

計畫編號：DOH91-DC-1025

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

病原真菌型別分析技術之研發與應用

研究報告

執行機構：台灣大學植物病理學系

計畫主持人：劉 瑞 芬

研究人員：李淑英、張綠萍

執行期間：91年2月8日至91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

摘 要

近年來由於免疫缺損病患的增加，伺機性真菌感染有逐漸增加之趨勢，其中念珠菌 *Candida albicans* 是造成一般醫院內感染最常見的菌種。在正常情形下，*C. albicans* 可存在於腸胃道、女性生殖道與口腔，是人體常見的共生菌，一旦個體免疫力衰退時，即可能進行侵襲性感染，造成相當高之死亡率。為了瞭解台灣各地區引發念珠菌感染症之菌系的特性及其存在情形，並進一步探討念珠菌遺傳變異與地理分佈及菌株抗藥性等因子間可能存在之相關性，我們以脈衝電泳建立念珠菌型別分析技術。念珠菌 DNA 經脈衝電泳分析及 ethidium bromide 染色之後，主要可觀察到 8 個條帶(7+R)，而且個別分離株間確實存在著 karyotype 多型性，不過僅依據念珠菌染色體 DNA 在脈衝電泳膠之泳動情形有時候並不足以提供充分訊息以進行念珠菌分型，因此我們更進一步建立 *Sfi* I-限制片段長度多型性分析技術。以 *Sfi* I 酵解 DNA 後再進行脈衝電泳分析(*Sfi* I-RFLP)所呈現之圖譜較為複雜，可提供之訊息也較為豐富明確，後續再根據電泳圖譜進行群叢分析，即可了解台灣臨床上引起感染症之念珠菌菌系之特性及其基因型與地理分佈、抗藥性等可能存在之相關性。目前已完成分析之菌株共 60 株，分析結果顯示一部份菌株之 *Sfi* I-RFLP 圖譜確實與其他菌株呈現顯著差異，這類遺傳變異之存在情形及其所代表之意義可望在完成全程計畫後得到解答。

關鍵詞：念珠菌、分子型別分析、脈衝電泳、*Sfi* I-限制片段長度多型性

Abstract

The yeast *Candida albicans* is usually a harmless colonizer of mucosal surfaces in healthy people. However, in immunocompromised patients, especially those infected with the human immunodeficiency virus (HIV), it can cause superficial as well as life-threatening systemic infections. To characterize *C. albicans* populations present in Taiwan, to delineate strain relatedness, and to monitor the emergence of drug-resistant strains, *C. albicans* isolates were collected from different areas of Taiwan and analyzed by electrophoretic karyotyping and *Sfi* I-restriction fragment length polymorphism (*Sfi* I-RFLP), which have been demonstrated to be useful tools for the delineation of *C. albicans* strains. Thus far, a total of 60 isolates have been analyzed by both methods. The DNA patterns obtained by electrophoretic karyotyping revealed the presence of eight chromosomes (7 + R) in *C. albicans* as well as karyotype polymorphisms among isolates. Analysis by *Sfi* I-RFLP, on the other hand, revealed more complicated DNA patterns feasible for cluster analysis and provided a more discriminatory method than electrophoretic karyotyping. Significance of *Sfi* I-RFLP as revealed by the analysis of Taiwanese isolates awaits further investigation.

Key words: *Candida albicans* · molecular typing · pulsed-field gel electrophoresis · *Sfi* I-RFLP

前 言

念珠菌是一種伺機性感染病原菌，在正常情形下可存在於口腔、腸胃道與女性生殖道，是人體常見的共生菌，但個體免疫力一旦衰退時，即可能造成侵襲性感染，常造成相當高之死亡率，是非常重要的病原真菌 (Fisher and Hutwagner, 1995; De Backer *et al.* 2000)。為了探討念珠菌感染症之流行病學，以便瞭解念珠菌菌系之特性、感染途徑及念珠菌感染症之發生情形，目前已有多種型別分析(typing)方法被開發出來，包括菌落型態、血清型，同功異構酶圖譜、毒素感受性、及抗藥性分析等，但這些方法可區分之型別較少，所能提供之訊息也相當有限 (Soll, 2000)。隨著分子生物技術之發展，近年來也有多種核酸標記被開發出來，包括脈衝電泳分析 (Diaz-Guerra *et al.* 1997; Espinel-Ingroff *et al.* 1999; Shin *et al.* 2001)、*Not I*- 或 *Sfi I*-限制片段長度多型性 (Dib *et al.* 1996)、以重複性序列27A或Ca3為探針進行DNA指紋分析(Scherer and Stevens, 1988; Schmid *et al.* 1990)，及進行特定核酸序列之分析及比對(Biswas *et al.*, 2001; Bougnoux *et al.*, 2002)等；其中應用最為普遍者為以脈衝電泳進行念珠菌染色體組分析(electrophoretic karyotyping) (Klempp-Selb *et al.*, 2000; Chen *et al.* 2001)及以Ca3為探針進行DNA指紋分析(Soll, 2000; Blignaut *et al.*, 2002; Pujol *et al.*, 2002)。這些方法可應用於鑑定臨床上引起嚴重感染的念珠菌菌系之特性、追蹤及分析念珠菌感染症之發生情形、進行念珠菌抗藥性相關研究及建立念珠菌型別資料

庫，是進行念珠菌感染症流行病學相關研究時不可或缺的重要工具 (Bart-Delabesse *et al.* 1995; Bernardis *et al.* 1999; Leung *et al.* 2000; Blignaut *et al.* 2002)。近幾年來，念珠菌已逐漸成為台灣重要病原菌，但我們對於臨床上引起嚴重感染的念珠菌菌系在台灣之存在及分佈情形所知十分有限，更遑論進一步追蹤念珠菌感染途徑及探討其抗藥性、致病性等問題。有鑑於此，我們擬以脈衝電泳及DNA指紋分析建立念珠菌型別分析技術，以便探討臨床上引起嚴重感染症的念珠菌菌系之基因型特性，並建立本地念珠菌型別資料庫，這些資訊可望提供作為疾病管制單位掌控本地念珠菌感染症疫情之重要參考。

材料與方法

菌株來源、培養與保存

本研究所使用之念珠菌(*C. albicans*)菌株主要由羅秀容博士(國家衛生研究院)提供。念珠菌之培養使用 YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)培養基，培養溫度為30 °C；進行長期保存時，於念珠菌培養液加入20% glycerol 混合均勻後，放置於-80 °C 冷凍櫃保存。

以脈衝電泳進行念珠菌 karyotype 分析

脈衝電泳分析主要參照 Espinel-Ingroff *et al.* (1999)所描述之方法，再加以適當修改後進行：念珠菌以 YPD 培養基放置於 30 C°培養 18 小時後，離

心收集菌體(3,000 xg, 5 min), 並以 1X PBS [0.01 M phosphate buffer (pH 7.4), 0.85% NaCl]清洗 2 次。之後, 將所收集之菌體懸浮於 cell suspension buffer [100 mM Tris (pH 8.0), 100 mM EDTA]、計算細胞密度, 再取適當數量之念珠菌製備 agarose plugs。製備 agarose plugs 時, 在念珠菌懸浮液加入等體積之 2% low-melting agarose (70 C°), 混合均勻後注入膠模。待凝固好之後, 將 agarose plugs 放置於 lysis buffer [10 mM Tris (pH 7.4), 0.45 M EDTA (pH 8.0), 1% N-lauroylsarcosine, 1% SDS, 1mg/ml Proteinase K]作用 4 小時(30 C°)。Agarose plugs 最後以 ET buffer [1 M Tris, (pH 8.0), 50 mM EDTA]清洗 4 次, 即可以進行脈衝電泳分析。脈衝電泳分析將以脈衝電泳機組 Biometra Rotaphor Type V 進行(0.8% Seakem Gold agarose in 0.5x TBE, 進行電泳分析時所設定之條件為: 120V with switch time of 60''~500''/ 120 °/14 C°/ 48 hr), 瓊脂膠體經 ethidium bromide 染色後即可觀察念珠菌之 electrophoretic karyotype。

***Sfi* I-限制片段長度多型性分析**

依前述步驟(1)~(5)製備好 agarose plugs 後, 以 TE buffer [1 M Tris, (pH 8.0), 50 mM EDTA, 另加入 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride)進行漂洗, 再將 agarose plugs 放置於 *Sfi* I restriction buffer, 放冰中平衡 30 min。之後, 加入適量 *Sfi* I, 放置於 37 C°作用隔夜。Agarose plugs 最後以 TE buffer 清

洗，即可以依前述方法進行脈衝電泳分析。

結果與討論

以脈衝電泳分析念珠菌染色體組(electrophoretic karyotyping)

本計畫第一年度之工作主要在建立以脈衝電泳技術分析念珠菌(*C. albicans*) karyotype 之方法。這項技術過去幾年來常被用於進行念珠菌型別分析，而且目前已發表文獻幾乎都是使用 Bio-Rad DRII 或 DRIII 脈衝電泳系統。由於我們只能借到一部 Biometra Rotaphor Type V 脈衝電泳分析儀，因此首先面對的問題是針對這一套脈衝電泳系統建立合適之電泳分析條件。經過多次嘗試之後發現，以 0.8% Seakem Gold agarose (in 0.5x TBE) 在 120V (with pulse intervals ranging from 60 sec. to 500 sec, at an angle of 120 °C) 進行 48 小時電泳分析之後可以得到相當好的 DNA 分析效果；由 Fig.1 之 gel pattern 可看出，用來當 size marker 的真菌染色體 DNA (chromosomal DNA of *Hansenula wingei*) 一共七個條帶都被清楚解析出來，其中泳動速率最慢的 DNA 之長度為 3.13 Mb，膠體最下方、泳動速率最快的 DNA 為 1.05 Mb。

念珠菌 DNA 經脈衝電泳分析，並進行 ethidium bromide 染色之後，主要可觀察到 7 個條帶，由膠體上方至下方分別編號為 1~7 (Fig. 1)，大小在 1~ 3.2 Mb 之間；一部分菌株在第一號條帶上方或第一號與第二號條帶之間

還出現一個條帶，這可能是一般稱為“chromosome R”之染色體(R1 或 R2)，其為念珠菌帶 ribosomal DNA 之染色體，由於長度迭有變異，在進行脈衝電泳分析時可能出現在第一號條帶上方或下方，也可能與第一號條帶出現在同一個位置，因此一般進行染色體組多型性分析時並不納入考量(Wickes *et al.*, 1990; Magee *et al.* 1992)。此外，有些菌株在第七號條帶下方還出現一個條帶(data not shown)，一般稱為 snc, the supernumerary chromosome。

在進行念珠菌 karyotype 多型性分析時，主要根據上述染色體 DNA 之存在情形及其在脈衝電泳膠之泳動速率加以分型；一般而言，DNA 長度之差異超過 10 kb 時，泳動速率就會顯出差異。Fig. 1 所示為念珠菌菌株編號 1-10 經脈衝電泳分析後所呈現之 karyotype，可清楚看出念珠菌跨菌株間 DNA 泳動速率之變化主要發生於第三至第七個 DNA 條帶，其中惟有 lanes 3 與 4 之 band pattern 可確切視為同一型，其他菌株在第五至七個 DNA 條帶之泳動速率互有差異，顯示念珠菌之分離株間確實存在著 karyotype 多型性，不過僅依據染色體 DNA 在脈衝電泳膠之泳動情形有時候並不足以提供充分訊息以進行念珠菌分型，因此我們更進一步建立 *Sfi* I-限制片段長度多型性分析技術。

***Sfi* I-限制片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, *Sfi* I-RFLP)**

在進行 RFLP 分析時，得先以限制酶 *Sfi* I 進行念珠菌 DNA 酵解，目前已被使用過的限制酶包括 *Not* I，*Bss*H II，及 *Sfi* I。由於 *Sfi* I 之前曾被用於建構念珠菌之 *Sfi* I macrorestriction map (Chu *et al.*, 1993)，而且單位價格較為便宜，我們選擇以 *Sfi* I 進行 RFLP。念珠菌(菌株編號 1-10, 與 Fig. 1 所分析者一樣)經 *Sfi* I-RFLP 分析後所得到之脈衝電泳圖譜如 Fig. 2 所示，這裏所設定的電泳條件為：120 V with switch time ranging from 5 sec to 65 sec/ 24 hr/ 14°C。由 Fig.2 可發現由於經 *Sfi* I 酵解之 DNA 長度比染色體 DNA 短，以脈衝電泳進行分析所需時間較短(48 hr vs. 24 hr)，呈現之 gel pattern 也比較平整、易於判讀，圖中還有少數 DNA 片段之亮度顯得比其他片段強，這可能是因為有長度相近的 DNA 片段出現在同一個位置所造成的結果。此外，由 Fig. 2 之結果也可以清楚的看出，在所分析的菌株中除了 lanes 3 and 4 之 band pattern 完全相同之外，其他菌株彼此之間都有些微差異。因此，*Sfi* I-RFLP 可提供之訊息應比 electrophoretic karyotyping 還要明確。不過，由目前之 gel pattern 看來，在電泳膠最上方之大片段 DNA 之解析情形其實還不夠理想，因此，我們另外試了一些電泳條件。Fig. 3 及 4 所示為念珠菌菌株編號#13 ~ #24 (Fig. 3)及 #21~#32 (Fig. 4)在不同電泳條件下所呈現之 *Sfi* I-RFLP 圖譜；由 DNA 圖譜看來，switch time 設定在 5 sec ~95 sec，電泳時間設定為 28 h 時，大片段 DNA 之解析效果確實比 Fig. 2 (switch time: 5 sec~

65 sec; 24 h)或 Fig. 4 (switch time: 5 sec~85 sec; 28 h)所呈現者還要好;以 Fig. 3 所設定之條件(switch time: 5 sec~95 sec; 28 h)再進行其他菌株(#49~#60)之分析也可獲得相當好之解析效果(Fig. 5),故此條件將設定為本研究進行念珠菌 *Sfi* I-RFLP 分析時之標準條件。至於在 Fig. 3 之 lanes 2, 7 和 12 所看到的 DNA smear, 應是操作過程中有 DNase 污染所致, 可全力避免。

由目前已獲得之分析結果看來,一部份菌株之 *Sfi* I-RFLP 圖譜確實與其他菌株呈現顯著差異,不過這類遺傳變異之存在情形及其所代表之意義將待分析完成全部菌株之分析後再一併討論,以免失之偏頗。另外值得一提的是,微生物型別分析技術種類繁多,而且由於各項技術所分析之標地不一樣,其所能提供之訊息也不盡相同,因此在進行念珠菌之型別分析工作時,最好能同時採用至少兩種方法(Dib *et al.* 1996; Diaz-Guerra *et al.*, 1997; Espinel-Ingroff *et al.*, 1999)。此外, electrophoretic karyotyping 與 *Sfi* I-RFLP 雖是過去十年來進行念珠菌相關研究時應用最為普遍的型別分析技術,國際間尚無任何學術團體有系統地建構念珠菌之 electrophoretic karyotype 或 *Sfi* I-RFLP 資料庫,這一方面之不足或可藉近年來常被採用的 Ca3 DNA 指紋分析技術加以補強(Soll, 2000)。

結論與建議

本計畫今年度之工作主要在建立以 electrophoretic karyotyping 及 *Sfi* I-RFLP 建立念珠菌型別分析技術，由分析結果看來，*Sfi* I-RFLP 可提供之訊息顯然比 electrophoretic karyotyping 豐富、明確，而且所需電泳時間較短，在時間成本之考量上也提供了相當的誘因。因此在對所收集之菌株進行全面分析時，我們決定採用 *Sfi* I-RFLP，後續並將進一步根據 *Sfi* I-RFLP 圖譜進行群叢分析(cluster analysis)，以了解台灣臨床上引起感染症之念珠菌菌系之特性及其基因型與地理分佈、抗藥性等可能存在之相關性。

參考文獻

1. Bart-Delabesse E, van Deventer H, Goessens W, Poirot JL, Lioret N, van Belkum A, and Dromer F: Contribution of molecular typing methods and antifungal susceptibility testing to the study of Candidemia cluster in a burn care unit. *J Clin Microbiol* 1995;33:3278-83.
2. Blignaut E, Pujol C, Lockhart S, Joly S, and Soll DR: Ca3 fingerprinting of *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive and healthy individuals reveals a new clade in South Africa. *J Clin Microbiol* 2002;40:826-36.
3. Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C: Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2002;40:1290-7.
4. Chen, YC, Chang SC, Tai HM, Hsueh PR, Luh KT: Molecular epidemiology of *Candida* colonizing critically ill patients in intensive care units. *J Formos Med Assoc* 2001; 100:791-7.
5. Chu WS, Magee BB, Magee PT: Construction of an *Sfi* I macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J Bacteriol* 1993;175:6637-51.
6. De Backer MD, Magee PT, and Pla J: Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:463-98.
7. Diaz-Guerra TM, Martinez-Suarez JV, Laguna F, Rodriguez-Tudela JL: Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis. *J Clin Microbiol* 1997;35:856-61.
8. Dib JC, Dube M, Kelly C, Rinaldi MG, Patterson JE: Evaluation of

- pulsed-field gel electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*: Comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms. J Clin Microbiol 1996;34:1494-6.
9. Espinel-Ingroff A, Vazquez JA, Boikov D, Pfaller MA: Evaluation of DNA-based typing procedures for strain categorization of *Candida* spp. Diag Microbiol Inf Dis 1999;33: 231-9.
 10. Fisher HSP, and Hutwagner L: Opportunistic candidiasis: an epidemic of the 1980s. Clin Infect Dis 1995;21:897-904.
 11. Klempp-Selb B, Rimek D, and Kappe R: Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* from patients with *Candida* sepsis. Mycoses 2000;43:159-63.
 12. Leung WK, Dassanayake RS, Yau JYY, Jin LJ, Yam WC, and Samaranayake LP: Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. J Clin Microbiol 2000;38:2219-26.
 13. Magee PT, Bowdin L, and Staudinger J: Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1992;30:2674-79.
 14. Pujol C, Pfaller M, Soll DR: Ca3 fingerprinting of *Candida albicans* bloodstream isolates from the United States, Canada, South America, and Europe reveals a European clade. J Clin Microbiol 2002;40:2729-40.
 15. Scherer S, and Stevens DA: A *C. albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:1452-6.
 16. Scherer S and Stevens DA: Application of DNA fingerprinting methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. J Clin Microbiol 1987;25:675-9.

- 17.Schmid J, Voss E, and Soll DR: Computer-assisted methods for assessing strain relatedness in *Candida albicans* by fingerprinting with the moderately repetitive sequence Ca3. J Clin Microbiol 1990;28:1236-43.
- 18.Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, and Ryang DW: Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parasilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. J Clin Microbiol 2001;39:1258-63.
- 19.Soll DR: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev 2000;13:332-70.
- 20.Wickes, B, Staudinger J, Magee, BB, Kwon-Chung KJ, Magee PT, and Scherer S: Physical and genetic mapping of *Candida albicans*: several genes previously assigned to chromosome 1 map to chromosome R, the rDNA-containing linkage group. Infection and Immunity 1990;59: 2480-4.

圖 說

Fig. 1 Electrophoretic karyotypes of *Candida albicans* isolates. Chromosomal DNA of *C. albicans* isolates (#1 to #10) was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis at 120 V with switch time ranging from 60 sec to 500 sec for 48 hr. M: Chromosomal DNA of *Hansenula wingei* was used as the size marker.

Fig. 2 *Sfi* I-RFLP analysis of *Candida albicans* isolates. After digestion with *Sfi* I, DNA of *Candida albicans* isolates (#1 to #10) was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis at 180 V with switch time ranging from 5 sec to 65 sec for 24 hr. M: Chromosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae* was used as the size marker.

Fig. 3 *Sfi* I-RFLP analysis of *Candida albicans* isolates. After digestion with *Sfi* I, DNA of *Candida albicans* isolates (#13 to #24) was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis at 180 V with switch time ranging from 5 sec to 95 sec for 28 hr. M: Chromosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae* was used as the size marker.

Fig. 4 *Sfi* I-RFLP analysis of *Candida albicans* isolates. After digestion with *Sfi* I, DNA of *Candida albicans* isolates (#21 to #32) was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis at 180 V with switch time ranging from 5 sec to 85 sec for 28 hr. M: Chromosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae* was used as the size marker.

Fig. 5 *Sfi* I-RFLP analysis of *Candida albicans* isolates. After digestion with *Sfi* I, DNA of *Candida albicans* isolates (#49 to #60) was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis at 180 V with switch time ranging from 5 sec to 95 sec for 28 hr. M: Chromosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae* was used as the size marker.