敏感性；在amphotericin B的測試中，也只要一菌株具抗藥性。然而，於flucytosine的藥敏試驗中，發現有2株MIC值為32 µg/ml為抗藥菌株分離自P1，以及11株中間抗藥性 (intermediately resistant; MIC=8-16 µg/ml) 菌株分別來自於病人P1 (7株)、P7 (1)、P10 (2) 與P14 (1)。這些對於flucytosine具抗性的菌株中，有92.3% (12/13) 皆屬於DST164。

利用e-Burst方法將MLST結果分成3型。而與Tavanti等人所發表文獻(Tavanti et al., 2005a)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%) (圖十七)。

DST 140是TSARY1999 最主要的 Fluconazole resistant clone，為了了解DST 140是否持續存在台灣。本篇研究我們使用了MLST的方法分析了TSARY2006年分離的50株熱帶念珠菌。其中31株是 Resistant(MIC>64)，19株是 Susceptible(MIC<16)，這些2006年菌株選擇的原則是與1999年是使用來自相同醫院的分離株。31株的Resistant中DST 140及98佔了11株(比例35.5%)，19株的Susceptible不包含DST 140及98。再者1999與2006分離的53株Fluconazole Resistant中DST140及98佔了24株(比例45.3%)。Fluconazole抗藥性與MLST allele的關係，Fluconazole resistant 當中MDR1(allele=3)比例92.1%，SAPT4(allele=17) 比例92.1%，XYR1(allele=54) 比例88.6%，是否這些allele與Fluconazole的抗藥性敏感性有關聯，需要更進一步的研究。

DST140及98與地理區及醫院的關係，DST140來自不同10個不同醫院及地理區北中南東均涵括，DST98來自不同4個不同醫院及地理區北部及南部。從結果來看這兩個DST廣泛分佈於台灣，並沒有醫院及區域的outbreak發生。

在台大醫院35株中分出19DST型，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型中。

2. *C. albicans*

就Clade的分佈而言，台灣201分離株區大致分為14個Clade(圖十八)，Clade 1 (37 isolates), Clade 4 (35), Clade 16 (26), Clade 3 (15), Clade 17 (14), Clade 9 (11), Clade 10 (10), Clade 8 and Clade 11 (7)及其他較為次要的Clade。(表十八)比較各clade中ABC type的比例，A type所佔比例較高者如Clade 1(25/37), Clade 7(3/3), Clade 8(6/7)；B type所佔比例較高者如Clade 3(16/16), Clade 4(30/36), Clade 10(10/10), Clade 12(8/9), Clade 16(24/26), Clade 17(13/14)。另外C type所佔比例較高者如Clade 11(4/8)，A type與C type比例相等的Clade 9(5/11)。Mating type中Homozygosity(不管是a type或是 α type)所佔比例相當低只有約(7/201)。Homozygosity分布於Clade 1、11、16及17。愛滋病人比例高的Clade有Clade 7(5/7)及Clade 11(5/8)。Fluconazole的MIC大多為susceptible，值得注意的是Clade 10有50%的高比例為resistant。地理區的分佈，由於收集的菌株大多是來自北部，當中南部較高的Clade為4與10。

利用 Minimum spanning tree 比較 201 株菌株的 7 個 alleles，所得到的關係圖如(圖十九)顯示，大致區分為 19 個 Clonal cluster。進一步說明個別 Clonal cluster 中 DST 的關聯性。從抗真菌的抗藥性結果分析，Clonal cluster 1 的 predicted founding ST 為 DST 669N3，經由兩個演化路徑變成 DST 1019N 與 669N4(Itraconazole 由 susceptible 變成 intermediate)。Clonal cluster 2 的 predicted founding ST 為 DST 766，演化變成 DST 673(Itraconazole 由 susceptible 變成 resistant)。Clonal cluster 3 的 predicted founding ST 為 DST 659N2，其中有一條演化變成 DST New 20(Fluconazole 由 susceptible 變成 resistant)。Clonal cluster 4 的 predicted founding ST 為 DST 601，經由兩個演化路徑變成 DST 671 與 1332(Fluconazole 與 Itraconazole 由 susceptible 經由 trailing growth 變成 resistant)。Clonal cluster 8 的 predicted founding ST 為 DST 669N6，經由演化變成 DST New57(Voriconazole 由 susceptible 經由 trailing growth 變成 resistant)。

(圖二十)台灣及國際比較的分離株共計 1508 個 DST 的 eBURST，大約可區分出 78 個 clonal cluster groups，其中具有 predicted founder 共有 26 個 clonal cluster groups。最大的 clonal

cluster 1 有 283 個 DSTs，其 predicted founder 為 DST69。就台灣的多年存在之菌株型別 DST918 屬於 clonal cluster 8 的 predicted founder。DST659 屬於 clonal cluster 15。另外 Fluconazole resistant 的 DST304 及相似型別屬於 clonal cluster 17 的 predicted founder。

3. *C. parapsilosis*

於台大醫院 2002 至 2003 年間，由 71 位病人中所分離出之 97 株經 Vitek II 鑑定為 *C. parapsilosis* 菌株進行分析。檢測其 ITS 片段序列後，發現這些菌株可進一步分為不同菌種，分別為 *C. parapsilosis sensu stricto*、*C. metapsilosis* 及 *C. orthopsilosis*。這些菌種所佔的比例為 83.5% (81/97)、9.3% (9/97) 與 7.2% (7/97)。由於有些病人可分離到多重菌株(來自同一病人菌株皆為同種)，其菌種的比例分配為 85.9% (61/71)、5.6% (4/71) 與 8.5% (6/71)。檢視其分離部位，發現來自血液的菌株最多，約佔 60% (59/97)。*C. parapsilosis sensu stricto* 菌株在各個採檢部位如血液、尿液、皮膚、痰液及中心靜脈導管(CVC, central venous cathete)等皆有發現。有三株 *C. orthopsilosis* 菌株則是來自皮膚部位，值得注意的是，六位病患中有四位來自皮膚相關部門。

在藥敏檢測方面，所有菌株對於 flucytosine, amphotericin B, 及 voriconazole 皆為敏感性。有三株來自同一位病人的 *C. metapsilosis* 菌株對於 fluconazole 則具抗性或呈劑量依賴感受性(susceptible-dose dependent)，並且為隨著病人採檢的時間推進，其 MIC 濃度也隨之增加。對所有菌株的 MIC 值進行統計，*C. metapsilosis* 對於 fluconazole 及 voriconazole 的 MIC 值皆較 *C. parapsilosis sensu stricto* 與 *C. orthopsilosis* 菌株來的高，並具有顯著差異($p < 0.05$)。

為了進一步了解這些不同種類菌株的型別及基因體上得特性，我們進一步利用 PFGE 分型法。將此 97 株 *C. parapsilosis* 之染色體 DNA 經 *BssHIII* 酶切後產生之片段以 PFGE 分離後，產生 83 種 DNA 圖譜 (即為 83 種基因型)。以 UPGMA 演算法之樹狀圖分析，將圖譜相似度設定為大於 75%，可分為三個主要的 group (圖二十一)，而此三個族群則正好符合 ITS 序列所鑑定之菌種，如圖中顯示由上而下分別為 *C. parapsilosis sensu stricto*、*C. orthopsilosis* 及 *C. metapsilosis*。

本研究中由 16 位病人取得多重 *C. parapsilosis* 分離株，發現於同一病患上其多重分離菌株表現相同或高度相關之基因型者有 12 位(75%)。除了病人 P16、P24、P31、P33 及 P53，

多數病人之多重分離株皆來自同一部位，其中包括有血液、中心靜脈導管、尿液、耳朵、膽汁等來源。由 P16、P24、P31、P33 與 P53 此五位病人所分離出之多重菌株雖來自血液及中心靜脈導管不同部位，卻仍表現相同 PFGE 型別，推測這些分離株為來自各個體中同一來源。

進一步觀察單一病人之多重菌株的 DNA 圖譜差異，16 位病人中有 7 位(44%; P5, P7, P13, P16, P24, P53 及 P64)具有相同基因型的多重菌株，而有些病人的多重菌株在 PFGE 分析圖譜上則具有些微差異(一至三個條帶的不同)，如 P2, P31 及 P42，推測可能有微演化現象發生(圖二十二)。另外，有 6 位病人的多重菌株(P3, P4, P12, P31, P33 及 P66)之 DNA 圖譜差異較大，顯示單一病人中存在多種 *C. parapsilosis* 型別，推測可能有置換現象產生。

(七) 光學圖譜分析鮑氏不動桿菌全基因分析

Optical mapping 分析結果如圖二十三所示，圖 A 為臨床菌株，圖 B 為標準菌株 ACICU，紅色框架標示基因體上的差異部份，由圖中可發現在臨床菌株上多出了數個大片段的插入序列 (Insertions)，由左到右大小片段分別為 100Kb，40kb，20kb，35kb，

50kb，40kb，標準菌株染色體上亦有一個約 100kb 片段的變異區域以及約 50kb 的插入序列，這些大片段基因組中皆包含大量的基因，值得我們進一步研究了解。將這些插入續列與其他鮑氏不動桿菌的菌株圖譜做比對，加上文獻的搜尋，發現有趣的現象，如圖二十四所示，臨床菌株與比對到已知相關的抗藥性基因組 AbaR1(黃色條狀區)與 AbaR2(粉紅條狀區)，但是與兩者又有不同，比 AbaR1 短，比 AbaR2 長，推論其中定有相關抗藥性基因的變異，我們將定序這段基因作後續的分析研究。

四、討論:

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

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

傳統鑑別系統主要依照菌株之表現型作為區分菌種的依據，如市售的 API20 NE¹⁸¹ 與 Viteck 2¹⁸² 兩種表現型鑑定系統系統。近年來拜分子生物學的發展，許多以分子生物為基礎的方法可提供較高

的鑑別力，參考前人的研究顯示，ITS 序列能有效地區分菌種，鑑別力高，支持 ITS 序列較 16S rRNA 為一適合之標的¹⁸³。

新穎流式微珠陣列多重鑑定方法能單管快速偵測多達 100 種病原，並可半定量。相較於核苷酸定序過程繁雜且至少須一天工時，流式微珠陣列僅需 8.5 個小時即可得到結果¹⁸⁴。在成本估算方面亦較定序來得低。可見流式微珠陣列確有速度快、高通量及擲節成本之優勢。Probes 設計之初皆參照已發表的標準菌株序列做設計，因此以流式微珠陣列檢測標準菌株的結果如同預測，positive 的訊號強度明顯高於背景值，確認整個實驗之正確性。The MSA is simple, rapid, specific, high throughput and capable of multiple species detection of clinically important molds, and can complement existing diagnostic methods and be integrated in clinical diagnostic workflow at a low cost.

ITS 之聚合酶鏈反應使用的細菌引子，經過三種菌屬 (*Staphylococcus*、*Pseudomonas*、*Acinetobacter*) 的 16s rRNA 以及 23s rRNA 的比對，所設計出來，forward primer 為 16s rRNA 的後端部分，reverse primer 則為 23s rRNA 的前端部分，reverse primer 使用 degenerated primer：5'-(T/G)A(C/G)TGCCAAGGCATCCACC-3，但是由於 degenerated 的核苷酸位置位於 5'端的前面，因此事實上無論 (T/G)(C/G)如何組合皆能夠順利將此三種細菌的 ITS 片段增幅出來；

真菌引子則是使用前人文獻中所設計的序列，同樣也是針對真菌的 ITS 片段。Probes 設計是以標準菌株的序列為基準，經過比對之後選擇出具有特別序列順序的保留性區域做為 probes 的目標，以分類地位來說，不同屬之間的菌種的序列差異較大，對於以 direct hybridization 的方式做流式微珠陣列檢測來說，設計 probe 鑑別菌株較為容易，而同屬不同種之間的序列差異則會變少，程度依據不同菌屬而不同，然而若是分類地位到達 strain 或是 subspecies，則序列相似度會大增，很可能 similarity 可高達 95%以上，如此對於 probe 的設計難度就會提高，通常可能只有利用 single base mutation 的位置來做區別，如同本實驗中的 *A. baumannii*，目前無法使用單一的 direct hybridization probe 區分出 genomic 3 和 13TU 的菌株。

SA probe 原本設計有兩條探針序列，針對 *S. aureus* 的 ITS 序列結合，經過臨床檢體測試 MSSA (10 isolates)和 MRSA (66 isolates)皆無問題可以正確辨認，然而在測試 CNS (10 isolates)的過程中，發現第一條探針會與 *S. epidermidis* (6 of 10)發生交叉反應的現象，而第二條則否。其餘三株 *S. capitis* 與一株 *S. haemolyticus* 則都會與此兩條探針有交叉反應的現象。原本 CNS 僅被歸類為單一菌屬，後來因為院內感染的重要性提高，而受到重視，鑑定到 species 則顯得重要，在 CNS 的感染中，以 *S. epidermidis* 為最大宗也最重要，所以在臨床菌

株的測試中僅選擇使用第二條探針(如文中序列)做為 probe 以避開 *S. epidermidis* 的交叉反應。剩餘 CNS 約有三十餘種，其中半數與院內感染相關，將這些 CNS 分別鑑定到 species 的階段可以做為此偵測系統未來的努力目標之一。

PA probe 就已經測試過的臨床菌株中尚無發現交叉反應的現象，然而在臨床菌株的測試中 min ratio 明顯較其他 probe 訊號強度低，然而在 sensitivity 測試中訊號則有起始 DNA 濃度低而訊號較佳的現象，因此 DNA 濃度最佳化以及 probe 的專一性、靈敏性也有提升的空間。由靈敏度測試結果以及臨床菌株測可以看出，起始的 ITS 片段增幅反應中作為 template 的 genomic DNA 濃度對於最後訊號強度是有影響的，但是似乎並沒有一個明確的規則，有些一菌種不同而異的情形。實驗中發覺，對於 SA probe 和 AB probe 似乎是 template 濃度高些訊號強度會較佳，而 PA probe 則好像在較低濃度的某範圍中訊號值會較高；臨床菌株的測試中所使用的 DNA template 濃度都比較高，而 PA probe 的訊號則較差。推論可能造成原因為 probe 本身與 target 結合能力以及結合位置上的差異所造成，也可能因為其他核酸序列存在而影響到結合能力。

本研究發展出能迅速區分常見院內感染病原菌的平台，尤其是臨床上最重要的 *S. aureus*，*P. aeruginosa*，*A. baumannii*。在鑑定

Acinetobacter spp.方面，進一步將本研究鑑定結果與台大醫院提供的抗藥性樣式結合分析，發現多數的 *A. baumannii* 臨床菌株均對 ciprofloxacin 與 imipenem 具抗藥性；反之，genomic species 3 及 13TU 則對 ciprofloxacin 與 imipenem 幾乎都為感受性。此項新發現極具臨床意義，顯示正確地將 *A. baumannii* 鑑定出來，有助於臨床更精準地投藥，間接減緩抗藥性菌株之崛起。本技術另一潛在優勢，為多重混合感染之鑑別，由於臨床上多重病原混合感染可達 5-22%^{185,186}，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或許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，未來接續本計畫將此多重檢測平台應用於多種多重抗藥性院內感染病原菌之鑑定上，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。

本研究利用 Real-time PCR 快速偵測 *gyrA* 基因的 QRDR 以判定是否為 ciprofloxacin 之抗藥性 *Acinetobacter* spp. 菌株。快速鑑定 *Acinetobacter* spp. 菌株對於 ciprofloxacin 的敏感度提供了兩項重要性：(1) ciprofloxacin 可能較 carbapenem 適合治療具有 Ser83 *gyrA* 基因的 *Acinetobacter* spp.，尤其是 *Acinetobacter* genospecies 3 和 13TU；(2) 鑑定出對 ciprofloxacin 具有抗藥性的 *A. baumannii* 可能也具有臨床

意義，因為抗 ciprofloxacin 的 *A. baumannii* 菌株常都為 MDRAB^{114,146,187}，故可使用其他建議的抗生素作為治療，如結合 carbapenem 和 sulbactam、colistin 及 tigecycline。因此，偵測 *Acinetobacter* spp. *gyrA* 基因的 QRDR 可以提供臨床醫師用藥上的策略，同時亦可增加正確治療的機會。

本研究同時也鑑定出不種別的 *Acinetobacter* spp. 具有不同形式的 carbapenemase 相關基因。發現 *bla*_{IMP-1} 和 *bla*_{VIM-2} 基因大部分存在於 *Acinetobacter* genospecies 3 和 13TU 中，而少見於 *A. baumannii* 中^{114,146}。在全部對 carbapenem 有抗藥性的 *A. baumannii* 中，只有發現 IS*Aba1*-*bla*_{OXA-51} 結構，而已有文獻顯示該結構對於 imipenem 的減少敏感度或抗藥性有關¹⁵¹。然而，class D OXA-type carbapenemases 對於 carbapenem 的水解活性明顯低於 MBL，故目前對於 class D OXA-type carbapenemases 在 *A. baumannii* 中造成抵抗 carbapenem 的機制仍然未明^{150,153}。

根據 imipenem 水解試驗的結果，我們發現具 *bla*_{IMP-1} 的菌株相較於 2 株含 *bla*_{VIM-11} 基因的菌株具有明顯較高的 imipenem 水解活性，再加上 *bla*_{VIM-11} 基因無表現的結果，可以推論該 2 株含 *bla*_{VIM-11} 基因的菌株 (No.6 和 No.7) 對 imipenem 敏感且具非常低的 imipenem 水解活性。然而，根據 E-test MBL 與 *bla*_{OXA-58} 基因無表現的結果，支持 *bla*_{OXA-58} 基因

會受到不同序列的誘導而表現，例如包括IS*Aba3*-like、IS*Aba1*、IS*Aba2*與IS*I8*¹⁵³。最近文獻指出*bla*_{OXA-58}基因的上游序列IS*Aba3*被一段插入序列IS*I008*截斷，此結構提供啟動子使*bla*_{OXA-58}基因表現¹⁸⁸。因此，IS*Aba3*啟動子似乎與carbapenem的抗藥性無關¹⁴⁹，而在本研究也發現類似的現象。

由 SDS-PAGE 分析與 LC-MS/MS 胜肽鑑定的結果顯示，OmpA、CarO 和 34kDa OMP 皆存在於 3 株具 MBL 基因的 *Acinetobacter* genospecies 13TU 菌株中，只有 No.5 和 No.7 菌株缺少 OprD-like。OmpA 為 *Acinetobacter* spp. 外膜蛋白中含量最高的蛋白，最近也有文獻指出與抗藥性無相關¹⁸⁹。由 RT-PCR 結果顯示，兩株具 *bla*_{VIM-11} 的菌株 (No.6 和 7) *bla*_{VIM-11} 和 *bla*_{OXA-58} 基因無表現產物，而 No.7 菌株缺少 OprD-like 相較於 No.6 菌株對 imipenem 卻具有較高的 MIC 值。此外，已有文獻指出 *A. baumannii* 的 OprD-like 和胺基酸的吸收與 carbapenem 的滲透有關¹⁵⁴。在本研究中，我們發現 No.5 和 No.7 菌株的 oprD 基因皆發生無意義突變。根據 E-test MBL 的結果，相較於其他菌株 (MIC <1 mg/L)，唯有 No.7 菌株在 EDTA 存在下對 imipenem 具有較高的 MIC (MIC = 2 mg/L)，故推論 No.7 菌株的不完整 OprD 為無功能性蛋白，使其可減少敏感於 imipenem。然而，在 No.5 菌株中，其不完整的 OprD 分子量約 36.5kDa，可能在圖 中

存在於條紋 C 之上的獨特條紋，但 No.5 菌株在 EDTA 存在下對於 imipenem 仍然較 No.7 菌株敏感。此外，亦有文獻指出 *P. aeruginosa* 對 carbapenem 具抗藥性是由於 OprD 突變去活化所導致¹⁹⁰。因此，以上結果顯示 OprD 的缺失可能造成 *Acinetobacter* genospecies 13TU 減少對於 imipenem 的敏感度。

本研究結合 multiplex PCR 與流式微珠陣列以偵測 11 種院內感染細菌之 7 個“後線”抗藥性基因與 *pvl* 基因。此 multiplex PCR 反應包含 2 組不同黏合溫度的引子：低嚴謹度之簡併性引子具有約 40°C 的黏合溫度，可增強 *gyrA* 的合成效率；而高嚴謹度之巢式引子則具有約 60°C 的黏合溫度，可將不同 PCR 引子反應之黏合溫度進行統一。然而，欲節省 PCR 反應所耗費之時間，合成的 multiplex PCR 產物皆控制在小於 200 bp，及將變性溫度縮短至 1 秒。在 ASPE 反應中，每個 ASPE 引子皆包含兩段功能性序列：一為在每個 ASPE 引子的 5' 端皆具有一特異性 ZipCode 序列，可互補地與微珠上的 cZipCode 結合；另一為在每個 ASPE 引子的 3' 端設計專一性鹼基，可與對應模板上的多型性鹼基結合，而合成出 ASPE 延伸產物¹⁹¹。於本研究中，當一個 ASPE 引子的 3' 端鹼基無法和模板完全互補時，此時 ASPE 延伸產物之合成效率會明顯較完全互補者為低。依此原理，以設計 11 種院內感染細菌之 *gyrA* 的 QRDR 與其他標的基因之特異性鹼基於相對應

的 ASPE 引子上，當成功合成 ASPE 延伸產物時，該產物已標定上含生物素的 dCTP。ASPE 反應已被推薦為較適合偵測突變的方法之一^{119,184}。此外，利用 ZipCode 和 cZipCode 的雜交平台具有以下兩點優勢：可有系統地整合 ASPE 延伸產物和微珠雜交反應的溫度；已標定含 cZipCode 的微珠可於其他以核酸為主的反應中使用，故可有效率地節省微珠之使用開銷。

近年來由細菌所衍生出的抗藥性問題已逐漸攀升，尤其是針對一些後線抗生素，包括 fluoroquinolones、vancomycin 與 carbapenems¹⁹²。然而，Ciprofloxacin 逐年遞增的使用，也造成 CipR 細菌的快速崛起¹⁹³，而最常見的抗藥性機制莫過於細菌 DNA 旋轉酶的 GyrA 亞基與 topoisomerase IV 的 ParC 亞基產生突變所致¹⁹⁴。在本研究中，我們發現利用細菌 *gyrA* 的 QRDR 不但可預測對 ciprofloxacin 的敏感度，也可藉由 *gyrA* 序列之差異區分為 gram-positive 和 gram-negative 細菌。此外，質體(plasmid)為另一主要造成抗藥性基因快速散播的機制，包括 *mecA*、*vanA*、*bla_{IMP}*、*bla_{VIM}* 與 *ISAba1-bla_{OXA-23}* 基因多由此機制導致。MRSA 具有 *mecA* 基因，可以轉譯出一個新式的 penicillin-binding protein (稱 PBP2a 或 PBP2')，與所有的 β -lactam 具低親和性，故為主要對所有的 β -lactam 產生抗藥性的機制¹⁰⁴。MRSA 亦常為多重抗藥性，僅對 glycopeptide

類抗生素，如 vancomycin 具有敏感性¹⁰⁷。故 vancomycin 為治療 MRSA、MRSE 與 CA-MRSA 感染之首選。然而，VRE 的崛起主要由於包含一 *vanA* 基因，可轉譯出專一性酵素以合成變異的細胞壁，vancomycin 無法與此變異的細胞壁結合，而使該藥的作用受到抑制¹⁹⁵。不幸地，含有 *vanA* 基因而對 vancomycin 具有抗藥性的 *S. aureus* 已有文獻報導¹⁹⁶。藉由 *vanA* 基因轉移至 MRSA 而使其對 vancomycin 的抗藥性已成為目前全球公共衛生矚目的問題。Carbapenems，包括 imipenem 和 meropenem，為廣效性的 β -lactams 且視為目前治療 gram-negative 細菌之最後線抗生素¹⁹⁷。然而，具有下列兩類型 carbapenemases 的細菌，包括 class B metallo- β -lactamases (MBLs) 與 carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDLs) 已出現而造成臨床治療上與公共衛生上的威脅¹⁰⁸。IMP 和 VIM，為常存在於 *Acinetobacter* spp. 與 *P. aeruginosa* 的 class 1 integron 內之 MBLs，可以藉由 integron 將抗藥性基因在細菌之間平行傳遞，進而產生多重抗藥性問題¹⁹⁸。CHDLs，例如 OXA-23 與 OXA-51，常於 *Acinetobacter* spp. 內發現，另一插入序列(insertion sequence, IS) IS*Aba1* 提供啟動子的角色而使 *bla*_{OXA-23} 和 *bla*_{OXA-51-like} 大量表現，為目前對 carbapenems 產生抗藥性的主要機制^{151,199}。本研究結合 multiplex PCR 與流式微珠陣列以偵測 11 種院內感染細菌之 7 個“後線”抗藥性基因與 *pvl* 基

因。此技術平台具有高靈敏度與專一性，且可在 4 小時內完成。快速多重檢測細菌之抗藥性基因不但可增加正確治療的機率，減少由於錯誤治療所導致的抗藥性基因傳播，對於抗藥性趨勢的監測和公共衛生亦有莫大的助益。未來將與醫院合作，測試直接自臨床檢體偵測病原及抗藥性的可行性。可能的話將招募有意願合作的醫院架構臨床檢體及個案收納網絡，測試自臨床檢體直接偵測致病原及抗藥性對臨床診療的助益。

利用 MLST 分析菌株親緣關係的不僅藉由 DNA 序列清楚定義其基因型，使得結果穩定、再現性高，也易於實驗室間資料交換比對，具有國際化之優勢。將 MLST 分析結果利用 eBURST 演算法與其他國家菌株比較，我們發現多數於台灣所流傳的菌株易自成一群，如 eBURST clusters 4 及 7 主要為台灣菌株所構成，本研究中台大 50 株 *C. tropicalis* 之菌株約有 80% 也包括其中。*C. tropicalis* 菌株在台灣擁有其特殊之 DSTs 並聚集於某幾個 clusters 的現象推測可能是由於台灣特殊氣候條件或地理位置所致。

由來自單一病人的多重菌株中，我們也發現了其菌株間在 MLST 的分析上具有些微變化之情形。這種微演化的現象牽涉到於多個基因片段上獲得或失去 heterozygosity (heterozygous SNP) 之概念，在 *C. albicans* 上已被提出。在 clonal group II 中，分離自病人 P6 的兩菌株

在 *ZWF1a* 基因上只有一個 SNP 的差別，其他基因序列都是相同的。來自 P2 的 3 株尿液分離菌株中，最早分離出的菌株與三天後所分離出的菌株於 *MDR1* 基因上增加了 9 個 heterozygosity，至七天後所分離出的菌株仍維持相同 DST 基因型。而 P10 的分離菌株中，有 2 株尿液分離菌株同為 DST164，其採檢時間相差一天，而另外 2 支則分別為 DST174 及 DST177，採檢時間則差了 23 天。DST174 較 DST177 於 *XYR1* 基因上增加了 4 個 heterozygosity。於 clonal group III 中，4 株來自 P11 的分離株具有 3 個不同之 DST，分別為 DST134、DST175 與 DST178，但其都序列很相近，僅在 *XYR1* 基因上有不同 heterozygosity 數目之變化；DST134 較 DST175 增加了 8 個 heterozygosity，而 DST178 皆與上述二者具有 4 個 heterozygosity 的差異。由 P13 所分離出 2 株分離菌株則只於 *SAPT2* 基因上有 1 個 heterozygosity 的不同。Odds 等人曾利用 eBURST 方法分析在 *C. albicans* 菌株中發生增加或減少 heterozygosity 的現象來解釋其可能之演化機制。本研究中，針對 *C. tropicalis* 菌株在 clonal group II and III 中，也發現於來自同一病人之不同菌株間似乎以不同的速度在各基因上以 heterozygous-homozygous SNP 變化的形式產生突變。然而，這些菌株的變異或許不完全是進入 ICU 後隨時間所產生，其多樣性也可能來自於採檢前已發展或由於採集部位之不同所致。無論如何，以

上結果都顯示了 *C. tropicalis* 菌株確實可於人體內發生微演化之情形，可能有利於菌種不同個體上之適應及生長。

Tavanti 等人藉由 MLST 分析 *C. albicans*，發現具有 flucytosine 抗藥性的 clade 1 菌株，於 *FURI* 基因上帶有單一個核苷酸的突變，與其抗藥性質有關。一個近期的法國研究團隊也發表了由一群 *C. tropicalis* 之血液分離株對於 flucytosine 具有抗藥性。本篇研究中發現了 13 株分別來自 P1、P4、P10 與 P14 病人的 *C. tropicalis* 菌株，於 flucytosine 測試中表現了高 MIC 值。有趣的是，其中的 12 株皆是屬於 DST164 並分布於 MLST 的 clonal group II。推測 DST164 這一群菌株可能有較易轉變為對 flucytosine 具有抗性之性質。而我們也將這些具有高 flucytosine MIC 的菌株的 MLST type 與 Tavanti 等人與 Desnos-Ollivier 等人所收集的同樣具有 flucytosine 抗藥性之歐洲菌株進行比對，其基因型相關性並不高。因此，具有 flucytosine 抗藥性之菌株型別的出現可能因地理區的不同而有所差異。由於目前發現 *C. tropicalis* 對 flucytosine 具抗性的菌株並不多見，我們未來也將搜尋與 flucytosine 抗藥機制之相關基因，針對這些菌株探討其基因多型性的變化。

本研究由醫院所收集的菌株中，使用快速檢測的方法，如 VitekII，僅能鑑定為 *C. parapsilosis sensu lato* 菌株。Tavanti 等人研究

團隊於 2005 年正式將 *C. parapsilosis* group II 及 group III 界定為新種，並命名為 *C. orthopsilosis* 及 *C. metapsilosis*²⁰⁰。雖然此兩菌種在國際上相對的比例並不多，但受到不同地理影響，各個國家的比例分布情形也不盡相同²⁰¹。本篇所收集的菌株中，經由進一步 ITS 序列的鑑定，發現此二新種佔有部份比例，值得進一步探討。

C. parapsilosis sensu lato 菌株多被發現分離自血液及皮膚檢體，並且主要來自加護病房及皮膚科相關部門之病患²⁰²。本研究中，菌株主要來自血液。而 *C. orthopsilosis* 則多數為來自皮膚相關檢體，但由於採集的數量有限，需做進一步的研究及釐清。

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

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

五、重要研究成果與具體建議

我們的主要進展有八：**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26種臨床重要絲狀黴菌的種別如 *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Coccidioides* spp., *Rhizomucor pusillus*, *Penicillium marneffeii*, *Paecilomyces javanicus*, *Saksenaea vasiformis*, *Apophysomyces elegans*, *Absidia corymbifera* 和 *Syncephalastrum racemosum*。此方法特異性高，僅 *Mucor racemosus* (Murac)的探針會與 *Mucor hiemalis* 和 *Mucor ramosissimus* 交叉反應。敏感度為 100 fg ~ 1 ng。整個流程包含核酸增幅可於5小時內完成。**第二**、成功開發流式微珠陣列系統，可單管快速正確地鑑定台灣院內感染最重要三種病原細菌：不動桿菌、金黃色葡萄球菌以及綠膿桿菌及一種真菌：白色念珠菌，敏感度可高達1-10 pg DNA。**第三**、發展院內感染多重抗藥性細菌抗藥性基因的快速多重檢測平台。方法為利用單步驟巢式多重PCR 從methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)、community associated MRSA (CA-MRSA)、methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE)、vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE)、carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA)、carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. (CRAB)和 ciprofloxacin-resistant (CipR)

Enterobacteriaceae等院內感染細菌增幅*gyrA*、*mecA*、*vanA*、*blaIMP*、*blaVIM*、*ISAbal-blaOXA-23*和 *ISAbal-blaOXA-51-like*等7種所謂最後線抗藥性基因(last resort antibiotic-resistant genes)，外加 *pvl* 基因。此方法敏感度及特異性均高，整個流程可於4小時內完成。準確快速的鑑別這些抗藥性基因可望有助於治療及防治。第四、發展快速鑑定不動桿菌對ciprofloxacin 抗藥性針對*gyrA*基因點突變之real-time PCR方法。本研究同時也鑑定出不種別的*Acinetobacter* spp.具有不同形式的carbapenemase相關基因。進而發現外膜蛋白中OprD的缺失可能造成 *Acinetobacter* genospecies 13TU減少對於imipenem的敏感度。並調查台灣不同不動桿菌基因型抗藥性機的分佈情形。第五、分析熱帶念珠菌的分子流行病學，顯示同一病人的多重菌株雖有些有微演化，但多半維持同一型別。且我們發現對flucytosine降低感受性的熱帶念珠菌菌株(DST164)在不同病人同時出現。第六、分析來自71病人的97株副禿髮念珠菌的分子流行病學，分析ITS2序列發現其中實際台灣的*C. parapsilosis* 實際上85.9% (61/71)是*C. parapsilosis sensu stricto*，8.5% (6/71)是*Candida orthopsilosis*而 5.6% (4/71)是*Candida metapsilosis*。此區分也與BssHII-PFGE 的類緣分析吻合。*C. metapsilosis* 的菌株對fluconazole 較有抗藥性；*C. parapsilosis sensu stricto* 對echinocandins 降低感受性。此3基因型好感染的部位似乎也

不同，顯現3者的精確區分具有臨床及治療意義。**第七**、持續應用 MLST分析台灣菌株外，並與國際菌株進行類緣性分析，以進一步調查流病關聯性，及地理趨適性的分子機轉。**第八**、使用光學圖譜(optical mapping)技術針對鮑氏不動桿菌多重抗藥性菌株進行全基因體分析，由於這項技術可以建構完整且原位排序基因限制酵素圖譜，並與已知全基因序列的七株標準菌株共做分析比較，觀察基因的重組排列，包含插入序列(insertion)、遺失序列(deletion)、反轉序列(inversions)或者雙倍序列(duplications)等情況。

本年度研究成果至少有SCI論文十一篇(3篇已發表，1篇列印中，1篇修改接受中，3篇已投寄，2篇投寄中，1篇撰寫中)，專利一篇(申請中)。我們的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。國際上持續建立合作關係，交換型別資訊或提供訓練。希望藉由持續努力瞭解病原可能傳播流行及特定高抗藥性/高致病性株系崛起之情形。甚且探勘出特異性流病、檢驗及疫苗標誌分子。

具體建議有八：

1. 將研究成果及型別資料將回饋給送檢單位及臨床醫師，協助釐

清病原於病程及療程中之變化，並持續合作與臨床及流病資料整合建立資料庫。

2. 擴大應用快速多重流式微珠陣列鑑定方法於其他細菌及真菌病原，院內感染病原菌、抗藥性基因、重病孱弱患者之病理檢體等。與醫院合作轉譯醫學，探討實際臨床應用之可行性。
3. 深入探討抗藥性病原真菌及院內感染病原之抗藥性機制，以提供預防因應之道。
4. 發展全基因體分析技術，探討國內具代表性臨床菌株的特性及其致病機轉。
5. 進一步開發快速多重流式微珠陣列的蛋白質平台，並評估直接使用臨床檢體之可行性。
6. 藉由建立可國際接軌之分型方法參與國際監測，與其他國家進行菌株及型別資料之交流，持續進行實質國際交流。目前已收集日本、奈及利亞及印度的念珠菌菌株，並擬共同合作發表多篇論文。
7. 由疾管局主動提供鑑定及分型服務，教育訓練及技術推廣：本實驗室發展之快速多重流式微珠陣列方法實驗細節已提供多個局內外相關單位參考，協助其建立技術。最適化的PFGE分子分型流程，也有多名相關研究助理來學習研習，將持續以寬闊的胸襟分享所知，發揮公僕服務奉獻之精神，並建立國際聲譽。
8. 持續努力提升國際SCI論文發表的質與量，分享台灣經驗，展現實力。

References

1. Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Vande Berg, J., Hu, J., Messer, S., Herwaldt, L., Pfaller, M., and Diekema, D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 37[9]. 2003. 1901.
2. Hajjeh, R. A., Sofair, A. N., Harrison, L. H., Lyon, G. M., Arthington-Skaggs, B. A., Mirza, S. A., Phelan, M., Morgan, J., Lee-Yang, W., Ciblak, M. A., Benjamin, L. E., Sanza, L. T., Huie, S., Yeo, S. F., Brandt, M. E., and Warnock, D. W. 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* 42[4]. 2004.
3. Kao, A. S., Brandt, M. E., Pruitt, W. R., Conn, L. A., Perkins, B. A., Stephens, D. S., Baughman, W. S., Reingold, A. L., Rothrock, G. A., Pfaller, M. A., Pinner, R. W., and Hajjeh, R. A. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* 29[5]. 1999.
4. Tortorano, A. M., Rigoni, A. L., Biraghi, E., Prigitano, A., and Viviani, M. A. 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* 52[4]. 2003.
5. Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., and Edmond, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39[3]. 2004. 1901.
6. Baddley, J. W., Stroud, T. P., Salzman, D., and Pappas, P. G. Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 32[9]. 2001. 1901.
7. Barnes, R. A., Denning, D. W., Evans, E. G., Hay, R. J., Kibbler, C. C., Prentice, A. G., Richardson, M. D., Roberts, M. M., Rogers, T. R., Speller, D. C., Warnock, D. W., and Warren, R. E. Fungal infections: a survey of laboratory services for diagnosis and treatment. *Commun Dis Rep CDR Rev* 6[5]. 1996. 1926.
8. Dasbach, E. J., Davies, G. M., and Teutsch, S. M. Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. *Clin Infect Dis* 31[6]. 2000.
9. Luo, G. and Mitchell, T. G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40[8]. 2002.
10. Ellis, M. E., Al-Abdely, H., Sandridge, A., Greer, W., and Ventura, W. Fungal endocarditis: evidence in the world literature, 1965-1995. *Clin Infect Dis* 32[1]. 2001.
11. Park, B. J., Sigel, K., Vaz, V., Komatsu, K., McRill, C., Phelan, M., Colman, T., Comrie, A. C., Warnock, D. W., Galgiani, J. N., and Hajjeh, R. A. An epidemic of coccidioidomycosis in Arizona associated with climatic changes, 1998-2001. *J Infect Dis* 191[11]. 2005. 1901.
12. Petersen, L. R., Marshall, S. L., Barton-Dickson, C., Hajjeh, R. A., Lindsley, M. D., Warnock, D. W., Panackal, A. A., Shaffer, J. B., Haddad, M. B., Fisher, F. S., Dennis, D. T., and Morgan, J. Coccidioidomycosis among workers at an archeological site, northeastern Utah. *Emerg Infect Dis* 10[4]. 2004.
13. Lyon, G. M., Bravo, A. V., Espino, A., Lindsley, M. D., Gutierrez, R. E., Rodriguez, I., Corella, A., Carrillo, F., McNeil, M. M., Warnock, D. W., and Hajjeh, R. A. Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998-1999. *Am J Trop Med Hyg* 70[4]. 2004.
14. Moran, G. P., Sullivan, D. J., Henman, M. C., McCreary, C. E., Harrington, B. J., Shanley, D. B., and Coleman, D. C. 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* 41[3]. 1997.

15. Chamany, S., Mirza, S. A., Fleming, J. W., Howell, J. F., Lenhart, S. W., Mortimer, V. D., Phelan, M. A., Lindsley, M. D., Iqbal, N. J., Wheat, L. J., Brandt, M. E., Warnock, D. W., and Hajjeh, R. A. A large histoplasmosis outbreak among high school students in Indiana, 2001. *Pediatr Infect Dis J* 23[10]. 2004.
16. Schneider, E., Hajjeh, R. A., Spiegel, R. A., Jibson, R. W., Harp, E. L., Marshall, G. A., Gunn, R. A., McNeil, M. M., Pinner, R. W., Baron, R. C., Burger, R. C., Hutwagner, L. C., Crump, C., Kaufman, L., Reef, S. E., Feldman, G. M., Pappagianis, D., and Werner, S. B. A coccidioidomycosis outbreak following the Northridge, Calif, earthquake. *JAMA* 277[11]. 1997. 1919.
17. Ponton, J., Ruchel, R., Clemons, K. V., Coleman, D. C., Grillot, R., Guarro, J., Aldebert, D., Ambroise-Thomas, P., Cano, J., Carrillo-Munoz, A. J., Gene, J., Pinel, C., Stevens, D. A., and Sullivan, D. J. Emerging pathogens. *Med.Mycol.* 38 Suppl 1. 2000.
18. Pfaller, M. A., Jones, R. N., Messer, S. A., Edmond, M. B., and Wenzel, R. P. 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.* 30[2]. 1998.
19. Pfaller, M. A., Jones, R. N., Doern, G. V., Sader, H. S., Messer, S. A., Houston, A., Coffman, S., and Hollis, R. J. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 44[3]. 2000.
20. McNeil, M. M., Nash, S. L., Hajjeh, R. A., Phelan, M. A., Conn, L. A., Plikaytis, B. D., and Warnock, D. W. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin.Infect.Dis.* 33[5]. 9-1-2001.
21. Lamagni, T. L., Evans, B. G., Shigematsu, M., and Johnson, E. M. Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990-9). *Epidemiol.Infect.* 126[3]. 2001.
22. Chen, Y. C., Chang, S. C., Luh, K. T., and Hsieh, W. C. Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. *J Antimicrob Chemother* 52[1]. 2003.
23. Chen, Y. C., Chang, S. C., Sun, C. C., Yang, L. S., Hsieh, W. C., and Luh, K. T. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 18[5]. 1997.
24. Hung, C. C., Chen, Y. C., Chang, S. C., Luh, K. T., and Hsieh, W. C. Nosocomial candidemia in a university hospital in Taiwan. *J Formos.Med Assoc.* 95[1]. 1996.
25. Huang, Y. C., Lin, T. Y., Leu, H. S., Wu, J. L., and Wu, J. H. Yeast carriage on hands of hospital personnel working in intensive care units. *J.Hosp.Infect.* 39[1]. 1998.
26. Huang, Y. C., Lin, T. Y., Peng, H. L., Wu, J. H., Chang, H. Y., and Leu, H. S. Outbreak of *Candida albicans* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Scand.J.Infect.Dis.* 30[2]. 1998.
27. Rentz, A. M., Halpern, M. T., and Bowden, R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clin.Infect.Dis.* 27[4]. 1998.
28. Sheng, W. H., Wang, J. T., Lu, D. C., Chie, W. C., Chen, Y. C., and Chang, S. C. Comparative impact of hospital-acquired infections on medical costs, length of hospital stay and outcome between community hospitals and medical centres. *J Hosp Infect* 59[3]. 2005.
29. Bartlett, J. G. Aspergillosis update. *Medicine (Baltimore)* 79[4]. 2000.
30. Patterson, T. F., Kirkpatrick, W. R., White, M., Hiemenz, J. W., Wingard, J. R., Dupont, B., Rinaldi, M. G., Stevens, D. A., and Graybill, J. R. Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment

- practices, and outcomes. I3 Aspergillus Study Group. *Medicine (Baltimore)* 79[4]. 2000.
31. Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Jones, R. N., Sader, H. S., Fluit, A. C., Hollis, R. J., and Messer, S. A. 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* 39[9]. 2001.
 32. Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Messer, S. A., Boyken, L., Hollis, R. J., and Jones, R. N. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 41[1]. 2003.
 33. Orozco, A. S., Higginbotham, L. M., Hitchcock, C. A., Parkinson, T., Falconer, D., Ibrahim, A. S., Ghannoum, M. A., and Filler, S. G. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 42[10]. 1998.
 34. Barchiesi, F., Calabrese, D., Sanglard, D., Falconi Di Francesco, L., Caselli, F., Giannini, D., Giacometti, A., Gavaudan, S., and Scalise, G. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob Agents Chemother* 44[6]. 2000.
 35. Pfaller, M. A., Messer, S. A., Gee, S., Joly, S., Pujol, C., Sullivan, D. J., Coleman, D. C., and Soll, D. R. In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J.Clin.Microbiol.* 37[3]. 1999.
 36. Trick, W. E., Fridkin, S. K., Edwards, J. R., Hajjeh, R. A., and Gaynes, R. P. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 35[5]. 2002. 1901.
 37. Wingard, J. R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 20[1]. 1995.
 38. Pappas, P. G., Rex, J. H., Sobel, J. D., Filler, S. G., Dismukes, W. E., Walsh, T. J., and Edwards, J. E. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 38[2]. 2004. 1915.
 39. Denning, D. W., Kibbler, C. C., and Barnes, R. A. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 3[4]. 2003.
 40. Rabkin, J. M., Orolloff, S. L., Corless, C. L., Benner, K. G., Flora, K. D., Rosen, H. R., and Olyaei, A. J. Association of fungal infection and increased mortality in liver transplant recipients. *Am J Surg* 179[5]. 2000.
 41. Denning, D. W. Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* 355[9202]. 2-5-2000.
 42. Kobayashi, G. S. Molecular genetics and the diagnostic mycology laboratory. *Arch.Med Res.* 26[3]. 1995.
 43. Sato, Y., Osabe, S., Kuno, H., Kaji, M., and Oizumi, K. Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by microscopic examination of centrifuged cerebrospinal fluid sediment. *J Neurol Sci* 164[1]. 1999. 1915.
 44. Pincus, D. H., Coleman, D. C., Pruitt, W. R., Padhye, A. A., Salkin, I. F., Geimer, M., Bassel, A., Sullivan, D. J., Clarke, M., and Hearn, V. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 37[11]. 1999.
 45. Ahmad, S., Khan, Z., Mustafa, A. S., and Khan, Z. U. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J.Clin.Microbiol.* 40[7]. 2002.
 46. Reiss, E., Obayashi, T., Orle, K., Yoshida, M., and Zancope-Oliveira, R. M. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Med Mycol* 38 Suppl 1. 2000.
 47. Hurst, S. F., Reyes, G. H., McLaughlin, D. W., Reiss, E., and Morrison, C. J. 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.* 7[3]. 2000.
48. Bretagne, S., Costa, J. M., Bart-Delabesse, E., Dhedin, N., Rieux, C., and Cordonnier, C. Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin.Infect.Dis.* 26[6]. 1998.
 49. Ikeda, R., Shinoda, T., Fukazawa, Y., and Kaufman, L. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 16[1]. 1982.
 50. Klein, B. S., Vergeront, J. M., DiSalvo, A. F., Kaufman, L., and Davis, J. P. Two outbreaks of blastomycosis along rivers in Wisconsin. Isolation of *Blastomyces dermatitidis* from riverbank soil and evidence of its transmission along waterways. *Am.Rev.Respir.Dis.* 136[6]. 1987.
 51. Hube, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 7[1]. 1996.
 52. Morrison, C. J., Hurst, S. F., and 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* 10[5]. 2003.
 53. Kwon-Chung, K. J., Lehman, D., Good, C., and Magee, P. T. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 49[3]. 1985.
 54. Staib, F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* 4[3]. 1965.
 55. Ray, T. L. and Payne, C. D. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. *Infect Immun* 56[8]. 1988.
 56. Macdonald, F. and Odds, F. C. Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* 129[2]. 1983.
 57. Niesters, H. G., Goessens, W. H., Meis, J. F., and Quint, W. G. Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. *J Clin.Microbiol* 31[4]. 1993.
 58. Jackson, C. J., Barton, R. C., and Evans, E. G. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J Clin.Microbiol* 37[4]. 1999.
 59. Velegraki, A., Kambouris, M. E., Skiniotis, G., Savala, M., Mitroussia-Ziouva, A., and Legakis, N. J. Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 23[4]. 1999.
 60. Hendolin, P. H., Paulin, L., Koukila-Kahkola, P., Anttila, V. J., Malmberg, H., Richardson, M., and Ylikoski, J. Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *J.Clin.Microbiol.* 38[11]. 2000.
 61. Martin, C., Roberts, D., van Der, Weide M., Rossau, R., Jannes, G., Smith, T., and Maher, M. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin.Microbiol* 38[10]. 2000.
 62. Park, S., Wong, M., Marras, S. A., Cross, E. W., Kiehn, T. E., Chaturvedi, V., Tyagi, S., and Perlin, D. S. Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. *J Clin Microbiol* 38[8]. 2000.
 63. Golbang, N., Burnie, J. P., and Matthews, R. C. A polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosing infection caused by *Aspergillus fumigatus*. *J Clin.Pathol.* 52[6]. 1999.
 64. Holmes, A. R., Cannon, R. D., Shepherd, M. G., and Jenkinson, H. F. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin.Microbiol* 32[1]. 1994.

65. Rand, K. H., Houck, H., and Wolff, M. Detection of candidemia by polymerase chain reaction. *Mol.Cell Probes* 8[3]. 1994.
66. Chaturvedi, S., Rodeghier, B., Fan, J., McClelland, C. M., Wickes, B. L., and Chaturvedi, V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MAT α pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *J Clin.Microbiol* 38[5]. 2000.
67. Lindsley, M. D., Hurst, S. F., Iqbal, N. J., and Morrison, C. J. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *J Clin.Microbiol* 39[10]. 2001.
68. Larsen, H. H., Masur, H., Kovacs, J. A., Gill, V. J., Silcott, V. A., Kogulan, P., Maenza, J., Smith, M., Lucey, D. R., and Fischer, S. H. Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin.Microbiol* 40[2]. 2002.
69. Li SY, Liao MH Lin YH et al. Rapid identification of clinically important fungi by use of PCR-EIA. *Epidemiol Bulletin* . 2003.
70. Hsu, M. C., Chen, K. W., Lo, H. J., Chen, Y. C., Liao, M. H., Lin, Y. H., and Li, S. Y. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *J Med Microbiol* 52[Pt 12]. 2003.
71. 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.
72. Chen, Y. C., Eisner, J. D., Kattar, M. M., Rassouljian-Barrett, S. L., LaFe, K., Yarfitz, S. L., Limaye, A. P., and Cookson, B. T. 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* 38[6]. 2000.
73. Haynes, K. A., Westerneng, T. J., Fell, J. W., and Moens, W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J.Med.Vet.Mycol.* 33[5]. 1995.
74. Zhao, J., Kong, F., Li, R., Wang, X., Wan, Z., and Wang, D. Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *J.Clin.Microbiol.* 39[6]. 2001.
75. Sugita, T., Nishikawa, A., Ikeda, R., and Shinoda, T. 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* 37[6]. 1999.
76. Yamada, Y., Makimura, K., Uchida, K., Yamaguchi, H., and Osumi, M. Phylogenetic relationships among medically important yeasts based on sequences of mitochondrial large subunit ribosomal RNA gene. *Mycoses* 47[1-2]. 2004.
77. Marlowe, E. M., Hogan, J. J., Hindler, J. F., Andruszkiewicz, I., Gordon, P., and Bruckner, D. A. Application of an rRNA probe matrix for rapid identification of bacteria and fungi from routine blood cultures. *J.Clin.Microbiol.* 41[11]. 2003.
78. Leinberger, D. M., Schumacher, U., Autenrieth, I. B., and Bachmann, T. T. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J Clin Microbiol* 43[10]. 2005.
79. Hsiao, C. R., Huang, L., Bouchara, J. P., Barton, R., Li, H. C., and Chang, T. C. Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 43[8]. 2005.
80. Diaz, M. R. and Fell, J. W. High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus *trichosporon*. *J Clin Microbiol* 42[8]. 2004.
81. Diaz, M. R., Boekhout, T., Theelen, B., Bovers, M., Cabanes, F. J., and Fell, J. W. Microcoding

- and flow cytometry as a high-throughput fungal identification system for *Malassezia* species. *J Med Microbiol* 55[Pt 9]. 2006.
82. Diaz, M. R. and Fell, J. W. Use of a suspension array for rapid identification of the varieties and genotypes of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *J Clin Microbiol* 43[8]. 2005.
 83. Page, B. T. and Kurtzman, C. P. Rapid identification of *Candida* species and other clinically important yeast species by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 43[9]. 2005.
 84. Page, B. T., Shields, C. E., Merz, W. G., and Kurtzman, C. P. 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* 44[9]. 2006.
 85. Das, S., Brown, T. M., Kellar, K. L., Holloway, B. P., and Morrison, C. J. DNA probes for the rapid identification of medically important *Candida* species using a multianalyte profiling system. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46[2]. 2006.
 86. Howell, S. A., Barnard, R. J., and Humphreys, F. Application of molecular typing methods to dermatophyte species that cause skin and nail infections. *J Med Microbiol* 48[1]. 1999.
 87. Soll, D. R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin. Microbiol Rev.* 13[2]. 2000.
 88. Katsu, M., Kidd, S., Ando, A., Moretti-Branchini, M. L., Mikami, Y., Nishimura, K., and Meyer, W. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *FEMS Yeast Res* 4[4-5]. 2004.
 89. Iida, S., Imai, T., Oguri, T., Okuzumi, K., Yamanaka, A., Moretti-Branchini, M. L., Nishimura, K., and Mikami, Y. 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* 46[2]. 2005.
 90. Tamura, M., Watanabe, K., Imai, T., Mikami, Y., and Nishimura, K. New PCR primer pairs specific for *Candida dubliniensis* and detection of the fungi from the *Candida albicans* clinical isolates in Japan. *Clin Lab* 46[1-2]. 2000.
 91. Robles, J. C., Koreen, L., Park, S., and Perlin, D. S. Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 42[6]. 2004.
 92. Bournoux, M. E., Tavanti, A., Bouchier, C., Gow, N. A., Magnier, A., Davidson, A. D., Maiden, M. C., D'Enfert, C., and Odds, F. C. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 41[11]. 2003.
 93. Bournoux, M. E., Aanensen, D. M., Morand, S., Theraud, M., Spratt, B. G., and d'Enfert, C. Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. *Infect Genet Evol* 4[3]. 2004.
 94. Redkar, R. J., Dube, M. P., McCleskey, F. K., Rinaldi, M. G., and Del Vecchio, V. G. DNA fingerprinting of *Candida rugosa* via repetitive sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 34[7]. 1996.
 95. Fundyga, R. E., Lott, T. J., and Arnold, J. Population structure of *Candida albicans*, a member of the human flora, as determined by microsatellite loci. *Infect Genet Evol* 2[1]. 2002.
 96. Poikonen, E., Vuopio-Varkila, J., Kaukoranta-Tolvanen, S. S., Sivonen, A., Siren, E., and Ruutu, P. Epidemiological typing of *Candida albicans* from bloodstream infections by restriction enzyme analysis. *Scand J Infect Dis* 33[2]. 2001.
 97. Pujol, C., Pfaller, M. A., and Soll, D. R. Flucytosine resistance is restricted to a single genetic clade of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48[1]. 2004.
 98. Makarova, N. U., Pokrowsky, V. V., Kravchenko, A. V., Serebrovskaya, L. V., James, M. J.,

- McNeil, M. M., Lasker, B. A., Warnock, D. W., and Reiss, E. 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* 41[5]. 2003.
99. Soll, D. R. and Pujol, C. *Candida albicans* clades. *FEMS Immunol Med Microbiol* 39[1]. 2003. 1924.
100. Riederer, K., Fozo, P., and Khatib, R. Typing of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*: species-related limitations of electrophoretic karyotyping and restriction endonuclease analysis of genomic DNA. *Mycoses* 41[9-10]. 1998.
101. Taylor, B. N., Harrer, T., Pscheidl, E., Schweizer, A., Rollinghoff, M., and Schroppel, K. Surveillance of nosocomial transmission of *Candida albicans* in an intensive care unit by DNA fingerprinting. *J Hosp Infect* 55[4]. 2003.
102. Samaranyake, Y. H., Samaranyake, L. P., Dassanayake, R. S., Yau, J. Y., Tsang, W. K., Cheung, B. P., and Yeung, K. W. 'Genotypic shuffling' of sequential clones of *Candida albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. *J Med Microbiol* 52[Pt 4]. 2003.
103. Ball, L. M., Bes, M. A., Theelen, B., Boekhout, T., Egeler, R. M., and Kuijper, E. J. 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* 42[4]. 2004.
104. Walsh, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406[6797]. 8-17-2000.
105. Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J., and Courvalin, P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N.Engl.J.Med.* 319[3]. 7-21-1988.
106. Livermore, D. M., James, D., Reacher, M., Graham, C., Nichols, T., Stephens, P., Johnson, A. P., and George, R. C. Trends in fluoroquinolone (ciprofloxacin) resistance in enterobacteriaceae from bacteremias, England and Wales, 1990-1999. *Emerg.Infect.Dis.* 8[5]. 2002.
107. Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., and Spratt, B. G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99[11]. 5-28-2002.
108. Queenan, A. M. and Bush, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin.Microbiol.Rev.* 20[3]. 2007.
109. Ho, Y. C., Chang, S. C., Lin, S. R., and Wang, W. K. High levels of *mecA* DNA detected by a quantitative real-time PCR assay are associated with mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J.Clin.Microbiol.* 47[5]. 2009.
110. Sheng, W. H., Lin, Y. C., Wang, J. T., Chen, Y. C., Chang, S. C., Hsia, K. C., Wu, R. J., and Li, S. Y. Identification of distinct ciprofloxacin susceptibility in *Acinetobacter* spp. by detection of the *gyrA* gene mutation using real-time PCR. *Mol Cell Probes* 23[3-4]. 2009.
111. Palacios, G., Quan, P. L., Jabado, O. J., Conlan, S., Hirschberg, D. L., Liu, Y., Zhai, J., Renwick, N., Hui, J., Hegyi, H., Grolla, A., Strong, J. E., Towner, J. S., Geisbert, T. W., Jahrling, P. B., Buchen-Osmond, C., Ellerbrok, H., Sanchez-Seco, M. P., Lussier, Y., Formenty, P., Nichol, M. S., Feldmann, H., Briese, T., and Lipkin, W. I. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg.Infect.Dis.* 13[1]. 2007.
112. Perreten, V., Vorlet-Fawer, L., Slickers, P., Ehricht, R., Kuhnert, P., and Frey, J. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J.Clin.Microbiol.* 43[5]. 2005.
113. Call, D. R., Bakko, M. K., Krug, M. J., and Roberts, M. C. Identifying antimicrobial resistance

- genes with DNA microarrays. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47[10]. 2003.
114. Lin, Y. C., Sheng, W. H., Chang, S. C., Wang, J. T., Chen, Y. C., Wu, R. J., Hsia, K. C., and Li, S. Y. Application of a microsphere-based array for rapid identification of *Acinetobacter* spp. with distinct antimicrobial susceptibilities. *J. Clin. Microbiol.* 46[2]. 2008.
 115. Boving, M. K., Pedersen, L. N., and Moller, J. K. Eight-plex PCR and liquid-array detection of bacterial and viral pathogens in cerebrospinal fluid from patients with suspected meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 47[4]. 2009.
 116. Landlinger, C., Preuner, S., Willinger, B., Haberpursch, B., Racil, Z., Mayer, J., and Lion, T. Species-specific identification of a wide range of clinically relevant fungal pathogens by use of Luminex xMAP technology. *J. Clin. Microbiol.* 47[4]. 2009.
 117. Huang, C. T., Wong, W. W., Li, L. H., Chiang, C. C., Chen, B. D., and Li, S. Y. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* by microsphere suspension array. *J. Clin. Microbiol.* 46[3]. 2008.
 118. Nazarenko, I., Kobayashi, L., Giles, J., Fishman, C., Chen, G., and Lorincz, A. A novel method of HPV genotyping using Hybrid Capture sample preparation method combined with GP5+/6+ PCR and multiplex detection on Luminex XMAP. *J. Virol. Methods* 154[1-2]. 2008.
 119. Ugozzoli, L. A. Multiplex assays with fluorescent microbead readout: a powerful tool for mutation detection. *Clin. Chem.* 50[11]. 2004.
 120. Corbella, X., Montero, A., Pujol, M., Dominguez, M. A., Ayats, J., Argerich, M. J., Garrigosa, F., Ariza, J., and Gudiol, F. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 38[11]. 2000.
 121. Falagas, M. E., Kasiakou, S. K., Rafailidis, P. I., Zouglakis, G., and Morfou, P. Comparison of mortality of patients with *Acinetobacter baumannii* bacteraemia receiving appropriate and inappropriate empirical therapy. *J Antimicrob Chemother* 57[6]. 2006.
 122. Bou, G., Cervero, G., Dominguez, M. A., Quereda, C., and Martinez-Beltran, J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 38[9]. 2000.
 123. Da Silva, G. J., Leitao, G. J., and Peixe, L. Emergence of carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 37[6]. 1999.
 124. Tankovic, J., Legrand, P., De Gatines, G., Chemineau, V., Brun-Buisson, C., and Duval, J. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *J Clin Microbiol* 32[11]. 1994.
 125. Hsueh, P. R., Teng, L. J., Chen, C. Y., Chen, W. H., Yu, C. J., Ho, S. W., and Luh, K. T. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* 8[8]. 2002.
 126. Kuo, L. C., Teng, L. J., Yu, C. J., Ho, S. W., and Hsueh, P. R. Dissemination of a clone of unusual phenotype of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* at a university hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol* 42[4]. 2004.
 127. Towner, K. J. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. Proceedings of a symposium held on 4-5 November 1996 at Eilat, Israel. *J Med Microbiol* 46[9]. 1997.
 128. van Dessel, H., Kamp-Hopmans, T. E., Fluit, A. C., Brisse, S., de Smet, A. M., Dijkshoorn, L., Troelstra, A., Verhoef, J., and Mascini, E. M. Outbreak of a susceptible strain of *Acinetobacter* species 13 (sensu Tjernberg and Ursing) in an adult neurosurgical intensive care unit. *J Hosp Infect* 51[2]. 2002.
 129. Gospodarek, E., Krasnicki, K., Ziolkowski, G., Kasprzak, H., and Beuth, W. Cerebrospinal

- meningitis with the presence of *Acinetobacter* spp. *Med Sci Monit* 6[1]. 2000.
130. Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A. M., Heritage, J., and Hawkey, P. M. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol* 36[7]. 1998.
 131. Aygun, G., Demirkiran, O., Utku, T., Mete, B., Urkmez, S., Yilmaz, M., Yasar, H., Dikmen, Y., and Ozturk, R. Environmental contamination during a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 52[4]. 2002.
 132. Jawad, A., Snelling, A. M., Heritage, J., and Hawkey, P. M. Exceptional desiccation tolerance of *Acinetobacter radioresistens*. *J Hosp Infect* 39[3]. 1998.
 133. Bergogne-Berezin, E. The increasing significance of outbreaks of *Acinetobacter* spp.: the need for control and new agents. *J Hosp Infect* 30 Suppl. 1995.
 134. Maragakis, L. L., Cosgrove, S. E., Song, X., Kim, D., Rosenbaum, P., Ciesla, N., Srinivasan, A., Ross, T., Carroll, K., and Perl, T. M. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with pulsatile lavage wound treatment. *JAMA* 292[24]. 2004. 1922.
 135. Wisplinghoff, H., Edmond, M. B., Pfaller, M. A., Jones, R. N., Wenzel, R. P., and Seifert, H. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* 31[3]. 2000.
 136. Bergogne-Berezin, E. and Towner, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 9[2]. 1996.
 137. Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., and Vanechoutte, M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol* 35[11]. 1997.
 138. Limansky, A. S., Mussi, M. A., and Viale, A. M. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J.Clin.Microbiol.* 40[12]. 2002.
 139. Clark, R. B. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. *J Antimicrob Chemother* 38[2]. 1996.
 140. Fernandez-Cuenca, F., Martinez-Martinez, L., Conejo, M. C., Ayala, J. A., Perea, E. J., and Pascual, A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 51[3]. 2003.
 141. Marchand, I., mier-Piolle, L., Courvalin, P., and Lambert, T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob.Agents Chemother.* 48[9]. 2004.
 142. Poirel, L., Marque, S., Heritier, C., Segonds, C., Chabanon, G., and Nordmann, P. OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 49[1]. 2005.
 143. Tsakris, A., Ikonomidis, A., Pournaras, S., Tzouveleki, L. S., Sofianou, D., Legakis, N. J., and Maniatis, A. N. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 12[6]. 2006.
 144. Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., and Nordmann, P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin.Microbiol.Rev.* 18[2]. 2005.
 145. Lee, J. H., Choi, C. H., Kang, H. Y., Lee, J. Y., Kim, J., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T., Kim, K. W., Song, do Y., and Lee, J. C. Differences in phenotypic and genotypic traits against antimicrobial agents between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU.

- J. Antimicrob. Chemother. 59[4]. 2007.
146. Lim, Y. M., Shin, K. S., and Kim, J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45[3]. 2007.
 147. Cardoso, O., Leitao, R., Figueiredo, A., Sousa, J. C., Duarte, A., and Peixe, L. V. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microb Drug Resist* 8[2]. 2002.
 148. Donald, H. M., Scaife, W., Amyes, S. G., and Young, H. K. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 44[1]. 2000.
 149. Heritier, C., Poirel, L., Fournier, P. E., Claverie, J. M., Raoult, D., and Nordmann, P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49[10]. 2005.
 150. Walther-Rasmussen, J. and Hoiby, N. OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 57[3]. 2006.
 151. Hu, W. S., Yao, S. M., Fung, C. P., Hsieh, Y. P., Liu, C. P., and Lin, J. F. An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51[11]. 2007.
 152. Wang, H., Guo, P., Sun, H., Yang, Q., Chen, M., Xu, Y., and Zhu, Y. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 51[11]. 2007.
 153. Poirel, L. and Nordmann, P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50[4]. 2006.
 154. Dupont, M., Pages, J. M., Lafitte, D., Siroy, A., and Bollet, C. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res* 4[6]. 2005.
 155. del Mar Tomas, M., Beceiro, A., Perez, A., Velasco, D., Moure, R., Villanueva, R., Martinez-Beltran, J., and Bou, G. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49[12]. 2005.
 156. Hooper, D. C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 7[2]. 2001.
 157. Piddock, L. J. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs* 58 Suppl 2. 1999.
 158. Pasca, M. R., Guglielame, P., Arcesi, F., Bellinzoni, M., De Rossi, E., and Riccardi, G. Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 48[8]. 2004.
 159. Marrer, E., Schad, K., Satoh, A. T., Page, M. G., Johnson, M. M., and Piddock, L. J. Involvement of the putative ATP-dependent efflux proteins PatA and PatB in fluoroquinolone resistance of a multidrug-resistant mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 50[2]. 2006.
 160. Hamouda, A. and Amyes, S. G. Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 54[3]. 2004.
 161. Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., Marcos, A., and Jimenez de Anta, T. Mutation in the gyrA gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 39[5]. 1995.

162. Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., and Jimenez de Anta, T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 39[6]. 1997.
163. Moreau, N. J., Houot, S., Joly-Guillou, M. L., and Bergogne-Berezin, E. Characterisation of DNA gyrase and measurement of drug accumulation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* resistant to fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother* 38[6]. 1996.
164. Higgins, P. G., Wisplinghoff, H., Stefanik, D., and Seifert, H. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 54[4]. 2004.
165. Gomes AR, Westh H, de Lencastre H: Origins and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50.
166. Ito T, Katayama Y, Asada K, et al: Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45.
167. Chen, C. C., Teng, L. J., and Chang, T. C. Identification of clinically relevant viridans group streptococci by sequence analysis of the 16S-23S ribosomal DNA spacer region. *J Clin Microbiol* 42[6]. 2004.
168. Whiley, R. A., Duke, B., Hardie, J. M., and Hall, L. M. Heterogeneity among 16S-23S rRNA intergenic spacers of species within the 'Streptococcus milleri group'. *Microbiology* 141 (Pt 6). 1995.
169. Cheng, J. C., Huang, C. L., Lin, C. C., Chen, C. C., Chang, Y. C., Chang, S. S., and Tseng, C. P. Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real-time PCR. *Clin Chem* 52[11]. 2006.
170. Wellinghausen, N., Wirths, B., Franz, A. R., Karolyi, L., Marre, R., and Reischl, U. Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 48[4]. 2004.
171. Shen, D. X., Du, J., and Feng, Z. C. [Rapid diagnosis of common pathogenic bacteria infection in newborn infants by 16SrDNA oligonucleotide array]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 42[9]. 2004.
172. Zhu, Y., Hein, D. W., Doll, M. A., Reynolds, K. K., Abudu, N., Valdes, R., Jr., and Linder, M. W. Simultaneous determination of 7 N-acetyltransferase-2 single-nucleotide variations by allele-specific primer extension assay. *Clin Chem* 52[6]. 2006.
173. Cai, W., Jing, J., Irvin, B., Ohler, L., Rose, E., Shizuya, H., Kim, U. J., Simon, M., Anantharaman, T., Mishra, B., and Schwartz, D. C. High-resolution restriction maps of bacterial artificial chromosomes constructed by optical mapping6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95[7]. 1998. 1931.
174. Latreille, P., Norton, S., Goldman, B. S., Henkhaus, J., Miller, N., Barbazuk, B., Bode, H. B., Darby, C., Du, Z., Forst, S., Gaudriault, S., Goodner, B., Goodrich-Blair, H., and Slater, S. Optical mapping as a routine tool for bacterial genome sequence finishing3. *BMC Genomics* 8. 2007.
175. Chen, Q., Savarino, S. J., and Venkatesan, M. M. Subtractive hybridization and optical mapping of the enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407 chromosome: isolation of unique sequences and demonstration of significant similarity to the chromosome of *E. coli* K-124. *Microbiology* 152[Pt 4]. 2006.
176. Shukla, S. K., Kislow, J., Briska, A., Henkhaus, J., and Dykes, C. Optical mapping reveals a large genetic inversion between two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains1. *J Bacteriol* 191[18]. 2009.
177. Yu, Y. S., Yang, Q., Xu, X. W., Kong, H. S., Xu, G. Y., and Zhong, B. Y. Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in a

- Chinese hospital. *J Med Microbiol* 53[Pt 7]. 2004.
178. Jacobsen, M. D., Davidson, A. D., Li, S. Y., Shaw, D. J., Gow, N. A., and Odds, F. C. Molecular phylogenetic analysis of *Candida tropicalis* isolates by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet Biol* 45[6]. 2008.
 179. Odds, F. C., Davidson, A. D., Jacobsen, M. D., Tavanti, A., Whyte, J. A., Kibbler, C. C., Ellis, D. H., Maiden, M. C., Shaw, D. J., and Gow, N. A. *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 44[10]. 2006.
 180. Lin, C. Y., Chen, Y. C., Lo, H. J., Chen, K. W., and Li, S. Y. Assessment of *Candida glabrata* strain relatedness by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 45[8]. 2007.
 181. Towner, K. J. and Chopade, B. A. Biotyping of *Acinetobacter calcoaceticus* using the API 20NE system. *J Hosp Infect* 10[2]. 1987.
 182. Ling, T. K., Tam, P. C., Liu, Z. K., and Cheng, A. F. Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *J Clin Microbiol* 39[8]. 2001.
 183. Chang, H. C., Wei, Y. F., Dijkshoorn, L., Vaneechoutte, M., Tang, C. T., and Chang, T. C. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol* 43[4]. 2005.
 184. Lee, S. H., Walker, D. R., Cregan, P. B., and Boerma, H. R. Comparison of four flow cytometric SNP detection assays and their use in plant improvement. *Theor.Appl.Genet.* 110[1]. 2004.
 185. Rello, J., Quintana, E., Mirelis, B., Gurgui, M., Net, A., and Prats, G. Polymicrobial bacteremia in critically ill patients. *Intensive Care Med* 19[1]. 1993.
 186. Weinstein, M. P., Murphy, J. R., Reller, L. B., and Lichtenstein, K. A. 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* 5[1]. 1983.
 187. Dizbay, M., Altuncevic, A., Sezer, B. E., Ozdemir, K., and Arman, D. Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 32[1]. 2008.
 188. Chen, T. L., Wu, R. C., Shaio, M. F., Fung, C. P., and Cho, W. L. Acquisition of a plasmid-borne blaOXA-58 gene with an upstream IS1008 insertion conferring a high level of carbapenem resistance to *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 52[7]. 2008.
 189. Bratu, S., Landman, D., Martin, D. A., Georgescu, C., and Quale, J. Correlation of antimicrobial resistance with beta-lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. *Antimicrob Agents Chemother* 52[9]. 2008.
 190. Gutierrez, O., Juan, C., Cercenado, E., Navarro, F., Bouza, E., Coll, P., Perez, J. L., and Oliver, A. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 51[12]. 2007.
 191. Chen, J., Iannone, M. A., Li, M. S., Taylor, J. D., Rivers, P., Nelsen, A. J., Slentz-Kesler, K. A., Roses, A., and Weiner, M. P. A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension. *Genome Res.* 10[4]. 2000.
 192. Levy SB, Marshall B: Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 2004;10:S122-S129.
 193. Lockhart SR, Abramson MA, Beekmann SE, et al: Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States

- between 1993 and 2004. *J Clin Microbiol* 2007;45:3352-9.
194. Jacoby GA: Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl 2:S120-S126.
 195. Bugg TD, Wright GD, Dutka-Malen S, et al: Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* 1991;30:10408-15.
 196. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, et al: Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med* 2003;348:1342-7.
 197. Livermore DM, Woodford N: Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000;3:489-95.
 198. Mazel D: Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:608-20.
 199. Turton JF, Ward ME, Woodford N, et al: The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;258:72-7.
 200. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, et al: *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005;43:284-92.
 201. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, et al: Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 2008;46:2659-64.
 202. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al: Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* 2008;46:842-9.

七、圖、表

表一、試驗菌株

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

表一試驗菌株（續）

Organism	Identification no
<i>Mucor racemosus</i>	BCRC 30186
<i>Mucor racemosus f. chibinensis</i>	BCRC 32162
<i>Mucor racemosus</i>	BCRC 32586
<i>Mucor ramosissimus</i>	BCRC 32160
<i>Rhizomucor pusillus</i>	BCRC 33122
	BCRC 31510
<i>Rhizopus azygosporus</i>	BCRC 31158
<i>Rhizopus microsporus</i>	BCRC 31995
<i>Rhizopus oryzae</i>	BCRC 31145
<i>Saksenaea vasiformis</i>	BCRC 33074
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	BCRC 31638
<i>Coccidioides immitis</i> RS	
<i>Coccidioides posadasii</i> C735	
<i>Absidia coerulea</i>	BCRC 30897
<i>Rhizopus homothallicus</i>	BCRC 31146
<i>Mucor flavus</i>	BCRC 32478
<i>Absidia cuneospora</i>	BCRC 32943
<i>Absidia fusca</i>	BCRC 33045
<i>Exophiala dermatitidis</i>	
<i>Sporothrix schenckii</i>	
<i>Trichosporon asahii</i>	
<i>Trichophyton rubrum</i>	
<i>Microsporum gypseum</i>	
<i>Chrysosporium spp.</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

表二、微珠陣列系統偵測絲狀真菌 DNA 的最低濃度

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

表三. Bacterial and fungal strains used in this study

Species	No. of strains	Reference strains
<i>Staphylococcus aureus</i>	66	ATCC25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63	ATCC27853
<i>Acinetobacter baumannii</i>	49	ATCC15151
<i>Candida albican</i>	24	ATCC90028
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	ATCC13048
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>Cloacae</i>	3	ATCC13047
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	ATCC19433
<i>Enterococcus faecium</i>	3	ATCC19434
<i>Escherichia coli</i>	2	ATCC25922
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	ATCC8724
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	2	ATCC13883
<i>Proteus mirabilis</i>	1	ATCC29906
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	ATCC14990
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	3	ATCC27840
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6	ATCC13637
<i>Candida dubliniensis</i>	1	CBS7988
<i>Candida glabrata</i>	1	ATCC2001
<i>Candida krusei</i>	1	ATCC20381
<i>Candida parapsilosis</i>	1	BCRC20865
<i>Candida tropicalis</i>	1	ATCC750
<i>Candida guilliermondii</i>	1	BCRC21599
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	ATCC32045

表四

Degenerate primers of bacteria

Forward: 5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3'

Reversed: 5'-(T/G)A(C/G)TGCCAAGGCATCCACC-3'

Degenerate primers of fungus

Forward: 5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'

Reversed: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

表五 Probes used for identification of the 4 nosocomial pathogens and measurement values

Pathogen	Probe	Probe sequence (5'-3')	Signal range (MFI)		
			Negative	Positive	Minimum ratio ^a
<i>S. aureus</i>	SA	CTAGATAAGTAAGTAAAATATAGA	49-117	355-808	3
<i>P. aeruginosa</i>	PA	CACTGGTGATCATTCAAGTCAAGGTA	44-125	1004-1589	8
<i>A. baumannii</i>	AB	ATTAGTGTGATCTGACGAAGACACATTAAC	33-71	332-989	4.7
<i>C. albicans</i>	CA	ATTGCTTGCGGCGGTAACGT ^b	45-130	635-1983	4.9

^a The minimum ratio is the lowest recorded positive value divided by the highest recorded negative value. A minimum ratio of ≥ 2 is used as the threshold for defining positive events.

^b The CA probe is followed as described previously with slight modification.

表六 Detection of multiple pathogens in equal proportions

Pathogen(s)	MFI of respective probes ^a			
	SA	PA	AB	CA
<i>S. aureus</i>	329.7	56.7	65.3	50.2
<i>P. aeruginosa</i>	62.0	294	68.8	48.7
<i>A. baumannii</i>	72.7	63.3	200.2	75.0
<i>C. albicans</i>	65.5	58.2	56.5	519.8
<i>S. aureus</i> + <i>P. aeruginosa</i>	200.5	236.3	54.7	39.2
<i>S. aureus</i> + <i>A. baumannii</i>	239.3	49.7	183.7	61.7
<i>S. aureus</i> + <i>C. albicans</i>	294.2	61.3	64.8	609.8
<i>P. aeruginosa</i> + <i>A. baumannii</i>	66.8	242.3	174.7	46.3
<i>P. aeruginosa</i> + <i>C. albicans</i>	57.8	287.7	61.2	527.3
<i>A. baumannii</i> + <i>C. albicans</i>	64.0	61.5	170.3	454.8

^aThe MFI of respective probes are the average value from the 3 independent experiments.

表七、臨床 *Acinetobacter* 菌種 55 株之 Real-time PCR Tm 值、*gyrA* 基因的 QRDR 序列與 ciprofloxacin 的最小抑制濃度測試

Species	No. of isolates	No. of isolates								
		Tm (°C) of real-time PCR			Sequencing QRDR of <i>gyrA</i> gene ^a		MICs (mg/L) of CIP ^b			
		52°C	50°C	47°C	TCA Ser83	TTA Leu83	≤0.5	1	2	≥4
<i>A. baumannii</i>	34	3		31	3	31	3			31
<i>A. genospecies 3</i>	10	6	4		10		9	1		
<i>A. genospecies</i> 13TU	11	11			11		10	1		

^aQRDR of *gyrA* gene equivalent to Ser83 of *E. coli*

^bCIP: ciprofloxacin

表八、臨床 81 株 *Acinetobacter* spp. 之 carbapenemase 相關基因及 imipenem 的最小抑制濃度

Species	No. of isolates	No. of isolates						
		MIC (mg/L) of imipenem			PCR positive for			
		≥ 16	8	≤ 4	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM-1}	<i>ISAba1-bla</i> _{OXA-51-like}	<i>bla</i> _{OXA-58}
<i>A. baumannii</i>	53	18	17	18	0	0	47	0
Genospecies	13	4	0	9	4	0	0	4
Genospecies 13TU	15	1	0	14	1	2	0	3
Total	81	23	17	41	5	2	47	7

表九、7 株具 MBL 基因 *Acinetobacter* spp. 之 E-test MBL 結果與 imipenem 水解測試

No.	Species	MBL	Upstream sequence of <i>bla</i> _{OXA-58}	MIC (mg/L) ^a		Sp. act. (nmol/min/mg of protein) ^b	
				IPM	IPM+EDTA	Crude extract	Crude extract + 2mM EDTA
1	3	<i>bla</i> _{IMP-1}	ISAba3	16	< 1	1001	2.32
2	3	<i>bla</i> _{IMP-1}	ISAba3	16	< 1	720	1.23
3	3	<i>bla</i> _{IMP-1}	ISAba3	16	< 1	862	1.42
4	3	<i>bla</i> _{IMP-1}	ISAba3	16	< 1	537	1.06
5	13TU	<i>bla</i> _{IMP-1}	ISAba3	24	< 1	499	1.25
6	13TU	<i>bla</i> _{VIM-11}	ISAba3	<4	< 1	0.48	NA ^c
7	13TU	<i>bla</i> _{VIM-11}	ISAba3	4	2	0.84	NA

^a IPM, imipenem

^b Specific activity data represent the average of three measurements.

^c NA, not assay

表十、胜肽鑑定分析

Bands	% of coverage	Peptide sequences	Accession no.	Protein
A	30.6%	GFVEDANGSILFR YGTQVLDLPVLASNTGR MVPEYFTGTLTTSHEIK FTKDQMSDQINTDADASGRGLDR YKFNDNLNASYYGLDSK SAQIQYNVDFGK NVTDDAQEREFFNQVK YTVQSGFAK IFLDIPVKLF	CAM88440	Putative outer membrane protein, OprD family
B, C	42.5%	QINGNFYVTSDLITKNYDSK PYVLLGAGHYK LNDALSLR VFFDTNK SNIKDQYKPEIAK VAEKLSEYPNATAR IEGHTDNTGPR ANSVKSALVNEYNVNASR LSTQGFQAWDQPIADNKT RVFATITGSR TVVVQPGQEAAAPAAAQ	ABO13246	Outer membrane protein A, OmpA
D	36.8%	GEAYVPTPYLPVYASATYNHTDVGK AKYVGPIDGTNMAIGFEAAGAFGQENQYGLK TDLYLTPK GNDLGEFR QAWGGNVNYFITPALAVGASYMK KSSYDTQTIGLNAK	CAJ01528	34 kDa Outer membrane protein
E	39.8%	VNGSTYDLMDNANNVYLNAEIRPWGASTNR SFRVNNQDFIAGADGVK NDIAPYLGFGFAPK INKNWGVFGEVGAYYTGNTPTVK KIANDDKYKWLVPVGK	ABG27025	Outer membrane protein, CarO
F	49%	NQLIPVGVR WAQGLYIAAGAAAYLDNDYDLAKR MKYENDIAPYVGFAGFAPK DDVSVNGTKYDLMDNANNVYLNAEIRPWGASTNR IGNGGTLTIDGNNYQQAAGQEGGVR NDDKYKWLVPVGK	ABR68804	Outer membrane protein, CarO

表十一、多套式聚合酶鏈反應(multiplex PCR)所使用之引子與對應之標的基因

PCR 引子	序列(5'-3')	標的基因	長度(bp)*
Nest-1	TGCGTACTGACTGACTGGACTATGC		
Nest-2	GCTGATCCAGAGTGACATGCGTACC		
GyrA-F	GTNATSGGTAARTAYCAYCC	<i>gyrA</i>	113
GyrA-R	CCRAAGTTDCCNTGRCCRTC		
MecA-F	ATATTTTTATGCTTCAAAAGATAAA	<i>mecA</i>	177
MecA-R	TTTATATCTTTAACGCCTAAAC		
VanA-F	GGTTGTGCGGTATTGGG	<i>vanA</i>	181
VanA-R	CCGTTTCCTGTATCCGTC		
PVL-F	AGAACAACACACTATGG	<i>pvl</i>	202
PVL-R	ATCAACTGTATTGGATAGC		
IMP-F	AGATACTGAAAAGTTAGTCA	<i>bla_{IMP}</i>	141
IMP-R	AATTCAGATGCATACGTGGG		
VIM-F	GTAACGCGTGCAGTCTCCAC	<i>bla_{VIM}</i>	194
VIM-R	TCTACTGGACCGAAGCGCAC		
ISAb _a 1-F	TTTRTCGTGTACAGAG		
OXA23-R	ACAATCTGACTCGGGGTTTC	ISAb _a 1- <i>bla_{OXA-23}</i>	140
OXA51-R	CTTCGTAAATAAATTTTTAATTTTCTC	ISAb _a 1- <i>bla_{OXA-51-lik}</i>	165

*此長度為原始PCR片段之長度未包含Nest-1和Nest-2長度。

表十二、ASPE 引子與對應之標的基因

ASPE 引子	序列(5'-3')	ZipCode*	標的基因
			<i>gyrA</i> 的 wtQRDR
GyrA-S1	ACCATTGAYTCRTARATCGCAC	3	<i>E. faecalis</i> 和 <i>E. faecium</i>
GyrA-S2	TACCATTGCTTCATAAATWGAWG	3	<i>S. aureus</i> 和 <i>S. epidermidis</i>
GyrA-S5	ACRATGGTGTTCGTABACSGCRG	49	<i>E. cloacae</i> 、 <i>K. oxytoca</i> 、 <i>K. pneumoniae</i> 和 <i>P. aeruginosa</i>
GyrA-EaerS	ACGATGGTGTTCATAAACGGCGG	49	<i>E. aerogenes</i>
GyrA-AbS	ACAATGGTTTCATAAACAGCTG	49	<i>Acinetobacter spp.</i>
GyrA-EcolS	ACGATCGTGTTATAAACCGCCG	49	<i>E. coli</i>
			<i>gyrA</i> 的 mtQRDR
GyrA-R1	ACCATTGAYTCRTARATCGCAA	8	<i>E. faecalis</i> 和 <i>E. faecium</i>
GyrA-R2	TACCATTGCTTCATARATWGAWA	8	<i>S. aureus</i> 和 <i>S. epidermidis</i>
GyrA-R2-1	TACCATTGCTTCATARATGAWT	8	<i>S. aureus</i> 和 <i>S. epidermidis</i>
GyrA-R5	ACRATGGTGTTCGTABACSGCRA	53	<i>E. cloacae</i> 、 <i>K. oxytoca</i> 、 <i>K. pneumoniae</i> 和 <i>P. aeruginosa</i>
GyrA-EaerR	ACGATGGTGTTCATAAACGGCGA	53	<i>E. aerogenes</i>
GyrA-AbR	ACAATGGTTTCATAAACAGCTA	53	<i>Acinetobacter spp.</i>
GyrA-EcolR	ACGATCGTGTTATAAACCGCCA	53	<i>E. coli</i>
MecA-ASPE	TTGATGCAATTGAAGATAAAAATTTC	18	<i>mecA</i>
Van-ASPE	GGTGGACCAAATCAGGCTGC	19	<i>vanA</i>
PVL-ASPE	GAAGGATCTAGAATACACAACGC	55	<i>pvl</i>
IMP-ASPE	GAGAATTAAGCCACTCTATTCC	14	<i>bla_{IMP}</i>
VIM-ASPE	CGCTCGATGAGAGTCCTTCTAG	17	<i>bla_{VIM}</i>
OXA23-ASPE	CCAGAAAGAAAAAGAGAAGCAACC	20	<i>ISAbal-bla_{OXA-23}</i>
OXA51-ASPE	CTATTTTTATTTTCAGCCTGCTCAC	21	<i>ISAbal-bla_{OXA-51-like}</i>

*Zipcode 序列選擇自 *Mycobacterium tuberculosis* 之基因體

表十三、*S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. faecalis* 與 *E. faecium* 之藥敏測試與抗藥性基因分析

菌株	MIC (mg/L)			<i>gyrA</i> 的 QRDR	PCR 陽性反應		
	CIP	OXA	VAN		<i>mecA</i>	<i>vanA</i>	<i>pvl</i>
<i>S. aureus</i>							
ATCC 29213	0.25	0.38	1.5	Ser83 TCA			
ATCC 6538	0.19	0.125	1.5	Ser83 TCA			
ATCC 6538P	0.19	0.125	1.5	Ser83 TCA			
Sa1	1.5	>256	1.5	Ser83 TCA	+		+
Sa2	0.25	8	1.5	Ser83 TCA	+		+
Sa3	>32	>256	2	Leu83 TTA	+		
Sa4	>32	>256	2	Leu83 TTA	+		
Sa5	>32	>256	2	Leu83 TTA	+		
Sa6	>32	>256	2	Leu83 TTA	+		
Sa7	>32	>256	2	Ser83 TCA	+		
Sa8	>32	>256	2	Leu83 TTA	+		
Sa9	0.25	0.75	1.5	Ser83 TCA			
Sa10	0.19	0.75	1.5	Ser83 TCA			
<i>S. epidermidis</i>							
ATCC 14990	0.125	0.19	2	Ser83 TCT			
Se1	>32	>256	3	Tyr83 TAT	+		
Se2	0.125	0.38	2	Ser83 TCT			
Se3	>32	>256	3	Phe83 TTT	+		
Se4	>32	>256	3	Phe83 TTT	+		
Se5	0.064	0.75	2	Ser83 TCT	+		
<i>E. faecalis</i>							
ATCC 19433	1		1	Ser83 AGT			
Efas1	>32		2	Ile83 ATT			
Efas2	0.75		1.5	Ser83 AGT			
Efas3	0.5		2	Ser83 AGT			
Efas4	0.75		3	Ser83 AGT			
Efas5	0.5		1	Ser83 AGT			
Efas6	0.5		1.5	Ser83 AGT			
Efas7	>32		>256	Ile83 ATT			+
Efas8	>32		>256	Ile83 ATT			+
<i>E. faecium</i>							
ATCC 19434	4		0.75	Ser83 AGT			
Efam1	1.5		1.5	Ser83 AGT			
Efam2	4		1	Ser83 AGT			
Efam3	>32		1	Arg83 AGG			
Efam4	>32		1	Ile83 ATT			
Efam5	0.75		3	Ser83 AGT			
Efam6	0.5		3	Ser83 AGT			
Efam7	>32		>256	Ile83 ATT			+
Efam8	>32		>256	Ile83 ATT			+

表十四、*P. aeruginosa* 和 *Acinetobacter spp.* 之藥敏測試與抗藥性基因分析

菌株	MIC (mg/L)		<i>gyrA</i> 的 QRDR	PCR 陽性反應			
	CIP	IPM		<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM}	ISAba1- <i>bla</i> _{OXA-23}	ISAba1- <i>bla</i> _{OXA-51-like}
<i>P. aeruginosa</i>							
ATCC 27853	0.19	2	Thr83 ACC				
ATCC 15442	0.125	1	Thr83 ACC				
ATCC 10145	0.19	1	Thr83 ACC				
ATCC 9027	0.094	1.5	Thr83 ACC				
Pa1	0.25	1	Thr83 ACC				
Pa2	>32	12	Ile83 ATC				
Pa3	0.25	1	Thr83 ACC				
Pa4	>32	16	Ile83 ATC		+		
Pa5	6	1	Ile83 ATC				
Pa6	>32	0.05	Ile83 ATC				
<i>Acinetobacter spp.</i>							
ATCC19606	0.5	0.25	Ser83 TCA				
ATCC15151	0.094	0.25	Ser83 TCA				
ATCC17922	0.047	0.094	Ser83 TCA				
ATCC17903	0.019	0.125	Ser83 TCA				
Aci1	>32	>32	Leu83 TTA				+
Aci2	>32	>32	Leu83 TTA			+	+
Aci3	0.25	16	Ser83 TCA	+			
Aci4	0.125	>32	Ser83 TCA		+		
Aci5	3	8	Phe83 TTT		+		
Aci6	0.19	12	Ser83 TCA			+	

表十五、五種 *Enterobacteriaceae* 之藥敏測試與抗藥性基因分析

菌株	CIP 的 MIC (mg/L)	<i>gyrA</i> 的 QRDR
<i>ATCC1388</i>		
3	0.032	Ser83 TCC
Kp1	>32	Ile83 ATC
<i>K. pneumoniae</i>		
Kp2	>32	Ile83 ATC
Kp3	0.023	Ser83 TCC
Kp4	0.032	Ser83 TCC
Kp5	0.032	Ser83 TCC
<i>ATCC8724</i>		
	0.012	Thr83 ACT
Ko1	0.012	Thr83 ACT
<i>K. oxytoca</i>		
Ko2	0.008	Thr83 ACT
<i>E. coli</i>		
<i>ATCC2592</i>		
2	0.012	Ser83 TCG
Eco1	>32	Leu83 TTG
Eco2	>32	Leu83 TTG
Eco3	32	Leu83 TTG
<i>E. aerogenes</i>		
<i>ATCC1304</i>		
8	0.023	Thr83 ACC
Eae1	0.023	Thr83 ACC
Eae2	0.064	Thr83 ACC
Eae3	0.23	Thr83 ACC
<i>E. cloacae</i>		
<i>ATCC1304</i>		
7	0.016	Ser83 TCC
Ecl1	0.25	Ser83 TCC
Ecl2	1.5	Ser83 TCC
Ecl3	0.023	Ser83 TCC
Ecl4	>32	Tyr83 TAC

表十六、以流式微珠陣列偵測不同標的之靈敏度

標的	菌種	菌株	靈敏度 (pg/μl)
GP- <i>gyrA</i> -S	<i>S. aureus</i>	Sa1	<5
GP- <i>gyrA</i> -R	<i>E. faecalis</i>	Efas7	500-1000
GN- <i>gyrA</i> -S	<i>Acinetobacter</i> spp.	Aci3	<5
GN- <i>gyrA</i> -R	<i>E. coli</i>	Eco1	<5
<i>mecA</i>	<i>S. aureus</i>	Sa1	100-500
<i>vanA</i>	<i>E. faecalis</i>	一、 Efas7	<5
二、 pvl	<i>S. aureus</i>	三、 Sa1	<5
<i>bla</i> _{IMP}	<i>Acinetobacter</i> spp.	Aci3	100-500
<i>bla</i> _{VIM}	<i>P. aeruginosa</i>	Pa4	5-10
ISAba1- <i>bla</i> _{OXA-23}	<i>Acinetobacter</i> spp.	Aci2	10-50
ISAba1- <i>bla</i> _{OXA-51-like}	<i>Acinetobacter</i> spp.	Aci2	100-500

表十七. 台大 50 株 *Candida. tropicalis* 分離株之菌株資料及藥敏試驗結果.

病人代號	採集日期 年/月/日	菌株代碼	檢體來源	48 小時 MIC (µg/ml) ^a				DST	MLST group
				Amphotericin B	Flucytosine	Fluconazole	Voriconazole		
P1	1997/1/27	DOH86g091	Anal	0.5	32	0.5	0.03	164	II-2
P1	1997/1/31	DOH86g041	Urine	0.5	8	0.5	0.03	164	II-2
P1	1997/1/31	DOH86g045	Urine	0.5	4	1	0.06	164	II-2
P1	1997/1/31	DOH86g081	Sputum	1	32	1	0.06	164	II-2
P1	1997/2/1	DOH86g055	CVC ^b	0.5	2	0.5	0.03	164	II-2
P1	1997/2/1	DOH86g063	CVC	1	0.125	1	0.06	164	II-2
P1	1997/2/3	DOH86g005	Urine	0.125	8	0.5	0.06	164	II-2
P1	1997/2/3	DOH86g074	Urine	0.25	16	0.5	0.06	164	II-2
P1	1997/2/11	DOH86g012	CVC	0.125	8	1	0.125	164	II-2
P1	1997/2/11	DOH86g021	Urine	0.25	8	1	0.06	164	II-2
P1	1997/2/11	DOH86g061	CVC	2	16	0.5	0.06	164	II-2
P1	1997/2/17	DOH86g071	Anal	0.5	16	1	0.06	164	II-2
P2	1996/12/6	DOH86g099	Urine	1	0.125	1	0.125	173	II-8
P2	1996/12/9	DOH86g018	Urine	0.25	0.25	1	0.06	165	II-7
P2	1996/12/16	DOH86g082	Urine	1	0.125	1	0.125	165	II-7
P3	1996/9/11	DOH86g035	Sputum	1	0.125	1	0.06	140	I-1
P3	1996/9/12	DOH86g006	Anal	0.25	0.125	1	0.06	140	I-1
P3	1996/9/13	DOH86g057	Sputum	0.5	0.125	1	0.06	140	I-1
P4	1996/11/27	DOH86g066	Sputum	1	0.125	1	0.06	TW3	I-4
P4	1996/11/29	DOH86g039	Sputum	0.25	0.125	1	0.06	166	I-5
P4	1996/12/2	DOH86g022	Anal	0.125	0.125	0.5	0.03	164	II-2
P5	1996/12/6	DOH86g038	Urine	0.5	0.125	0.5	0.06	167	I-6
P5	1996/12/6	DOH86g078	Sputum	1	0.25	1	0.125	134	III-1
P5	1996/12/6	DOH86g089	Throat	1	0.25	0.5	0.03	171	I-7
P6	1996/10/8	DOH86g076	Anal	0.25	0.125	1	0.03	170	II-3
P6	1996/10/11	DOH86g070	Stool	0.25	0.125	1	0.06	169	II-4
P7	1996/12/24	DOH86g011	Anal	0.125	16	1	0.06	164	II-2
P7	1996/12/24	DOH86g097	Anal	1	0.125	0.5	0.03	172	II-1
P7	1996/12/26	DOH86g092	Anal	0.5	0.125	0.5	0.03	172	II-1
P8	1996/11/30	DOH86g036	Urine	0.25	0.125	1	0.03	176	I-3
P8	1996/12/2	DOH86g086	Anal	0.5	0.125	1	0.25	98	I-2
P9	1997/1/23	DOH86g003	Anal	0.25	0.125	0.5	0.03	140	I-1
P9	1997/1/23	DOH86g033	Throat	0.25	0.125	1	0.03	140	I-1
P9	1997/1/23	DOH86g014	Urine	0.125	0.125	1	0.06	134	III-1
P10	1996/12/16	DOH86g068	Anal	1	0.125	0.125	0.03	169	II-4
P10	1996/12/26	DOH86g051	Urine	0.5	16	1	0.03	164	II-2
P10	1996/12/27	DOH86g062	Urine	0.5	16	1	0.06	164	II-2
P10	1996/12/28	DOH86g058	Urine	0.5	0.125	1	0.25	177	II-6
P10	1997/1/20	DOH86f018	Urine	0.125	0.125	1	0.25	174	II-5
P11	1997/1/21	DOH86g023	Sputum	0.25	0.125	1	2	100	I-8
P11	1997/1/29	DOH86g004	Anal	0.25	0.25	0.5	0.03	175	III-4
P11	1997/1/29	DOH86g024	Sputum	1	0.125	1	0.06	134	III-1
P11	1997/2/1	DOH86g075	CVC	1	0.25	1	0.125	178	III-3
P11	1997/1/29	DOH86g002	Sputum	1	0.125	1	0.06	134	III-1
P12	1996/10/1	DOH86g040	Sputum	1	4	1	0.06	TW2	III-5
P12	1996/11/6	DOH86g094	Nasal	0.5	0.125	0.5	0.03	98	I-2
P13	1997/1/29	DOH86g031	Sputum	0.125	0.125	0.5	0.03	TW1	III-2
P13	1997/1/31	DOH86g095	Anal	1	0.25	1	0.06	134	III-1
P14	1997/1/25	DOH86g065	Anal	0.5	16	1	0.03	134	III-1
P14	1997/1/29	DOH86g054	Anal	1	0.125	0.5	0.125	134	III-1

表十八. 201 株 *Candida albicans* Clade 與不同 phenotype 之關係.

MLST Clade	ABC type			Mating type		HIV		FCZ susceptibility			Region of Taiwan			
	A	B	C	Het	Hom	w/+	w/o	R	SDD	S	N	M	S	E
	1	25	1	11	33	4	10	27	2	0	35	19	4	12
2														
3	0	16	0	16	0	4	12	2	0	14	7	1	8	0
4	1	30	5	36	0	2	34	1	0	35	11	5	16	4
5	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
6	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
7	3	0	0	3	0	1	2	0	1	2	1	0	1	1
8	6	1	0	7	0	5	2	0	0	7	6	0	1	0
9	5	1	5	11	0	3	8	0	0	11	7	2	2	0
10	0	10	0	10	0	0	10	5	0	5	2	3	4	1
11	2	2	4	7	1	5	3	0	0	8	6	1	0	1
12	1	8	0	9	0	3	6	0	0	9	5	1	2	1
13														
14	0	4	0	4	0	0	4	0	0	4	1	1	2	0
15														
16	1	24	1	25	1	3	23	0	1	25	12	6	5	2
17	0	13	1	13	1	3	11	0	0	14	8	3	3	0
S														
Total														

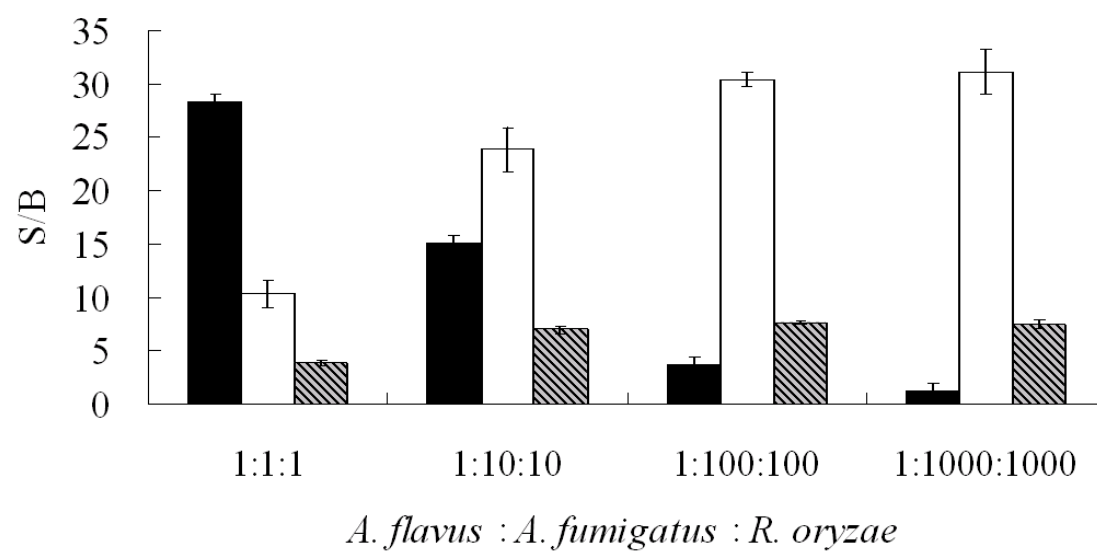
圖一、利用微珠陣列系統測試鑑定絲狀真菌菌株

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

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

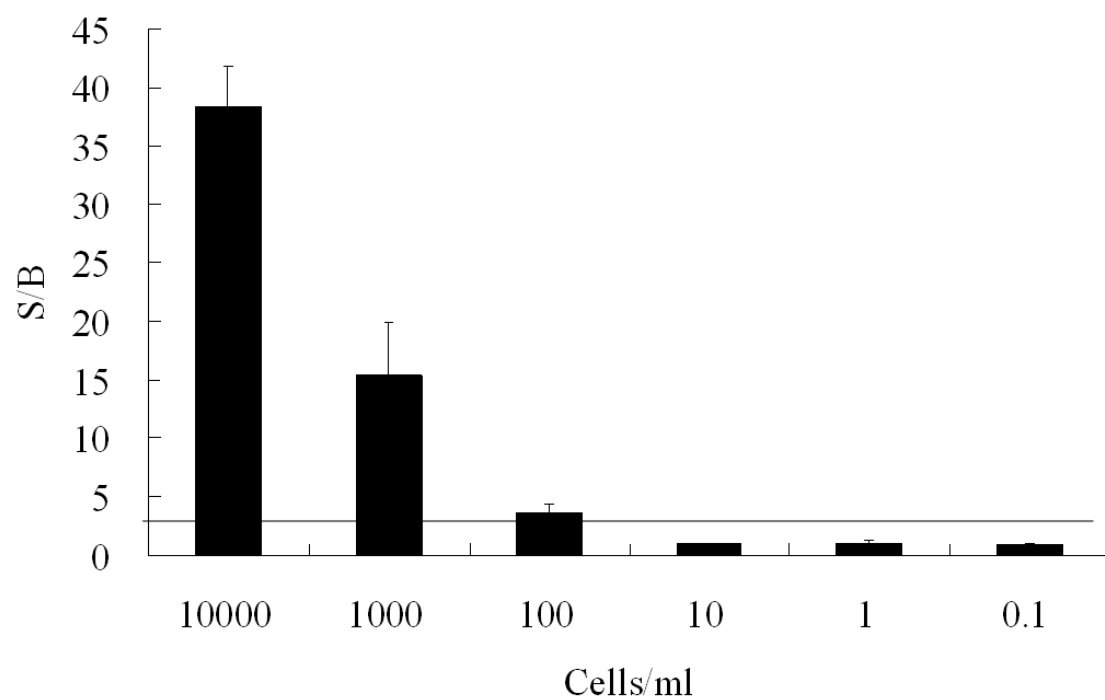
圖二、以微珠陣列系統偵測多重絲狀真菌混合實驗

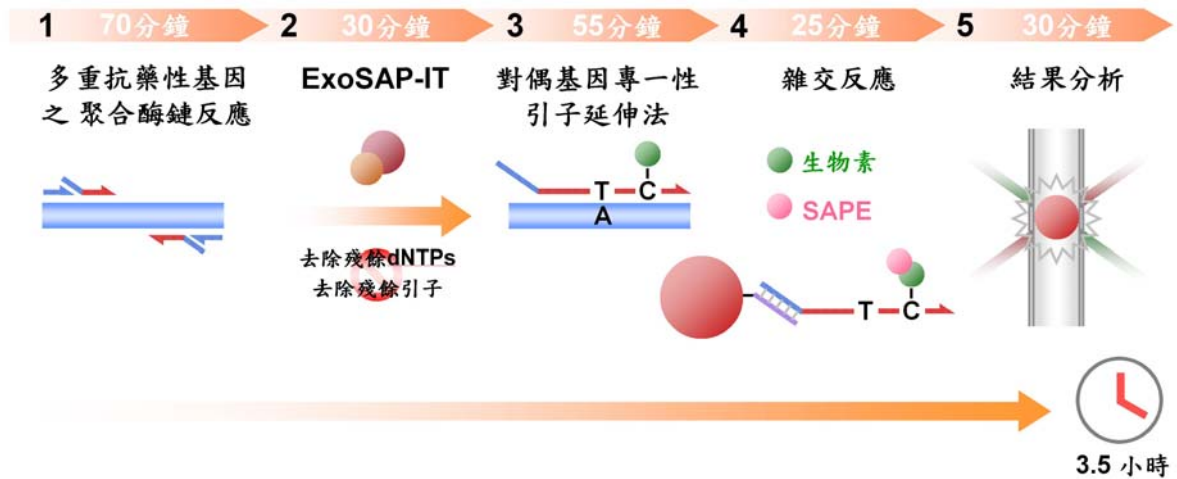
■ *A. flavus* □ *A. fumigatus* ▨ *R. oryzae*



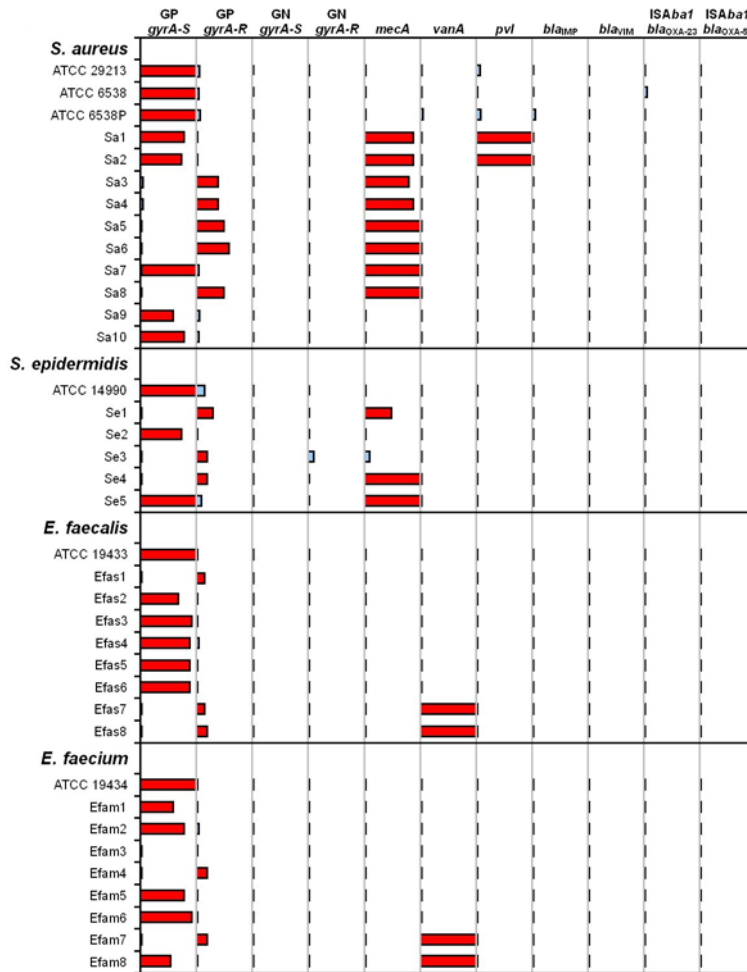
圖三、以spiked的血液測試微珠陣列系統運用臨床檢驗可行性及靈敏

度



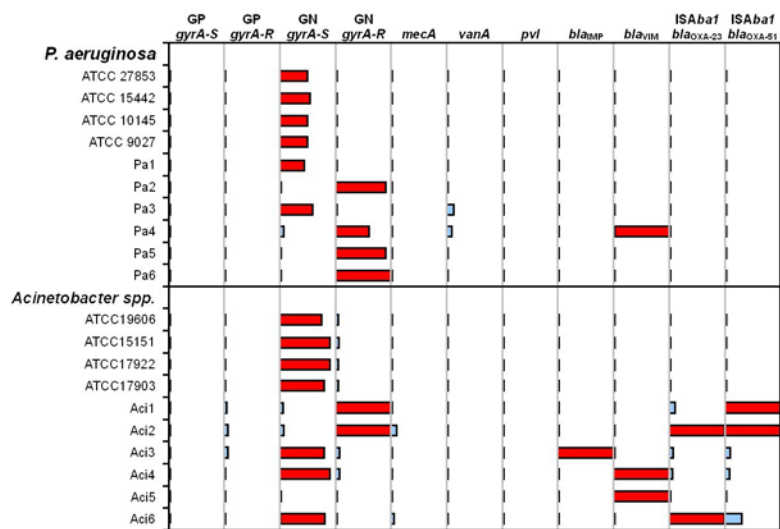


圖四、流式微珠陣列之流程圖。(1)多重抗藥性基因之聚合酶鏈反應：以多套式聚合酶鏈反應合成11種院內感染細菌之7個抗藥性基因與*pvl*基因；(2)ExoSAP-IT：多套式聚合酶鏈反應之產物以shrimp alkaline phosphatase和exonuclease I處理；(3)對偶基因專一性引子延伸法(ASPE)：只有正確的ASPE引子可將含生物素(biotin)的dCTP鑲嵌在ASPE延伸產物中；(4)雜交反應：ASPE延伸產物具有特異性的ZipCodes，可專一性地與微珠上的cZipCodes雜交，而SAPE則可與ASPE延伸產物上的生物素結合；(5)結果分析：利用流式細胞儀偵測專一性微珠上PE的螢光信號，再藉電腦轉成數位信號以便分析。

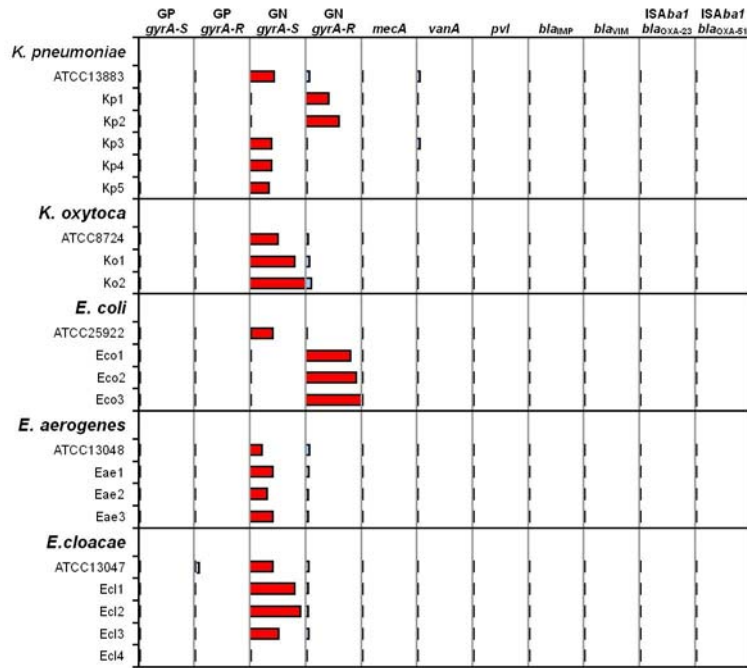


圖五、以流式微珠陣列偵測 *S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. faecalis* 與 *E. faecium* 之

multiplex PCR 產物。垂直位置列出各菌株名稱。平行位置的長方條顯示各種 ASPE 引子反應之 S/B 比例。全長的長方條表示 S/B 比例 ≥ 10 。紅色長方條表示專一性反應，藍色長方條則表示非專一性反應。

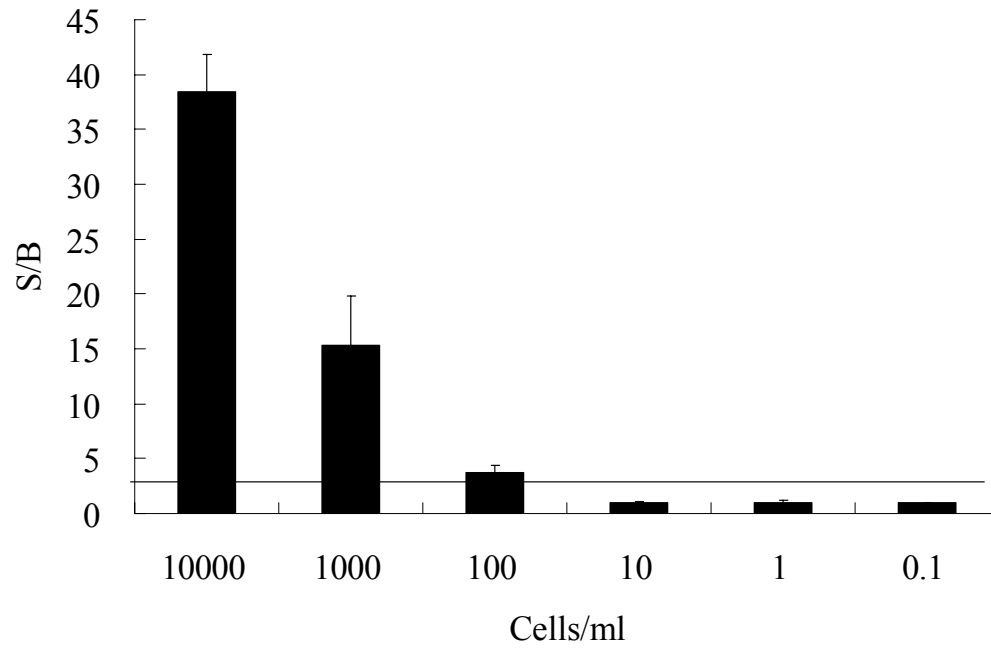


圖六、以流式微珠陣列偵測 *P. aeruginosa* 與 *Acinetobacter* spp. 之 multiplex PCR 產物。

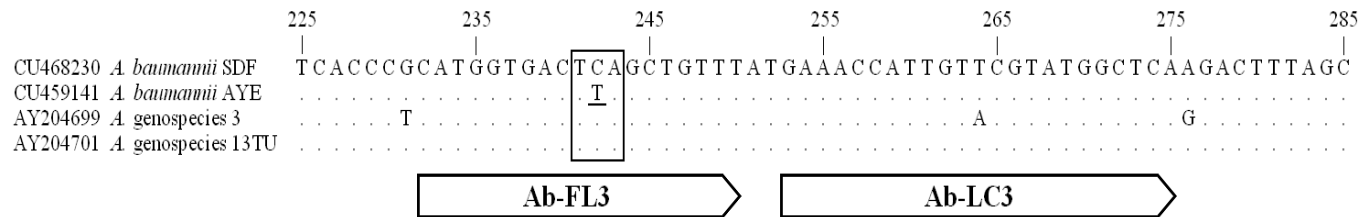


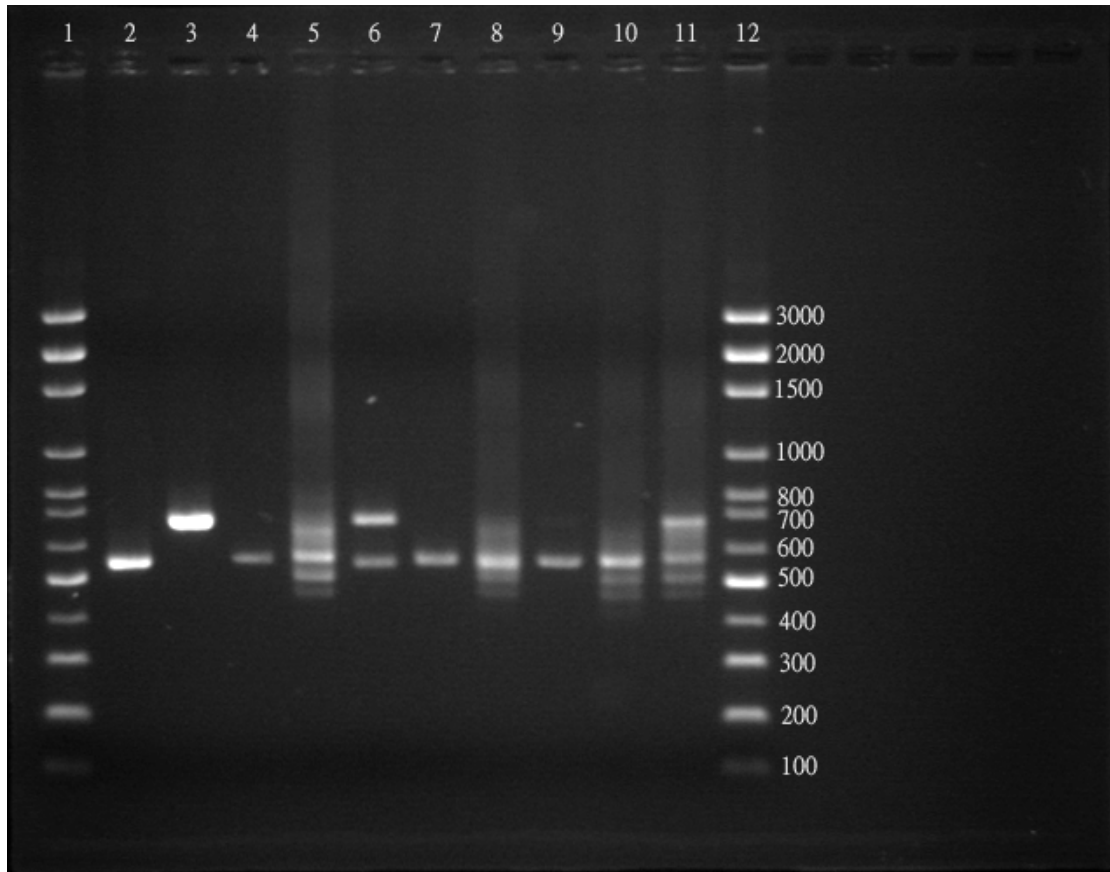
圖七、以流式微珠陣列偵測 *K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*E. coli*、*E. aerogenes* 與 *E. cloacae* 之 multiplex PCR 產物。

圖八、以流式微珠陣列偵測 *S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. faecalis* 與 *E. faecium* 之 multiplex PCR 產物。垂直位置列出各菌株名稱。平行位置的長方條顯示各種 ASPE 引子反應之 S/B 比例。全長的長方條表示 S/B 比例 ≥ 10 。紅色長方條表示專一性反應，藍色長方條則表示非專一性反應。



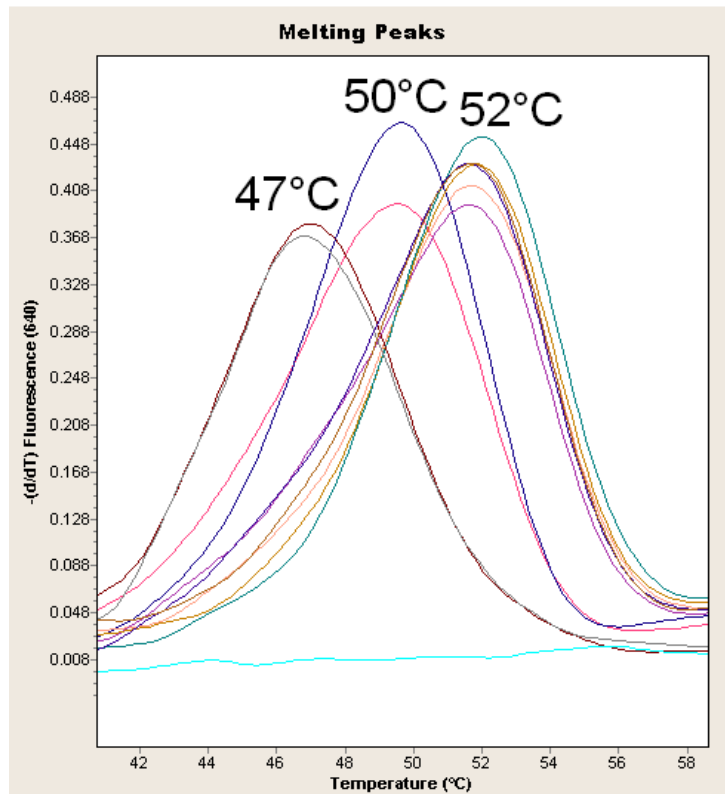
圖九、四個*Acinetobacter* spp. 菌株*gyrA*基因的QRDR序列排列(Alignment)。框起來的序列為*gyrA*基因的QRDR。下標的序列指出改變的胺基酸。兩個箭頭表示所設計的兩個探針Ab-FL3和Ab-LC3序列。



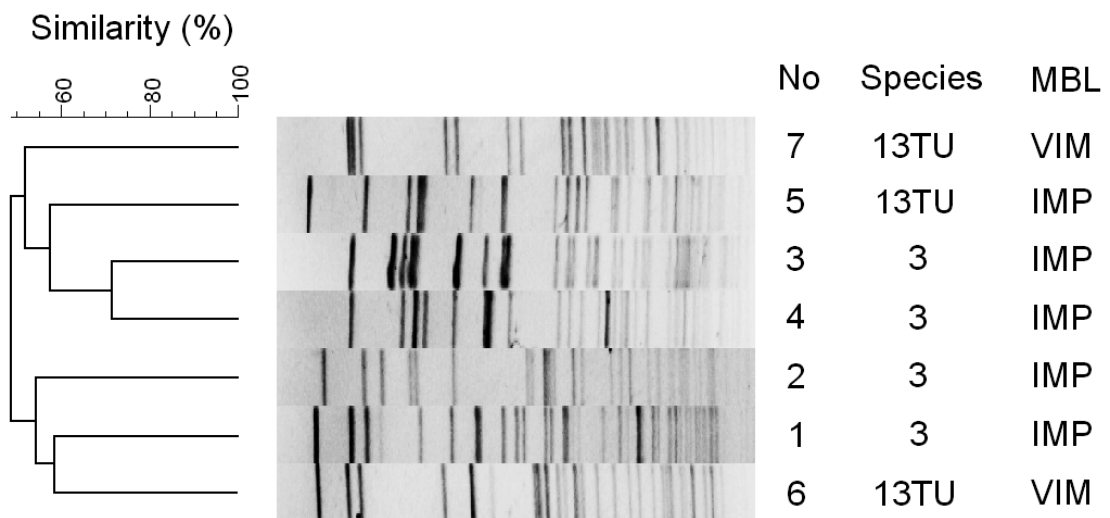


圖十. Results of multiplex PCR using two universal primers to amplify DNA templates of each species alone or mixture of 2 different species. Lane 1 and lane 12 are markers, lane 2 is *C. albican*, lane 3 is *A. baumannii*, lane 4 is *P. aeruginosa*, lane 5 is *S. aureus*, lane 6 are *C. albican* plus *A. baumannii*, lane 7 are *C. albican* plus *P. aeruginosa*, lane 8 are *C. albican* plus *S. aureus*, lane 9 are *A. baumannii* plus *P. aeruginosa*, lane 10 are *P. aeruginosa* plus *S. aureus*, lane 11 are *A. baumannii* plus *S. aureus*

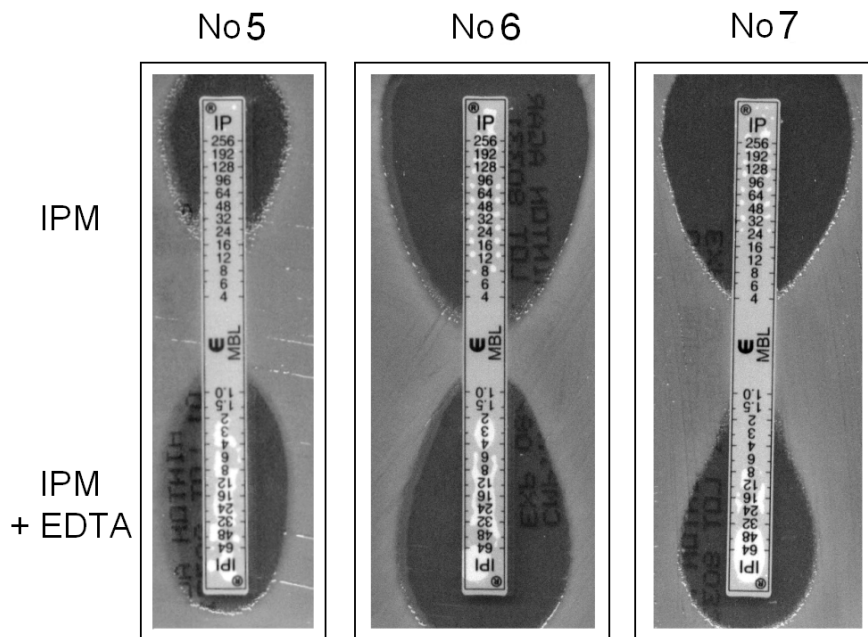
圖十一、10株 *Acinetobacter* spp. 臨床菌株之 Melting-curve 分析。T_m 值在 52°C 的分別為 2 株 *A. baumannii*、2 株 genospecies 3 與 2 株 genospecies 13TU；在 T_m 值 50°C 的為 2 株 genospecies 3；T_m 值在 47°C 的為 2 株 *A. baumannii*。



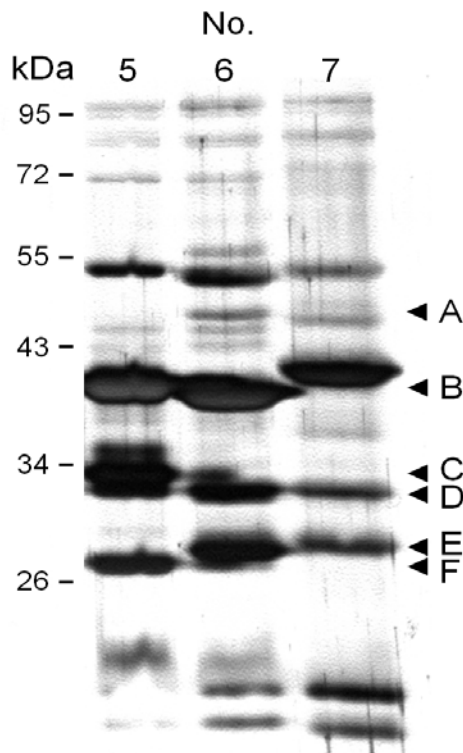
圖十二、7株具MBL基因 *Acinetobacter* spp. 菌株之 PFGE 分析



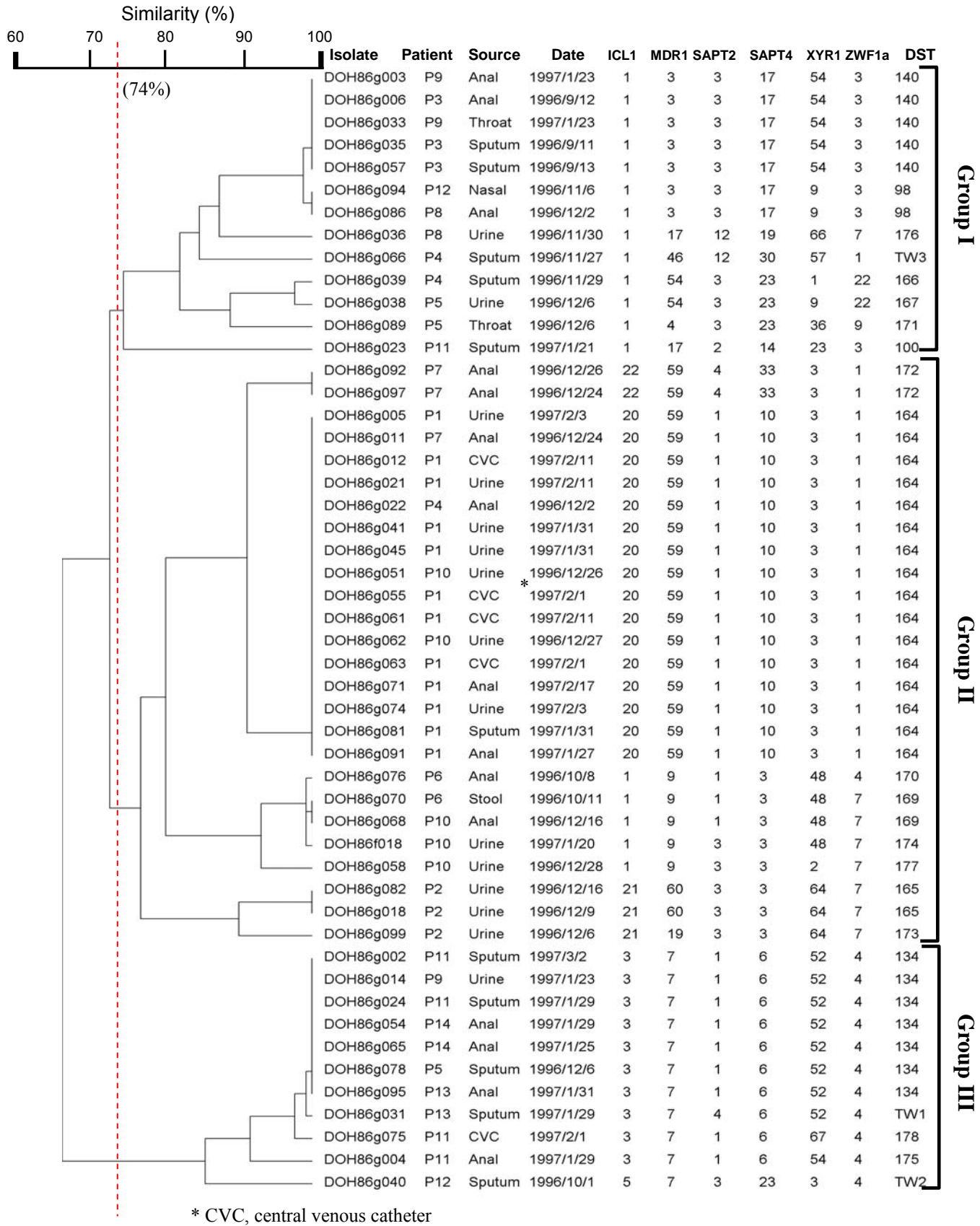
圖十三、3株具MBL基因*Acinetobacter* genospecies 13TU 菌株之E-test
MBL分析



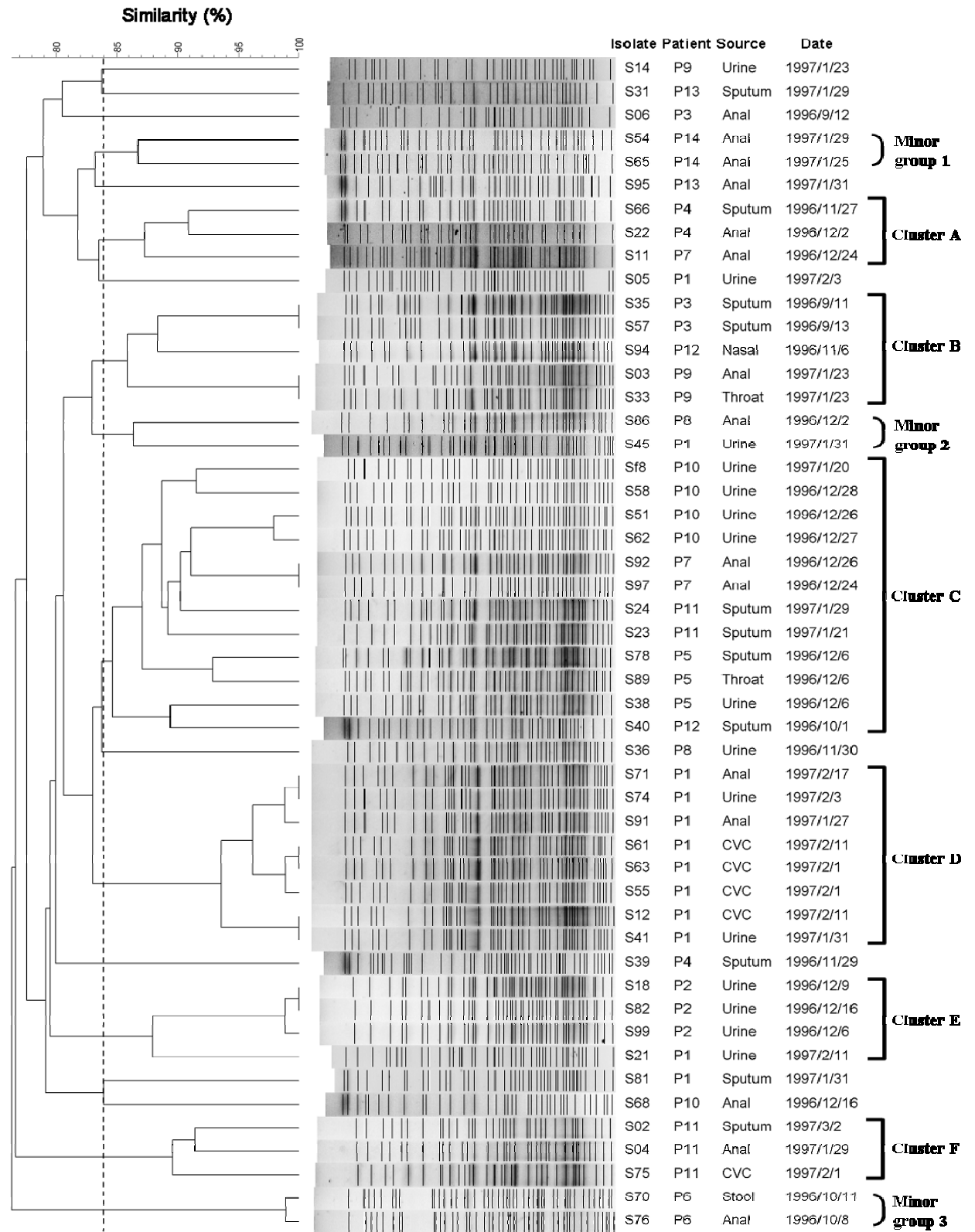
圖十四、SDS-PAGE分析3株具MBL基因的*Acinetobacter* genospecies 13TU之OMPs。標示線指出不同分子量相對位置。英文字母(A-F)相對應的箭頭指出進行LC-MS/MS後續分析的條紋。



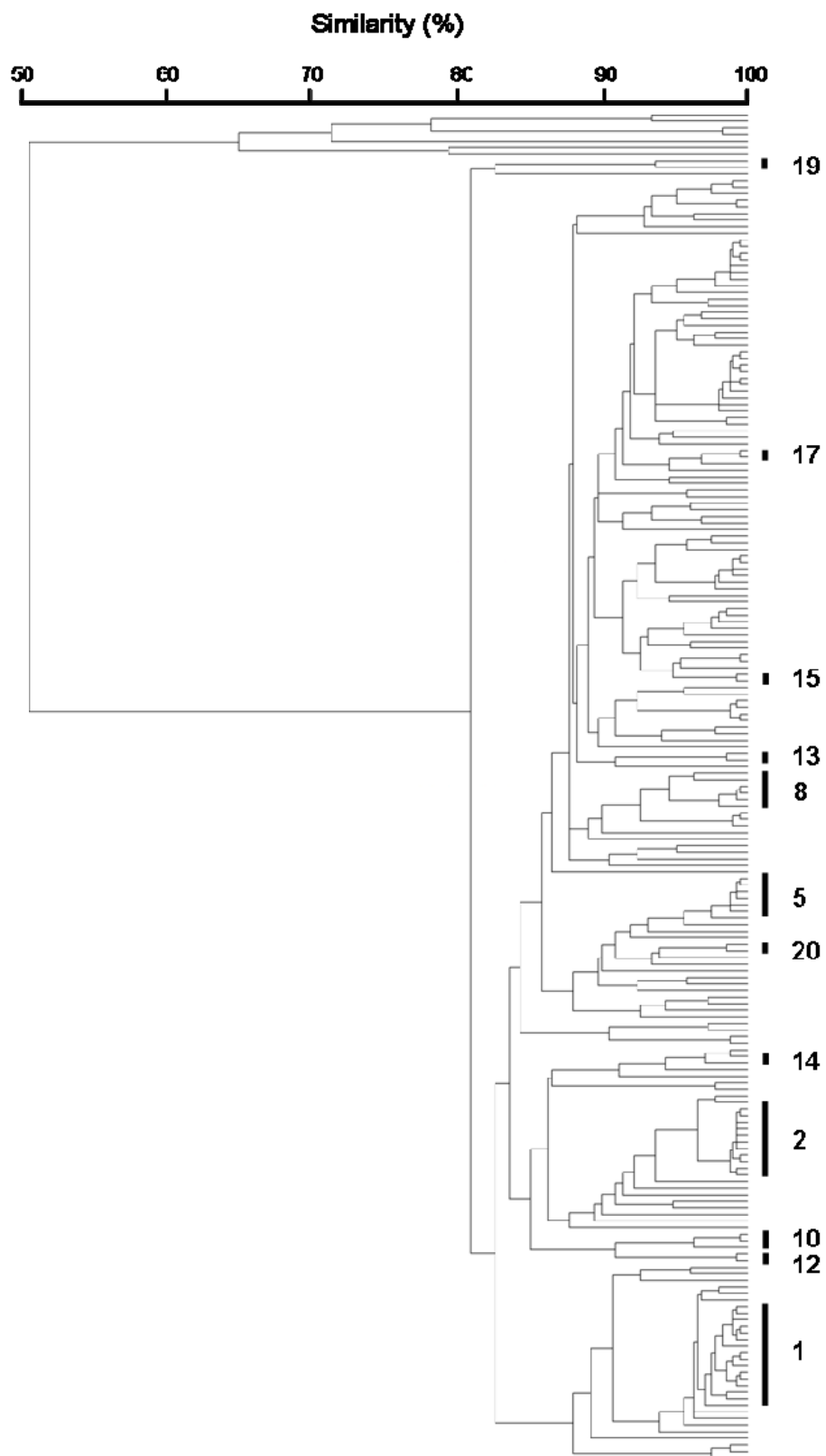
圖十五、台大50株*Candida tropicalis*分離株的MLST分析

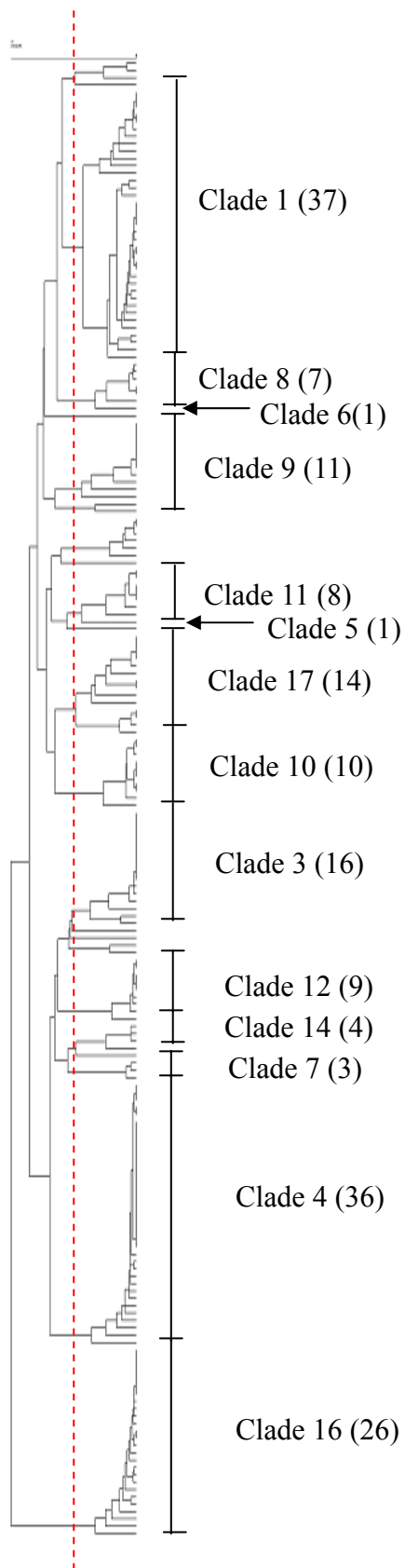


圖十六、台大 50 株 *Candida tropicalis* 分離株的 PFGE 分析



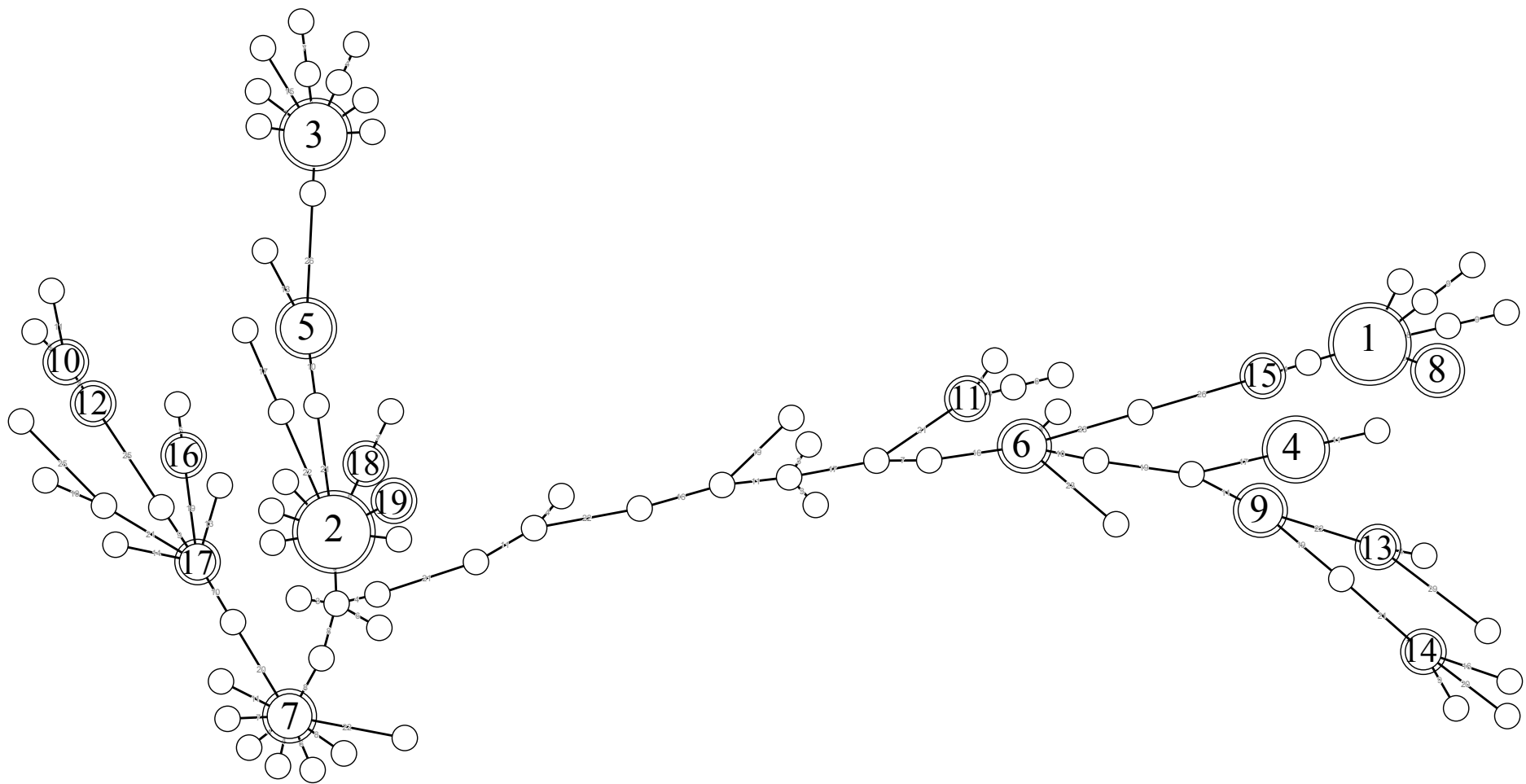
圖十七: 205 株台灣及國際 *C. tropicalis* MLST UPGMA 樹狀圖(右邊數字顯示為台灣分離株的 eBURST cluster)





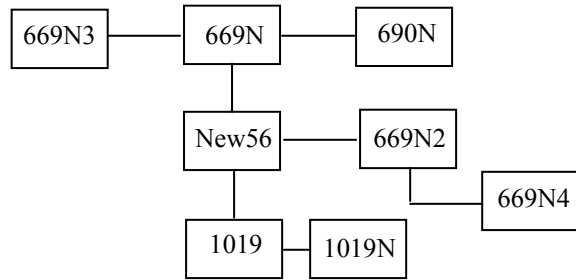
圖十八、 台灣 201 株(1997-2006)*Candida albicans* 的 UPGMA tree

(Clade number 後括弧內為 isolates 菌株數)

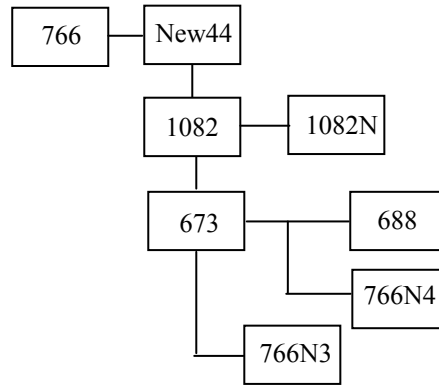


圖十九、 台灣 201 株(1997-2006)*Candida albicans* 的 Minimum Spanning tree (數字顯示為主要之 clonal cluster)

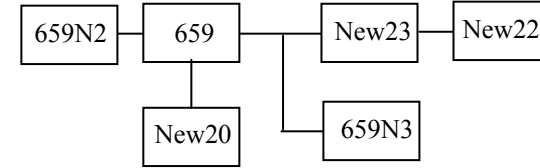
Clonal cluster1



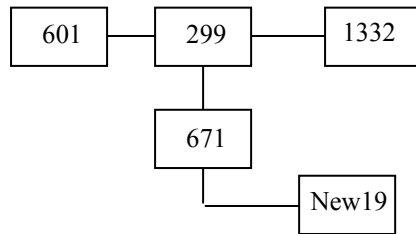
Clonal cluster2



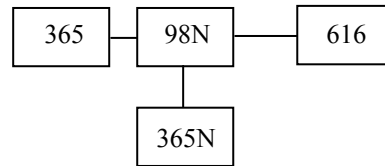
Clonal cluster3



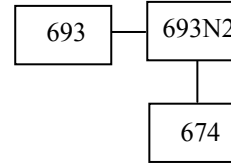
Clonal cluster4



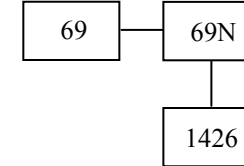
Clonal cluster5



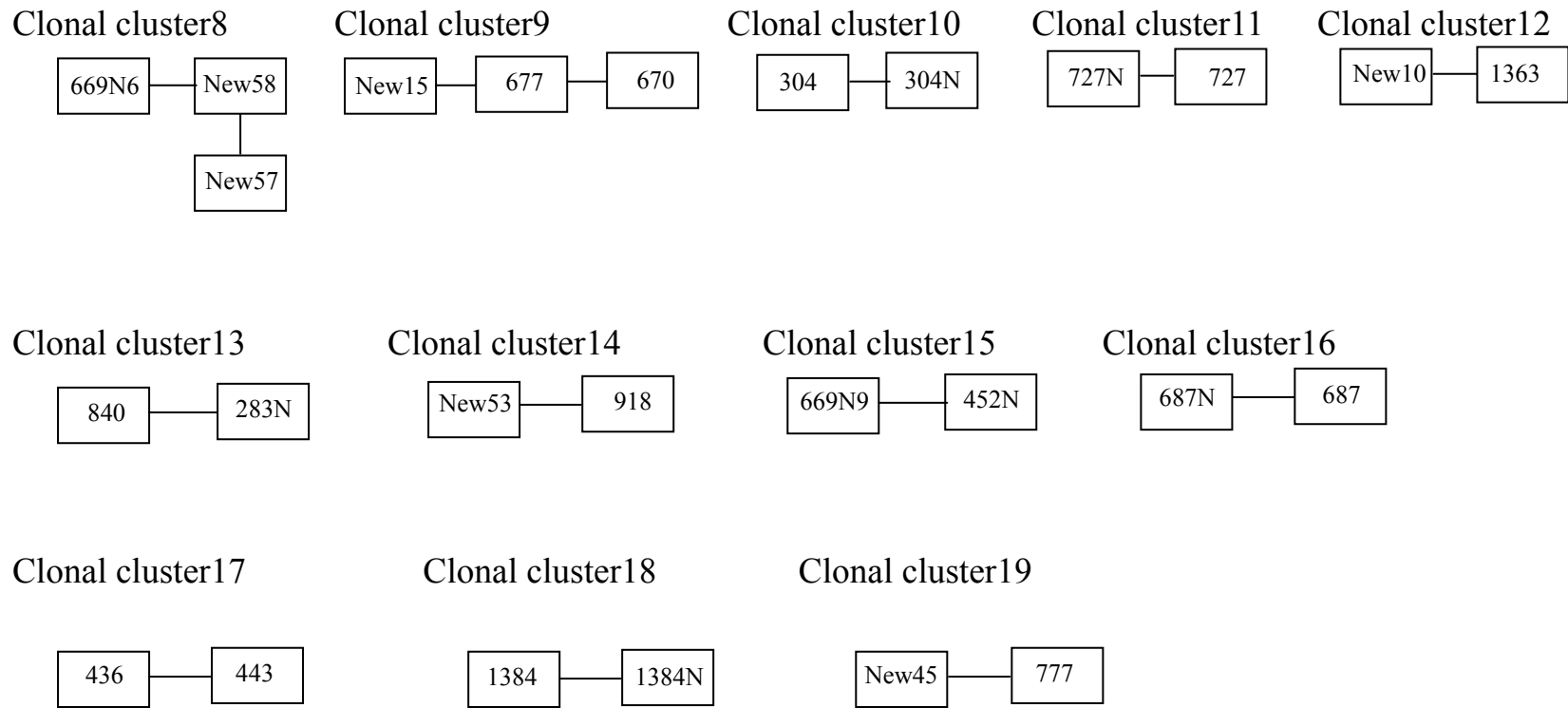
Clonal cluster6



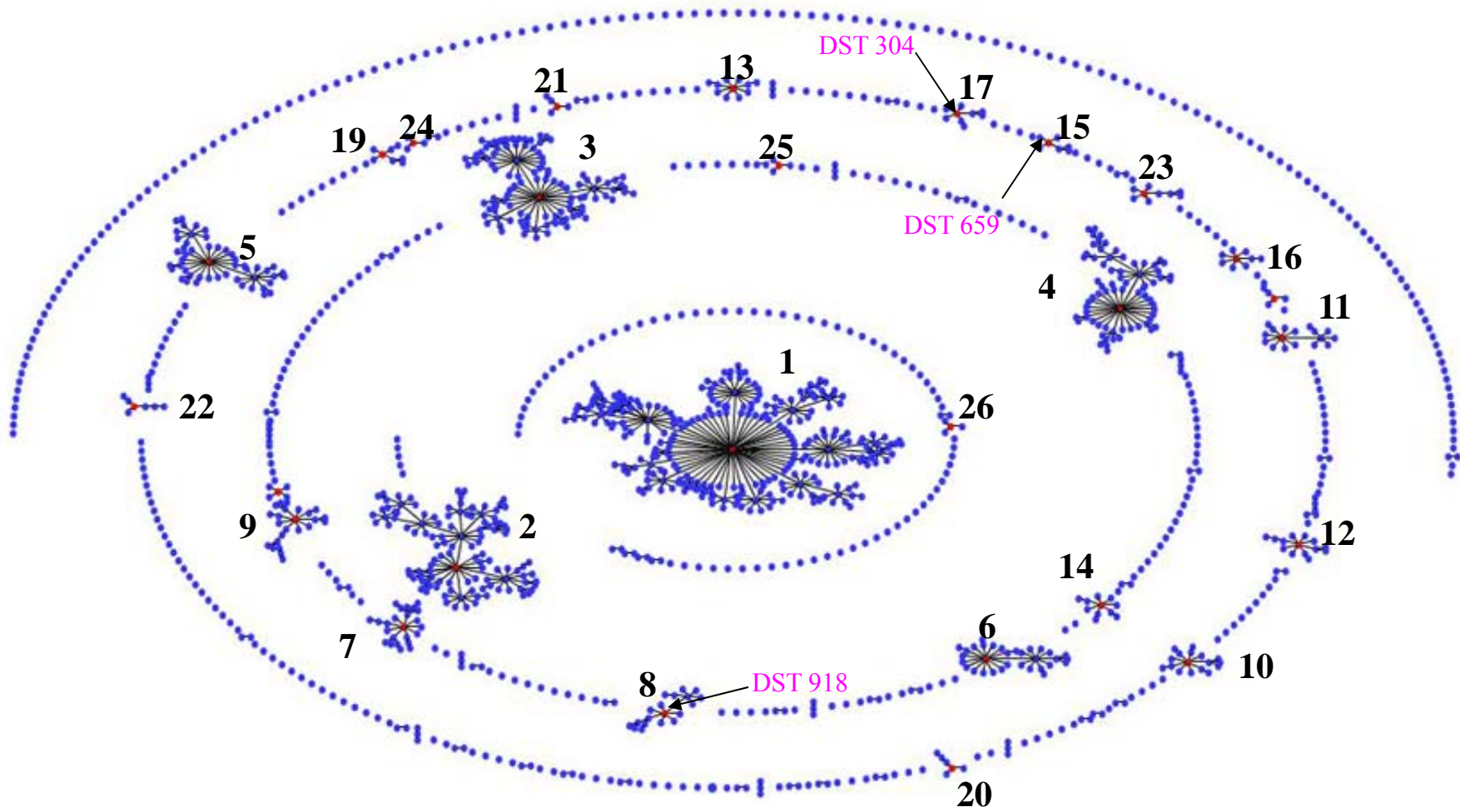
Clonal cluster7



圖十九 (續) 長方形內數字為 DST 號碼

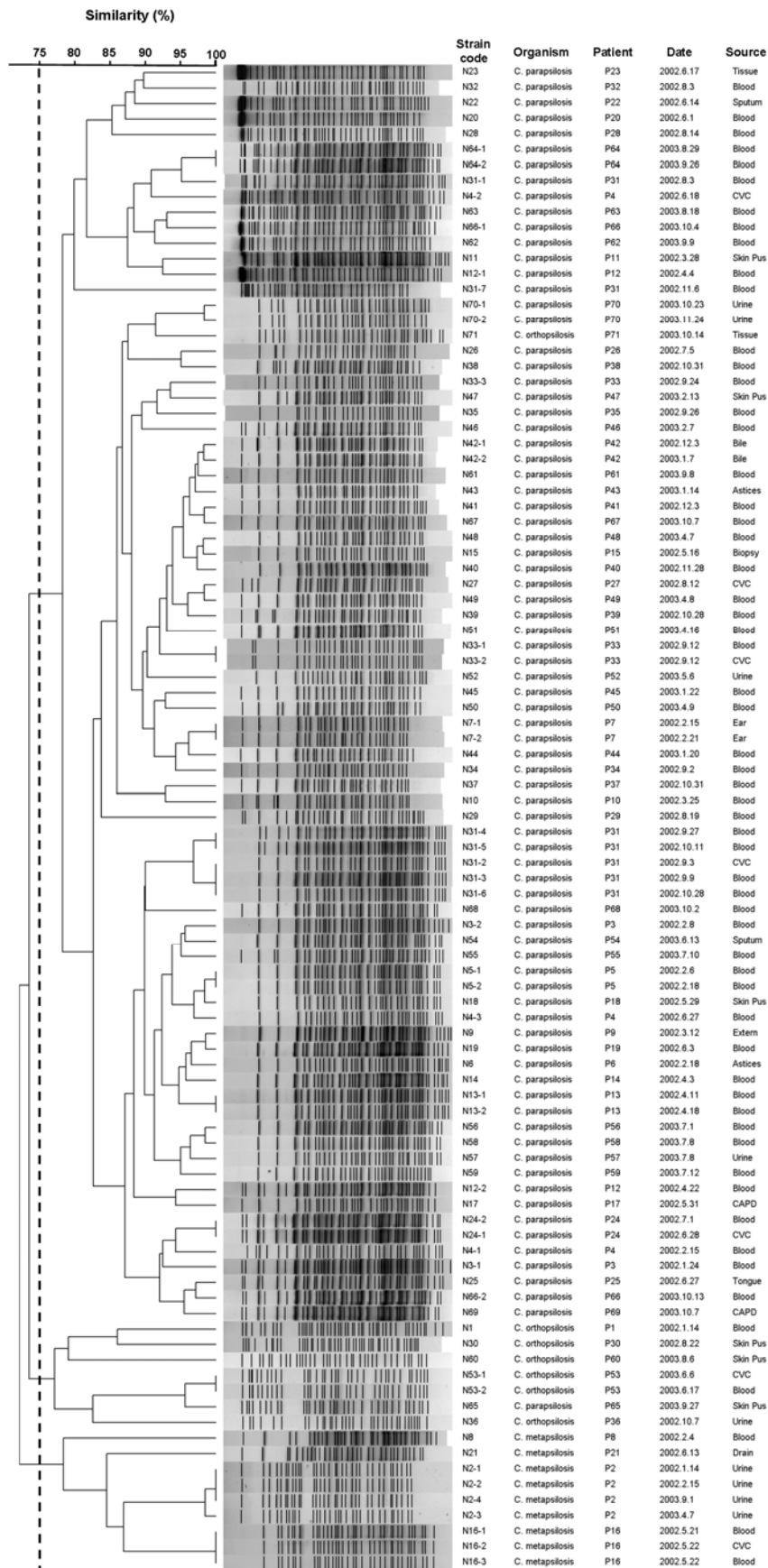


圖十九 (續)

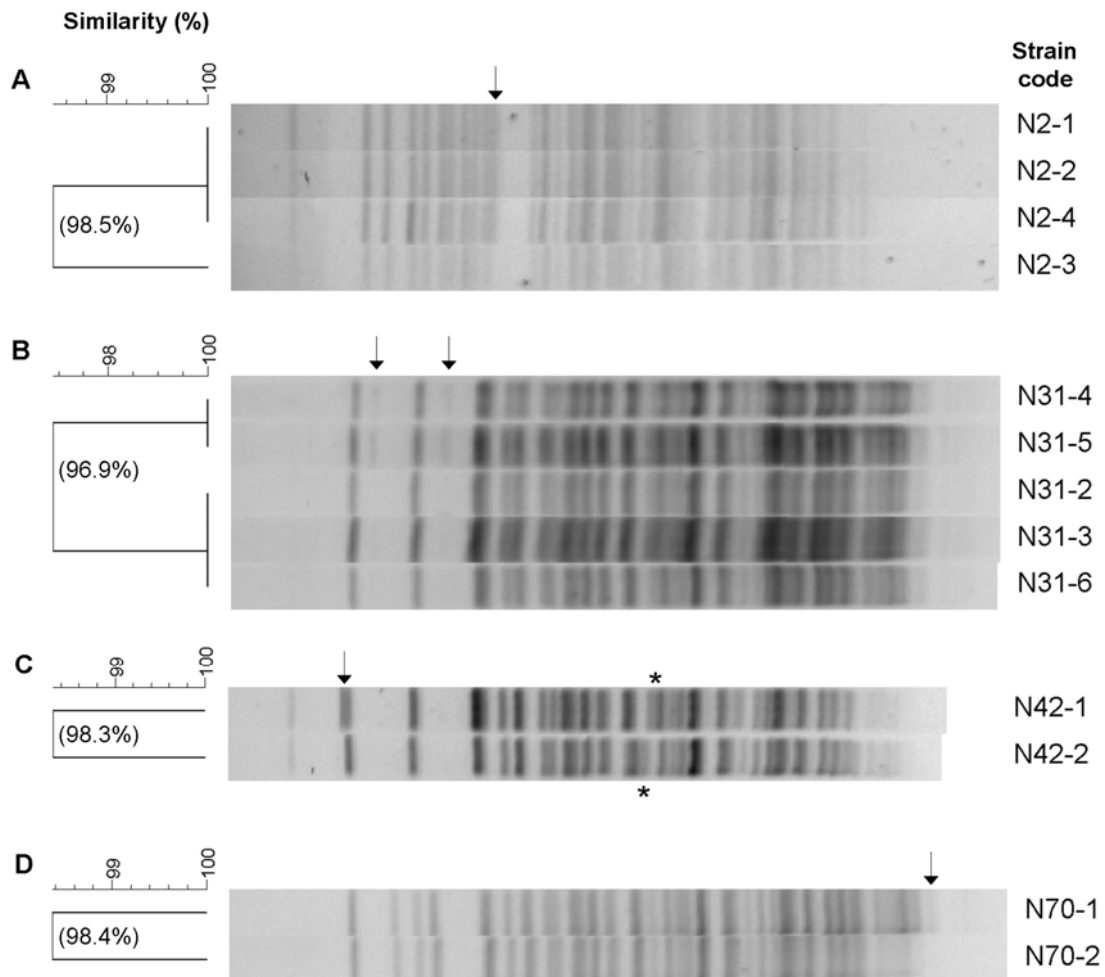


圖二十、台灣與國際菌株 *Candida albicans* 1508 個 DST 之 eBURST 圖 (數字顯示為 clonal cluster 之 group)

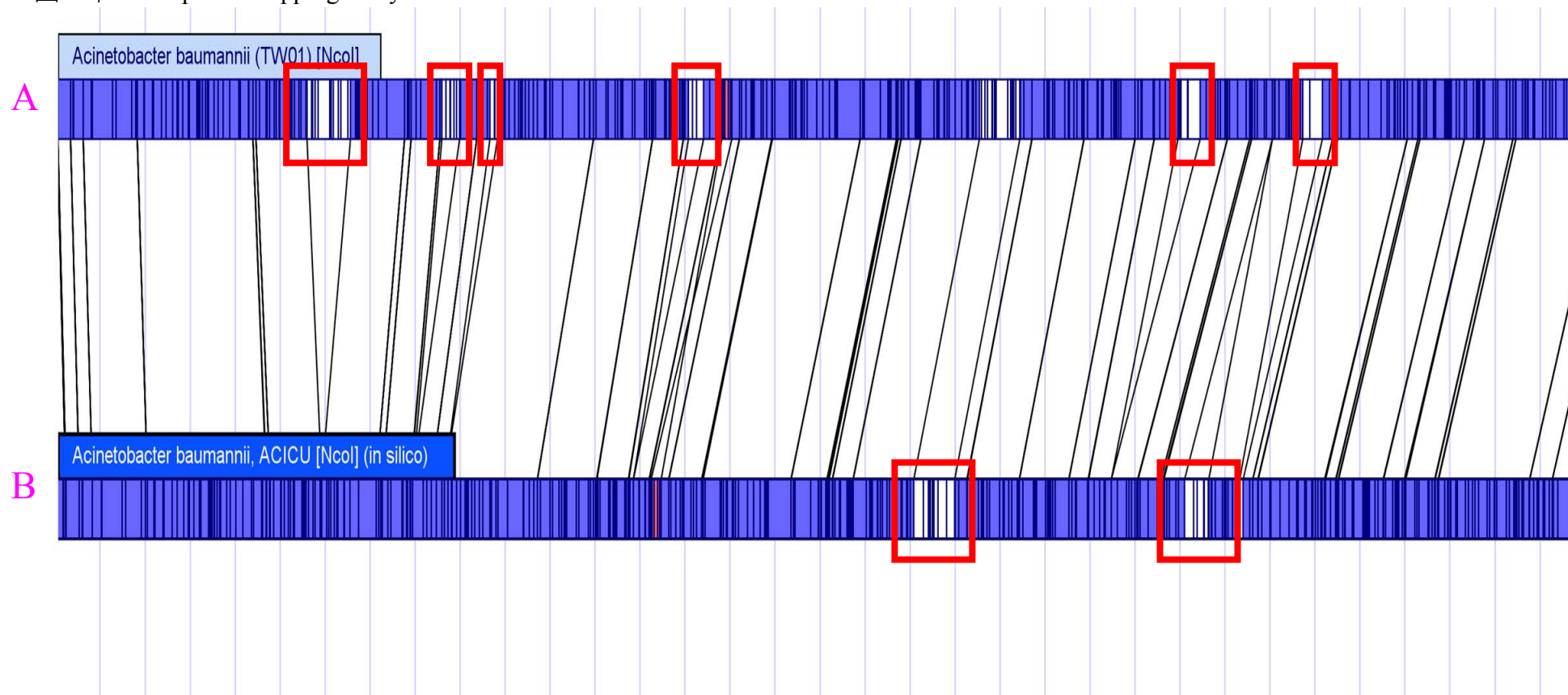
圖二十一、台大 97 株 *Candida parapsilosis* 分離株的 PFGE-*BssHIII* 分析。



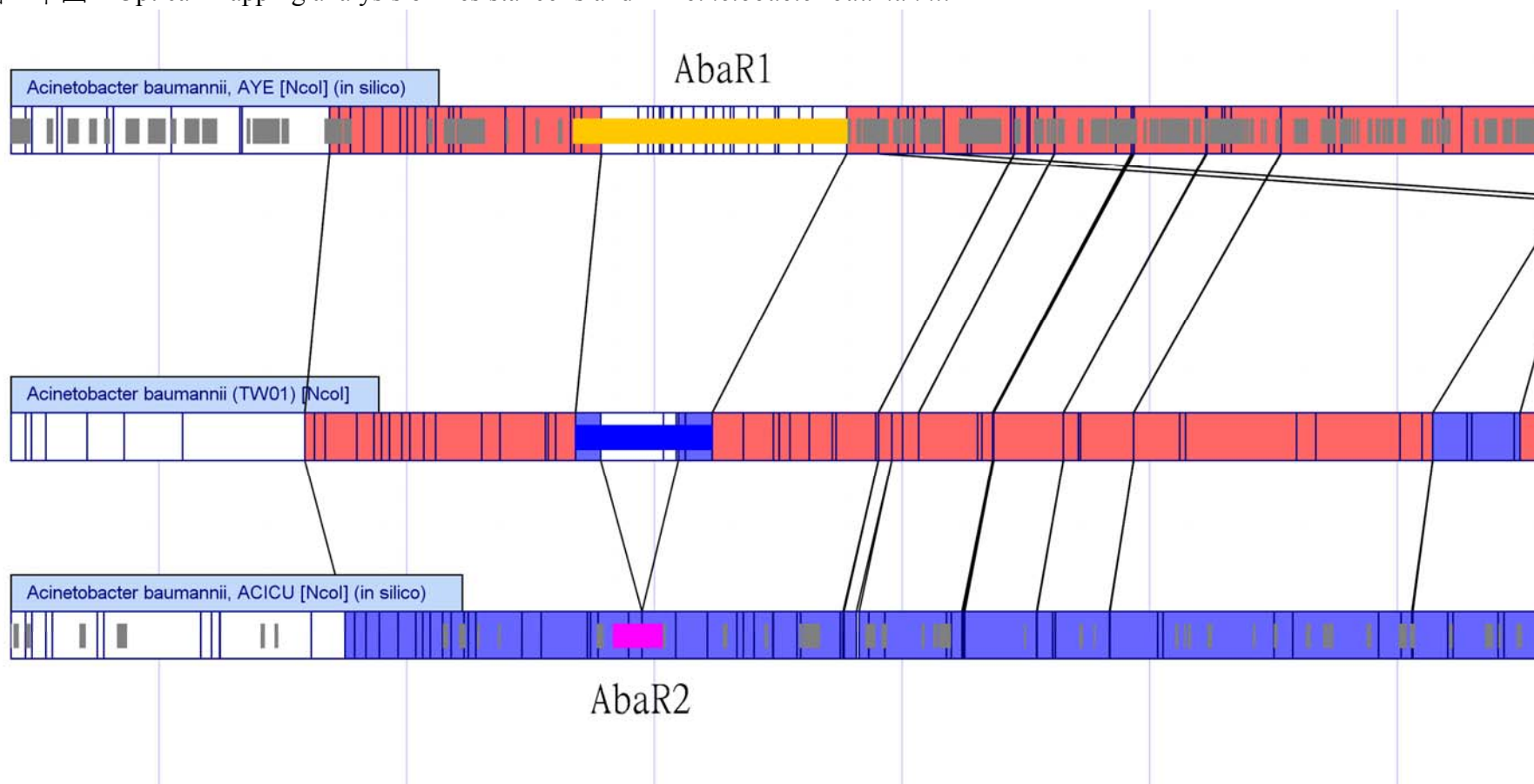
圖二十二、利用 PFGE-*BssHII* DNA 圖譜觀察 *C. parapsilosis* 微演化現象。*C. parapsilosis* 菌株分別採集自 P2 病人之尿液(A)、P31 病人之血液及 CVC(B)與 P42 病人之膽汁(C)。箭頭表示差異之條帶，星號為條帶位置之改變。



圖二十三、Optical Mapping analysis of *Acinetobacter baumannii*



圖二十四、Optical Mapping analysis of Resistance Island in *Acinetobacter baumannii*



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 論文十一篇(3 篇已發表，1 篇列印中，1 篇修改接受中，3 篇已投寄，2 篇投寄中，1 篇撰寫中)，專利一篇(申請中)。

1. Kuo-Wei Chen, Hsiu-Jung Lo, Yee-Chun Chen, **Shu-Ying Li*** (2008) MLST of *C. albicans* in Taiwan (in preparation)
2. Chung-Ter Huang, Mei-Hui Liao, **Shu-Ying Li*** (2009) *Mycoplasma pneumoniae* respiratory infections in Taiwan (submitting)
3. Ko-Chiang Hsia, Yu-Chi Lin, Yee-Chun Chen, Mei-Hui-Liao, **Shu-Ying Li*** (2009) Application of a microsphere-based array for rapid and simultaneous identification of nosocomial pathogens (submitting)
4. Mei-Hui Liao, Chiung-Yu Hung, Garry T. Cole, **Shu-Ying Li*** (2009) Application of a Multiplex Suspension Array for Rapid and Simultaneous Identification of Clinically Important Mold Pathogens. *J. Clin. Microbiol.* (submitted)
5. Yu-Chi Lin, Yee-Chun Chen, Wang-Huei Sheng, Shan-Chwen Chang, Ko-Chiang Hsia, **Shu-Ying Li*** (2009) Luminex for Multiplex Detection of Antibiotic-resistant Genes. *AAC* (submitted)
6. Yee-Chun Chen, Yu-Hsin Lin, Hsiao-Hui Chou, Kuo-Wei Chen, **Shu-Ying Li*** (2009) Molecular Epidemiology and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. parapsilosis* in Taiwan. (submitted)
7. Yu-Chi Lin, Ko-Chiang Hsia, Yee-Chun Chen, Wang-Huei Sheng, Shan-Chwen Chang, Mei-Hui Liao, **Shu-Ying Li*** (2009) Identification of fluoroquinolones, aminoglycosides, cephalosporins, and carbapenemases resistant genes in *Acinetobacter* spp. in Taiwan. *AAC* (revised, Impact factor:4.39, Ranking *Microbiol.* 15/94, 16.0%)
8. Yu-Chi Lin, Wang-Huei Sheng, Yee-Chun Chen, Shan-Chwen Chang, Ko-Chiang Hsia, **Shu-Ying Li*** (2009) The differences in carbapenem-resistant genes among *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* genospecies 3 and *Acinetobacter* genospecies 13TU in Taiwan *IJAA* (in press, Impact factor:3.067, Ranking *Microbiol.* 26/91, 28.5%, *Infectious Diseases* 17/51, 33.3%)
9. **Shu-Ying Li**, Yun-Liang Yang, Yu-Hsin Lin, Hui-Ching Ko, An-Huei Wang, Kuo-Wei Chen, Chih-Wei Wang, Hsin Chi, Hsiu-Jung Lo* Tsary Hospitals (2009) Two Dominant Diploid Sequence Types of *Candida tropicalis* Isolates with Reduced Susceptibility to Fluconazole in Taiwan from 1999 to 2006. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology & Disease.* 15(3):205-10, 2009 Sep (Impact factor:1.8, Ranking *Infectious Disease* 58/91, 63.7%).

10. Kuo-Wei Chen, Yee-Chun Chen, Yu-Hsin Lin, Hsiao-Hui Chou, **Shu-Ying Li*** (2009) The molecular epidemiology of serial *Candida tropicalis* isolates from ICU patients as revealed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis Infect. Genetic Evolut. 9 (5) 912-920 (Impact factor:2.792, Ranking Infectious Diseases 20/51, 39.2%)
11. Wang-Huei Sheng, Yu-Chi Lin, Jann-Tay Wang, Yee-Chun Chen, Shan-Chwen Chang, Ko-Chiang Hsia, Rwei-Jiuan Wu, **Shu-Ying Li*** (2009) Detection of *Acinetobacter* spp. with distinct Fluoroquinolone Resistance by Real-Time PCR. Mol. Cel. Probe 23 (3-4) pp. 154-156 (Impact factor:2.196, Ranking Biotechnol. 64/144, 44.4%)

專利申請

1. 李淑英, 林鈺棋, 以流式微珠陣列法快速鑑定不動桿菌種類之方法, (專利申請中), 申請日期96年11月, 申請案號 96----