

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000404

衛生福利部疾病管制署 104 年科技研究計畫

真菌及特殊病原菌檢驗、監測與流行病學研究

年度研究報告

執行機構：行政院衛生福利部疾病管制署

計畫主持人：李淑英

研究人員：李淑英、廖美惠、陳國緯、施苡亘、林芷羽、陳育辰

執行期間：104 年 1 月 1 日至 104 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

計畫摘要	1
一、中文摘要.....	1
二、Abstract.....	4
本文	6
一、前言	6
二、材料與方法	14
三、結果.....	21
四、討論.....	30
五、結論與建議	33
六、計畫重要研究成果及具體建議	34
七、參考文獻.....	36
八、圖與表.....	41
附錄一：圖表目錄.....	57

計畫摘要

一、中文摘要

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

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

本研究計畫為期五年(102-106 年)，旨在建立參考實驗室，提供鑑定服

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

我們的主要進展有七：**第一**、發展可單管同時偵測麴菌、鐮胞菌、青黴菌、接合菌等26種臨床重要絲狀真菌的微珠陣列如 *Aspergillus* spp. , *Fusarium* spp. , *Mucor* spp. , *Rhizopus* spp. , *Coccidioides* spp. , *Rhizomucor pusillus* , *Penicillium marneffeii* , *Paecilomyces javanicuss* , *Saksenaea vasiformis* , *Apophysomyces elegans* , *Absidia corymbifera* 和 *Syncephalastrum racemosum* 。此方法特異性高，僅 *Mucor racemosus* (Murac)的探針會與 *Mucor hiemalis* 和 *Mucor ramosissimus* 交叉反應。敏感度為 100 fg ~ 1 ng、模擬血液檢體檢測敏感度為 10² cells/ ml。整個流程包含核酸增幅可於5小時內完成。**第二**、開發偵測臨床重要酵母菌和絲狀真菌的real-time PCR 檢測方法。整合應用微珠陣列和 real-time PCR檢測方法，應用於血液腫瘤病人及小兒感染檢體等高危險族群之偵測。**第三**、建立高病原性輸入性雙型性真菌之檢驗方法。**第四**、由臨床病理學及對抗生素抗藥性的特性從2002-2015 分析 14 株 *Nocardia brasiliensis* 的分子流行病學，以gyrB 是當中最具有鑑別力，且可區分出病患是否為具淋巴結炎。以及區分是否具

有高的 imipenem MIC 值。**第五**、由臨床病理學及對抗生素抗藥性的特性從 2011-2015 分析 39 株 *Staphylococcus lugdunensis* 的分子流行病學。**第六**、*Candida albicans* MALDI-TOF 與 MLST 分型並無明顯的關聯性。**第七**、新型隱球菌檢驗品質系統通過全國認證基金會(TAF)ISO 15189 醫學實驗室認證。

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

二、Abstract

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

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

This research is aiming at developing rapid species identification method, standardized typing methods, systematically collect more domestic and international isolates, integrate clinical, epidemiological data with typing data to establish a database. Identify significant clonal clusters and explore the specific differences at molecular levels. We also try to study the resistance and resistance mechanisms to have more scientific impact. Our major findings can be summarized into 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 javanicus*, *Saksenaea vasiformis*, *Apophysomyces elegans*, *Absidia corymbifera*, and *Syncephalastrum racemosum*. Twenty-three oligonucleotide probes were

designed based on the internal transcribed spacer(ITS2)region for species level identification of molds. No cross-reactivity was identified except for probes of *Mucor racemosus* (Murac)which cross react with *Mucor hiemalis* and *Mucor ramosissimus*. The sensitivity of MSA is 100 fg to 1 ng and 10^2 cells/ml in simulated blood specimens. The whole procedure can be finished within 5 hours. **Secondly**, we have developed real-time PCR detection methods for clinically important yeast and mold pathogens and integrated the beads array and real-time detection methods and applied in the detection of various specimens from high-risk groups such as hematological and neonatal patients. **Thirdly**, we have set up diagnostic methods for high-pathogenic imported dimorphic fungi. **Fourthly**, we set up typing scheme for *Nocardia brasiliensis* and conduct its molecular epidemiology study. **Fifthly**, we carry out the molecular epidemiology study of *Staphylococcus lugdunensis* in Taiwan. **Sixthly**, MALDI-TOF is not associated to MLST in *Candida albicans*. **Seventhly**, quality system for cryptococcal antigen test has accredited to ISO 15189 by the Taiwan Accreditation Foundation (TAF) ◦

We will establish a fungal reference laboratory in Taiwan. Our research results and typing data will be feedback to clinicians for refining their therapy regimen and collaborate to establish databases integrating typing results with clinical and epidemiological data.and provide research findings to control divisions for fine-tuning of their control strategies. Our 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，使得侵襲性真菌感染造成接受癌症或器官移植的患者免疫抑制的化療和免疫缺損病患族群造合併症 (morbidity) 及死亡 (mortality) 的主要原因¹⁻⁵，並持續成為公衛上的隱憂⁶⁻¹⁰。除了上述主要為院內感染案例外，病原真菌在社區對於健康個體之威脅性亦與日俱增。例如，肇因於都市發展、人口遷移及環境之變遷、地震等天災及氣候之異象，助長了真菌如 *coccidioidomycosis*^{11, 12}、*histoplasmosis*¹³⁻¹⁵ 及 *blastomycosis* 等雙型性高致病性真菌之感染趨勢¹⁶。新興真菌的崛起¹⁷、社區病感染的增加及抗真菌藥物菌株的浮現更增加問題的棘手性。而這些新興及社區感染病原真菌其流行傳播途徑不明、好發危險因子及抗藥性特性有待釐清。真菌的感染加長了住院期，並增加醫療花費成本，這是由於患者住院期長，且抗真菌用藥價昂。未來費用可能隨著更昂貴藥物的出現而更形增加^{18, 19}。影響真菌感染的二個里程碑，一個為強效抗愛滋療法 (HAART，即俗稱的雞尾酒療法)，的出現及普及；其二為 *fluconazole* 之上市問世。這固然稍有阻遏了病原真菌感染竄升之趨勢，然而感染流行病學卻以另一面貌出現，例如抗 *fluconazole* 的非 *albicans* 的念珠菌有逐年增加的趨勢。因此有必要建立監測網，並發展快速及精確的鑑定病原種別，協助釐清感染源，進而落實公衛防治措施。依據 TNIS 本署資料從 2005 至 2013 年醫學中心加護病房常見之醫療照護相關感染菌種排名如圖一。*Candida species* 排名由 2005 年的第 7 名，之後於 2007 至 2013 年始終維持在第 1 名。

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

blastomycosis 等雙型性高致病性 BSL3 真菌病原流行區。依據美國 NETSS (National Electronic Telecommunications System for Surveillance) 電子監測系統結合地理資訊系統及氣象資訊，分析 1998-2001 年資料顯示近來 coccidioidomycosis 有顯著增加之趨勢，並因氣候異象常見於冬季爆發感染，並分別有在鳳凰城及 65 歲以上老人聚集之流病特性¹¹。Coccidioidomycosis 曾見在建築工地²⁰或在考古隊挖掘洞穴時¹²因灰塵揚起而爆發感染，或因國際運動賽事，選手於疫區感染返國後各自紛紛發病²¹。Histoplasmosis 在因整建曾為鳥類棲息地的工程中灰塵揚起，而爆發此鄰該工地操場教室的學生流行感染¹³；亦有因探索蝙蝠洞穴接觸塵土而爆發感染¹⁴；或有至南美洲旅遊旅客感染²²。Promed 亦有英國熱帶醫學專家報導最近爆發由來自各國（英國、澳洲、瑞士、荷蘭、瑞典、波蘭、南非、馬達加斯加）組成大學生生態研究團隊，至肯亞因暴露到蝙蝠棲息過的腐敗樹幹，截至 201109 調查已知 24 中至少有 8 人回國後因 histoplasmosis 發病 (<http://www.promedmail.org> 7 Sep 2011 Cottle et. al.)。國人國際經商旅遊頻繁，遊蹤遍佈全球各地，對於返國旅客發病之鑑別診斷，尤其是去過流行地區之國人，也應將上述病原列為考慮之中²³。以日本為例，基於日本在南美經貿觀光活躍，移民者眾，近十餘年來其返國僑民之 coccidioidomycosis 及 histoplasmosis 等報告病例有逐年上升之趨勢。質是之故，日本早在 1990 年代已將二者列為法定報告傳染病。鑑於我國與日本國情近似，台灣亦應就這類疾病之診斷及分子流行病學等及早建立預應機制。

路鄧葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)在人體皮膚共生並經常導致皮膚和軟組織感染^{24, 25}。在凝固酶陰性葡萄球菌(CNS)中它是毒性最強的，致病性和毒力類似於金黃色葡萄球菌^{25, 26}。近日，已經越來越多地報導路鄧葡萄球菌感染導致嚴重高侵襲性感染且死亡率高，如骨髓炎，關節炎，

腦膜炎，菌血症，敗血症和心內膜炎等^{25,26}。

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²⁷。早期及正確的診斷有助於病害診療及防治^{28,29}。真菌種類繁多可大分為酵母菌及黴菌兩類，而會引起疾病的真菌大約在 100-200 種。一般較常見的人類致病菌包括 *Candida* spp. 如 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, 和 *C. glabrata* 以及 *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., *A. fumigatus* 及 *A. niger* 等。病原真菌之傳統鑑別診斷方法如用 SDA、BHI、CHROM agar 培養及染色法如用 KOH、India Ink³⁰，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³¹，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³²。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³³。例如，利用樹脂凝集試驗法(LA)檢測 *C. neoformans* 抗原³⁴，以三明治酵素免疫反應(EIA)³⁵，免疫螢光染色(IF)³⁶ 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³⁷。

目前應用在 *Aspergillus* 類的 POC 檢測方法，例如 immuno-chromatographic lateral-flow device(LFD) 是一種利用 *Aspergillus*-specific MAb 做檢驗偵測 Invasive aspergillus(IA)³⁸。目前應用在

candida 類的 Vaginal Yeast Test，POC 檢測方法，例如 Savvycheck rapid yeast test³⁹。

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^{29, 40}。以 PCR 配合酵素免疫檢測法 EIA 或 RFLP 技術^{41, 42}以及核酸雜合法^{43, 44}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*⁴⁵之文獻。此外如應用在 *Aspergillus* spp.⁴⁶，*Candida* spp.⁴⁷，*C. neoformans*⁴⁸，*Penicillium marneffeii* 及重要的雙型性酵母菌⁴⁹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⁵⁰。吾人日前發展出可鑑定7種臨床上常見真菌種別之 PCR-EIA⁵¹。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^{52, 53}，針對基因標的為 ITS2 或 large subunit ribosomal DNA，可鑑定臨床重要真菌^{54, 55}。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⁵⁶。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⁵⁷。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⁵⁸，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⁵⁹。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⁶⁰。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⁶¹、*Malassezia* species⁶²種別及 *Cryptococcus neoformans* 種群鑑定⁶³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⁶⁴及 9 種臨床常見及 6 種罕見之子囊酵母菌的 Luminex 技術⁶⁵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⁶⁶。這類技術對於防疫檢驗上甚感棘手的未知病原檢體之檢驗，或許亦可提供部分解決之道。國內晶片技術平台經數年研發以來，各種 macro-/microarray 乃至

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

各種分子分型(molecular typing)的方法應運而出，除了有助於種別鑑定、病原性、傳播途徑、院內感控、療效追蹤、菌株消長⁶⁷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⁶⁸。針對基因序列分型的 rDNA 序列，分析比對新型隱球菌的 ITS1-5.8S-ITS2 region 序列中的八個位置的核苷酸(10, 11, 15, 108, (ITS1), 221(5.8S), 298, 346(ITS2)可將新型隱球菌三個變種(varieties)分成 7 個 type(type 1~7)⁶⁹，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)⁷⁰。*C. albicans* 以 25S rRNA 基因為標的進行 PCR 反應，依增幅產物片段大小可分為 genotype A(450 bp)，genotype B(840 bp)，genotype C(450 bp and 840 bp)，genotype E(1,400 bp)，*C. dubinienesis*(1,080 bp)⁷¹。2002 年法國學者倡議建立 MLST(multi-locus sequence typing)做為病原菌國際化比對的平台(<http://www.mlst.net>)。MLST 原理為針對 6-8 個約 500bp 的持家基因(house-keeping genes)定序，每一條不同(multi-antigen sequence typing)，砂眼披衣菌則可針對 omp1 變異區的 VS1-VS4 進行分型。每株菌株則依其這

些特定持家基因 locus 上 alleles 的組合樣式形成其特定的序列樣式 (sequence type, ST) 以茲比較。MLST 具有穩定、鑑別力高，利於實驗室間資料交換比對等優點⁷²，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⁷³。其他如針對重複性序列 DNA 的分析，如 rep-PCR⁷⁴ 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⁷⁵。

奴卡氏菌屬物種是革蘭氏和改良抗酸染色陽性，並且具有珠狀和絲狀分支形態。使用 16S rRNA 基因定序已確定 100 餘種諾卡氏菌物種。超過 30 種奴卡氏菌引起人類諾卡菌病和 actinomycetoma⁷⁶。隨著免疫功能低下的患者如 HIV / AIDS 的增加，奴卡氏菌感染已經被越來越多的報導。不同物種的患病率可根據不同的地理區域而變化。在美國和加拿大，新奴卡氏菌 (*Nocardia nova*) 是主要品種^{77,78}。在日本和泰國，星狀諾卡氏菌群 (*Nocardia asteroides* complex) 是先前最普遍的物種，現在則是 *Nocardia farcinica* 居首⁷⁹⁻⁸¹。在西班牙是 *N. cyriacigeorgica* 居冠，而在澳大利亞則是 *N. brasiliensis*^{82,83}。在台灣，早先是 *Nocardia asteroides* complex 引起全身皮膚感染為主。1986 年，*N. brasiliensis* 西北首次在台灣發現⁸⁴。現在台灣最普遍的奴卡氏菌依序為 *N. brasiliensis* (40-50%)，*N. cyriacigeorgica* 和 *N. farcinica*⁸⁵⁻⁸⁷。氣候可能是影響患病率和不同奴卡氏菌物種的地理分佈的因素之一。

目前，*N. brasiliensis* 佔了絕大部分皮膚感染⁸⁸⁻⁹⁰。皮膚表現包括膿皰，潰瘍，蜂窩組織炎，皮下膿腫，膿皮病，足菌腫和孢子絲菌樣淋巴皮膚感染症 (sporotrichoid lymphocutaneous)。奴卡菌病預後的嚴重程度依年齡，感染部位，局部或播散性形式，及宿主特性，如年齡，性別和潛在的疾病，

如，糖尿病，HIV malignancy或長期使用類固醇的存在而異。

路鄧葡萄球菌普遍對許多抗菌藥物呈現感受性。然而，在過去的二十年裡，青黴素抗性的速度不斷增加，且苯唑西林耐藥性出現已經成為一個主要關注的問題。在台灣北部，在凝固酶陰性葡萄球菌菌血症中路鄧葡萄球菌發生率被認為是0.87%且死亡率超過20%。10株（20.8%）分離株耐苯唑西林和8株金黃色葡萄球菌懷有第V型盒式染色體MEC（SCCmec）⁹¹。可用脈衝場凝膠電泳和AGR附屬基因分型分析路鄧葡萄球菌血症菌株表現型和基因型之關連性⁹²。

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

二、材料與方法

(一)、菌株來源及培養

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

絲狀黴菌共 52 株包括麴菌、鐮胞菌、青黴菌、接合菌標準菌株購買自生物資源保存及研究中心(表一)，*Exophiala dermatitidis*、*Sporothrix schenckii*、*Trichosporon asahii*、*Microsporium 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)。

侵襲性真菌症檢體收案標準為(1)病患年齡大於等於 18 歲者，(2)惡性血液病患，(3)發燒或有下情況 Neutropenia、GVHD 或長期使用 steroid 或 cyclosporine 且接受抗生素治療之病患。2011 年-2015 年收集自台大醫院及高雄醫學大學附設醫院 319 位血液腫瘤科病人共計 4,091 件檢體，其中 1,973 件(48.2%)為 blood，1,536 件(37.5%)為 gargling，574 件(14.0%)為 sputum，8 件(0.2%)為其他(支氣管沖洗液、肋膜液、肺水、肺沖洗液、肺泡沖洗液)。

真菌培養陽性之鼻咽拭子檢體收集自通報不明原因肺炎檢驗檢體，共計 207 件(*Candida albicans* 167 件，*Candida glabrata* 5 件，*Candida krusei* 1 件，*Candida parapsilosis* 2 件，*Candida tropicalis* 6 件，*Candida albicans* 及

Candida glabrata 12 件, *Candida albicans* 及 *Candida tropicalis* 10 件, *Candida glabrata* 及 *Candida tropicalis* 1 件, *Candida albicans* 及 *Aspergillus flavus* 2 件)。

奴卡菌菌株和路鄧葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)來源為與中山醫院皮膚科合作。

(二)、真菌分離株 DNA 的萃取

真菌分離株培養後用 PUREGENE DNA Purification Kit(Gentra, Minneapolis, Minnesota, USA)萃取 DNA。簡言之,在 SDA 上培養 2~3 天後,取兩個接種環的真菌量攪散於 2 ml PBS 內,加入 10-15 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。以以分光光度計測 DNA 的質量,後保存 -80°C。

(三)、咽喉拭子檢體 DNA 的萃取

鼻咽拭子檢體以 QIAamp Viral RNA Min Kit(QIGEN)依照試劑說明書

萃取 DNA。

(四)、流式微珠陣列檢測

1. 引子及探針之設計及合成

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

2. 真菌 ITS3 & ITS4 之聚合酶鏈反應(PCR)

以 ITS3(5' GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC 3')和 ITS4(5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3')引子對增幅 ITS2(internal transcribed spacer)區域，PCR 反應，總容積為 50 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. 鍵結固定化探針於微珠上

取 2.5×10^6 磁珠 (Luminex ， TX) ， 加入 50 μ l 0.1 M 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(MES)buffer pH 4.5(Sigma)與 1 mM 探針 oligonucleotide。序列的設計為在 5' amino 端加上 12-carbon linker。加入 3 μ 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 μ 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 μ l Tris-EDTA 回溶，置於 4 $^{\circ}$ C 暗房保存。

4. 增幅產物與探針專一性雜交

磁珠以 1.5X tetramethylammonium chloride(TMAC)solution(Sigma，St. Louis，MO)稀釋。TMAC solution 包含 4.5 M TMAC、0.15% Sarkosyl、75 mM Tris-HCl pH 8.0 與 6 mM EDTA(pH 8.0)。取 33 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 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，接著於 45 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 10 分鐘。最後將樣本分別加至 96 孔 ELIS A 盤，以 Bio-Plex 200 Suspension Array System(Bio-Rad Laboratories，Inc. Hercules，CA)檢測。螢光強度中位數值(Median fluorescent intensity，MFI)為測量 100 個訊號數值之中位數，再由 Bio-Plex Manager 4.1.1 軟體分析結果。

5. 流式微珠陣列檢測之靈敏度測試

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

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

1. 病原酵母菌持家基因及PCR條件

Candida albicans 選出七個 *AAT1a*、*ACC1*、*VPS13*、*MPIb*、*ADP1*、

ZWF1 及 *SYA1*。以 PTC-200 96-well thermal cycler(MJ Research)進行 PCR 反應。*C. albicans* 反應試劑包含 2 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 $^{\circ}$ C, 2 min denature, 接著進行 25 cycle 94 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 52 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 1 min 的反應, 最後為 72 $^{\circ}$ C, 10 min。*C. glabrata* PCR 反應容積為 20 μ l, 內含有 10 ng DNA、每種 primer 50 pmol、1.25U Taq DNA polymerase、5 μ l 的 10X buffer 及 200 μ M deoxynucleoside triphosphate。PCR 反應條件為 95 $^{\circ}$ C, 5 min denature, 接著進行 30 cycle 93 $^{\circ}$ C, 30S \rightarrow 依據增幅基因片段的的不同, 黏合溫度範圍從 50-57 $^{\circ}$ C 不等, 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 1 min 的反應, 最後為 72 $^{\circ}$ C, 4 min 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 $^{\circ}$ C, 7 min denature, 接著進行 30 cycle 94 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 52 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 74 $^{\circ}$ C, 1 min 5 seconds 的反應, 最後為 74 $^{\circ}$ C, 10 min。定序反應使用的引子與 PCR 反應相同, 並定序正反二股, 反應之分析使用 ABI 3100 avant(PE Applied Biosystems)。

2. 路鄧葡萄球菌MLST持家基因及PCR條件

S. lugdunensis 選出七個 *aroE* (*shikimate dehydrogenase*), *dat* (*D-amino acid aminotransferase*), *ddl* (*D-alanine:D-alanine ligase*), *gmk* (*guanylate kinase*), *ldh* (*L-lactate dehydrogenase*), *recA* (*recombinase*), and *yqiL* (*acetyl-coenzyme A acetyltransferase*)⁹³。PCR 反應容積為 25 μ l, 試劑包含 20 ng 的 genomic DNA, 各 1 μ l 的正向及反向 primer(5 μ M)及 12.5 μ l of Master Mix(2X)(Fermentas, Hanover, MD)。增幅條件為 94 $^{\circ}$ C, 5 min denature, 接著進行 25 cycle 94 $^{\circ}$ C 30 sec, 30 min \rightarrow 50 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 1 min 的反應, 最後為 72 $^{\circ}$ C, 7 min。反應之儀器使用 T3000 thermal

cycler(Biometra , Gottingen, Germany)。

3. PCR反應

以 PTC-200 96-well thermal cycler(MJ Research)進行 PCR 反應。*Candida albicans* 反應試劑包含 2 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 $^{\circ}$ C, 2 min denature, 接著進行 25 cycle 94 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 52 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 1 min 的反應, 最後為 72 $^{\circ}$ C, 10 min。*Candida glabrata* PCR 反應容積為 20 μ l, 內含有 10 ng DNA、每種 primer 50 pmol、1.25U Taq DNA polymerase、5 μ l 的 10X buffer 及 200 μ M deoxynucleoside triphosphate。PCR 反應條件為 95 $^{\circ}$ C, 5 min denature, 接著進行 30 cycle 93 $^{\circ}$ C, 30S \rightarrow 依據增幅基因片段的不同, 黏合溫度範圍從 50-57 $^{\circ}$ C 不等, 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 1 min 的反應, 最後為 72 $^{\circ}$ C, 4 min 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 $^{\circ}$ C, 7 min denature, 接著進行 30 cycle 94 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 52 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 74 $^{\circ}$ C, 1 min 5 seconds 的反應, 最後為 74 $^{\circ}$ C, 10 min。定序反應使用的引子與 PCR 反應相同, 並定序正反二股, 反應之分析使用 ABI 3100 avant(PE Applied Biosystems)。

(六)、核酸序列比對分析、運算及資料庫建立

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

(七)、*Candida albicans* MALDI-TOF

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

三、結果

(一)、微珠陣列測試鑑定真菌

1. 探針專一性

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

2. 敏感性與再現性分析

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

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

3. 多重菌種混合偵測

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

4. 微珠陣列系統運用於臨床檢體之可行性

為試驗微珠陣列系統運用於臨床檢體鑑定之可行性及的敏感性，將

10^5 cells/ ml *Aspergillus nidulans* 分生孢子(conidia)與血液混合均勻後連續稀釋至 10^0 cell/ ml 後萃取 DNA，測試微珠陣列系統敏感性結果顯示檢測範圍為 10^2 cells/ ml(圖四)。

5. 微珠陣列系統檢測侵襲性真菌症

微珠陣列系統針對血液腫瘤病人常見感染的 *Candida* species(*C. albicans* , *C. dubliniensis* , *C. glabrata* , *C. krusei* , *C. lusitaniae* , *C. parapsilosis* , *C. tropicalis* , *C. guilliermondii* , *Aspergillus* species(*A. flavus* , *A. fumigatus* , *A. nidulans* , *A. niger* , *A. terreus*)及 *Cryptococcus neoformans* 建立檢驗模組，檢測 319 位侵襲性真菌症病人 4,091 件檢體，808 (19.8%) 件檢體為 positive，61(1.5%)件檢體為 beyond cutoff。808 件 positive 檢體中 755(18.5%)件為 *Candida* species、30(0.7%)件為 *Aspergillus* species、18(0.4%)件為 *Candida* species 及 *Aspergillus* species、5(0.1%)件檢體為 *Candida* species positive 及 *Aspergillus* species 為 beyond cutoff。61 件 beyond cutoff 檢體中 45 件(1.1%)為 *Candida* species，16 件(0.4%) *Aspergillus* species(表三)。

2011 年 1 月至 2015 年 2 月 4,091 件檢體，分別採集自 blood、gargling、sputum 及其他(支氣管沖洗液、肋膜液、肺水、肺沖洗液、肺泡沖洗液)，在 808 件檢體 positive 的檢體 gargling 及 sputum 佔多數，分別是該檢體 34.4%(529/1,536)及 41.3%(237/574)。檢測含有 *Candida* species 的 755 件檢體分別是 gargling 516 件(33.6%)、sputum 210 件(36.6%)、blood 25 件(1.3%)、其他檢體 4 件(50.0%)。 *Aspergillus* species 則在 blood、gargling、sputum 檢測出分別是該檢體的 0.7%(13/1,973)、0.3%(4/1,536)及 2.3%(12/574)。同時含有 *Candida* species 及 *Aspergillus* species 則是在 gargling 及 sputum 檢測出，佔該檢體的 0.4%(6/1,536)及 2.1%(12/574)。

而其他檢體包括支氣管沖洗液、肋膜液、肺水、肺沖洗液、肺泡沖洗液僅有 8 件，有 4 件檢測出含有 *Candida species*(表三)，因檢體數過少並不具意義。

微珠陣列系統檢測為 positive 及 beyond cutoff 的檢體，依據檢測出所含有的 species 以專一性引子作確認，結果顯示一致。而部分檢體以電泳確認 ITS3-4 pan-fungal PCR 結果含有產物但微珠陣列系統檢測結果卻為 negative，探討二者結果不一致的原因有(1)ITS3-4 pan-fungal 引子會與部分真核生物 Internal transcribed spacer(ITS)region 有 cross reaction，若檢體含有其他真核生物如 gargling 檢體含有食物殘渣，則在進行 ITS3-4 pan-fungal PCR 該片段會被增殖；(2)檢體中所含有之 species 在微珠陣列系統檢測模組中專一探針序列處有變異，導致專一性探針無法與其雜交；(3)因為檢驗模組專一性探針種類是以血液腫瘤科病人常見感染的真菌所設計，若病人檢體中所含真菌為少見不在我們的檢驗模組中則無法檢測出。

(二)、侵襲性真菌症 Real time PCR 檢測

利用 pan-fungal, Pan-Candida 及 Pan-Aspergillus primer 進行 Real time PCR 後(圖五 A)，以 Tm 值範圍推估檢體中是否含有特定的 *Candida* 或 *Aspergillus* 的 species，因檢體中若混合多種的 *Candida* 或 *Aspergillus* species，可能會誤判或遺漏某些 species 的結果，而無法做到完全準確判讀結果。為改善上述情形在改以微珠陣列系統檢測結果，再以 *Candida spp.* 或 *Aspergillus spp.* 專一性引子進行 Real time PCR(圖五 B)。在微珠陣列系統檢測結果 301 件 *Candida spp.* 檢體中 Real time PCR 有 242 件陽性反應；微珠陣列系統檢測結果 33 件 *Aspergillus spp.* 檢體中 Real time PCR 有 23 件檢體是陽性反應，Real time PCR 結果和微珠陣列系統結果比對，

結果 *Candida species* 為 80%(242/301)，*Aspergillus species* 70%(23/33)，兩方法比較結果顯示都有達到七成以上。

在 92 件微珠陣列系統檢測為同時含有 2 種以上 *Candida species* 檢體中有 64 件 Real time PCR 檢測結果與微珠陣列系統一致為。33 件微珠陣列系統檢測 *Aspergillus species* 為陽性檢體以 *Aspergillus species*-specific primer 進行 Real time PCR 結果 23 件(69.7%)為陽性，其中 3 件微珠陣列系統檢測含有 2 種 *Aspergillus species* 但 Real time PCR 2 件檢測檢測出 2 種，1 件檢測檢測出 1 種。5 件微珠陣列系統檢測 *Candida species* 及 *Aspergillus species* 為陽性檢體分別以 *Candida species*-specific primer、*Aspergillus species*-specific primer 進行 Real time PCR 2 件檢體結果是一致的。Real time PCR 結果與微珠陣列系統不一致的原因可能為病原菌較少或是抑制因子的影響。

(三)、不明原因肺炎檢體微珠陣列系統檢測與 Real time PCR 檢測

不明原因肺炎咽喉拭子檢體微珠陣列系統檢測與 Real time PCR 檢測二種方法之比較是以真菌培養分離鑑定為標準檢測方法，真菌培養分離鑑定結果為 *Candida species*、*Aspergillus species* 共計 207 件分別進行檢體微珠陣列系統與 Real time PCR 檢測。微珠陣列系統檢測是以 *Candida species*、*Aspergillus species* 及 *Cryptococcus neoformans* 檢測模組進行檢測，結果有 142 件與真菌培養分離鑑定菌屬一致，28 件除了培養分離菌屬外同時檢測出其他菌屬。而 Real time PCR 檢測是依據菌培養分離鑑定及微珠陣列系統檢測以專一性引子進行檢測，結果有 150 件與真菌培養分離鑑定菌屬一致，22 件除了培養分離菌屬外同時檢測出其他菌屬。微珠陣列系統檢測與 Real time PCR 未檢測出 *Candida species*、*Aspergillus species* 分別為 28 件及 26 件，而檢測結果與真菌培養分離鑑定不一致者微珠陣列系統檢測有 4 件、Real time

PCR 檢測有3件。真菌培養分離鑑定菌、微珠陣列系統檢測與Real time PCR 檢測一致性可達八成(表四)。

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

(四)、高致病性真菌檢測方法的建立

我們針對高致病性真菌 *Coccidioides species* 及 *Histoplasma capsulatum* 建立了免疫及分子檢驗的方法。*Coccidioides species* 就免疫檢測的方法主要採用免疫擴散的方法，由結果可辨識出 sample 的陽性反應如圖六(A)所示。另外我們採用分子檢測的方法針對 *Coccidioides species* 的特異之 CSP gene，從圖六(B)的結果得知 Lane 2, 3 *C. posadasii*(C735)及 *C. immitis*(RS)在約 500 bp 左右有明顯的訊號，檢體並沒有訊號出現。就 *Histoplasma capsulatum* 我們同樣採用免疫擴散及分子檢驗的方法，免疫擴散與 *Coccidioides species* 檢驗相似，有抗體反應出現時會出現沈澱之現象。*Histoplasma capsulatum*免疫擴散法在分子檢測中使用 M antigen gene(圖七)。

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

1. *C. albicans*

就 Clade 的分佈而言，台灣 201 分離株區大致分為 14 個 Clade(圖八)，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。Fluconazole 的 MIC 大多為 susceptible，值得注意的是 Clade 10 有 50% 的高比例為 resistant。地理區的分布，由於收集的菌株大多是來自北部，當中南部較高的 Clade 為 4 與 10。另外azole 類(fluconazole，voriconazole及itraconazole)的抗藥性 resistant 的比例高於 5%，其他種類的藥 amphotricin B 及 Flucytosine 比例不高於 1%。

2. 奴卡菌 *Nocardia brasiliensis*

台灣 2002-2015 所收集 14 例巴西奴卡氏菌感染造成的皮膚性臨床表徵及對 14 種抗生素的抗藥性樣式。gyrB 分子分型與淋巴腺炎 (lymphadenitis)及對 imipenem(4-32 versus 0.25-0.75 mg/L)的抗藥性有關。

結節膿皰性膿皮病(nodulopustular pyoderma)伴隨著類淋巴脈絡型孢子絲菌病蔓延(sporotrichoid spreading)是最常見的臨床表徵。我們首度強調多數巴西奴卡氏菌感染早期呈現小膿泡，提醒臨床類似病徵應將奴卡菌列為鑑別診斷並與實驗室密切聯繫加強培養。在 12 個分離株中 7 個是局部感染 5 個是表皮淋巴散佈型(3 個是 cervical lymphadenopathy，在男性病患中有一個 nodulopustular pyoderma 於頭與頸，結節膿皰性膿皮病(nodulopustular pyoderma)伴隨著類淋巴脈絡型孢子絲菌病蔓延(sporotrichoid spreading)是最常見的臨床表徵(圖九)。實驗室確認需要 3-10 天(平均 5.17 天)鑑定奴卡菌基於具有革蘭氏陽性與部分抗酸性染色，這些菌株進一步以確認 16S rRNA 基因定序及降解即利用糖產酸的試驗。

抗生素敏感性試驗中我們測試了 14 種藥，其中 amikacin，gentamicin，tobramycin，piperacillin/tazobactam，and TMPSMX 等 5 種藥屬於敏感性，另外kanamycin，erythromycin，and oxacilli 屬於抗藥性。其餘6種藥(imipenem，vancomycin，penicillin-G，tetracycline，clindamycin，and ciprofloxacin)在 14 分離株中存在變異，當中 imipenem 與

ciprofloxacin 其 MIC 分別為0.5 - 2 and 0.25 - 32 mg/L。依據 *gyrB* 於 70% bootstrap 區分為 2 個主要的分群。一群是 16S rRNA具有 T160G 的變異，具有較高的MIC值(4-32 mg/L)及具高比例淋巴炎(66.7%)(圖九)。

早期監測結果顯示 *N. asteroides* 和 *N. brasiliensis* 是臨床上主要造成皮膚感染的奴卡氏菌屬，但是近期的監測結果顯示 *N. brasiliensis* 造成皮膚奴卡氏菌病的盛行率逐漸增加，已經超過 *N. asteroides* complex。在本研究中所有由 *N. brasiliensis* 造成皮膚奴卡氏菌病的菌株主要收集自 2002 年到 2015 年之間，然而造成流行病學由 *N. asteroides* 傾向 *N. brasiliensis* 的原因，可能是近幾十年來氣候的變遷造成影響。

N. brasiliensis 主要會感染 immunocompetents 病人，進而造成局部皮膚、皮下組織、器官和肌肉，甚至是鄰近的骨骼的感染，本研究發現台灣 *N. brasiliensis* 造成的皮膚奴卡氏菌病最常見的臨床表徵是孢子絲菌樣的結節膿皰，和早期相關報導結果一致。本研究 and 早期研究結果一致指出奴卡氏菌病一般發生在年齡 21 歲到 50 歲的成年人當中，而成年人相對於青少年或幼童較易於被感染，至於男女感染比率早期相關報告指出為 3:1。而在本研究中的 12 個奴卡氏菌菌株檢體主要有 7 株(58.3%)是來自於男性檢體和 5 株(41.7%)是來自女性檢體。造成男性奴卡氏菌病感染率較高的主要原因，可能是由於職業或環境上的暴露而造成感染，另外發現有高比例的男性感染者帶有其他疾病，像是糖尿病等也是原因之一。而皮膚奴卡氏菌症的感染主要是經由環境中的奴卡氏菌感染造成，像是經由土壤、腐敗植被、水和汗水汙泥等，另外這些致病菌也會經由接種自組織外傷的病原體造成感染。本研究中有四個病人過去病史指出曾暴露在塵蹣，溫泉，和花園的環境中，然而我們沒辦法從病人接觸過的環境土壤或水中採集檢體做進一步的重新培養，因為從皮膚採集檢體到培養檢測至少需要

10 工作天以上，如果收集自環境中的檢體到培養檢測，則所需花費的時間可能會造成的延遲治療而錯過最佳治療的時間。在 *N. brasiliensis* 四個基因的基因分型當中，*gyrB* 基因序列是最具有區分能力的，*gyrB* 基因分型將 12 個菌株分成兩個主要族群，此兩族群差異主要在 16S rRNA 基因序列上的第 160 位置上產生的單一核酸取代，分別為 G 和 T，形成不同程度的 imipenem(IPM) 最低抑菌濃度和淋巴結炎的盛行率。針對 16S rRNA 定序結果顯示在基因序列的第 160 位置，單一核酸取代為 G160 時，主要為 IPM 抗藥性族群，相對於 IPM 敏感性族群則為 T160。一篇早期研究 *N. brasiliensis* 發現 16S rDNA 基因序列在單一核酸取代位置為 T103、A381 和 A456 時，主要歸為 IPM 敏感性族群。對於這些多型性的分析，不僅可以幫助我們推測臨床的表現、治療反應結果和改善治療方法，而最後未來進一步的研究，則希望能建立基因型和表現型之間的關聯性，像是臨床表現和 *N. brasiliensis* 對抗菌化合物的抗藥性之間的關聯。

3. 路鄧葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)

39 株路鄧葡萄球菌的 MLST (<http://www.pasteur.fr/mlst>) UPGMA 分析圖如(圖十)。來自 37 個病人 39 個菌株可區分為 9 個 ST 及以 bootstraps 70% 的標準分界可區分為 5 群(CG 1-5)。以 Penicillin-G resistant rate 而言，各別 Group 依序為 Group 1(7/8), Group 2(3/13), Group 3(2/5), Group 4(0/3), Group 5(7/8) 等。其中 Group 1 及 Group 5 有較高比例的 Penicillin-G resistant rate。

來自同一病人的菌株 P2-1, P2-2 及 P2-3 分離的年代由 2011 至 2013 年，從 P2-1 的 ST N1 型別變化為 P2-2 & P2-3 的 ST6，七個 alleles 中只有 *yqiL* 基因型別的差異，但是還是同樣被分到 Group 2 中。就抗生素抗藥性而言，從 P2-1 對於 Erythromycin 與 Clindimycin 產生抗藥性一直到 P2-3 對於 Amikacin, Gentamycin 與 Tetracyclin 產生抗藥性。

(六)、*Candida albicans* MALDI-TOF 與 MLST 分子分型之比較

為了解MALDI-TOF是否可應用於*Candida albicans*的分子分型，我們選擇30株MLST分型不同clade的菌株。其中台灣主要分群clade 1, 3, 4, 16, 17選擇3株其餘的非主要分群選1~2株(表五)。經由MALDI-TOF PCA cluster分群如圖十一，可大致區分為6個Group。MLST 主要分群clade1, 3, 4, 16, 17每個clade的3株菌皆分散於不同的Group中，由結果可知MALDI-TOF 與MLST並無明顯的關聯性。在30菌株有4株Fluconazole resistant菌株(菌株編號依序為6, 8, 26, 27)，其中編號8與27屬於Group1而編號6及26屬於Group2，Group3至Group6均為susceptible。由於本次菌株選擇Fluconazole resistant菌株較少，較無法確切比較出MALDI-TOF與Fluconazole resistant的關聯性，有較多的resistant才能確認兩者是否有關連聯性。

四、討論

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

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

傳統鑑別系統主要依照菌株之表現型作為區分菌種的依據，如市售的 API20 NE⁹⁴ 與 Viteck 2⁹⁵ 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⁹⁶。

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⁹⁷。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、高通量及擷節成本之優勢。Probes 設計之初皆參照已發表的標準菌株序列做設計，因此以流式微珠陣列檢測標準菌株的

結果如同預測， positive 的訊號強度明顯高於背景值，確認整個實驗之正確性。

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

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

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。

MALDI-TOF 已廣泛應用於微生物種的鑑定，至於分子分型及其他應用還處於試驗階段。近期其他學者的研究，在分型方面 *Candida albicans* 無法確認 MALDI-TOF 與 microsatellite 的關聯性⁹⁸。就抗藥性方面結果顯示 MALDI-TOF 可區分比較 *C. albicans*、*C. glabrata* 及 *C. tropicalis* 等 species 的 triazoles 的抗藥性⁹⁹，另外 *C. albicans* 及 *Aspergillus spp* 可區分比較 echinocandins 的抗藥性¹⁰⁰。雖然比較 *Candida albicans* MALDI-TOF 及 MLST 的分型方法沒有明顯的關聯性，但是之後持續進行 MALDI-TOF 與抗真菌藥的抗藥性關聯之研究。

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

五、結論與建議

我們的主要進展有七：**第一**、發展可單管同時偵測麴菌、鵝胞菌、青黴菌、接合菌等26種臨床重要絲狀真菌的微珠陣列如 *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、模擬血液檢體檢測敏感度為 10² cells/ml。整個流程包含核酸增幅可於5小時內完成。**第二**、開發偵測臨床重要酵母菌和絲狀真菌的real-time PCR 檢測方法。整合應用微珠陣列和 real-time PCR 檢測方法，應用於血液腫瘤病人及小兒感染檢體等高危險族群之偵測。**第三**、建立高病原性輸入性雙型性真菌之檢驗方法。**第四**、由臨床病理學及對抗生素抗藥性的特性從2002-2015 分析 14 株 *Nocardia brasiliensis* 的分子流行病學， *gyrB* 可區分出病患是否為具淋巴結炎。以及區分是否具有高的 imipenem MIC 值。**第五**、由臨床病理學及對抗生素抗藥性的特性從 2011-2015 分析 39 株 *Staphylococcus lugdunensis* 的分子流行病學。**第六**、建立 *Candida albicans* MALDI-TOF分型方法。**第七**、新型隱球菌檢驗品質系統通過全國認證基金會(TAF)ISO 15189醫學實驗室認證。

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

六、計畫重要研究成果及具體建議

具體建議有十二：

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

10. 由疾管署主動提供鑑定及分型服務，教育訓練及技術推廣：本實驗室發展之快速多重流式微珠陣列方法實驗細節已提供多個署內外相關單位參考，協助其建立技術。最適化的 PFGE 分子分型流程，也有多名相關研究助理來學習研習，將持續以寬闊的胸襟分享所知，發揮公僕服務奉獻之精神，並建立國際聲譽。
11. 教育民眾如何落實防治，自我保護。
12. 持續努力提升國際SCI論文發表的質與量，分享台灣經驗，展現實力。

七、参考文献

1. Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, et al: Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases* 2001;32:1319-24.
2. Barnes RA, Denning DW, Evans EG, et al: Fungal infections: a survey of laboratory services for diagnosis and treatment. *Commun Dis Rep CDR Rev* 1996;6:R69-75.
3. Dasbach EJ, Davies GM, Teutsch SM: Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 2000;31:1524-8.
4. Ellis ME, Al-Abdely H, Sandridge A, et al: Fungal endocarditis: Evidence in the world literature, 1965-1995. *Clinical Infectious Diseases* 2001;32:50-62.
5. Luo GZ, Mitchell TG: Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40:2860-5.
6. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al: Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infectious Diseases* 2003;37:1172-7.
7. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, et al: Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:1519-27.
8. Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, et al: The epidemiology of candidemia in two United States cities: Results of a population-based active surveillance. *Clinical Infectious Diseases* 1999;29:1164-70.
9. Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, et al: The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-*albicans* *Candida* isolates from blood. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003;52:679-82.
10. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al: Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* 2004;39:309-17.
11. Park BJ, Sigel K, Vaz V, et al: An epidemic of coccidioidomycosis in Arizona associated with climatic changes, 1998-2001. *Journal of Infectious Diseases* 2005;191:1981-7.
12. Petersen LR, Marshall SL, Barton-Dickson C, et al: Coccidioidomycosis among workers at an archeological site, northeastern Utah. *Emerging Infectious Diseases* 2004;10:637-42.
13. Chamany S, Mirza SA, Fleming JW, et al: A large histoplasmosis outbreak among high school students in Indiana, 2001. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2004;23:909-14.
14. Lyon GM, Bravo AV, Espino A, et al: Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998-1999. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004;70:438-42.
15. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, et al: Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997;41:617-23.
16. Schneider E, Hajjeh RA, Spiegel RA, et al: A coccidioidomycosis outbreak following the Northridge, Calif, earthquake. *Jama-Journal of the American Medical Association* 1997;277:904-8.
17. Ponton J, Ruchel R, Clemons KV, et al: Emerging pathogens. *Medical Mycology* 2000;38:225-36.
18. Rentz AM, Halpern MT, Bowden R: The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clinical Infectious Diseases* 1998;27:781-8.
19. Sheng WH, Wang JT, Lu DCT, et al: Comparative impact of hospital-acquired infections on medical costs, length of hospital stay and outcome between community hospitals and medical centres. *Journal of Hospital Infection* 2005;59:205-14.
20. Cummings KC, McDowell A, Wheeler C, et al: Point-source outbreak of coccidioidomycosis in construction workers. *Epidemiol Infect* 2010;138:507-11.
21. Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, et al: Evaluation of a reformulated CHROMagar *Candida*. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:2015-6.

22. Weinberg M, Weeks J, Lance-Parker S, et al: Severe histoplasmosis in travelers to Nicaragua. *Emerging Infectious Diseases* 2003;9:1322-5.
23. Panackal AA, Hajjeh RA, Cetron MS, et al: Fungal infections among returning travelers. *Clinical Infectious Diseases* 2002;35:1088-95.
24. Wu AB, Wang MC, Tseng CC, et al: Clinical and microbiological characteristics of community-acquired *Staphylococcus lugdunensis* infections in Southern Taiwan. *Journal of clinical microbiology* 2011;49:3015-8.
25. Liu PY, Huang YF, Tang CW, et al: *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: a literature review and analysis of risk factors. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 2010;43:478-84.
26. Frank KL, Del Pozo JL, Patel R: From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clinical microbiology reviews* 2008;21:111-33.
27. Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA, et al: British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infectious Diseases* 2003;3:230-40.
28. Denning DW: Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* 2000;355:423-4.
29. Kobayashi GS: Molecular genetics and the diagnostic mycology laboratory. *Arch Med Res* 1995;26:293-6.
30. Sato Y, Osabe S, Kuno H, et al: Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by microscopic examination of centrifuged cerebrospinal fluid sediment. *Journal of the Neurological Sciences* 1999;164:72-5.
31. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, et al: Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:3533-9.
32. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, et al: Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40:2483-9.
33. Reiss E, Obayashi T, Orle K, et al: Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Medical Mycology* 2000;38:147-59.
34. Hurst SF, Reyes GH, McLaughlin DW, et al: Comparison of commercial latex agglutination and sandwich enzyme immunoassays with a competitive binding inhibition enzyme immunoassay for detection of antigenemia and antigenuria in a rabbit model of invasive aspergillosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2000;7:477-85.
35. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, et al: Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* 1998;26:1407-12.
36. Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, et al: Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1982;16:22-9.
37. Klein BS, Vergeront JM, DiSalvo AF, et al: Two outbreaks of blastomycosis along rivers in Wisconsin. Isolation of *Blastomyces dermatitidis* from riverbank soil and evidence of its transmission along waterways. *AmRevRespirDis* 1987;136:1333-8.
38. Dufresne SF, Datta K, Li XM, et al: Detection of Urinary Excreted Fungal Galactomannan-like Antigens for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Plos One* 2012;7.
39. Dan M, Leshem YY, Yeshaya A: Performance of a rapid yeast test in detecting *Candida* spp. in the vagina. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2010;67:52-5.
40. Niesters HGM, Goessens WHF, Meis J, et al: RAPID, POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED IDENTIFICATION ASSAYS FOR CANDIDA SPECIES. *Journal of Clinical Microbiology* 1993;31:904-10.
41. Jackson CJ, Barton RCE, Evans EGV: Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:931-6.
42. Velegraki A, Kambouris ME, Skiniotis G, et al: Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 1999;23:303-12.

43. Hendolin PH, Paulin L, Koukila-Kahkola P, et al: Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:4186-92.
44. Martin C, Roberts D, van der Weide M, et al: Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:3735-42.
45. Park S, Wong M, Marras SAE, et al: Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:2829-36.
46. Golbang N, Burnie JPMatthews RC: A polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosing infection caused by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Pathology* 1999;52:419-23.
47. Rand KH, Houck HWolff M: Detection of candidemia by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1994;8:215-21.
48. Chaturvedi S, Rodeghier B, Fan JJ, et al: Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT alpha and MATa pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:2007-9.
49. Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, et al: Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:3505-11.
50. Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, et al: Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40:490-4.
51. Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, et al: Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *Journal of Medical Microbiology* 2003;52:1071-6.
52. Henry T, Iwen PCHinrichs SH: Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:1510-5.
53. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, et al: Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:2302-10.
54. Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, et al: RAPID DETECTION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC FUNGI BY POLYMERASE CHAIN-REACTION AMPLIFICATION OF LARGE SUBUNIT RIBOSOMAL DNA. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 1995;33:319-25.
55. Zhao J, Kong FR, Li R, et al: Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:2261-6.
56. Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, et al: Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:1985-93.
57. Yamada Y, Makimura K, Uchida K, et al: Phylogenetic relationships among medically important yeasts based on sequences of mitochondrial large subunit ribosomal RNA gene. *Mycoses* 2004;47:24-8.
58. Marlowe EM, Hogan JJ, Hindler JF, et al: Application of an rRNA probe matrix for rapid identification of bacteria and fungi from routine blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:5127-33.
59. Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, et al: Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:4943-53.
60. Hsiao CR, Huang LY, Bouchara JP, et al: Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:3760-8.
61. Diaz MRFell JW: High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus *Trichosporon*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:3696-706.
62. Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, et al: Microcoding and flow cytometry as a high-throughput fungal identification system for *Malassezia* species. *Journal of Medical Microbiology* 2006;55:1197-209.

63. Diaz MRFell JW: Use of a suspension array for rapid identification of the varieties and genotypes of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:3662-72.
64. Page BTKurtzman CP: Rapid identification of *Candida* species and other clinically important yeast species by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:4507-14.
65. Page BT, Shields CE, Merz WG, et al: Rapid identification of ascomycetous yeasts from clinical specimens by a molecular method based on flow cytometry and comparison with identifications from phenotypic assays. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:3167-71.
66. Das S, Brown TM, Kellar KL, et al: DNA probes for the rapid identification of medically important *Candida* species using a multianalyte profiling system. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 2006;46:244-50.
67. Howell SA, Barnard RJHumphreys F: Application of molecular typing methods to dermatophyte species that cause skin and nail infections. *Journal of Medical Microbiology* 1999;48:33-40.
68. Soll DR: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 2000;13:332-+.
69. Katsu M, Kidd S, Ando A, et al: The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Fems Yeast Research* 2004;4:377-88.
70. Iida S, Imai T, Oguri T, et al: Genetic diversity of the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S rRNA genes among the clinical isolates of *Candida parapsilosis* in Brazil and Japan. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2005;46:133-7.
71. Tamura M, Watanabe K, Imai T, et al: New PCR primer pairs specific for *Candida dubliniensis* and detection of the fungi from the *Candida albicans* clinical isolates in Japan. *Clin Lab* 2000;46:33-40.
72. Bounoux ME, Tavanti A, Bouchier C, et al: Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:5265-6.
73. Bounoux M-E, Aanensen DM, Morand S, et al: Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. *Infection Genetics and Evolution* 2004;4:243-52.
74. Redkar RJ, Dube MP, McCleskey FK, et al: DNA fingerprinting of *Candida rugosa* via repetitive sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1996;34:1677-81.
75. Fundyga RE, Lott TJArnold J: Population structure of *Candida albicans*, a member of the human flora, as determined by microsatellite loci. *Infection Genetics and Evolution* 2002;2:57-68.
76. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, et al: Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:259-82.
77. Uhde KB, Pathak S, McCullum I, Jr., et al: Antimicrobial-resistant nocardia isolates, United States, 1995-2004. *Clin Infect Dis* 2010;51:1445-8.
78. Tremblay J, Thibert L, Alarie I, et al: Nocardiosis in Quebec, Canada, 1988-2008. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:690-6.
79. Kageyama A, Yazawa K, Ishikawa J, et al: Nocardial infections in Japan from 1992 to 2001, including the first report of infection by *Nocardia transvalensis*. *Eur J Epidemiol* 2004;19:383-9.
80. Poonwan N, Mekha N, Yazawa K, et al: Characterization of clinical isolates of pathogenic *Nocardia* strains and related actinomycetes in Thailand from 1996 to 2003. *Mycopathologia* 2005;159:361-8.
81. Kageyama A, Hoshino Y, Watanabe M, et al: Clinical isolates of *Nocardia brasiliensis* from Japan exhibit variable susceptibility to the antibiotic imipenem. *Mycopathologia* 2004;158:275-8.
82. Minero MV, Marin M, Cercenado E, et al: Nocardiosis at the turn of the century. *Medicine (Baltimore)* 2009;88:250-61.
83. Gilpin C: Nocardia Update. *Mycoses Newsletter* 2004;9 4-11.
84. Lu YC: History of Medical Mycology in Taiwan. *Dermatologica Sinica* 1991;9:1-14.
85. Tan CK, Lai CC, Lin SH, et al: Clinical and microbiological characteristics of Nocardiosis including those

- caused by emerging *Nocardia* species in Taiwan, 1998-2008. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:966-72.
86. Liu WL, Lai CC, Hsiao CH, et al: Bacteremic pneumonia caused by *Nocardia veterana* in an HIV-infected patient. *Int J Infect Dis* 2011;15:e430-2.
 87. Lai CC, Liu WL, Ko WC, et al: Antimicrobial-resistant nocardia isolates, Taiwan, 1998-2009. *Clin Infect Dis* 2011;52:833-5.
 88. Fukuda H, Saotome A, Usami N, et al: Lymphocutaneous type of nocardiosis caused by *Nocardia brasiliensis*: a case report and review of primary cutaneous nocardiosis caused by *N. brasiliensis* reported in Japan. *J Dermatol* 2008;35:346-53.
 89. Wilson JW: Nocardiosis: updates and clinical overview. *Mayo Clin Proc* 2012;87:403-7.
 90. Mootsikapun P, Intarapoka B, Liawnoraset W: Nocardiosis in Srinagarind Hospital, Thailand: review of 70 cases from 1996-2001. *Int J Infect Dis* 2005;9:154-8.
 91. Lin JF, Cheng CW, Kuo AJ, et al: Clinical experience and microbiologic characteristics of invasive *Staphylococcus lugdunensis* infection in a tertiary center in northern Taiwan. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 2014.
 92. Tseng SP, Lin YT, Tsai JC, et al: Genotypes and phenotypes of *Staphylococcus lugdunensis* isolates recovered from bacteremia. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 2013.
 93. Chassain B, Lemee L, Didi J, et al: Multilocus sequence typing analysis of *Staphylococcus lugdunensis* implies a clonal population structure. *Journal of clinical microbiology* 2012;50:3003-9.
 94. Towner KJ, Chopade BA: BIOTYPING OF ACINETOBACTER-CALCOACETICUS USING THE API 20NE SYSTEM. *Journal of Hospital Infection* 1987;10:145-51.
 95. Ling TKW, Tam PC, Liu ZK, et al: Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against Gram-negative clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:2964-6.
 96. Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, et al: Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:1632-9.
 97. Lee SH, Walker DR, Cregan PB, et al: Comparison of four flow cytometric SNP detection assays and their use in plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 2004;110:167-74.
 98. Dhieb C, Normand AC, L'Ollivier C, et al: Comparison of MALDI-TOF mass spectra with microsatellite length polymorphisms in *Candida albicans*. *Journal of Mass Spectrometry* 2015;50:371-7.
 99. Dhieb C, Normand A, Al-Yasiri M, et al: MALDI-TOF typing highlights geographical and fluconazole resistance clusters in *Candida glabrata*. *Medical Mycology* 2015;53:462-9.
 100. De Carolis E, Vella A, Florio AR, et al: Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Caspofungin Susceptibility Testing of *Candida* and *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 2012;50:2479-83.

八、圖與表

表一、試驗菌株

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

表一、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 (MSA) 偵測絲狀真菌 DNA 的最低濃度

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

表三、微珠陣列系統 (MSA) 檢測侵襲性真菌症病人檢體

檢體種類	No.	MSA (+)		MSA (±)*		<i>Candida</i> spp.		<i>Aspergillus</i> spp.		<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.		<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. (±)*		<i>Candida</i> spp. (±)*		<i>Aspergillus</i> spp. (±)*	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
blood	1,973	38	1.9%	19	1.0%	25	1.3%	13	0.7%	0	0.0%	0	0.0%	9	0.5%	10	0.5%
gargling	1,536	529	34.4%	35	2.3%	516	33.6%	4	0.3%	6	0.4%	3	0.2%	30	2.0%	5	0.3%
sputum	574	237	41.3%	7	1.2%	210	36.6%	13	2.3%	12	2.1%	2	0.3%	6	1.0%	1	0.2%
other	8	4	50.0%	0	0.0%	4	50.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
總計	4,091	808	19.8%	61	1.5%	755	18.5%	30	0.7%	18	0.4%	5	0.1%	45	1.1%	16	0.4%

* (±) : beyond cutoff

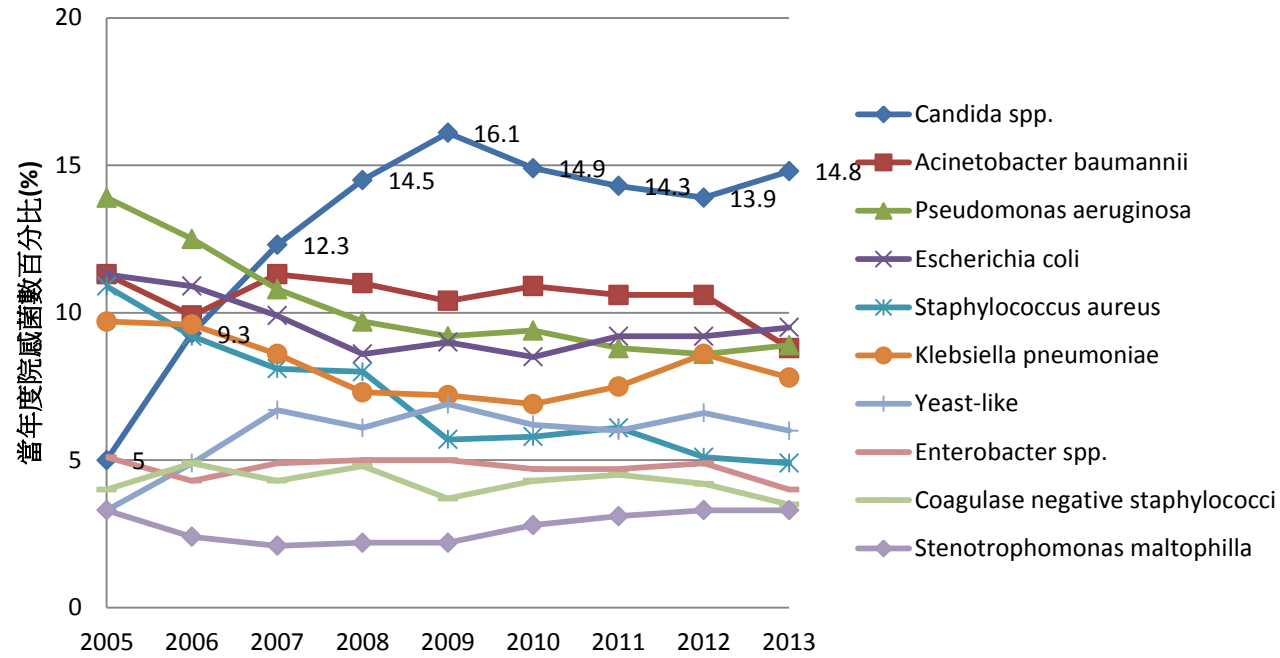
表四、不明原因肺炎檢體檢測

Cultivation	No.	MSA/Real-Time PCR	MSA No.	Real-Time PCR No.
<i>Candida albicans</i>	167	<i>Candida albicans</i>	116	123
		<i>Candida albicans</i>		
		<i>Candida glabrata</i>	10	5
		<i>Candida albicans</i>	1	1
		<i>Candida krusei</i>		
		<i>Candida albicans</i>	2	2
		<i>Candida parapsilosis</i>		
		<i>Candida albicans</i>	5	4
		<i>Candida tropicalis</i>		
		<i>Candida albicans</i>		
		<i>Candida glabrata</i>	1	1
		<i>Candida parapsilosis</i>		
		<i>Candida albicans</i>		
		<i>Candida glabrata</i>	2	3
		<i>Candida tropicalis</i>		
		<i>Candida albicans</i>		
		<i>Candida glabrata</i>	1	1
		<i>Candida krusei</i>		
		<i>Candida tropicalis</i>		
		<i>Candida glabrata</i>	0	1
<i>Candida glabrata</i>	1	0		
<i>Candida tropicalis</i>				
<i>Aspergillus flavus</i>	1	1		
<i>Negative</i>	27	25		
<i>Candida glabrata</i>	5	<i>Candida glabrata</i>	1	2
		<i>Candida glabrata</i>		
		<i>Candida albicans</i>	2	1
		<i>Candida glabrata</i>		
		<i>Candida dubliniensis</i>	1	1
		<i>Candida glabrata</i>	1	1
<i>Candida tropicalis</i>				
<i>Candida krusei</i>	1	<i>Candida krusei</i>	1	1
<i>Candida parapsilosis</i>	2	<i>Candida parapsilosis</i>	1	1
		<i>Negative</i>	1	1
<i>Candida tropicalis</i>	6	<i>Candida tropicalis</i>	4	5
		<i>Candida albicans</i>	1	0
		<i>Candida parapsilosis</i>	1	1
<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus flavus</i>	2	<i>Candida albicans</i>	1	2
		<i>Aspergillus flavus</i>		
		<i>Candida albicans</i>	1	0
<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i>	12	<i>Candida albicans</i>	10	9
		<i>Candida glabrata</i>		
		<i>Candida glabrata</i>	0	1
		<i>Candida albicans</i>		
		<i>Aspergillus flavus</i>	1	1
<i>Negative</i>	1	1		
<i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i>	10	<i>Candida albicans</i>	8	7
		<i>Candida tropicalis</i>		
		<i>Candida albicans</i>	2	2
<i>Candida glabrata</i> <i>Candida tropicalis</i>	2	<i>Candida tropicalis</i>	0	1
		<i>Candida albicans</i>		
		<i>Candida glabrata</i>	2	2
<i>Candida tropicalis</i>				

表五、MALDI-TOF 所比較 30 株 *C. albicans* 的 MLST clade list .

序號	Candida albicans No.	MLST Clade	序號	Candida albicans	MLST Clade
1	YH020393	17	16	YH990175	1
2	YH020126	17	17	YH990166	1
3	CDC139	14	18	YH010214	9
4	YH020409	16	19	YM990613	9
5	CDC088	12	20	YH990203	8
6	YM020805	10	21	YH010285	8
7	YH020358	11	22	YH990176	3
8	CDC242	5	23	YM020045	3
9	YH010339	6	24	CDC114	4
10	CDC356	7	25	YH020347	4
11	CDC064	4	26	CDC268	16
12	c016	1	27	YM060580	10
13	YH010244	3	28	YM060958	16
14	YH010336	17	29	YM060120	10
15	YH010040	11	30	ATCC90028	

圖一、醫學中心加護病房的院感菌逐年趨勢 2005-2013

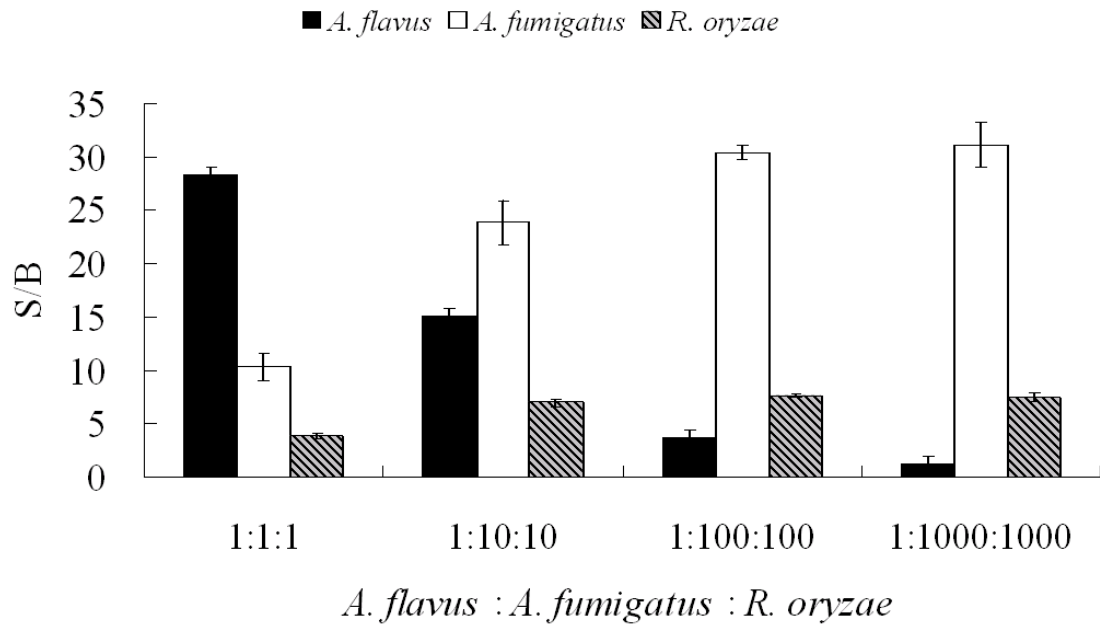


圖二、利用微珠陣列系統測試鑑定絲狀真菌菌株

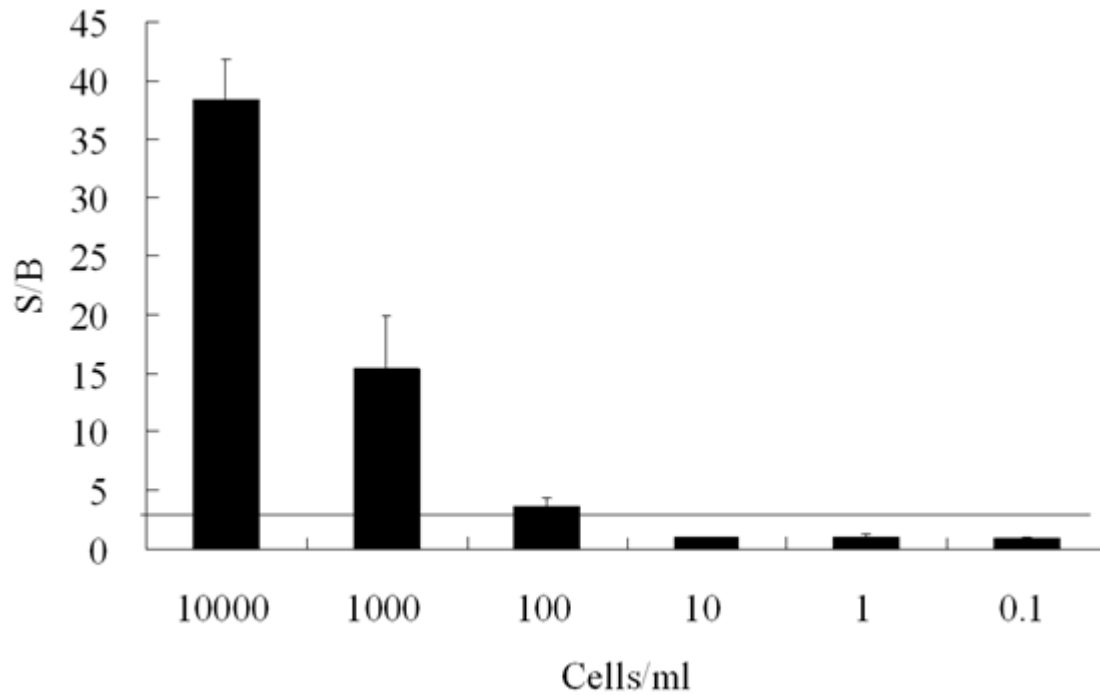
Organism	Identification no	S/B ratio																							
		Ascia	Asfla	Asfum	Asnid	Asnig	Aster	Asver	Fumop	Fuoxy	Fusol	Pajav	Pemar	Abcor	Apele	Mnhic	Murac	Muram	Rmpus	Rpam	Rpory	Savas	Syrac	Cocci	
<i>Aspergillus clavatus</i>	BCRC 31136	■																							
<i>Aspergillus flavus</i>	BCRC 30007		■																						
	BCRC 30008		■																						
	BCRC 30144		■																						
<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					■																			
<i>Aspergillus terreus</i>	ATCC 16404						■																		
	BCRC 30135						■																		
	BCRC 31128						■																		
BCRC 32068						■																			
<i>Aspergillus versicolor</i>	BCRC 30225							■																	
<i>Fusarium moniliforme</i>	BCRC 31492								■																
<i>Fusarium oxysporum</i>	BCRC 31611								■																
	BCRC 32107								■																
	BCRC 32139								■																
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	BCRC 33554								■																
	BCRC 33555								■																
<i>Fusarium solani</i>	BCRC 32448									■															
<i>Paecilomyces javanicus</i>	BCRC 35511										■														
<i>Penicillium marnettei</i>	CBS 344.59											■													
	CBS 549.77											■													
<i>Absidia corymbifera</i>	BCRC 33078												■												
<i>Apophysomyces elegans</i>	BCRC 33107													■											
<i>Mucor hiemalis f. corticola</i>	BCRC 32109														■										
<i>Mucor racemosus</i>	BCRC 30186															■									
<i>Mucor racemosus f. chibinensis</i>	BCRC 32162															■									
<i>Mucor racemosus</i>	BCRC 32586																■								
	BCRC 32160																■								
<i>Mucor ramosissimus</i>	BCRC 32160																■								
	BCRC 33122																■								
<i>Rhizomucor pusillus</i>	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>Microsporum gypsum</i>	2008 F-09																							■	
<i>Chrysosporium spp.</i>	2008 F-10																							■	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2008 F1-09																							■	

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

圖三、以微珠陣列系統偵測多重絲狀真菌混合實驗

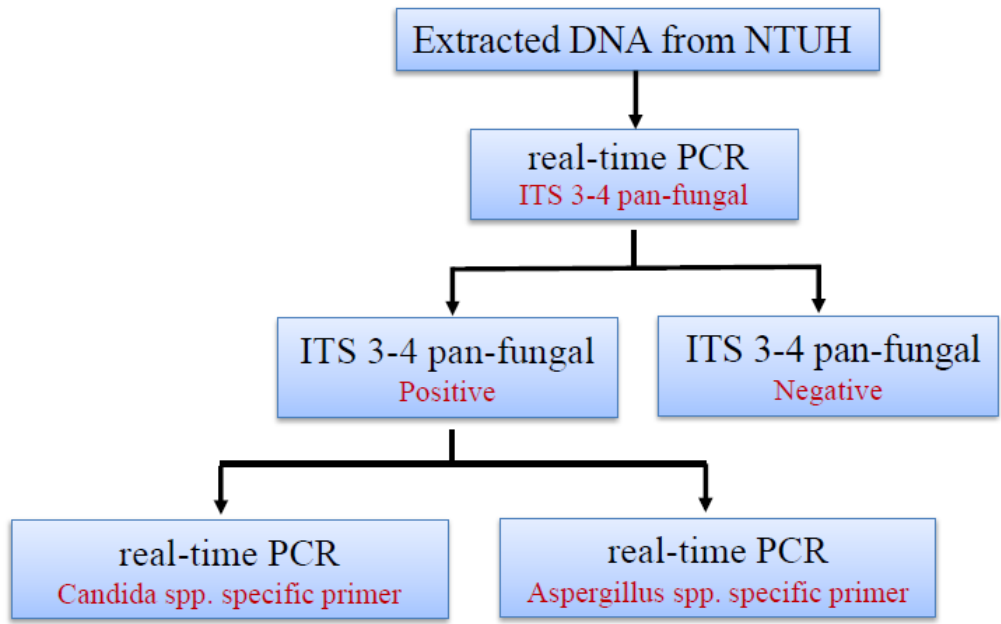


圖四、以 spiked 的血液測試微珠陣列系統運用臨床檢驗可行性及靈敏度

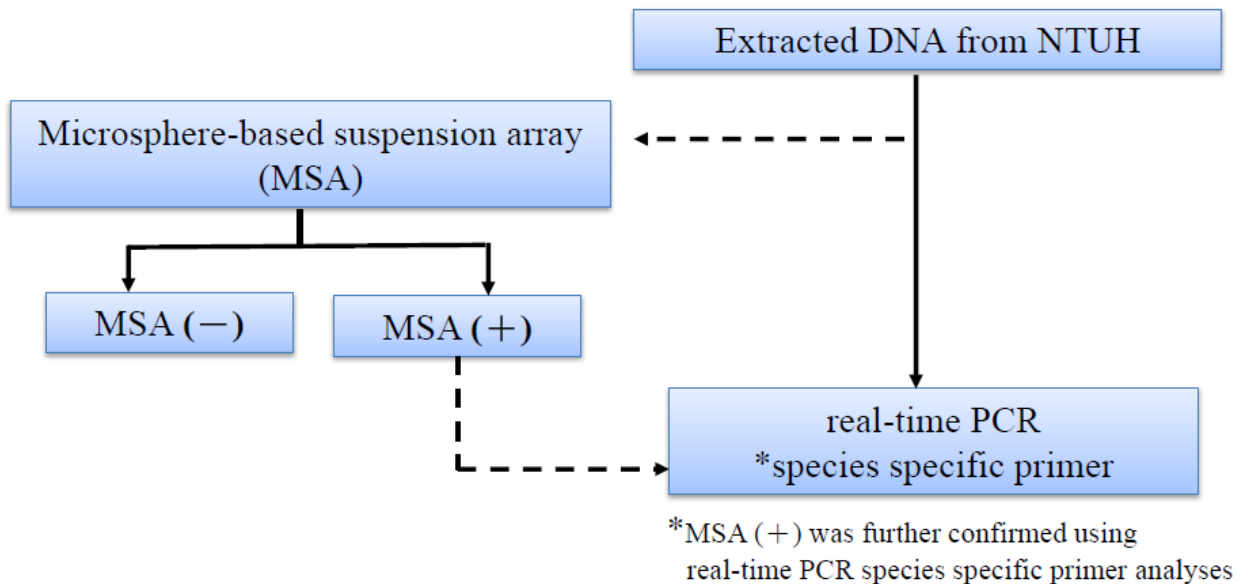


圖五、Real time PCR 檢測侵襲性真菌症檢體流程圖

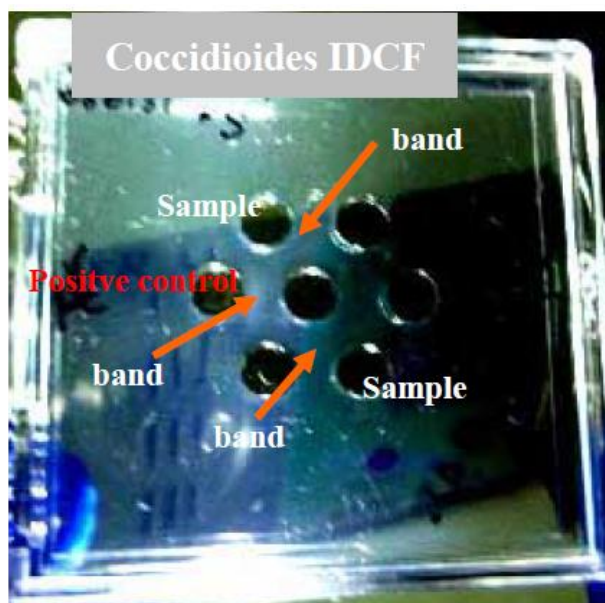
(A) 原始流程



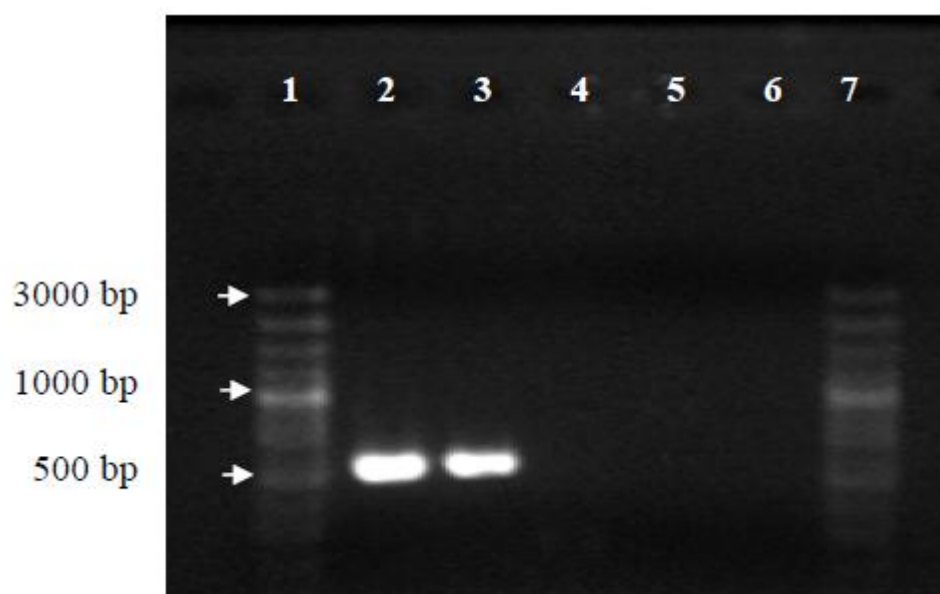
(B) 更新流程



圖六、*Coccidioides immitis* 免疫擴散 (IDCF) 及 PCR
(A) 免疫擴散 (IDCF)

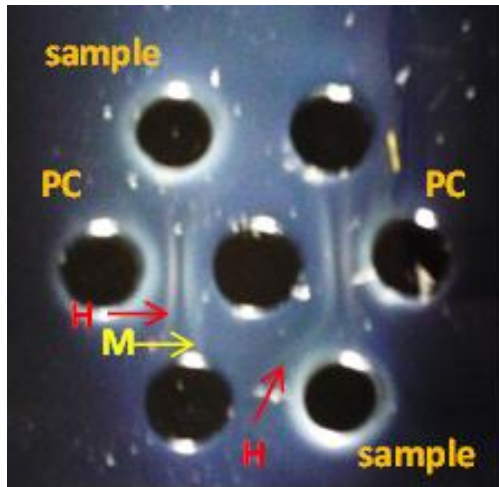


(B) CSP gene PCR

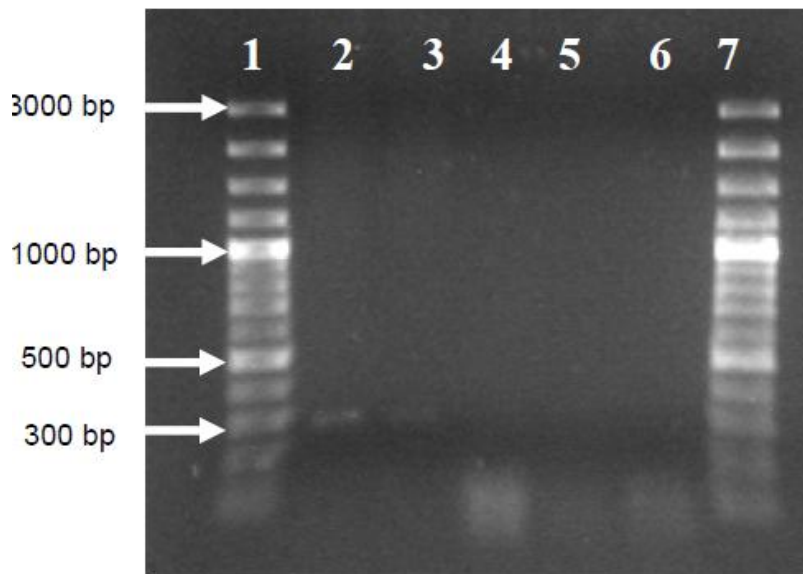


Lane 1, 7: Marker 323
Lane 2: *C. posadasii* C735
Lane 3: *C. immitis* RS
Lane 4, 5: sample1 and sample 2
Lane 6: Negative control

圖七、*Histoplasma capsulatum*(A)免疫擴散法和(B)M Antigen PCR
(A)

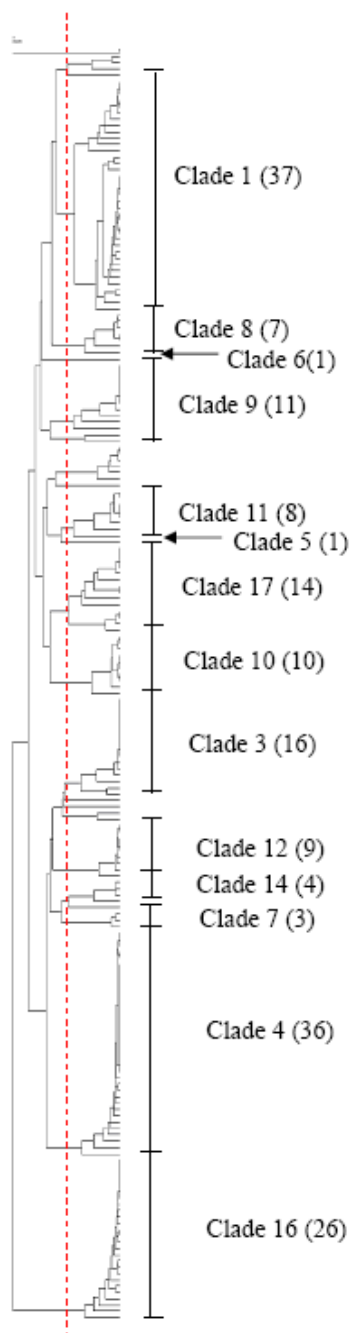


(B)

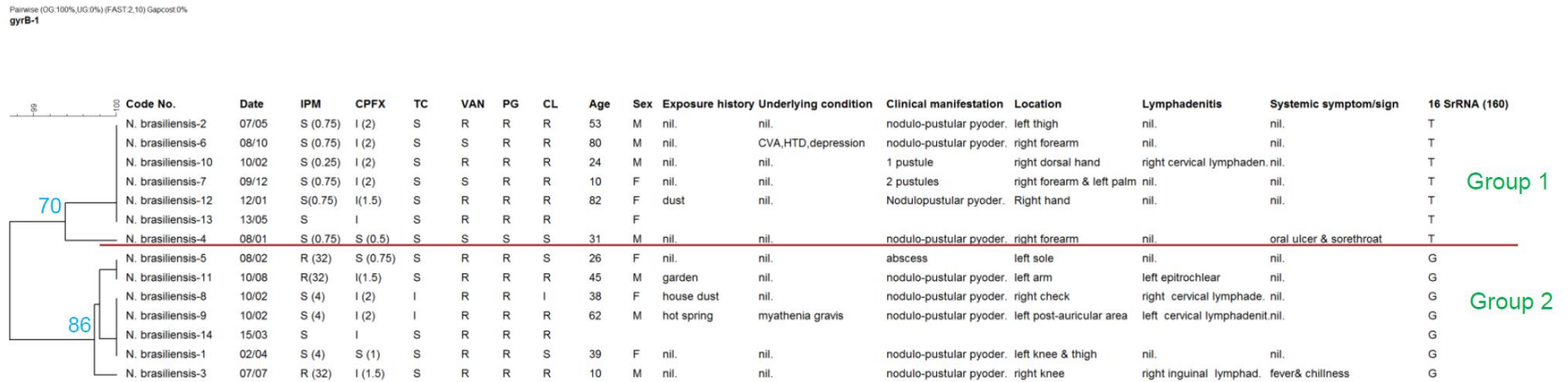


Lane 1, 7: Marker 323
Lane 2: *H. capsulatum*
Lane 3: *C. immitis* RS
Lane 4, 5: sample1 and sample 2
Lane 6: Negative control

圖八、台灣 201 株 (1997-2006) *Candida albicans* 的 UPGMA tree
(Clade number 後括弧數為菌株數)



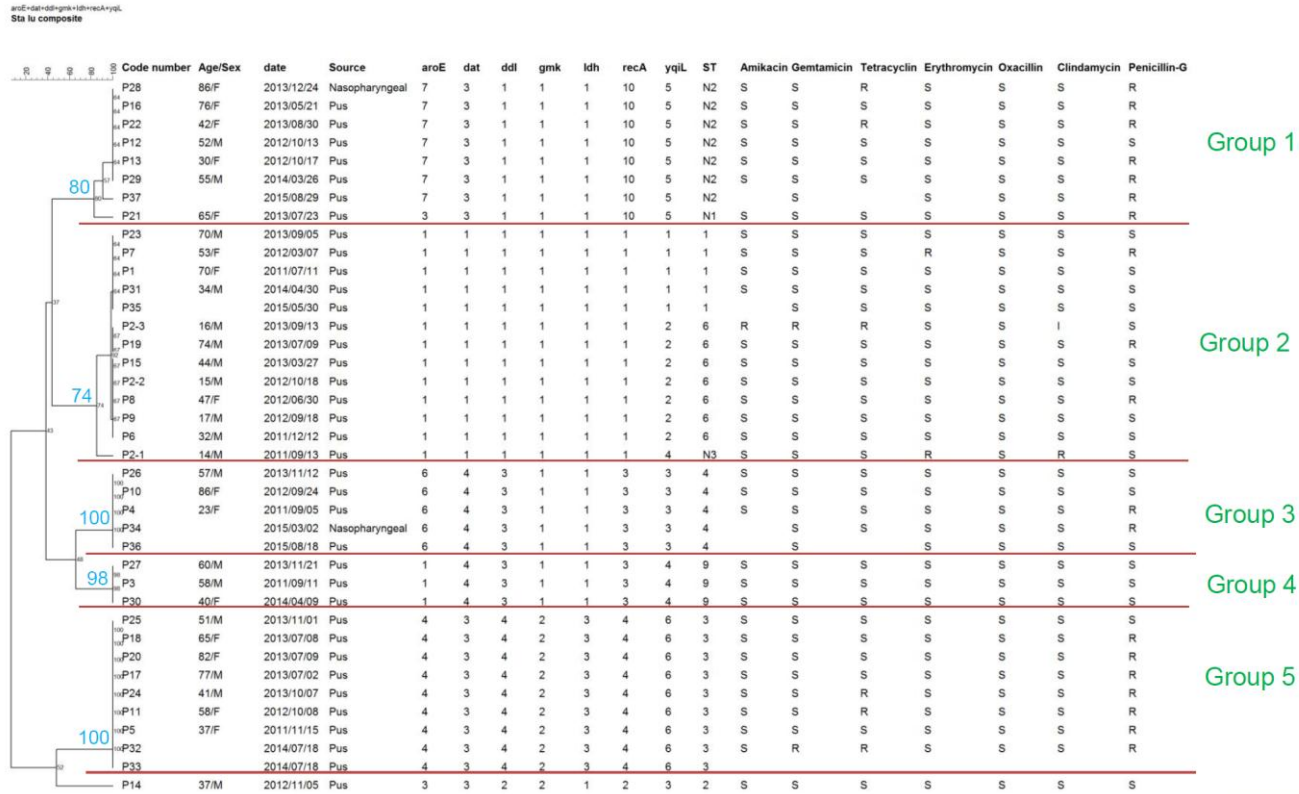
圖九、Dendrogram indicating the similarities of 14 *N. brasiliensis* isolates determined by *gyrB* gene sequencing and the association with clinical manifestation.



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

IPM: Imipenem, CPFX: Ciprofloxacin, TC: Tetracycline, VAN: Vancomycin, PG: Penicillin G, CL: Clindamycin, ,

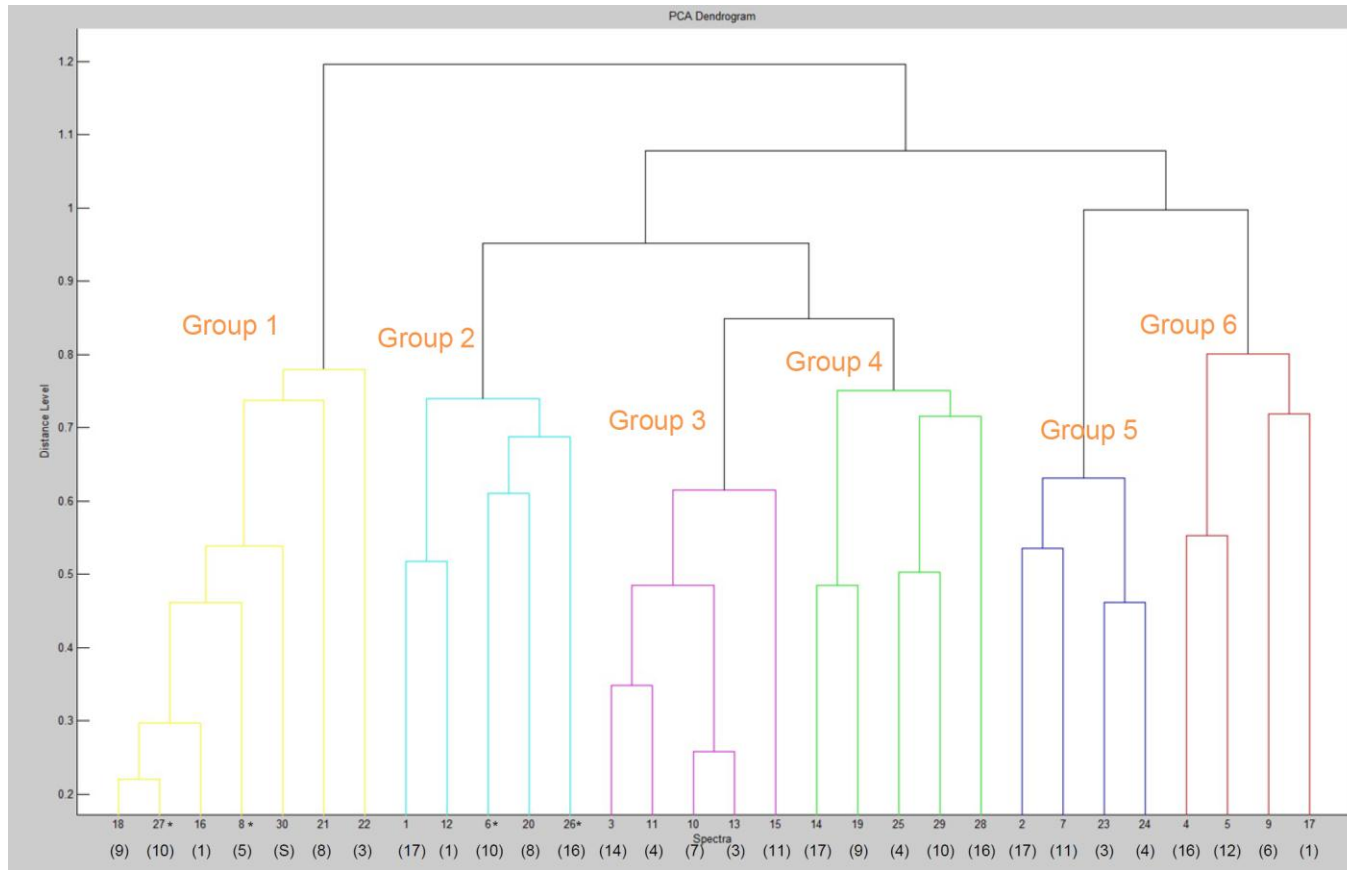
圖十、*Staphylococcus lugdunensis* MLST 類緣關係圖



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

ST 的型別 N1, N2 及 N3 表示 MLST 網站無法比對到的新

圖十一、30株 *Candida albicans* MALDI-TOF PCA 樹狀圖分析



橫軸數字為菌株編號，數字旁有*為 Fluconazole resistant 的菌株
()內的數字代表該菌株的 MLST clade

附錄一：圖表目錄

表一、試驗菌株	41
表二、微珠陣列系統 (MSA) 偵測絲狀真菌 DNA 的最低濃度	43
表三、微珠陣列系統 (MSA) 檢測侵襲性真菌症病人檢體	44
表四、不明原因肺炎檢體檢測	45
表五、MALDI-TOF 所比較 30 株 <i>C. albicans</i> 的 MLST clade list	46
圖一、醫學中心加護病房的院感菌逐年趨勢 2005-2013	47
圖二、利用微珠陣列系統測試鑑定絲狀真菌菌株	48
圖三、以微珠陣列系統偵測多重絲狀真菌混合實驗	49
圖四、以 spiked 的血液測試微珠陣列系統運用臨床檢驗可行性及靈敏度	49
圖五、Real time PCR 檢測侵襲性真菌症檢體流程圖	50
圖六、 <i>Coccidioides immitis</i> 免疫擴散 (IDCF) 及 PCR	51
圖七、 <i>Histoplasma capsulatum</i> (A)免疫擴散法和(B)M Antigen PCR	52
圖八、台灣 201 株 (1997-2006) <i>Candida albicans</i> 的 UPGMA tree	53
圖九、Dendrogram indicating the similarities of 14 <i>N. brasiliensis</i> isolates determined by gyrB gene sequencing and the association with clinical manifestation.	54
圖十、 <i>Staphylococcus lugdunensis</i> MLST 類緣關係圖	55
圖十一、30 株 <i>Candida albicans</i> MALDI-TOF PCA 樹狀圖分析	56