

計畫編號：DOH100-DC-2025

行政院衛生署疾病管制局一百年度科技研究發展計畫

建立高致病性及新興病原真菌及院內感染病原  
實驗室檢驗及監測-I

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：李淑英

研究人員：李淑英、陳國緯、林政峰、廖美惠、陳俊辰、林昆彥、黃彥霖

執行期間：100年 01月 01日至 100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\*

計畫摘要：	3
本文	9
一、前言：	9
二、材料與方法：	22
三、結果：	27
四、討論：	38
五、結論與建議	44
六、計畫重要研究成果及具體建議	46
七、參考文獻：	48
八、圖與表	53
附錄一：本計畫產出著作發表成果	84
附錄二：圖表目錄	85

## 計畫摘要：

### (1) 中文摘要：

中文關鍵詞：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、真菌參考實驗室、奴卡菌、鮑氏不動桿菌、新型隱球菌、分子流行病學、多重抗藥性細菌、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。本局 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（100-104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。

我們的主要進展有十：第一、發展可單管同時偵測麴菌、鏹胞菌、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 marneffei*, *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  $10^2$  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。第三、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。第四、成功開發流式微珠陣列系統，可單管快速正確地鑑定台灣院內感染最重要細菌及真菌(不動桿菌、金黃色葡萄球菌、綠膿桿菌及白色念珠菌)，敏感度可高達 1-10 pg DNA。發展院內感染多重抗藥性細菌的快速多重檢測平台。第五、建立高病原性輸入性雙型性真菌之檢驗方法。第六、發展新型隱球菌分子分型技術，密切注意北美新崛起高致病力菌株引入台灣的可能性。第七、發展奴

卡菌的分子分型方法探討其分子流行病學。**第八**、持續應用MLST分析台灣菌株外，並與國際菌株進行類緣性分析，以進一步調查流病關聯性，及地理趨適性的分子機轉。**第九**、使用全基因體定序技術及光學圖譜(optical mapping)針對本土鮑氏不動桿菌TCDC-AB0715多重抗藥性菌株進行全基因體分析，結果已刊登於*Journal of Bacteriology*，序列公佈在GenBank。**第十**、將TCDC-AB0715與已知全基因序列的8株標準菌株進行比較基因體分析，觀察基因的重組排列，包含序列片段的插入、遺失、反轉、或倍增等情況，藉此探討抗藥性及致病力演化之機轉。

本多年期計畫成果豐碩，本年度著作產出成果共有七篇論文（2篇SCI論文已發表；5篇SCI論文投寄中）。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，合作持續分型及統計分群並與臨床及流病資料整合建立資料庫。國際上持續建立合作關係，交換型別資訊或提供訓練。希望藉由持續努力瞭解病原可能傳播流行及特定高抗藥性/高致病性株系崛起之情形。甚且探勘出特異性流病、檢驗及疫苗標誌分子。

## (2)Abstract :

Keywords : community-acquired fungal infections, nosocomial fungal infections, newly emerging fungi, dimorphic imported fungi, fungus reference laboratory, *Nocardia* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Cryptococcus neoformans*, molecular epidemiology, multiple-drug resistant bacteria, 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 twelve 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 marneffei*, *Paecilomyces javanicuss*, *Saksenaea vasiformis*, *Apophysomyces elegans*, *Absidia corymbifera*, and *Syncephalastrum racemosum*. Twenty-three oligonucleotide probes were designed based on the internal transcribed spacer (ITS2) region for species level identification of molds. 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<sup>2</sup> 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. **Thirdly** , We have 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. **Fourthly**, we develop a microsphere suspension array assay for rapid and accurate identification of four most important nosocomial pathogens, namely *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Candida albicans*. The specificity is high and the sensitivity of detection is 1-10 pg DNA. **Fifthly**, We have set up diagnostic methods for high-pathogenic imported dimorphic fungi. **Sixthly**, we develop molecular typing methods for *Cryptococcus neoformans* and monitor closely the possible introduction of the high virulent strains from North America. **Seventhly**, we set up typing scheme for *Nocardia brasiliensis* and conduct its molecular epidemiology study. **Eighthly**, we continue strain typing of *Candida* spp. by MLST and analyse the strain relatedness with international data to find out the epidemiological links and the geographical preferences. **Ninethly**, we use novel optical mapping technique and whole genome sequencing to map whole

genome of a multiple drug resistant *A. baumanei* strain TCDC-AB0715 and the result published in *Journal of Bacteriology* and sequence deposited in NCBI.

**Tenthly,** We conduct comparative genomic study of our TCDC-AB0715 and 7 other reference strains which are already whole genome sequenced to identify gene rearrangement such as insertion, deletion, inversions or duplications in a hope to elucidate the resistance and virulence mechanisms.

This year (2011), 7 papers have been generated: 2 SCI papers have already been published, 5 are (re-)submitting. 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<sup>1-5</sup>，並持續成為公衛上的隱憂<sup>6-10</sup>。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<sup>11, 12</sup>、histoplasmosis<sup>13-15</sup> 及 blastomycosis 等雙型性高致病性真菌之感染趨勢<sup>16</sup>。新興真菌的崛起<sup>17</sup>、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<sup>18, 19</sup>。影響真菌感染的二個里程碑，一個為強效抗愛滋療法 (HAART，即俗稱的雞尾酒療法)，的出現及普及；其二為 fluconazole 之上市問世。這固然稍有阻遏了病原真菌感染竄升之趨勢，然而感染流行病學卻以另一面貌出現，例如抗 fluconazole 的非 albicans 的念珠菌有逐年增加的趨勢。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。

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<sup>11</sup>。

Coccidioidomycosis曾見在建築工地<sup>20</sup>或在考古隊挖掘洞穴時<sup>12</sup>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<sup>21</sup>。Histoplasmosis在因整建曾為鳥類棲息地的工程中灰塵揚起，而爆發於鄰該工地操場教室的學生流行感染<sup>13</sup>；亦有因探索蝙蝠洞穴接觸塵土而爆發感染<sup>14</sup>；或有至南美洲旅遊旅客感染<sup>22</sup>。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<sup>23</sup>。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。

毛黴菌(mucormycetes)致死率十分高且抗藥性樣式特殊，過去罕見感染病例，然近年來也有增加之趨勢，在印度等輕忽糖尿病控制的國家毛黴菌已成為重要新興真菌，在黎巴嫩等中東國家見5-10月季節性流行<sup>24</sup>。今年七月美國CDC在MMWR 報告在密蘇里州因颶風肆虐後，13名免疫健全民眾因創傷導致爆發*Apophysomyces trapeziformis*造成的感染，其中10名需進ICU，5名死亡 (Robert et. al. 2011)。其他毛黴菌感染與地震、車禍、海嘯創

傷相關的例子亦不勝枚舉。在免疫缺損病人毛黴菌更是重要院內感染病原，在血液腫瘤器官移植病患中的盛行率節節升高<sup>25</sup>。因竹製壓舌片<sup>26</sup>、糖衣錠及病膳<sup>27</sup>、造成醫源性 *Rhizopus spp.* 的感染亦頗受矚目。

新型隱球菌 (*Cryptococcus neoformans*)首度於1894 年被發現，是一種產莢膜之酵母菌，能引起隱球菌病(cryptococcosis)及隱球菌腦膜炎(cryptococcal meningitis)，世界各地均有此病散發性發生。1955 年以前全球文獻統計僅300 個病例，然而隨著免疫抑制療法的普遍化及愛滋病(AIDS)的崛起，全球病例有日益增多之趨勢。近年來，新型隱球菌已躍居愛滋病患死因首位，且佔腦膜炎病因的5%，因此逐漸引起醫療界之重視。病原菌隱球菌(*Cryptococcus*)一屬已知有37 種(species)，但具致病性的多為新型隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)，其他菌種如*Cryptococcus albidus*、*C. laurentii*、*C. curvatus* 或 *C. humicola* 僅引致少數個案病例<sup>28</sup>。依據分子序列分析新型隱球菌可分為三亞種(varieties)：*C. neoformans* var.*grubii* (血清型A)、*C. neoformans* var. *gattii*(血清型B 和C)及*C. neoformans* var. *neoformans* (血清型D)。新型隱球菌常存在於土壤、鳥類排泄物、尤加利樹、腐爛有機物中。當含隱球菌的腐植土或乾燥鴿糞逸散入空氣中時，便可經由呼吸道進入人體而感染。病原被吸入後會沉積在肺泡中，引起肺部疾病，若患者缺乏正常T 細胞功能，病菌會散播全身並侵入中樞神經系統，引發腦膜炎。檢驗以檢體（腦脊髓液、痰、尿液及血清）直接以印度墨汁（India ink）染色多醣體莢膜鏡檢菌體外圍呈現光暈。在Potato Dextrose 或 Sabouraud's Dextrose 瓊脂及不含有cycloheximide 之培養基，於20-37°C 培養，2-3 天觀察黏狀、乳白色至褐色之菌落。Cornmeal Tween 80 含咖啡因瓊脂會製造黑色素形成棕色菌落，可進一步鑑別出此酵母菌。或以乳膠凝集試驗 (latex agglutination) 檢測血液或是腦脊髓液中新型隱球菌抗原，抗

原力價超過1:8 可視為感染。抗原力價檢測亦可為病程及療程追蹤之依據。

依據美國CDC 資料隱球菌病一般族群的年發生率為0.2-0.9/100,000，在AIDS 患者的年發生率為2-4/1,000。在歐洲隱球菌病一般族群的年發生率為0.1-0.05/100,000（德國0.16/100,000、英國0.066/100,000）<sup>29</sup>。在澳洲及紐西蘭一般族群的年發生率分別為0.66 及0.22/100,000<sup>30</sup>。新型隱球菌是AIDS 最常見的伺機性感染，在美國和歐洲愛滋病病患約有3-10%會感染隱球菌病，在非洲則高達30%。新型隱球菌病原依型別差異其傾病因子、生態趨適性及地理分佈亦有差異。*C. neoformans* var. *grubii* (血清型A) 分佈遍布全世界，佔全世界的隱球菌病的70%。尤其存在鴿糞或其它鳥類如麻雀、鸚鵡等之糞便中。愛滋病病人和美國地區的隱球菌感染百分之百是由血清型A 所造成。*C. neoformans* var. *neoformans* (血清型D) 佔全世界隱球菌病的9%，主要分佈在北歐地區。其感染臨牀上較屬急性，較易有發燒及全身性感染，較少造成腦膜炎。採自歐洲如丹麥、法國、德國、義大利、荷蘭及瑞士等與亞洲的日本，菌種100%皆為A 或D 兩個血清型。阿根廷、加拿大、英國及南加州及夏威夷以外的美國，隱球菌病的致病菌種A 或D 兩個血清型亦多達85%。*C. neoformans* var. *gattii* (血清型B 及C) 盛行於熱帶和亞熱帶地區如巴西、中非洲、巴布亞新幾內亞、澳洲、南加州、夏威夷、墨西哥、巴拉圭、地中海地區或亞洲的高棉、泰國、越南、印度及尼泊爾等地。*C. neoformans* var. *gattii* 好發於免疫力正常的人身上，易造成腦部病變和肺部的感染，雖然死亡病例較少，但需外科及較長的藥物治療且易有後遺症。B 血清型佔全世界隱球菌病的11%；而C 血清型只有2%，且其中88%發生於美國的南加州。*C. neoformans* var. *gattii* 血清型B 與多種桉樹(*Eucalyptus* spp.)有生態學上之關聯性，主要生長於熱帶及亞熱帶地區並不見於溫帶地區，如赤桉(*E. camaldulensis*)、細葉桉(*E. tereticornis*)及檸檬桉(*E. citriodora*)

等。除了澳洲本土以外加州、亞普利亞、義大利、及印度北部<sup>31</sup>等地區的赤桉可分離出*C. neoformans* var. *gattii*。台灣地區屬於亞熱帶適合桉樹的繁殖，桉樹為速生樹種且經濟價值高，自1896 年起由澳洲引進台灣後，已成為台灣重要造林樹種之一，目前台灣常見的桉樹有長葉桉(*E. longifolia*)、藍桉(*E. globulus*)、大葉桉(*E. robusta*)以及檸檬桉(*E. citriodora*)等。這些樹種的植被分佈及開花期與*C. neoformans* var. *gattii*的感染是否具有地域及時序上的相關性，有待進一步探討。台灣隱球菌感染情形，台大醫院研究報告中約有64.4%感染由*C. neoformans* var. *neoformans* 造成；約有35.6%感染由*C. neoformans* var. *gattii*造成。然而自1995 年後由於愛滋病的增加，*C. neoformans* var. *neoformans* 感染率也在逐漸上升中。由於各亞種生態趨適性不同，臨床病程發展易有些微差異，如此勢必影響防治及治療策略，因此，對於國內各血清型之分佈情形有必要加以調查，發展快速型別鑑別診斷亦十分重要。新型隱球菌宿主範圍包括人、貓、狗、狐狸、天竺鼠、馬、牛、羊、猴子、無尾熊、海豚、鳥類等。潛伏期可長達數月至數年。日本動物園曾發現一例澳洲進口無尾熊因隱球菌死亡的案例，經鑑定病原為*C. neoformans* var. *gattii*，由於日本本土株皆屬*C. neoformans* var. *neoformans* 亞種，這也是*C. neoformans* var. *gattii* 亞種首度在日本被分離之案例<sup>32</sup>，這隻無尾熊應在澳洲已受感染。雖然新型隱球菌曾被報導過從鳥類糞便及人類臨床檢體分離之菌株具有相同生化特性，單株抗體特異性及限制片段長度多型性 (RFLP) 指紋分析圖譜<sup>33</sup>。一般而言，人畜共患的案例仍屬罕見。*Cryptococcus gattii*一般分佈於熱帶及亞熱帶，自1999年初次被發現在加拿大 Vancouver Island，並且向內陸漫延至 British Columbia，1999-2007的統計數據死亡率達8.7%(19/218)。2004以後出現在美國西北部太平洋沿岸 Oregon, Washington, California, Idaho 等州，根據美國CDC的檢驗週報MMWR所做的

統計，2004-2010數據顯示具有造成高達25%(15/60)的死亡率。*Cryptococcus gattii*具有高死亡率且會感染健康的人，因此相當值得大家重視。加拿大 Vancouver Island 及 British Columbia 所發現的 genotype 主要為 VGIIa，其他為 VGIIb。在美國所出現的 genotype 除了 VGIIa 與 VGIIb 外，還有 VGIIc 的特有型別。從老鼠的毒性試驗發現 VGIIa, VGIIc 遠高於 VGIIb，故具有高致病性的型別 VGIIa 及 VGIIc 更值得注意的。*Cryptococcus gattii*的主要存在於尤加利樹及土壤等、孢子會藉由人類活動及交通工具攜帶造成病原菌的散佈，因此建立監測機制的重要。監測方法是利用 MLST 區分出是否具有高致病性的型別，並且比較是否對抗真菌藥具有高抗藥性。

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<sup>34</sup>。早期及正確的診斷有助於病害診療及防治<sup>35, 36</sup>。真菌種類繁多可大分為酵母菌及黴菌兩類，而會引起疾病的真菌大約在 100-200 種。一般較常見的人類致病菌包括 *Candida* spp. 如 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, 和 *C. glabrata* 以及 *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., *A. fumigatus* 及 *A. niger* 等。許多較罕見的真菌在近年來被發現引發感染。病原真菌之傳統鑑別診斷方法一般結合培養法如用 SDA、BHI、CHROMagar 培養及染色法如用 KOH、India Ink<sup>37</sup>，觀察型態為主。培養法費時久、過程複雜、需累積的經驗，且敏感度不夠高。生化生理檢測法如用 API ID32C (bioMérieux Inc., France)、VitekII、Rapid 檢測法等商業化快速鑑定的套組<sup>38</sup>，雖然操作上比較簡單，但須培養 48 小時才可以判斷結果，並僅能對其資料庫所收羅之常見菌種，

才能有正確鑑定結果<sup>39</sup>。近來，一些檢測檢體之真菌細胞壁成份、抗原、抗體之非培養分析法應運而生<sup>40</sup>。例如，利用樹脂凝集試驗法(LA)檢測*C. neoformans*抗原<sup>41</sup>，以三明治酵素免疫反應(EIA)<sup>42</sup>，免疫螢光染色(IF)<sup>43</sup>偵測麴菌和念珠菌抗原、或利用EIA、免疫擴散法(ID)或補體固定反應(CF)測blastomycosis, coccidioidomycosis, paracoccidioidomycosis及histoplasmosis等之抗體力價<sup>44</sup>。

晚近，核酸檢測技術如各種PCR方法之崛起提供快速、精確及敏感鑑別之利器<sup>36, 45</sup>。以PCR配合酵素免疫檢測法EIA或RFLP技術<sup>46, 47</sup>以及核酸雜合法<sup>48, 49</sup>檢測真菌已有不少報告，在Candida方面，已有先以PCR增幅ITS2區段，再以專一性molecular beacons探針鑑定*C. dubliniensis*<sup>50</sup>之文獻。此外如應用在*Aspergillus spp.*<sup>51</sup>, *Candida spp.*<sup>52</sup>, *C. neoformans*<sup>53</sup>, *Penicillium marneffei*及重要的雙型性酵母菌<sup>54</sup>等之鑑別。針對檢驗病原真菌中*Coccidioides immitis*、*Histoplasma capsulatum*及*Blastomyces dermatitidis*的標準化核酸檢驗試劑GenProbe已成功上市。PCR的最新發展則是利用及時PCR偵測法(real-time PCR)，具有快速(45min-2hr)、敏感度更高、可定量及避免污染等優點<sup>55</sup>。吾人日前發展出可鑑定7種臨床上常見真菌種別之PCR-EIA<sup>56</sup>。也發展以Light-Cycler Real-time PCR及時偵測7種臨床上常見真菌病原之檢驗系統<sup>57, 58</sup>，針對基因標的為ITS2或large subunit ribosomal DNA，可鑑定臨床重要真菌<sup>59, 60</sup>。Sugita等已經建立一個ITS序列資料庫來鑑定臨床重要的Trichosporon spp.，需時24小時以下<sup>61</sup>。Ninet等發展一套利用28S核酸序列來鑑定皮膚真菌菌種(dermatophytes species)的商業套組；ABI公司則發展出針對真菌的D2 LSU rDNA片段可全自動化分析序列的系統，並經由資料庫比對鑑別種別。定序粒腺體的large subunit ribosomal RNA基因，亦可提供作為除細胞核rDNA外另一比較類緣及區別鑑定之標的<sup>62</sup>。這些真菌菌株基因

序列資料若能更臻完備，不但可作為分類鑑定之依據，更可提供引子、探針設計的寶貴資料。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，更將提供了令人瞠目的豐富資訊。

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<sup>63</sup>，甚可納入可能變種及人畜共通病原，如此一來，可以極少量檢體做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<sup>64</sup>。國內成大張長泉教授最近亦已發展出檢驗64種黴菌之核酸陣列<sup>65</sup>。目前在全球漸受矚目的流式微珠陣列，主要原理為二種螢光染劑以不同比例混合出100種微珠，其上可固定化偵測用探針或抗原/抗體，與經適當PCR反應或免疫反應前處理之待測物產生特異性結合後，這些微珠會流經流式細胞儀裝置，並逐一被雙股雷射光束，以便同時辨識微珠編碼及目標信號強弱。如此可高通量、快速、精確地同步偵測100種不同特定目標物。這對於時常需面對多種未知傳染病原的防疫及反生恐單位確實頗具潛在應用性。Diaz和Fell近三年利用Luminex流式細胞儀高通量多重快速檢測平台，分別發展出針對*Trichosporon* genus (絲孢酵母屬)種別<sup>66</sup>、*Malassezia* species<sup>67</sup>種別及*Cryptococcus neoformans*種群鑑定<sup>68</sup>之新穎技術。Page和Kurzman最近則發表利用Luminex平台發展鑑定念珠菌<sup>69</sup>及9種臨床常見及6種罕見之子囊酵母菌的Luminex技術<sup>70</sup>最新應用。美國CDC真菌部門發表利用Luminex鑑定*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*六種臨床重要酵母菌，靈敏度可達0.5

pg 的 DNA，PCR增幅後僅需不到1小時的時間<sup>71</sup>。這類技術對於防疫檢驗上甚感棘手的未知病原檢體之檢驗，或許亦可提供部分解決之道。國內晶片技術平台經數年研發以來，各種macro-/microarray乃至lab-on-a-chip技術已漸趨成熟，文獻上發表各種探針之資訊亦急速成長，因此這類高通量之核酸檢測技術發展應用於快速鑑定致病性真菌應是甚為可行之方向。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<sup>72</sup>外，亦可應用於致病力、抗藥性及地理趨勢性等問題分子層次機轉之闡明。適當分子分型工具依菌種特性和探討的目的而定，理想上必須具再現性、識別力、容易使用，且需朝向高通量、可數位交換、網路化、標準化與建立資料庫<sup>73</sup>。針對基因序列分型的rDNA序列，分析比對新型隱球菌的ITS1-5.8S-ITS2 region序列中的八個位置的核苷酸(10, 11, 15, 108,(ITS1), 221(5.8S), 298, 346(ITS2))可將新型隱球菌三個變種(varieties)分成7個type(type1~7)<sup>74</sup>，各有其全球地理分佈特性。利用*C. parapsilosis* ITS1-5.8S-ITS2 region序列分析，*C. parapsilosis*可分為四群(group I, II, III, IV)<sup>75</sup>。*C. albicans*以25S rRNA基因為標的進行PCR反應，依增幅產物片段大小可分為genotype A(450 bp), genotype B(840 bp), genotype C(450 bp and 840 bp), genotype E(1,400 bp)，*C. dubliniensis* (1,080 bp)<sup>76</sup>。2002年法國學者倡議建立MLST(multi-locus sequence typing)做為病原菌國際化比對的平台(<http://www.mlst.net>)。MLST原理為針對6-8個約500bp的持家基因

(house-keeping genes)定序，每一條不同(miltiantigen sequence typing)，砂眼披衣菌則可針對omp1變異區的VS1-VS4進行分型。每株菌株則依其這些特定持家基因locus上alleles的組合樣式形成其特定的序列樣式(sequence type, ST) 以茲比較。每株菌株則依其這些特定持家基因locus上alleles的組合樣式形成其特定的序列樣式(sequence type, ST) 以茲比較。最早應用於MLST的菌是*Neisseria meningitidis*以後陸續有*Compylobacter* spp. 及*Streptococcus* spp...等菌，至於可供比對資料數，目前以*N. meningitidis* 最多，有超過60個國家共計有2840 STs (sequence types)。MLST具有穩定、鑑別力高的序列皆被歸於一特定的alleles。百日咳、淋病則有MAST<sup>77</sup>，利於實驗室間資料交換比對等優點<sup>78</sup>，並被成功應用於探討*C. albicans*的院內感染流行病學及評估全球菌株之多樣性及菌株間類緣關係<sup>79</sup>。其他如針對重複性序列DNA的分析，如rep-PCR<sup>80</sup>與Multilocus microsatellite genes分析。如針對高變化頻率的satellite DNA上的micro-及minisatellite所發展的VNTR (variable number of tandem repeats)或MLVA (multiple- locus VNTR)分型技術則被用來探討*C. albicans*的演化和族群遺傳結構<sup>81</sup>。

許多真菌基因體已陸續被定序完成，揭開了基因解密的新紀元。運用各種基因破壞及不活化技術如 RNA-mediated gene silencing，得以闡明許多未知基因的功能，並進一步瞭解負責真菌生長及致病過程的基因。全基因體研究方式如 transcript profiling, signature-tagged mutagenesis and in vivo expression technology 有助於探討致病機轉。2D-PAGE, mass spectrometry 等蛋白質體的研究有助於瞭解雙型性、寄主反應、細胞壁、病原因子及抗藥性等。基因體解序完成後其基因註解(annotation) 也幾近完成，使得吾人對病原真菌瞭解更行加速<sup>1</sup>。為求對於真菌病原可能的致病、傳播及抗藥性機制以及具有臨床意義的基因能有更深的了解和研究，我們使用光學圖譜

(optical mapping)技術進行分析。光學圖譜是一個研究基因體學的一個新方法，由 Opgen 生技公司提供這項服務。Optical mapping 利用特殊的方式使微生物染色體帶電荷，通過晶片通道後，使得單一染色體分子能夠拉開並且固定，接著以限制酵素(restriction enzyme)作用，再加以染色和照相，就可以得到高解析度、具有順序的 whole genome restriction maps<sup>82</sup>。由於這項技術可以建構完整且具有順序的基因限制酵素圖譜，故可應用於許多方面，包括輔助全基因定序(sequence finishing)、分子分型(strain typing)以及基因分析比較(Comparative Genomics)；(1)在全基因定序中，genome sequence 若帶有許多短片段的重複序列，會造成定序結果出現許多無法比對組合的序列片段(contig)，亦或富含 GC 的部分，也會造成定序的困難<sup>83</sup>，如果搭配現制圖譜的技術加以比對，則可以解決這個問題；(2)在分子分型的應用上，與傳統 PFGE 做比較，由於解析度很高，可達到 1.6kb，加上具有順序的特性，分型效果會遠比 PFGE 來的好，且傳統 PFGE 在不同實驗室或者不同人操作所造成的差異或也不會發生在 optical mapping 的技術上；(3)具有順序的全基因體限制酵素切位圖譜可以觀察基因的重組排列，包含插入序列(insertion)、遺失序列(deletion)、反轉序列(inversions)或者雙倍序列(duplications)等情況，藉由基因層面的變化推測可能造成的生理代謝改變、抗藥性的發生、或者毒力的增減等現象<sup>84, 85</sup>。過去研究計畫中，我們選取 7Ab15 菌株進行全基因體定序。這一株 AB 菌除了對國內廣泛使用的 carbapenem 類抗生素具抗藥性之外，另外擁有一個非常特殊的性質：有別於大部分已知的 AB 菌只具有四種 carbapenem-hydrolyzing Class D β-lactamases (OXA-23, OXA-24, OXA-51 及 OXA-58)中的一種，此菌株同時具有 OXA-23 (盛行於東南亞、南北美洲、澳洲)及 OXA-51 (全球皆有病例) 兩個基因，顯示台灣本土可能已演化出自有的特殊菌株。本研究中，我們

委託陽明大學定序中心進行基因體定序，定序後資料共計 114 個 contigs，長度由 1,003 bases 到 236,289 bases 不等，約 100 倍覆蓋率(100-fold coverage)、 $0.15 / 100,000$  bases 錯誤率(error rate)。基因體總長度約在 4.05 ~4.07 Mb 之間，目前正在更進一步組合 contigs、與光學圖譜(optical mapping)比對其正確性、標定開放式讀架(ORFs)、並且注釋(annotation)各基因功能，結果已發表<sup>86</sup>，希望能對國內的本土菌株研究再帶來新的發現。為求對於鮑氏不動桿菌(*Acinetobacter baumannii*)可能的抗藥性機制以及具有臨床意義的基因能有更深的了解和研究，我們使用光學圖譜(optical mapping)技術進行分析。光學圖譜是一個研究基因體學的一個新方法，由 Opgen 生技公司提供這項服務。Optical mapping 利用特殊的方式使微生物染色體帶電荷，通過晶片通道後，使得單一染色體分子能夠拉開並且固定，接著以限制酵素(restriction enzyme)作用，再加以染色和照相，就可以得到高解析度、具有順序的 whole genome restriction maps<sup>82</sup>。由於這項技術可以建構完整且具有順序的基因限制酵素圖譜，故可應用於許多方面，包括輔助全基因定序(sequencing finishing)、分子分型(strain typing)以及基因分析比較(Comparative Genomics)；(1)在全基因定序中，genome sequence 若帶有許多短片段的重複序列，會造成定序結果出現許多無法比對組合的序列片段(contig)，亦或富含 GC 的部分，也會造成定序的困難<sup>83</sup>，如果搭配現制圖譜的技術加以比對，則可以解決這個問題；(2)在分子分型的應用上，與傳統 PFGE 做比較，由於解析度很高，可達到 1.6kb，加上具有順序的特性，分型效果會遠比 PFGE 來的好，且傳統 PFGE 在不同實驗室或者不同人操作所造成的差異或也不會發生在 optical mapping 的技術上；(3)具有順序的全基因體限制酵素切位圖譜可以觀察基因的重組排列，包含插入序列(insertion)、遺失序列(deletion)、反轉序列(inversions)或者雙倍序列

(duplications)等情況，藉由基因層面的變化推測可能造成的生理代謝改變、抗藥性的發生、或者毒力的增減等現象<sup>84, 85</sup>。本實驗將台灣臨床抗藥性不動桿菌與已知全基因序列的標準菌株共七株做分析比較，差異甚大，故選差異最小的標準菌株 *Acinetobacter baumannii* ACICU，希望可以藉由 optical mapping 的技術讓我們對於不動桿菌有更深的了解，以期解決嚴重決抗藥性所造成的醫療問題。

於本研究中，我們發展一多套式聚合酶鏈反應(multiplex PCR)以合成 11 種院內感染細菌之 7 個”後線”之抗藥性基因與 *pvl* 基因。此外亦利用流式微珠陣列偵測 multiplex PCR 之產物以鑑定細菌所具有的抗藥性基因。抗藥性基因的檢測不但有助於增加正確治療的機會，對於細菌抗藥性的監測及未來用藥方針亦提供莫大的助益。除此之外亦投入新穎全基因體分析的光學圖譜技術，進行更深入的研究，以求在學術上及實務應用上有所突破和貢獻。

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

## 二、材料與方法：

### (一)、菌株來源及培養：

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

來自台大醫院血液腫瘤科病人共計 60 個病人，有 502 個檢體扣除了 DNA 不足量或是無法分析的 18 個檢體，此次共檢測了 484 個檢體。檢體中 blood 有 219 個(45.2%)gargling 有 194 個(40.1%)sputum 有 70 個(14.5%)及 BAL 有 1 個(

圖六)。

抗藥性細菌菌株來源除了自生物資源研究及保存中心(BCRC)購買的標準菌株外尚有與醫院合作收集之臨床分離株：金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 13 株、methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) 66 株，methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) 10 株，表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) 6 株、3 株 *S. capitis*，一株 *S. haemolyticus*，糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) 9 株，腸球菌 (*Enterococcus faecium*) 9 株、綠膿桿菌 (*P. aeruginosa*) 63 株、不動桿菌(*Acinetobacter* spp.) 10 株、*A. baumannii* 84 株，克雷伯氏肺炎菌(*Klebsiella pneumoniae*) 6 株、產酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*) 4 株、大腸桿菌(*Escherichia coli*) 4 株、產氣腸桿菌(*Enterobacter aerogenes*) 4 株與陰溝腸桿菌 (*Enterobacter cloacae*) 5 株。所有菌株皆以 TSA (tryptone soy agar) plate 作分離培養。並以 API 及 VitekII 標準方法加以鑑定，確認種別。

真菌菌株來源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 及 2002 菌株。念珠菌屬 *C. tropicalis* 的台大醫院 14 位 ICU 病人之多重分離菌株共 50 株。*C. albicans* 收集自十年間接(1997-2006)全省 25 家醫院時間分離菌株共 201 株。新型隱球菌 *Cryptococcus neoformans* 1999 及 2001 年分離株共 14 株。奴卡菌 *Nocardia brasiliensis* 2002-2010 分離株共 11 株，基本資料詳見表十一。菌株之分離培養採用 Sabouraud dextrose agar (SDA)。菌株之型態及生理生化鑑定採用發芽管試驗 Germ-tube assay，接著採用常用之 API-32 或 VITEK2 酵母菌生化卡片自動鑑定系統。

### (二)、真菌分離株 DNA 的萃取：

真菌分離株培養後用 PUREGENE DNA Purification Kit (Gentra, Minneapolis, Minnesota, USA) 萃取 DNA。簡言之，在 SDA 上培養 2~3 天後，取兩個接種環的真菌量攪散於 2ml PBS 內，加入 10-15 μl 分解酵素，置於 37°C 過夜。13,000 x g 離心 3 分鐘之後，去除上清液；加入 2 ml Cell Lysis Solution，將細胞胚累沖散以達到分解細胞的效果。之後加入 1 ml Protein Precipitation Solution，高速震盪 20 秒；

13,000 x g 離心 10 分鐘。取上清液加入 100% 異丙醇使 DNA 沉澱；以 70% 酒精洗過後，加入 50  $\mu$ 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 ml 的 Tissue and Cell Lysis Solution 的 2 ml screw cap tube 後放入 Mini- Beadbeater 以 4,200 rpm 轉速，振動 5 分鐘破壞細胞，然後將細胞懸浮液取至 1.5 ml centrifuge tube 以 MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, Wisconsin)。萃取 DNA。以分光光度計測 DNA 的質量，後保存 -80°C。

### (三)、流式微珠陣列檢測：

#### 1. 引子及探針之設計及合成：

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

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

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

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

#### 2. 真菌 ITS3&ITS4 之聚合酶鏈反應(PCR)

以 ITS3 (5' GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC 3') 和 ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') 引子對增幅 ITS 2 (internal transcribed spacer) 區域，PCR 反應，總容積為 50  $\mu$ l，內含 10 ng 待測 DNA, 25  $\mu$ 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°C 5 分鐘溫度，35 次循環的變性反應 95°C 30 秒 → 黏和 58°C 30 秒 → 72°C 1 分鐘聚合延長反應，最後為 72°C 10 分鐘聚合延長反應。PCR 機器使用 PTC-200(MJ research)。

#### 3. 細菌 ITS 之聚合酶鏈反應(PCR)：

將標準菌株及待測臨床菌株進行 PCR 反應。反應總容積為 50  $\mu$ l，內含 1  $\mu$ l 的細菌 chromosome DNA (concentration < 10<sup>2</sup>  $\mu$ g/ml), forward primer 1  $\mu$ l, reverse primer 1  $\mu$ l (10  $\mu$ M), 22  $\mu$ l 純水, 25  $\mu$ l 之兩倍 master mix(Fermentas)。反應初始以 94°C 10 分鐘溫度，34 次循環的變性反應 94°C 30 秒 → 黏和 55°C 20 秒 → 72°C 1 分鐘聚合延長反應，最後為 72°C 10 分鐘聚合延長反應。PCR 機器使用 PTC-200(MJ research)。

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

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

#### **5. 鍵結固定化探針於微珠上：**

取  $2.5 \times 10^6$  磁珠(Luminex, TX)，加入 50 $\mu$ l 0.1M 2-(N-morpholono) ethanesulfonic acid (MES) buffer pH 4.5 (Sigma)與 1 mM 探針 oligonucleotide。序列的設計為在 5' amino 端加上 12-carbon linker。加入 3  $\mu$ l 現配製 1-ethyl-3-3 (3-3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) solution (10 mg/ml) (Pierce Biotechnology)，可將探針與磁珠結合，置於室溫反應 30 分鐘。之後再加入 3  $\mu$ l 現配製的 EDC 反應 30 分鐘。EDC 反應後，加入 0.5 ml 0.02% Tween 20，混合均勻，8000 rpm 離心 2 分鐘，去除上清液，加入 0.5 ml of 0.1% SDS 清洗後，再以 8000 rpm 離心 2 分鐘，去除上清液。最後磁珠以 50  $\mu$ l Tris-EDTA 回溶，置於 4°C 暗房保存。

#### **6. 增幅產物與探針專一性雜交：**

磁珠以 1.5X tetramethylammonium chloride (TMAC) solution (Sigma, St. Louis, MO) 稀釋。TMAC solution 包含 4.5 M TMAC、0.15% Sarkosyl、75 mM Tris-HCl pH 8.0 與 6 mM EDTA (pH 8.0)。取 33  $\mu$ l 1.5X TMAC 包含 5,000 顆磁珠與 17  $\mu$ l 增幅產物混合均勻，置於暗室於 95°C 反應 10 分鐘，接著於 45°C 反應 30 分鐘。以 6000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 75  $\mu$ l 1X TMAC solution 包含 10 ng/ $\mu$ l streptavidin-R-phycoerythrin (Molecular Probes, Eugene, OR)，置於暗房 40 °C 10 分鐘。最後將樣本分別加至 96 孔 ELISA 盤，以 Bio-Plex 200 Suspension Array System (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) 檢測。螢光強度中位數值(Median fluorescent intensity, MFI) 為測量 100 個訊號數值之中位數，再由 Bio-Plex Manager 4.1.1 軟體分析結果。

#### **7. 流式微珠陣列檢測之靈敏度測試：**

抽取標準菌株 DNA 以十倍序列稀釋，濃度由 10  $\mu$ g/ml 至 10pg/ml，由其中取 1  $\mu$ l 做為 template DNA 進行流式微珠陣列檢測，實驗流程如(圖十二)。

#### **8. 微珠陣列反應成本估算**

一個編號的 bead 共有  $1.25 \times 10^6$  的 7 次方個 beads 價錢是 12000 元，一次反應 5000 顆，所以共可做 2500 次反應，單組微珠一次反應便是 4.8 元，因此微珠成本即為 4.8 乘以 beads 組數，PE 呈色劑成本則為每次反應 3 元。所以一次反應的價錢 =  $4.8 \times (\text{beads 組數}) + 3$  元

### **(四)、抗生素感受性試驗**

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

#### (五)、奴卡菌脈衝式電泳分析(PFGE)：

*Nocardia* PFGE plug 製作操作流程首先將新鮮的 colony 接種於 10ml BHI broth(劇烈振盪 3days)，待沉澱後取菌液置於 BHI broth(含 15% sucrose and 2% glycine) subculture 4hrs，使其對 lysozyme 敏感。用 5ml TEN(0.1M Tris-HCl, 0.1M EDTA, 0.15M NaCl) wash 兩次。再將菌液溶於 EC buffer(6mM Tris-HCl, 0.1M EDTA, 1M NaCl, 1% sarcosine, 0.2% sodium-deoxycholate)調菌液濃度至 2x10<sup>8</sup> cells/ml。與 1% agarose 等比例混合。Plug 置於 1ml EC buffer(含 20mg/ml lysozyme)於 37oC 反應 overnight。換掉 EC buffer 後加入 1ml ESP buffer(0.5M EDTA, 1% sarcosine, 1 mg/ml proteinase K)於 50oC 反應 24 hrs。換掉舊的 ESP buffer 後加入 1ml 新的 ESP 於 50oC 反應 24 hrs。

限制酶選擇(從不同的 species 篩選)：從 *In silico* 網站篩選出 *HpaI*, *SpeI*, *SspI*, *XbaI* (*N. farcinica*) 等四種限制酶，另外比較 *AseI* (*N. farcinica*) , *Xba I* and *Ase I* (*N. Seriolae*) 等限制酶。經 *XbaI* 與 *SpeI* 所得的 band 大約 35-40 左右，均適合作為比較的條件，將來視陸續增加的菌株數再比較其優劣。

#### (六)、真菌脈衝式電泳(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<sup>84</sup>。以 IS-1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Calif.) 之照相系統照相並存取圖形。利用 Bionumerics 5.1(Applied Maths, Kortrijk, Belgium) 分析軟體擷取影像檔，並且以樹狀圖比較各菌株間之類緣關係。位置差異範圍在 1% 可忍受，而最佳化是設在 3%。使用擲骰子係數(Dice Coefficient)去分析片段相似度( $S_{AB}$ )，樹狀圖分析採用 UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic average) 的方式。當分離株片段相似度小於 95% 時，被認為是不同的 PFGE genotypes。

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

##### 1. 病原酵母菌及持家基因

*Candida albicans* 選出七個 AAT1a、ACC1、VPS13、MPIb、ADP1、ZWF1b 及 SYA1。*Candida glabrata* 選擇六個 housekeeping loci (housekeeping gene loci) 分別為 FKS、LEU2、NMT1、TRP1、UGP1 及 URA3。*Candida tropicalis* 選擇六個 loci 分別為 ICL1、MDR1、SAPT2、SAPT4、XYR1 及 ZWF1a。*Candida krusei* 選擇六個 loci 分別為 ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、NMT1 及 TRP1。

##### 2. PCR反應

以 PTC-200 96-well thermal cycler (MJ Research) 進行 PCR 反應。*Candida albicans* 反應試劑包含 2 μl DNA(10ng/μl), 4 μl primer(5 μM), 10 μl distilled water, 及 TEMPY PCR kit (LTK BioLaboratories)。

反應條件為 94°C, 2 min denature, 接著進行 25 cycle 94°C, 1 min→52°C , 1 min→72°C, 1 min 的反應，最後為 72°C, 10 min。*Candida glabrata* PCR 反應容積為 20 μl, 內含有 10ng DNA、每種 primer 50pmol、1.25U Taq DNA polymerase、5 μl 的 10X buffer 及 200 μM deoxynucleoside triphosphate。PCR 反應條件為 95°C, 5min denature，接著進行 30 cycle 93°C, 30S→依據增幅基因片段的不同，黏合溫度範圍從 50-57°C 不等, 1min→72°C, 1min 的反應，最後為 72°C, 4min 的反應。反應試劑包含 6 μl DNA(10ng/μl), 2 μl primer(5 μM), 5 μl distilled water, 及 TEMPLY PCR kit (LTK BioLaboratories)。反應條件為 94°C, 7 min denature, 接著進行 30 cycle 94°C, 1 min→52°C , 1 min→74°C, 1 min 5 seconds 的反應，最後為 74°C, 10 min。定序反應使用的引子與 PCR 反應相同，並定序正反二股，反應之分析使用 ABI 3100 avant (PE Applied Biosystems)。

#### (八)、新型隱球菌IGS及M13 PCR Fingerprinting

IGS 係針 *Cryptococcus gattii* VGII 的分型方法所使用的 primer 為 IGSF (5-CCGAGGCAGGACACACATAC-3)IGSR (5-GGCAGAATACAAATACTTACCT-3) , PCR 反應之條件為 94°C, 1 min denature, 接著進行 35 cycle 94°C, 1 min→1 min, 20 s→72°C, 56°C 的反應，最後為 72°C, 6 min<sup>87</sup>。M13 屬於 minisatellite 分型方式，所使用的 primer 為 M13 (5-GAGGGTGGCGGTCT-3) , PCR 反應之條件為 94°C, 1 min denature, 接著進行 35 cycle 94°C, 1 min→1 min, 20 s→72°C, 50°C 的反應，最後為 72°C, 6 min。電泳條件為電壓 120V，緩衝液為 0.5X TBE，電泳時間為 30 min。比較電泳膠的 band type，比較類緣關係是屬於新型隱球菌 VGI~IV 或是 VNI~IV。

#### (九)、核酸序列比對分析、運算及資料庫建立

將定序後的圖形檔轉入 Bionumerics 5.1 分析軟體，在軟體上比對每個 locus 的序列後，上網 (<http://www.mlst.net>) 比對各 locus 的基因型。並且將所有菌株所有 loci 的型別組合為個別的 sequence types(STs)，建立台灣念珠菌菌株之資料庫。台灣不同區域所分離之菌株與國際菌株比對。各菌株間類緣關係是以 UPGMA 的方式比對基因的序列。以 Minimum Spanning Tree (MST) 運算建立本土菌株及國外菌株間之類緣關係。

#### (十)基因體定序與定序後 DNA 片段之組合

本研究中的鮑氏不動桿菌基因體係委託陽明大學定序中心以 Illumina Genome Analyzer II 平台完成定序。產生的大量讀取片段(reads)則以 CLC bio 軟體套組組合成 contigs，最後得到長度≥ 1 Kb 的 contigs 合計 114 個。這些 contigs 正進入知識分析過程、並搭配先前已取得的 optical mapping 結果進行組合中。

### 三、結果：

#### (一) 血液腫瘤病人深入性真菌症檢測

我們分析了 60 個病人及 484 個檢體，其中 ITS3-4 pan-fungal positive 的有 171 (35.3%)，negative 的有 313 (64.7%)，進一步將 ITS3-4 pan-fungal positive 的檢體以 pan-Candida 分析了 86 個 sample 其結果 positive 有 37 (43%) negative 有 49 (57%)；以 pan-Aspergillus 分析 152 個 sample 其結果 positive 僅有 4 (2.6%) negative 有 152 (97.4%)。(

圖六) 就以上的結果來看，檢體檢驗為 pan-fungal 中 Candida species 的比例高達 43%，Aspergillus species 的比例僅佔 2.6%。

就檢體來源區分在 ITS3-4 pan-fungal positive 171 中個別檢體來源檢測為 positive 與該檢體的數目相較，blood 有 11(5%)、gargling 有 123(63.4%)、sputum 有 37(52.9%)；ITS3-4 pan-fungal negative 313 中 blood 有 208(66.5%)、gargling 有 72(23%)、sputum 有 133(10.5%)。Pan-Candida positive 37 中 gargling 有 27(44.3%)、sputum 有 10(71.4%)。Pan-Aspergillus positive 4 個中 blood 有 1(9%)、gargling 有 2(1.9%)、sputum 有 1(2.7%)。在 ITS pan-fungl 檢測為 positive 的檢體中 gargling 及 sputum 佔的比例較高(63.4 及 52.9%)，而 blood 所佔的比例最低(5%)。Pan-Candida 檢測為 positive 同樣地 gargling 及 sputum 佔的比例較高(44.3 及 71.4%)，Pan-Aspergillus positive 因為 positive 的數目太少，比較檢體所佔之比例較不具意義。

Tm 值的分析，選定 5 個重要的 Candida species(C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. parasilosis 及 C. krusei) 及 Aspergillus species(A. fumigates, A. flavus, A. niger, A. nidulans 及 A. terreus)，我們分別列出其 Tm 值範圍，Pan-fungal 的結果從低至高 Candida species

依序為 *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. albicans* 及 *C.krusei*，溫度範圍是 84.18~84.27 °C 至 90.69~90.78 °C，高與低間差異為 6.5°C，*Aspergillus species* 依序為 *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* 及 *A. nidulans*，溫度範圍是 92.44~92.5 °C 至 93.6~93.67 °C，高低間僅差異 1.2 °C，另外 *A. terreus* 並未有明顯的 Tm 值。Pan-Candida 的結果從低至高 *Candida species* Tm 的趨勢同 Pan-fungal，溫度範圍是 81.45~81.5 °C 至 89.81~89.9 °C，高與低間差異接近 8.5°C。Pan-Aspergillus 的結果從低至高 *Aspergillus species* Tm 的趨勢同 Pan-fungal，溫度範圍是 91.72~91.96 °C 至 93.9 °C，高低間僅差異 2 °C，其結果如表四。由以上的結果得知，比較 Tm 值的高低或許可以推測出檢體中是否有何種的 species。我們進一步比較 Real time PCR pan-fungal, Pan-Candida 及 Pan-Aspergillus 不同對 primer 的 Tm 值與 MSA 的結果選定了 13 個病人及 20 個檢體，依據表四的趨勢加以比較以紅色字表示 Tm 值的範圍與 MSA 的結果相吻合，從結果相較來看 Real time PCR 的結果與 MSA *Candida species* 中的 *C. albicans*, *C. glabrata* 及 *C. tropicalis* 與 *Aspergillus species* 中的 *A. flavus*，結果詳見表五。綜上所述，Real time PCR 的 Tm 值範圍可推估檢體中是否含有特定的 *Candida* 或 *Aspergillus* 的 species，若是檢體中混合多種的 *Candida* 或 *Aspergillus* 不同的 species，可能會遺漏某些的 species 的結果。針對這個問題，爾後開發針對特定的 *Candida species* 與 *Aspergillus species* 可補助目前檢測方法上之限制。

## (二)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的陽性反應如圖七 (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，從圖七 (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。在分子檢測中使用M antigen gene，從結果可知若為positive則在270bp有位置有訊號出現，如圖八所示。

### (三)微珠陣列測試鑑定絲狀真菌

#### 1. 探針專一性

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

#### 2. 敏感性與再現性分析

為試驗微珠陣列系統在鑑定檢測絲狀真菌的敏感性，將麴菌、鏹孢菌、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 marneffei*) (表二)。

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

#### 3. 多重菌種混合偵測

欲評估微珠陣列偵測多重菌種之可行性，設定不同的 *Aspergillus*

*flavus* 染色體濃度 (1 ng、100 pg、10 pg、1 pg) 與 *Aspergillus fumigatus* (1 ng) 和 *Rhizopus oryzae* (1 ng) 混合進行分析。結果顯示當 *A. fumigatus*、*R. oryzae* 染色體濃度為 *A. flavus* 的 100 倍時，利用流式微珠陣列仍可偵測出 *A. fumigatus* 訊號，表示微珠陣列可有效的區分出多重菌種（圖二）。

#### 4. 微珠陣列系統運用於臨床檢體之可行性

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

#### (四)微珠陣列測試鑑定常見院內感染菌

##### 1. 探針設計與專一性測試

(表三)為本實驗中所使用的臨床菌株數目以及相對應的標準菌株。(表六)則為所使用的兩對引子，分別針對真菌病原菌以及細菌病原菌，同時使用於單管聚合酶反應中。(圖五)為multiplex pcr的電泳膠圖，分別針對單一的病原菌以及兩種病原菌混合的反應，電泳膠圖中 lane 2 為單一 *C. albican*, lane 3 為 *A. baumannii*, lane 4 為 *P. aeruginosa*, lane 5 為 *S. aureus*, lane 6 則是 *C. albican* 加上 *A. baumannii*, lane 7 為 *C. albican* 加上 *P. aeruginosa*, lane 8 為 *C. albican* 加上 *S. aureus*, lane 9 為 *A. baumannii* 加上 *P. aeruginosa*, lane 10 為 *P. aeruginosa* 加上 *S. aureus*, lane 11 為 *A. baumannii* 加上 *S. aureus*。由圖中可清楚看見相對應的基因片段皆有正確的被放大出來，經過純化的步驟後再進行微珠陣列測試。

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

## (五)利用 MLST 或 PFGE 分型探討國內及國際念珠菌、隱球菌及奴卡菌之分子流行病學

### 1. *C. tropicalis*

以MLST分析台大醫院14位ICU病人之多重分離菌株共50株*C. tropicalis*，共有21種diploid sequence types (DSTs) 產生。以UPGMA樹狀圖分析，使序列相似度大於74%，所有菌株可分為三個clonal groups，clonal group I (13株) 及II (26株) 各有8種DST，而clonal group III (11株) 則包含5種DST。PFGE-NaeI區分為六個clusters(cluster A至F)及三個minor groups(minor group I至III)。MLST與PFGE-NaeI高度相關性( $p<0.05$ )。

與 Jacobsen 等人以 eBUST 分析其所收集 242 株其他各國 *C. tropicalis* 菌株<sup>88</sup>相比，台灣目前所收集的菌株共分屬於 7 個 eBURST clusters，而本研究的菌株則主要分布於 3 個 clusters 中，其中包括 clonal group III (包含 DST 134、175 與 178) 屬於主要來自英國及美洲菌株的 eBURST clusters 1，clonal group I 的菌株 (包含 DST 98 及 140) 分屬於

大多來自台灣菌株（少數來自英國及哥倫比亞）的eBURST clusters 4，而 clonal group II 中包括 DST 169、174 及 177 菌株則囊括於全部為台灣菌株之 eBURST clusters 7。

由於 *C. tropicalis* 為雙倍體 (diploid) 酵母菌，其不同對偶基因 (alleles) 上 SNP (single nucleotide polymorphism) 位點變化可產生不同 heterozygosity / homozygosity (heterozygous / homozygous SNPs)。本研究中，由單一病人所分離出之多重菌株可藉由 MLST 序列上 SNP 變化之特點，進一步追蹤這些菌株在病人個體上進行置換 (replacement)、微演化 (microevolution) 或維持不變 (maintenance) 等情形。分離自 P2 病人的 3 株菌株中，DOH86g018 與 DOH86g082 具有相同的 DST165，其包含了 16 個 heterozygosity，而 DOH86g099 為 DST173 則有 7 個 heterozygosity。此兩種 DST 的 *C. tropicalis* 菌株，在 *MDR1* 基因上具有 9 個 heterozygosity 的差異。來自 P6 的菌株，DOH86g070 (屬於 DST169) 與 DOH86g076 (DST170) 各具有 7 及 8 個 heterozygosity，只在 *ZWF1a* 基因上具有 1 個 heterozygosity 的差異。同樣的，DOH86g095 (屬於 DST134) and DOH86g031 (屬於 DST TW1) 分離自 P13 也在 *SAPT2* 基因上具有 1 個 heterozygosity 的差異。另外，由多株來自 P10 與 P11 的菌株中，菌株間於單一基因上其 heterozygosity 的變化也呈現多樣性。以上結果可提供我們了解關於 *C. tropicalis* 在病人身上產生微演化的現象。這種在單一基因上產生 heterozygous SNP 的現象於本研究中只見於 clonal group II 及 III。來自病人 P4、P5、P7、P8、P9、P10、P11 與 P12 的各同一病人之分離株則在多個基因上產生不同的 heterozygosity 變異，此情形也發現於 *C. albicans*<sup>89</sup> 及 *C. glabrata*<sup>90</sup>。而來自 P1、P3 與 P14 的多重菌株則都維持一相同 DST 於同

一病人身上。

菌株抗藥性分析方面，其MICs結果如表十所示。在50株*C. tropicalis*菌株中，只有一株對voriconazole具抗性，其他菌株對於azole類藥物包括voriconazole及fluconazole皆為敏感性；在amphotericin B的測試中，也只有一菌株具抗藥性。然而，於flucytosine的藥敏試驗中，發現有2株MIC值為32 μg/ml為抗藥菌株分離自P1，以及11株中間抗藥性 (intermediately resistant; MIC=8-16 μg/ml) 菌株分別來自於病人P1 (7株)、P7 (1株)、P10 (2株) 與P14 (1株)。這些對於flucytosine具抗性的菌株中，有92.3% (12/13) 皆屬於DST164。

利用e-Burst方法將MLST結果分成3型。而與Tavanti等人所發表文獻<sup>91</sup>中菌株比較，發現我們的第一群與其來自美國與英國的第二群相近，而我們的第二群有20株，其中有14株對fluconazole有抗藥性，佔了70%。在第二群中的20株只分出了四個DST型，其中DST98有兩株、DST137有一株、DST140有15株及DST144有2株，特別值得注意的是，第二群中抗藥性菌株一共有14株，而在DST140中就佔了11株，以及在DST140中來自同一家醫院 (N2) 的有六株，包含了1株沒有抗藥性跟5株有抗藥性，且六株來源來自尿液的分離就佔了5株 (83.3%) (圖十六)。

DST 140是TSARY1999 最主要的 Fluconazole resistant clone，為了了解DST 140是否持續存在台灣。本篇研究我們使用了MLST的方法分析了TSARY2006年分離的50株熱帶念珠菌。其中31株是Resistant(MIC>64)，19株是Susceptible(MIC<16)，這些2006年菌株選擇的原則是與1999年是使用來自相同醫院的分離株。31株的Resistant中DST 140及98佔了11株(比例35.5%)，19株的Susceptible不包含DST

140及98。再者1999與2006分離的53株Fluconazole Resistant中DST140及98佔了24株(比例45.3%)。Fluconazole抗藥性與MLST allele的關係，Fluconazole resistant 當中MDR1(allele=3)比例92.1%，SAPT4(allele=17)比例92.1%，XYR1(allele=54)比例88.6%，是否這些allele與Fluconazole的抗藥性敏感性有關聯，，需要更進一步的研究。

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

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

## 2. *C. albicans*

就Clade的分佈而言，台灣201分離株區大致分為14個Clade(圖十七)，Clade 1 (37 isolates), Clade 4 (35), Clade 16 (26), Clade 3 ( 15), Clade17 (14), Clade 9 (11), Clade10 (10), Clade 8 and Clade 11 (7)及其他較為次要的Clade。(表九)比較各clade中ABC type的比例，A type所佔比例較高者如Clade 1(25/37), Clade 7(3/3), Clade 8(6/7)； B type所佔比例較高者如Clade 3(16/16), Clade 4(30/36), Clade 10(10/10), Clade 12(8/9), Clade 16(24/26), Clade 17(13/14)。另外C type所佔比例較高者如Clade 11(4/8) , A type與C type比例相等的Clade 9(5/11)。Mating type中Homozygosity(不管是a type或是 $\alpha$  type)所佔比例相當低只有約(7/201)。Homozygosity分布於Clade 1、 11、 16及17。愛滋病人比例高的Clade有

Clade 7(5/7)及Clade 11(5/8)。Fluconazole的MIC大多為susceptible，值得注意的是Clade 10有50%的高比例為resistant。地理區的分布，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(表十)azole類(fluconazole, voriconazole及itraconazole)的抗藥性resistant的比例高於5%，其他種類的藥amphotericin B及Flucytosine比例不高於1%。

利用 Minimum spanning tree 比較 201 株菌株的 7 個 alleles，所得到的關係圖如(圖十七)顯示，大致區分為 19 個 Clonal cluster。進一步說明個別 Clonal cluster 中 DST 的關聯性。從抗真菌的抗藥性結果分析，Clonal cluster 1 的 predicted founding ST 為 DST 1698，經由三個演化路徑變成 1759、1739 與 1702。Clonal cluster 2 的 predicted founding ST 為 DST 1753，演化變成 DST 1721。Clonal cluster 3 的 predicted founding ST 為 DST 1608，其中有一條演化變成 DST 1712。Clonal cluster 4 的 predicted founding ST 為 DST 601，經由兩個演化路徑變成 DST 671 與 1332。Clonal cluster 8 的 predicted founding ST 為 DST 1724，經由演化變成 DST 1743。

### 3. 新型隱球菌 *Cryptococcus neoformans*

我們比較用 LAC1 及 CAP64 的基因比較了四個不同的血清型(圖九)，另外收集了 18 株台灣臨床菌株分離年代分別為 1998, 1999 年及 2001 年，另有 18 株已知型別的菌株比較，從 IGS typing(圖九) 及 M13 fingerprinting 的結果(圖十)得知台灣主要的型別為 *Cryptococcus grubii* VNI (16 株) 及 *Cryptococcus gattii* VGII (2 株)。在北美流行的高致病性的型 VGII 別曾在台灣出現，且其 Fluconazole(MIC=64) 與 Amphotericin B(MIC=8) 皆為 resistant。遠高於 VNI 的 Fluconazole(MIC ≤2) 與 Amphotericin B(MIC≤0.25) 抗藥性。

#### 4. 奴卡菌 *Nocardia brasiliensis*

*Nocardia* 之流行趨勢台灣最主要的奴卡菌是 *N. brasiliensis*(佔 48%)，在美國從 1990-2000 十年間 *N. brasiliensis* 的比例增加了 35%。我們收集了十一株台灣臨床菌株分離年代為 2002 年及 2010 年(表十一)，主要來自皮膚科門診病患，年齡分布 10-80 歲，男女皆有，且分離自膿疱。圖二十五所示以 *N. brasiliensis*-3 為例(a)右臂膿皮症及(b)~(d)在染色及 OL:1000X 的條件下可觀察到放線狀。另外我們使用了 16S rRNA 的比較方法(圖十九)可將菌株分為兩群，其中機制與細胞壁合成有關的 Imipenem (Group1:MIC:0.25-0.75, Group2:4-32)。PFGE-XbaI(圖二十) 可將菌株分為四群，分群與抗藥性較無關係。最近有利用結合 gyrase B, 16SrRNA, SecA1, hsp65, rpoB 等基因的 MLST 的方法區分 *Nocardia*<sup>92</sup>。DNA 分型與 chromosome 分型趨勢明顯不同(DNA 分型方法分群彼此較相似，同樣地不同 PFGE 分型方法分群彼此較相似。) 16S rRNA 與 gyrB gene 分群的相似度極高，gyrB gene 序列的差異程度較 16S rRNA 高。

#### (六)光學圖譜分析鮑氏不動桿菌全基因分析

Optical mapping 分析結果如圖二十一所示，圖 A 為臨床菌株，圖 B 為標準菌株 ACICU，紅色框架標示基因體上的差異部份，由圖中可發現在臨床菌株上多出了數個大片段的插入序列(Insertions)，由左到右大小片段分別為 100Kb, 40kb, 20kb, 35kb, 50kb, 40kb，標準菌株染色體上亦有一個約 100kb 片段的變異區域以及約 50kb 的插入序列，這些大片段基因組中皆包含大量的基因，值得我們進一步研究了解。將這些插入續列與其他鮑氏不動桿菌的菌株圖譜做比對，加上文獻的搜尋，發現有趣的現象，如圖二十二所示，臨床菌株與比對到已知相關的抗藥性基因組 AbaR1(黃色條狀區)與 AbaR2(粉

紅條狀區)，但是與兩者又有不同，比 AbaR1 短，比 AbaR2 長，推論其中定有相關抗藥性基因的變異，我們將定序這段基因作後續的分析研究。

### (七)鮑氏不動桿菌全基因體定序

鮑氏不動桿菌(俗稱 AB 菌)擁有快速接收環境中抗藥性基因而演變成多重抗藥性菌株的特性，在國內是醫院內感染的大宗病源，尤以加護病房病患最為嚴重。AB 菌因其基因快速交換的危險性質，本土菌株極可能有異於國外菌株，而具有自己特殊的性狀-基因型間關係、基因組成、以及分子流病特性。在此前提下，進行本土 AB 菌菌株全基因體定序實有其必要性與迫切性。

去年度計畫中，我們選取 TCDC-AB0715 菌株委託陽明大學定序中心進行全基因體定序，並配合光學圖譜(optical mapping)，建立國內第一株 AB 菌全基因體圖譜。就其表現性狀來說，這一株 AB 菌除了對國內廣泛使用的 carbapenem 類抗生素具抗藥性之外，另外擁有一個特殊的性質：有別於大部分已知的 AB 菌只具有 carbapenem-hydrolyzing Class D  $\beta$ -lactamases (例如 OXA-23, OXA-40, OXA-51 等型別)中的一種，此菌株同時具有 *bla<sub>OXA-23</sub>* (盛行於東南亞、南北美洲、澳洲等地)及 *bla<sub>OXA-66</sub>* 兩種基因，顯示台灣本土可能已演化出自有的特殊菌株。

而在今(2011)年度，此序列已發表在 *Journal of Bacteriology*<sup>86</sup>，並公佈於 GenBank，TCDC-AB0715 包含 4,138,388 bp 之環狀染色體，以及大小不等的兩個質體(8,731 bp 和 70,894 bp)，識別號分別為 CP002522、CP002523 及 CP002524。唯目前全球已全基因體定序的 9 株 AB 菌中具有最大染色體者。經進一步分析後，發現此菌株有三個特殊之處：一、為目前 9 株 AB 菌中開放式讀架(ORF)最多者，達到 3,851 個；二、在長度 50.5 Kb 的 AB 菌抗藥性基因島(AbaR, 圖二十一)區域中，鑲嵌有 2 個 Class I integron，各包含一

個基因卡匣(cassette)(圖二十二)。三、具 1 個 *bla<sub>OXA-23</sub>* 基因、2 個 *bla<sub>OXA-66</sub>* 基因。目前我們正在進行基因功能之深入分析，預期將再發表至少 1 篇討論此本土菌株的 SCI 論文。

#### 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、鏹胞菌、青黴菌、接合菌等絲狀黴菌。於臨床檢體上之應用，在全血等檢體的檢測上靈敏度均約達到約  $10^2$  cells/ ml，檢驗時間也控制在 1 小時之內，如此可望增加檢測效率。顯現本方法確能有助於臨床診斷、投藥之參考。此方法若能與血清、培養、鏡檢等傳統方法做整合，有助於增加檢驗之準確性並使得檢驗實驗室之工作流程更形精簡流暢，更有助於臨床投藥防治之參考。

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

傳統鑑別系統主要依照菌株之表現型作為區分菌種的依據，如市售的 API20 NE<sup>93</sup> 與 Viteck 2<sup>94</sup> 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<sup>95</sup>。

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。相較於核昔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<sup>96</sup>。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、高通量及撙節成本之優勢。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。

除了念珠菌外我們利用分型技術分析了新型隱球菌及奴卡菌，新型隱球菌可知高致病的型別 VGII 曾經在台灣出現，需多加注意。奴卡菌的部分結合 16SrRNA 及 gyraseB 等基因及 PFGE 方法可大致區分 *Nocardia brasiliensis*。由於目前 case 的收集有限，待建立方法及技術更加成熟會加強宣導，並加強與醫院合作，將來收集更多的 case 使研究更具有代表性。

ITS 之聚合酶鏈反應使用的引子，經過三種菌屬(*Staphylococcus*、*Pseudomonas*、*Acinetobacter*)的 16s rRNA 以及 23s rRNA 的比對，設計出 forward primer 為 16s rRNA 的後端部分，reverse primer 則為 23s rRNA 的前端部分，reverse primer 使 用 degenerated primer：5'-(T/G)A(C/G)TGCCAAGGCATCCACC-3。真菌引子則是使用前人文獻中所設計的序列，針對真菌的 ITS 片段。Probes 設計是以標準菌株的序列為基準，經過比對之後選擇出具有特別序列順序的保留性區域做為 probes 的目標，以分類地位來說，不同屬之間的菌種的序列差異較大，對於以 direct hybridization 的方式做流式微珠陣列檢測來說，設計 probe 鑑別菌株較為容易，而同屬不同種之間的序列差異則會變少，程度依據不同菌屬而不同，然而若是分類地位到達 strain 或是 subspecies，則序列相似度會大增，很可能 similarity 可高達 95%以上，如此對於 probe 的設計難度就會提高，通常

可能只有利用 single base mutation 的位置來做區別，如同本實驗中的 *A. baumannii*，目前無法使用單一的 direct hybridization probe 區分出 genomic 3 和 13TU 的菌株。

SA probe 原本設計有兩條探針序列，針對 *S. aureus* 的 ITS 序列結合，經過臨床檢體測試 MSSA (10 isolates) 和 MRSA (66 isolates) 皆無問題可以正確辨認，然而在測試 CNS (10 isolates) 的過程中，發現第一條探針會與 *S. epidermidis* (6 of 10) 發生交叉反應的現象，而第二條則否。其餘三株 *S. capitis* 與一株 *S. haemolyticus* 則都會與此兩條探針有交叉反應的現象。原本 CNS 僅被歸類為單一菌屬，後來因為院內感染的重要性提高，而受到重視，鑑定到 species 則顯得重要，在 CNS 的感染中，以 *S. epidermidis* 為最大宗也最重要，所以在臨床菌株的測試中僅選擇使用第二條探針(如文中序列)做為 probe 以避開 *S. epidermidis* 的交叉反應。剩餘 CNS 約有三十餘種，其中半數與院內感染相關，將這些 CNS 分別鑑定到 species 的階段可以做為此偵測系統未來的努力目標之一。

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

身與 target 結合能力以及結合位置上的差異所造成，也可能因為其他核酸序列存在而影響到結合能力。

本研究發展出能迅速區分常見院內感染病原菌的平台，尤其是臨床上最重要的 *S. aureus*，*P. aeruginosa*，*A. baumannii*。本技術另一潛在優勢，為多重混合感染之鑑別，由於臨床上多重病原混合感染可達 5-22%<sup>97, 98</sup>，如 HIV 感染、性病感染、重病孱弱免疫低下之患者，故單管多重檢測若能應用於實際臨床檢體之檢測，較諸傳統培養及生化鑑定方法或許更能反映臨床感染之現況。面對國際輸入及新興病原之不斷崛起，高效率之快速多重檢測方法已為未來趨勢，未來接續本計畫將此多重檢測平台應用於多種多重抗藥性院內感染病原菌之鑑定上，發表後亦將不吝將實驗流程細節及經驗在國內加以推廣分享。此技術平台具有高靈敏度與專一性，且可在 4 小時內完成。快速多重檢測細菌之抗藥性基因不但可增加正確治療的機率，減少由於錯誤治療所導致的抗藥性基因傳播，對於抗藥性趨勢的監測和公共衛生亦有莫大的助益。未來將與醫院合作，測試直接自臨床檢體偵測病原及抗藥性的可行性。可能的話將招募有意願合作的醫院架構臨床檢體及個案收納網絡，測試自臨床檢體直接偵測致病原及抗藥性對臨床診療的助益。

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/per 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稔，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。

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

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<sup>99, 100</sup>。其它分型方法如 Cp3-13 探針 DNA fingerprinting<sup>101, 102</sup>，微衛星分析<sup>103, 104</sup>，及 PFGE<sup>101, 105, 106</sup> 皆可提供足夠的鑑別力。PFGE 結合核酸內切酶如 SfiI 或 BssHII 已被應用於 *C. parapsilosis* 的分型且其對於其藥敏性、生物膜形成及菌落群聚間的關係具類緣性<sup>107-109</sup>。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。雖然 *C. parapsilosis* 無法利用 MLST 來分析，本研究利用 PFGE 分析其 DNA 圖譜仍可發現其微演化之端倪。曾有韓國研究團隊使用 PFGE 方法證明微演化現象存在於 *C. albicans* 中<sup>110</sup>。目前在 *Candida* spp. 之分型方法中，MLST 具有直接提供標準化及方便的優點，相當受到國際間各實驗室所青睞，本實驗室也成功將 MLST 應用至 *C. albicans*、*C. glabrata*、*C. tropicalis* 及 *C. krusei* 之分型。但已有報告指出，MLST 並不適用於 *C. parapsilosis* 的分型，因為其核苷酸多型性(nucleotide polymorphism)數量太少，以至於無法辨識不同亞種間的型別。

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

## 五、結論與建議

我們的主要進展有十：第一、發展可單管同時偵測麴菌、鏹胞菌、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 marneffei*, *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  $10^2$  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。第三、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。第四、成功開發流式微珠陣列系統，可單管快速正確地鑑定台灣院內感染最重要細菌及真菌(不動桿菌、金黃色葡萄球菌、綠膿桿菌及白色念珠菌)，敏感度可高達1-10 pg DNA。發展院內感染多重抗藥性細菌的快速多重檢測平台。第五、建立高病原性輸入性雙型性真菌之檢驗方法。第六、發展新型隱球菌分子分型技術，密切注意北美新崛起高致病力菌株引入台灣的可能性。第七、發展奴卡菌的分子分型方法探討其分子流行病學。第八、持續應用MLST分析台灣菌株外，並與國際菌株進行類緣性分析，以進一步調查流病關聯性，及地理趨適性的分子機轉。第九、使用全基因體定序技術及光學圖譜(optical mapping)針對本土鮑氏不動桿菌TCDC-AB0715多重抗藥性菌株進行全基因體分析，結果已刊登於*Journal of Bacteriology*，序列公佈在GenBank。第十、將TCDC-AB0715與已知全基因序列的8株標準菌株進行比較基因體分析，觀察基因的重組排列，包含序列片段的插入、遺失、反轉、或倍增等。

情況，藉此探討抗藥性及致病力演化之機轉。

本多年期計畫成果豐碩，本年度著作產出成果共有七篇論文（2篇SCI論文已發表；5篇SCI論文投寄中）。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，**且擴大合作之範圍至其他高危險族群之真菌感染症**，持續分型及統計分群並與臨床及流病資料整合建立資料庫。國際上持續建立合作關係，交換型別資訊或提供訓練。希望藉由持續努力瞭解病原可能傳播流行及特定高抗藥性/高致病性株系崛起之情形。甚且探勘出特異性流病、檢驗及疫苗標誌分子。**未來致力於發展低成本、有量產及商業標準化之技術發展通用的primer及選取最具鑑別力之DNA且發布該技術之SOP**，並提供訓練，達到到標準化及資源共享之目的。

## 六、計畫重要研究成果及具體建議

具體建議有十：

1. 落實建立真菌參考實驗室，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. 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。
4. 擴大應用各種鑑定及分型方法於各種高危險族群，如血液腫瘤、早產兒、皮膚科病患。
5. 應用快速多重流式微珠陣列鑑定方法於其他細菌及真菌病原，院內感染病原菌、抗藥性基因、重病孱弱患者之病理檢體等。與醫院合作轉譯醫學，探討實際臨床應用之可行性。
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. 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. 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。
9. 由疾管局主動提供鑑定及分型服務，教育訓練及技術推廣：本實驗室發展之快速多重流式微珠陣列方法實驗細節已提供多個局內外相關單位參考，協助其建立技術。最適化的PFGE分子分型流程，也有多

名相關研究助理來學習研習，將持續以寬闊的胸襟分享所知，發揮公  
僕服務奉獻之精神，並建立國際聲譽。

10. 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、參考文獻：

### References

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. Anonymous: Coccidioidomycosis among persons attending the world championship of model airplane flying--Kern County, California, October 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001;50:1106-7.
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. Al-Ajam MR, Bizri AR, Mokhbat J, et al: Mucormycosis in the Eastern Mediterranean: a seasonal disease.

- Epidemiol Infect* 2006;134:341-6.
25. Llata E, Blossom DB, Khoury HJ, et al: A cluster of mucormycosis infections in hematology patients: challenges in investigation and control of invasive mold infections in high-risk patient populations. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71:72-80.
  26. Harper JJ, Coulter C, Lye GR, et al: Rhizopus and tongue depressors. *Lancet* 1996;348:1250.
  27. Cheng VC, Chan JF, Ngan AH, et al: Outbreak of intestinal infection due to Rhizopus microsporus. *J Clin Microbiol* 2009;47:2834-43.
  28. Casadevall AP, J. R.: Cryptococcus neoformans. *ASM Press Washington* 1998.
  29. Lamagni TL, Evans BG, Shigematsu M, et al: Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990-9). *Epidemiology and Infection* 2001;126:397-414.
  30. Chen S, Sorrell T, Nimmo G, et al: Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to Cryptococcus neoformans in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin Infect Dis* 2000;31:499-508.
  31. Chakrabarti A, Jatana M, Kumar P, et al: Isolation of Cryptococcus neoformans var. gattii from Eucalyptus camaldulensis in India. *J Clin Microbiol* 1997;35:3340-2.
  32. Makimura K, Karasawa M, Hosoi H, et al: A Queensland koala kept in a Japanese zoological park was carrier of an imported fungal pathogen, Filobasidiella neoformans var. bacillispora (Cryptococcus neoformans var. gattii). *Jpn J Infect Dis* 2002;55:31-2.
  33. Nosanchuk JD, Shoham S, Fries BC, et al: Evidence of zoonotic transmission Cryptococcus neoformans from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. *Ann Intern Med* 2000;132:205-8.
  34. 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.
  35. Denning DW: Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* 2000;355:423-4.
  36. Kobayashi GS: Molecular genetics and the diagnostic mycology laboratory. *Arch Med Res* 1995;26:293-6.
  37. 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.
  38. 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.
  39. 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.
  40. Reiss E, Obayashi T, Orle K, et al: Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Medical Mycology* 2000;38:147-59.
  41. 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.
  42. 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.
  43. 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.
  44. 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. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1333-8.
  45. 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.
  46. Jackson CJ, Barton RCEvans 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.
  47. 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.
  48. 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.
  49. 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.
  50. 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.

51. 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.
52. Rand KH, Houck HWolff M: Detection of candidemia by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1994;8:215-21.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. Diaz MRFell JW: High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus *Trichosporon*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:3696-706.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. Soll DR: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 2000;13:332-+.
74. 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.

75. 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.
76. 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.
77. Robles JC, Koreen L, Park S, et al: Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discrimination among strains of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:2480-8.
78. Bougnoux 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.
- 79.
80. 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.
81. 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.
82. Cai WW, Jing JP, Irvin B, et al: High-resolution restriction maps of bacterial artificial chromosomes constructed by optical mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:3390-5.
83. Latreille P, Norton S, Goldman BS, et al: Optical mapping as a routine tool for bacterial genome sequence finishing. *Bmc Genomics* 2007;8.
84. Chen Q, Savarino SJVenkatesan MM: Subtractive hybridization and optical mapping of the enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407 chromosome: isolation of unique sequences and demonstration of significant similarity to the chromosome of *E. coli* K-12. *Microbiology-Sgm* 2006;152:1041-54.
85. Shukla SK, Kislow J, Briska A, et al: Optical Mapping Reveals a Large Genetic Inversion between Two Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Journal of Bacteriology* 2009;191:5717-23.
86. Chen CC, Lin YC, Sheng WH, et al: Genome sequence of a dominant, multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain, TCDC-AB0715. *J Bacteriol* 2011;193:2361-2.
87. Feng X, Yao Z, Ren D, et al: Rapid differentiation of VGII/AFLP6 genotype within *Cryptococcus gattii* by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:471-3.
88. Jacobsen MD, Davidson AD, Li SY, et al: Molecular phylogenetic analysis of *Candida tropicalis* isolates by multi-locus sequence typing. *Fungal Genetics and Biology* 2008;45:1040-2.
89. Odds FC, Davidson AD, Jacobsen MD, et al: *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:3647-58.
90. Lin CY, Chen YC, Lo HJ, et al: Assessment of *Candida glabrata* strain relatedness by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology* 2007;45:2452-9.
91. Tavanti A, Davidson AD, Johnson EM, et al: Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:5593-600.
92. McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, et al: Phylogeny and Identification of *Nocardia* Species on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 2010;48:4525-33.
93. Towner KJChopade BA: BIOTYPING OF ACINETOBACTER-CALCOACETICUS USING THE API 2ZONE SYSTEM. *Journal of Hospital Infection* 1987;10:145-51.
94. 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.
95. 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.
96. 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.
97. Rello J, Quintana E, Mirelis B, et al: POLYMICROBIAL BACTEREMIA IN CRITICALLY ILL PATIENTS. *Intensive Care Medicine* 1993;19:22-5.
98. Weinstein MP, Reller LB, Murphy JR, et al: THE CLINICAL-SIGNIFICANCE OF POSITIVE BLOOD CULTURES - A COMPREHENSIVE ANALYSIS OF 500 EPISODES OF BACTEREMIA AND FUNGEMIA IN ADULTS .1. LABORATORY AND EPIDEMIOLOGIC OBSERVATIONS. *Reviews of Infectious Diseases* 1983;5:35-53.
99. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, et al: *Candida orthopsisilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:284-92.
100. Fundyga RE, Kuykendall RJ, Lee-Yang W, et al: Evidence for aneuploidy and recombination in the

- human commensal yeast Candida parapsilosis. *InfectGenetEvol* 2004;4:37-43.
101. Reissa E, Lasker BA, Iqbal NJ, et al: Molecular epidemiology of Candida parapsilosis sepsis from outbreak investigations in neonatal intensive care units. *InfectGenetEvol* 2008;8:103-9.
  102. Enger L, Joly S, Pujol C, et al: Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for Candida parapsilosis. *JClinMicrobiol* 2001;39:658-69.
  103. Lasker BA, Butler GLott TJ: Molecular genotyping of Candida parapsilosis group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. *JClinMicrobiol* 2006;44:750-9.
  104. Brillowska-Dabrowska A, Schon T, Pannanusorn S, et al: A nosocomial outbreak of Candida parapsilosis in southern Sweden verified by genotyping. *ScandJInfectDis* 2008;1-7.
  105. Shin JH, Shin DH, Song JW, et al: Electrophoretic karyotype analysis of sequential Candida parapsilosis isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:1258-63.
  106. Garcia San ML, Pla J, Cobo J, et al: Morphotypic and genotypic characterization of sequential Candida parapsilosis isolates from an outbreak in a pediatric intensive care unit. *DiagnMicrobiolInfectDis* 2004;49:189-96.
  107. Pfaller MA, Messer SAHollis RJ: Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of Candida parapsilosis. *DiagnMicrobiolInfectDis* 1995;21:9-14.
  108. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, et al: An outbreak of Candida parapsilosis prosthetic valve endocarditis. *DiagnMicrobiolInfectDis* 1997;29:147-53.
  109. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, et al: Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of Candida parapsilosis. *JClinMicrobiol* 1994;32:452-6.
  110. Shin JH, Park MR, Song JW, et al: Microevolution of Candida albicans strains during catheter-related candidemia. *JClinMicrobiol* 2004;42:4025-31.

## 八、圖與表

表一、試驗菌株

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

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 RS</i>	
<i>Coccidioides posadasii C735</i>	
<i>Absidia coerulea</i>	BCRC 30897
<i>Rhizopus homothallicus</i>	BCRC 31146
<i>Mucor flavus</i>	BCRC 32478
<i>Absidia cuneospora</i>	BCRC 32943
<i>Absidia fusca</i>	BCRC 33045
<i>Exophiala dermatitidis</i>	
<i>Sporothrix schenckii</i>	
<i>Trichosporon asahii</i>	
<i>Trichophyton rubrum</i>	
<i>Microsporum gypseum</i>	
<i>Chrysosporium spp.</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

表二、微珠陣列系統偵測絲狀真菌 DNA 的最低濃度

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

表三、Bacterial and fungal strains used in this study

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

表四 參考菌株的 Reference strain

	Pan-fungal ITS3-4 primers	Pan-Candida primers	Pan-Aspergillus primers
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)	84.18-84.27 °C	81.45-81.5°C	—
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	84.73-84.88 ° C	82.81-82.98°C	—
<i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)	85.05-85.18 ° C	84.78-84.83°C	—
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	86.36-86.46° C	85.08-85.19°C	—
<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)	90.69-90.78° C	89.81-89.9°C	—
<i>Aspergillus fumigatus</i> (ATCC 1022)	92.23-92.3°C	—	92.9-93.04°C
<i>Aspergillus flavus</i> (ATCC 16883)	92.69-92.74°C	—	92.45-92.6°C
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	92.44-92.5°C	—	91.72-91.96°C
<i>Aspergillus nidulans</i> (ATCC 10074)	93.6-93.67°C	—	93.3-93.48°C
<i>Aspergillus terreus</i> (BCRC 30125)		—	93.9°C

表五 比較 Real time PCR 與 MSA 的結果

病歷號碼	檢體編號	檢體種類	CDC			
			Real-Time PCR (Candida spp.)	Real-Time PCR (Aspergillus spp.)	Real-Time PCR (pan-fungus ITS3&4)	MSA
3118431	ND-579	sputum	+ (84.71)	—	+ (86.26)	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida tropicalis</i>
5230726	ND-431(1~4)	gargling	+ (81.57)	—	+ (82.75)	<i>Candida albicans</i>
	ND-434(1~4)	gargling	+ (84.97)	—	+ (82.61, 88.81)	—
5516157	ND-446	sputum	+ (81.45)		+ (89.01)	—
5669649	ND-531(1~4)	gargling	+ (87.26)		+ (92.17)	—
	ND-533(1~4)	gargling	+ (81.81)		+ (89.18)	<i>Candida tropicalis</i>
5230726	ND-622	sputum	+ (84.57)	—	+ (90.69)	<i>Candida glabrata</i>
	ND-635	gargling	+ (85)	—	+ (85.15)	—
	ND-644	sputum	+ (84.93)	—	+ (85.1)	<i>Candida glabrata</i>
5688404	ND-698	gargling	+ (85.64)	—	+ (86.8)	<i>Candida albicans</i>
06061334	ND-692高醫	gargling	+ (85.49)	+ (92.62)	+ (93.28)	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Candida albicans</i>
	ND-695高醫	sputum	+ (85.49)	+ (92.96)	+ (93.14)	<i>Candida albicans</i>
5695653	ND-700	gargling	+ (85.49)	—	+ (86.5)	<i>Candida albicans</i>
5688404	ND-727	gargling	+ (85.49)	—	+ (86.75)	<i>Candida albicans</i>
5672070	ND-731	gargling	+ (85.55)	—	+ (86.55)	<i>Candida albicans</i>
5636785	ND-759	gargling	+ (85.13)	—	+ (86.01)	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i>
	ND-760	gargling	+ (85.31)	—	+ (82.68)	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i>
	ND-773	gargling	+ (85.19)	—	+ (85.99)	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i>
5055928	ND-771	sputum	+ (81.45)	—	+ (82.85)	<i>Candida tropicalis</i>
5569930	ND-578	blood	—	+ (92.35)	+ (83, 92.61)	<i>Aspergillus flavus</i>

表六、廣效性的簡併性引子(degenerate primers)序列

Degenerate primers of bacteria

Forward: 5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3'

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

Degenerate primers of fungus

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

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

表七、用來鑑定四種常見院內感染病原菌的探針序列

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

<sup>a</sup>The minimum ratio is the lowest recorded positive value divided by the highest recorded negative value. A minimum ratio of  $\geq 2$  is used as the threshold for defining positive events.

<sup>b</sup>The CA probe is followed as described previously with slight modification.

表八、相同比例多重病原偵測結果

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

<sup>a</sup> The MFI of respective probes are the average value from the 3 independent experiments.

表九、201 株 *Candida albicans* Clade 與不同 phenotype 之關係.

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

表十、*C. albicans* 臨床菌株對 5 種抗真菌藥物之抗藥性.

	MIC50	MIC90	range	S	I	R
Fluconazole	0.5	2	0.125-64	93%	1%	6%
Itraconazole	0.03	0.125	0.015-8	90.4%	1.9%	7.5%
Voriconazole	0.0325	0.25	0.015-8	94.6%	0%	5.4%
Amphotericin B	0.5	1	0.0625-2	99.5%		0.5%
5-FC	0.125	0.25	0.125-64	98%	1%	1%

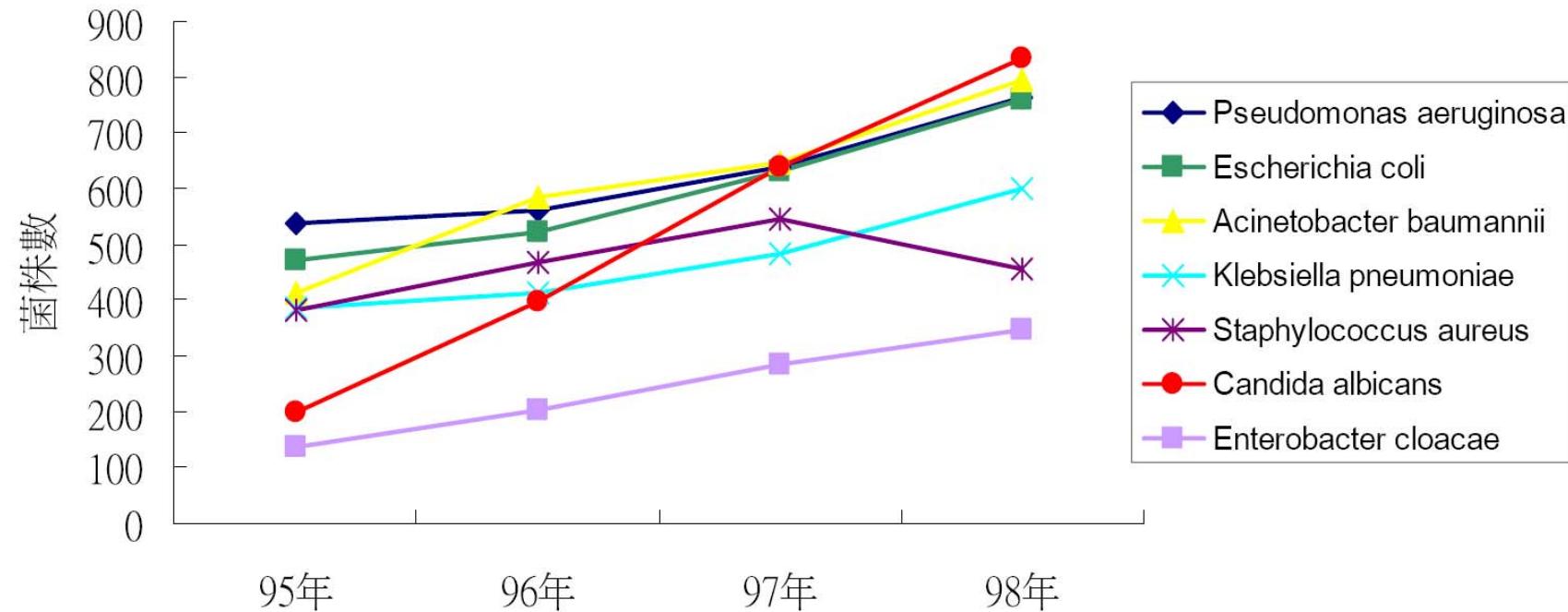
表十一、*Nocardia brasiliensis*菌株基本資料

Isolate No.	Age	Sex	Exposure history	Underlying condition	Clinical manifestation	Location	Lymphadenitis	Systemic symptom/sign
N. brasiliensis-1	39	F	nil.	nil.	nodulo-pustular pyoderma & cellulitis	left knee & thigh	nil.	nil.
N. brasiliensis-2	53	M	nil.	nil.	nodulo-pustular pyoderma	left thigh	nil.	nil.
N. brasiliensis-3	10	M	nil.	nil.	nodulo-pustular pyoderma	right knee	right inguinal lymphadenitis	fever& chillness
N. brasiliensis-4	31	M	nil.	nil.	nodulo-pustular pyoderma	right forearm	nil.	oral ulcer & sorethroat
N. brasiliensis-5	26	F	nil.	nil.	abscess	left sole	nil.	nil.
N. brasiliensis-6	80	M	nil.	CVA,HTD,depression	nodulo-pustular pyoderma	right forearm	nil.	nil.
N. brasiliensis-7	10	F	nil.	nil.	2 pustules	right forearm & left palm	nil.	nil.
N. brasiliensis-8	38	F	house dust	nil.	nodulo-pustular pyoderma	right cheek	right cervical lymphadenitis	nil.
N. brasiliensis-9	62	M	hot spring	myasthenia gravis	nodulo-pustular pyoderma	left post-auricular area	left cervical lymphadenitis	nil.
N. brasiliensis-10	24	M	nil.	nil.	1 pustule	right dorsal hand	right cervical lymphadenitis	nil.
N. brasiliensis-11	45	M	garden	nil.	nodulo-pustular pyoderma	left arm	lymphadenitis above the left elbow joint	nil.

表十二 國際已公開之九株鮑氏不動桿菌基因內容(gene content)之比較，數字為兩兩菌株之間的重複基因數量

	<b>TCDC-AB0715</b>	<b>ACICU</b>	<b>AYE</b>	<b>1656-2</b>	<b>AB0057</b>	<b>ATCC 17978</b>	<b>MDR-ZJ06</b>	<b>AB307-0294</b>	<b>SDF</b>
<b>TCDC-AB0715</b>	3851	3270	3006	3255	3080	2775	3320	2946	2175
<b>ACICU</b>		3667	2985	3166	3025	2752	3274	2927	2160
<b>AYE</b>			3607	2974	3176	2740	3000	3089	2170
<b>1656-2</b>				3715	2974	2751	3254	2951	2141
<b>AB0057</b>					3790	2727	3022	3098	2122
<b>ATCC 17978</b>						3787	2741	2700	2020
<b>MDR-ZJ06</b>							3863	2928	2204
<b>AB307-0294</b>								3458	2097
<b>SDF</b>									2913

圖一、醫學中心加護病房的院感菌逐年趨勢

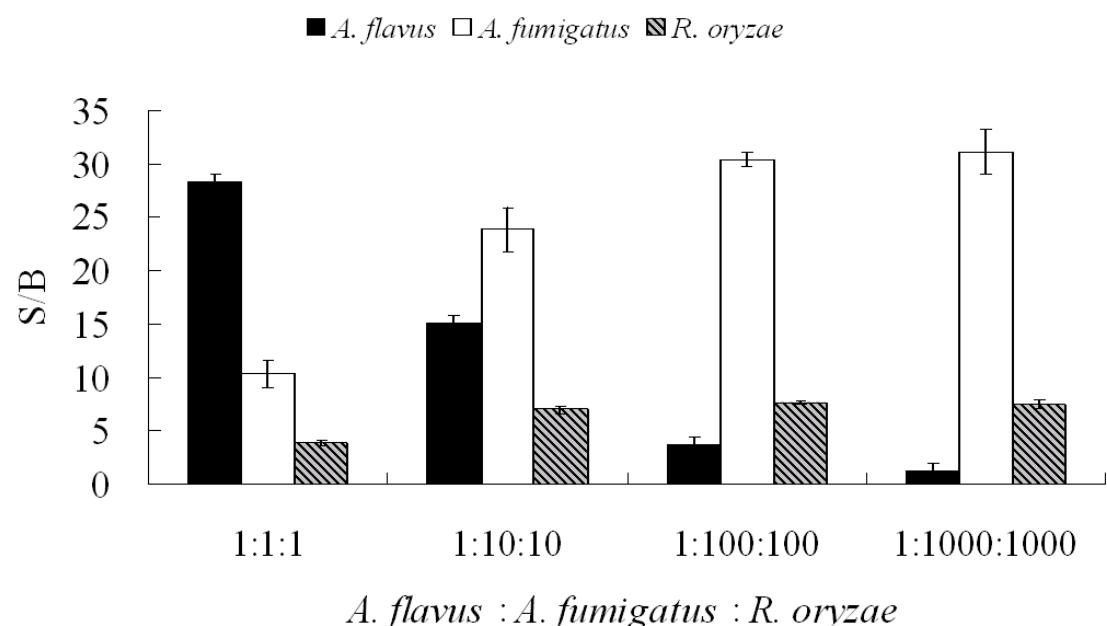


圖二、利用微珠陣列系統測試鑑定絲狀真菌菌株

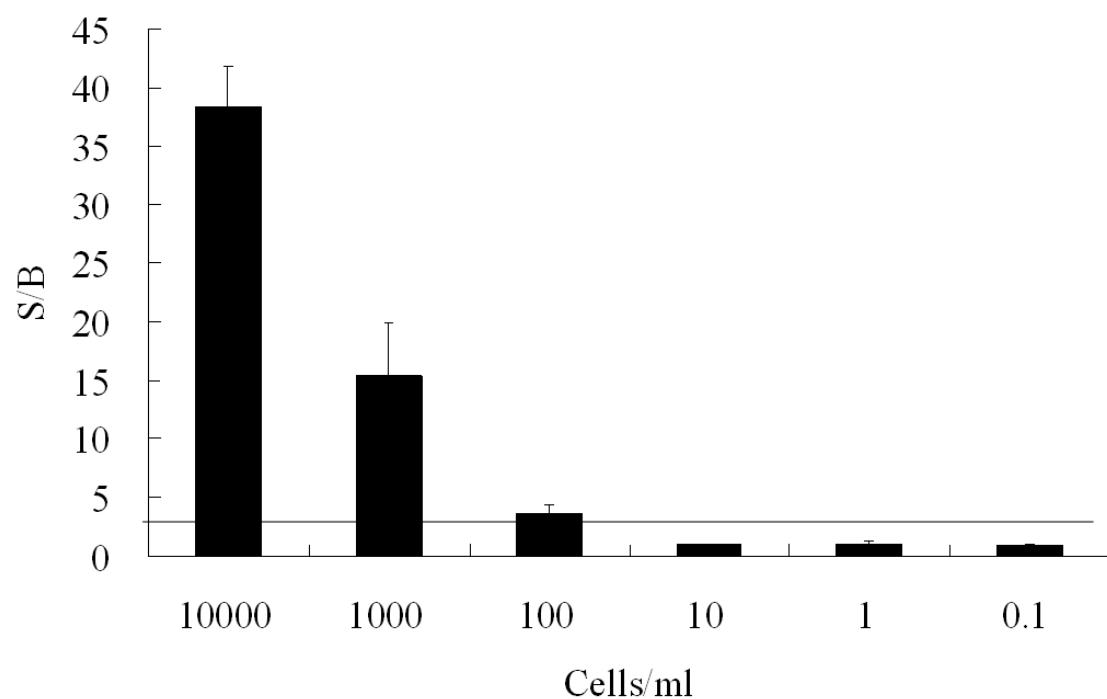
Organism	Identification no	S/B ratio																					
		Ascia	Asfla	Asfum	Asnid	Asnig	Aster	Asver	Fumop	Fuxy	Fusol	Pajav	Pemar	Abcor	Apcle	Muhic	Murac	Muram	Rmpus	Rpm	Rpory	Savas	Syrc
<i>Aspergillus clavatus</i>	BCRC 31136	■																					
	BCRC 30007		■																				
<i>Aspergillus flavus</i>	BCRC 30008		■																				
	BCRC 30144			■																			
	BCRC 33516				■																		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	BCRC 30099					■																	
	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																	■					
	BCRC 32068																		■				
<i>Aspergillus versicolor</i>	BCRC 30225																		■				
<i>Fusarium moniliforme</i>	BCRC 31492																			■			
	BCRC 31611																			■			
<i>Fusarium oxysporum</i>	BCRC 32107																			■			
	BCRC 32139																			■			
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	BCRC 33554																			■			
	BCRC 33555																			■			
<i>Fusarium solani</i>	BCRC 32448																			■			
<i>Paecilomyces javanicus</i>	BCRC 35511																			■			
<i>Penicillium marneffei</i>	CBS 344.59																			■			
	CBS 549.77																				■		
<i>Absidia corymbifera</i>	BCRC 33078																			■			
<i>Apophysomyces elegans</i>	BCRC 33107																			■			
<i>Mucor hiemalis f. corticola</i>	BCRC 32109																			■			
<i>Mucor racemosus</i>	BCRC 30186																			■			
<i>Mucor racemosus f. chibinensis</i>	BCRC 32162																			■			
<i>Mucor racemosus</i>	BCRC 32586																			■			
<i>Mucor ramosissimus</i>	BCRC 32160																			■			
<i>Rhizomucor pusillus</i>	BCRC 33122																			■			
	BCRC 31510																			■			
<i>Rhizopus azygosporus</i>	BCRC 31158																			■			
<i>Rhizopus microsporus</i>	BCRC 31995																			■			
<i>Rhizopus oryzae</i>	BCRC 31145																			■			
<i>Saksenaea vasiformis</i>	BCRC 33074																			■			
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	BCRC 31638																			■			
<i>Coccidioides immitis</i>	RS																			■			
<i>Coccidioides posadasii</i>	C735																			■			
<i>Absidia coerulea</i>	BCRC 30897																			■			
<i>Rhizopus homothallicus</i>	BCRC 31146																			■			
<i>Mucor flavus</i>	BCRC 32478																			■			
<i>Absidia cuneospora</i>	BCRC 32943																			■			
<i>Absidia fusca</i>	BCRC 33045																			■			
<i>Exophiala dermatitidis</i>	2007 F-02																			■			
<i>Sporothrix schenckii</i>	2007 F-03																			■			
<i>Trichosporon asahii</i>	2007 F-04																			■			
<i>Trichophyton rubrum</i>	2007 F-05																			■			
<i>Microsporum gypseum</i>	2008 F-09																			■			
<i>Chrysosporium spp.</i>	2008 F-10																			■			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2008 F1-09																			■			

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

圖三、以微珠陣列系統偵測多重絲狀真菌混合實驗

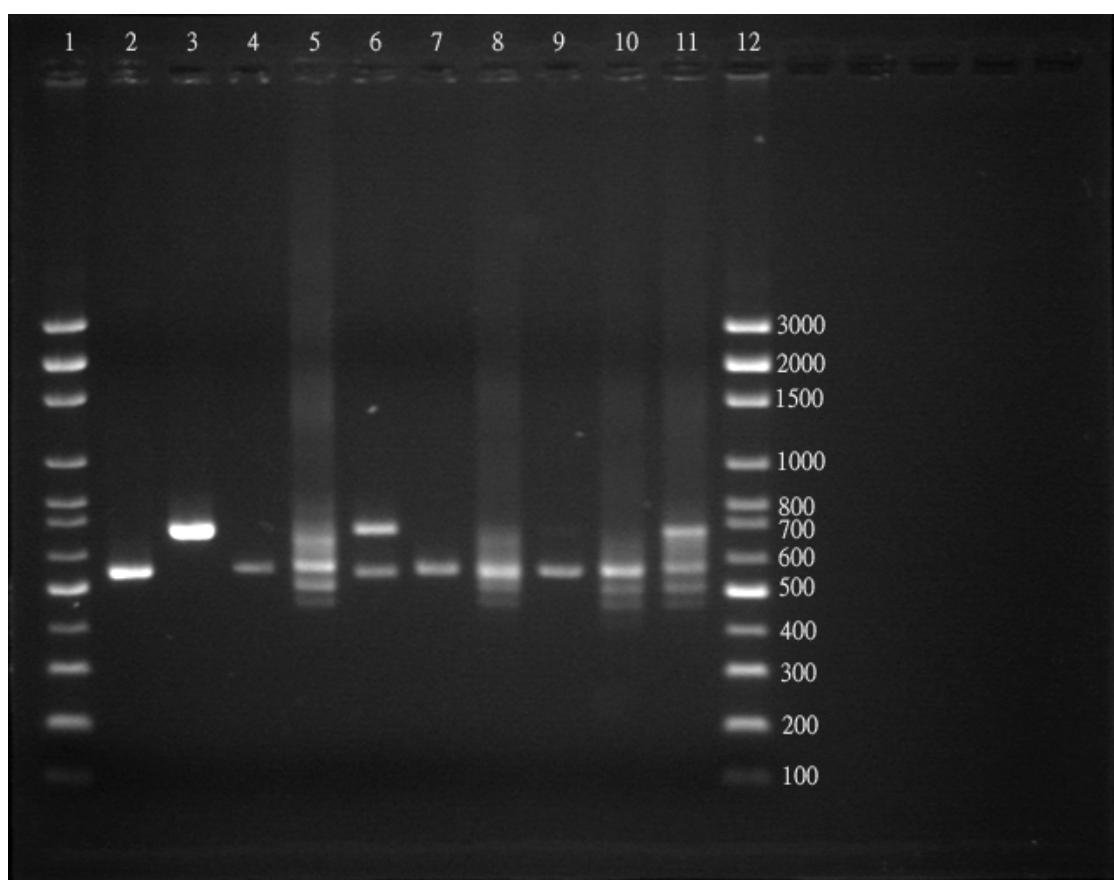


圖四、以 spiked 的血液測試微珠陣列系統運用臨床檢驗可行性及靈敏度

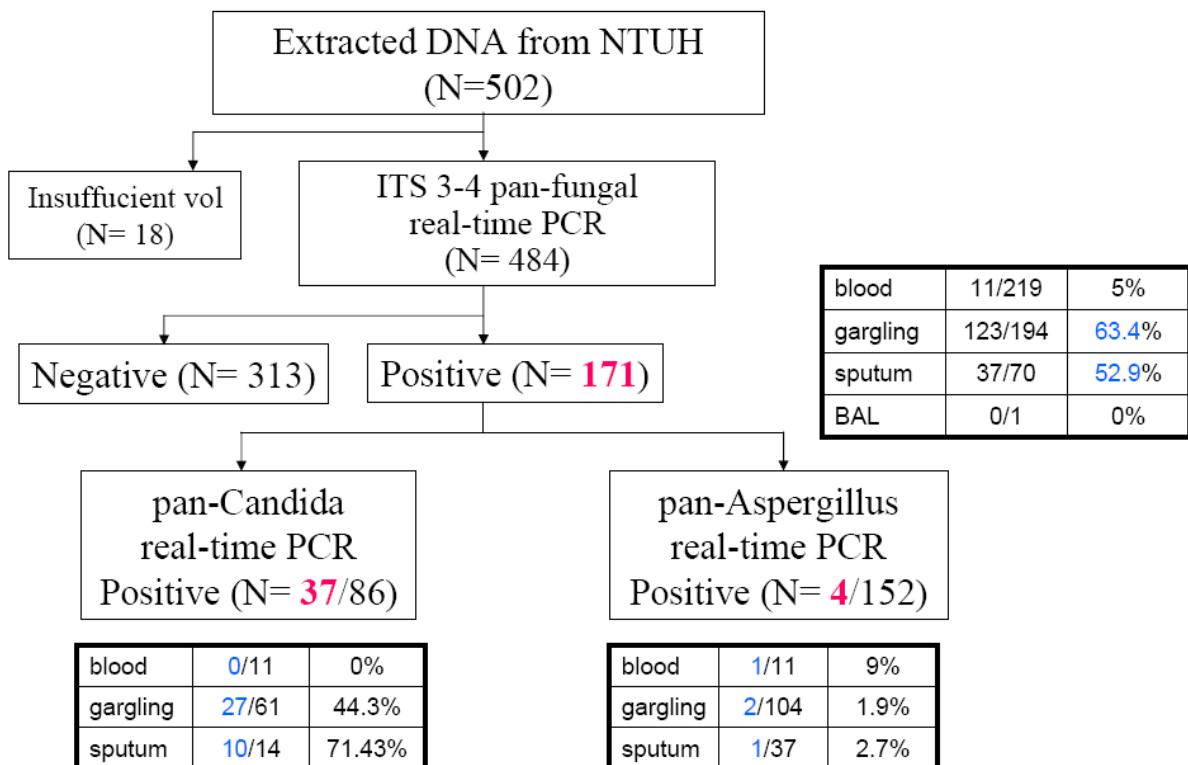


圖五、利用 multiplex PCR 採二對通用型引子對(universal primers) 增幅單獨或混合樣本 DNA

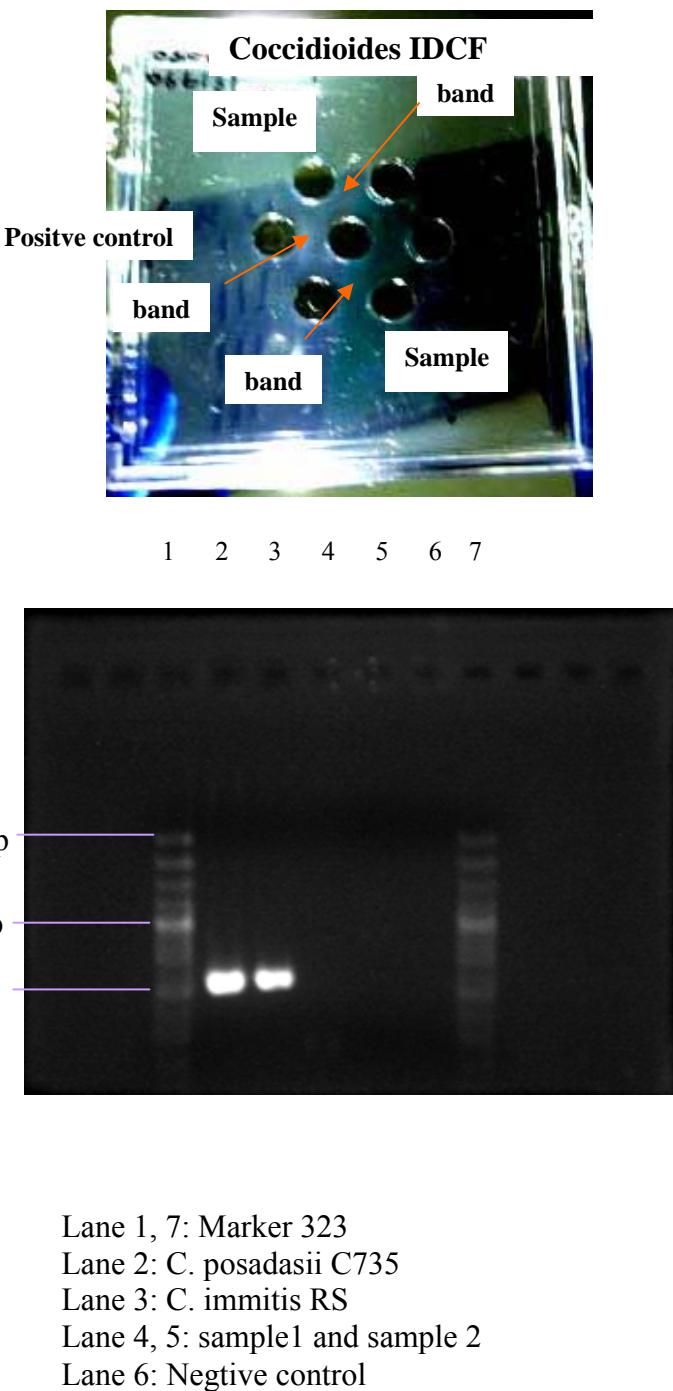
Lane 1 和 lane12 為 markers, lane 2 為 *C. albican*, lane 3 為 *A. baumannii*, lane 4 為 *P. aeruginosa*, lane 5 為 *S. aureus*, lane 6 為 *C. albican* 加 *A. baumannii*, lane 7 為 *C. albican* 加 *P. aeruginosa*, lane 8 為 *C. albican* 加 *S. aureus*, lane 9 為 *A. baumannii* 加 *P. aeruginosa*, lane 10 為 *P. aeruginosa* 加 *S. aureus*, lane 11 為 *A. baumannii* 加 *S. aureus*



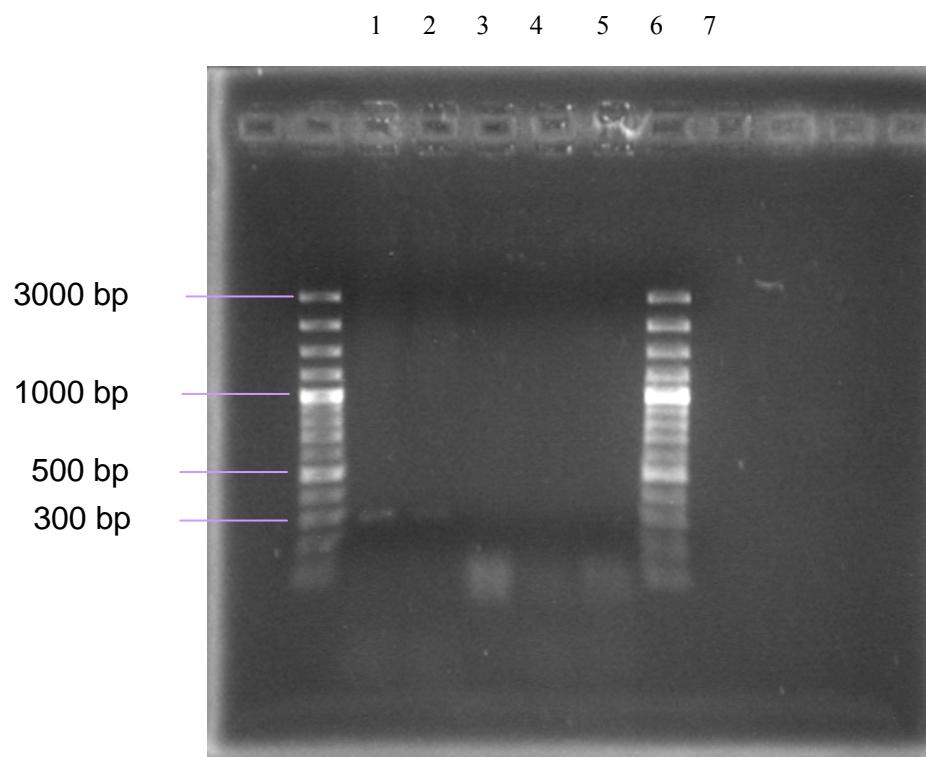
圖六、Real time PCR分析流程圖



圖七 Coccidioides immitis免疫擴散(IDCF)及PCR

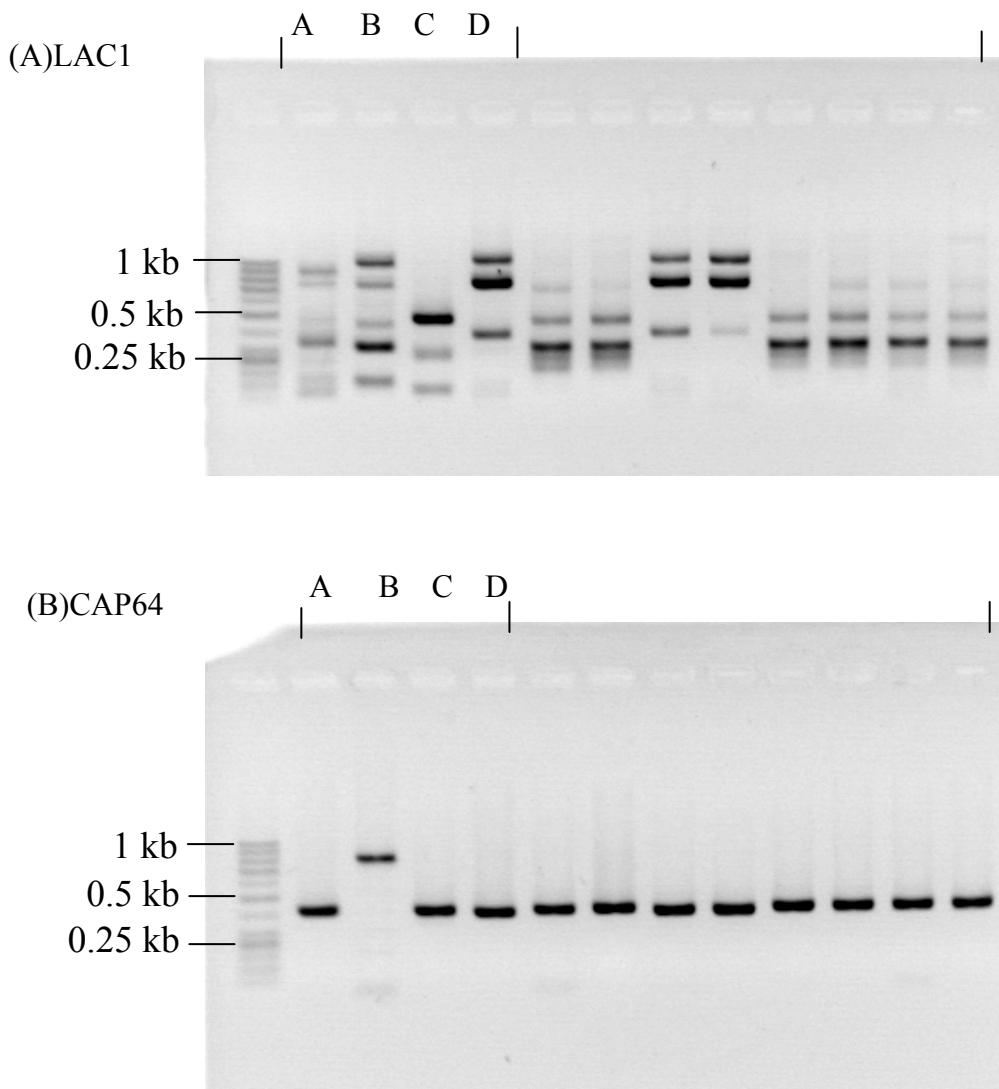


圖八 Histoplasma capsulatum M Antigen gene



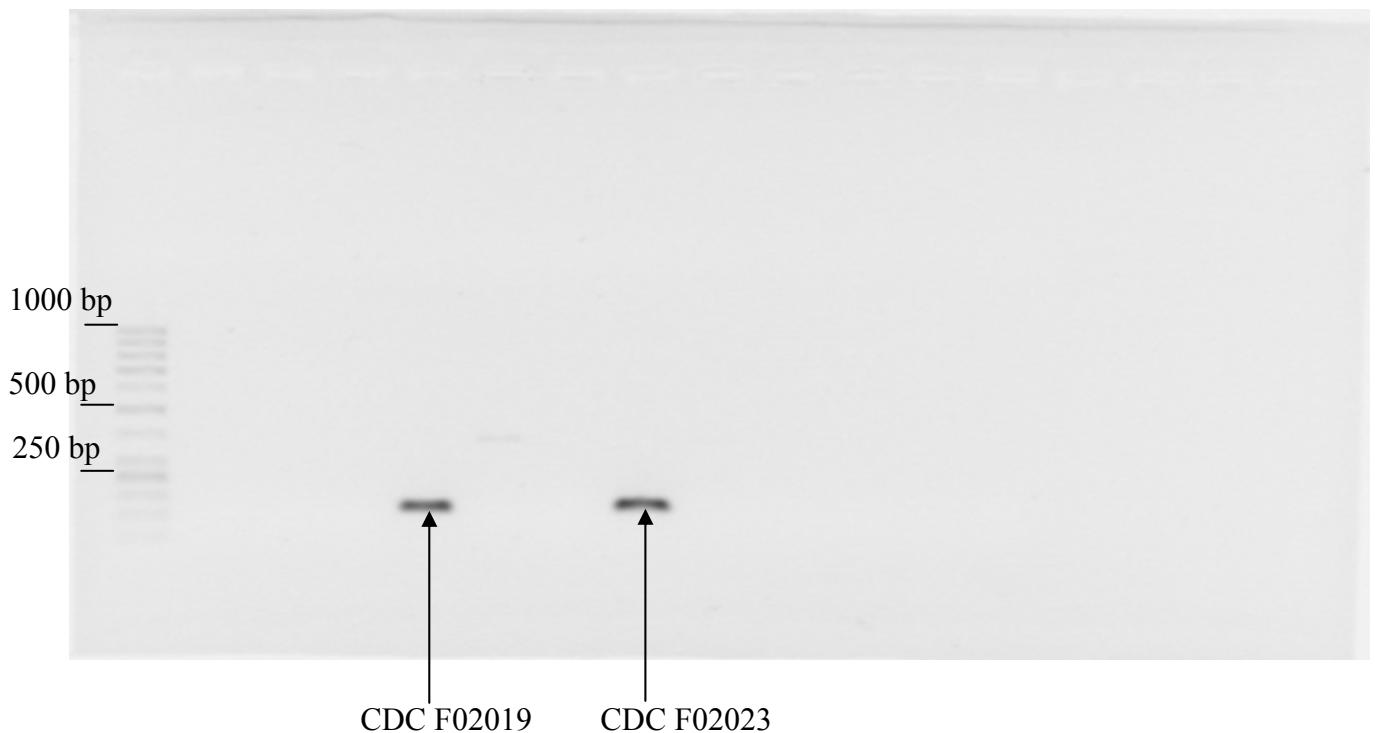
Lane 1, 7: Marker 323  
Lane 2: *H. capsulatum*  
Lane 3: *C. immitis* RS  
Lane 4, 5: sample1 and sample 2  
Lane 6: Negative control

圖九 *Cryptococcus neoformans* 血清型分型(A)LAC1 及(B)CAP64

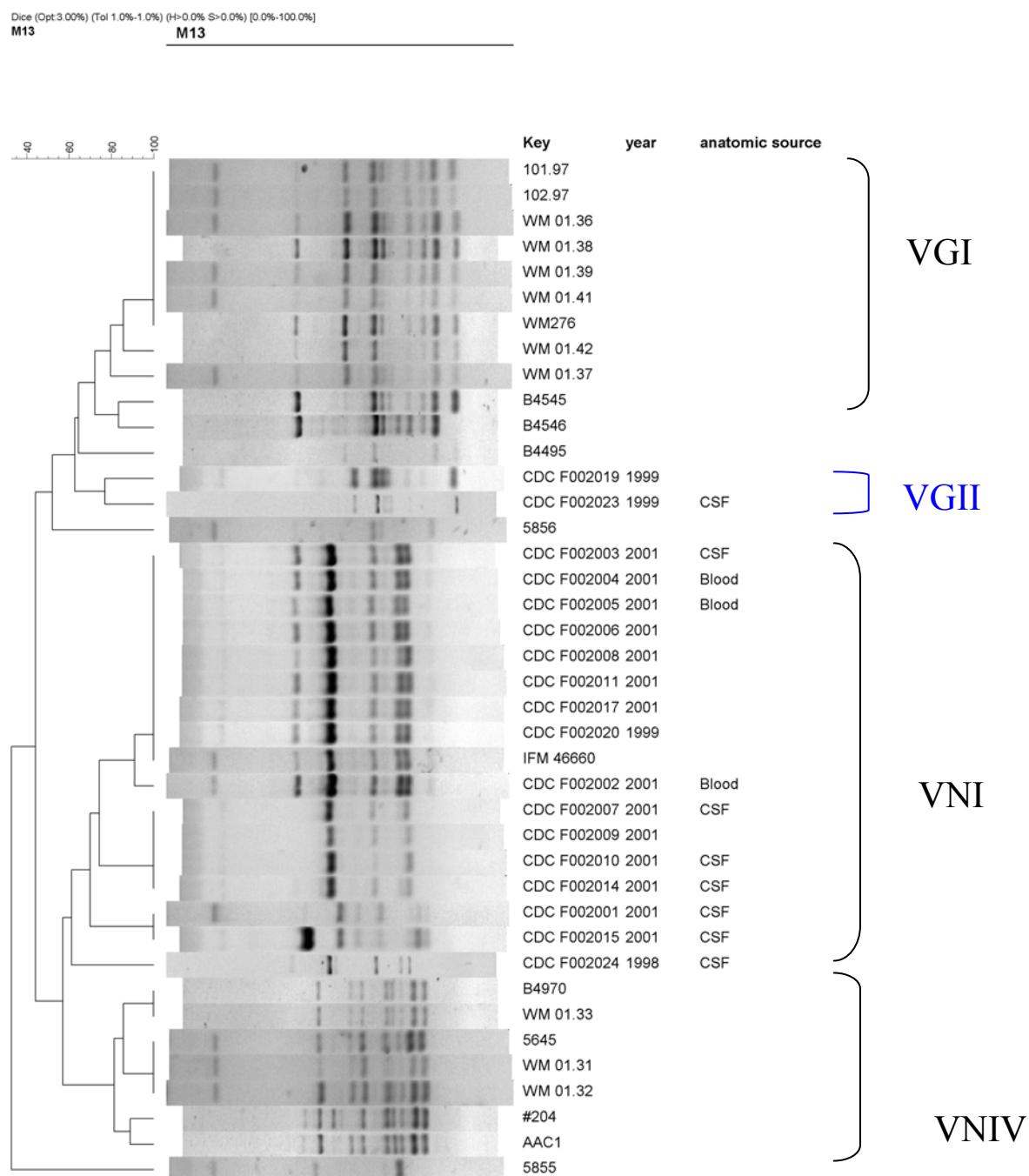


圖十、新型隱球菌 *Cryptococcus gattii* VGII 鑑定(IGS)

(大小約在 150 bp 左右有訊號出現即可確定為 VGII)

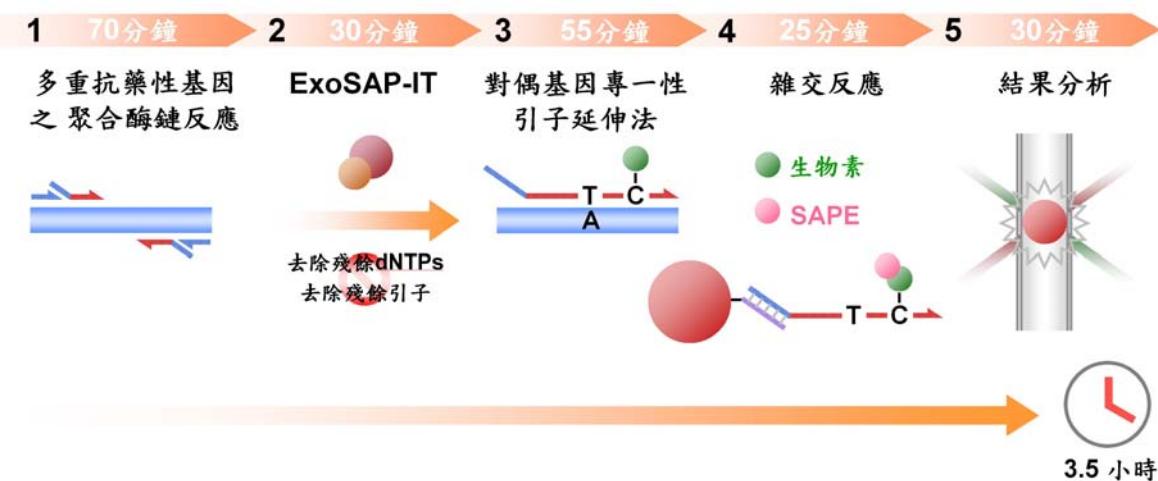


圖十一、新型隱球菌分子分型鑑定(M13 typing)



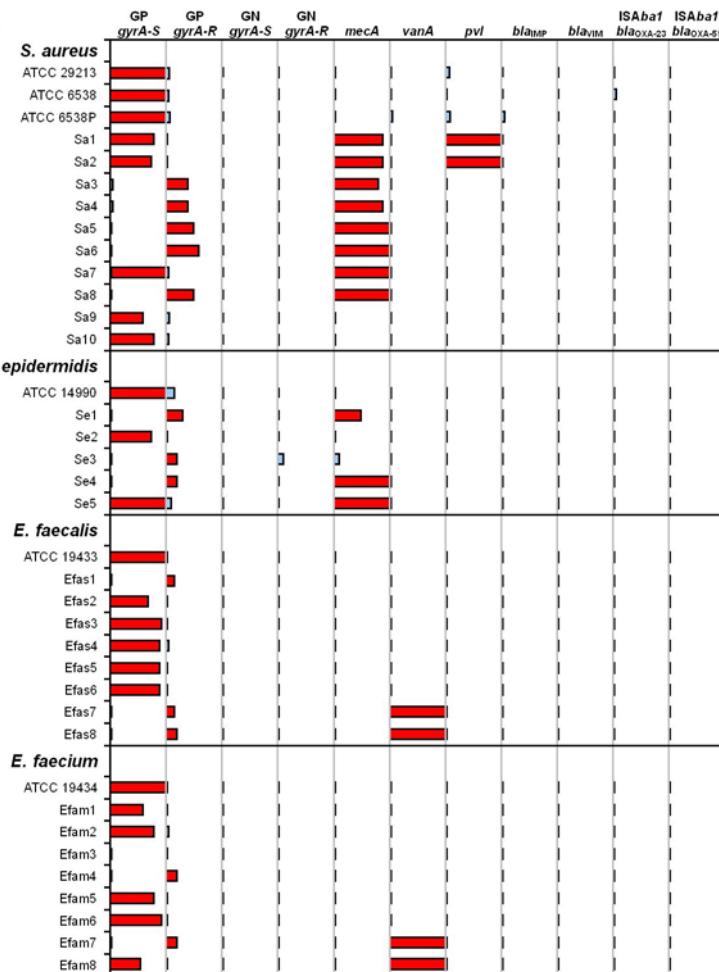
## 圖十二、流式微珠陣列之流程圖

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

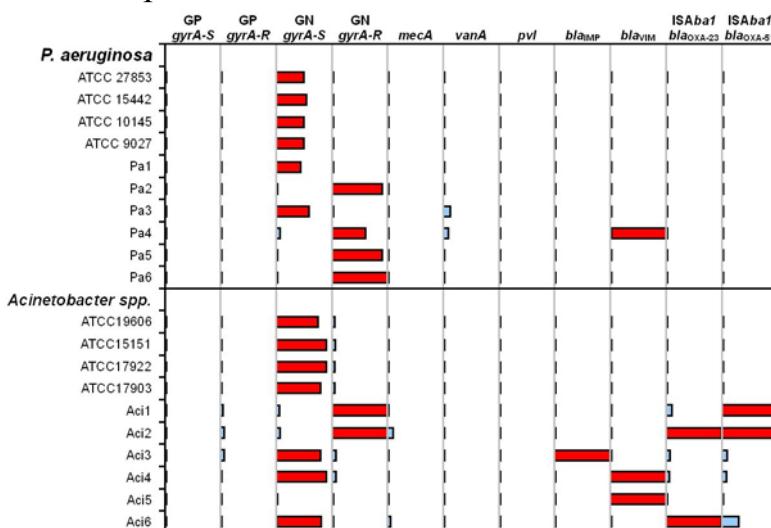


圖十三、以流式微珠陣列偵測 *S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. faecalis* 與 *E. faecium* 之 multiplex PCR 產物

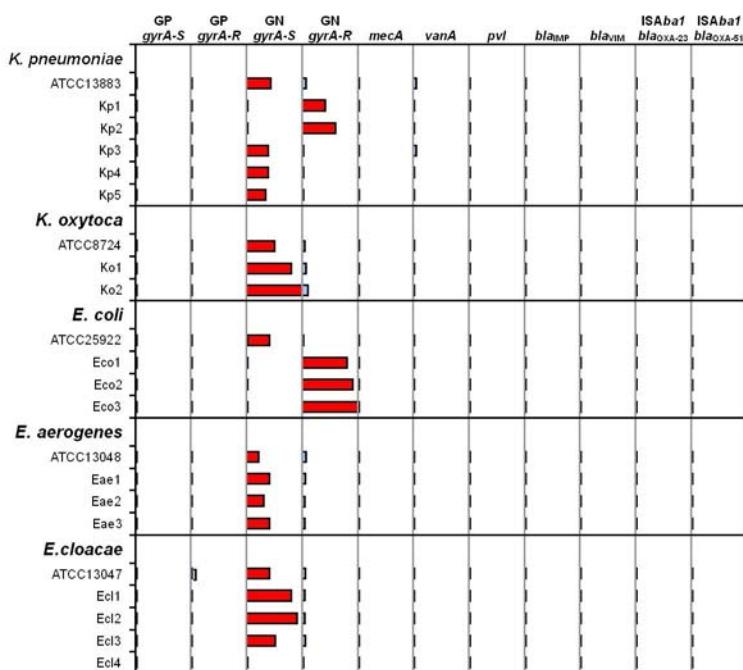
垂直位置列出各菌株名稱。平行位置的長方條顯示各種 ASPE 引子反應之 S/B 比例。全長的長方條表示 S/B 比例  $\geq 10$ 。紅色長方條表示專一性反應，藍色長方條則表示非專一性反應。



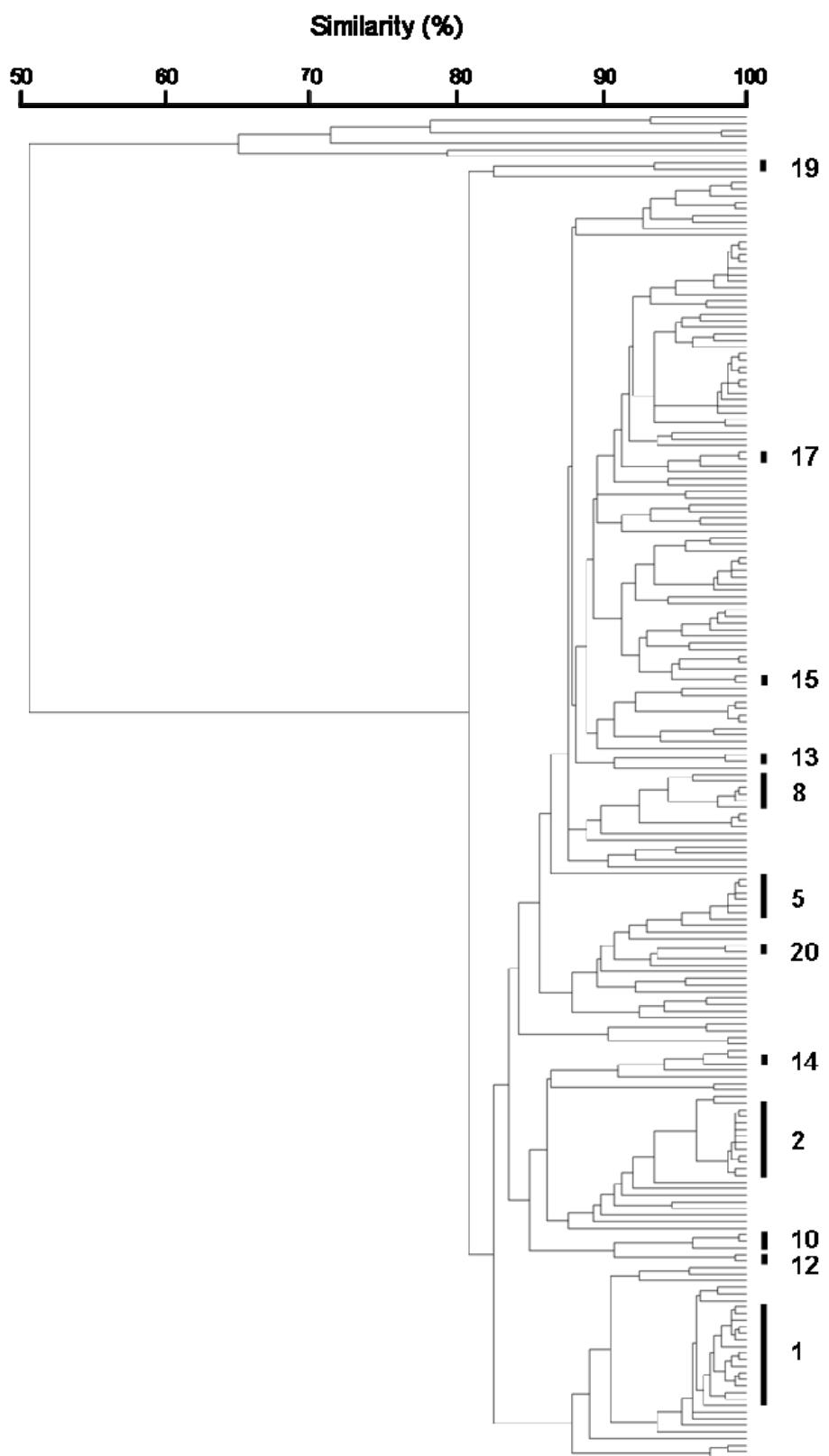
圖十四、以流式微珠陣列偵測 *P. aeruginosa* 與 *Acinetobacter* spp. 之 multiplex PCR 產物



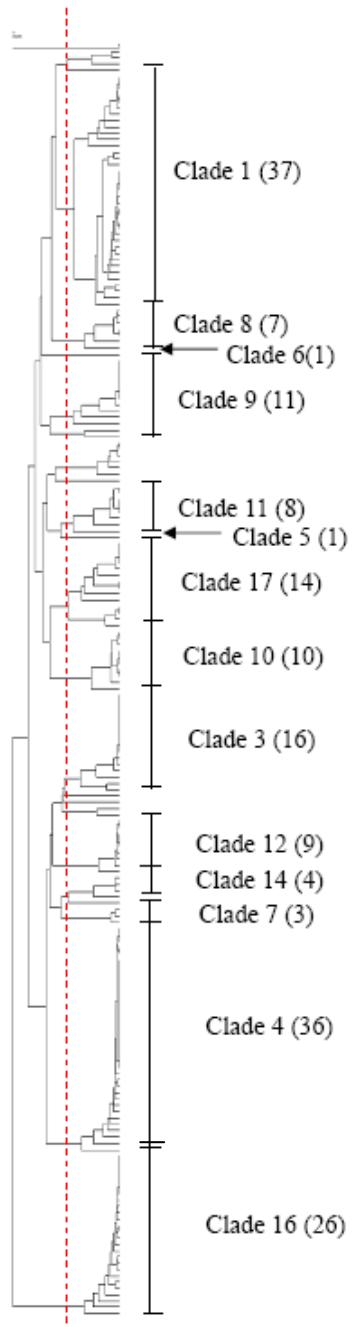
圖十五、以流式微珠陣列偵測 *K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*E. coli*、*E. aerogenes* 與 *E. cloacae* 之 multiplex PCR 產物



圖十六、205 株台灣及國際 *C. tropicalis* MLST UPGMA 樹狀圖  
(右邊數字顯示為台灣分離株的 eBURST cluster )



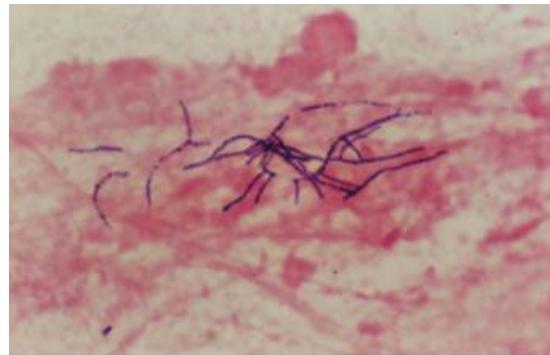
圖十七、台灣 201 株(1997-2006)*Candida albicans* 的 UPGMA tree  
(Clade number 後括弧數為菌株數)



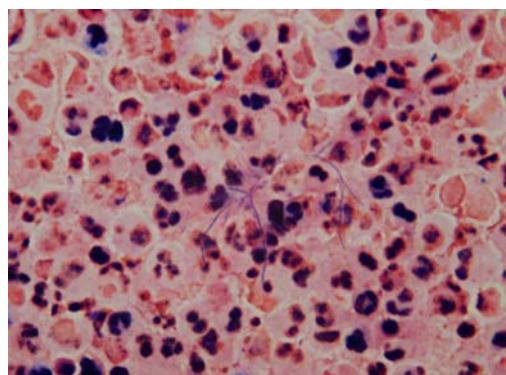
圖十八、*Nocardia brasiliensis* 的病症表現及診斷細胞學圖  
(以 *N. brasiliensis*-3 為例)



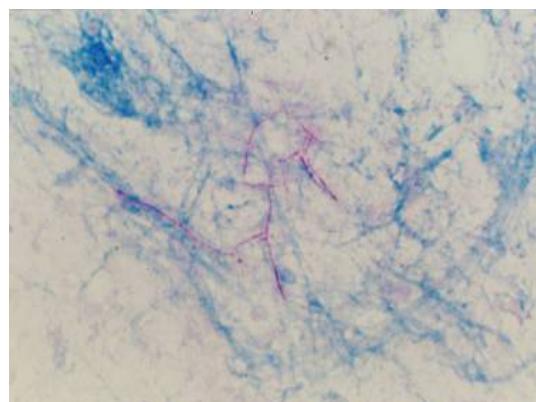
(a)右臂膿皮症



(b) OL: 1000X



(c) OL: 1000X



(d) OL: 1000X

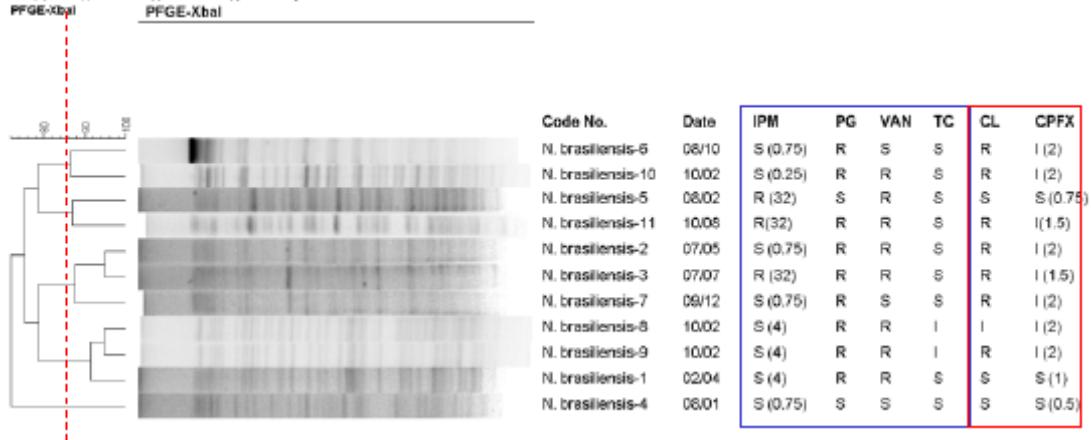
圖十九、11 株奴卡菌 *Nocardia brasiliensis* 16S rRNA 類緣關係圖

Pairwise (OG:100%,UG:0%) (FAST:2,10) Gapcost:0%  
8-691F

Code No.	Date	IPM	VAN	PG	TC	CL	CPFX
N. brasiliensis-2	07/05	S (0.75)	R	R	S	R	I (2)
N. brasiliensis-4	08/01	S (0.75)	S	S	S	S	S (0.5)
N. brasiliensis-6	08/10	S (0.75)	S	R	S	R	I (2)
N. brasiliensis-7	09/12	S (0.75)	S	R	S	R	I (2)
N. brasiliensis-10	10/02	S (0.25)	R	R	S	R	I (2)
N. brasiliensis-1	02/04	S (4)					S (1)
N. brasiliensis-3	07/07	R (32)					I (1.5)
N. brasiliensis-5	08/02	R (32)	R	S	S	S	S (0.75)
N. brasiliensis-8	10/02	S (4)	R	R	I	I	I (2)
N. brasiliensis-9	10/02	S (4)	R	R	I	R	I (2)
N. brasiliensis-11	10/08	R(32)	R	R	S	R	I(1.5)

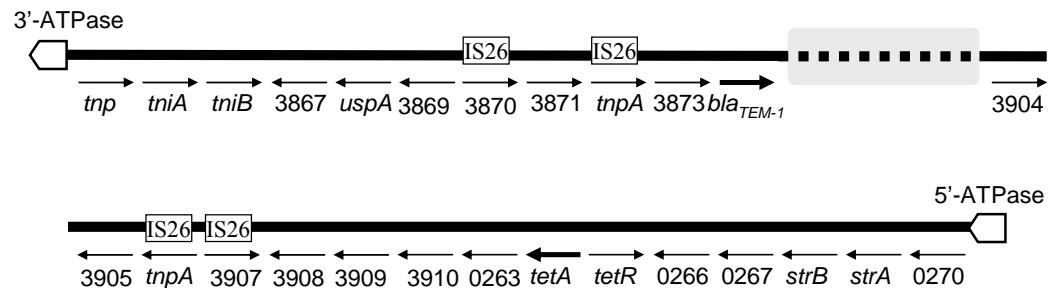
圖二十、*Nocardia brasiliensis* PFGE-XbaI 類緣關係圖

Dice (Opt:3.00%) (Tol:1.00%-1.00%) (Q>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
PFGE-XbaI

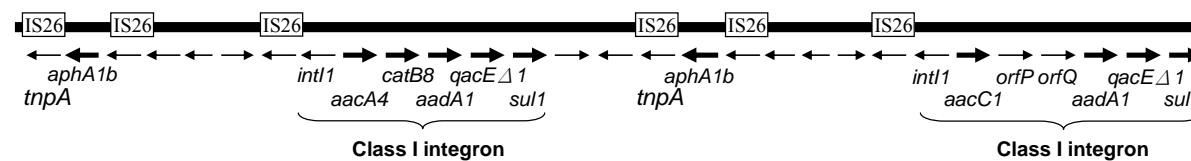


圖二十一本土高抗藥性鮑氏不動桿菌 TCDC-AB0715 之(A)抗藥性基因島(AbaR)區域，以及(B)鑲嵌有 Class I integron 之區域的細部放大(即 A 圖中的灰色方塊區域)

(A)

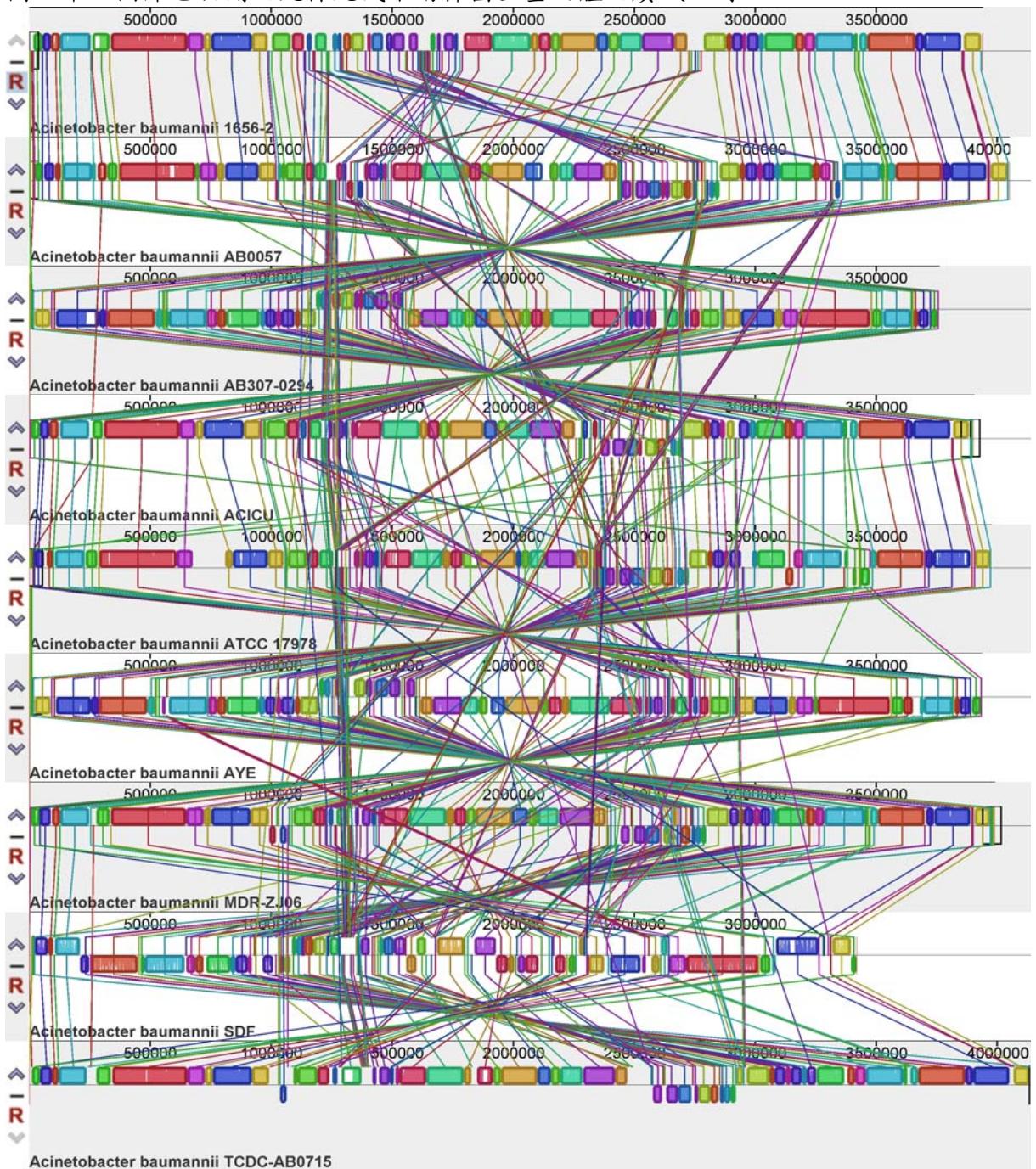


(B)



\* *bla<sub>TEM-1</sub>*、*aphA1b*、*aacA4*、*catB8*、*aadA1*、*aacC1*、*qacEΔ1*、*sul1* 皆是已知功能的抗藥性基因。

圖二十二國際已公開之九株鮑氏不動桿菌全基因體之廣域比對



## 附錄一：本計畫產出著作發表成果

本年度著作產出成果共有七篇論文（2篇SCI已發表；5篇SCI論文投寄中）。

1. Kuo-Wei Chen, Hsiu-Jung Lo, Yee-Chun Chen, Shu-Ying Li\* (2010) MLST of *C. albicans* in Taiwan (submitting)
2. Chung-Ter Huang, Mei-Hui Liao, Shu-Ying Li\* (2010) *Mycoplasma pneumoniae* respiratory infections in Taiwan (submitting)
3. Ko-Chiang Hsia, Yu-Chi Lin, Yee-Chun Chen, Mei-Hui-Liao, Shu-Ying Li\* (2010) Application of a microsphere-based array for rapid and simultaneous identification of nosocomial pathogens (submitting)
4. Mei-Hui Liao, Chiung-Yu Hung, Garry T. Cole, Shu-Ying Li\* (2010) Application of a Multiplex Suspension Array for Rapid and Simultaneous Identification of Clinically Important Mold Pathogens. *J. Clin. Microbiol.* (resubmitting)
5. Yu-Chi Lin, Yee-Chun Chen, Wang-Huei Sheng, Shan-Chwen Chang, Ko-Chiang Hsia, Shu-Ying Li\* (2010) Luminex for Multiplex Detection of Antibiotic-resistant Genes. (resubmitting)
6. Sheng, W.-H., Wang, J.-T., Shu-Ying Li, Lin, Y.-C., Cheng, A., Chen, Y.-C., Chang, S.-C. (2011) Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities and synergistic activities of antimicrobial combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter* species: *Acinetobacter baumannii* versus *Acinetobacter* genospecies 3 and 13TU. Diagn Microbiol Infect Dis. 70(3):380-6 (通訊作者, Impact factor:2.426, Ranking Microbiol. 50/107, 46.7%; Infect. Dis. 35/58, 60.3%)(被引用 1 次)
7. Chun-Chen Chen, Yu-Chi Lin, Wang-Huei Sheng, Yee-Chun Chen, Shan-Chwen Chang, Ko-Chiang Hsia, Mei-Hui Liao, Shu-Ying Li\* (2011) Genome Sequence of a Dominant Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain TCDC-7AB15. J Bacteriol 193 (9)2361-2362 (genome announcement, 通訊作者, Impact factor:3.726, Ranking Microbiol. 25/107, 23.36%)

## 附錄二：圖表目錄

表一、試驗菌株 .....	53
表二、微珠陣列系統偵測絲狀真菌 DNA 的最低濃度 .....	55
表三、Bacterial and fungal strains used in this study .....	56
表四 參考菌株的 Reference strain .....	57
表五 比較 Real time PCR 與 MSA 的結果 .....	58
表六、廣效性的簡併性引子(degenerate primers)序列 .....	59
表七、用來鑑定四種常見院內感染病原菌的探針序列 .....	59
表八、相同比例多重病原偵測結果 .....	60
表九、201 株 <i>Candida albicans</i> Clade 與不同 phenotype 之關係 .....	61
表十、 <i>C. albicans</i> 臨床菌株對 5 種抗真菌藥物之抗藥性 .....	62
表十一、 <i>Nocardia brasiliensis</i> 菌株基本資料 .....	63
表十二 國際已公開之九株鮑氏不動桿菌基因內容(gene content)之比較，數字為兩兩 菌株之間的重複基因數量 .....	64

圖一、醫學中心加護病房的院感菌逐年趨勢 .....	65
圖二、利用微珠陣列系統測試鑑定絲狀真菌菌株 .....	66
圖三、以微珠陣列系統偵測多重絲狀真菌混合實驗 .....	67
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 .....	67
圖五、利用 multiplex PCR 採二對通用型引子對(universal primers) 增幅單獨或混合樣本 DNA .....	68
圖六、Real time PCR 分析流程圖 .....	69
圖七 Coccidioides immitis 免疫擴散(IDCF)及 PCR .....	70
圖八 Histoplasma capsulatum M Antigen gene .....	71
圖九 Cryptococcus neoformans 血清型分型(A)LAC1 及(B)CAP64 .....	72
圖十、新型隱球菌 <i>Cryptococcus gattii</i> VGII 鑑定(IGS) .....	73
圖十一、新型隱球菌分子分型鑑定(M13 typing) .....	74
圖十二、流式微珠陣列之流程圖 .....	75
圖十三、以流式微珠陣列偵測 <i>S. aureus</i> 、 <i>S. epidermidis</i> 、 <i>E. faecalis</i> 與 <i>E. faecium</i> 之 multiplex PCR 產物 .....	76
圖十四、以流式微珠陣列偵測 <i>P. aeruginosa</i> 與 <i>Acinetobacter</i> spp. 之 multiplex PCR 產物 .....	77
圖十五、以流式微珠陣列偵測 <i>K. pneumoniae</i> 、 <i>K. oxytoca</i> 、 <i>E. coli</i> 、 <i>E. aerogenes</i> 與 <i>E. cloacae</i> 之 multiplex PCR 產物 .....	77
圖十六、205 株台灣及國際 <i>C. tropicalis</i> MLST UPGMA 樹狀圖 .....	78
圖十七、台灣 201 株(1997-2006) <i>Candida albicans</i> 的 UPGMA tree .....	79
圖十八、 <i>Nocardia brasiliensis</i> 的病症表現及診斷細胞學圖 .....	80
圖十九、11 株奴卡菌 <i>Nocardia brasiliensis</i> 16S rRNA 類緣關係圖 .....	81
圖二十、 <i>Nocardia brasiliensis</i> PFGE-XbaI 類緣關係圖 .....	81
圖二十一本土高抗藥性鮑氏不動桿菌 TCDC-AB0715 之(A)抗藥性基因島(AbaR)區域，以及(B)鑲嵌有 Class I integron 之區域的細部放大(即 A 圖中的灰色方塊區域) .....	82
圖二十二國際已公開之九株鮑氏不動桿菌全基因體之廣域比對 .....	83