

計畫編號：DOH94-DC-2035

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

病原真菌快速檢驗及分子流行病學之研究 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、林啟揚、周曉慧、徐敏智、林鈺棋、黃仲德

廖美惠

執行期間：94 年 01 月 01 日至 94 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

頁 碼

1. 封面	1
2. 目錄	2
3. 計畫摘要	3
4. 本文	7
一、 前言	7
二、 材料與方法	19
三、 結果	24
四、 討論	34
五、 結論與建議	45
六、 參考文獻	46
七、 圖、表	58
八、 附錄	89
九、 謹謝	90

計畫摘要：

(1) 中文摘要：

中文關鍵詞：念珠菌、快速分子檢驗、分子分型、分子流行病學

侵襲性念珠菌感染在重症孱弱及免疫缺損病患族群中造成之合併症及死亡率仍居高不下，並持續成為公衛上的隱憂。分子流行病學之研究，有助於釐清病原真菌在國內及跨國間傳播情形，進而研擬防治對策。

本研究過去致力在快速檢驗及 *Candida albicans* 分子流行病學上研究，今年則承續過去三年之努力並為綜合總結之年度。今年著重在臨床之應用除 *C. albicans* 外也擴及到 *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* 及 *Candida guilliermondii* 四種念珠菌分子流行病學之探討。我們除了持續比較並最適化 PFGE、MLST 及 AFLP 分型方法外，並應用所發展之分型方法分析從台灣各醫院收集的念珠菌菌株，我們的主要發現有三：第一、不同種別的念珠菌流行病學特性有異，*C. albicans* 型別為病人專屬和分離部位，地源性與抗藥性無相關；*C. tropicalis* 的型別卻與抗藥性息息相關。第二、在同一 HIV 患者長期追蹤收集之菌株，其抗藥性或有起伏，但型別均極為類似，顯現抗藥性是這些菌株在病人身上為適應而獲得，而非尤其他病人平行轉移而來。第三、分型方法鑑別力之高下亦依種別而異，在 *C. albicans*，MLST 高於 PFGE；在 *C. glabrata* 却相反，這可能

是因為二物種單/雙倍體之差異。

基於 MLST 數位化分型方法之特性，具有容易國際接軌之優點，因此我們應用 MLST 分型方法分析 *C. albicans* 及 *C. glabrata* 之結果顯示台灣的菌株除少數外，多半獨立於歐美菌株群之外，而與日本類緣性較近。持續與國際比較型別資料，藉此可瞭解病原可能跨國傳播情形及特定抗藥性/高致病株系崛起之情形。發展中的 AFLP 分子分型法則具有鑑別出特異性基因標誌之潛力，未來希望藉此找出流病、檢驗及疫苗之有用標記分子。

本年度研究論文的質與量均有顯著提升，共有 SCI 論文八篇，五篇已發表，一篇已投寄，二篇投寄中，還有五篇論文在撰寫中即將投寄至 SCI 期刊。在由合作所衍生成果有二，一為與台大醫院合作將所發展之快速鑑定六種念珠菌及新型隱球菌種別的 real-time PCR 技術，於臨床檢體上之應用，試驗結果，在全血及其他檢體的來源(如腦脊髓液)的檢測上靈敏度均約達到 10-50 cells/ ml 不等，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，相關成果正在撰寫投稿中。二為與國家衛生研究院合作，結合真菌抗藥性分佈資料與本實驗室分子分型技術瞭解抗藥性菌株是否有株系擴散之情形，相關成果有二篇已發表，有一篇正投稿中。

(2)Abstract:

Keywords : *Candida spp.*, rapid molecular diagnosis, molecular typing, molecular epidemiology.

Invasive *Candida* infections continue to cause major problems of morbidity and mortality in a diverse range of debilitated and immunocompromised hosts and constitute an important public health problem. Molecular epidemiology study is important in elucidating the domestic as well as international transmission route and can contribute to the consolidation of control strategy.

In our previous research work in the past 3 years, we have successfully developed various rapid molecular diagnosis for clinically important fungi as well as typing methods for *C. albicans*. The research in this year serves as a continuation as well as end conclusion of our previous effort. The research focus in this year has expanded to include not only *C. albicans* but also *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida guilliermondii*. In addition to continuously compare and optimize typing methods such as PFGE, MLST and AFLP, we applied the typing techniques to analyze all the *Candida spp.* isolates collected from different hospitals in Taiwan. Our major findings can be summarized into three points: Firstly, different *Candida* species exhibited different molecular epidemiology characteristics. For *C. albicans*, the DNA type of each isolate was patient-specific and not associated with source of isolation, geographical origin or antifungal resistance. Whereas genotypes of *C. tropicalis* were highly correlated with fluconazole resistance. Secondly, the fluctuation of fluconazole resistance of the isolates collected from the same

patient is due to micradaptation leading to acquisition/loss of resistance phenotype rather than horizontal transfer of isolates from other patients. Thirdly, the relative superiority of the typing method in terms of discriminatory power is also species-specific. For *C. albicans*, the discriminatory power of MLST is higher than PFGE; while for *C. glabrata* is on the contrary.

In view of the digital nature of MLST typing, which can facilitate data exchange and comparison, we applied MLST in typing of *C. albicans* and *C. glabrata* isolates. With few exceptions, most of the Taiwanese isolates are separated from the clusters dominated by western isolates and showed higher similarity with Japanese isolates. The AFLP typing technique that we are currently developing can differentiate specific genetic marker. We hope to identify useful epidemiological, diagnostic and vaccine candidate molecules by using this technique.

The publication output of the project in this year has significantly improved both quantitatively as well as qualitatively. Eight SCI papers have been generated: 5 papers have already been published in SCI journals, one paper has been submitted to SCI journal, and two articles have been finished and is submitting now, 5 manuscripts are in preparation and will be submitted to SCI journals. Two further publications derived from collaboration have been submitted or completed: one with NTU teaching hospital on the clinical application of real-time PCR technique. The second one is collaboration with NHRI, combination of the antifungal susceptibility data with our genotyping technique to trace the clonal spreading of resistant strains.

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。除上述機緣性感染之案例外，肇因於都市發展、人口遷移及自然災害等因素⁶，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⁷及抗藥性菌株的浮現更增加問題的棘手性。

在美國南部(猶他州以南)及南美等地，是coccidioidomycosis、histoplasmosis及blastomycosis等雙型性高致病性真菌病原流行區。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coccidioidomycosis有顯著增加之趨勢，並因近來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⁸。以美國為例，自1989年起念珠菌*Candida spp.* 感染已躍居院內血流性感染的第四位⁹。其中白色念珠菌*Candida albicans* 佔系統性念珠菌屬的50%且為最具病原性的念珠菌¹⁰。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¹¹。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¹²。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。

Coccidioidomycosis曾見在考古隊挖掘洞穴時因灰塵揚起而爆發感染¹³。Histoplasmosis在因整建曾為鳥類棲息地的工程中灰塵揚起，而爆發仳鄰教室學生流行感染，該工地操場¹⁴；亦有因探索蝙蝠洞穴接觸塵土而爆發感染¹⁵；亦有整建老舊旅館工程造成居住旅客感染¹⁶。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¹⁷。以日本為例，基於日本在南美經貿觀光活躍，近十餘年來返國僑民之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。

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(*C. albicans*)為最^{18,19}。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²⁰。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²¹⁻²³。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^{24,25}。

抗真菌藥物仍有許多改善的空間^{26,27}。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，使得醫師在針對不同種別真菌用藥時有更多選擇。抗藥性亦已成為真菌感染的重要議題。自從azole類藥物尤其fluconazole上市以來，其低腎毒性、可口服及廣效性之優點，使其漸成為抗真菌用藥的首選之一。然而，對azole藥物具有抗藥性的菌株逐漸浮現，舉例如amphotericin B, flucytosine, itraconazole, ravuconazole及voriconazole對不同黴菌的抑菌濃度也有顯著不同²⁸，更增加問題的棘手性。如*C. lusitaniae*對 amphotericin B容易產生抗藥性²⁹。*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³⁰，*C. dubliniensis*

和 *C. tropicalis* 非常容易產生 fluconazole 的抗藥性³¹⁻³⁵。*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得知其對抗真菌藥物抗藥性以提供治療的參考³⁶。

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。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，特別是，這個菌種的發生率比其他高或為罕見菌種(如 *C. lusitaniae*, *C. lipolytica*)時³⁷。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變成是侵入性但在肝臟移植的病人則不會³⁸。可見早期及正確的診斷有助於病害診療及防治^{39,40}。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 Ink⁴¹，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⁴²，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⁴³。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⁴⁴。例如，利用樹脂凝集試驗法(LA)檢測*C. neoformans*抗原⁴⁵，以三明治酵素免疫反應(EIA)⁴⁶，免疫螢光染色(IF)⁴⁷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⁴⁸。利用抗體檢測來診斷全身性的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。是以抗原檢測對於診斷侵襲性念珠菌症可能是比較有用的方法。血液循環中多數的抗原已被當成診斷廣泛性念珠菌症(disseminated candidiasis)的標的。Secreted aspartyl proteinase (Sap)是一毒力因子⁴⁹⁻⁵²，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^{53,54}。此外，Mannan是*C. albicans*主要的細胞壁mannoprotein，為另一個有潛力的診斷抗

原。

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^{39,55}。以PCR配合酵素免疫檢測法EIA或RFLP技術^{56,57} 以及核酸雜合法^{58,59}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*⁶⁰之文獻。此外如應用在*Aspergillus spp*⁶¹, *Candida spp.*^{62,63}, *C. neoformans*⁶⁴, *Penicillium marneffei*及重要的雙型性酵母菌⁶⁵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⁶⁶。吾人日前發展出可鑑定7種臨床上常見真菌種別之PCR-EIA⁶⁷。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⁶⁸。晚近在2000年，日本Notomi等人研發出一種名為Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)的新型核酸增幅技術快速精確⁶⁹，藉由精密的引子及反應設計大幅提升了鑑別力，並簡化了反應的過程，被認為具有可加快醫療措施及防疫的啟動之潛力，然而其引子設計複雜普及性及應用

型仍有待觀察。新崛起的Pyrosequencing快速及時定序技術⁷⁰，亦提供短序列種別鑑定(50bp左右)⁷¹、real-time PCR增幅產物確認⁷²或SNP單點基因序列突變分析之新選擇。新發展的全基因體Pyrosequencing快速定序技術平臺，標榜數小時內完成全基因體定序，更將提供了令人瞠目的豐富資訊。

隨著序列分析的重要性增加，有許多研究者以菌種之間序列的核苷酸組成或長度差異來鑑定菌種^{73,74}，針對基因標的為ITS2或large subunit ribosomal DNA，可鑑定臨床重要真菌^{75,76}。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⁷⁷。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⁷⁸。這些真菌菌株基因序列資料若能更臻完備，不但可作為分類鑑定之依據，更可提供引子、探針設計的寶貴資料。此領域之進一步應用則是發展高通量之核酸檢測技術，核酸微陣列晶片，流式微珠陣列，可廣納大量特異性探針(上百至數萬)，且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⁷⁹，甚可納入可能變種及人畜共通病原，如此一來，可以極少量檢體做較全面且快

速的檢驗鑑定。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.*)已發展出來⁸⁰。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⁸¹。流式微珠陣列方面，Diaz和Fell近二年利用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)種別及*Cryptococcus neoformans*種群鑑定⁸²之新穎技術。Page和Kurzman最近則發表利用類似Luminex平台發展鑑定念珠菌等重要臨床酵母菌之最新應用⁸³。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。

念珠菌為常見的院內感染病原，多數感染案例之流行病學調查指向病人本身共生菌叢伺機感染所致，而非院內交叉感染所致⁸⁴，近來研究卻顯示外源感染(exogenous)如源自醫護人員、器械、環境之可能性⁸⁵。同為念珠菌屬，其內不同種別有其不同流行特性，以*C. parapsilosis*為例，屢見報導於早產新生兒及成人加護病房爆發感染之案例，常發現在照護醫護人員或家屬的手部培養菌叢，分析爆發流行菌株之特性，發現其基因型獨特並較純系化(clonal)，且具有易形成生物膜(biofilm)之特性⁸⁶。以DNA探針Cp3-13

等分型技術比對，顯示照護人員手部菌株型別與患者感染菌株具高度相關性⁸⁷，顯現監測醫護人員手部衛生及落實手部清潔習慣在防治之重要。HIV病人上*C. albicans*菌株之分子流行病學也是熱門的議題。曾見報告感染HIV病人的感染性菌株與共生菌株不同⁸⁸。然而也有研究觀察健康帶原者的分離株與HIV感染病人的菌株相類似⁸⁹。曾有*C. albicans*抗藥性菌株在家族成員間⁹⁰或經由伴侶口腔接觸而平行傳播⁹¹的報告，內源性感染之案例亦見報導⁹²。以EK及用27A重複性序列雜和，針對接受fluconazole治療HIV患者口腔所分離之*C. albicans*菌株做型別區分。結果顯示HIV病患口腔具複雜菌相，但各菌株仍具相關性，且有些菌株在治療過程會產生fluconazole抗藥性⁹³。27A探針雜和技術鑑別菌株，發現型別與地理區及抗藥性無關，亦反駁HIV患者所分離fluconazole抗藥性菌株具同一起源之說法⁹⁴。女性HIV病患常同時感染口腔及陰道念珠菌病，以RFLP及RAPD型別分析卻顯示，不同部位菌株的型別不同⁹⁵，流行病學特性亦有差異，口腔念珠菌病好發於CD4數目低下之患者，陰道念珠菌則否，這或許反映出口腔及陰道二部位黏膜免疫機制的不同⁹⁶。

各種病原真菌分子分型(molecular typing)的方法應運而出，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⁹⁷及抗藥機轉諸問題之闡明。常用的方法如，將基因組用酵素*Eco*RI, *Hinf*I和*Msp*I做RFLP⁹⁸

或RFLP結合探針雜交被應用於探討*C. albicans*菌株間演化、流病傳播⁹⁹和抗藥性相關問題^{100,101}。**EK**是利用脈衝式電泳，讓染色體DNA分離開來。**PFGE**則為將真菌染色體DNA以切點少的限制酶如*SfiI*¹⁰²、*SmaI*、*NotI*及*BssHII*¹⁰³水解後，將片段用脈衝式電泳得到特異性圖譜。這些PFGE分子分型方法被廣泛用來做流病爆發追蹤傳播途徑之調查，PFGE識別力及再現性均佳，堪稱為是流行病學分子分型分析的黃金標準。然而PFGE具有通量低(low throughput)、不易標準化、比對不易等缺點。全部基因組的PCR-fingerprinting則包括**RAPD**¹⁰⁴或者是**AFLP**¹⁰⁵，二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。AFLP利用嚴苛的PCR條件較諸RAPD再現性高。隨著分型樣本量的增加，國際間比對的需求殷切，分型方法需朝向高通量、數位化、網路化發展。核酸定序分析應是最客觀理想的分子分型工具，近來自動化定序技術越臻成熟，成本越趨合理，使得定序分型可行性增高。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)¹⁰⁶，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)¹⁰⁷。*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)¹⁰⁸ 。

2002年法國學者倡議建立MLST (milti-locus sequence typing)做為病原菌國際化比對的平台(<http://www.mlst.net>)。MLST原理為針對6-8個約500bp的持家基因(house-keeping genes)定序，每一條不同的序列皆被歸於一特定的alleles。每株菌株則依其這些特定持家基因 locus 上alleles的組合樣式形成其特定的序列樣式(sequence type, ST) 以茲比較。最早應用於MLST的菌是 *Neisseria meningitidis* 以後陸續有 *Compylobacter spp.* 及 *Streptococcus spp...* 等菌，至於可供比對資料的數目目前以 *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¹⁰⁹，利於實驗室間資料交換比對等優點¹¹⁰，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¹¹¹。其他如針對重複性序列DNA的分析，如rep-PCR¹¹²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^{113,114}。綜言之，適當分子分型工具的挑選應視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、可數位輸出、網路化、標準化與建立資料庫¹¹⁵。

本計畫今年度之主要目的在於發展*Candida spp.* 具高鑑別力之分型方法、認識全國各種念珠菌(*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. gilliermondii*, *C. parapsilosis*)之分子流行病學概況。發展標準化方法及建立資料庫平台，協助國內相關單位建立技術，提供教育訓練及分型服務。發展與國際接軌的分子分型技術，並與國際交換型別資料，建立全球監測及防治網絡。

,

二、材料與方法：

(一)、菌株來源及培養：

包括從疾病管制局例行檢驗檢體分離之菌株，並與醫院合作收集國內臨床菌株及國衛院 Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts Projec (TSARY) 1999 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 VITEK 酵母菌生化卡片自動鑑定系統。

C. albicans 之 MLST 試驗包含 2 株參考菌株及 51 株的 *C. albicans* 臨床分離菌株可分為三組：Group 1 包含由 TSARY 1999 所收集的 16 株分離菌株(P1-P16)，這 16 株菌株是由不同區域的 22 家醫院於 1999 年 4 月 15 日至 6 月 15 日所收集的。Group 1 菌株之收集是每個一感染只分離一株菌株，所以在流行病學上不相關。Group 2 包含 28 株(P17-P27)由於大型教學醫院成人加護病房住院 6 個月的 11 個 HIV-negative 病人所分離。Group 3 包含 7 株(P28-P30)於 1999 至 2000 年間由 3 個 HIV-positive 病人口腔分離。每一株臨床菌株包含的資訊有 fluconazol 抗藥性測試、地域來源和由身體何部位分離，還包含是否為院內感染¹¹⁶。主治醫生根據美國疾病管制局制訂標準決定是否為院內感染¹¹⁷。每次院內感染事件僅取一株代表性菌株。*C. albicans* 分離株的 fluconazol 抗藥性 MICs 測試用 microdilution broth 的方法，根據 NCCLS 公布文件 M27-A¹¹⁸。另外為研究本土菌株與國際菌株之類緣及演化之關係，選用 18 株日本菌株、5 株美國菌株、5 株英國菌株、5 株法國菌株及 103 株本土菌株做比較。18 株日本菌株是與日本千葉大學真菌研究所交換來的菌株。

C. glabrata 菌株來源由台大醫院及國家衛生研究院提供，在 MLST 共分析 84 株包含 1996 年國內台大醫院臨床菌株 41 株，2002 年國內愛滋病患(YH 編號)14 株與國外菌株 29 株(CG1-CG29)。其中扣除序列不理想者，共分析了國內臨床菌株 46 株與國外菌株 29 株。

C. tropicalis 菌株分別來自於國衛院以及台大醫院。國衛院的 36 菌株是由不同區域的 10 家醫院於 1999 年 4 月 15 日至 6 月 15 日所收集的。而另外 70 株國衛院菌株也是同期收集於不同區域的 18 家醫院。另有 74 株台大醫院臨床菌株是從 1996 年 10 月收集到 1997 年 3 月。

21 株國衛院 *C. parasilosis* 菌株是由 TSARY 1999 收集自 10 家醫院。

C. guilliermondii 包含 6 株 TSARY 1999 臨床株，1 株台大醫院菌株及 1 株 BCRC 212559 標準株

發展 AFLP 分型方法共計使用 122 株 *C. albicans* 臨床菌株和 1 株標準菌株。

(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 of DNA Hydration Solution 讓 DNA 溶水。以分光光度計(A_{260})測 DNA 的質量，保存於 -80°C。

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

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

(四)、脈衝式電泳(PFGE)及 *BssHII* 限制酶切片段分析.

PFGE 及 *BssHII* 限制酶片段分析之操作細節詳見已發表之論文¹¹⁹。以 IS-1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Calif.) 之照相系統照相並存取圖形。利用 Bionumerics 4.0(Applied Maths, Kortrijk, Belgium) 分析軟體擷取影像檔，並且以樹狀圖比較各菌株間之類緣關係。位置差異範圍在 1% 可忍受，而最佳化是設在 3%。使用擲骰子係數(Dice Coefficient)去分析片段相似度(S_{AB})，樹狀圖分析採用 UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic average) 的方式。當分離株片段相似度小於 95% 時，被認為是不同的 PFGE genotypes¹²⁰。

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

1. *Candida albicans*

依據選擇最少持家基因得到最大的 discriminatory power 的原則，自十個持家基因(housekeeping gene loci)選出七個 *AAT1a*、*ACCI*、*VPS13*、*MPI*、*ADP1*、*ZWF1* 及 *SYA1*¹²¹。而每個 locus 之 primer

的使用為 fragment 經 PCR 反應放大至 478-741bp (詳見表一)。以 PTC-200 96-well thermal cycler (MJ Research)進行 PCR 反應。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。定序反應使用的引子與 PCR 反應相同，並定序正反二股，反應之分析使用 ABI 3100 avant (PE Applied Biosystems)。

2. *Candida glabrata*

選擇六個 housekeeping loci 分別為 **FKS**、**LEU2**、**NMT1**、**TRP1**、**UGP1** 及 **URA3**，而每個 locus 之 primer 的使用為 fragment 經 PCR 反應放大至 500-700bp(詳見表七)。

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 55°C, 1min \rightarrow 72°C, 1min 的反應，最後為 72°C, 4min 的反應。

(六)、核酸序列比對分析、運算及資料庫建立

將定序後的圖形檔轉入 Bionumerics 4.0 分析軟體，在軟體上比對每個 locus 的序列後，上網 (<http://www.mlst.net>) 比對各 locus 的基因型。並且將所有菌株所有 loci 的型別組合為個別的 sequence types(STs)，建立台灣念珠菌菌株之資料庫。台灣不同區域所分離之菌株與英國及美國菌株之比對，由 Tavanti 等人所發 MLST data 的每一個群選擇一株與台灣不同縣市所分離之菌株作比對。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)、MTL and ABC typing

MTL typing 使用之 primers 如下：

MLT α 為 Fwd (5'-GAATTCACATCTGGAGGC-3') 及

Rev (5'-CAAAGCAGCCAACTCAGG-3')，

MLT α 為 Fwd (5'-ACCTGCATGAAGAACAG-3') 及

Rev (5'-GTGGCTAGGTTGAATTG-3')。

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

ABC typing 增幅 25S rRNA 轉錄間隔區 PCR 依循已發表之方法並稍加修改¹²²。使用之 primers 為 CA-INT-L (5'-ATA AGG GAA GTC GGC AAA ATA GAT CCG TAA-3') and CA-INT-R (5'-CCT TGG CTG TGG TTT CGC TAG ATA GTA GAT-3')。PCR 反應， $50\mu\text{l}$ 試劑包含 100 ng 的 genomic DNA, 2.5 U 的 DyNAzymeTM II DNA polymerase (Finnzymes), $5\mu\text{l}$ 的 $10\times$ reaction buffer (supplied with the enzyme), $200\mu\text{M}$ 的 dNTP mix，及 $1\mu\text{M}$ 的 primers。反應條件為 $94^\circ\text{C}, 3\text{ min}$ ，接著進行 30 cycle $94^\circ\text{C}, 1\text{ min} \rightarrow 65^\circ\text{C}, 1\text{ min} \rightarrow 72^\circ\text{C}, 2.5\text{ min}$ 的反應，最後為 $72^\circ\text{C}, 10\text{ min}$ 。*C. albicans* 基因分型依 PCR 產物大小來決定：A 型 ($\sim 450\text{ bp}$)，B 型 ($\sim 840\text{ bp}$)，C 型則有二個 PCR 產物 ($\sim 450 \& \sim 840\text{ bp}$)。

(八)、鑑別力的計算：

四種分型法的個別識別力指數(discriminatory index, DI)由辛普森多樣性指數(Simpson's Index)決定¹²³。測試族群中兩個不相干的種被放入不同型族群中，DI 數值如果是 1.0，表示此種與此族群可區分；相反的，DI 值為 0.0，表示此種與此族群為同一種。

(九)、增幅片段長度多型性分析(AFLP)

1. 限制酶切及以接合子接合：

取 10^7 CFU 的真菌細胞並抽取 DNA。取 100ng 的染色體 DNA 並加入 5U 的 EcoRI 和 1U 的 MseI (New England Biolabs, Beverly, Mass.) 於酵素緩衝液(restriction buffer)內進行酶切，反應總體積為 $10\mu\text{l}$ 。酶切反應 37°C 下進行 2 小時。限制酵素切後，取 $10\mu\text{l}$ 的酶切產物移置新反應管，內含已加入的 $0.5\mu\text{l}$ 1mg/ml BSA, $1\mu\text{l}$ 0.5M NaCl, 2 pmol 的 EcoRI 接合子, 20 pmol of the MseI 接合子, 80 U of T4 DNA ligase, 2 μl of a 10X T4 ligase buffer (United States Biochemical, Cleveland, Ohio)。反應總體積為 $20\mu\text{l}$ 。接合反應於 37°C 下進行 2 小時。

AFLP 所用接合子和引子如下：

接合子或引子		序列
Adaptor	<i>Eco</i> RI adaptor	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
	<i>Mse</i> I adaptor	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-CTACTCAGGACTCAT-5'
1st PCR Primers	<i>Eco</i> RI-A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
	<i>Mse</i> I	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'
2nd PCR Primers	JOE- <i>Eco</i> RI-AA	JOE -5'-CAATTCAA-3'
	<i>Mse</i> I-C	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'

2. 前篩選PCR和篩選PCR：

所得反應混合物以水稀釋十倍。使用包含 AFLP primers, core mix, 和 internal size standard 的 AFLP 套組(Applied Biosystems Foster city, CA.)。前篩選 PCR 的 core sequences 為不含 nucleotide extensions 的引子。PCR 增幅反應總體積為 10 μ l 內含 2 μ l 的 10 倍稀釋的接合反應產物, 0.3 μ l 的 *Eco*RI core sequence, 0.3 μ l 的 *Mse*I core sequence, 和 7.4 μ l 的 AFLP amplification core mix。反應物進行 PCR 增幅 (Whatman Biometra T3000 thermocycler machine)。增幅溫度條件： 94°C 5min, 20 次循環的 94°C 30 s 和 65°C 30 s, 最後延長反應 72°C 1 min。再接著最後延長反應 72°C 及 10 min。接著的後增幅反應則是使用 *Eco*RI-AA-JOE 和 *Mse*I-C 引子(表 2) 增幅溫度條件： 94°C 5min, 12 次循環的 94°C 30 s 和 65°C 30 s, 黏合反應每循環降 1°C，最後延長反應 72°C 1 min。再接著最後延長反應 72°C 1 min 和 23 次循環的 94°C 30 s, 56°C 30 s, 和最後延長反應 72°C 1 min。再接著最後延長反應 72°C 及 10 min。進行毛細管電泳之前處理則是將 0.5 μ l 的篩選 PCR 產物添加於 10 μ l 的混合液，混合液包括 1:40 的 GeneScan-500 6-carboxy-X-rhodanine [ROX] labeled 和 deionized formamide 做為內部標準品。混合液加熱 94°C 3 min, 接著置於冰上冷卻。

3. AFLP 片段分離偵測及資料分析：

AFLP 增幅產物以 ABI3100 avant 全自動定序分析儀分析。並以 Bionumerics, 版本 4.0 軟體分析圖譜(Applied Maths) 使用 Dice 做出相似度係數並以 UPGMA 做樹狀圖群組分析。

三、結果：

(一) 利用 PFGE 分型探討國內念珠菌之分子流行病學

1. *C. glabrata*

C. glabrata 的染色體核型分型(見圖一)包括 33 株 TSARY 1999 菌株、24 株 HIV 病人菌株及 19 株台大醫院 ICU 病人等共 76 株，以類緣關係 71.6% 為分際，可將所有 *C. glabrata* 區分為 4 個 Group，初步分析與地理區域、Fluconazole MIC、院內感染與否較無關性。Group3 幾乎皆為 HIV 病人，Group4 的 ICU 病人株與其他菌株親緣性較低。與 MLST 方法之一致性是相同病人的菌株其關聯性高，如六名 HIV 病人的 YH020047- YH020048；YH020191- YH020193；YH020359-YH020361；YH010383-YH010385； YH020293- YH020294；YH020354- YH020355 菌株。三名 ICU 病人的 DOH86h059&DOH86h075; DOH86i011, DOH86i013& DOH86i024; DOH86i029, DOH86i031 DOH86i032 菌株。相同病人的菌株其抗藥性雖有高低起伏，但型別關聯性仍高

2. *C. tropicalis*

利用 PFGE- *Bss*HII 分型收集 1999 年 TSARY 的 162 株 *C. tropicalis* 分離株，所有分離株中有 129 株對 fluconazole 敏感(占 79.6%)，10 株

依靠敏感藥劑 susceptible-dose dependent (占 6.2%)，有 23 有抗藥性(占 14.2%)(見表一)。70 株從全省獲得的 *C. tropicalis* 分離株(見圖二)，以 85% 區分，主要可區分成兩大群與數小群。除 CDC-F003000129，CDC-F003000349 與 CDC-F003000359 三株外，其他具抗藥性菌株都座落在第一群，W6 醫院的菌株主要在第一群或者其他小群，並無在第二群中發現。而 N8 醫院除 CDC-F003000081 與 CDC-F003000083 兩株例外，其他都在第二群中。第一群中源自 W6 醫院的菌株相似度為 100% 的四株分離株，有三株為院內感染，一株不是；而第二群中 N8 相似度為 100% 三株的分離株，有兩株為非內感染，另一株為院內感染，此外，分離來源分佈亦相當廣泛。進一步將各間醫院隨機取約 1/5(約 36 株，其中 23 株為抗藥性菌株跟 13 株為敏感性菌株)的臨床菌株用最有識別力的 PFGE-BssHII 方法分型，來做 *C. tropicalis* 抗藥性基因關係。由圖三可看出，主要可區分成兩群，與抗 fluconazol ($MIC > 64\mu\text{g/ml}$) 的敏感性有密切相關連。再以 80% 細分次族群，可以看出在 13 株敏感性菌株中可分成 3 群，分別有 7 株、5 株跟 1 株，而在 23 株抗藥性菌株中可以分 19 株(占 82.6%)、1 株跟 3 株。而且其中來自 N2 的 5 分離株有相同的片段組成。利用 PFGE-BssHII 比對台大醫院提供 74 株 *C. tropicalis* 菌株與國衛院的 36 分離株樹圖(圖四)

發現，主要分成兩群，台大醫院尚未做 fluconazol 抗藥性測驗，可看出同一病人的分離株大多歸在同一群，與不同部位、醫院病房與採檢日期並無相關，而國衛院的抗藥性測驗的分離株依舊分成兩大群。

3. *C. parasilosis*

由圖五可看出，21株*C. parasilosis*的相似度在80%以上，而且檢驗結果皆無抗藥性。除分離株CDC-F003000383與CDC-F003000231外，可發現北部的分離株自成一族群，與其分出來的部位跟是否為院內感染無相關。不同顏色星號代表不同間醫院的分離株，相似度最高達100%，最低亦有到89%。

4. *C. guilliermondii*

C. guilliermondii (圖六) 三種 PFGE 間方法之比較是 PFGE 與 PFGE-S_fI 間一致性高，CDC-003000119、CDC-003000261 與 CDC-003000317 在同一 Group，而 CDC-003000071、CDC-003000128、CDC-003000171 與 CDC-003000441 在另一 Group。因 PFGE-B_sHII 大多數的 band 集中於 40-100kb，因為太密集之故，區分及分辨之力較差。

5. 測試不同限制酵素針對 *Candida spp.* 標準菌株 PFGE 的效果

圖七顯示 *Candida spp.* 脢切前染色體核型 PFGE 的情形，依種別不同，染色體數在 5~9 條之間，分佈分子量範圍在 0.45~3.13Mb 之間。PFGE 圖八~十三顯示使用十二種不同罕切(rare-cutting)限制酵素處理 *C. albicans* ATCC90028、*C. glabrata* ATCC 9003、*C. tropicalis* ATCC 13808、*C. parasilosis* ATCC 90018、*C. guilliermondii* BCRC212599、*C. krusei* ATCC 6258 標準菌株的結果，*BssHII* 處理對 *C. albicans*、*C. glabrata* 及 *C. krusei* PFGE 分離，分別產生 31、34 和 41 條均勻分佈於 20~1135Kb 之間的片段，效果最佳。*C. tropicalis* 和 *C. parasilosis* 使用 *BssHII* 處理，分別產生 27 和 26 條的片段，分佈亦算均勻，但偏在稍下方約 30~600Kb 之間。至於 *C. guilliermondii* 的片段則完全擠在下方約 40~100kb 之間。

(二) 利用 MLST 分型分析類緣性及與國際菌株之關係

1. *C. albicans*

我們利用 MLST 及 PFGE 限制酵素脢切來定義區分收集自台灣 12 家醫院的 51 株 *C. albicans* 臨床菌株 之基因型。這 51 株菌株中，16 株為流病不相關菌株，28 株來自 11 個重症非 HIV 之病人，而 7 株菌株為長期分離自 3 個 HIV 陽性病人。定序分析 7 個持家基因 (AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1b) 共計 2883bp 的結

果共發現 83 個多型性變異。每一個基因座上出現 10-20 個不同等位基因(表二)。表三顯示利用 PFGE 限制酵素酶切及 MLST 來定義區分 51 株 *C. albicans* 臨床菌株及 2 株參考菌株之基因型。詳述每一株分離株的 alleles，雙倍體基因型 (diploid sequence type, DST) 及醫院來源及分離部位。各 loci 上基因型由 10~20 不等。組合之下 51 株菌株形成 45 個不同 DST。MLST 可以追蹤 *C. albicans* 分離株在同一個病人的微適應(microadaptation)。台灣菌株的所有 DST 與網路上 *C. albicans* DST 資料庫 (test1.mlst.net)比對結果均是新的。流病不相關的 Group 1(P1-P16)表現不同的 PFGE-*BssHII* genotypes 及 MLST DSTs，菌株基因型別與檢體種類醫院來源及抗藥性 fluconazole 無關。來自重症非 HIV 之病人 Group 2，大部分來自相同病人的分離菌株顯示相同的 PFGE-*BssHII* genotypes。少數菌株有相同的 PFGE-*BssHII* genotypes 外也具有相同的 DSTs (0-2 個 alleles 的不同)。這可能是由於菌株在同一病人上具有微適應(microadaptation)。P28-P30 是由長期 HIV 病人的口腔所分離，由同一個病人分離的所有菌株顯示出不同 PFGE-*BssHII* genotypes 及 MLST DSTs。由 MLST 方法顯示時間會造成 alleles 的改變，P29-3 與 P29-2 分離時間相差 2 年具有 1 個不同 alleles，P29-3 與 P29-1 分離時間相差 3 年具有 2 個不同 alleles。經過一段長時間及

抗真菌藥物治療的結果造成菌株的微適應(microadaptation)。18-1, 18-2, and 18-3 是分別由一個 ICU 病人的痰液，尿液及肛門拭子分離所的菌株，結果顯示這些菌株具有不同的 PFGE-*Bss*HII genotypes 及 MLST DSTs，繼續分析這三株菌株 25S rRNA typ 結果顯示為不同型別(分別為 A, B, C types)。這時實現結果證明在同一病人的不同部位特別是非無菌部位可以分離出不同的菌株。

ABC 分型結果顯示所有來自英國及美國的菌株均屬於 A 型，除了 UK2 和 US2 屬於 B 型。台灣收集的菌株與英國及美國菌株 ABC 型別分佈比例不同，歐美有較多的 A 型，B 型較少而 C 型則罕見¹²⁴，台灣則具有約相同比例的 A (22/51, 43.1%) 和 B 型 (23/51, 45.1%)，僅有 6 株是 C 型。所有的 HIV 病人均為 A 型，除了 28-1 和 28-2 屬 B 型為例外。MLST 型別與 fluconazole 抗藥性無關。所有菌株在交配型基因座(mating type locus)均為雜合型，僅 P29-3 例外為 MLT *a* 型。

在 83 個多型性變異中 30 個(36.1%)是 synonymous, 53 個(63.9%)是 nonsynonymous。在 30 個改變的胺基酸中 20 個是 substantive changes(表四)。在七個定序分析的片段以 ATT1a 有較高的鑑別率(10

個 polymorphic site 有 19 個不同的 alleles)，依序是 ACC1(6 個中有 11 個)， SYA1 (13 個中有 20 個), ZWF1b(13 個中有 17 個), VPS13 (16 個中有 20 個), ADP (10 個中有 10 個)及 MPIb (15 個中有 14 個)。目前已解序的台灣本土菌株可提供國際比對網站共計有 23 個新的 alleles，ACC1 有 2 個、ADP1 有 1 個、MPIb 有 3 個、SYA1 有 6 個、VPS13 有 5 個及 ZWF1b 有 6 個。

MLST and PFGE- *BssHII* 鑑別力的比較顯示(表六)，MLST 的鑑別力比 PFGE- *BssHII* 高，MLST 方法在 51 株菌株組合七個 MLST loci 的多型性變異可形成 45 個不同 DST (discriminatory index, DI=0.995)，PFGE- *BssHII* 方法區分出 40 種 DNA pattern (DI=0.991)。在 16 株流病不相關菌株，MLST 及 PFGE- *BssHII* 的鑑別力是相同，二種方法都形成 16 種不同的基因型。在 35 株流病關菌株，MLST 有較高的鑑別力。

圖十四之一親緣性樹狀圖(dendrogram)顯示出利用 7 個持家基因所做 MLST 決定 51 株 *C. albicans* 臨床菌株間之類緣關係。親緣性樹狀圖的 threshold 為 99.17 %，結果顯示菌株分為二群(I, II)，所有來自 HIV 病人的分離菌株均為 cluster I，除了 28-1 外。來自同一個病人

的分離株會歸於同一群，長期由 HIV 病人的分離菌株，顯示不同分離年代會有不同基因型。所有源自英國與美國的菌株除了編號 UK2 和 US2 的二株外，均屬於 cluster I。MLST DST types 及 PFGE pulsotypes 都與 fluconazole 抗藥性及醫院來源無關。

我們進一步比較本土菌株與國外菌株的差異，我們使用 103 株本土菌株，18 株日本菌株，5 株美國菌株，5 株英國及 5 株法國菌株，範圍除了亞洲外還包括美洲與歐洲。就樹狀圖類緣關係之分析(圖十四之二)，美國菌株位於 Group I 與 Group II，其中 US-2 與 US-3 與其他菌株差異最大。就歐洲菌株觀之，英國菌株除了 UK-2 外其他均屬於 GroupII 與 GroupIII，大多數菌株屬於 GroupII 的上半部；法國菌株同樣除了 FR-4 外其他均屬於 GroupII 與 GroupIII。日本菌株除了 JP8 與 JP11 外均屬於 GroupII 與 GroupIII。

就 Minimal spanning tree (MST) 演化樹關係之分析(圖十五)，自中心點向外區分為 5 個族群，大多歐美菌株(UK-3~UK-5, US-1, US-4~5, FR-2, FR-5)及參考菌株集中於 Group4，顯示這些菌株間演化關係較為接近。其他歐美菌株除了 FR-3 外均位於該群的末端，顯示與本土菌株雖屬同一族群，但是與本土菌株還是有 10 個 base 以上之

差距。日本菌株大多分散於 2~4 群，第 5 群僅有 JP-7 與 JP-17，這兩株演化上最接近。大多數日本菌株分散於本土菌株的演化樹中，顯示台日間菌株之間的類緣性較近。MST 的分群歸屬與 ABC 型別具相關性。群 1 及群 2 屬 A 型。群 3 屬 B 型。群 4 則為 A 型及 B 型綜合。群 5 則為 A 型及 C 型綜合。英國及美國的菌株主要分佈在群 2，有少數在群 4。

2. *C. glabrata*

本次 *C. glabrata* 菌株共分析 84 株包含 1996 年國內臨床菌株 41 株，2002 年國內愛滋病患(YH 編號)14 株與國外菌株 29 株(CG1-CG29)。其中扣除序列不理想者，共分析了國內臨床菌株 46 株與國外菌株 29 株。國內菌株經 MLST 分析，主要的 Sequence type 可分為 13 型，其中 5 型與目前國外資料庫(<http://cglabrata.mlst.net/sql/sthtml.asp>)所公布的 36 型中較為相似(表八)。細分個別基因型則為 *FKS*, 6 型；*LEU2*, 4 型；*NMT1*, 6 型；*TRP1*, 9 型；*UGP1*, 3 型；*URA3*, 8 型(表九)。在個別基因方面經統計其變異率分別為 *FKS*, 1.7%；*LEU2*, 1.2%；*NMT1*, 2.1%；*TRP1*, 2.6%；*UGP1*, 0.6%；*URA3*, 1.8%(表七)，並根據不同 Sequence Type，使用 BioNumerics UPGMA 分群系統，可將所收集的菌株在 99%的相似度下做分離株間

的類緣分析(圖十六)。在類緣關係下，依據病患個體，可在最低 99.5% 的相似度下分成 4 群 (Group1-4)。其中發現大多數愛滋病患分離株對於抗生素 Amphotericin B 及 Fluconazole 之 MIC 值似乎符合分群結果。而群落 1 則主要為國外菌株。依照分群結果，*C. glabrata* 分離株主要以病患個體為一單位，少數發現同一病患不同分離部位產生偌大的差異現象(9.3%)。經由 Minimun Spanning Trees 系統分析國內外分離株之間的差異以瞭解國內 *C. glabrata* 是否與國外有交互關係(圖十七)。在圖形的分佈上，國內分離株主要屬於小群落分佈且多獨立於國外分離株，只有零星國外菌株與國內相似 (~6.7%)，且以少量集中在不同群落之中，並無平均的散佈在各群落間。

(三) 利用 AFLP 分型分析類緣性及鑑別特異性片段

AFLP(圖十八) 以 92.49%為標準區分為 4 個 Group，與 MLST 方法之一致的是日本菌株分散於各 Group 中。

四、討論：

侵襲性念珠菌感染身體病弱及免疫缺損病患族群中造成高合併症及致死率而成為公衛上的隱憂。近年來，病原菌隨著國際旅行、候鳥的遷徙或全球食物供應鏈，甚且生物恐怖蓄意釋放傳播的案例日益增加，如SARS，禽流感，MRSA，和食因性病原如*E. coli*與*C. jejuni*¹²⁵等，開發分型技術，有助於瞭解病原間之類緣性及分子流行病學，進而釐清病原之傳播途徑及跨國傳播之情形，有助於國際疫情監測及共同防治。美國CDC建立以PFGE技術的PulseNet於食物中毒流病調查上之應用情形，示範了PFGE技術作為食因性病原追溯感染源頭及發揮預警效果，避免疫情擴大之實例探討。

適當分型方法的選擇依應用目的而異，針對短期(數天至數月)、地區性小規模(數個至數百人)疑似爆發流行的調查，應盡量選擇高鑑別力的分型方法。針對長期(數年乃至數十年)、全球性、大規模(可達上千人)的跨國傳播監測或長期防治成效之評估，此時的分型方法應顧及鑑別力與遺傳演化穩定度之平衡考量，並應盡量選擇方便實驗室間(最好可透過網際網路)比對，簡單、再現性高的分型方法¹²⁶。

非 *C. albicans* 的感染如 *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* 和 *C. lusitaniae* 已經顯著增加。其中 *C. tropicalis* 和 *C. glabrata* 往往高居二或三

位。而且，非 *C. albicans* 的菌種往往比 *C. albicans* 對 fluconazole 抗藥性及致死率更高。臨床性來說，*C. tropicalis* 對 fluconazole 抗藥性增加被認為更重要，因為其為非 *C. albicans* 中最常見分離株。本研究除持續探討 *C. albicans* 分子流行病學外，亦擴充探討其他非 *C. albicans* 的 *Candida spp.* 之分子流行病學。

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

C. albicans 等伺機性真菌在免疫缺損的病患常造成高死亡率的系統性感染¹²⁷。不明的口腔念珠菌病向來被視為感染了 AIDS 或 HIV-病人免疫缺損惡化的先期指標¹²⁸，1/3 的病人晚期有口腔有 *C. albicans* 抗藥性菌株的出現¹²⁹。HIV 患者 *C. albicans* 帶原量及引發鵝口瘡之機率在 CD4+ 數量低下時明顯升高¹³⁰。HIV 病人因抗藥性菌株引發的口咽念珠菌症已成為主要問題¹³¹ 依據台北市立性病防治所 207 位 HIV 感染患者口腔表徵之發生率，發現口腔念珠菌病為 12.1%。其中仍以 *C. albicans* 最為常見，而非 *albicans*

的念珠菌感染與 CD4 lymphocyte 低下及 azole 療程有關，這些非 *albicans* 的念珠菌也較易發展出抗藥性且常與 *C. albicans* 混合感染，因此在治療投藥時應加以注意¹³²。此外，在泰國的 HIV 患者研究顯示感染新型隱球菌患者感染之 HIV 亞型為 CRF01_AE (舊稱亞型 E)。

台灣所分離 *C. albicans* 菌株的 DST 與英國及美國的菌株利用 UPGMA 和 minimal spanning tree 分析比對，結果顯示就台灣國內分離菌株的 DNA type 具為病人專屬，與 ABC type，愛滋族群與否、分離年代有關；而與分離部位，醫院來源及 fluconazole 抗藥性無關，這與前人的研究報告相當一致。但就較廣大地理區域而言，DST type 與國別則具相關性。我們與日本千葉大學交換來的 20 株 *C. albicans* 菌株，分析結果顯示我們的菌株與日本類緣性較近，而與歐美的較遠。基於台日地理上鄰近且二國互動頻繁，這也是可預期的結果。

C. glabrata 的 PFGE 核型分型初步分析與醫院別、fluconazole MIC、院內感染與否較無關性。相同病人的菌株其關聯性高，如六名 HIV 病人和三名 ICU 病人的菌株。源自 HIV 病人的菌株似乎也有聚集成群的傾向。*C. glabrata* 的染色體核型分型與 MLST 方法具一致性，相同病人的菌株其關聯性高。與我們 *C. albicans* 的結果相同的是，由同一 HIV 病人長期分離菌株感受性的改變，但其型別類緣性仍十分近似，顯現可能由於內源性菌株產生

突變而非抗藥性菌株在病人間的平行傳播。*C. glabrata*的染色體分析顯示，在1.4~2.2Mbp間的第12及13條染色體或稱L及M染色體因為內含rDNA重複序列，故會因重複序列數目之多寡，分子量有極大之變異性。但目前看來，此變異性並不影響分型之準確性，故分析時不需要加以剔除。

瞭解抗藥性菌株基因型的變化可能有助於抗真菌的治療療法，我們針對 *C. albicans* 的研究，清楚地顯示每個菌株的 DNA 型別是病人特有的，與個別病人有關而和院內感染與否，分離部位，醫院來源，並無引起院內感染能力或血流感染的特別基因型占優勢。型別與抗藥性之間並無相關性這這與前人的研究相當一致^{133,134}。可能 *C. albicans* 對 fluconazole 藥物敏感性的變化是由於染色體 DNA 相關抗藥性基因的微小變化有關¹³⁵。若想偵測突變、缺失或者插入是否與抗藥性有關，基因定序分析應該比基因指紋法更適合¹³⁶。反之，*C. tropicalis* 對 fluconazole 感受株和抗藥株(MIC>64μg/ml)間及侵襲感染株和移生株間屬同類緣株系。分子分型方法可反映出 *C. tropicalis* 抗藥性造成的染色體改變。我們回溯分析某些醫院菌株疑似曾發生過院內感染的現象。然而代表不同地域代表性不同醫院基因型廣泛分散，顯現基因型與醫院別兩者間並無相關性，而且不同分離部位分離株基因型也分散。顯示 *C. tropicalis* 的 DNA 型別與個別病人、HIV 感染與否、對 fluconazole 的抗藥性有關而和院內感染與否、分離部位、醫院來源等無

關。

以 PFGE 為調查工具，韓國 *C. tropicalis* 的研究報告中指出，在兩間醫院 *C. tropicalis* 菌株類緣性低，屬於個別獨立感染事件。而在台大醫院發表文章發現在 *C. albicans*、*C. glabrata* 及 *C. parasilosis* 菌株 PFGE 核型(EK) 分型結果，證明主要在同一病人不同部位有相同的片段組成，但卻在 *C. tropicalis* 無明顯此特徵，利用台大醫院提供的 *C. tropicalis* 菌株與國衛院的比對樹圖發現，與國衛院一樣主要分成兩群，或許同一病人卻非在同一族群內，是因為受抗藥性影響。可進一步對台大醫院的 75 株分離株做 fluconazole 的抗藥性測驗，看是否與其有關。雖然圖六大致來看，分離來源、是否為院內感染及採樣醫院，其實分佈相當廣泛，但由 W6 與 N8 的分群推測，其實菌株還是有區域性的分佈。而抗藥性菌株大多座落在第一群，表示菌株有受抗藥性影響。而在第一群中 W6 相似度為 100% 四株的分離株，有三株為院內感染，一株不是；而第二群中 N8 相似度為 100% 三株的分離株，有兩株為非內感染，另一株為院內感染，此外，分離來源分佈亦相當廣泛，所以推測基因型別與醫院來源有關而非是否為院內感染或者是分離來源影響。

C. parasilosis 的 PFGE 分型結果可發現北部的分離株自成一大族群，推測 *C. parasilosis* 在台灣分佈有區域性，但 *C. parasilosis* 的樣本比較少，所以

推測是否正確，需要採集更多分離株來比對。相同醫院內分離株，相似度

最高達100%者，推測應為同一病人來源，但病人來源資料已經無法考。

*C. parapsilosis*和*C. lusitaniae*由於是常分離自環境表面和醫護人員手部的病

原，因此當發現環境分離株與感染病人菌株型別一致時，應特別警惕院內

感染的可能性。

C. guilliermondii 三種 PFGE 方法間 PFGE 與 PFGE-*SfiI* 間一致性

高。我們過去曾系統性的比較四種不同分型方法在 *C. albicans* 分型上的

鑑別力，發現 PFGE-*BssHII* 鑑別力最高。理想的指紋法片段在廣泛分子

範圍內應包含 20-30 條。而限制酶 *NotI*，或者 *SmaI*¹³⁷ 在窄的分子範圍

內大約有 10 條片段，並不合適。PFGE-*SfiI* 與 PFGE- *BssHII* 各辨認 13

和 6 bp 的限制酶切位，提供感染性 *C. albicans* 分子分型更多分析能力。

限制酶 *SfiI* 產生 18-22 條清晰片段(平均 20 條)，可清楚的區別片段範圍

由 40 到 1100kb。PFGE-*BssHII* 片段更多(平均 31 條，範圍由 50 到

1000kb)，區別能力最強，但相對要比 PFGE-*SfiI* 花更多時間去辨認及計

數其片段。而本研究顯示，針對 *C. guilliermondii* 的 PFGE， *BssHII* 僅

產生 15 個片段，且片段多集聚在甚窄的分子量範圍內，故鑑別力十分不

理想；反之，*SfiI* 產生 41 個均勻分佈的片段，對 *C. guilliermondii* 為較適

合的酶切酵素。我們的結果也顯示，雖然 *C. tropicalis* 和 *C. parapsilosis*

用 PFGE-*Bss*HII(分別產生 27 及 26 個片段)所得效果尚可接受，但若 *C. tropicalis* 用 *Nae*I (34 個片段)，*C. parapsilosis* 用 *Pac*I (36 個片段)其分別鑑別效果應該會更改善。曾有研究報導 PFGE-*Bss*HII 分型對 *C. albicans*, *C. tropicalis* 和 *C. krusei* 分型效果佳；但對 *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guillermondii*, *C. pseudotropicalis* 和 *C. lusitaniae* 分型效果卻不彰^{138,139}。我們的結果與前人報導均顯示了 *Candida spp.* 的最適合的酶切酵素依種別而異。

PFGE 相關方法主要在於在區別 DNA 的指紋片段，主要原理乃基於個別酶切多型、易位¹⁴⁰，或不包含 rDNA 染色體的重組或 rDNA 作用子(cistron)非互補的重組¹⁴¹ 的結果。PFGE 方法需有嚴格的標準化程序，以保證實驗室間比對的品質及再現性。MLST 分型方法的原理是基於 *Candida* 的持家基因突變或重組產生變異，可據多個等位基因樣式組合以定義每株菌株的基因型，並比較菌株間之類緣關係及菌株間核苷酸置換改變的情形^{142,143}。MLST 的資料明確並利於儲存在一個中心資料庫，可很方便地經由網路交換分子型別資訊，有利於全球流病監測資料之建立。如在 M RSA 上 MLST 已被用於追蹤病原獲致抗藥性和跨洲傳播演化的歷程^{144,145}。在細菌，一般而言 PFGE-限制酶切分型方法較諸 MLST 分型方法有較高之鑑別能力。然而，依據我們針對 *C. albicans* 酵母菌的

研究結果，MLST 分型方法較諸 PFGE-限制酶切分型方法有較高之鑑別能力。這可能因為酵母菌的基因體較大（雙倍體 *C. albicans* 為 16 Mb），約為一般細菌基因體的 4-8 倍（格蘭陽性細菌約 4.5 Mb, 格蘭陰性細菌約 2.2 Mb）。PFGE 的最佳解析度約在某特定分子量範圍及片段數量(例如 30-35 個片段)。這可能使得 PFGE 對 *Candida* 病原較不利。反之，*C. albicans* 雙倍體的特性使得 MLST 變異組和更形增加。

我們的 *C. albicans* MLST 分型結果顯示，某些來自同一病人具相同 PFGE-BssHII 基因型的菌株可再分為不同的 MLST 的 DST，具有 1-2 個等位基因之差異。在 *C. albicans* 上，MLST 分型方法確實可追蹤菌株在同一病人上的微適應(microadaptation)。*C. albicans* 分型實驗結果顯示，基因型別為病人專屬，且與 ABC type 及分離年代有關，而與分離部位、醫院來源或 fluconazole 抗藥性無關。

在目前 *C. glabrata* 菌株的 MLST 分型分析中，發現國內的分離株分佈大多能屬局部性(主要為台灣地區)，建立我國 *C. glabrata* 基因體資料庫有其必要性。也可提供在流行病學上不管院內還是院外感染以作為了解病原傳播模式及防治策略擬定之參考依據。在個別基因變異度上，基因 *NMT1*, *TRP1*, *UGP3* 在六個基因中為較高(2.0%- 2.6%)與前人之研究符合，而核甘酸變異點位置對於氨基酸的改變影響不大，主要以密碼子

的第三個為主(表九)，故長期監測變異點對於蛋白的影響(如，可能產生的抗藥性，生態或病原性的改變等)是一個重要的主軸之一；經由國內菌株分型結果，在 13 型中有 8 型目前屬於台灣本土型，將來可以藉由親外國型別與本土型別之間個數的消長，並利用時間作為依據來判斷流行傳播趨勢(如境外移入，演化速率等)，除此之外抗藥性的變化也是值得關注，一般較會關注於愛滋病患上的變異性，尤其愛滋病患個數正節節升高的當下，勢必是下一個帶動台灣感染族群菌株變異的源頭之一。在類緣關係比較中發現三個個體在不同部位的分離株產生較大的歧異度，除了需進一步分型確認外，推測可能為複合感染。而類緣上除了群落 1 屬於國外菌株外，其他少數國外菌株則為個別或少量集中散佈在其他群落之中，大致上較無與國內產生交叉感染的情形。在愛滋病的分析中藉由分群結果可以發現對於抗生素 Amphotericin B 及 Fluconazole 之 MIC 值有似乎有符合分群的現象，因此需再繼續建立其他分離株的 MIC 值，以作更詳細的判斷。但是對於 *C. glabrata* 分離株間則無特別自成一格，推測目前 *C. glabrata* 感染愛滋病患者並沒有因病患的特殊體質或環境而有差異度產生。由於 *C. glabrata* 不管在國際上還是國內，資料的收集仍屬起步階段，但在國際上已逐步快速累積中，因此國內也必須同步建立相關分子資訊以獲得更多的流行病學資訊，而本計畫中 *C. glabrata* 的初探

則提供一個良好的起步。有趣的是，在 *C. glabrata* PFGE-BssHII 分型法較諸 MLST 分型之鑑別力高，這與 *C. albicans* 分型比較結果恰好相反。可能原因為 *C. glabrata* 的染色體為單倍體(haploid)而 *C. albicans* 為雙倍體(diploid)。

以核酸定序為原理的分型方法如 MLST 的優點為資訊明確，比對簡易，對於標準化及國際資訊交換十分有利；缺點為價昂、鑑別力不高及需事先已知病原序列，但未來隨著更低成本更高通量 DNA 定序技術之出現，將可獲得全球的一致性而且普遍化，利於普及。近年來，除念珠菌外¹⁴⁶ 針對其他病原真菌如 *H. capsulatum*, *A. flavus*, *C. immitis*¹⁴⁷ 和 *Fusarium oxysporum* complex¹⁴⁸ 的 MLST 分型方法也已發展出來。本文的資料也是台灣甚至亞洲首度有關 *C. albicans* 及 *C. glabrata* 的 MLST 資料。單核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)比較下，MLST 的優點為可較全面且正確地瞭解多型性位點的情形和可偵測出新的多型性位點。至於 Array 則涉及數千條基因之雜和每條代表一個 ORF，較為廣泛，但僅能知道 match/mismatch。隨著低成本、高通量定序方法的出現，MLST 的成本及效率可再大幅提昇。未來 MLST 若與微陣列等高通量、快速偵測平台結合，如 MLST-like array¹⁴⁹ 或 MLST 與 MALDI-TOF 結合之發展可進一步擴大化分型的通量。

新型 AFLP 分子分型方法由於技術剛建立，數據較少有關其適用性及再現性仍有待更多實驗來確認。未來期能藉由 AFLP 或 c-DNA-AFLP 技術鑑別出負責特別表現型的基因體或轉錄質體特異性片段。

所發展之快速鑑定六種念珠菌及新型隱球菌種別的 real-time PCR 技術，於臨床檢體上之應用，試驗結果，在全血及其他檢體的來源(如腦脊髓液)的檢測上靈敏度均約達到 10-50 cells/ ml 不等，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。此方法可謂提供了傳統鑑定方法以外的另一種選擇，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。

五、結論與建議

侵襲性念珠菌感染持續成為公衛上的隱憂。本研究有關*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*及*C. guilliermondii*五種念珠菌分子流行病學之研究，有助於釐清病原真菌抗藥性/高病原性菌株在國內各醫院及高危險族群間及跨國間傳播情形，進而研擬防治對策。所發展之高鑑別力分型法經實際檢體驗證，確能區分出流病相關菌株，這將可成為流病調查監測的可靠工具。所建立之全國性分型資料庫平台，可成為國內、國際型別交流比較之參考。我們將持續積極於國內推廣這些標準化技術，提供分型服務及技術支援，協助相關醫療單位釐清院感、抗藥性及治療等問題。國際實質合作上，我們主動與日本、英國等研究單位交換菌株及相關資料，展現台灣疾管局參與國際監測之決心與實力，更將研究成果發表於國際SCI期刊，與國際社會分享台灣經驗。

具體建議有三：

- 1.建立主動監測擴大收集菌株及流病資料之網絡。
- 2.以疾管局為中心，建立型別基因資料庫平台，並與國際進行型別資訊交換機制。
- 3.由疾管局主動提供分型服務，技術推廣。

六、參考文獻 References

1. Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, et al: The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-albicans Candida isolates from blood. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:679-82.
2. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, et al: Incidence of bloodstream infections due to Candida species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 2004;42:1519-27.
3. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al: Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309-17.
4. Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, et al: The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* 1999;29:1164-70.
5. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al: Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003;37:1172-7.
6. Schneider E, Hajjeh RA, Spiegel RA, et al: A coccidioidomycosis outbreak following the Northridge, Calif, earthquake. *JAMA* 1997;277:904-8.
7. Ponton J, Ruchel R, Clemons KV, et al: Emerging pathogens. *Med Mycol* 2000;38 Suppl 1:225-36.
8. Park BJ, Sigel K, Vaz V, et al: An epidemic of coccidioidomycosis in Arizona associated with climatic changes, 1998-2001. *J Infect Dis* 2005;191:1981-7.
9. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, et al: National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of Candida other than Candida albicans: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. SCOPE Participant Group. Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;30:121-9.
10. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al: Bloodstream infections due to Candida species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:747-51.
11. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, et al: Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis* 2001;33:641-7.

12. Lamagni TL, Evans BG Shigenatsu M et al. Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales(1990-9). *Epidemiol Infect* 126, 397-414. 2001.

Ref Type: Generic

13. Petersen LR, Marshall SL, Barton-Dickson C, et al: Coccidioidomycosis among workers at an archeological site, northeastern Utah. *Emerg Infect Dis* 2004;10:637-42.
14. Chamany S, Mirza SA, Fleming JW, et al: A large histoplasmosis outbreak among high school students in Indiana, 2001. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:909-14.
15. Lyon GM, Bravo AV, Espino A, et al: Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998-1999. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:438-42.
16. Morgan J, Cano MV, Feikin DR, et al: A large outbreak of histoplasmosis among American travelers associated with a hotel in Acapulco, Mexico, spring 2001. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69:663-9.
17. Panackal AA, Hajjeh RA, Cetron MS, et al: Fungal infections among returning travelers. *Clin Infect Dis* 2002;35:1088-95.
18. Chen YC, Chang SC, Luh KT, et al: Stable susceptibility of Candida blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:71-7.
19. Chen YC, Chang SC, Sun CC, et al: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:369-75.
20. Hung CC, Chen YC, Chang SC, et al: Nosocomial candidemia in a university hospital in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1996;95:19-28.
21. Huang YC, Lin TY, Leu HS, et al: Yeast carriage on hands of hospital personnel working in intensive care units. *J Hosp Infect* 1998;39:47-51.
22. Huang YC, Lin TY, Peng HL, et al: Outbreak of Candida albicans fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Scand J Infect Dis* 1998;30:137-42.
23. Huang YC, Lin TY, Leu HS, et al: Outbreak of Candida parapsilosis fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. *Infection* 1999;27:97-102.
24. Sheng WH, Wang JT, Lu DC, et al: Comparative impact of hospital-acquired infections on medical costs, length of hospital stay and outcome between community hospitals and medical centres. *J Hosp Infect* 2005;59:205-14.

25. Rentz AM, Halpern MT, Bowden R: The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clin Infect Dis* 1998;27:781-8.
26. Bartlett JG: Aspergillosis update. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:281-2.
27. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, et al: Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 Aspergillus Study Group. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:250-60.
28. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, et al: International surveillance of bloodstream infections due to Candida species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol* 2001;39:3254-9.
29. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, et al: In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against Candida species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 2003;41:78-83.
30. Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, et al: Mechanism of fluconazole resistance in Candida krusei. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2645-9.
31. Wingard JR: Importance of Candida species other than C. albicans as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 1995;20:115-25.
32. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, et al: Antifungal drug susceptibilities of oral Candida dubliniensis isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:617-23.
33. Pfaller MA, Messer SA, Gee S, et al: In vitro susceptibilities of Candida dubliniensis isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J Clin Microbiol* 1999;37:870-2.
34. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, et al: Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 2002;35:627-30.
35. Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, et al: Experimental induction of fluconazole resistance in Candida tropicalis ATCC 750. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1578-84.
36. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, et al: Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 2004;38:161-89.
37. Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA: British Society for Medical Mycology proposed standards of

care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 2003;3:230-40.

38. Rabkin JM, Orolloff SL, Corless CL, et al: Association of fungal infection and increased mortality in liver transplant recipients. *Am J Surg* 2000;179:426-30.
39. Kobayashi GS: Molecular genetics and the diagnostic mycology laboratory. *Arch Med Res* 1995;26:293-6.
40. Denning DW: Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* 2000;355:423-4.
41. Sato Y, Osabe S, Kuno H, et al: Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by microscopic examination of centrifuged cerebrospinal fluid sediment. *J Neurol Sci* 1999;164:72-5.
42. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, et al: Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 1999;37:3533-9.
43. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, et al: Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol* 2002;40:2483-9.
44. Reiss E, Obayashi T, Orle K, et al: Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Med Mycol* 2000;38 Suppl 1:147-59.
45. Hurst SF, Reyes GH, McLaughlin DW, et al: Comparison of commercial latex agglutination and sandwich enzyme immunoassays with a competitive binding inhibition enzyme immunoassay for detection of antigenemia and antigenuria in a rabbit model of invasive aspergillosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:477-85.
46. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, et al: Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998;26:1407-12.
47. Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, et al: Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1982;16:22-9.
48. Klein BS, Vergeront JM, Kaufman L, et al: Serological tests for blastomycosis: assessments during a large point-source outbreak in Wisconsin. *J Infect Dis* 1987;155:262-8.
49. Staib F: Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* 1965;4:187-93.
50. Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good C, et al: Genetic evidence for role of extracellular proteinase in

virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1985;49:571-5.

51. Hube B: *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 1996;7:55-69.
52. Morrison CJ, Hurst SF, Reiss E: Competitive binding inhibition enzyme-linked immunosorbent assay that uses the secreted aspartyl proteinase of *Candida albicans* as an antigenic marker for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:835-48.
53. Macdonald F, Odds FC: Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* 1983;129:431-8.
54. Ray TL, Payne CD: Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. *Infect Immun* 1988;56:1942-9.
55. Niesters HG, Goessens WH, Meis JF, et al: Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1993;31:904-10.
56. Jackson CJ, Barton RC, Evans EG: Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J Clin Microbiol* 1999;37:931-6.
57. Velegraki A, Kambouris ME, Skiniotis G, et al: Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;23:303-12.
58. Hendolin PH, Paulin L, Koukila-Kahkola P, et al: Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *J Clin Microbiol* 2000;38:4186-92.
59. Martin C, Roberts D, van Der WM, et al: Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2000;38:3735-42.
60. Park S, Wong M, Marras SA, et al: Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. *J Clin Microbiol* 2000;38:2829-36.
61. Golbang N, Burnie JP, Matthews RC: A polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosing infection caused by *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Pathol* 1999;52:419-23.
62. Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, et al: Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:228-31.
63. Rand KH, Houck H, Wolff M: Detection of candidemia by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1994;8:215-21.

64. Chaturvedi S, Rodeghier B, Fan J, et al: Direct PCR of Cryptococcus neoformans MATalpha and MATa pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *J Clin Microbiol* 2000;38:2007-9.
65. Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, et al: Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 2001;39:3505-11.
66. Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, et al: Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 2002;40:490-4.
67. Li SY, Liao MH, Lin YH, et al: Rapid identification of clinically important fungi by use of PCR-EIA. *Epidemiol Bulletin* 2003.
68. Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, et al: Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *J Med Microbiol* 2003;52:1071-6.
69. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, et al: Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clin Chem* 2001;47:1742-3.
70. Ahmadian A, Ehn M, Hofer S: Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* 2006;363:83-94.
71. Gharizadeh B, Norberg E, Loffler J, et al: Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology. *Mycoses* 2004;47:29-33.
72. Trama JP, Mordechai E, Adelson ME: Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing. *Mol Cell Probes* 2005;19:145-52.
73. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, et al: Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2000;38:2302-10.
74. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH: Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol* 2000;38:1510-5.
75. Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, et al: Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J Med Vet Mycol* 1995;33:319-25.
76. Zhao J, Kong F, Li R, et al: Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol* 2001;39:2261-6.

77. Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, et al: Identification of medically relevant Trichosporon species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for Trichosporon identification. *J Clin Microbiol* 1999;37:1985-93.
78. Yamada Y, Makimura K, Uchida K, et al: Phylogenetic relationships among medically important yeasts based on sequences of mitochondrial large subunit ribosomal RNA gene. *Mycoses* 2004;47:24-8.
79. Marlowe EM, Hogan JJ, Hindler JF, et al: Application of an rRNA probe matrix for rapid identification of bacteria and fungi from routine blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003;41:5127-33.
80. Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, et al: Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J Clin Microbiol* 2005;43:4943-53.
81. Hsiao CR, Huang L, Bouchara JP, et al: Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2005;43:3760-8.
82. Diaz MR, Fell JW: Use of a suspension array for rapid identification of the varieties and genotypes of the Cryptococcus neoformans species complex. *J Clin Microbiol* 2005;43:3662-72.
83. Page BT, Kurtzman CP: Rapid identification of Candida species and other clinically important yeast species by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 2005;43:4507-14.
84. Chen YC, Chang SC, Tai HM, et al: Molecular epidemiology of Candida colonizing critically ill patients in intensive care units. *J Formos Med Assoc* 2001;100:791-7.
85. Aragao PA, Oshiro IC, Manrique EI, et al: Pichia anomala outbreak in a nursery: exogenous source? *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:843-8.
86. Kuhn DM, Mikherjee PK, Clark TA, et al: Candida parapsilosis characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1074-81.
87. Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, et al: Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of Candida parapsilosis bloodstream infections in a community hospital. *J Clin Microbiol* 2004;42:4468-72.
88. Brawner DL, Cutler JE: Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1989;27:1335-41.
89. Whelan WL, Kirsch DR, Kwon-Chung KJ, et al: *Candida albicans* in patients with the acquired

immunodeficiency syndrome: absence of a novel of hypervirulent strain. *J Infect Dis* 1990;162:513-8.

90. Xu J, Ramos AR, Vilgalys R, et al: Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2000;38:1214-20.
91. Dromer F, Improvisi L, Dupont B, et al: Oral transmission of *Candida albicans* between partners in HIV-infected couples could contribute to dissemination of fluconazole-resistant isolates. *AIDS* 1997;11:1095-101.
92. Voss A, Hollis RJ, Pfaller MA, et al: Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *J Clin Microbiol* 1994;32:975-80.
93. Diaz-Guerra TM, Martinez-Suarez JV, Laguna F, et al: Change in fluconazole susceptibility patterns and genetic relationship among oral *Candida albicans* isolates. *AIDS* 1998;12:1601-10.
94. Diaz-Guerra TM, Martinez-Suarez JV, Laguna F, et al: 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.
95. Dahl KM, Keath EJ, Fraser VJ, et al: Molecular epidemiology of mucosal candidiasis in HIV-positive women. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997;13:485-91.
96. Schuman P, Sobel JD, Ohmit SE, et al: Mucosal candidal colonization and candidiasis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group. *Clin Infect Dis* 1998;27:1161-7.
97. Howell SA, Barnard RJ, Humphreys F: Application of molecular typing methods to dermatophyte species that cause skin and nail infections. *J Med Microbiol* 1999;48:33-40.
98. Poikonen E, Vuopio-Varkila J, Kaukoranta-Tolvanen SS, et al: Epidemiological typing of *Candida albicans* from bloodstream infections by restriction enzyme analysis. *Scand J Infect Dis* 2001;33:140-4.
99. Makarova NU, Pokrowsky VV, Kravchenko AV, et al: Persistence of oropharyngeal *Candida albicans* strains with reduced susceptibilities to fluconazole among human immunodeficiency virus-seropositive children and adults in a long-term care facility. *J Clin Microbiol* 2003;41:1833-7.
100. Pujol C, Pfaller MA, Soll DR: Flucytosine resistance is restricted to a single genetic clade of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:262-6.
101. Soll DR, Pujol C: *Candida albicans* clades. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;39:1-7.

102. Taylor BN, Harrer T, Pscheidl E, et al: Surveillance of nosocomial transmission of *Candida albicans* in an intensive care unit by DNA fingerprinting. *J Hosp Infect* 2003;55:283-9.
103. Riederer K, Fozo P, Khatib R: Typing of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*: species-related limitations of electrophoretic karyotyping and restriction endonuclease analysis of genomic DNA. *Mycoses* 1998;41:397-402.
104. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Dassanayake RS, et al: 'Genotypic shuffling' of sequential clones of *Candida albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. *J Med Microbiol* 2003;52:349-59.
105. Ball LM, Bes MA, Theelen B, et al: Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida* species colonization in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 2004;42:1673-9.
106. Katsu M, Kidd S, Ando A, et al: The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *FEMS Yeast Res* 2004;4:377-88.
107. 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.
108. 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.
109. Robles JC, Koreen L, Park S, et al: Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2004;42:2480-8.
110. Bougnoux ME, Tavanti A, Bouchier C, et al: Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2003;41:5265-6.
111. Bougnoux ME, Aanensen DM, Morand S, et al: Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. *Infect Genet Evol* 2004;4:243-52.
112. Redkar RJ, Dube MP, McCleskey FK, et al: DNA fingerprinting of *Candida rugosa* via repetitive sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34:1677-81.
113. Fundyga RE, Lott TJ, Arnold J: Population structure of *Candida albicans*, a member of the human flora, as determined by microsatellite loci. *Infect Genet Evol* 2002;2:57-68.

114. Lott TJ, Fundyga RE, Brandt ME, et al: Stability of allelic frequencies and distributions of *Candida albicans* microsatellite loci from U.S. population-based surveillance isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:1316-21.
115. Soll DR: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:332-70.
116. Yang YL, Ho YA, Cheng HH, et al: Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:60-4.
117. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, et al: CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988;16:128-40.
118. NCCLS. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 1997. NCCLS document M27-A (ISBN 1-56238-328-0), 940 West valley road, suite 1400, wayne, pennsylvania 19087.

Ref Type: Report

119. Chen KW, Lo HJ, Lin YH, et al: Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *J Med Microbiol* 2005;54:249-58.
120. Voss A, Pfaller MA, Hollis RJ, et al: Evaluation of the discriminatory power of pulsed-field gel electrophoresis and PCR fingerprinting for epidemiologic typing of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:82-7.
121. 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.
122. McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA: Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol* 1999;37:417-21.
123. Hunter PR, Fraser CA: Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1989;27:2156-60.
124. Tavanti A, Davidson AD, Fordyce MJ, et al: *Candida albicans*: population structure and properties determined by multi-locus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2005;(in press).
125. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, et al: PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001;7:382-9.

126. Struelens MJ, De Gheldre Y, Deplano A: Comparative and library epidemiological typing systems: outbreak investigations versus surveillance systems. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19:565-9.
127. Pappas PG, Rex JH, Lee J, et al: A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2003;37:634-43.
128. Klein RS, Harris CA, Small CB, et al: Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1984;311:354-8.
129. Law D, Moore CB, Wardle HM, et al: High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. *J Antimicrob Chemother* 1994;34:659-68.
130. Fong IW, Laurel M, Burford-Mason A: Asymptomatic oral carriage of *Candida albicans* in patients with HIV infection. *Clin Invest Med* 1997;20:85-93.
131. Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC: Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol* 1994;2:393-400.
132. Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG: Non-albicans oral candidosis in HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:419-22.
133. Lasker BA, Elie CM, Lott TJ, et al: Molecular epidemiology of *Candida albicans* strains isolated from the oropharynx of HIV-positive patients at successive clinic visits. *Med Mycol* 2001;39:341-52.
134. Dassanayake RS, Ellepola AN, Samaranayake YH, et al: Molecular heterogeneity of fluconazole-resistant and -susceptible oral *Candida albicans* isolates within a single geographic locale. *APMIS* 2002;110:315-24.
135. Franz R, Kelly SL, Lamb DC, et al: Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3065-72.
136. Lee MK, Williams LE, Warnock DW, et al: Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:217-24.
137. Doi M, Mizuguchi I, Homma M, et al: Electrophoretic karyotypes of *Candida* yeasts recurrently isolated from single patients. *Microbiol Immunol* 1994;38:19-23.
138. Espinel-Ingroff A, Vazquez JA, Boikov D, et al: Evaluation of DNA-based typing procedures for strain categorization of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33:231-9.

139. Voss A, Pfaller MA, Hollis RJ, et al: Evaluation of the discriminatory power of pulsed-field gel electrophoresis and PCR fingerprinting for epidemiologic typing of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:82-7.
140. Iwaguchi SI, Kanbe T, Tohne T, et al: High-frequency occurrence of chromosome translocation in a mutant strain of *Candida albicans* by a suppressor mutation of ploidy shift. *Yeast* 2000;16:411-22.
141. Ramsey H, Morrow B, Soll DR: An increase in switching frequency correlates with an increase in recombination of the ribosomal chromosomes of *Candida albicans* strain 3153A. *Microbiology* 1994;140 (Pt 7):1525-31.
142. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al: Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3140-5.
143. Spratt BG: Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:312-6.
144. Enright MC: The evolution of a resistant pathogen--the case of MRSA. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:474-9.
145. Enright MC, Robinson DA, Randle G, et al: The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7687-92.
146. Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, et al: Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *J Clin Microbiol* 2003;41:5709-17.
147. Koufopanou V, Burt A, Taylor JW: Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5478-82.
148. O'donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, et al: Genetic Diversity of Human Pathogenic Members of the *Fusarium oxysporum* Complex Inferred from Multilocus DNA Sequence Data and Amplified Fragment Length Polymorphism Analyses: Evidence for the Recent Dispersion of a Geographically Widespread Clonal Lineage and Nosocomial Origin. *J Clin Microbiol* 2004;42:5109-20.
149. Swiderek H, Claus H, Frosch M, et al: Evaluation of custom-made DNA microarrays for multilocus sequence typing of *Neisseria meningitidis*. *Int J Med Microbiol* 2005;295:39-45.

表一、*Candida tropicalis* 對 Fluconazole 敏感的不同來源

對 fluconazole 的敏感性

來源	Susceptible-Dose			總數
	Susceptible	Dependent	Resistant	
尿液	55 (76.4)*	5 (6.9)	12 (16.7)	72
血清	35 (81.4)	2 (4.7)	6 (13.9)	43
傷口	12 (92.3)	1 (7.7)	0	13
血液	7 (58.4)	1 (8.3)	4 (33.3)	12
其他	20 (91)	1 (4.5)	1 (4.5)	22
總數	129 (79.6)	10 (6.2)	23 (14.2)	162

* 分離菌株數 (相同來源百分比)

表一、*C. albicans* MLST 所用的基因及其引子

Locus	Primer	Sequence (5'→3')	Fragment size (bp)	No. of genotypes identified	No(%). of polymorphic nucleotide sites	No. of polymorphic amino acid sites
<i>AAT1a</i>	forward	ACTCAAGCTAGATTGGC	373	18	10(2.68%)	1
	reverse	CAGCAACATGATTAGCCC				
<i>ACC1</i>	forward	GCAAGAGAAATTAAATTCAATG	407	11	6(1.47%)	2
	reverse	TTCATCAACATCATCCAAGTG				
<i>ADP1</i>	forward	GAGCCAAGTATGAATGATTG	443	10	10(2.26%)	4
	reverse	TTGATCAACAAACCCGATAAT				
<i>MPIb</i>	forward	ACCAGAAATGCCATTGC	375	14	15(4%)	8
	reverse	GCAGCCATGCATTCAATTAT				
<i>SYA1</i>	forward	AGAAGAATTGTTGCTGTTACTG	391	20	13(3.32%)	4
	reverse	GTTACCTTACCAACCAGCTT				
<i>VPS13</i>	forward	TCGTTGAGAGATATTGACTT	403	20	16(3.97%)	8
	reverse	ACGGATGGATCTCCAGTCC				
<i>ZWF1b</i>	forward	GTTCATTGATCCTGAAGC	491	17	13(2.65%)	3
	reverse	GCCATTGATAAGTACCTGGAT				
Total			2883	110	83(2.88%)	30

表二、*C. albicans* 臨床菌株之流病資料及 MLST 結果

Strain code	Time Y/m/d	Source		Fluconazole MIC	PFGE -BssHII	Minimun Spanning tree cluster	ABC type	Allele no.							
		Clinical	Hospital					<i>ATT1a</i>	<i>ACCI</i>	<i>ADP1</i>	<i>MPIb</i>	<i>SYA1</i>	<i>VPS13</i>	<i>ZWF1b</i>	DST
P1	99/---	Urine	N3	0.25	1	3	B	4	1	5	5	5	12	3	1
P2	99/---	Sputum	M3	0.125	2		A	7	9	5	1	5	15	15	2
P3	99/---	Sputum	M3	0.25	3	3	B	11	1	3	6	1	17	13	3
P4	99/---	Urine	S4	64	4	3	B	4	1	5	3	5	13	18	4
P5	99/---	Wound	S4	0.25	5	5	A	2	1	9	8	11	6	5	5
P6	99/---	Pleural effusion	S2	0.25	6	3	B	8	5	1	3	3	8	14	6
P7	99/---	CVP tip	N8	0.25	7	4	B	9	5	5	11	18	4	8	7
P8	99/---	Wound	N1	64	8	5	C	18	12	10	12	13	7	4	8
P9	99/---	Sputum	N6	32	9	3	B	11	4	3	4	8	16	13	9
P10	99/---	Urine	M1	0.25	10	3	B	4	1	5	5	5	13	3	10
P11	99/---	Pental swab	M1	0.25	11	3	B	15	1	10	6	2	11	17	11
P12	99/---	Sputum	N9	0.25	12		C	18	1	5	8	6	13	12	12
P13	99/---	Blood	E1	0.25	13	3	B	4	1	4	5	7	18	3	13
P14	99/---	Urine	E1	0.125	14	1	A	4	1	9	8	16	12	5	14
P15	99/---	Sputum	E2	0.25	15	4	A	14	5	10	13	14	20	7	15
P16	99/---	Sputum	E2	0.25	16	5	C	6	1	9	9	19	6	5	16
P17-1	97/01/27	Rectal swab	N4	0.5	17	3	B	10	3	10	4	2	11	17	17

P17-2	97/01/27	Sputum	N4	0.125	18	5	A	17	6	10	10	4	1	9	18
P17-3	97/02/03	Fleural effusion	N4	0.125	18	5	A	17	5	10	10	4	2	9	19
P18-1	97/01/08	Sputum	N4	ND	19	2	A	1	2	9	14	16	14	10	20
P18-2	97/01/22	Urine	N4		20	4	B	14	7	5	13	12	3	1	21
P18-3	97/01/08	Rectal swab	N4	0.125	21	5	C	6	1	9	8	9	6	5	22
P18-4	97/01/15	Rectal swab	N4	0.125	21	5	C	3	1	9	8	9	6	5	23
P19-1	97/01/03	Rectal swab	N4		22	3	B	11	4	3	6	1	16	13	24
P19-2	97/01/03	Urine	N4		23	1	A	3	2	10	8	11	6	5	25
P19-3	97/01/03	Sputum	N4		24	2	A	1	1	9	9	16	10	10	26
P20-1	96/11/11	Sputum	N4		25	3	B	8	5	1	3	3	9	14	27
P20-2	96/11/09	Stool	N4		25	3	B	8	5	1	3	3	9	14	27
P20-3	96/11/09	Rectal swab	N4		25	3	B	8	1	2	3	3	9	14	28
P21-1	96/10/03	Rectal swab	N4		26	3	B	7	10	5	1	5	15	15	29
P21-2	96/10/01	Urine	N4		27	3	B	5	10	5	1	5	15	15	30
P21-3	96/10/01	Sputum	N4		26	3	B	7	10	5	1	5	15	15	29
P22-1	96/12/26	Rectal swab	N4		28	4	A	13	5	10	13	14	19	2	31
P22-2	97/01/17	Rectal swab	N4		28	4	A	13	5	10	13	14	19	2	31
P22-3	97/01/18	Urine	N4		29	4	A	14	5	10	13	14	20	2	32
P23-1	96/12/21	Rectal swab	N4		30	2	A	16	8	7	12	15	8	11	33
P23-2	96/12/30	Sputum	N4		30	2	A	16	8	7	12	15	8	11	33
P23-3	96/12/30	Rectal swab	N4		30	2	A	16	8	7	12	15	8	11	33
P24-1	97/01/21	Rectal swab	N4		31	5	A	2	1	9	7	11	6	5	34

P24-2	97/01/21	Sputum	N4		31	5	A	2	1	9	7	11	6	5	34
P25-1	96/11/11	Throat swab	N4		32	5	C	2	1	6	8	11	6	6	35
P25-2	96/11/14	Rectal swab	N4		32		B	2	1	6	8	10	12	6	36
P26	96/12/26	Sputum	N4		33	3	B	8	5	1	2	3	9	16	37
P27	97/01/03	Sputum	N4		34	3	B	12	4	3	6	20	16	13	38
P28-1	02/--	Oral	N4	0.25	4	3	B	4	1	5	13	5	13	7	39
P28-2	99/--	Oral	N4	0.125	35	4	B	9	11	5	14	17	4	9	40
P29-1	02/--	Oral	N4	256	36	5	A	2	1	9	8	17	5	5	41
P29-2	01/--	Oral	N4	0.125	37	5	A	2	1	9	8	11	5	5	42
P29-3	99/--	Oral	N4	64	38	5	A	2	1	8	8	11	5	5	43
P30-1	02/--	Oral	N4	0.25	39	1	A	2	1	8	8	10	12	5	44
P30-2	01/--	Oral	N4	128	40	1	A	3	1	8	8	11	12	5	45
R1				ND		2	A								
R2				0.125		2	A								

N: north, S: south, M: middle, E: east

R1: ATCC14053, R2: ATCC90028 .

表三、*C. albicans* MLST 分析中導致氨基酸變異的核甘酸多型性

Fragment	Starting nucleotide position of triplet	Triplet polymorphism	Amino acids
AAT1a	89	A/GTC	I/V
ACC1	210	A A/C A	K/T
	392	C/TGA	R/W
ADP1	35	A/G A A	K/E
	125	A/G T T	I/V
	224	C A/T A	Q/L
	281	G/AGT	G/S
MPI	34	A/GCC/T	T/A
	70	GAA/T	E/D
	88	A/GTC	I/V
	106	CA/CA	Q/P
	232	GAA/C	E/D
	238	C/GAA	Q/E
	289	A/GGA	R/G
	352	A/GTT	I/V
SYA1	62	AA/GA	R/K
	122	A/C AA	K/Q
	185	G/T C T	A/S
	203	GC/TT	A/V
	350	G C/T C	A/V
VPS13	134	A/T G T	S/C
	212	A/G TA	I/V
	281	A/G A/G A	R/G/K/E
	320	A/G T G/T	M/I/V
	326	A/G TG	M/V
	338	C/G GT	R/G
	368	A A A/T	K/N
	374	T C/T C	S/F
ZWF1	23	A/C AA	K/Q
	62	A/G CT	T/A
	482	A/T TT	I/F

表四、*C. albicans* 臨床菌株及 2 株標準菌株變異的核甘酸位置和基因座 (locus) 上的各種 alleles。各欄顯示有多型性的位置。因為 *C. albicans* 為雙倍體變異代碼: K, G 或 T; M, A 或 C; R, A 或 G; S, C 或 G; W, A 或 T; Y, C 或 T。括號內的數目代表有這種 allele 的數目。

<i>AAT1a</i>	Alleles	1	2	3	3	3	3	1	2	2	3	3
		2	4	7	8	2	2	5	6	7		
	Alleles	7	8	0	0	9	4	5	2	1	3	
1(2)	R T R T R Y C C C C							1(22)	G G A C C			
2(9)	A							2(2)	M			
3(3)	G A A C							3(1)	Y			
4(6)	A A A C							4(4)	R			
5(1)	A A A C							5(11)	T			
6(2)	A C							6(1)	Y			
7(3)	A A Y A C							7(1)	R Y			
8(5)	A A Y							8(3)	A			
9(2)	A Y A Y							9(1)	C T			
10(1)	A Y							10(3)	M T			
11(3)	A G A T T							11(1)	M Y Y			
12(1)	A G A T Y							12(1)	Y Y			
13(2)	A C G A T T											
14(3)	A Y G A T T											
15(1)	A G G T											
16(3)	A G T											
17(2)	A C G A											
18(2)	Y A Y Y Y											

<i>ADPI</i>	Alleles	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	3
		3	4	4	0	2	6	0	2	3	8			
	Alleles	5	0	6	9	5	6	5	5	2	1			
1(4)	A Y Y R G R R W Y G								1(4)	G G A C T G T G C A G G A G G				
2(1)	C								2(1)	M R R				
3(4)	T T G A A A T								3(5)	M R R R				
4(1)	T T G R A A A T								4(2)	C A G A				
5(12)	R								5(3)	M C A G A				
6(2)	R C C A A G G T C R								6(4)	C G A				
7(3)	C C A R G G T C								7(2)	A G T T A C A G A				
8(3)	G C C A A G G T C								8(13)	A G T T A R C A G A				
9(11)	R C C A A G G T C								9(2)	A G T T A A C A G A				
10(10)	C C A A G G T C								10(2)	A T T A R C A G A R				

<i>MPI1b</i>	Alleles	1	2	2	2	2	2	3
		2	2	3	3	4	6	7
	Alleles	1	7	4	6	5	6	2
		0	3	3	3	7	8	5
		7	4	7	8	6	9	2
1(4)	G G A C T G T G C A G G A G G							
2(1)	M R R							
3(5)	M R R R							
4(2)	C A G A							
5(3)	M C A G A							
6(4)	C G A							
7(2)	A G T T A C A G A							
8(13)	A G T T A R C A G A							
9(2)	A G T T A A C A G A							
10(2)	A T T A R C A G A R							
11(1)	R R Y K W R C A G A							
12(4)	R R R Y K W C A G A							
13(6)	R R Y K W C A G A							
14(2)	R R Y Y K W R C A G							

<i>SYAI</i>	Alleles	2	6	6	0	2	4	6	8	0	0	2	5	
	Alleles	1	5	1	3	0	2	2	0	5	4	7	8	1
1(2)		Y	M	R	G	Y	C	R	C	K	C	C	Y	Y
2(2)		T	C	A	T	G	G			T	T			
3(5)		C		T	G	G		T						
4(2)				T	G	G		M	T					
5(8)		T	A	T	G	G		A	T	C				
6(1)		T	C	A	T	G	G	A	T	C				
7(1)		C			R	Y	G		T	C				
8(1)								T						
9(2)				C	M	A	Y		T	C				
10(2)		C	C	A	A	T		T	C					
11(8)				C	A	Y		T	C					
12(1)		T	C	A	T	G		T	C					
13(1)		T			A	Y		T						
14(4)		T	A	C	A	T		T						
15(3)		T	A	G	C	A	T	G	Y	T				
16(3)		T	A	G	C	A	T	G		T				
17(2)		T		C	A	T	G		T	C				
18(1)		T	A	C	A	Y		T	C					
19(1)			R	C	A	Y		T	C					
20(1)		T	A	A	C	A	T		C	C				

<i>ZWF1b</i>	Alleles	2	3	4	4	5	6	7	6	7	3	7	3	8
	Alleles	3	1	3	9	5	2	5	2	4	7	9	9	2
1(1)		A	C	A	C	Y	G	C	C	G	Y	T	A	A
2(3)		Y	W	Y						R				
3(3)		Y	W	Y						A				
4(1)		M	Y	T	Y					A	T			
5(13)		T	W	T						R	T			
6(2)			T	C						R	T			
7(2)		Y	W	Y						A	T			
8(1)		Y	W	Y			Y		A	T				
9(3)		M	Y	T	Y					A				
10(2)		Y	W	T	T					A	Y			
11(3)			T	T		Y	A		Y		W			
12(1)		Y	W	Y			Y	M	R					
13(4)		M		C			M	R	T	C	R			
14(5)		M	W	C				R	C					
15(4)		C	T	C				A	C					
16(1)		M	W	C				A	C					
17(2)		M	W	C	R			A	C					

<i>VPS13</i>	Alleles	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3
	Alleles	4	3	1	1	1	4	8	8	1	2	2	2	3
1(1)		C	A	G	G	Y	A	R	G	Y	G	K	G	G
2(1)														W
3(1)		R						G	C	T				
4(2)								G	C	T		S		
5(3)								C	C	T				W
6(8)									C	T				W
7(1)		R	R	R	C	T		R			R	W		
8(4)			T	R	G	R	C	T				W		
9(4)				R	G	R	C	T				W		
10(1)									C			W	Y	
11(2)		W		T	A	A		C				T	Y	
12(5)				T	A	A		C	T			T		
13(4)				T	A	A		C	R			T		
14(1)								C				T	Y	
15(4)		M	W					T		C	R	T		W
16(3)		M	R					T	G		C	R	T	
17(1)			R					T	G		C	R	T	
18(1)				R				T		C	R	T		W
19(2)								T	R	G	A	C	R	T
20(2)								T	R	G	R	C	R	T

表五、MLST 及 PFGE-BssHII 分型方法區分三類群 *C. albicans* 臨床菌株之鑑別指數

菌株類群	分型方法	基因型數目	鑑別指數 Discriminatory Index
35 related-origin isolates	PFGE-BssHII	25	0.98
	MLST	29	0.989
16 unrelated isolates	PFGE-BssHII	16	1.00
	MLST	16	1.00
All 51 isolates	PFGE-BssHII	40	0.991
	MLST	45	0.995

表六、*C. glabrata* 臨床菌株各 ST 所對應各基因型別之組合

	FKS	LEU2	NMT1	TRP1	UGP1	URA3
ST1	1	4	6	6	3	2
ST2	2	4	1	9	2	3
ST3	2	2	7	5	1	5
ST4	3	4	1	8	2	8
ST5	2	3	5	2	3	6
ST6	3	4	1	8	2	4
ST7	4	2	3	4	3	1
ST8	5	4	6	6	3	8
ST9	6	1	4	3	3	8
ST10	6	1	2	3	3	7
ST11	6	4	6	6	3	8
ST12	6	4	6	1	3	8
ST13	6	4	6	7	3	8

表七、*C. glabrata* MLST 之基因和引子以及基因變化分析

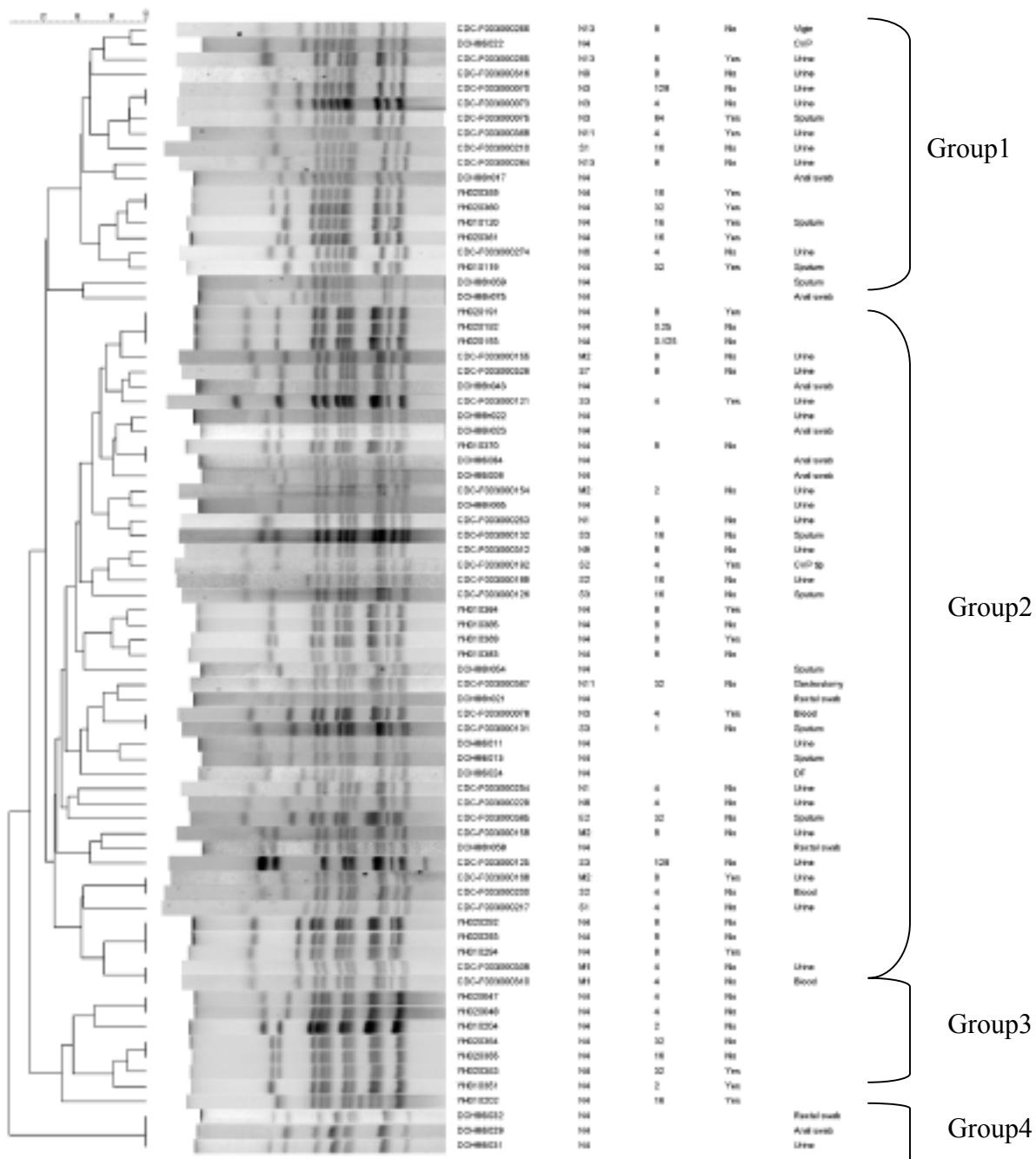
Locus	Gene Product	Primer	Sequence (5'→3')	Annealing temp.(°C)	NO. of bp sequenced	No. of genotypes identified	No(%) of polymorphic nucleotide sites
<i>FKS</i>	1,3-Beta-glucan synthase	forward reverse	GTCAAATGCCACAACAAACACT AGCACTTCAGCAGCGTCTTCAG	55.0	589	6	10(1.7%)
<i>LEU2</i>	3-Isopropylmalate dehydrogenase	forward reverse	TTTCTTGATCCTCCCATTGTTCA ATAGGTAAAGGTGGTTGTGTTGC	54.0	512	4	6(1.2%)
<i>MMT1</i>	Myristoyl-CoA, protein N-myristoyltransferase ^a	forward reverse	GCCGGTGTGGTGGTGCCTGCTC CGTTACTGCGGTGCTCGGTGTCG	59.0	607	6	13(2.1%)
<i>TRP1</i>	Phosphoribosyl-anthraniilate isomerase	forward reverse	AATTGTTCCAGCGTTTTGT GACCAGTCCAGCTTTCAC	50.0	419	9	11(2.6%)
<i>UGP1</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	forward reverse	TTTCAACACCGACAAGGACACAGA TCGGACTTCACTAGCAGCAAATCA	57.0	616	3	4(0.6%)
<i>URA3</i>	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase	forward reverse	AGCGAATTGTTGAAGTTGGTTGA AATT CG GT TGT AAG AT GAT GTT GC	53.0	602	8	11(1.8%)

表八、*C. glabrata* 臨床菌株各基因型上變異位點及變異情形

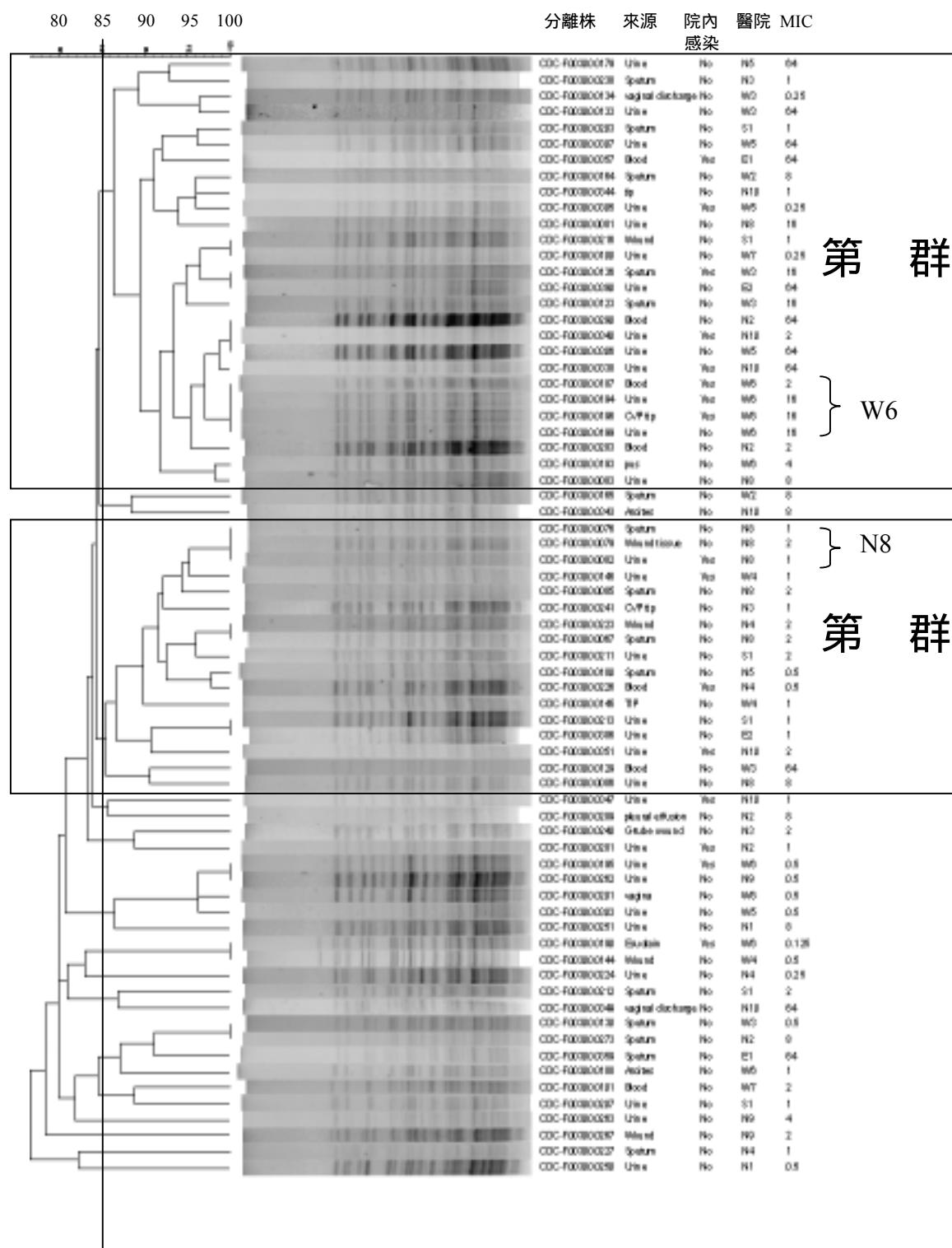
	FKS	LEU2	NMT1	TRP1	UGP1	URA3
	4 6 7 1 2 4 4 5 5 5	1 1 1 2 4 4	3 9 1 2 2 2 2 3 3 4 4 5 5	3 3 4 6 8 1 1 1 2 3 4	3 1 2 4	2 2 3 4 5 1 2 2 3 4 5
	8 3 3 9 3 4 6	2 2 7 2 0 5	3 6 7 1 6 8 8 0 0 0 5 7 9	1 3 2 8 7 1 4 9 4 8 1	2 8 0 2	2 9 7 7 4 6 1 2 4 3 5
	7 8 6 9 6 7 8	1 9 7 3 2 9	4 2 7 0 2 3 7 3 3 3 8	1 8 1 4 9 1	2 4 2	3 7 3 6 9 9
consensus	C A C C T A C A T A	A T A C C T	A T G A G T C C A T A G T	G T A A T G A A A G A	T G T C	G G A A C C T G C C A
ST1	G T T C G C G		G	G	T	G
ST2	T G		G	G	A	A T T T
ST3	T G	G G C		G G C	G A C	A A C C A T
ST4	T		G	G	G C	A T T
ST5	T G	G T	A G	A T A C C A	C	A T
ST6	T		G	G	G C	A T A A T T
ST7	C G C G	G G C C G A		G C	G G	A A T T T
ST8		G T		G	G	T
ST9		G G G T T C	A G	C C	C	T T
ST10		G G G T T C	G A G	C C	C	T T
ST11			G		G	T
ST12			G	A	G	T
ST13			G		G	A T
Affection	N S N N N N S S N N	S S N N N N	N N N S N S N N S S N N N	S N N S N N S S N S N	N N N N	N S N S S N N N N N N
of amino acid						

N: nonsynonymous; S: synonymous

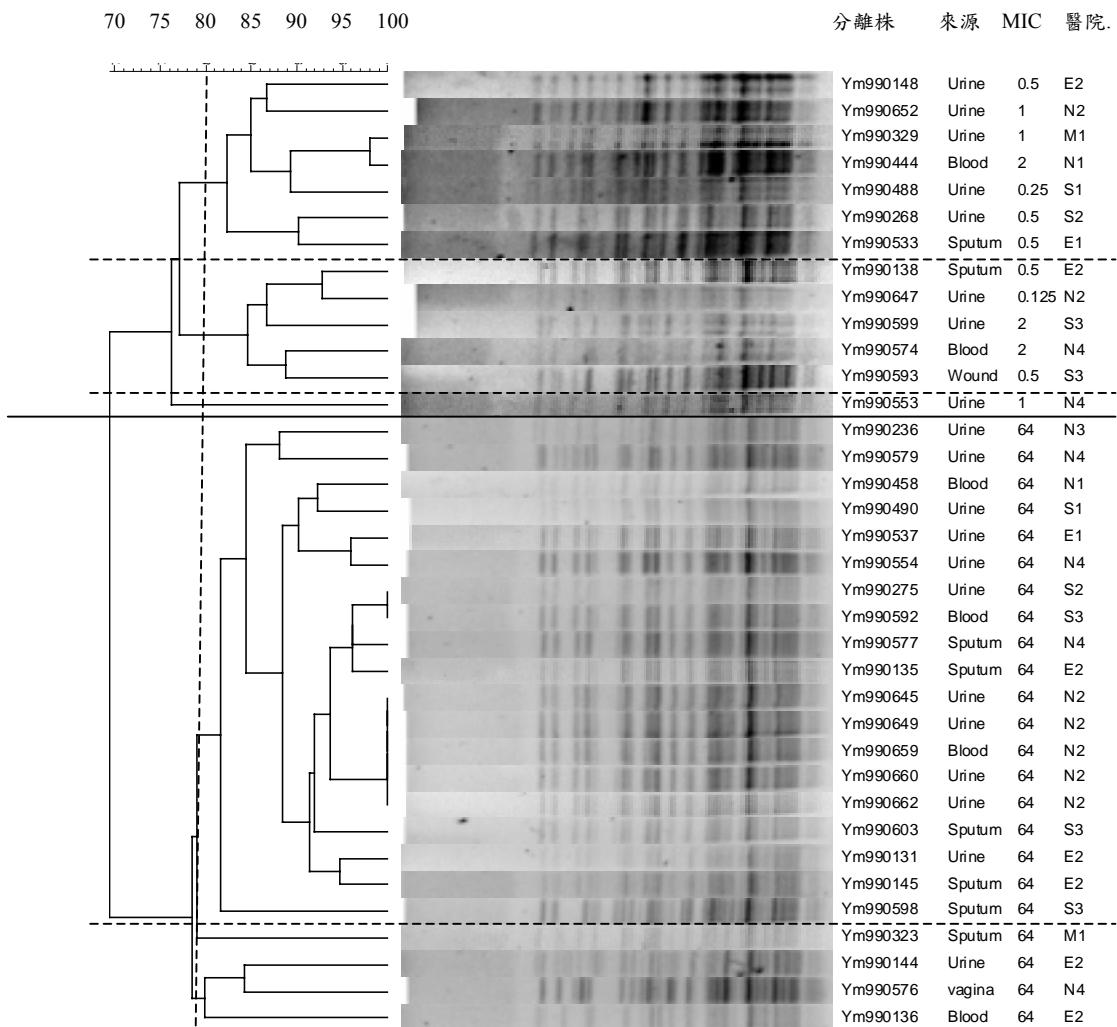
圖一、以 PFGE 分子分型法分析 76 株 *C. glabrata* 臨床菌株。地區: N, 北; S, 南; M, 中; E, 東. MIC 代表每株菌的 fluconazol 抗藥性。



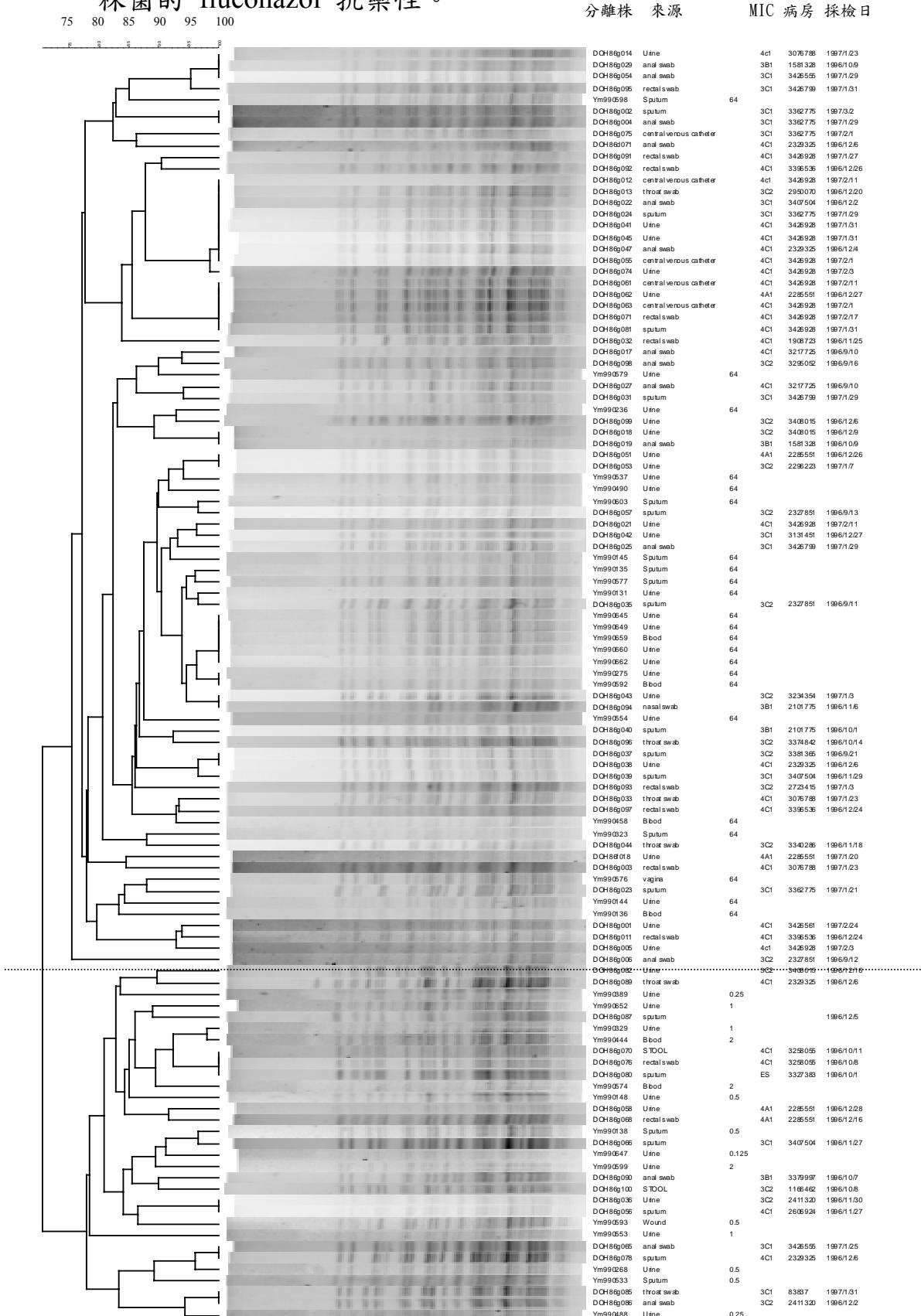
圖二、以 PFGE-BssHII 分子分型法分析 70 株 *C. tropicalis* 臨床菌株。地區：N，北；S，南；M，中；E，東。MIC 代表每株菌的 fluconazol 抗藥性。



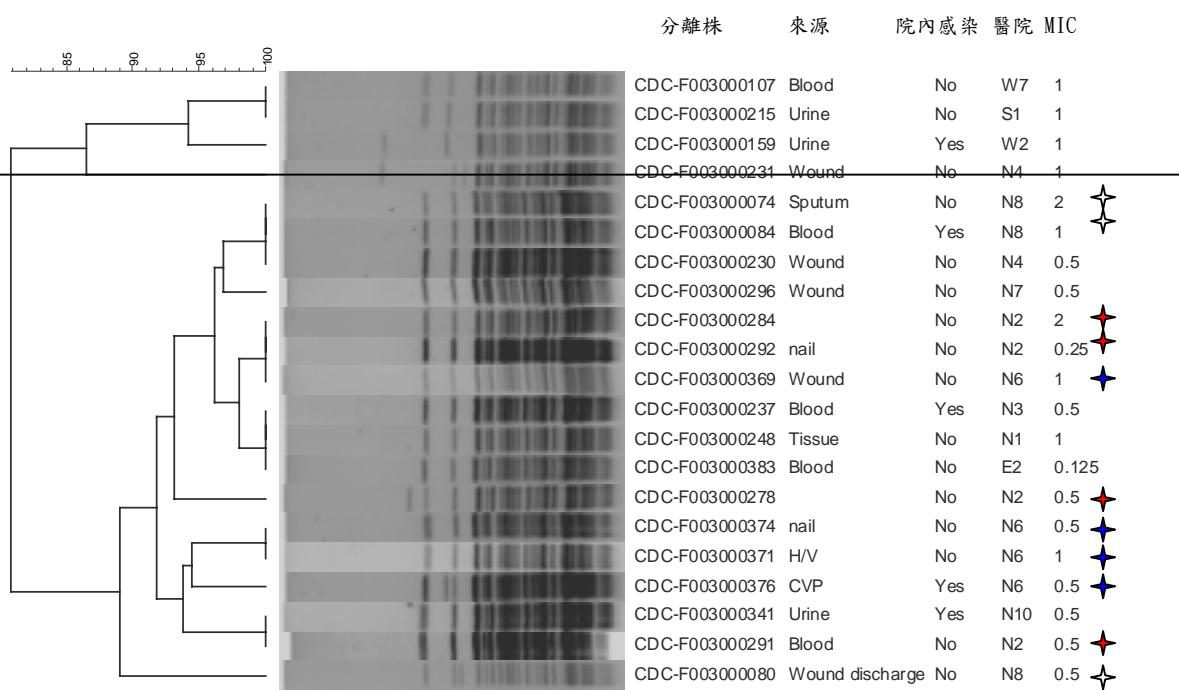
圖三、以 PFGE-BssHII 分子分型法分析 36 株 *C. tropicalis* 臨床菌株。
 地區: N, 北; S, 南; M, 中; E, 東. MIC 代表每株菌的 fluconazol
 抗藥性。



圖四、以 PFGE-BssHII 分子分型法分析 36 株與台大醫院 74 株 *C. tropicalis* 臨床菌株。地區：N，北；S，南；M，中；E，東。MIC 代表每株菌的 fluconazol 抗藥性。

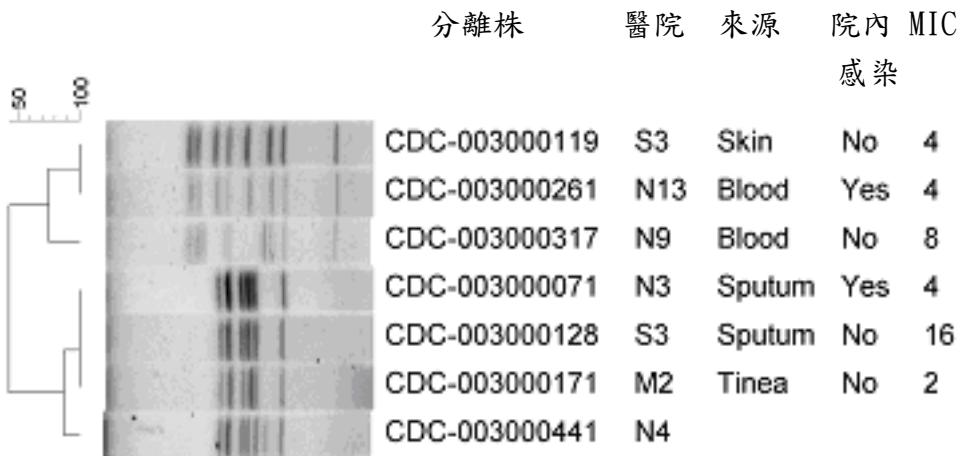


圖五、以 PFGE-BssHII 分子分型法分析 21 株 *C. parasilosis* 臨床菌株。地區: N, 北; S, 南; M, 中; E, 東. MIC 代表每株菌的 fluconazol 抗藥性。不同顏色星號代表相同來醫院的分離株。

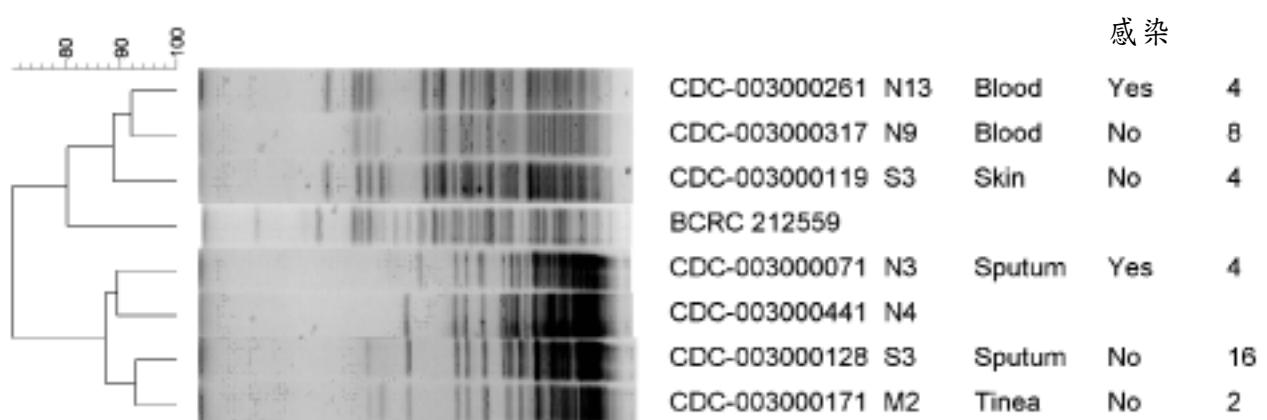


圖六、以 PFGE-EK、PFGE-SfiI 及 PFGE-BssHII 分子分型法分析 7 株 *C. guilliermondii* 臨床菌株及 1 株標準菌株。地區：N，北；S，南；M，中；E，東。MIC 代表每株菌的 fluconazol 抗藥性。

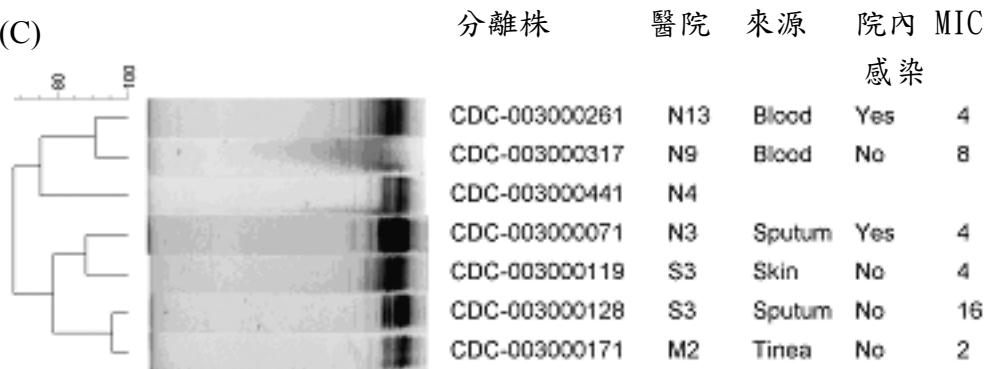
(A)



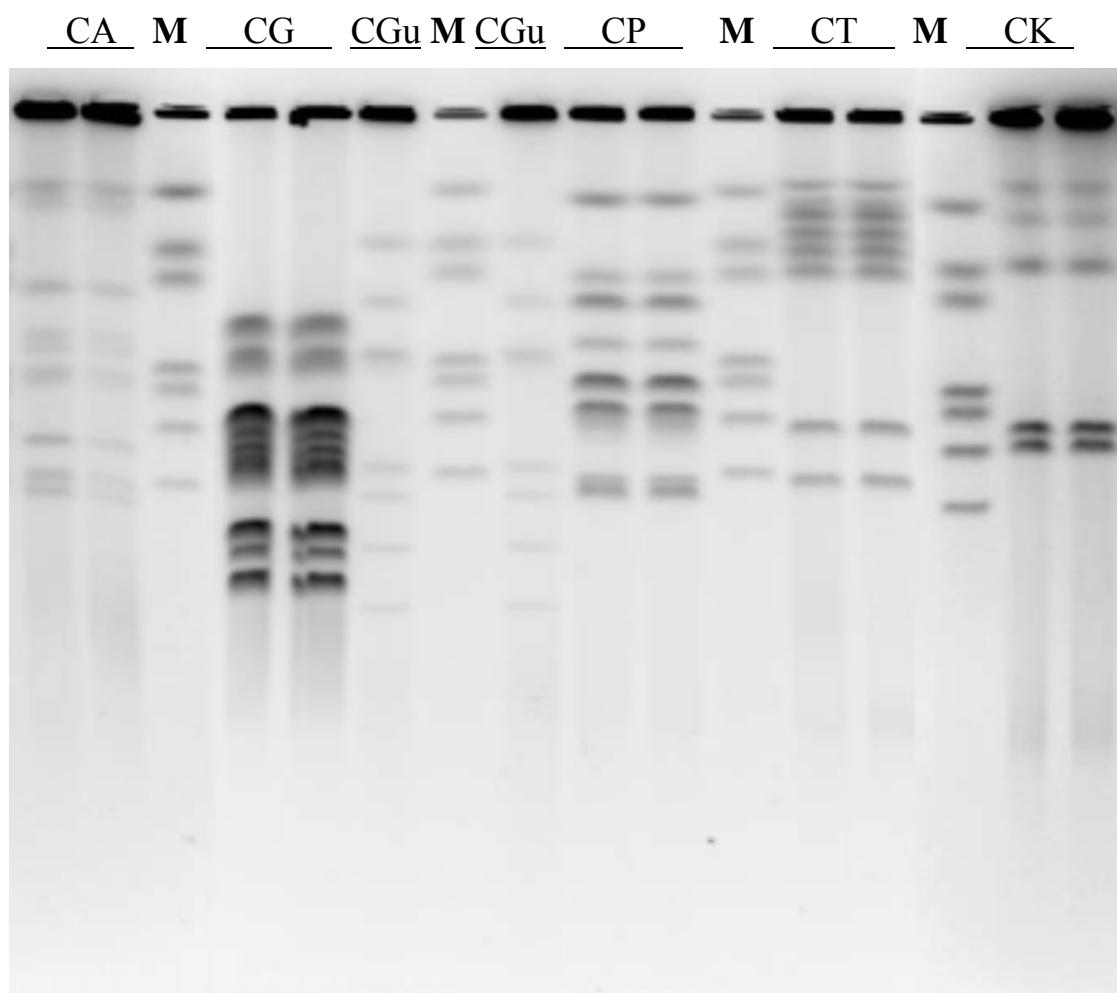
(B)



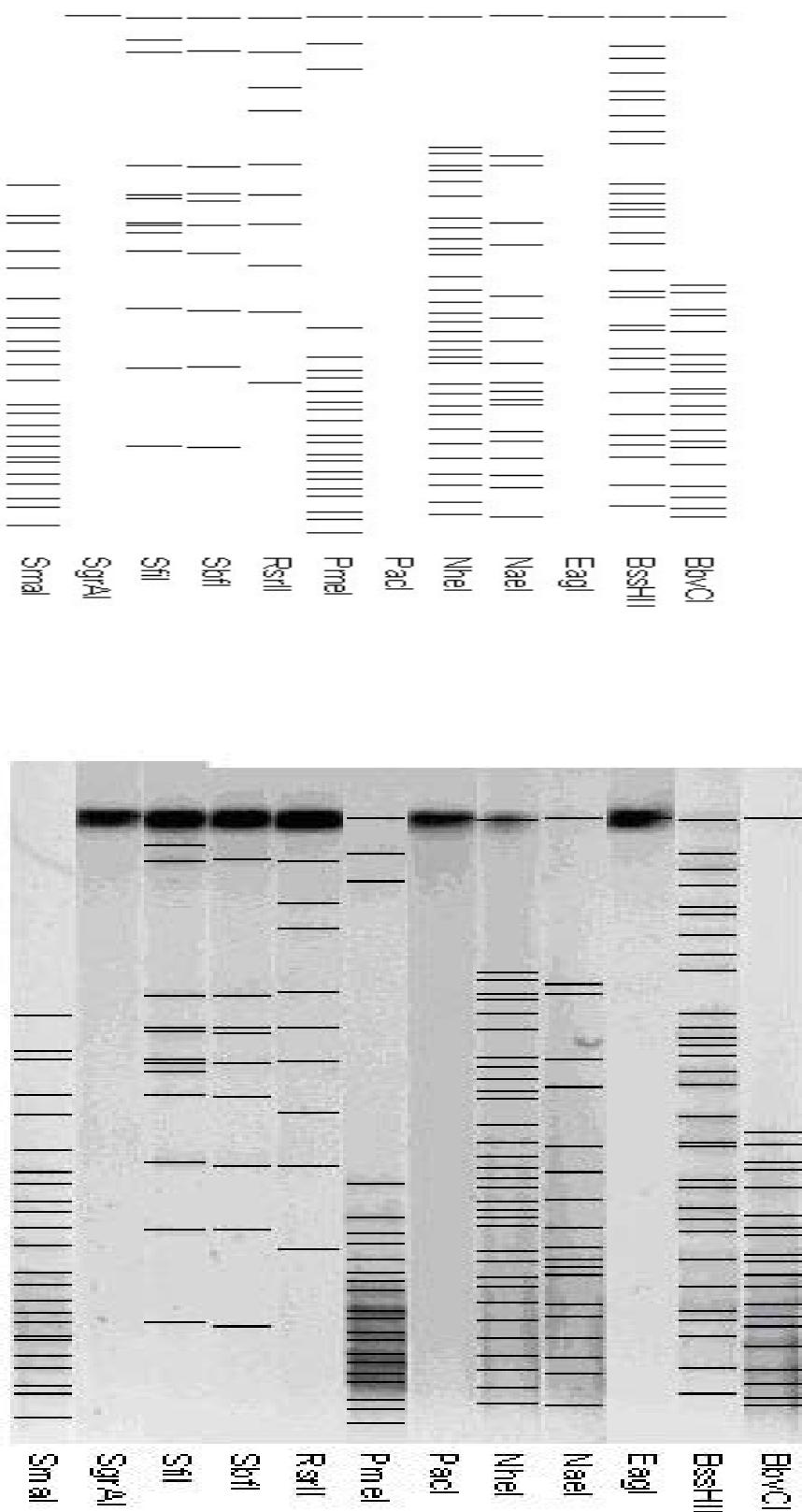
(C)



圖七、不同 *Candida spp.* 染色體核型 PFGE 的分佈情形。M: marker, CA: *C. albican* ATCC 90028, CG: *C. glabrata* ATCC9003, CGu: *C. guilliermondii* BCRC 212599, CP: *C. parasilosis* ATCC 90018, CT: *C. tropicalis* ATCC 13808, CK: *C. krusei* ATCC 6258。

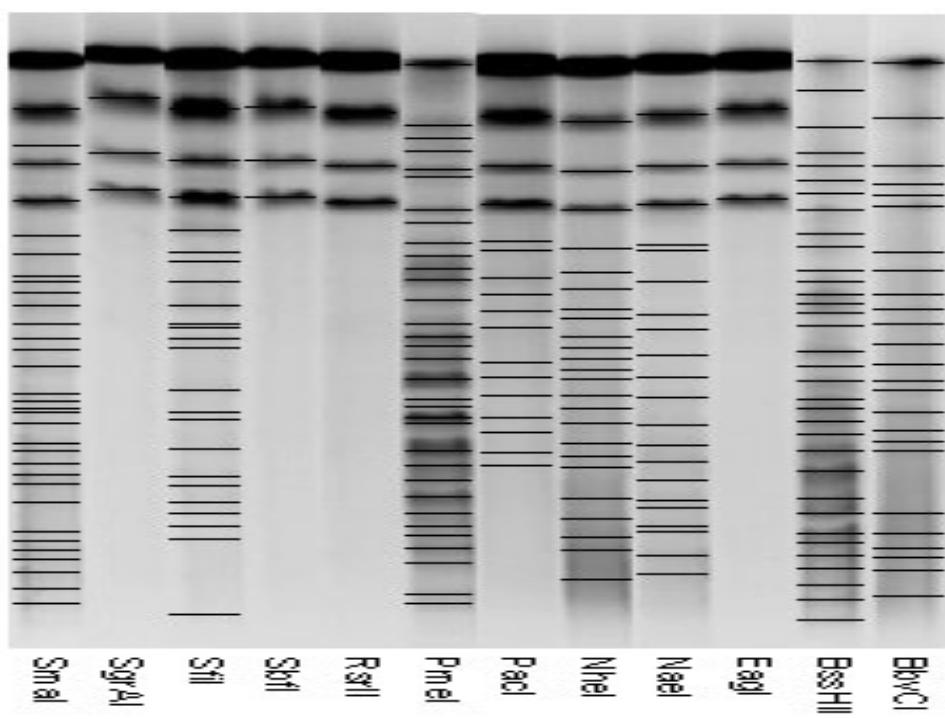
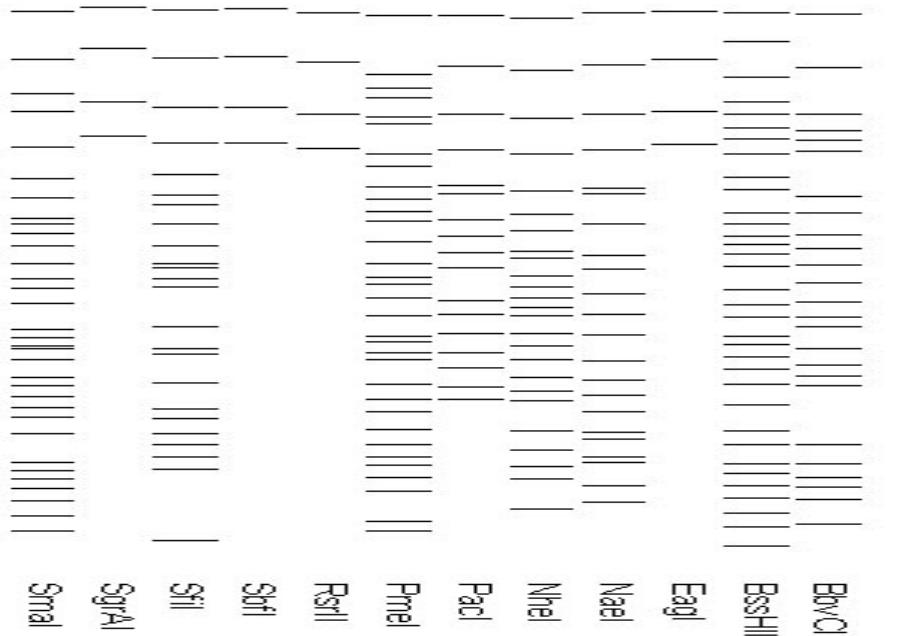


圖八、測試不同限制酵素針對 *Candida albicans* ATCC90028 菌株產生片段
PFGE 的分離效果

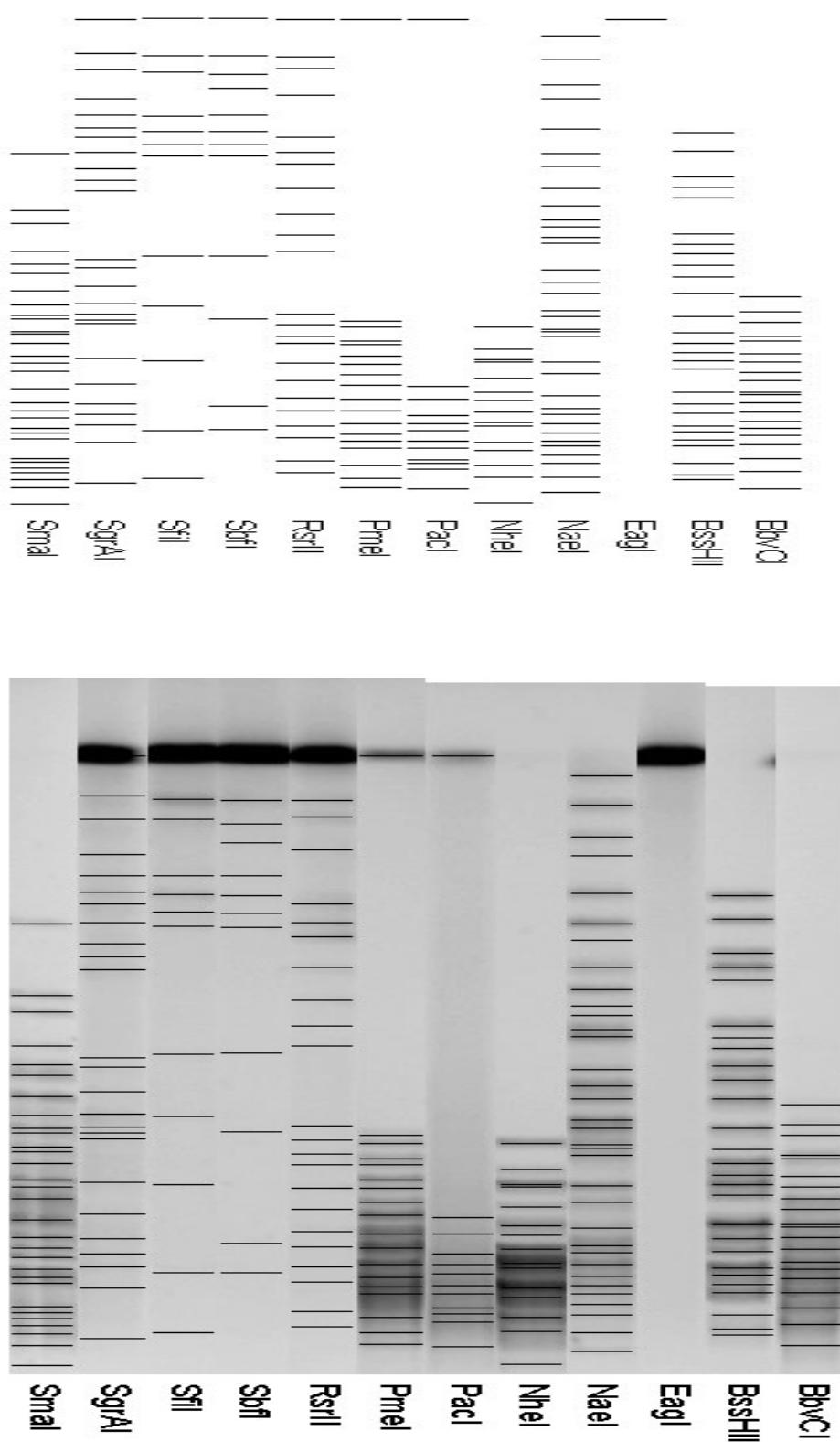


圖九、測試不同限制酵素針對 *Candida glabrata* ATCC9003 菌株產生片段

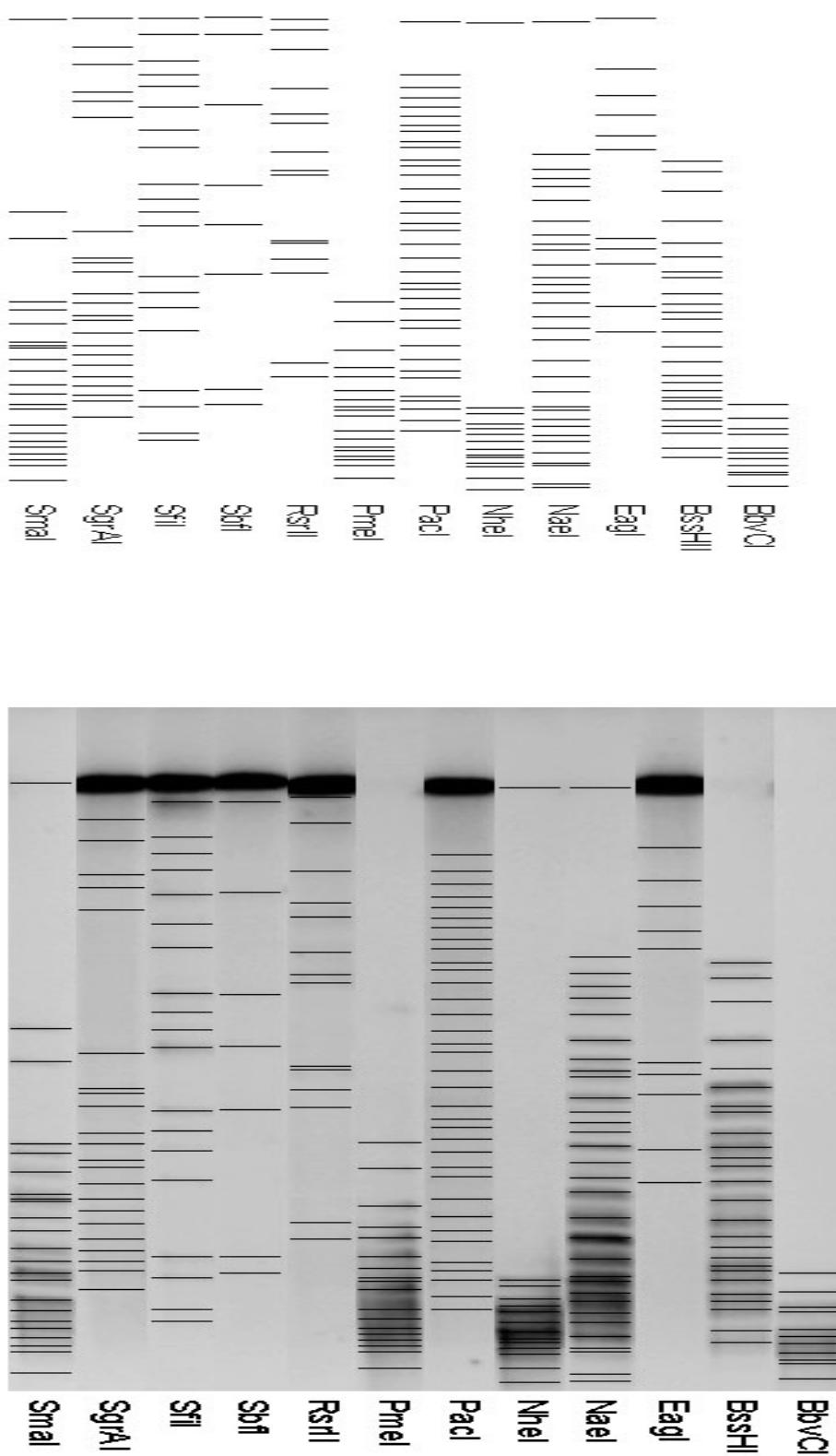
PFGE 的分離效果



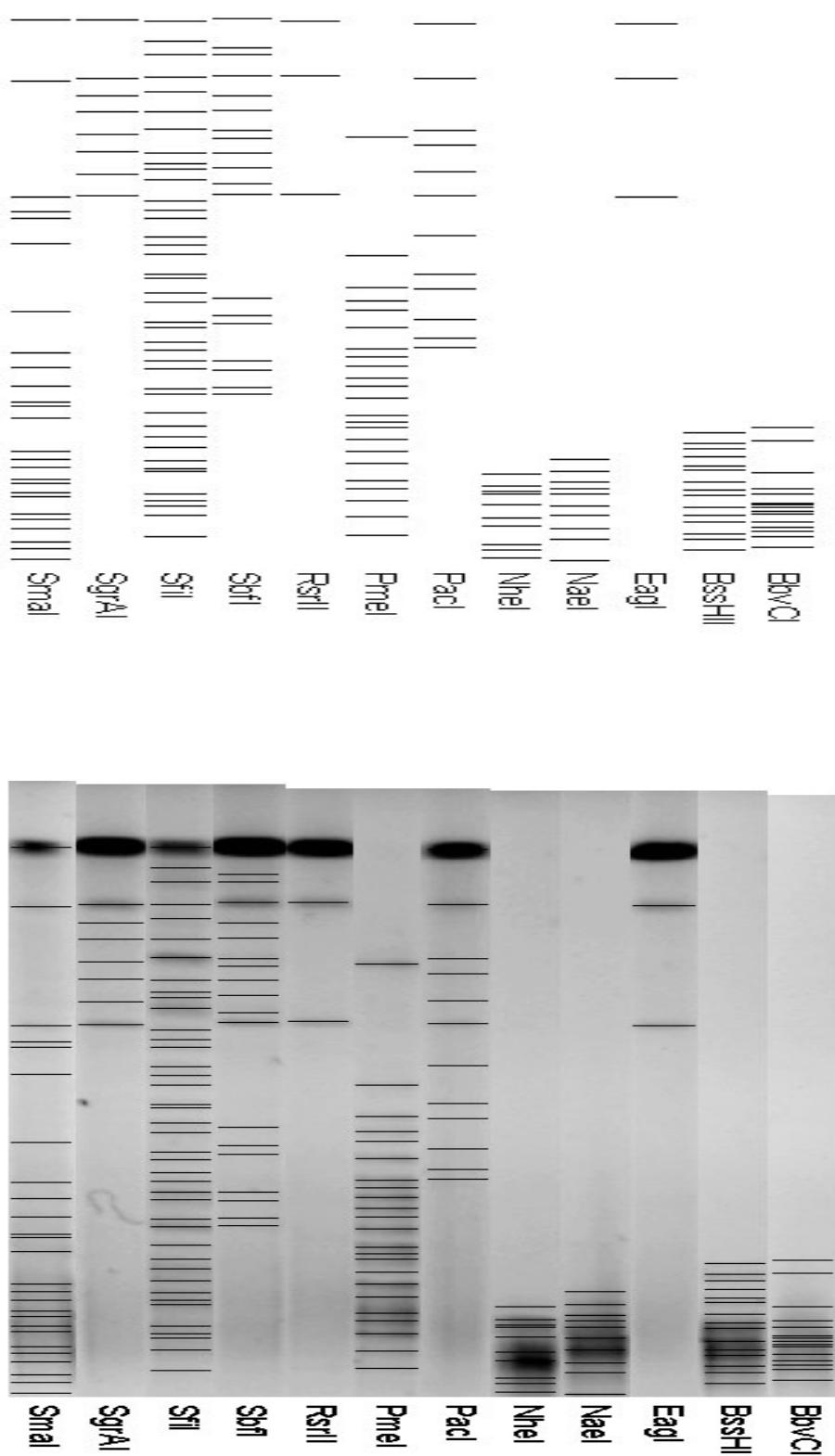
圖十、測試不同限制酵素針對 *Candida tropicalis* ATCC13808 菌株產生片段 PFGE 的分離效果



圖十一、測試不同限制酵素針對 *Candida parapsilosis* ATCC90018 菌株產生片段 PFGE 的分離效果

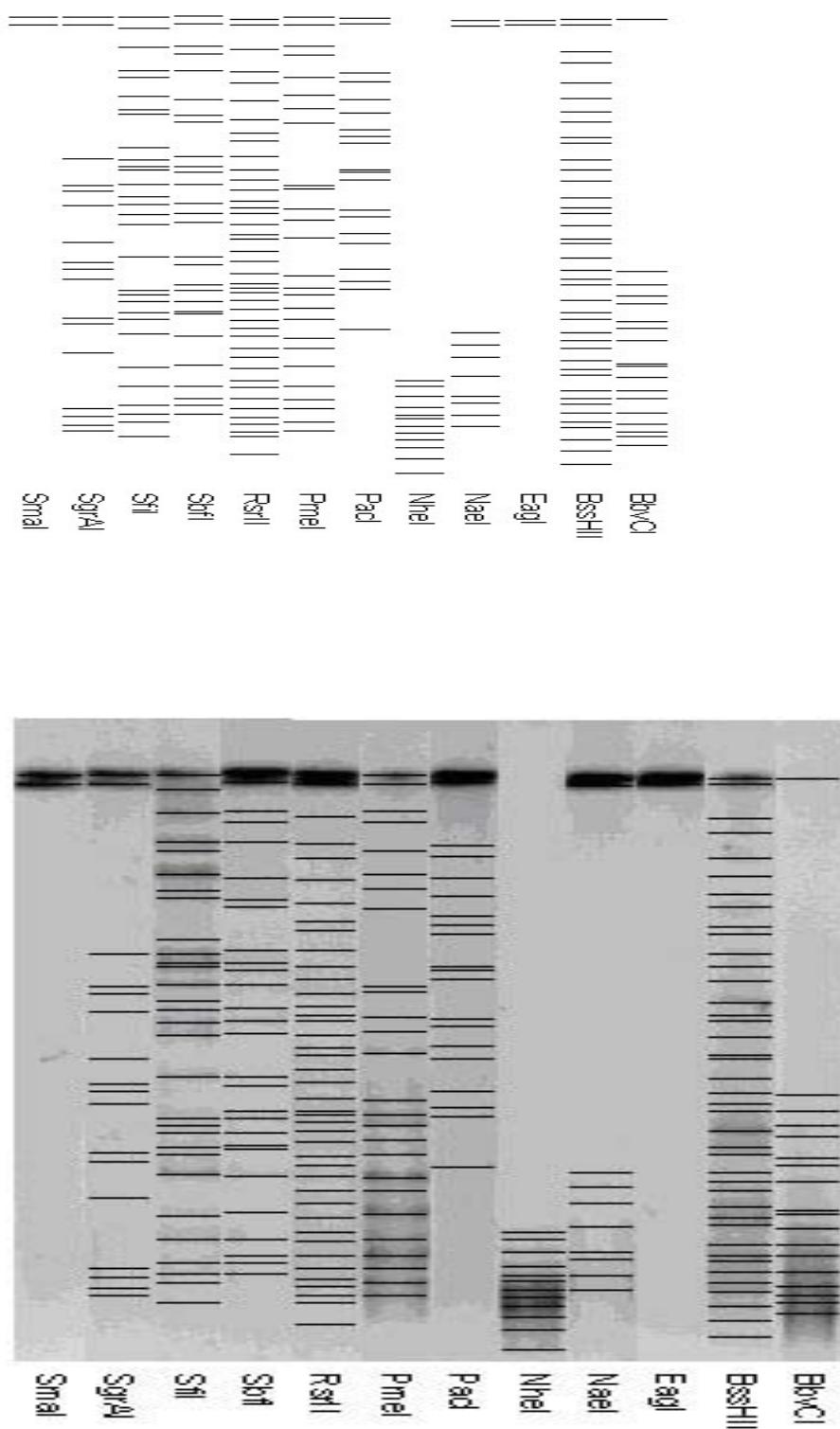


圖十二、測試不同限制酵素針對 *Candida guilliermondii* BCRC212599 菌株產生片段 PFGE 的分離效果

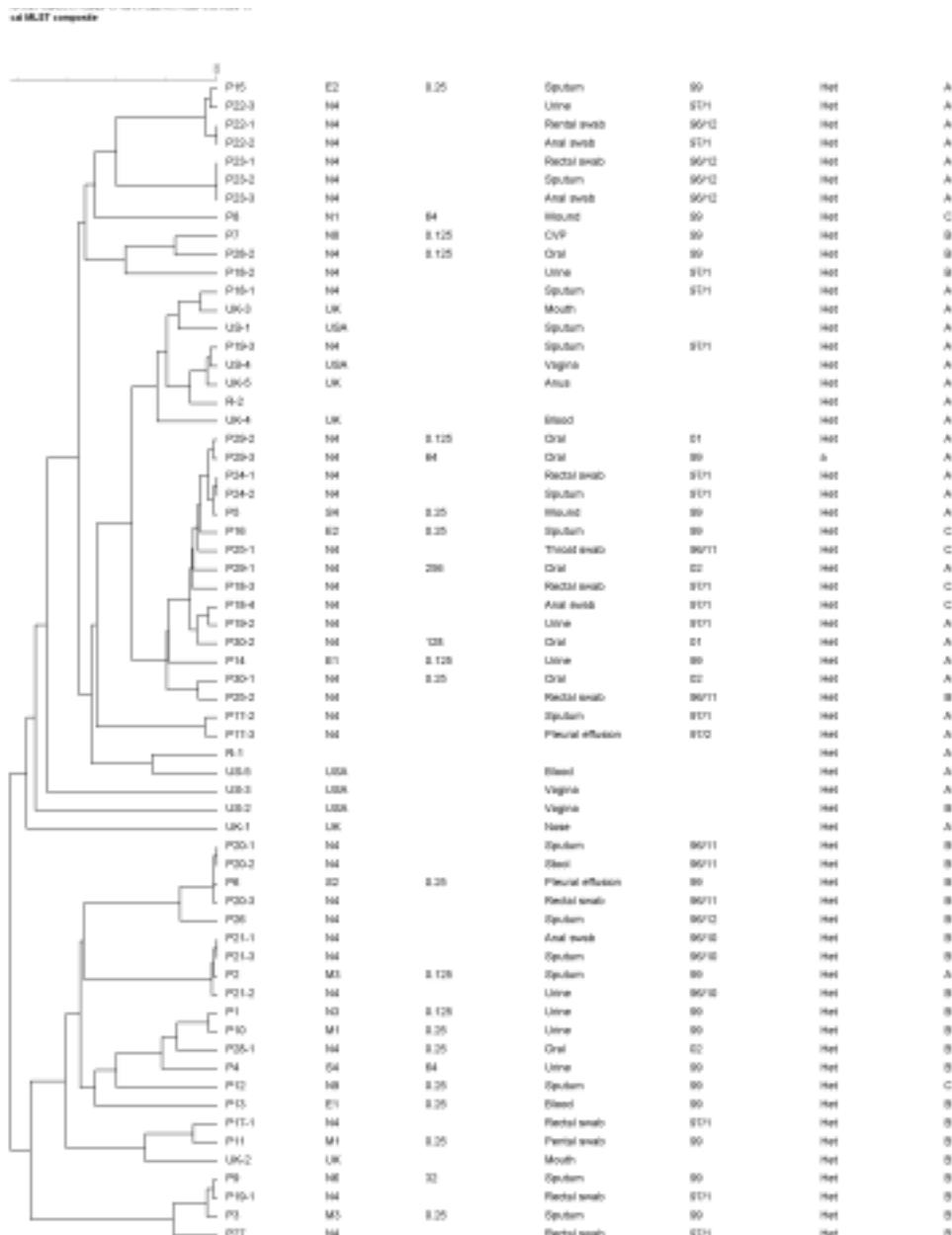


圖十三、測試不同限制酵素針對 *Candida krusei* ATCC6258 菌株產生片段

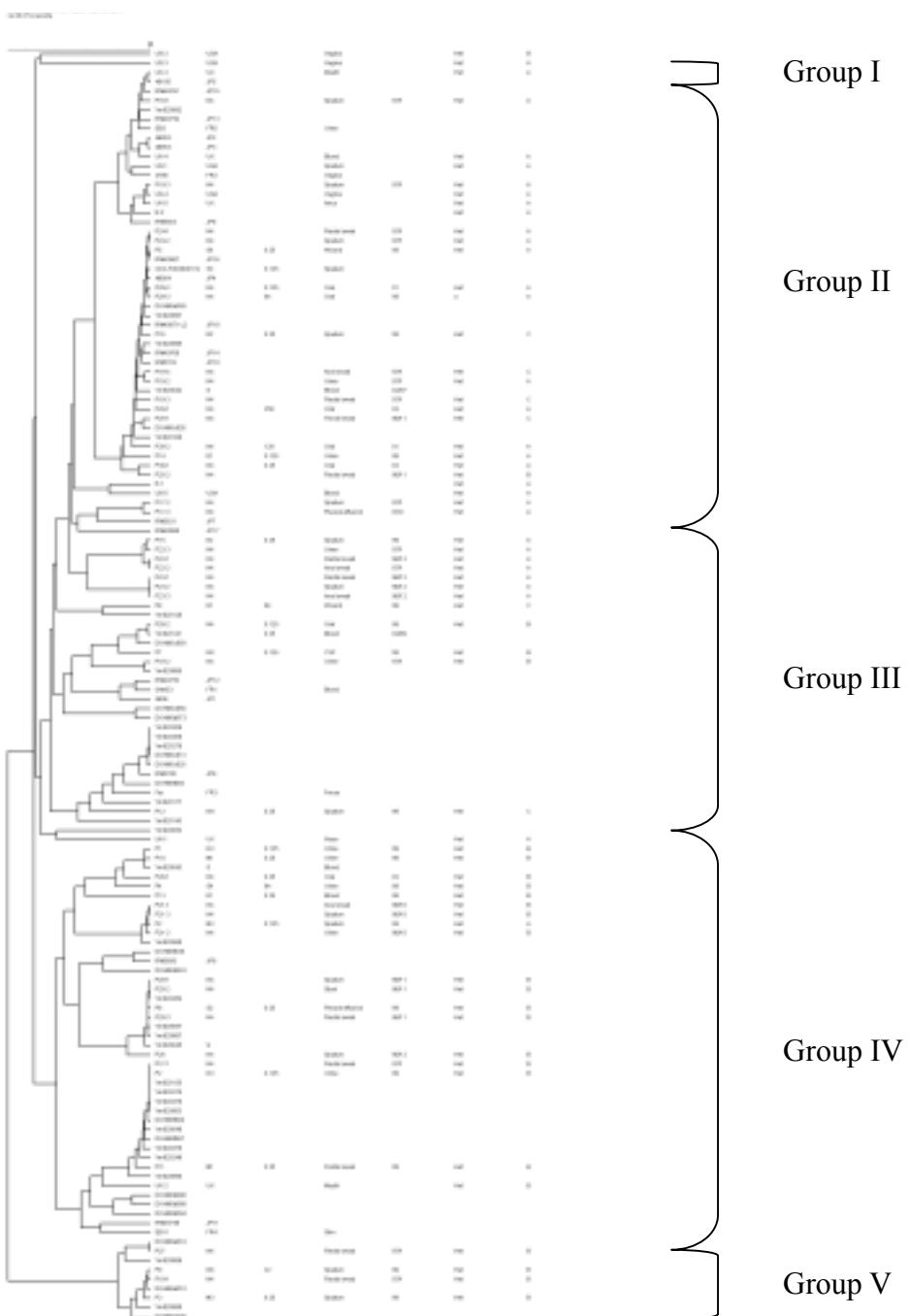
PFGE 的分離效果



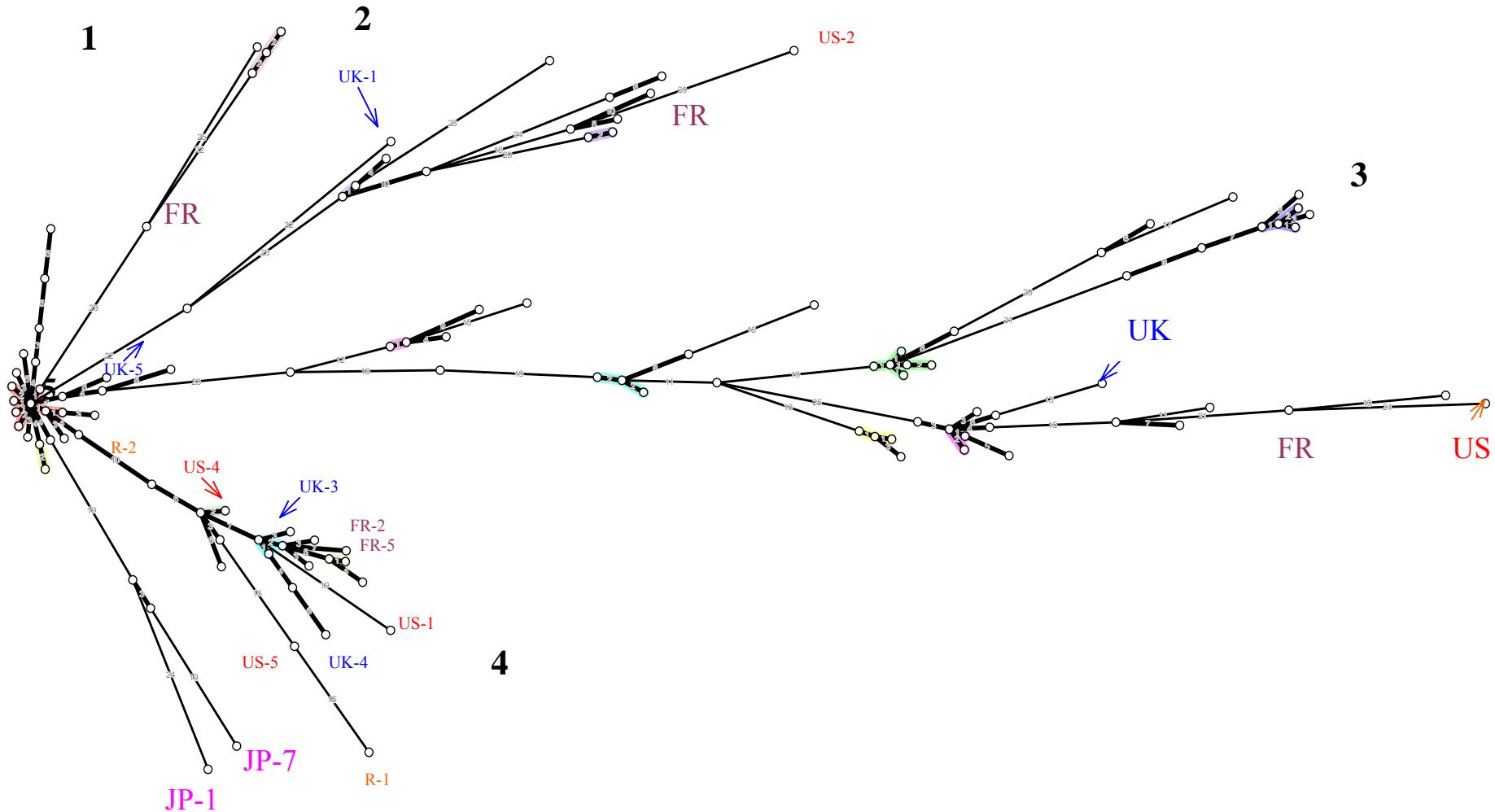
圖十四-一、親緣性樹狀圖(dendrogram)顯示出利用 7 調持家基因所做 MLST 決定 58 株 *C. albicans* 臨床菌株間之類緣關係。



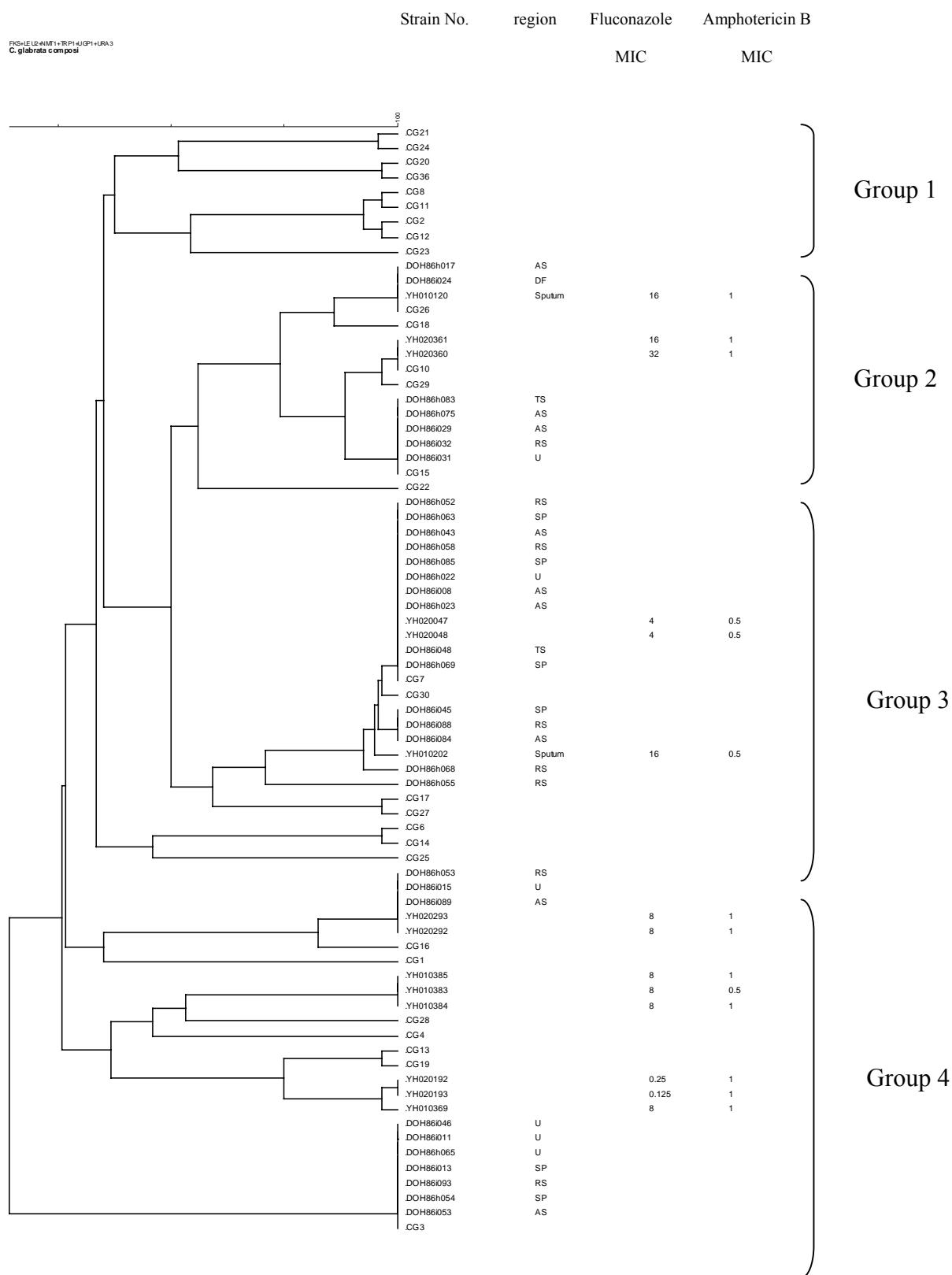
圖十四-二、親緣性樹狀圖(dendrogram)顯示出利用 7 調持家基因所做 MLST 決定 103 株本土菌株，18 株日本菌株，5 株美國菌株，5 株英國及 5 株法國菌株 *C. albicans* 臨床菌株間之類緣關係。

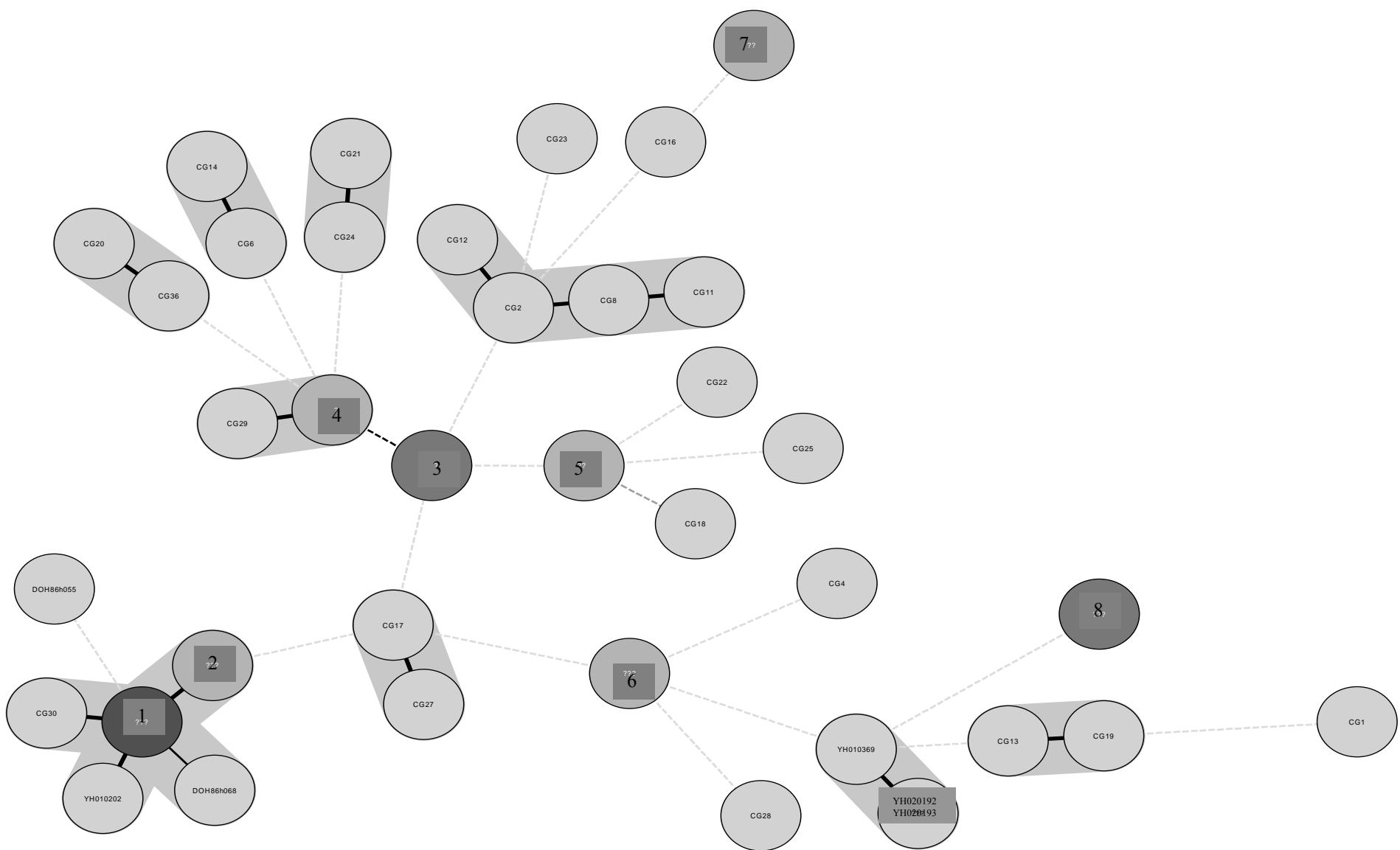


圖十五、將台灣 51 株臨床菌株運算及英國與美國臨床菌株的資料進行 Minimal spanning tree 運算。每一個圓圈代表一株菌株。連接線條及其長度代表菌株間關係及其類緣性親疏。



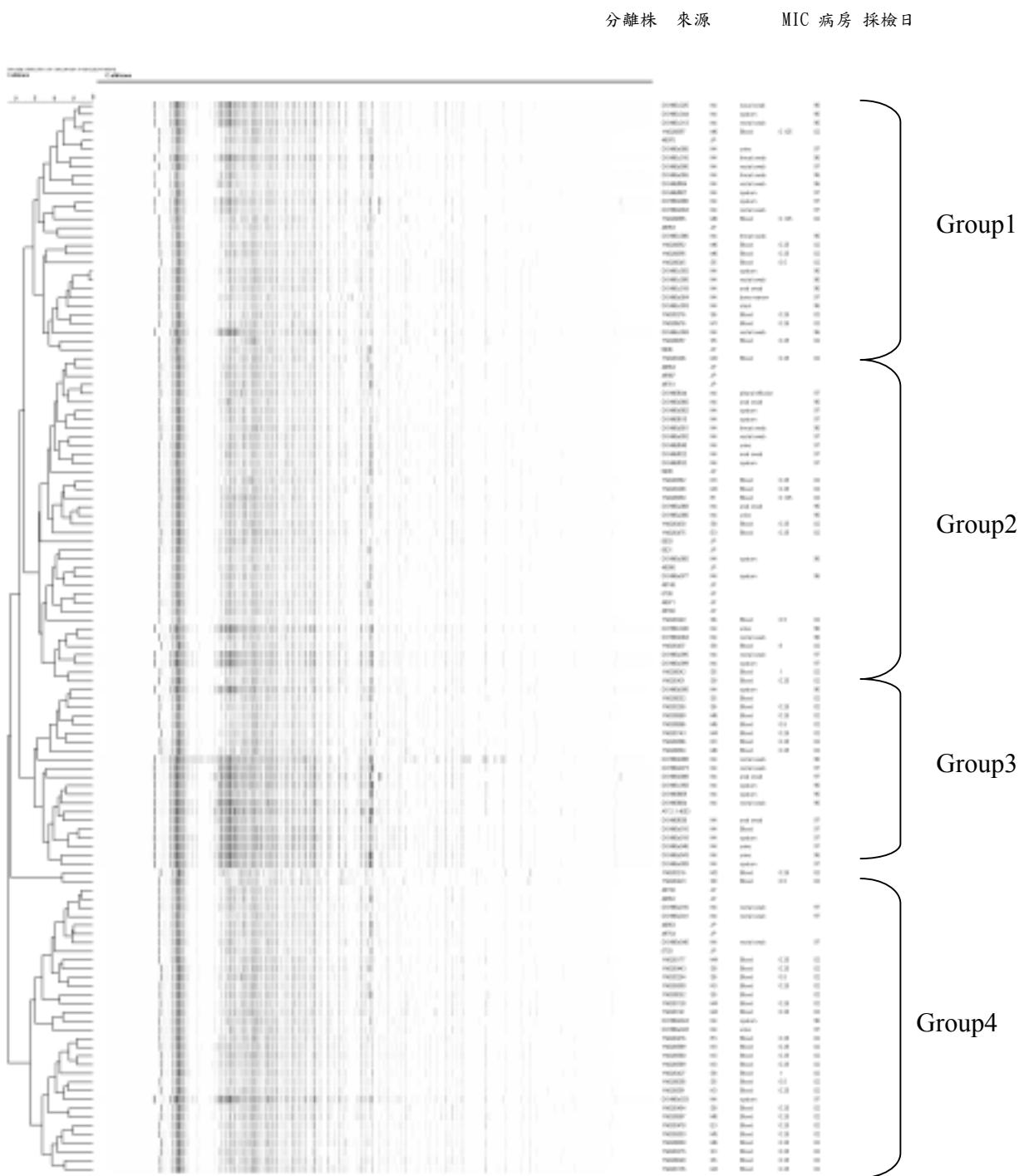
圖十六、親緣性樹狀圖(dendrogram)顯示出利用 6 調持家基因所做 MLST 決定 75 株 *C. glabrata* 臨床菌株間之類緣關係





圖十七、將台灣 46 株臨床菌株運算及國外 46 株臨床菌株的資料進行 Minimal spanning tree 運。每一個圓圈代表一株或一群菌株。連接線條及其長度代表菌株間關係及其類緣性親疏。1：DOH86h052，DOH86h063，DOH86h043，DOH86h058，DOH86h085，DOH86h022，DOH86i008，DOH86h023，DOH86i048，DOH86h069，YH020047，YH020048，CG7；2：DOH86i045，DOH86i088，DOH86i084；3：DOH86h083，DOH86h075，DOH86i029，DOH86i032，DOH86i031，CG15；4：YH020361，YH020360，CG10；5：DOH86h017，DOH86i024，YH010120，CG26；6：YH010385，YH010383，YH010384；7：DOH86h053，DOH86i015，DOH86i089，YH020293，YH020292；8：DOH86i046，DOH86i011，DOH86h065，DOH86i013，DOH86i093，DOH86h054，DOH86i053，CG3。

圖十八、以 AFLP 分子分型法分析全省 55 株與某大醫院 49 株 *C. albicans* 臨床菌株以及日本菌株 18 株。地區: N, 北; S, 南; M, 中; E, 東. MIC 代表每株菌的 fluconazol 抗藥性。



八、附錄：本計畫產出著作發表成果

本計畫之著作產出成果共有 SCI 論文八篇(五篇已發表，一篇已投寄，二篇投寄中)，還有五篇 SCI 論文在撰寫中。

1. Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY*. (2005) Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. J Med Microbiol. 54(3): 249-258.
2. Li SY, Yang YL, Chen KW, Cheng HH, Chiou CS, Wang TH, Lauderdale TL, Hung CC, Lo HJ. (2005) Molecular Epidemiology of Long-term Colonization of *Candida albicans* Strains from HIV-infected Patients. Epidemiology and Infection 133(5): (與國衛院合作成果)
3. Yun-Liang Yang, Shu-Ying Li, Hsiao-Hsu Cheng and Hsiu-Jung Lo (2005) The Trend of Susceptibilities to Amphotericin B and Fluconazole of *Candida* species from 1999 to 2002 in Taiwan BMC Infectious Diseases, 5:99(與國衛院合作成果)
4. Hsiao CH, Li Shu-Ying, Wang JL, Liu CM. Clinicopathologic and immunohistochemical characteristics of fungal sinusitis J. Form. Med. Associat 104 (8):549-556(與台大醫院合作成果).
5. Yang YL, Li Shu-Ying, Cheng HH, Lo HJ; TSARY Hospitals. Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in TSARY 2002. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005 Mar;51(3): 179-183. (與國衛院合作成果)
6. Jang-Shiun Wang, Shu-Ying Li, Yun-Liang Yang, Hsiao-Hui Chou, Hsiu-Jung Lo Close Relatedness among Fluconazole Resistant *Candida tropicalis* Isolated from Different Hospitals in Taiwan. J. Antimicrob. Chemother. (submitted, 2005) (與國衛院合作成果)
7. Kuo-Wei Chen, Yee-Chun Chen, Hsiu-Jung Lo, Frank C. Odds, Tzu-Hui Wang, Chi-Yang Lin, Shu-Ying Li* (2005) Multilocus Sequence Typing for Analyses of Clonality of *Candida albicans* strains in Taiwan J. Clin. Microbiol. (submitting)
8. Mei-Hui Liao, Shu-Ying Li* Differentiation of fungal species with various fluconazol resistance by PCR-EIA method(submitting).

五篇 SCI 論文在撰寫中

- MLST of *C. albicans* in HIV patients (manuscript in preparation)
- Rep-PCR typing of *C. albicans* (manuscript in preparation)
- MLST of *Candida glabrata* in Taiwan (manuscript in preparation)
- *Candida tropicalis* in Taiwan (manuscript in preparation)
- *Candida parapsilosis* in Taiwan (manuscript in preparation)

誌謝

本計畫擬向邱乾順研究員提供之PFGE及MLST實驗技術指導及提供臨床酵母菌株及其相關資料之台大醫院陳宜君博士及國家衛生研究院羅秀容博士及22家醫院致最大謝意，這22家醫院為：台大醫院，林口長庚醫院，基隆長庚醫院，新竹醫院，羅東博愛醫院，聖瑪麗醫院，台北市立陽明醫院，台北市立仁愛醫院，桃園綜合醫院，台安醫院，辜基金會孫逸仙癌症中心，三軍總醫院，光田綜合醫院，台中榮民總醫院，仁愛綜合醫院，奇美醫院，高雄醫學院附設醫院，高雄三軍醫院，臺南市立醫院，高雄榮民總醫院，花蓮佛教慈濟綜合醫院，馬偕醫院台東分院。在此亦感謝本局315核心實驗室黃漢欽等同仁在核酸定序相關試驗上之協助。