

計畫編號：DOH99-DC-2011

行政院衛生署疾病管制局九十九年度科技研究發展計畫

應用全基因體技術發展真菌及特殊病原先進檢
驗及流病分型技術-V

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：李淑英

研究人員：李淑英、陳國緯、林郁欣、夏可強、廖美惠、陳俊辰、林昆彥

執行期間：99年01月01日至99年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目錄

計畫摘要.....	3
本文.....	9
一、前言：.....	9
二、材料與方法：.....	26
三、結果：.....	35
四、討論：.....	56
五、結論與建議.....	73
六、計畫重要研究成果及具體建議.....	74
七、參考文獻：.....	78
八、圖與表.....	89
附錄一：本計畫產出著作發表成果.....	131
附錄二：圖表目錄.....	135

計畫摘要

(1)中文摘要：

中文關鍵詞：熱帶念珠菌、禿髮念珠菌、白色念珠菌、院內感染病原菌、鮑氏不動桿菌、金黃色葡萄球菌、綠膿桿菌、新型隱球菌、巴西奴卡菌、分子流行病學、抗藥性基因、快速多重檢測、流式微珠陣列

病原真菌及多種院內感染病原在重症孱弱及免疫缺損病患族群中造成之合併症及死亡率仍居高不下，並持續成為公衛上的隱憂。快速精確檢驗及分子流行病學之研究，有助於釐清各類病原菌傳播特性，進而研擬更精確之防治對策。此外，持續監測並即時展現國內病原之型別及特性（病原性、抗藥性）數據，參與全球病原型別及其特性調查。深入探討抗藥性及致病病性機制，可為未來疫苗的參採或檢驗試劑開發之參考。

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

我們的主要進展有十二：**第一**、發展可單管同時偵測麴菌、鐮胞菌、青黴菌、接合菌等26種臨床重要絲狀真菌的微珠陣列。此方法特異性高，敏感度為 100 fg~1 ng、模擬血液檢體檢測敏感度為 10^2 cells/ml。**第二**、成功開發流式微珠陣列系統，可單管快速正確地鑑定台灣院內感染最重要細菌及真菌(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。**第三**、發展院內感染多重抗藥性細菌抗藥性基因的快速多重

檢測平台。方法為利用單步驟巢式多重PCR 從methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)、community associated MRSA (CA-MRSA)、methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE)、vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE)、carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA)、carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. (CRAB)和 ciprofloxacin-resistant (CipR) Enterobacteriaceae等院內感染細菌增幅 $gyrA$ 、 $mecA$ 、 $vanA$ 、 bla_{IMP} 、 bla_{VIM} 、 $ISAbal-bla_{OXA-23}$ 和 $ISAbal-bla_{OXA-51-like}$ 等7種所謂最後線抗藥性基因(last resort antibiotic-resistant genes)，外加 pvl 基因。**第四**、發展快速鑑定不動桿菌對ciprofloxacin 抗藥性針對 $gyrA$ 基因點突變之real-time PCR方法。**第五**、探討台灣不同種別 *Acinetobacter*攜帶不同carbapenemase相關基因之特性：多數*A. baumannii*攜帶 $ISAbal-bla_{OXA-51}$ 結構並對於imipenem減少敏感性甚至抗藥性；genospecies 3 以及genospecies 13TU中，只有 bla_{IMP} 、 bla_{VIM} 、與 bla_{OXA-58} 等carbapenemase 相關基因被測出，其中含有 bla_{IMP} 基因者對imipenem有抗藥性。進而發現外膜蛋白中OprD的缺失可能造成 *Acinetobacter* genospecies 13TU減少對於imipenem的敏感度。**第六**、調查台灣不同不動桿菌抗fluoroquinolones、aminoglycosides、cephalosporins等抗生素之抗藥性機制，並經由轉殖實驗證明pOXA23以及pOXA66造成對於carbapenem類藥物明顯造成抗藥性增加。並首度發現 $ISAbal-bla_{OXA-23}$ 基因會造成Cefepime的抗藥性增加。**第七**、分析熱帶念珠菌的分子流行病學，顯示同一病人的多重菌株雖有些有微演化，但多半維持同一型別。且我們發現對flucytosine降低感受性的熱帶念珠菌菌株(DST164)在不同病人同時出現。**第八**、分析來自71病人的97株副禿髮念珠菌的分子流行病學，分析ITS2序列發現其中實際台灣的*C. parapsilosis* 實際上85.9% (61/71)是*C. parapsilosis sensu stricto*，8.5% (6/71)是*Candida*

*orthopsilosis*而 5.6% (4/71)是*Candida metapsilosis*。此區分也與BssHIII-PFGE的類緣分析吻合。*C. metapsilosis* 的菌株。此3基因型對fluconazole 和 echinocandins 降低感受性及好感染的部位不同，顯現3者的精確區分具有臨床及治療意義。**第九**、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。**第十**、發展奴卡菌的分子分型方法探討其分子流行病學。**第十一**、持續應用MLST分析台灣白色念珠菌外，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。**第十二**、使用光學圖譜(optical mapping)及全基因體定序技術針對鮑氏不動桿菌多重抗藥性菌株進行全基因體分析，並進行比較基因體分析，並藉此探討抗藥性及致病力機轉。

本多年期計畫成果豐碩，本年度著作產出成果共有九篇論文 (3 篇 SCI 及 1 篇疫情報導已發表;5 篇 SCI 論文投寄中)，一篇專利(駁回答辯中)。95-98 年在真菌及特殊病原研究上計發表 19 篇 SCI 論文。我們的型別資料將回饋給臨床醫師，合作持續分型及統計分群並與臨床及流病資料整合建立資料庫。國際上持續建立合作關係，交換型別資訊或提供訓練。希望藉由持續努力瞭解病原可能傳播流行及特定高抗藥性/高致病性株系崛起之情形。甚且探勘出特異性流病、檢驗及疫苗標誌分子。

(2)Abstract :

Keywords : *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, Nosocomial pathogens, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cryptococcus neoformans*, *Nocardia brasiliensis*, molecular epidemiology, resistance genes, 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 with high specificity. The sensitivity of MSA is 100 fg to 1 ng and 10^2 cells/ml in simulated blood specimens. **Secondly**, we develop a microsphere suspension array assay for rapid and accurate identification of four most

important nosocomial pathogens, namely *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Candida albicans*.

The specificity is high and the sensitivity of detection is 1-10 pg DNA.

Thirdly, we developed a one-step nested multiplex PCR and subsequent luminex array system for detection of the 7 last resort antibiotic-resistant genes, including *gyrA*, *mecA*, *vanA*, *blaIMP*, *blaVIM*, IS*AbaI*-*blaOXA-23*, and IS*AbaI*-*blaOXA-51*-like genes in addition to the *pvl* gene, from the commonly nosocomial bacteria. **Fourthly**, we develop a real-time PCR

targeting the mutation of *gyrA* gene of *Acinetobacter* spp. to detect the Ciprofloxacin resistant *Acinetobacter* spp. isolates. **Fifthly**, we explore the differences in carbapenemase- associated genes in distinct *Acinetobacter* spp.: were identified. Most *A. baumannii* carried IS*AbaI*-*bla*_{OXA-51}

and exhibited reduced susceptibility or resistance to imipenem ; in genospecies 3 and genospecies 13TU, only *bla*_{IMP} , *bla*_{VIM} , and *bla*_{OXA-58} carbapenemase genes were detected, strains harboring *bla*_{IMP} gene show resistance to imipenem. In addition, we found that loss of OprD porin may be associated with a reduced susceptibility to imipenem in *Acinetobacter* genospecies 13TU.

Sixthly, we also investigated genetic basis of MDR *Acinetobacter* spp. to fluoroquinolones , aminoglycosides , cephalosporins and found through transformation experiments that pOXA23 and pOXA66 increase the MIC of carbapenems. In addition, we also firstly report the association of

IS*AbaI*-*bla*_{OXA-23} gene with increase MIC to cefepime. **Seventhly**, we conduct study on the molecular epidemiology of *Candida tropicalis* in ICU patients and found that same DST persist in each patients with microevolution.

Furthermore, one DST (DST 164) of *C. tropicalis* with reduced susceptibility to flucytosine was identified from different patients.

Eighthly, we re-identify *C. parapsilosis* species complex into 3 respective species, namely *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* and conducted epidemiological and susceptibility studies and found different resistant pattern as well as tissue tropism among the three species. **Ninthly**, 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. **Tenthly**, we develop molecular typing methods for *Cryptococcus neoformans* and monitor closely the possible introduction of the high virulent strains from North America. **Eleventhly**, we set up typing scheme for *Nocardia brasiliensis* and conduct its molecular epidemiology study. **Twelvethly**, we use novel optical mapping technique and whole genome sequencing to map whole genome of a multiple drug resistant *A. baumanei* strain. Comparative genomic study will be attempted in a hope to elucidate the resistance and virulence mechanisms.

This 5-year project is very productive in terms of publications. This year (2010) 9 papers have been generated: 3 SCI papers and 1 peer-reviewed report have already been published, 5 are (re-)submitting , one patent is in rebuttal stage. In the past 4 years (2006-2009) 19 additional SCI have been published. Furthermore, we will feedback the subtyping data to clinicians for refining their therapy regimen and collaborate to establish databases integrating typing results with clinical and epidemiological data. and provide research findings to control divisions for fine-tuning of their control strategies. Our continuous efforts will eventually help to identify crucial points for disease intervention and display our strength and commitment in international collaboration and participation. Such continuous efforts will help to identify specific diagnostic, vaccine, and epidemiological marker molecules.

本文

一、前言：

近年來因愛滋病毒的肆虐及先進醫療行為等因素，使得侵襲性念珠菌感染在重症孱弱及免疫缺損病患族群中造成之合併症(morbidity)及死亡率(mortality)仍居高不下，並持續成為公衛上的隱憂¹⁻⁵。侵襲性真菌感染造成接受癌症或器官移植的患者免疫抑制的化療和免疫缺損病患族群造合併症(morbidity)及死亡(mortality)的主要原因⁶⁻¹⁰。由於抗生素大量使用、重病孱弱及免疫低下患者的增加、長期住院、院感措施鬆懈均助長院內感染之發生及抗藥性菌株之增加。不同的院內感染病原有其獨特流行傳播途徑、好發危險因子及抗藥性特性。快速及精確的鑑定院內感染病原種別，可協助釐清感染源，進而有助於落實感控措施。

自1989年起在美國念珠菌*Candida spp.* 感染已躍居院內血流性感染的第四位¹¹。侵入性念珠菌症(invasive candidiasis)病原中*Candida albicans*目前仍是臨床上最常見的念珠菌，約佔所有侵入性念珠菌症的三分之二¹²。然而，non-albicans念珠菌，如*C. glabrata*及*C. krusei*等對一般藥物感受性降低的物種，近年來也已發現有崛起的趨勢。根據美國院內感染監視系統NNISS之傳染病死亡案例統計亦顯示，真菌性病害的排名已由1980的第十位躍升至1997年的第七位¹³。其他歐美國家之調查報告亦指向病原真菌漸趨嚴重之事實¹⁴。在國內的真菌盛行率居高不下情形也極類似。在台灣某大教學醫院念珠菌高居院內感染致病菌的榜首，而其中又以白色念珠菌為最^{15, 16}。依據該醫院統計1981至1993年院內感染真菌菌種分析方面，前四名分別為*C. albicans* 50.8%、*C. tropicalis* 17.6%、*C. parapsilosis* 11.7%及*C. glabrata* 8.2%。其中，*C. parapsilosis* 與 *C. glabrata* 更攀升了4-6倍的¹⁷。而另一教學醫院新生兒加護病房在過去的三年半內，也發生了50多次的念

珠菌血症，其中甚至發生了三次院內念珠菌血流感染的流行，而其中一次醫護人員手上所帶真菌被鑑定為該加護病房爆發感染的來源^{18, 19}。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^{20, 21}。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。

侵入性念珠菌症包含各種廣泛且嚴重的病症，如念珠菌血症 (candidemia)、傳播性念珠菌症 (disseminated candidiasis)、心內膜炎 (endocarditis)、腦膜炎 (meningitis)、深層器官感染症 (deep organ involvement)及念珠菌性陰道炎或外陰陰道念珠菌症 (candidal vaginitis or vulvovaginal candidiasis)等。侵入性念珠菌症在加護病房的盛行率與實質的發病率和致死率有關聯，因而造成治療上的問題。

(1) **念珠菌血症**: 念珠菌造成院內的菌血感染症在美國及歐洲分別為第四及第六大的病原菌；然而，在台灣，念珠菌為造成院感菌血症三大病原之一²²⁻²⁴。雖然*C. albicans*為主要的感染種別 (約佔 40-60%)，但是 non-albicans念珠菌感染的增加更顯重要性²⁵。在1980年代，第二代azole類藥物開始普遍使用後，念珠菌血症的開始轉變為non-albicans念珠菌的感染且逐漸增加^{26, 27}。臨床上發現，這些物種包括對於fluconazole具低敏感性的*C. glabrata*及天生具抗性的*C. krusei*，因此，菌株被分離後的物種鑑定可幫助後續的治療計畫²⁸。諸多原因可導致念珠菌血症如外科手術、免疫抑制藥物、糖尿病或腎臟等相關疾病、癌症化療及廣效性抗生素等因素，但最重要的單一危險因子為加護病房的停留，

感染的情形約在第 10 天出現²⁹⁻³¹。

- (2) **念珠菌腦膜炎**: 念珠菌腦膜炎案例雖為少數，但近幾年有逐漸增加的趨勢，其發生可能為自發性感染或經由傳播性念珠菌症 (disseminated candidiasis) 及神經外科手術等感染中樞神經系統所造成之併發症。因此，免疫不全、使用廣效性抗生素及靜脈營養輸入等病人為高危險族群³²。*C. albicans*為常見的感染菌種，其他如 *C. tropicalis*、*C. parapsilosis*、*C. krusei*、*C. lusitaniae* 或 *C. glabrata* 則為少數。念珠菌腦膜炎較常發生在新生兒，一般健康的成人個體較少見。由念珠菌所造成的腦膜炎或腦損傷主要與 *Candida spp.* 進入中樞神經系統及其區域增幅性質有關。*Candida* 過度繁殖生長後進一步造成傳播性或進入中樞神經。如懷孕時，當母體的陰道念珠菌叢過度生長，便會侵犯胎兒的神經管因而造成腦膜炎或 meningocele 的發生。在新生兒中，中樞神經的念珠菌感染主要發生在未成熟或孱弱的個體³³。另外，神經外科手術可能藉由其傷口造成念珠菌相關的感染症³⁴。
- (3) **念珠菌尿道炎**: 念珠菌尿道炎為院內感染常見的尿道感染，但在不同醫療院所的盛行率有異，最多發生在加護病房，特別是外科加護病房及骨髓移植病房中^{35,36}。對於念珠菌尿道炎所有研究報告包括回溯性研究、病例對照研究及大型的監測計畫中，顯示其危險因子一般為尿道醫療設備、外科手術、近期為抗生素的使用、以及更進一步為年齡、性別、免疫低下及住院時間等。其中，導尿管的使用可造成 27% 念珠菌的尿道感染³⁷。另外，抗生素的使用也是促進感染念珠菌尿道炎的主要危險因子；這是由於體內的正常菌叢被藥物破壞後，提供了念珠菌入侵及群聚的平台^{36,38}。多數研究顯示，*C. albicans* 為主要造成感染的菌種，約超過 50%，而後則為 *C. glabrata* (16%) 及 *C. tropicalis*³⁸⁻⁴⁰。

不同念珠菌種類的感染與其感染部位有關，如non-albicans念珠菌較*C. albicans*易感染口咽及陰道處等部位^{35, 36, 39, 40}。院內的念珠菌尿道感染中，發現有10%的病人有*Candida* spp.混合感染的現象³⁹。

(4) 念珠菌性陰道炎或外陰陰道念珠菌症：念珠菌性陰道炎約占陰道感染的三分之一。念珠菌為健康女性下生殖道之正常菌叢的一部分(20-50%)。陰道念珠菌症多數為由*C. albicans*所造成，此菌易被多數的抗真菌藥物所消滅，因此療程簡易且短。然而，約有5-8%的女性具有復發性的陰道念珠菌症(每年感染發作至少四次以上)，可能和宿主、微生物和藥物的使用有關。另外，non-albicans念珠菌，特別是*C. glabrata*常造成復發性的陰道念珠菌感染。一般而言，70-90%的陰道念珠菌症由*C. albicans*所感染，10-20%為*C. glabrata*；陰道炎較少由*C. krusei*、*C. parapsilosis*及*C. tropicalis*所引發。然而近年來，non-albicans念珠菌造成陰道炎的比例也有增加的趨勢。

抗真菌藥物仍有許多改善的空間^{41, 42}。這是因為早期診斷不易，延誤投藥時機。藥物選擇少且副作用大、對有些真菌無效及產生抗藥性等缺點。近來多種具有不同作用範疇的替代藥物如voriconazole, posaconazole, echinocandin, caspofungin的上市，具有低腎毒性、可口服及廣效性之優點，使得醫師在針對不同種別真菌用藥時有更多選擇。自從azole類藥物尤其fluconazole上市以來，使其漸成為抗真菌用藥的首選之一。然而，具有抗藥性的菌株卻逐漸浮現，尤其是對azole藥物抗藥性亦已成為真菌感染的重要議題，其他諸如amphotericin B, flucytosine, itraconazole, ravuconazole及voriconazole對不同黴菌的抑菌濃度也有顯著不同²²，更增加問題的棘手性。如*C. lusitanae*對amphotericin B容易產生抗藥性⁴³。*C. krusei*對於azole先天具有抗藥性，*C. glabrata*已經有研究顯示在*in vitro*及*in vivo*易獲得抗藥

性⁴⁴，*C. dubliniensis*和*C. tropicalis*非常容易產生fluconazole的抗藥性⁴⁵⁻⁴⁹。*C. parapsilosis*和*C. guilliermondii*對echinocandins的最低抑菌濃度(MIC)比其他的*Candida* spp.的濃度高。以amphotericin B治療*C. glabrata*和*C. krusei*需要較大的劑量，*C. glabrata*和*C. krusei*對itraconazole具有抗藥性，voriconazole的最低抑菌濃度(MIC)也較高。是以鑑定造成感染的真菌種類，可稍預測其對抗真菌藥物抗藥性以提供治療的參考⁵⁰。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。

除上述機緣性感染之案例外，肇因於都市發展、人口遷移及環境之變遷、地震等天災及氣候之異象，亦助長了真菌如Cryptococcosis及coccidioidomycosis^{51, 52}、histoplasmosis^{45, 53, 54}及blastomycosis等雙型性高致病性真菌之感染趨勢⁵⁵。病原真菌對於健康個體之威脅性亦與日俱增。而新的致病原崛起⁵⁶及抗藥性菌株的浮現更增加問題的棘手性。*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。*C. 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⁵⁷。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⁵⁸。*C. 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。

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⁵⁹。不同種別發展出深層器官感染機率及其嚴重程度亦有異。例如，*C. tropicalis*在嗜中性白血球減少症的病人造成侵入性感染但在肝臟移植的病人則不會⁶⁰。可見早期及正確的診斷有助於病害診療及防治^{61,62}。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 Ink⁶³，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⁶⁴，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⁶⁵。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⁶⁶。例如，利用樹脂凝集試驗法(LA)檢測*C. neoformans*抗原⁶⁷，以三明治酵素免疫反應(EIA)⁶⁸，免疫螢光染色(IF)⁶⁹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⁷⁰。利用抗體檢測來診斷全身性的念珠菌症(candidiasis)是有限制的，在免疫機能障礙的病人因抗體產生較低或是抗體濃度達不到檢測得濃度會造成會造成偽陰性，病人有表皮的移生(superficial

colonization)會造成偽陽性。是以抗原檢測可能是比較有用的方法。血液循環中多數的抗原可當成診斷全身性的念珠菌症的標的。Mannan是*C. albicans*主要的細胞壁mannoprotein，為一個有潛力的診斷抗原。此外，Secreted aspartyl proteinase (Sap)是一毒力因子⁷¹⁻⁷⁴，且因Sap為組織受侵襲過程產生與單純的移生無關，因此被推測可當成診斷抗原^{75,76}。

病原真菌在診斷上頗為困難。且相較於細菌菌血症與病毒菌血症，真菌菌血症之菌量一般低很多。因此，高敏感度的偵測甚為重要。晚近，核酸檢測技術如各種PCR方法之崛起提供快速、精確及敏感鑑別之利器^{62,77}。以PCR配合酵素免疫檢測法EIA或RFLP技術^{78,79}以及核酸雜合法^{80,81}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*⁸²之文獻。此外如應用在*Aspergillus spp*⁸³，*Candida spp.*^{84,85}，*C. neoformans*⁸⁶，*Penicillium marneffeii*及重要的雙型性酵母菌⁸⁷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⁸⁸。吾人日前發展出可鑑定7種臨床上常見真菌種別之PCR-EIA⁸⁹。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^{90,91}，針對基因標的為ITS2或large subunit ribosomal DNA，可鑑定臨床重要真菌^{92,93}。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⁹⁴。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⁹⁵。這些真菌菌株基因序列資料若能更臻完備，不但可作為分類鑑定之依據，更可提供引子、探針設計的寶貴資料。各種新發展的全基因體快速定序技術平台，標榜數小時內完成全基因體定序，更將提供了令人矚目的豐富資訊。

除此之外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⁹⁶，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⁹⁷。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⁹⁸。目前在全球漸受矚目的流式微珠陣列，系利用流式細胞儀的技術基礎，加上雷射激發、數位訊號以及傳統化學反應和免疫反應等技術，整併後的一種檢驗技術平台，可同時快速並且正確的檢驗多種類型(蛋白質或者核酸)及數量(100)的標的。由於檢測反應均在液態中完成，也稱為液相晶片(liquichip)。主要原理是利用特殊製備的微珠(polystyrene材質，利用二種螢光染劑混合製備多達100種不同的色珠)，依不同研究目的，標定上特定抗體、核酸探針與各種受體探針與經適當PCR反應或免疫反應前處理之待測物產生特異性結合來做檢測，由於微珠顏色可多至100種，不同類型的探針亦有不同的螢光區別，故可實現高通量高速度的檢驗目的。由於可高通量、快速、精確地同步偵測 100 種不同特定目標物。此技術已被運用於菌種鑑定⁹⁹⁻¹⁰¹、病原體基因型分析^{102, 103}與突變之檢測¹⁰⁴。對於時常需面對多種未知傳染病原的防疫及反生恐單位亦頗具潛在應用性。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¹⁰⁵、*Malassezia species*¹⁰⁶種別及 *Cryptococcus neoformans*種群鑑定¹⁰⁷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¹⁰⁸及9種臨床常見及6種罕見之子囊酵母菌的Luminex技術¹⁰⁹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¹¹⁰。本實驗室亦使用luminex公司的系統(xMAP100)，於95年即開始發展病原菌分子分型檢驗技術，標的包含有常見的27種絲狀真菌鑑定、四種院內感染菌鑑定、砂眼披衣菌血清型分型、鮑氏不動菌屬之鑑定，以及多種院內感染菌的抗藥性基因偵測，在眾多菌種鑑定方法中，16S-23S rRNA ITS序列分析具有低種內變異度(intraspecies diversity)與高種間變異度(interspecies diversity)之優點，故適合作為細菌分類依據之標的^{111, 112}。近年來分子即時偵測鑑定方法的發展不但可提供快速的結果，也可提高檢測的正確性，包括利用LightCycler real-timePCR 方法^{113, 114}及利用寡核苷酸陣列鑑定¹¹⁵系統等。然而，大部分的分子檢測方法皆須經過多試管PCR放大，過程多繁瑣且所需檢體量較多；流式微珠陣列系統，可於一次反應中，同時偵測100種不同的反應強弱並同時鑑別標的，故提供高通量、單管檢測多重標的、快速、高專一性及節省檢體之優點^{15, 116}。目前尚未有利用流式微珠陣列檢測平台多重快速鑑定四種常見院內感染病原菌*S. aureus*，*P. aeruginosa*，*A. baumannii*，*C. albicans*，以及鑑定不動桿菌屬三種species，*A. baumannii*和 genomic species 3及 13TU等相關報告。由於臨床上多重病原混合感染頗常見，如HIV感染、性病感染、重病孱弱免疫低下之患者，故單管多重檢測若能應用於實際臨床檢體之檢測，較諸傳統培養及生化鑑定方法或許更能反映臨床感染之現況。國內晶片技術平台經數年研發以來，各種macro-/microarray乃至lab-on-a-chip技術已漸趨成熟，文

獻上發表各種探針之資訊亦急速成長，因此這類高通量之核酸檢測技術發展應用於快速鑑定致病性真菌應是甚為可行之方向。

各種分子分型(molecular typing)的方法應運而出，除了有助於種別鑑定、病原性、傳播途徑、院內感控、療效追蹤、菌株消長¹¹⁷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¹¹⁸。針對基因序列分型的rDNA序列，分析比對新型隱球菌的ITS1-5.8S-ITS2 region序列中的八個位置的核苷酸 (10, 11, 15,108,(ITS1), 221(5.8S), 298, 346(ITS2))可將新型隱球菌三個變種(varieties)分成7個type (type 1~7)¹¹⁹，各有其全球地理分佈特性。*C. albicans*以25S rRNA基因為標的進行PCR反應，依增幅產物片段大小可分為genotype A(450 bp)，genotype B(840 bp)，genotype C(450 bp and 840 bp)，genotype E(1,400 bp)，*C. dubinienesis* (1,080 bp)¹²⁰。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，依這些特定持家基因locus上alleles的組合樣式形成其特定的序列樣式(sequence type, ST) 以茲比較。MLST具有穩定、鑑別力高、利於實驗室間資料交換比對等優點¹²¹，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¹²²。其他如針對重複性序列DNA的分析，如rep-PCR¹²³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¹²⁴。

常用的全基因體分型方法如RFLP¹²⁵，或RFLP結合探針雜交¹²⁶⁻¹²⁸、被廣泛用來做流病爆發追蹤傳播途徑之調查，堪稱為是流行病學分子分型分析的黃金標準的EK、PFGE^{129, 130}分子分型方法。全部基因組的PCR-fingerprinting尚包括RAPD¹³¹或者是AFLP¹³²，二者除分型外可用於建立菌株相關性及鑑別菌株特殊標記片段。

細菌之抗藥性已成為目前世界性公共衛生之問題¹³³。免疫抑制病人的增加、侵入性儀器的使用以及抗生素日與遽增的消耗，皆促使抗藥性細菌的崛起而造成院內感染。於近二十年中，許多新式及後線抗生素，包括glycopeptides、fluoroquinolones與carbapenems等已陸續開發用以治療抗藥性細菌。然而，methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)、community-associated MRSA (CA-MRSA)、methicillin-resistant *S. epidermidis* (MRSE)、vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE)、carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA)、carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. (CRAB)與ciprofloxacin-resistant (CipR) Enterobacteriaceae等含有可對抗後線抗生素之抗藥性基因，已對全球的公共衛生與醫療方面造成衝擊¹³⁴⁻¹³⁷。

面對抗藥性細菌崛起的挑戰，發展具有快速、靈敏、專一、可多套式與高通量等特性的技術以檢測抗藥性基因實為當務之急。監測細菌之抗藥性基因不但在臨床治療已日顯重要，且可提供未來治療用藥方針之參考。許多利用PCR為基礎以偵測抗藥性基因的方法已經被開發，主要用來預測細菌之抗藥性，但技術層面往往侷限在無法進行多套式分析^{138, 139}。然而，微陣列(microarray)分析雖具有多套式分析之優勢，但其高經費、受限的靈敏度與技術上的複雜性使其無法廣泛應用¹⁴⁰⁻¹⁴²。流式微珠陣列(suspension bead array)提供可同時進行100個多套式分析，此外亦利用寡核苷酸雜交反應與流式細胞儀之特性，提供快速且高靈敏度之優勢⁹¹。於本研究中，我們

發展一多套式聚合酶鏈反應(multiplex PCR)以合成 11 種院內感染細菌之 7 個”後線”之抗藥性基因與*pvl*基因。此外亦利用流式微珠陣列偵測multiplex PCR之產物以鑑定細菌所具有的抗藥性基因。抗藥性基因的檢測不但有助於增加正確治療的機會，對於細菌抗藥性的監測及未來用藥方針亦提供莫大的助益。

多重抗藥性細菌是全世界所共同面臨的問題，臺灣地區受其影響尤其嚴重。近年來快速崛起的多重抗藥性鮑氏不動桿菌 (multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, 簡稱MDRAB) 為最重要的抗藥性革蘭氏陰性菌之一，影響了治療用藥的選擇，對臨床的衝擊甚為嚴重¹⁴³。值得注意的是，受到MDRAB感染的病患若接受無敏感性效果的抗生素治療，在臨床上常具有較高的死亡率¹⁴⁴。自 1991 年美國爆發由 multidrug-resistant *A.baumannii* (MRAB) 所造成的院內感染案例後，其他國家也陸續分離出MRAB¹⁴⁵⁻¹⁴⁷。1998 年五月，臺大醫院自白血病病人身上發現第一株全抗藥性之*A.baumannii*，命名為pandrug-resistant *A.baumannii* (MDRAB)，可抵抗目前所有使用的抗生素，包括 cephalosporins、aztreonam、aminoglycosides 和 ciprofloxacin等²⁴。於 1999 年一月之間也陸續自普通病房的三位病患發現三株以上MDRAB; 1999 年四月後，MDRAB已逐漸擴散至遍佈醫院，其中尤以ICU病房最為嚴重。2002 年十二月，又於台大醫院分離出 15 株具有不同表現型及PFGE型別的MDRAB¹⁴⁸。以上結果顯示出台灣的*A. baumannii*抗藥性問題日趨嚴重，尤其是針對乙內醯胺類(β -lactam)藥物之抗藥性菌株的出現，更增加治療的棘手性。抗生素的合理使用、正確鑑別種別、瞭解病原抗藥性特性及崛起之分子機制，醫院間傳播之流行病學、追溯環境之感染源、施行衛生消毒措施對於控制*Acinetobacter spp.*之感染十分重要¹⁴⁹。

乙內醯胺類 (β -lactam) 抗生素是目前全球使用最廣泛的抗生素，包括

盤尼西林類 (penicillin)、頭孢菌素類 (cephalosporin)、單環胺基類 (monobactams)、碳醯胺機類 (carbapenem) 等。目前台灣的MDRAB除了碳醯胺機類之外，對於其他三類乙內醯胺類抗生素均高達 95% 以上的抗藥性²⁴。不幸的是，MDRAB對碳醯胺機類中的meropenem與imipenem也分別有 92 % 與 38 % 抗藥性，表示未來治療MDRAB可能將面臨無藥可用的窘境；本研究對於台灣臨床鮑氏不動桿菌做了一系列抗藥性分析研究，包含多種常見藥物藥敏測試以及各型抗藥性基因分析，以期對於臨床治療可有所助益。碳醯胺機類目前對於*A. baumannii*曾被提及的抗藥性機轉如下：(1) 細胞外膜通透性降低^{150, 151}；(2) penicillin結合蛋白 (penicillin-binding protein, PBP) 改變¹⁵²；(3) 排出幫浦 (efflux pump) 表現量的增加¹⁵³；(4) 產生 class B metallo- β -lactamase (MBL) 及 class D OXA carbapenemase^{154, 155}。值得一提的是除了外膜的低通透性是內因性機轉，其他的抗藥機轉可能都是因為使用抗生素而誘發的抗藥性機制。

近年來致病菌自外在環境中獲取MBL而抵抗carbapenem已造成治療上相當程度的問題¹⁵⁶。MBL具有高度分解carbapenem的活性，其中以IMP-1與VIM-2為二個最常見的MBL，目前已陸續出現在許多國家中¹⁵⁶⁻¹⁵⁹。至於class D OXA carbapenemase則具有四個亞型，分別為OXA-23、OXA-24、OXA-51與OXA-58，已被證實和*Acinetobacter* spp.的carbapenem抗藥性有關^{145, 154, 160-162}。OXA-51為固有存在於所有的*A. baumannii*中¹⁶¹。然而，*bla*_{OXA-23}和*bla*_{OXA-51}基因的上游常發現一段ISAbal序列，可能作為啟動子而與其下游基因的表現有關^{163, 164}。至於*bla*_{OXA-58}基因的上游則發現ISAbal3的存在，另外也有文獻指出在上游發現其他插入序列，包括ISAbal3-like、ISAbal、ISAbal2與IS18¹⁶⁵。一些文獻指出，對於carbapenem具抗藥性的*Acinetobacter* spp.和外膜蛋白 (outer membrane proteins, OMPs) 的缺失有關，包括CarO、

33-36kDa OMP與OprD亦曾被提及^{150, 166, 167}，但目前尚未有明確的證據解釋這些OMPs的缺失原因。

最近一些國際文獻研究指出，在臨床上所分離的*A. baumannii* 菌株大多為MDRAB，僅對carbapenems類的抗生素具部分敏感性。然而，對於在臨床上分離的*A. genospecies* 3 和 13TU菌株，儘管部分菌株具有MBL對carbapenem具有抗藥性，大部分的菌株對於ciprofloxacin皆具有很高的敏感度^{157, 158}。因此，檢測不動桿菌的ciprofloxacin藥敏試驗對於在臨床上治療不動桿菌感染症提供有助益的訊息。Ciprofloxacin是對於革蘭氏陽性及革蘭氏陰性病原菌具廣效性抗菌活性之一種氟化奎林酮類(Fluoroquinolone)衍生物，尤其在治療呼吸道感染症，更是扮演極重要角色¹⁶⁸。最近臺大醫院統計研究從1991到2003年各種抗生素使用趨勢與抗藥性細菌分佈的相關結果中，ciprofloxacin為一明顯逐年增加使用的抗生素。不幸的是，ciprofloxacin其廣泛抗菌的效果卻也造成許多細菌具有抗藥性。ciprofloxacin在革蘭氏陰性細菌的主要作用目標是結合在DNA旋轉酶(DNA gyrase A, GyrA)上，以抑制細菌DNA的複製。DNA旋轉酶是一個細菌複製DNA過程中所必需的酵素。目前研究ciprofloxacin抗藥性最清楚的機制為DNA旋轉酶(DNA gyrase A, GyrA)的突變，導致藥物與其目標之間的親和力降低而產生抗藥性。許多研究報導在GyrA的quinolone抗藥性決定區(quinolone resistance-determining region, QRDR)發生單一鹼基突變，即可導致細菌對quinolone類的抗生素具有減少敏感性或抗藥性¹⁶⁹。此外，efflux pump表現量的增加也為細菌增加抵抗氟化奎林酮類的抗藥能力^{170, 171}。目前對於*A. baumannii*曾被提及的氟化奎林酮類抗藥性機轉，除了gyrA及parC基因抗藥性決定區的突變¹⁷²⁻¹⁷⁵，efflux pump表現量的增加亦開始被討論^{153, 176}。在MDR的*Acinetobacter. spp*裡，通常都會含有具移動性的多種基因組，稱為轉移子^{177, 178} (integron)，因

其帶有多種酵素基因 (aminoglycoside-modifying enzymes) ，對於 Aminoglycosides類藥物會產生抗藥性，因此相關抗藥性研究亦受到重視。

金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)為革蘭氏陽性球菌，在顯微鏡下之形態常以葡萄串狀聚集。葡萄球菌普遍存在於自然環境中，亦存於人體皮膚表面及上呼吸道黏膜的正常菌叢 (normal flora)，然而仍會造成重病孱弱及免疫低下患者的感染，對象通常為院內術後或重症患者，可引起皮膚、傷口、骨髓炎、肺炎及菌血症的感染。抗甲氧苯青黴素的金黃色葡萄球菌 (MRSA)在 1960 年初次被報告以來¹⁷⁹，就快速的散佈至全世界而造成醫療上的一個大問題。MRSA之產生是經金黃色葡萄球菌獲得一移動性的基因片段，稱為staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)¹⁸⁰，而對 methicillin產生抗性。MRSA可製造一種對 β -lactam類抗生素之親和性都降低的蛋白質，導致MRSA對 β -lactam類抗生素幾乎全具抗性，包含所有青黴素類及頭孢子素類抗生素。同時，大多MRSA菌對不同非 β -lactam類之抗生素亦具抗藥性，包含分子類(如紅黴素)、四環黴素、克林達黴素 (clindamycin)、胺基糖苷類(如gentamicin)、氟化恩甾類(如ciprofloxacin)、及複方磺胺類。近年來日本、美國及其他國家已發現了對使用於治療嚴重MRSA感染病患的最後線抗生素萬古黴素(vancomycin)已具有感受性降低及具抗藥性的菌。雖然近年來已有對MRSA的新抗生素被研發出來，但MRSA仍是全球臨床上極受重視的多重抗藥菌。

Pseudomonas aeruginosa (綠膿桿菌) 在分類上屬於假單胞菌科 (Pseudomonadaceae) 之假單胞菌屬 (Pseudomonas)，此菌屬種類高達 140 種以上，大部分為腐生菌或能導致植物病害，約有二十五種會感染人類，但多屬伺機性感染。綠膿桿菌是本屬之中研究最多最重要的院內感染致病菌。能伺機感染任何部位，如燒傷處傷口、角膜、尿道及肺部等，並引起

細菌性心內膜炎及腸胃炎。引起敗血症，死亡率超過 80%，引起肺炎死亡率甚高，尤其是白血病患者。因為它的外型呈棒狀，所以在 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 中把它分類在 Aerobic Gram-Negative Rods and Cocci 部門中。綠膿桿菌的致病機制為：綠膿桿菌經由傷口或呼吸道黏膜黏膜組織入侵宿主後，首先利用菌體表面的纖毛附著於細胞表面，菌體開始生長、繁殖，同時分泌許多毒素以及蛋白水解酵素。例如蛋白質水解酵素不斷分解有免疫抗菌作用的血清蛋白，再加上內毒素的影響使感染綠膿桿菌的死亡率高於其他常見的伺機性感染細菌，除此之外，他的高抗藥性源自於本身的抗藥能力以及感染過程中形成的生物膜，以侵襲囊性纖維變性 (cystic fibrosis) 為例，即使施以長期抗生素治療，綠膿桿菌仍能存活於病患體內，學者研究發現是由於綠膿桿菌的相位變異的蛋白質 PvrR (phenotype variant regulator)，主宰綠膿桿菌在具抗藥性及不具抗藥性變異種間的轉換頻率，使抗藥性菌株高頻率增生，才會使綠膿桿菌成為醫院中極為棘手的致病菌。

為求對於鮑氏不動桿菌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 maps¹⁸¹。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¹⁸²，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^{183, 184}。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*A. 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，以期解決嚴重抗藥性所造成的醫療問題，並求在學術上及實務應用上有所突破和貢獻。

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

二、材料與方法：

(一)、菌株來源及培養：

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

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

共 55 株 *Acinetobacter* spp. 臨床菌株由台大醫院提供，分離年代為 2005 年，大部分從血液與痰分離，經 API20NE system 鑑定皆為 *Acinetobacter* spp.。利用 ITS 序列鑑定菌種，鑑定出共 34 株 *A. baumannii*、10 株 genospecies 3 與 11 株 genospecies 13TU。全部的 *Acinetobacter* 菌株皆培養於 Mueller-Hinton 固體培養基中，於 37°C 培養 20 小時。共 81 株 *Acinetobacter* spp. 臨床菌株來源由台大醫院提供，分離年代為 2005 年，經 API20NE system 鑑定皆為 *Acinetobacter* spp.。另外利用 ITS 序列鑑定菌種。

菌株來源除了自生物資源研究及保存中心(BCRC)購買的標準菌株外尚有與醫院合作收集之臨床分離株：金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 13 株、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) 6 株、糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) 9 株，腸球菌 (*Enterococcus faecium*) 9 株、綠膿桿菌 (*P. aeruginosa*) 10 株、不動桿菌(*Acinetobacter* spp.) 10 株、克雷伯氏肺炎菌(*Klebsiella pneumoniae*) 6 株、產酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) 4 株、大腸桿菌(*Escherichia coli*) 4 株、產氣腸桿菌(*Enterobacter aerogenes*) 4 株與陰溝腸桿菌(*Enterobacter cloacae*) 5 株。所有菌株皆以 TSA (tryptone soy agar) plate 作分離培養。並以經 API 20 NE system 方法加以鑑定，確認種別。

真菌菌株來源念珠菌屬 *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(1997-2006)全省 25 家醫院時間分離菌株共 201 株。*C. parapsilosis* 為台大醫院 2002 至 2003 年間，由 71 位病人中所分離出之 97 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。

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。菌株之分離培養採用 Sabouraud dextrose agar (SDA)。菌株之型態及生理生化鑑定採用發芽管試驗 Germ-tube assay，

接著採用常用之 API-32 或 VITEK2 酵母菌生化卡片自動鑑定系統。

(二)、真菌分離株 DNA 的萃取：

真菌分離株培養後用 PUREGENE DNA Purification Kit (Gentra, Minneapolis, Minnesota, USA) 萃取 DNA。簡言之，在 SDA 上培養 2~3 天後，取兩個接種環的真菌量攪散於 2ml PBS 內，加入 10-15 μ l 分解酵素，置於 37°C 過夜。13,000 x g 離心 3 分鐘之後，去除上清液；加入 2 ml Cell Lysis Solution，將細胞胚累沖散以達到分解細胞的效果。之後加入 1 ml Protein Precipitation Solution，高速震盪 20 秒；13,000 x g 離心 10 分鐘。取上清液加入 100% 異丙醇使 DNA 沉澱；以 70% 酒精洗過後，加入 50 μ l DNA Hydration Solution 溶 DNA。以 A_{260} 測 DNA 的質量，保存於 -80°C。絲狀真菌以 Sabouraud dextrose broth 培養於 25°C 培養箱，直到菌絲體長出後萃取 DNA。將菌絲體加入含有 300 mg 的 glass beads (Biospec Products, Bartlesville, Okla.) 及 600 μ l 的 Tissue and Cell Lysis Solution 的 2 ml screw cap tube 後放入 Mini-Beadbeater 以 4,200 rpm 轉速，振動 5 分鐘破壞細胞，然後將細胞懸浮液取至 1.5 ml centrifuge tube 以 MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, Wisconsin) 萃取 DNA。以分光光度計測 DNA 的質量，後保存 -80°C。

(三)、細菌分離株 DNA 萃取：

細菌菌株經過隔夜培養後，以無菌移殖環挑取菌體。綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和 鮑氏不動桿菌 (*Acinetobacter baumannii*) 菌株用 QIAamp DNA mini kit 抽取 DNA。金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 用 PUREGENE DNA Purification Kit (Gentra, Minneapolis, Minnesota, USA) 萃取 DNA。加入含有 lysozyme (終濃度 2.5mg/ml) 之細胞懸浮緩衝液中，37°C 培養隔夜後，加入 1ml 的 cell lysis Solution，將細胞胚累沖散以達到分解細胞的效果。之後加入 340 μ l Protein Precipitation Solution，高速震盪 20 秒；13,000 x g 離心 10 分鐘。取上清液加入 100% 異丙醇使 (Isopropanol) DNA 沉澱；以 99% 酒精洗過後，加入 50 μ l water 溶解 DNA，以分光光度計測 DNA 的質量，後保存於 -30°C。

(四)、抗藥性基因之分析與多種抗藥性基因之聚合酶鏈反應：

抗藥性基因分析所使用的引子與對應的標的如(表十一)所示。在 GyrA 中，與 quinolone 抗藥性相關的 quinolone 抗藥性決定區 (the relative quinolone resistance-determining region, QRDR) 等同於 *E. coli* GyrA 中的第 83 個胺基酸，即對等 *gyrA* 基因的第 247-249 個核苷酸序列。設計兩條簡併性引子 (degenerate primers)，GyrA-F 和 GyrA-R，以合成 11 種院內感染細菌之 *gyrA* 基因部分片段。放大的 *gyrA* 片段直接定序以鑑定 QRDR。設計其他基因的專一性引子，包括針對 MRSA 和 MRSE 的 *mecA* 基因、CA-MRSA 的 *pvl* 基因、VRE 的 *vanA* 基因、CRPA 和 CRAB 的 *bla_{IMP}* 與 *bla_{VIM}* 基因以及 CRAB 的 *ISAbal-bla_{OXA-23}* 與 *ISAbal-bla_{OXA-51-like}* 基因，以合成對應之產物。PCR 反應與下列的多套式聚合酶鏈反應 (multiplex PCR) 相同，將於下列加以描述。Multiplex PCR 可以同時合成放大 11 種院內感染細菌之 7 個抗藥性基因與 *pvl* 基因。此外，兩條 25-bp 長的巢式引子，Nest-1 和 Nest-2，設計於每個引子的 5' 端，以統一 multiplex PCR 過程時的黏合溫度。Multiplex PCR 反應總容積為 20 μ l，內含 10ng

細菌的 chromosome DNA, 2 μ l 的 10X PCR buffer, 5 mM MgCl₂, 250 μ M dNTP, 1 U Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 1 μ M GyrA-F, 1.5 μ M GyrA-R, 250 nM Nest-1 與 Nest-2 及 50 nM 的其他引子。Multiplex PCR 的反應初始以 95°C 2 分鐘, 10 次循環的變性反應 95°C 1 秒→黏和 40°C 5 秒→72°C 10 秒的聚合延長反應, 之後再進行另一 30 次循環的變性反應 95°C 1 秒→60°C 15 秒的黏合與延長反應。最後的 PCR 產物保存於 4°C。

(五)、流式微珠陣列檢測：

1. 引子及探針之設計及合成：

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

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

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

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

2. 真菌 ITS3&ITS4 之聚合酶鏈反應(PCR)

以 ITS3 (5' GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC 3') 和 ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') 引子對增幅 ITS 2 (internal transcribed spacer) 區域, PCR 反應, 總容積為 50 μ l, 內含 10 ng 待測 DNA, 25 μ l 2X Master Mix (Fermentas), 及 50 nM of ITS3 (forward primer), 200 nM of ITS4 (reverse primer), , 其餘加蒸餾水混勻。反應初始以 95°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 μ l, 內含 1 μ l 的細菌 chromosome DNA (concentration < 10² μ g/ml), forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l (10 μ M), 22 μ l 純水, 25 μ 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. 鏈結固定化探針於微珠上：

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

6. 增幅產物與探針專一性雜交：

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

(六)、流式微珠陣列檢測之靈敏度測試：

抽取標準菌株 DNA 以十倍序列稀釋，濃度由 $10 \mu\text{g/ml}$ 至 10pg/ml ，由其中取 $1 \mu\text{l}$ 做為 template DNA 進行流式微珠陣列檢測，實驗流程如(圖五)。

(七)、微珠陣列反應成本估算

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

(八)、抗生素感受性試驗

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

(九)、gyrA 基因之即時聚合酶鏈反應 (Real-time PCR)：

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

(十)、分析 carbapenemase 相關基因

利用 PCR 合成 carbapenemase 相關之基因，包括 *bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{OXA-23}、*bla*_{OXA-24}、*bla*_{OXA-51} 與 *bla*_{OXA-58}。分析在 *bla*_{OXA-51} 與 *bla*_{OXA-58} 基因上游之插入序列則使用一端為 *bla* 基因的引子，另一端為插入序列的引子，包括 *ISAbal*、*ISAbal2* 或 *ISAbal3*，再利用 PCR 合成。利用 E-test MBL (AB Biodisk, Solna, Sweden)以分析菌株是否具有 MBL 活性。

(十一)、脈衝式電泳分析(PFGE)及 *ApaI* 限制酶切片段分析：

將菌溶於TE buffer (10mM Tris-HCl、1mM EDTA pH8.0) 溶液中，利用濁度計 (Vitek colormeter) 調整菌量至 15 %T，取菌液 300 μ L 將此溶液與預熱 56 $^{\circ}$ C 之 300 μ L洋菜膠溶液 (1.2% SeaKem Gold agarose/1% SDS) 混合，注入模型內待凝結，取出置於 5 mL Cell Lysis Buffer (50mM Tris-HCl、50mM EDTA、1% sarcosine、0.15mg/mL proteinase K) 溶液內，置於 54 $^{\circ}$ C 水浴震盪約 2 小時後、倒掉此溶液終止反應，並開始清洗已包埋菌體chromosomal DNA的洋菜膠塊 (plug)，清洗步驟如下所述，用 15 mL ddH₂O 54 $^{\circ}$ C 水浴震盪 15min後倒掉溶液，重複此步驟一次，再以 15 mL TE buffer 54 $^{\circ}$ C 水浴震盪 15min清洗，重複此步驟四次，分別以 10U *ApaI*¹⁸⁵ 來進行限制酶切割反應。利用脈衝電泳分析，經酵素切割後的plug置入 1% SeaKem Gold agarose，在 0.5 倍TBE緩衝液中以 2-20 秒的轉換時間，旋轉角度 120 度，溫度 14 $^{\circ}$ C，電場 6V/cm，進行 20 小時後經ethidium bromide 染色觀察DNA條帶，使用數位照相系統拍照儲存後，以影像分析系統BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) 比對分析。

(十二)、反轉錄聚合酶鏈反應 RT-PCR

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

16sRNA forward : 5'-GGCCTTATGGTTGTAAAGCAC-3'

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

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

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

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

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

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

(十三)、imipenem 水解試驗

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

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

1. 外膜蛋白萃取

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

2. SDS 膠體電泳

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

120 伏特電壓直至實驗完成。

3. 銀染分析(Silver stain)

以 silver stain 染色[30 分鐘 fixing(酒精 100 ml、醋酸 25 ml、水 125 ml)，30 分鐘 sensitizing(酒精 75 ml、醋酸鈉 17 克、水 163.75 ml、sodium thiosulphate 10 ml，25% glutardialdehyde 1.25 ml)，清洗三次，銀染(silver nitrate 2.5%)，清洗，呈色(sodium carbonate 120 mM)，停止反應(EDTA-Na₂·2H₂O 50 mM)。]，分析各菌株膜蛋白之異同。

(十五)、質譜儀分析

1. 退染

針對膠體電泳分析後有差異之蛋白，作酵素切割之後以質譜儀分析。首先以二次水清洗膠體，將有興趣的蛋白以小刀片或是吸管尖頭(tip)挖取下來，放入微量離心管中，加入 100μl 的退染溶液(50mM sodium thiosulfate, 15 mM potassium ferricyanide)直到咖啡色褪去，接著移除退染溶液加入 100μl CH₃CN 反應 8 分鐘，重複此二步驟，使用真空抽乾儀將膠塊抽乾。

2. 烷基化(Reduction/Alkylation)

加入 100μl 的 10 mM DTT 水溶液於 57°C 至少反應一小時，之後移除 DTT 溶液加入 100μL 55 mM Iodoacetamide solution 在室溫避光反應一小時，以 100μl 25 mM 的 ammonium carbonate 清洗 8 分鐘，移除清洗溶液後用 CH₃CN 將膠塊脫水，此二步驟重複兩次，移除溶液後真空抽乾。

3. 膠體內水解(In gel digestion)

加入足夠覆蓋過膠塊的 trypsin 溶液(12ng/μl trypsin /25 mM ammonium carbonate solution)於 30°C 反應隔夜。加入 5μl CH₃CN/H₂O/HCOOH，隔水超音波震盪 10 分鐘，即可離心取上清液作 MALDI MS 分析，或是離心後加入 10-20μl 的 CH₃CN/H₂O/HCOOH，利用真空抽乾後，做 ES-LC/MS/MS 分析。

(十六)、oprD 基因分析與 accession number

下列引子為利用 PCR 合成完整 oprD 基因的引子：

oprD forward：5'- ATGCTAAAAGCACAAAACTTAC-3'

oprD reverse：5'- TTAGAATAATTTACAGGAATATC-3'

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

(十七)、真菌脈衝式電泳(PFGE)及 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¹⁸³。以 IS-1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Calif.) 之照相系統照相並存取圖形。利用 Bionumerics 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) 分析軟體擷取影像檔，並且以樹狀圖比較各菌株間之類緣關係。位置差異範圍在 1% 可忍受，而最佳化是設在 3%。使用擲骰子係數(Dice Coefficient)去分析片段相似

度(S_{AB})，樹狀圖分析採用UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic average)的方式。當分離株片段相似度小於 95%時，被認為是不同的PFGE genotypes。

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

1. 病原酵母菌及持家基因

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

2. PCR反應

以 PTC-200 96-well thermal cycler (MJ Research)進行 PCR 反應。*Candida albicans* 反應試劑包含 2 μ l DNA(10ng/ μ l), 4 μ l primer(5 μ M), 10 μ l distilled water, 及 TEMPLY PCR kit (LTK BioLaboratories)。反應條件為 94°C, 2 min denature, 接著進行 25 cycle 94°C, 1 min→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 μ l, 內含有 10ng DNA、每種 primer 50pmol、1.25U Taq DNA polymerase、5 μ l 的 10X buffer 及 200 μ M deoxynucleoside triphosphate。PCR 反應條件為 95°C, 5min denature, 接著進行 30 cycle 93°C, 30S→依據增幅基因片段的的不同, 黏合溫度範圍從 50-57°C 不等, 1min→72°C, 1min 的反應, 最後為 72°C, 4min 的反應。反應試劑包含 6 μ l DNA(10ng/ μ l), 2 μ l primer(5 μ M), 5 μ l distilled water, 及 TEMPLY PCR kit (LTK BioLaboratories)。反應條件為 94°C, 7 min denature, 接著進行 30 cycle 94°C, 1 min→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)。

(十九)、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-GGCGGAATACAAATACTACTTACCT-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 min¹⁸⁶。M13 屬於 minisatellite 分型方式, 所使用的 primer 為 M13 (5-GAGGGTGGCGGTTCT-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。

(二十)、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。

(二十一) 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。

(二十二) 鮑氏不動桿菌菌株與質體

2006 年由台大醫院提供共 75 株臨床鮑氏不動桿菌屬(*Acinetobacter*.spp)菌株，所有菌株皆以 16s rRNA 序列定序確認其種名(species)，另有及鮑氏不動桿菌標準菌株 ATCC15151 和大腸桿菌(*Escherichia coli*) Top10 菌株為實驗材料。Invitrogen 之質體 pCR2.1-TOPO 為基因複製用質體，pAT801 由巴斯德實驗室提供，作為穿梭質體，可於大腸桿菌以及鮑氏不動桿菌中複製表現，個臨床菌株以及轉殖菌株都有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)。

(二十三) ISAbal-blaOXA-23 以及 ISAbal-blaOXA-66 基因複製

ISAbal-blaOXA-23 以及 ISAbal-blaOXA-66 基因分別由菌株 6AB15、6AB11 中增幅得到，引子如附表，增幅條件如下：初始以 95°C 反應 2 分鐘，35 次循環的變性反應為 95°C 10 秒 \rightarrow 黏和 50°C 10 秒 \rightarrow 72°C 130 秒聚合延長反應，最後 72°C 一分鐘後結束。增幅的產物黏接至 pCR2.1-TOPO 後，再以酵素剪切至 pAT801 質體上，利用電穿孔方式導入至鮑氏不動桿菌標準菌株 ATCC15151 中，以抗生素培養基挑選並確認轉殖株。

(二十四) SDS-PAGE 分析

挑選臨床菌株以及轉殖株在 37°C 培養隔夜，離心後收集菌株以超音波震盪打破細胞，取上清液(細菌全蛋白)，經過蛋白定量後以 SDS-PAGE 分析，結果如圖十五。

三、結果：

(一) 微珠陣列測試鑑定絲狀真菌

1. 探針專一性

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

2. 敏感性與再現性分析

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

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

3. 多重菌種混合偵測

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

4. 微珠陣列系統運用於臨床檢體之可行性

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

(二) 微珠陣列測試鑑定常見院內感染菌

1. 探針設計與專一性測試

(表三)為本實驗中所使用的臨床菌株數目以及相對應的標準菌株。(表四)則為所使用的兩對引子，分別針對真菌病原菌以及細菌病原菌，同時使用於單管聚合酶反應中。(圖四)為multiplex pcr的電泳膠圖，分別針對單一的病原菌以及兩種病原菌混合的反應，電泳膠圖中 lane 2 為單一 *C. albican*, lane 3 為 *A. baumannii*, lane 4 為 *P. aeruginosa*, lane 5 為 *S. aureus*, lane 6 則是 *C. albican* 加上 *A. baumannii*, lane 7 為 *C. albican* 加上 *P. aeruginosa*, lane 8 為 *C. albican* 加上 *S. aureus*, lane 9 為 *A. baumannii* 加上 *P. aeruginosa*, lane 10 為 *P. aeruginosa* 加上 *S. aureus*, lane 11 為 *A. baumannii* 加上 *S. aureus*。由圖中可清楚看見相對應的基因片段皆有正確的被放大出來，經過純化的步驟後再進行微珠陣列測試。

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

結果)。

(三) 流式微珠陣列鑑定 11 種院內感染細菌之抗藥性基因

1. 院內感染細菌之藥敏測試與抗藥性基因檢測

11種院內感染細菌之藥敏測試與檢測之抗藥性基因如表三至表五所示。表三列出4種革蘭氏陽性菌，包括*S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. faecalis*與*E. faecium*。在7株 *S. aureus* (ATCC 29213、ATCC6538、ATCC6538P、Sa1、2、9和10)中，具有野生型QRDR(wild-type QRDR, wtQRDR) (Ser83, TCA)皆對ciprofloxacin敏感(CipS)，然而其他5株(Sa3-6和Sa8) 具有突變型QRDR(mutant-type QRDR, mtQRDR) (Leu83, TTA)則皆對ciprofloxacin具有抗藥性(CipR)。Sa7為唯一CipR *S. aureus*的菌株且具有wtQRDR；此抗藥性產生可能由其他機制所導致，例如topoisomerase IV的ParC亞基發生突變與efflux pumps的作用。此外，全部的*S. aureus*菌株皆對vancomycin敏感，而8株(Sa1-Sa8)含mecA 對oxacillin具抗藥性則判定為MRSA。Sa1和Sa2兩菌株包含mecA與pvl則判定為CA-MRSA。在*S. epidermidis*中，ATCC 14990和2株臨床菌株(Se2和5) 具有wtQRDR (Ser83, TCT)皆為CipS，而3株菌株(Se1、3和4)具有mQRDR (Tyr83, TAT)或(Phe83, TTT)則皆為CipR。本研究全部的*S. epidermidis*菌株皆對vancomycin敏感，而4株菌株(Se1、3、4和5)含mecA對oxacillin具抗藥性則判定為MRSE。在*E. faecalis*中，ATCC 19433與5株菌株(Efas2-6)具有wtQRDR (Ser83, AGT)為CipS，而3株CipR菌株(Efas1、7和8)則包含mtQRDR (Ile83, ATT)。在*E. faecium*中，3株菌株(Efam4、7和8)含mtQRDR (Ile83, ATT)與Efam3含另一種mtQRDR (Arg83, AGG)皆為CipR。然而ATCC 19434與Efam2雖含有wtQRDR，但卻為低

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

表四列出*P. aeruginosa* 和 *Acinetobacter* spp. 菌株的特性。在*P. aeruginosa*中，全部的CipS菌株皆含有wtQRDR (Thr83, ACC)，反之其他4株菌株(Pa2、4、5和6)含mtQRDR (Ile83, ATC)則為CipR。Pa4菌株含blaVIM則判定為CRPA，反之Pa2菌株缺乏blaIMP或blaVIM則對imipenem為中間性(MIC = 12 mg/L)。在*Acinetobacter* spp.中，全部的CipS菌株皆包含wtQRDR (Ser83, TCA)，而全部具有mtQRDR (Leu83, TTA)的菌株則為CipR。Aci5菌株為唯一具有另一種mtQRDR (Phe83, TTT)的菌株且對ciprofloxacin為中間性(MIC = 3 mg/L)。此外，Aci1 (包含ISAbal-blaOXA51-like) 和 Aci2 菌株 (包含 ISAbal-blaOXA23 與 ISAbal-blaOXA51-like) 皆對imipenem具抗藥性。Aci3 (包含blaIMP)和Aci4菌株(包含blaVIM)亦皆對imipenem具抗藥性。然而，Aci5和Aci6菌株分別包含blaVIM與ISAbal-blaOXA23則對imipenem為中間性 (MIC = 8-12 mg/L)。以上包含 blaIMP、blaVIM、ISAbal-blaOXA23 與 ISAbal-blaOXA51-like的所有*Acinetobacter* spp. 菌株皆判定為CRAB，即使其中有部分僅對imipenem為中間性。

表五列出5種常見院內感染之腸道菌(*Enterobacteriaceae*)，包括*K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*E. coli*、*E. aerogenes*和*E. cloacae*的菌株特性。在*K. pneumoniae*中，全部CipS菌株皆包含wtQRDR (Ser83, TCC)，而其他2株CipR菌株(Kp1和2)則含有mtQRDR (Ile83, ATC)。全部的*K. oxytoca*

和*E. aerogenes* 菌株皆分別含wtQRDR (Thr83, ACT)及(Thr83, ACC)且為CipS。在*E. coli*中，ATCC13048菌株含wtQRDR (Ser83, TCG)為CipS，反之其他3株菌株(Eco1-3)具有mtQRDR (Leu83, TTG) 則為CipR。全部的CipS *E. cloacae*菌株包含 wtQRDR (Ser83, TCC)，而Ecl4為唯一的CipR菌株具有mtQRDR (Tyr83, TAC)。由以上結果得知，這些院內感染細菌所包含的抗藥性基因與其所對應的抗藥性呈高度正相關。

2. 流式微珠陣列鑑定

實驗流程如圖五，利用流式微珠陣列以鑑定11種院內感染細菌之7個抗藥性基因與pvl基因之multiplex PCR產物，如圖六至圖八所示。欲鑑別gram-positive和gram-negative細菌，與區分11種院內感染細菌gyrA的wtQRDR和mtQRDR，在ASPE引子的5'端設計4種不同的ZipCode來區分下列4種gyrA的QRDR：gram-positive細菌的wtQRDR (GP-gyrA-S)、gram-positive細菌的mtQRDR (GP-gyrA-R)、gram-negative細菌的wtQRDR (GN-gyrA-S)與gram-negative細菌的mtQRDR (GN-gyrA-R)。在gram-positive細菌中，利用此技術可有效鑑定*S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. faecalis*和*E. faecium* gyrA的QRDR，MRSA和MRSE的mecA，CA-MRSA的pvl與VRE的vanA，然而只有Efam3菌株的gyrA具有一個突變在QRDR的第3個鹼基上(Arg83, AGG)，故無法由GyrA-R1 APSE引子所偵測，如圖九所示。圖七展示此技術可鑑定*P. aeruginosa*與*Acinetobacter* spp. gyrA的QRDR，以及分別偵測blaIMP、blaVIM、ISAba1-blaOXA-23與ISAba1-blaOXA-51-like的存在。僅Aci5菌株無法由GyrA-AbR ASPE引子偵測，因其具有一個突變在QRDR的第3個鹼基上(Phe83, TTT)。該技術亦可鑑別5種Enterobacteriaceae，包括*K.*

pneumoniae、*K. oxytoca*、*E. coli*、*E. aerogenes*和*E. cloacae* gyrA 的 QRDR，除了 Ecl 菌株包含另一個 mtQRDR (Tyr83, TAC) 無法藉由 GyrA-R5 ASPE 引子所偵測，如圖八所示。此外，所使用的 ASPE 引子之間無明顯的交叉性反應，顯示該技術對於同時偵測多重標的物具有高度的專一性。

表六顯示此技術對於偵測 7 個抗藥性基因與 pvl 基因的靈敏度，實驗 DNA 濃度範圍介於 5 到 1000 pg/μl。結果顯示偵測 GP-gyrA-S、GN-gyrA-S、GN-gyrA-R、vanA 與 pvl 具有低於 5 pg/μl 之較高的靈敏度。偵測 mecA、blaIMP、blaVIM、ISAba1-blaOXA-23 和 ISAba1-blaOXA-51-like, 的靈敏度則分別介於 100-500、100-500、5-10、10-50 和 100-500 pg/μl 之間。然而，偵測 GP-gyrA-R 之靈敏度僅介於 500-1000 pg/μl。

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

1. Real-time PCR 分析臨床 55 株不動桿菌

比對四個 *Acinetobacter* spp. gyrA 基因的序列，分別為：*A. baumannii* SDF (CU468230)、MDR *A. baumannii* AYE (CU459141)、*A. genospecies* 3 (AY204699) 與 *A. genospecies* 13TU (AY204701)。依上述比對結果，設計合成 gyrA 基因所使用的引子與探針：引子：Ab-GF (5'-ACAAGAAATCTGCCCCGT-3')、Ab-GR (5'-CGAAGTTACCCTGACCATC-3'); 探針：Ab-FL3 (5'-CATGGTGACTCAGCTGTTT-3'-fluorescein)、Ab-LC3 (5'-Red640-GAAACCATTTGTWCGTATGGCTCA-3'-phosphorylated)，此引子可利用 PCR 反應增殖出長 145 個鹼基的 gyrA 基因部分片段(圖九)。

針對收集的臺大醫院 55 株臨床 *Acinetobacter* spp. 進行 Real-time PCR 分析。利用已設計的探針 Ab-FL3 和 Ab-LC3，可將 gyrA 基因的

QRDR藉分析Melting curve區分為47、50和52°C的T_m值(圖十)。其中31株 *A. baumannii* 的T_m值鑑定為47°C。然而3株 *A. baumannii*、6株 genospecies 3 以及11株 genospecies 13TU的T_m值分別鑑定為52°C。此外，4株 genospecies 3的T_m值鑑定為50°C。

2. *gyrA* 基因定序分析及 ciprofloxacin 藥敏試驗

為確定 Real-time PCR 的鑑定結果之正確性，將該55株臨床 *Acinetobacter* spp. 的 *gyrA* 基因定序及進行對 ciprofloxacin 之感受性試驗。表七顯示大部分的(91%，31/34株) *A. baumannii* 在 *gyrA* 胺基酸序列中第83個胺基酸皆由 Ser 突變為 Leu (Ser83→Leu83)，且該全部菌株對於 ciprofloxacin 具抗藥性(MIC \geq 4 mg/L)；然而，其他3株 *A. baumannii*、10株 genospecies 3 以及11株 genospecies 13TU 在 *gyrA* 胺基酸序列中第83個胺基酸則 Ser83，且皆對於 ciprofloxacin 具有敏感性(MIC < 4 mg/L)。這些結果和 Real-time PCR 的結果具有高度一致性：大部分對 ciprofloxacin 敏感性的 *Acinetobacter* spp. 菌株，其T_m值為52°C；然而全部對 ciprofloxacin 有抗藥性的 *Acinetobacter* spp. 菌株，其T_m值皆為47°C。除此之外，另外4株對 ciprofloxacin 敏感的 genospecies 3，由於在第264個核酸具有一個A的鹼基，故其T_m值為50°C。因此，利用 Real-time PCR 分析 *gyrA* 基因的 QRDR 可有效的鑑定 *Acinetobacter* spp. 菌株對於 ciprofloxacin 是否具有抗藥性。

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

1. Carbapenemase 相關基因之偵測

針對收集的臺大醫院81株臨床 *Acinetobacter* spp. 進行分析，其中含53株 *A. baumannii*、13株 genospecies 3 以及15株 genospecies 13TU (表

八)。偵測carbapenemase相關基因，除了 bla_{OXA-51} 基因外，其他包括 bla_{IMP} 、 bla_{VIM} 、 bla_{OXA-23} 、 bla_{OXA-24} 與 bla_{OXA-58} 等皆不存在於任何*A. baumannii*菌株中。大部分(88.7%，47/53菌株)的*A. baumannii*菌株具有IS*Aba1*- bla_{OXA-51} 結構，對於imipenem具有減少敏感性甚至抗藥性(MICs = 2-32 mg/L)。然而，不具有IS*Aba1*在 bla_{OXA-51} 基因上游的其他6株*A. baumannii*，對於imipenem有較高的敏感度(MICs = 0.5-1 mg/L)。另外在13株genospecies 3以及15株genospecies 13TU中，只有 bla_{IMP} 、 bla_{VIM} 、與 bla_{OXA-58} 等carbapenemase相關基因被測出。全部4株抗imipenem的genospecies 3皆含有一個 bla_{IMP} 基因。共1株含 bla_{IMP} 基因的genospecies 13TU對imipenem有抗藥性，而兩株含 bla_{VIM} 基因的genospecies 13TU則對imipenem敏感性。全部7株含MBL基因的*Acinetobacter* spp.皆具有一個 bla_{OXA-58} 基因。

2. MBL 的分析

進一步分析該7株含MBL基因之*Acinetobacter* spp.。PFGE的結果顯示此7株*Acinetobacter* spp.為非同源的菌株(圖十一)。由定序結果發現，在 bla_{OXA-58} 基因的上游部分只有一個IS*Aba3*結構，而 bla_{IMP} 與 bla_{VIM} 也分別被鑑定為 bla_{IMP-1} 與 bla_{VIM-11} 基因(表九)。E-test MBL的結果顯示，5株具 bla_{IMP-1} 基因的菌株(No.1-5)皆對imipenem有抗藥性，且當EDTA的存在下，對imipenem的MIC有明顯減少的情況發生。然而，兩株具 bla_{VIM-11} 基因的菌株(No.6和7)對imipenem敏感，但是由E-test MBL的結果顯示未受到EDTA的影響(圖十二)。

3. Imipenem 水解活性分析

欲比較含 bla_{IMP-1} 與 bla_{VIM-11} 基因的菌株間在E-test MBL結果的差異性，備製該7株含MBL基因之*Acinetobacter* spp.的全細胞萃取物以測量

對Imipenem的水解活性，同時也測試受EDTA的抑制效果(表九)。具 *bla*_{IMP-1} 基因的5株菌株(No.1-5)具有明顯的imipenem水解活性(499-1001 nmol/min/mg of protein)，且在EDTA存在下該水解活性明顯受到抑制(1.06-2.32 nmol/min/mg of protein)。然而，具 *bla*_{VIM-11} 基因的2株菌株(No.6和7)，其imipenem水解活性明顯較低(0.48-0.84 nmol/min/mg of protein)，而在EDTA的存在下無法測得。此外，經由RT-PCR的結果發現，該7株含MBL基因之 *Acinetobacter* spp. 的 *bla*_{VIM-11} 和 *bla*_{OXA-58} 基因似乎沒有表現(結果未呈現)。

4. 外膜蛋白分析

欲研究為何No.7對imipenem的MIC大於No.6儘管具有相同的 *IS**Aba3*-*bla*_{OXA-58} 和 *bla*_{VIM-11} 基因，我們分析三株genospecies 13TU的外膜蛋白(圖十三)。六個條紋，編號從A到F，自膠體中切下並進行後續LC-MS/MS分析。(表十)顯示自LC-MS/MS肽鑑定結果。依據NCBI資料庫，條紋A鑑定為OprD-like (CAM88440)，條紋B和C鑑定為OmpA (ABO13246)，條紋D鑑定為34 kDa OMP (CAJ01528)，而條紋E和F則分別鑑定為CarO (ABG27025和ABR68804)。

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

5. 菌株以及定序

75株臨床菌株經過定序確認(使用引子如表十一)，共53株*A. baumannii* (n=53)，20株，*Acinetobacter* genospecies 13TU (n=20),以及 *Acinetobacter* genospecies 3 (n=2)，其抗藥性測試結果如表十二，帶有的抗藥性基因整理如表十三。

6. Fluoroquinolones

85%(45/53)的*A.baumannii*對於fluoroquinolones具有抗藥性，他們在GyrA基因上都有在第83的氨基酸位置上發生Serine突變為leucine的情況，僅有一株ciprofloxacin-resistant分離株對於levofloxacin是敏感性菌株的*A.baumannii*同樣也帶有83的氨基酸位置上發生Serine突變為leucine。約55%(24/44)的GyrA突變 *A.baumannii*同時也對levofloxacin具有抗藥性，大部分的genospecies13(18/20)對於ciprofloxacin是具有敏感性的，GyrA基因也沒有發生突變，而兩株species 13TU則對於ciprofloxacin是具有抗藥性的，在GyrA基因上第83個位置發生leucine以及phenylalanine的突變。

7. Aminoglycosides

75株臨床菌株裡面偵測到了六個不同的抗藥性整合子(integron)，這些整合子中帶有不同抗 aminoglycoside的基因，列於表十三中，28%的*A.baumannii*對於amikacin有抗藥性，81%對於gentamicin有抗藥性，以及75%對於tobramycin有抗藥性。在*Acinetobacter* genospecies 13TU的二十個菌株中有五株帶有基因整合子，但有些仍對aminoglycoside類的藥物有些敏感性，而在genospecies 3的菌株中則無發現整合子的存在，對於aminoglycoside類的藥物也仍都是具有敏感性的。

8. Cephalosporins

83% 以及 79% 的 *Acinetobacter baumannii* 對於 ceftazidime 以及

cefepime具有抗藥性，且這些抗藥性菌株通通都具有IS*Aba1*-*bla*_{AmpC}這個基因組，有八株*A.baumannii* 僅具有對於*bla*_{AmpC}這個基因缺乏IS*Aba1*插入序列，對於ceftazidime就呈現敏感性的藥敏結果。

9. Carbapenems

45%的*Acinetobacter baumannii* 對於以及meropenem具有抗藥性，抗藥性菌株中的88%則帶有IS*Aba1*-*bla*_{OXA-51-like}的基因結構組，此基因組與抗藥性具有高度的相關性。在genospecies 13TU的菌株中，有五株帶有IS*Aba3*-*bla*_{OXA-58-like}的基因結構組，其中一株對於carbapenem類藥物具有敏感性，且沒有偵測到其他任何的carbapenem類抗藥性基因的存在，其他四株則帶有其他抗藥性基因例如*bla*_{VIM-11} 以及*bla*_{-imp-1}，故對於carbapenem類藥物具有抗藥性或者低敏感性。

10. Cloning of IS*Aba1*-*bla*_{OXA-23} and IS*Aba1*-*bla*_{OXA-66}

經過定序結果確認，IS*Aba1*-*bla*_{OXA-23}與已發表之序列(GeneBank accession number EF127491)99%以上相同，IS*Aba1*-*bla*_{OXA-66}則與已發表之序列(GeneBank accession number DQ923479)100%相同。

11. Expression of IS*Aba*-*bla*_{OXA-23} and IS*Aba*-*bla*_{OXA-66} in *A.baumannii* ATCC 15157

表現結果如圖十四，lane1 為帶有IS*Aba*-*bla*_{OXA-66}基因的臨床菌株全蛋白，lane2則為帶有IS*Aba*-*bla*_{OXA-23}基因的臨床菌株全蛋白，lane3為標準菌株ATCC15151的全蛋白，lane4為帶有pAT801質體的標準菌株ATCC15151全蛋白，lane5為IS*Aba*-*bla*_{OXA-66}基因轉殖株全蛋白，lane6為帶有IS*Aba*-*bla*_{OXA-2}基因轉殖株全蛋白，圖中明顯可見到臨床菌株全蛋白pattern與標準菌株以及轉殖株差異較大，轉殖株可明顯見到重組蛋白的表現(30, 32kDa)。

12. Antibiotic susceptibilities of two transformants

基因轉殖株的抗藥性測試結果如表十四。可見到臨床株對於所測試的抗生素皆成抗藥性反應，空質體轉殖株則因為抗生素篩選基因存在造成 piperacillin 以及 ampicillin-sulbactam 的抗藥性增加，除此之外對於 cephalosporin 以及 carbapenem 類藥物都呈現敏感結果，而轉殖株 (pOXA23 以及 pOXA66) 則對於 carbapenem 類藥物明顯造成抗藥性增加。另外 IS*Aba-bla*_{OXA-23} 基因轉殖株特別造成 Cefepime 的抗藥性增加，則是本研究第一次發表出來的重要發現。

(六) 利用 MLST 或 PFGE 分型探討國內及國際念珠菌之分子流行病學

1. *C. tropicalis*

以 MLST 分析台大醫院 14 位 ICU 病人之多重分離菌株共 50 株 *C. tropicalis*，共有 21 種 diploid sequence types (DSTs) 產生。以 UPGMA 樹狀圖分析，使序列相似度大於 74%，所有菌株可分為三個 clonal groups (圖十五)，clonal group I (13 株) 及 II (26 株) 各有 8 種 DST，而 clonal group III (11 株) 則包含 5 種 DST。PFGE-NaeI 區分為六個 clusters (cluster A 至 F) 及三個 minor groups (minor group I 至 III)。MLST 與 PFGE-NaeI 高度相關性 ($p < 0.05$)。

與 Jacobsen 等人以 eBURST 分析其所收集 242 株其他各國 *C. tropicalis* 菌株¹⁸⁷ 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*¹⁸⁸ 及 *C. glabrata*¹⁸⁹。而來自 P1、P3 與 P14 的多重菌株則都維持一相同 DST 於同一病人身上 (圖十六)。

菌株抗藥性分析方面，其 MICs 結果如表十五所示。在 50 株 *C. tropicalis* 菌株中，只有一株對 voriconazole 具抗性，其他菌株對於 azole 類藥物包括 voriconazole 及 fluconazole 皆為敏感性；在 amphotericin B 的測試

中，也只要一菌株具抗藥性。然而，於flucytosine的藥敏試驗中，發現有2株MIC值為32 µg/ml為抗藥菌株分離自P1，以及11株中間抗藥性(intermediately resistant; MIC=8-16 µg/ml) 菌株分別來自於病人P1 (7株)、P7 (1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¹⁹⁰中菌株比較，發現我們的第一群與其來自美國與英國的第二群相近，而我們的第二群有20株，其中有14株對fluconazole有抗藥性，佔了70%。在第二群中的20株只分出了四個DST型，其中DST98有兩株、DST137有一株、DST140有15株及DST144有2株，特別值得注意的是，第二群中抗藥性菌株一共有14株，而在DST140中就佔了11株，以及在DST140中來自同一家醫院(N2)的有六株，包含了1株沒有抗藥性跟5株有抗藥性，且六株來源來自尿液的分離就佔了5株(83.3%) (圖十七)。

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

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

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

2. *C. albicans*

就Clade的分佈而言，台灣201分離株區大致分為14個Clade(圖十八)，Clade 1 (37 isolates), Clade 4 (35), Clade 16 (26), Clade 3 (15), Clade17 (14), Clade 9 (11), Clade10 (10), Clade 8 and Clade 11 (7)及其他較為次要的Clade。(表十六)比較各clade中ABC type的比例，A type所佔比例較高者如Clade 1(25/37), Clade 7(3/3), Clade 8(6/7)； B type所佔比例較高者如Clade 3(16/16), Clade 4(30/36), Clade 10(10/10), Clade 12(8/9), Clade 16(24/26), Clade 17(13/14)。另外C type所佔比例較高者如Clade 11(4/8)，A type與C type比例相等的Clade 9(5/11)。Mating type中Homozygosity(不管是a type或是 α type)所佔比例相當低只有約(7/201)。Homozygosity分布於Clade 1、 11、16及17。愛滋病人比例高的Clade有Clade 7(5/7)及Clade 11(5/8)。Fluconazole的MIC大多為susceptible，值得注意的是Clade 10有50%的高比例為resistant。地理區的分布，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(表十七)azole類(fluconazole, voriconazole及itraconazole)的抗藥性resistant的比例高於5%，其他種類的藥amphotricin B及Flucytosine比例不高於1%。

利用 Minimum spanning tree 比較 201 株菌株的 7 個 alleles，所得到的關係圖如(圖十九)顯示，大致區分為 19 個 Clonal cluster。進一步說明個別 Clonal cluster 中 DST 的關聯性。從抗真菌的抗藥性結果分析，Clonal cluster 1 的 predicted founding ST 為 DST 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。

(圖二十)台灣及國際比較的分離株共計 1508 個 DST 的 eBURST，大約可區分出 78 個 clonal cluster groups，其中具有 predicted founder 共有 26 個 clonal cluster groups。最大的 clonal cluster 1 有 283 個 DSTs，其 predicted founder 為 DST69。就台灣的多年存在之菌株型別 DST918 屬於 clonal cluster 8 的 predicted founder。DST659 屬於 clonal cluster 15。另外 Fluconazole resistant 的 DST304 及相似型別屬於 clonal cluster 17 的 predicted founder。

3. *C. parapsilosis*

於台大醫院 2002 至 2003 年間，由 71 位病人中所分離出之 97 株經 Vitek II 鑑定為 *C. parapsilosis* 菌株進行分析。檢測其 ITS 片段序列後，發現這些菌株可進一步分為不同菌種，分別為 *C. parapsilosis sensu stricto*、*C. metapsilosis* 及 *C. orthopsilosis*。這些菌種所佔的比例為 83.5% (81/97)、9.3% (9/97)與 7.2% (7/97)。由於有些病人可分離到多重菌株(來自同一病人菌株皆為同種)，其菌種的比例分配為 85.9% (61/71)、5.6%

(4/71) 與 8.5% (6/71)。這些菌種於各分離部位的分布詳述於表十八。檢視其分離部位，發現來自血液的菌株最多，佔 60% 以上 (59/97)，特別是 *C. parapsilosis sensu stricto* 的血液分離株佔其 66.7% (54/81)。 *C. parapsilosis sensu stricto* 菌株可由廣泛的身體部位如血液、尿液、皮膚、痰液及中心靜脈導管(CVC, central venous cathete)採檢分離。而除了血液檢體 *C. metapsilosis* 及 *C. orthopsilosis* 菌株在尿液及中心靜脈導管皆有發現。除此之外，有三株 *C. orthopsilosis* 菌株則是來自皮膚部位；值得注意的是，其六位病患中有四位來自皮膚相關部門。

在藥敏檢測方面，所有菌株對於 flucytosine, amphotericin B, 及 voriconazole 皆為敏感性。多數菌株對於 fluconazole 及 voriconazole 皆具敏感性；然而，有三株來自同一位病人的 *C. metapsilosis* 菌株對於 fluconazole 則具抗性(resistant)或呈劑量依賴感受性(susceptible-dose dependent)；並且隨著病人採檢的時間推進，其 MIC 值也隨之增加。對所有菌株的 MIC 值進行統計，*C. metapsilosis* 對於 fluconazole 及 voriconazole 的 MIC 值皆較 *C. parapsilosis sensu stricto* 與 *C. orthopsilosis* 菌株來的高，並具有顯著差異($p < 0.01$, 於 24 及 48 小時)。在 Echinocandin 類藥物方面，*C. parapsilosis sensu stricto*、*C. metapsilosis* 及 *C. orthopsilosis* 菌株對此類藥物的感受性不盡相同。就這次所收集的菌株而言，*C. metapsilosis* 菌株對於 caspofungin 的 MIC 值皆較 *C. parapsilosis sensu stricto* 與 *C. orthopsilosis* 來得低，且具顯著差異($p < 0.01$, 於 24 小時)。而以另一 Echinocandin 類藥物—micafungin 測試，*C. parapsilosis sensu stricto* 菌株的 MIC 值則顯著高於 *C. metapsilosis* 及 *C. orthopsilosis* ($p < 0.01$, 於 24 小時) (如表十九)。

由於觀察到這些菌株對抗Echinocandin類藥物的MIC值具有較大範圍之感受性，所以我們更深入去探討在基因層次上，其之間是否有任何差異來解釋此現象。藉由Fks1基因上hot spot區域的解序，可幫助我們了解*C. parapsilosis*對於此類藥物的MIC變化機制。Garcia-Effron等人的研究指出，與*C. albicans*相比，*C. parapsilosis*天生對於Echinocandin具較高MIC值，這是因為其Fks1基因的hot spot區域上第660位點具有一先天上的胺基酸變異：Proline→Alanine。本研究中，我們也嘗試定序此97株菌株之Fks1基因上包含hot spot區域片段。結果發現，這些*C. parapsilosis sensu lato*菌株其hot spot 1區域上胺基酸第660位點皆為Alanine，此結果是與前人研究所相符的。另外，Garcia-Effron團隊也發現在*C. orthopsilosis*菌株中，其Fks1基因上hot spot 2區域存在另一變異為Isoleucine→Valine。而本研究發現此變異不僅存在於*C. orthopsilosis*，也可在*C. metapsilosis*中找到；而在*C. parapsilosis sensu stricto*菌株中，其相對的位點僅發現皆由Isoleucine表現。然而，比對各菌株之藥敏性資料後，這些在hot spot 2上的胺基酸變異與菌株產生不同MIC可能並無直接相關性。

為了進一步了解這些不同種類菌株的型別及基因體上的特性，利用PFGE分型法將此97株*C. parapsilosis*之染色體DNA經BssHIII酶切後產生之片段以PFGE分離，產生83種DNA圖譜（即為83種基因型）。以UPGMA演算法之樹狀圖分析，將圖譜相似度設定為大於75%，可分為三個主要的group（圖二十一），而此三個族群則正好符合ITS序列所鑑定之菌種，如圖1中顯示由上而下分別為*C. parapsilosis sensu stricto*、*C. orthopsilosis*及*C. metapsilosis*。

本研究中由16位病人取得多重分離株中，發現於同一病患上其多

重分離菌株表現相同(P5、P7、P13、P24 及 P33 的 *C. parapsilosis sensu stricto* 分離株；P16 的 *C. metapsilosis* 分離株；P53 的 *C. orthopsilosis* 分離株)或高度相關之基因型者(P31、P42、P66、P70 的 *C. parapsilosis sensu stricto* 分離株；P2 的 *C. metapsilosis* 分離株)共有 12 位(75%)。除了病人 P16、P24、P31、P33 及 P53，多數病人之多重分離株皆來自同一部位，其中包括有血液、中心靜脈導管、尿液、耳朵、膽汁等來源。由 P16、P24、P31、P33 與 P53 此五位病人所分離出之多重菌株雖來自血液及中心靜脈導管不同部位，卻仍表現相同 PFGE 型別，推測這些分離株為來自各個體中同一來源。

進一步觀察單一病人之多重菌株的 DNA 圖譜差異，16 位病人中有 7 位(44%；P5, P7, P13, P16, P24, P53 及 P64)具有相同基因型的多重菌株，而有些病人的多重菌株在 PFGE 分析圖譜上則具有些微差異(一至三個條帶的不同)，如 P2、P31、P42 及 P70，推測可能有微演化現象發生(圖二十二)。另外，有 6 位病人 (P3、P4、P12、P31、P33 及 P66)的多重菌株間 DNA 圖譜差異較大，顯示單一病人中存在多種 *C. parapsilosis* 型別，推測可能有置換現象發生。

3. 新型隱球菌 *Cryptococcus neoformans*

我們收集了 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(圖二十三) 及 M13 fingerprinting 的結果(圖二十四)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(MI=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*

我們收集了十一株台灣臨床菌株分離年代為 2002 年及 2010 年(表二十)，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(圖二十六)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(圖二十七) 可將菌株分為四群，分群與抗藥性較無關係。

(七) 光學圖譜分析鮑氏不動桿菌全基因分析

Optical mapping 分析結果如圖二十八所示，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。將這些插入序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，如圖二十九所示，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。

(八) 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，在國內目前已躍升為醫院內感染的大宗病源。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。

本年度研究計畫中，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、澳洲等地)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，覆蓋率約高達 700 倍 (700-fold coverage)。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、與去年度研究計劃中得到的光學圖譜(optical mapping)比對其正確性、標定開放式讀架(ORFs)、並且注釋(annotate)各基因功能，待完成之後，相信能對國內的 AB 菌研究再帶來新的發現。

四、討論：

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

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

傳統鑑別系統主要依照菌株之表現型作為區分菌種的依據，如市售的 API20 NE¹⁹¹ 與 Viteck 2¹⁹² 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¹⁹³。

新穎流式微珠陣列多重鑑定方法能單管快速偵測多達 100 種病原，並可半定量。相較於核苷酸定序過程繁雜且至少須一天工時，流式微珠陣列僅需 8.5 個小時即可得到結果¹⁹⁴。在成本估算方面亦較定序來得低。可見流式微珠陣列確有速度快、高通量及擷節成本之優勢。Probes 設計之初皆參

照已發表的標準菌株序列做設計，因此以流式微珠陣列檢測標準菌株的結果如同預測，

ITS 之聚合酶鏈反應使用的細菌引子，經過三種菌屬(*Staphylococcus*、*Pseudomonas*、*Acinetobacter*)的 16s rRNA 以及 23s rRNA 的比對，所設計出來，forward primer 為 16s rRNA 的後端部分，reverse primer 則為 23s rRNA 的前端部分，reverse primer 使用 degenerated primer：5'-(T/G)A(C/G)TGCCAAGGCATCCACC-3，但是由於 degenerated 的核苷酸位置位於 5'端的前面，因此事實上無論(T/G)(C/G)如何組合皆能夠順利將此三種細菌的 ITS 片段增幅出來；真菌引子則是使用前人文獻中所設計的序列，同樣也是針對真菌的 ITS 片段。Probes 設計是以標準菌株的序列為基準，經過比對之後選擇出具有特別序列順序的保留性區域做為 probes 的目標，以分類地位來說，不同屬之間的菌種的序列差異較大，對於以 direct hybridization 的方式做流式微珠陣列檢測來說，設計 probe 鑑別菌株較為容易，而同屬不同種之間的序列差異則會變少，程度依據不同菌屬而不同，然而若是分類地位到達 strain 或是 subspecies，則序列相似度會大增，很可能 similarity 可高達 95%以上，如此對於 probe 的設計難度就會提高，通常可能只有利用 single base mutation 的位置來做區別，如同本實驗中的 *A. baumannii*，目前無法使用單一的 direct hybridization probe 區分出 genomic 3 和 13TU 的菌株。

SA probe 原本設計有兩條探針序列，針對 *S. aureus* 的 ITS 序列結合，經過臨床檢體測試 MSSA (10 isolates)和 MRSA (66 isolates)皆無問題可以正確辨認，然而在測試 CNS (10 isolates)的過程中，發現第一條探針會與 *S. epidermidis* (6 of 10)發生交叉反應的現象，而第二條則否。其餘三株 *S. capitis* 與一株 *S. haemolyticus* 則都會與此兩條探針有交叉反應的現象。原本 CNS

僅被歸類為單一菌屬，後來因為院內感染的重要性提高，而受到重視，鑑定到 species 則顯得重要，在 CNS 的感染中，以 *S. epidermidis* 為最大宗也最重要，所以在臨床菌株的測試中僅選擇使用第二條探針(如文中序列)做為 probe 以避開 *S. epidermidis* 的交叉反應。剩餘 CNS 約有三十餘種，其中半數與院內感染相關，將這些 CNS 分別鑑定到 species 的階段可以做為此偵測系統未來的努力目標之一。

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

本研究發展出能迅速區分常見院內感染病原菌的平台，尤其是臨床上最重要的 *S. aureus*，*P. aeruginosa*，*A. baumannii*。在鑑定 *Acinetobacter* spp. 方面，進一步將本研究鑑定結果與台大醫院提供的抗藥性樣式結合分析，發現多數的 *A. baumannii* 臨床菌株均對 ciprofloxacin 與 imipenem 具抗藥性；反之，genomic species 3 及 13TU 則對 ciprofloxacin 與 imipenem 幾乎都為感受性。此項新發現極具臨床意義，顯示正確地將 *A. baumannii* 鑑定出

來，有助於臨床更精準地投藥，間接減緩抗藥性菌株之崛起。本技術另一潛在優勢，為多重混合感染之鑑別，由於臨床上多重病原混合感染可達5-22%^{195, 196}，如HIV感染、性病感染、重病孱弱免疫低下之患者，故單管多重檢測若能應用於實際臨床檢體之檢測，較諸傳統培養及生化鑑定方法或許更能反映臨床感染之現況。面對國際輸入及新興病原之不斷崛起，高效率之快速多重檢測方法已為未來趨勢，未來接續本計畫將此多重檢測平台應用於多種多重抗藥性院內感染病原菌之鑑定上，發表後亦將不吝將實驗流程細節及經驗在國內加以推廣分享。

本研究利用Real-time PCR快速偵測*gyrA*基因的QRDR以判定是否為ciprofloxacin之抗藥性*Acinetobacter* spp. 菌株。快速鑑定*Acinetobacter* spp. 菌株對於ciprofloxacin的敏感度提供了兩項重要性：(1) ciprofloxacin可能較carbapenem適合治療具有Ser83 *gyrA*基因的*Acinetobacter* spp.，尤其是*Acinetobacter* genospecies 3 和 13TU；(2) 鑑定出對ciprofloxacin具有抗藥性的*A. baumannii* 可能也具有臨床意義，因為抗ciprofloxacin的*A. baumannii* 菌株常都為MDRAB^{99, 158, 197}，故可使用其他建議的抗生素作為治療，如結合carbapenem和sulbactam、colistin及tigecycline。因此，偵測*Acinetobacter* spp. *gyrA*基因的QRDR可以提供臨床醫師用藥上的策略，同時亦可增加正確治療的機會。

本研究同時也鑑定出不種別的*Acinetobacter* spp. 具有不同形式的carbapenemase相關基因。發現*bla*_{IMP-1} 和*bla*_{VIM-2} 基因大部分存在於*Acinetobacter* genospecies 3 和 13TU中，而少見於*A. baumannii* 中^{99, 158}。在全部對carbapenem有抗藥性的*A. baumannii* 中，只有發現IS*Aba1*-*bla*_{OXA-51} 結構，而已有文獻顯示該結構對於imipenem的減少敏感度或抗藥性有關¹⁶³。然而，class D OXA-type carbapenemases 對於carbapenem的水解活性明

顯低於MBL，故目前對於class D OXA-type carbapenemases在*A. baumannii*中造成抵抗carabepenem的機制仍然未明^{162, 165}。

根據imipenem水解試驗的結果，我們發現具 bla_{IMP-1} 的菌株相較於2株含 bla_{VIM-11} 基因的菌株具有明顯較高的imipenem水解活性，再加上 bla_{VIM-11} 基因無表現的結果，可以推論該2株含 bla_{VIM-11} 基因的菌株(No.6和No.7)對imipenem敏感且具非常低的imipenem水解活性。然而，根據E-test MBL與 bla_{OXA-58} 基因無表現的結果，支持 bla_{OXA-58} 基因會受到不同序列的誘導而表現，例如包括IS*Aba3*-like、IS*Aba1*、IS*Aba2*與IS*18*¹⁶⁵。最近文獻指出 bla_{OXA-58} 基因的上游序列IS*Aba3*被一段插入序列IS*1008*截斷，此結構提供啟動子使 bla_{OXA-58} 基因表現¹⁹⁸。因此，IS*Aba3*啟動子似乎與carbapenem的抗藥性無關¹⁶¹，而在本研究也發現類似的現象。

由SDS-PAGE分析與LC-MS/MS胜肽鑑定的結果顯示，OmpA、CarO和34kDa OMP皆存在於3株具MBL基因的*Acinetobacter* genospecies 13TU菌株中，只有No.5和No.7菌株缺少OprD-like。OmpA為*Acinetobacter* spp.外膜蛋白中含量最高的蛋白，最近也有文獻指出與抗藥性無相關¹⁹⁹。由RT-PCR結果顯示，兩株具 bla_{VIM-11} 的菌株(No.6和7) bla_{VIM-11} 和 bla_{OXA-58} 基因無表現產物，而No.7菌株缺少OprD-like相較於No.6菌株對imipenem卻具有較高的MIC值。此外，已有文獻指出*A. baumannii*的OprD-like和胺基酸的吸收與carbapenem的滲透有關¹⁶⁷。在本研究中，我們發現No.5和No.7菌株的oprD基因皆發生無意義突變。根據E-test MBL的結果，相較於其他菌株(MIC <1 mg/L)，唯有No.7菌株在EDTA存在下對imipenem具有較高的MIC (MIC = 2 mg/L)，故推論No.7菌株的不完整OprD為無功能性蛋白，使其可減少敏感於imipenem。然而，在No.5菌株中，其不完整的OprD分子量約36.5kDa，可能在圖中存在於條紋C之上的獨特條紋，但No.5菌株在EDTA存在下對於

imipenem 仍然較 No.7 菌株敏感。此外，亦有文獻指出 *P. aeruginosa* 對 carbapenem 具抗藥性是由於 OprD 突變去活化所導致²⁰⁰。因此，以上結果顯示 OprD 的缺失可能造成 *Acinetobacter* genospecies 13TU 減少對於 imipenem 的敏感度。

對於 carbapenem 類藥物抗藥性基因 OXA 家族與上游插入序列(insertion sequence) 的影響在本篇研究中也得到證實，許多文獻觀察發現 *Acinetobacter.spp* 對於 carbapenem 類藥物具有抗藥性通常會帶有上游插入序列以及下游抗藥性基因 OXA23 或者 OXA66²⁰¹⁻²⁰³，有些菌株可能帶有 OXA66 基因但缺乏插入序列，對於 carpenem 類藥物就會呈現敏感性，本篇研究中利用穿梭質體 pAT801 將此基因組(插入序列+OXA 家族基因)轉殖進入標準菌株中(敏感性)，可以單一的造成 carbapenem 類藥物的抗藥性提高，另外發現 ISAbal-OXA23 基因組另外可單獨增加三代頭孢菌素 cefepime 的抗藥性，亦是首次的發現，這些機制釐清對於往後靠藥性菌株的偵查預測非常有幫助，有助於臨床醫師在治療時候選擇合適的抗生素使用。

本研究結合 multiplex PCR 與流式微珠陣列以偵測 11 種院內感染細菌之 7 個”後線”抗藥性基因與 *pvl* 基因。此 multiplex PCR 反應包含 2 組不同黏合溫度的引子：低嚴謹度之簡併性引子具有約 40°C 的黏合溫度，可增強 *gyrA* 的合成效率；而高嚴謹度之巢式引子則具有約約 60°C 的黏合溫度，可將不同 PCR 引子反應之黏合溫度進行統一。然而，欲節省 PCR 反應所耗費之時間，合成的 multiplex PCR 產物皆控制在小於 200 bp，及將變性溫度縮短至 1 秒。在 ASPE 反應中，每個 ASPE 引子皆包含兩段功能性序列：一為在每個 ASPE 引子的 5' 端皆具有一特異性 ZipCode 序列，可互補地與微珠上的 cZipCode 結合；另一為在每個 ASPE 引子的 3' 端設計專一性鹼基，可與對應模板上的多型性鹼基結合，而合成出 ASPE 延伸產物²⁰⁴。於本研究中，當一個 ASPE 引

子的3'端鹼基無法和模板完全互補時，此時ASPE延伸產物之合成效率會明顯較完全互補者為低。依此原理，以設計11種院內感染細菌之*gyrA*的QRDR與其他標的基因之特異性鹼基於相對應的ASPE引子上，當成功合成ASPE延伸產物時，該產物已標定上含生物素的dCTP。ASPE反應已被推薦為較適合偵測突變的方法之一^{104, 194}。此外，利用ZipCode和cZipCode的雜交平台具有以下兩點優勢：可有系統地整合ASPE延伸產物和微珠雜交反應的溫度；已標定含cZipCode的微珠可於其他以核酸為主的反應中使用，故可有效率地節省微珠之使用開銷。

近年來由細菌所衍生出的抗藥性問題已逐漸攀升，尤其是針對一些後線抗生素，包括fluoroquinolones、vancomycin與carbapenems²⁰⁵。然而，Ciprofloxacin逐年遞增的使用，也造成CipR細菌的快速崛起²⁰⁶，而最常見的抗藥性機制莫過於細菌DNA旋轉酶的GyrA亞基與topoisomerase IV的ParC亞基產生突變所致²⁰⁷。在本研究中，我們發現利用細菌*gyrA*的QRDR不但可預測對ciprofloxacin的敏感度，也可藉由*gyrA*序列之差異區分為gram-positive和gram-negative細菌。此外，質體(plasmid)為另一主要造成抗藥性基因快速散播的機制，包括*mecA*、*vanA*、*bla_{IMP}*、*bla_{VIM}*與ISA*ba1*-*bla_{OXA-23}*基因多由此機制導致。MRSA具有*mecA*基因，可以轉譯出一個新式的penicillin-binding protein (稱PBP2a或PBP2')，與所有的β-lactam具低親和性，故為主要對所有的β-lactam產生抗藥性的機制¹³³。MRSA亦常為多重抗藥性，僅對glycopeptide類抗生素，如vancomycin具有敏感性¹³⁶。故vancomycin為治療MRSA、MRSE與CA-MRSA感染之首選。然而，VRE的崛起主要由於包含一*vanA*基因，可轉譯出專一性酵素以合成變異的細胞壁，vancomycin無法與此變異的細胞壁結合，而使該藥的作用受到抑制²⁰⁸。不幸地，含有*vanA*基因而對vancomycin具有抗藥性的*S. aureus*已有文獻報導

²⁰⁹。藉由*vanA*基因轉移至MRSA而使其對vancomycin的抗藥性已成為目前全球公共衛生矚目的問題。Carbapenems，包括imipenem和meropenem，為廣效性的 β -lactams且視為目前治療gram-negative細菌之最後線抗生素²¹⁰。然而，具有下列兩類型carbapenemases的細菌，包括class B metallo- β -lactamases (MBLs)與carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDLs)已出現而造成臨床治療上與公共衛生上的威脅¹³⁷。IMP和VIM，為常存在於*Acinetobacter* spp.與*P. aeruginosa*的class 1 integron內之MBLs，可以藉由integron將抗藥性基因在細菌之間平行傳遞，進而產生多重抗藥性問題¹⁷⁸。CHDLs，例如OXA-23 與OXA-51，常於*Acinetobacter* spp.內發現，另一插入序列(insertion sequence, IS) IS*Aba1* 提供啟動子的角色而使*bla*_{OXA-23}-和*bla*_{OXA-51-like}大量表現，為目前對carbapenems產生抗藥性的主要機制^{163, 211}。本研究結合multiplex PCR與流式微珠陣列以偵測11種院內感染細菌之7個”後線”抗藥性基因與*pvl*基因。此技術平台具有高靈敏度與專一性，且可在4小時內完成。快速多重檢測細菌之抗藥性基因不但可增加正確治療的機率，減少由於錯誤治療所導致的抗藥性基因傳播，對於抗藥性趨勢的監測和公共衛生亦有莫大的助益。未來將與醫院合作，測試直接自臨床檢體偵測病原及抗藥性的可行性。可能的話將招募有意願合作的醫院架構臨床檢體及個案收納網絡，測試自臨床檢體直接偵測致病原及抗藥性對臨床診療的助益。

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捻，於本計劃開始初期就發展相關檢驗分型檢驗技術，歷年來具有豐碩的研究成果(可見歷年發表 SCI 論文)，期望未來能有所突破開發出經過認證的檢驗試劑組。

利用 MLST 分析菌株親緣關係的不僅藉由 DNA 序列清楚定義其基因型，使得結果穩定、再現性高，也易於實驗室間資料交換比對，具有國際化之優勢。將 MLST 分析結果利用 eBURST 演算法與其他國家菌株比較，我們發現多數於台灣所流傳的菌株易自成一類，如 eBURST clusters 4 及 7 主要為台灣菌株所構成，本研究中台大 50 株 *C. tropicalis* 之菌株約有 80% 也包括其中。*C. tropicalis* 菌株在台灣擁有其特殊之 DSTs 並聚集於某幾個 clusters 的現象推測可能是由於台灣特殊氣候條件或地理位置所致。

由來自單一病人的多重菌株中，我們也發現了其菌株間在 MLST 的分析上具有些微變化之情形。這種微演化的現象牽涉到於多個基因片段上獲得或失去 heterozygosity (heterozygous SNP) 之概念，在 *C. albicans* 上已被提出。在 clonal group II 中，分離自病人 P6 的兩菌株在 *ZWF1a* 基因上只有一個 SNP 的差別，其他基因序列都是相同的。來自 P2 的 3 株尿液分離菌株中，最早分離出的菌株與三天後所分離出的菌株於 *MDR1* 基因上增加了 9 個 heterozygosity，至七天後所分離出的菌株仍維持相同 DST 基因型。而 P10 的分離菌株中，有 2 株尿液分離菌株同為 DST164，其採檢時間相差一天，

而另外 2 支則分別為 DST174 及 DST177，採檢時間則差了 23 天。DST174 較 DST177 於 *XYRI* 基因上增加了 4 個 heterozygosity。於 clonal group III 中，4 株來自 P11 的分離株具有 3 個不同之 DST，分別為 DST134、DST175 與 DST178，但其都序列很相近，僅在 *XYRI* 基因上有不同 heterozygosity 數目之變化；DST134 較 DST175 增加了 8 個 heterozygosity，而 DST178 皆與上述二者具有 4 個 heterozygosity 的差異。由 P13 所分離出 2 株分離菌株則只於 *SAPT2* 基因上有 1 個 heterozygosity 的不同。Odds 等人曾利用 eBURST 方法分析在 *C. albicans* 菌株中發生增加或減少 heterozygosity 的現象來解釋其可能之演化機制。本研究中，針對 *C. tropicalis* 菌株在 clonal group II and III 中，也發現於來自同一病人之不同菌株間似乎以不同的速度在各基因上以 heterozygous-homozygous SNP 變化的形式產生突變。然而，這些菌株的變異或許不完全是進入 ICU 後隨時間所產生，其多樣性也可能來自於採檢前已發展或由於採集部位之不同所致。無論如何，以上結果都顯示了 *C. tropicalis* 菌株確實可於人體內發生微演化之情形，可能有利於菌種不同個體上之適應及生長。

Tavanti 等人藉由 MLST 分析 *C. albicans*，發現具有 flucytosine 抗藥性的 clade 1 菌株，於 *FURI* 基因上帶有單一個核苷酸的突變，與其抗藥性質有關。一個近期的法國研究團隊也發表了由一群 *C. tropicalis* 之血液分離株對於 flucytosine 具有抗藥性。本篇研究中發現了 13 株分別來自 P1、P4、P10 與 P14 病人的 *C. tropicalis* 菌株，於 flucytosine 測試中表現了高 MIC 值。有趣的是，其中的 12 株皆是屬於 DST164 並分布於 MLST 的 clonal group II。推測 DST164 這一群菌株可能有較易轉變為對 flucytosine 具有抗性之性質。而我們也將這些具有高 flucytosine MIC 的菌株的 MLST type 與 Tavanti 等人與 Desnos-Ollivier 等人所收集的同樣具有 flucytosine 抗藥性之歐洲菌株進行

比對，其基因型相關性並不高。因此，具有 flucytosine 抗藥性之菌株型別的出現可能因地理區的不同而有所差異。由於目前發現 *C. tropicalis* 對 flucytosine 具抗性的菌株並不多見，我們未來也將搜尋與 flucytosine 抗藥機制之相關基因，針對這些菌株探討其基因多型性的變化。

目前 *C. parapsilosis* 為世界上許多地區最常見造成血液感染的非 *albicans* 念珠菌之一，包括拉丁美洲、歐洲及亞洲。自 2005 年，*C. parapsilosis* 被進一步分為三個不同種別並命名為 *C. parapsilosis sensu stricto*、*C. orthopsilosis* 及 *C. metapsilosis*²¹²，關於這三種菌株的普及率、分布、藥敏等相關監測的研究工作已在不同國家開始進行並陸續被報導。一份全球性的研究於 2001-2006 年共收集了 1929 株被初步鑑定為 *C. parapsilosis* 的菌株，其中經重新分型發現 *C. orthopsilosis* 與 *C. metapsilosis* 分別各佔了 6.1% 及 1.8%。而在這份報告中所收集的菌株中，有 31 株來自台灣，包括了 29 株 (93.5%) *C. parapsilosis sensu stricto* 及 2 株 (6.5%) *C. metapsilosis*²¹³。本研究中收集由 71 位病人所分離出的 97 株 *C. parapsilosis*，使用快速檢測的方法，如 Vitek II，僅能鑑定為 *C. parapsilosis sensu lato* 菌株。藉由 ITS 序列比對，鑑別出 *C. orthopsilosis* 及 *C. metapsilosis*，以 71 位相異病患個體來看，在當中各佔了 8.5% (6/71) 及 5.6% (4/71)。此兩新菌種在本研究中佔有高顯著性的百分比，因此，值得進一步監控及探討其在臨床上各流行病學研究上的相關性。

C. parapsilosis sensu lato 菌株多被發現分離自血液及皮膚檢體或軟組織樣本，並且主要來自加護病房及皮膚科相關部門之病患²¹⁴。本研究中，菌株主要來自血液。而 *C. orthopsilosis* 則多數為來自皮膚相關檢體，但由於採集的數量有限，需進一步研究及釐清。

一般來說，*C. parapsilosis* 菌株大多被認為對於 fluconazole 具低抗性^{2, 215}。

²¹⁶。然而，近年來臨床上報告已指出其對於azole類藥物的抗性與日俱增²¹⁷⁻²¹⁹。本研究發現一位病人所帶有的三株*C. metapsilosis*呈現抗性及劑量依賴感受性。其MIC值隨時間推進而增加，推測為該名病患在fluconazole的治療中，其菌株逐漸發展而呈現抗性。目前在國際文獻上，仍未發現具有fluconazole抗藥性的*C. metapsilosis*菌株^{213, 220}，然而，一些呈現劑量依賴感受性的菌株已在近年被發現²²¹。因此我們認為這個部份是有趣且值得探討的：是否此*C. metapsilosis*菌株的基因型為容易造成具有抗性之型別？進一步原因仍待更多研究。Echinocandin類新型藥物對於廣泛的*C. parapsilosis sensu lato*菌株具有良好毒殺效果，但在不同菌種間，其MIC結果仍具顯著差異。隨著Echinocandin在臨床上的使用逐漸增加，這些菌種對於這類藥物的藥敏呈現及分布都需要密切監控及注意²²²。

許多研究顯示，*C. parapsilosis*菌株對於echinocandin類藥物caspofungin及micafungin，其MIC值皆較其他*Candida*屬的菌種來得較高²²³⁻²²⁵。前人研究發現，與*C. albicans*及*C. glabrata*比對，*C. parapsilosis*的Fks1蛋白質上具有一個天生的變異(由proline置換為alanine)。Fks1蛋白為echinocandin藥物的攻擊目標。此胺基酸的變異發生在*C. parapsilosis*與其對echinocandin大幅減少的敏感性具有相關性^{215, 226, 227}。本研究中，所有*C. parapsilosis sensu lato*菌株也在Fks1基因上hot spot 1區域的相同位點上發現有alanine的置換，所以這些菌株對於echinocandin藥物的MIC平均基準值皆較其他種別的菌高。另外，在hot spot 2區域，在發現*C. orthopsilosis*及*C. metapsilosis*均有一個由isoleucine變為valine的胺基酸變異。然而這些變異對於*C. parapsilosis sensu lato*菌株間echinocandin MIC的顯著差異度皆無明顯相關。另一篇論文也報導了類似的結果²²⁸。推測*C. parapsilosis*菌株在echinocandin MIC產生大範圍的差異由其他因素所導致。

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^{212, 229}。其它分型方法如 Cp3-13 探針 DNA fingerprinting^{230, 231}，微衛星分析^{232, 233}，及 PFGE^{230, 234, 235} 皆可提供足夠的鑑別力。PFGE 結合核酸內切酶如 SfiI 或 BssHIII 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²³⁶⁻²³⁸ 本研究使用 PFGE-BssHIII 分型法分析 97 株 *C. parapsilosis* 菌株。結果顯示，其鑑別力 (discriminatory power, DI) 可達 0.99，說明此方法很適合用於 *C. parapsilosis* 的分型。然而，這些基因型與分離部位、藥敏性、與感染或群聚狀態無關。一份全球性的 *C. parapsilosis* 流病研究，利用 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 及 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 分型方法也發現其分析出的型別和年齡或來自血液感染/群聚性及環境的菌株並無直接相關性。本研究中 97 株 *C. parapsilosis* 藉由 PFGE-BssHIII 分型，於相似度大於 75% 時可以清楚區分 *C. parapsilosis sensu stricto*、*C. orthopsilosis* 及 *C. metapsilosis* 此三個種別。另外，在 PFGE 類緣性的樹狀圖上可約略推測這三個菌種的可能的演化關係：*C. metapsilosis* 最先分支成為獨立菌種，而後 *C. parapsilosis sensu stricto* 與 *C. orthopsilosis* 才被分開各自獨立。如此的演化關係也許在此三個菌種的粒線體基因體之親緣關係可以得到佐證。Tavanti 等人則在 2005 年的研究提出，經由 MLST 核酸序列資料分析，推測 *C. parapsilosis* 可能由 *C. orthopsilosis* 演化而來²¹²。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²³⁹。另外，Enger 等人設計 Cp3-13 complex DNA 探針，應用南方點墨法，也提出 *C. parapsilosis* 發生微演化之現象²³¹。而 *C. orthopsilosis* 及 *C. metapsilosis* 此兩新定義菌種的菌株，對於其流行病學和臨床多型性方面的資料目前仍只有少數研究^{212, 213}。Tavanti 等人利用 amplified fragment length polymorphism (AFLP) 分析來自單一病人的 *C. orthopsilosis* 系列菌株，推論其菌系間維持不變或發生重組皆存在於同一病人的不同部位。另一項近期研究同樣利用 AFLP 分析 20 株 *C. metapsilosis* 間的差異並發現其菌株重組之現象²²¹。本研究中，16 位具兩株或以上菌株的病人，其所擁有的多重菌株在 PFGE 型別上表現相同或相近的人佔 75% (12/16)。有些來自同一病人的多重菌株再 PFGE 結果上只發現有一至兩個條帶的差異 (圖二)，推測可能發生微化現象。本研究中皆可觀察到菌株間的歧異度在同一宿主上產生維持、微演化及置換等現象發生在三種 *C. parapsilosis* 相關的菌種。我們的研究結果不但進一步印證前人的發現，更提供有效的方法來分析 *C. parapsilosis* 於分子流行病學上的研究。

在 6 個來自單一個體同時含有血液與中心靜脈導管 (CVC) 分離株的案例中，鑑別為 *C. parapsilosis sensu stricto* 有 4 例，*C. orthopsilosis* 與 *C. metapsilosis* 各 1 例。其中 5 個病人所帶有的分離株具相同或相似的基因型別。類似的發現也曾在其他研究中 *C. parapsilosis* 和 *C. albicans* 菌株上出現

來自單一病人的多重菌株可以觀察到 *C. parapsilosis* 其菌株間的親緣關係以及菌體群聚或感染於人體部位的模式^{188, 189, 240}。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²³⁹。另外，Enger等人設計Cp3-13 complex DNA探針，應用南方點墨法，也提出*C. parapsilosis*發生微演化之現象²³¹。而*C. orthopsilosis*及*C. metapsilosis*此兩新定義菌種的菌株，對於其流行病學和臨床多型性方面的資料目前仍只有少數研究。Tavanti等人利用amplified fragment length polymorphism(AFLP)分析來自單一病人的*C. orthopsilosis*系列菌株，推論其菌系間維持不變或發生重組皆存在於同一病人的不同部位²⁴¹。另一項近期研究同樣利用AFLP分析20株*C. metapsilosis*間的差異並發現其菌株重組之現象²²¹。本研究中，16位具兩株或以上菌株的病人，其所擁有的多重菌株在PFGE型別上表現相同或相近的人佔75%(12/16)。有些來自同一病人的多重菌株再PFGE結果上只發現有一至兩個條帶的差異(圖二)，推測可能發生微化現象。本研究中皆可觀察到菌株間的歧異度在同一宿主上產生維持、微演化及置換等現象發生在三種*C. parapsilosis*相關的菌種。我們的研究結果不但進一步印證前人的發現，更提供有效的方法來分析*C. parapsilosis*於分子流行病學上的研究。

在6個來自單一個體同時含有血液與中心靜脈導管(CVC)分離株的案例中，鑑別為*C. parapsilosis sensu stricto*有4例，*C. orthopsilosis*與*C. metapsilosis*各1例。其中5個病人所帶有的分離株具相同或相似的基因型別。類似的發現也曾在其他研究中*C. parapsilosis*和*C. albicans*菌株上出現^{239, 242}。CVC可能是一個提供給*Candida*病原菌侵襲的入口，因而導致念珠菌菌血症(candidemia)的發生。由於目前*C. parapsilosis*是一個血液感染的重要來源，所以此現象值得我們關注²⁴³。一在美國為期三個月的研究更發現*C.*

parapsilosis 菌株來自血液及醫療設備的比例更多於 *C. albicans*²⁴⁴。在本研究中，發現另兩個 *C. parapsilosis* 相關的菌種—*C. orthopsilosis* 及 *C. metapsilosis* 也在血液及中心靜脈導管中分離出並具有高度相關性，此結果不但值得注意更需進一步做相關的追蹤及調查。

許多關於 *C. parapsilosis* 的研究在過去已有諸多文獻發表，而 2005 年所新定義的三個 *C. parapsilosis sensu lato* 菌株—*C. parapsilosis sensu stricto*，*C. orthopsilosis* 與 *C. metapsilosis* 在一系列的全球監測、抗藥性資料或分子分型等面向的觀察仍只有少數研究被報導。以台灣的角度，本研究中所收集的菌株揭露了此三菌種在分子流行病學上的一些資訊。未來仍待進一步釐清其抗藥性數據、感染目標及部位喜好、傳染方式及毒性等相關資訊，期望在防治及治療上提供更多應用及協助。

本研究由醫院所收集的菌株中，使用快速檢測的方法，如 Vitek II，僅能鑑定為 *C. parapsilosis sensu lato* 菌株。Tavanti 等人研究團隊於 2005 年正式將 *C. parapsilosis* group II 及 group III 界定為新種，並命名為 *C. orthopsilosis* 及 *C. metapsilosis*²¹²。雖然此兩菌種在國際上相對的比例並不多，但受到不同地理影響，各個國家的比例分布情形也不盡相同²¹³。本篇所收集的菌株中，經由進一步 ITS 序列的鑑定，發現此二新種佔有部份比例，值得進一步探討。

C. parapsilosis sensu lato 菌株多被發現分離自血液及皮膚檢體，並且主要來自加護病房及皮膚科相關部門之病患²¹⁴。本研究中，菌株主要來自血液。而 *C. orthopsilosis* 則多數為來自皮膚相關檢體，但由於採集的數量有限，需做進一步的研究及釐清。

目前在 *Candida* spp. 之分型方法中，MLST 具有直接提供標準化及方便

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

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

五、結論與建議

病原真菌及多種院內感染多重抗藥性病原在重症孱弱及免疫缺損病患族群中造成之合併症及死亡率仍居高不下，並持續成為公衛上的隱憂。發展快速多重檢驗平台並持續進行分子流行病學之研究，有助於釐清各類病原菌傳播特性，進而研擬更精確之防治對策。多重抗藥性細菌及真菌來勢洶洶，應積極建立監測平台。此外，持續監測並即時展現國內病原之型別及特性（病原性、抗藥性）數據，掌握全球病原型別及其特性資訊，瞭解其傳播特性及引入國境之可能性亦十分重要。尤有甚者，需深入探討抗藥性及致病性機制，俾能提出根本解決之道。

建議：

1. 針對多重抗藥性及罕見新興病原發展快速精確鑑定及分型方法
2. 與送檢單位及臨床醫師合作與臨床及流病資料整合建立資料庫。
3. 擴大發展多重快速檢驗技術並推廣應用。
4. 針對冷門或罕見病原建立參考實驗室。
5. 建立抗藥性基因及機制監測平台，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。
6. 發展全基因體分析及轉殖技術，探討優勢菌株的傳播、抗藥及致病機轉。
7. 藉由型別資料之交流，進行實質國際交流，掌握全球傳播動態。

六、計畫重要研究成果及具體建議

我們的主要進展有十二：**第一**、發展可單管同時偵測麴菌、鐮胞菌、青黴菌、接合菌等26種臨床重要絲狀真菌的微珠陣列。此方法特異性高，敏感度為 100 fg ~ 1 ng、模擬血液檢體檢測敏感度為 10^2 cells/ml。**第二**、成功開發流式微珠陣列系統，可單管快速正確地鑑定台灣院內感染最重要細菌及真菌(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。**第三**、發展院內感染多重抗藥性細菌抗藥性基因的快速多重檢測平台。方法為利用單步驟巢式多重PCR 從methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)、community associated MRSA (CA-MRSA)、methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE)、vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE)、carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA)、carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. (CRAB)和 ciprofloxacin-resistant (CipR) Enterobacteriaceae等院內感染細菌增幅*gyrA*、*mecA*、*vanA*、*bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*ISAbal-bla*_{OXA-23}和 *ISAbal-bla*_{OXA-51-like}等7種所謂最後線抗藥性基因(last resort antibiotic-resistant genes)，外加 *pvl* 基因。**第四**、發展快速鑑定不動桿菌對ciprofloxacin 抗藥性針對*gyrA*基因點突變之real-time PCR方法。**第五**、探討台灣不同種別 *Acinetobacter*攜帶不同carbapenemase相關基因之特性：多數*A. baumannii*攜帶*ISAbal-bla*_{OXA-51}結構並對於imipenem減少敏感性甚至抗藥性；genospecies 3 以及genospecies 13TU中，只有*bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、與*bla*_{OXA-58}等carbapenemase相關基因被測出，其中含有*bla*_{IMP}基因者對imipenem有抗藥性。進而發現外膜蛋白中OprD的缺失可能造成 *Acinetobacter* genospecies 13TU減少對於imipenem的敏感度。**第六**、調查台灣不同不動桿菌抗fluoroquinolones、aminoglycosides、cephalosporins等抗生素之抗藥性機制，並經由轉殖實驗證

明pOXA23以及pOXA66造成對於carbapenem類藥物明顯造成抗藥性增加。並首度發現IS*Aba-bla*_{OXA-23}基因會造成Cefepime的抗藥性增加。**第七**、分析熱帶念珠菌的分子流行病學，顯示同一病人的多重菌株雖有些有微演化，但多半維持同一型別。且我們發現對flucytosine降低感受性的熱帶念珠菌菌株(DST164)在不同病人同時出現。**第八**、分析來自71病人的97株副禿髮念珠菌的分子流行病學，分析ITS2序列發現其中實際台灣的*C. parapsilosis* 實際上85.9% (61/71)是*C. parapsilosis sensu stricto*，8.5% (6/71)是*Candida orthopsilosis*而 5.6% (4/71)是*Candida metapsilosis*。此區分也與BssHII-PFGE的類緣分析吻合。*C. metapsilosis* 的菌株。此3基因型對fluconazole 和 echinocandins 降低感受性及好感染的部位不同，顯現3者的精確區分具有臨床及治療意義。**第九**、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。**第十**、發展奴卡菌的分子分型方法探討其分子流行病學。**第十一**、持續應用MLST分析台灣白色念珠菌外，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。**第十二**、使用光學圖譜(optical mapping)及全基因體定序技術針對鮑氏不動桿菌多重抗藥性菌株進行全基因體分析，並進行比較基因體分析，並藉此探討抗藥性及致病力機轉。

本多年期計畫成果豐碩，本年度著作產出成果共有九篇論文 (3篇SCI及1篇疫情報導已發表；5篇SCI論文投寄中)，一篇專利(駁回答辯中)。95-98年在真菌及特殊病原研究上計發表19篇SCI論文。我們的型別資料將回饋給臨床醫師，合作持續分型及統計分群並與臨床及流病資料整合建立資料庫。國際上持續建立合作關係，交換型別資訊或提供訓練。

具體建議有十：

1. 將研究成果及型別資料將回饋給送檢單位及臨床醫師，協助釐清病原於病程及療程中之變化，並持續合作與臨床及流病資料整合建立資料庫。
2. 擴大應用快速多重流式微珠陣列鑑定方法於其他細菌及真菌病原，院內感染病原菌、抗藥性基因、重病孱弱患者之病理檢體等。與醫院合作轉譯醫學，探討實際臨床應用之可行性。
3. 針對新興或罕見病原如新型隱球菌高致病株及奴卡菌，應建立檢驗及研究配套以茲早為因應。
4. 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。
5. 建立抗藥性基因及機制監測平台。
6. 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。
7. 進一步開發快速多重流式微珠陣列的蛋白質平台，並評估直接使用臨床檢體之可行性。
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。目前已收集日本、奈及利亞及印度的念珠菌菌株，並擬共同合作發表多篇論文。
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。

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，並建立國際聲譽。

七、參考文獻：

References

1. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al: Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infectious Diseases* 2003;37:1172-7.
2. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, et al: Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:1519-27.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, et al: Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases* 2001;32:1319-24.
7. 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.
8. Dasbach EJ, Davies GM, Teutsch SM: Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 2000;31:1524-8.
9. Luo GZ, Mitchell TG: Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40:2860-5.
10. 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.
11. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, et al: National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: Frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 1998;30:121-9.
12. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al: Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;44:747-51.
13. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, et al: Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clinical Infectious Diseases* 2001;33:641-7.
14. 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.
15. Chen YC, Chang SC, Luh KT, et al: Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003;52:71-7.
16. Chen YC, Chang SC, Sun CC, et al: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1997;18:369-75.
17. Hung CC, Chen YC, Chang SC, et al: Nosocomial candidemia in a university hospital in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association* 1996;95:19-28.
18. Huang YC, Lin TY, Leu HS, et al: Yeast carriage on hands of hospital personnel working in intensive care units. *Journal of Hospital Infection* 1998;39:47-51.
19. Huang YC, Lin TY, Peng HL, et al: Outbreak of *Candida albicans* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 1998;30:137-42.
20. 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.
21. 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.
22. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, et al: International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program.

- Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:3254-9.
23. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, et al: Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991–2000. *Clinical Infectious Diseases* 2004;38:311-20.
 24. Hsueh PR, Teng LJ, Chen CY, et al: Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases* 2002;8:827-32.
 25. Bassetti M, Righi E, Costa A, et al: Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006;6:21.
 26. Garbino J, Kolarova L, Rohner P, et al: Secular trends of candidemia over 12 years in adult patients at a tertiary care hospital. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:425-33.
 27. Pappas PG, Rex JH, Lee J, et al: A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2003;37:634-43.
 28. Snyderman DR: Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial *Candida* infections. *Chest* 2003;123:500S-3S.
 29. Michalopoulos AS, Geroulanos S, Mentzelopoulos SD: Determinants of candidemia and candidemia-related death in cardiothoracic ICU patients. *Chest* 2003;124:2244-55.
 30. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, et al: Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis* 2001;33:177-86.
 31. Wenzel RP: Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1995;20:1531-4.
 32. Nguyen MH, Peacock JE, Jr., Morris AJ, et al: The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996;100:617-23.
 33. Salaki JS, Louria DB, Chmel H: Fungal and yeast infections of the central nervous system. A clinical review. *Medicine (Baltimore)* 1984;63:108-32.
 34. Nguyen MH, Yu VL: Meningitis Caused by *Candida* Species: An Emerging Problem in Neurosurgical Patients. *Clinical Infectious Diseases* 1995;21:323-7.
 35. Rivett AG, Perry J, Cohen J: Urinary candidiasis: a prospective study in hospital patients. *Urol Res* 1986;14:183-6.
 36. Lundstrom T, Sobel J: Nosocomial candiduria: a review. *Clin Infect Dis* 2001;32:1602-7.
 37. Platt R, Polk BF, Murdock B, et al: Risk factors for nosocomial urinary tract infection. *Am J Epidemiol* 1986;124:977-85.
 38. Guler S, Ural O, Findik D, et al: Risk factors for nosocomial candiduria. *Saudi Med J* 2006;27:1706-10.
 39. Sobel JD, Kauffman CA, McKinsey D, et al: Candiduria: a randomized, double-blind study of treatment with fluconazole and placebo. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clin Infect Dis* 2000;30:19-24.
 40. Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, et al: Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. The National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clin Infect Dis* 2000;30:14-8.
 41. Bartlett JG: Aspergillosis update. *Medicine* 2000;79:281-2.
 42. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, et al: Invasive aspergillosis - Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. *Medicine* 2000;79:250-60.
 43. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, et al: In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:78-83.
 44. Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, et al: Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998;42:2645-9.
 45. 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.
 46. Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, et al: Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;44:1578-84.
 47. Pfaller MA, Messer SA, Gee S, et al: In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:870-2.
 48. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, et al: Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clinical Infectious Diseases* 2002;35:627-30.
 49. Wingard JR: IMPORTANCE OF CANDIDA SPECIES OTHER THAN CANDIDA-ALBICANS AS PATHOGENS IN ONCOLOGY PATIENTS. *Clinical Infectious Diseases* 1995;20:115-25.
 50. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, et al: Guidelines for treatment of candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*

- 2004;38:161-89.
51. 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.
 52. 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.
 53. 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.
 54. 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.
 55. 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.
 56. Ponton J, Ruchel R, Clemons KV, et al: Emerging pathogens. *Medical Mycology* 2000;38:225-36.
 57. Iqbal N, DeBess EE, Wohrle R, et al: Correlation of Genotype and In Vitro Susceptibilities of *Cryptococcus gattii* Strains from the Pacific Northwest of the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 2010;48:539-44.
 58. Byrnes EJ, Li WJ, Lewit Y, et al: Emergence and Pathogenicity of Highly Virulent *Cryptococcus gattii* Genotypes in the Northwest United States. *PLoS Pathog* 2010;6.
 59. 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.
 60. Rabkin JM, Oroloff SL, Corless CL, et al: Association of fungal infection and increased mortality in liver transplant recipients. *American Journal of Surgery* 2000;179:426-30.
 61. Denning DW: Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* 2000;355:423-4.
 62. Kobayashi GS: Molecular genetics and the diagnostic mycology laboratory. *Arch Med Res* 1995;26:293-6.
 63. 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.
 64. 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.
 65. 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.
 66. Reiss E, Obayashi T, Orle K, et al: Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Medical Mycology* 2000;38:147-59.
 67. 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.
 68. 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.
 69. Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, et al: ANTIGENIC CHARACTERIZATION OF CRYPTOCOCCUS-NEOFORMANS SEROTYPES AND ITS APPLICATION TO SEROTYPING OF CLINICAL ISOLATES. *Journal of Clinical Microbiology* 1982;16:22-9.
 70. Klein BS, Vergeront JM, Disalvo AF, et al: 2 OUTBREAKS OF BLASTOMYCOSIS ALONG RIVERS IN WISCONSIN - ISOLATION OF BLASTOMYCES-DERMATITIDIS FROM RIVERBANK SOIL AND EVIDENCE OF ITS TRANSMISSION ALONG WATERWAYS. *American Review of Respiratory Disease* 1987;136:1333-8.
 71. Hube B: *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 1996;7:55-69.
 72. Morrison CJ, Hurst SF, Reiss E: Competitive binding inhibition enzyme-linked immunosorbent assay that uses the secreted aspartyl proteinase of *Candida albicans* as an antigenic marker for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2003;10:835-48.
 73. Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good C, et al: GENETIC EVIDENCE FOR ROLE OF EXTRACELLULAR PROTEINASE IN VIRULENCE OF CANDIDA-ALBICANS. *Infection and Immunity* 1985;49:571-5.
 74. Staib F: Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* 1965;4:187-93.
 75. Ray TL, Payne CD: SCANNING ELECTRON-MICROSCOPY OF EPIDERMAL ADHERENCE AND CAVITATION IN MURINE CANDIDIASIS - A ROLE FOR CANDIDA ACID PROTEINASE. *Infection and Immunity* 1988;56:1942-9.
 76. Macdonald FODds FC: VIRULENCE FOR MICE OF A PROTEINASE-SECRETING STRAIN OF CANDIDA-ALBICANS AND A PROTEINASE-DEFICIENT MUTANT. *Journal of General Microbiology*

- 1983;129:431-8.
77. 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.
 78. 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.
 79. 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.
 80. 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.
 81. 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.
 82. 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.
 83. 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.
 84. Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, et al: DETECTION OF CANDIDA-ALBICANS AND OTHER YEASTS IN BLOOD BY PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1994;32:228-31.
 85. Rand KH, Houck HWolff M: DETECTION OF CANDIDEMIA BY POLYMERASE CHAIN-REACTION. *Molecular and Cellular Probes* 1994;8:215-21.
 86. 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.
 87. 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.
 88. 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.
 89. 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.
 90. 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.
 91. 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.
 92. 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.
 93. 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.
 94. 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.
 95. 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.
 96. 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.
 97. 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.
 98. 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.
 99. Lin YC, Sheng WH, Chang SC, et al: Application of a microsphere-based array for rapid identification of *Acinetobacter* spp. with distinct antimicrobial susceptibilities. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46:612-7.
 100. Boving MK, Pedersen LNMoller JK: Eight-Plex PCR and Liquid-Array Detection of Bacterial and Viral Pathogens in Cerebrospinal Fluid from Patients with Suspected Meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*

- 2009;47:908-13.
101. Landlinger C, Preuner S, Willinger B, et al: Species-Specific Identification of a Wide Range of Clinically Relevant Fungal Pathogens by Use of Luminex xMAP Technology. *Journal of Clinical Microbiology* 2009;47:1063-73.
 102. Huang CT, Wong WW, Li LH, et al: Genotyping of Chlamydia trachomatis by microsphere suspension array. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46:1126-8.
 103. Nazarenko I, Kobayashi L, Giles J, et al: A novel method of HPV genotyping using Hybrid Capture (R) sample preparation method combined with GP5+/6+PCR and multiplex detection on Luminex (R) XMAP (R). *Journal of Virological Methods* 2008;154:76-81.
 104. Ugozzoli LA: Multiplex assays with fluorescent microbead readout: A powerful tool for mutation detection. *Clinical Chemistry* 2004;50:1963-5.
 105. Diaz MRFell JW: High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus Trichosporon. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:3696-706.
 106. 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.
 107. 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.
 108. 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.
 109. 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.
 110. 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.
 111. Chen CC, Teng LJChang TC: Identification of clinically relevant viridans group streptococci by sequence analysis of the 16S-23S ribosomal DNA spacer region. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:2651-7.
 112. Whiley RA, Duke B, Hardie JM, et al: HETEROGENEITY AMONG 16S-23S RIBOSOMAL-RNA INTERGENIC SPACERS OF SPECIES WITHIN THE STREPTOCOCCUS-MILLERI GROUP. *Microbiology-Uk* 1995;141:1461-7.
 113. Cheng JC, Huang CL, Lin CC, et al: Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real-time PCR. *Clinical Chemistry* 2006;52:1997-2004.
 114. Wellinghausen N, Wirths B, Franz AR, et al: Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2004;48:229-41.
 115. Shen D-x, Du JFeng Z-c: Rapid diagnosis of common pathogenic bacteria infection in newborn infants by 16SrDNA oligonucleotide array. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2004;42:668-72.
 116. Zhu YS, Hein DW, Doll MA, et al: Simultaneous determination of 7 N-acetyltransferase-2 single-nucleotide variations by allele-specific primer extension assay. *Clinical Chemistry* 2006;52:1033-9.
 117. 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.
 118. Soll DR: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 2000;13:332-+.
 119. 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.
 120. 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.
 121. Bounoux ME, Tavanti A, Bouchier C, et al: Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of Candida albicans. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:5265-6.
 122. Bounoux M-E, Aanensen DM, Morand S, et al: Multilocus sequence typing of Candida albicans: strategies, data exchange and applications. *Infection Genetics and Evolution* 2004;4:243-52.
 123. 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.
 124. 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.
 125. Poikonen E, Vuopio-Varkila J, Kaukoranta-Tolvanen SS, et al: Epidemiological typing of Candida

- albicans from bloodstream infections by restriction enzyme analysis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2001;33:140-4.
126. Pujol C, Pfaller MASoll DR: Flucytosine resistance is restricted to a single genetic clade of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004;48:262-6.
 127. Makarova NU, Pokrowsky VV, Kravchenko AV, et al: Persistence of oropharyngeal *Candida albicans* strains with reduced susceptibilities to fluconazole among human immunodeficiency virus-seropositive children and adults in a long-term care facility. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:1833-7.
 128. Soll DRPujol C: *Candida albicans* clades. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 2003;39:1-7.
 129. Riederer K, Fozo PKhatib R: Typing of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*: species-related limitations of electrophoretic karyotyping and restriction endonuclease analysis of genomic DNA. *Mycoses* 1998;41:397-402.
 130. Taylor BN, Harrer T, Pscheidl E, et al: Surveillance of nosocomial transmission of *Candida albicans* in an intensive care unit by DNA fingerprinting. *Journal of Hospital Infection* 2003;55:283-9.
 131. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Dassanayake RS, et al: 'Genotypic shuffling' of sequential clones of *Candida albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. *Journal of Medical Microbiology* 2003;52:349-59.
 132. Ball LM, Bes MA, Theelen B, et al: Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida* species colonization in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:1673-9.
 133. Walsh C: Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 2000;406:775-81.
 134. Leclercq R, Derlot E, Duval J, et al: PLASMID-MEDIATED RESISTANCE TO VANCOMYCIN AND TEICoplanin in *Enterococcus faecium*. *New England Journal of Medicine* 1988;319:157-61.
 135. Livermore DM, James D, Reacher M, et al: Trends in fluoroquinolone (ciprofloxacin) resistance in Enterobacteriaceae from bacteremias, England and Wales, 1990-1999. *Emerging Infectious Diseases* 2002;8:473-8.
 136. Enright MC, Robinson DA, Randle G, et al: The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:7687-92.
 137. Queenan AMBush K: Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 2007;20:440-58.
 138. Ho YC, Chang SC, Lin SR, et al: High Levels of *mecA* DNA Detected by a Quantitative Real-Time PCR Assay Are Associated with Mortality in Patients with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia (vol 47, pg 1443, 2009). *Journal of Clinical Microbiology* 2009;47:2361-.
 139. Sheng WH, Lin YC, Wang JT, et al: Identification of distinct ciprofloxacin susceptibility in *Acinetobacter* spp. by detection of the *gyrA* gene mutation using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes* 2009;23:154-6.
 140. Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, et al: Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases* 2007;13:73-81.
 141. Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, et al: Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:2291-302.
 142. Call DR, Bakko MK, Krug MJ, et al: Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003;47:3290-5.
 143. Corbella X, Montero A, Pujol M, et al: Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:4086-95.
 144. Falagas ME, Kasiakou SK, Rafailidis PI, et al: Comparison of mortality of patients with *Acinetobacter baumannii* bacteraemia receiving appropriate and inappropriate empirical therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006;57:1251-4.
 145. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, et al: Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: High-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:3299-305.
 146. Da Silva GJ, Leitao RPeixe L: Emergence of carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:2109-10.
 147. Tankovic J, Legrand P, Degatines G, et al: CHARACTERIZATION OF A HOSPITAL OUTBREAK OF IMPENEM-RESISTANT ACINETOBACTER-BAUMANNII BY PHENOTYPIC AND GENOTYPIC TYPING METHODS. *Journal of Clinical Microbiology* 1994;32:2677-81.
 148. Kuo LC, Teng LJ, Yu CJ, et al: Dissemination of a clone of unusual phenotype of pandrug-resistant

- Acinetobacter baumannii* at a University Hospital in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:1759-63.
149. Towner KJ: Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. *Journal of Medical Microbiology* 1997;46:721-46.
 150. Limansky AS, Mussi MAViale AM: Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40:4776-8.
 151. Clark RB: Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: Association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1996;38:245-51.
 152. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, et al: Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003;51:565-74.
 153. Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, et al: Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004;48:3298-304.
 154. Poirel L, Marque S, Heritier C, et al: OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005;49:202-8.
 155. Tsakris A, Ikonomidis A, Pourmaras S, et al: VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases* 2006;12:981-3.
 156. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al: Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews* 2005;18:306-+.
 157. Lee JH, Choi CH, Kang HY, et al: Differences in phenotypic and genotypic traits against antimicrobial agents between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007;59:633-9.
 158. Lim YM, Shin KSKim J: Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2007;45:902-5.
 159. Cardoso O, Leitao R, Figueiredo A, et al: Metallo-beta-lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* 2002;8:93-7.
 160. Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, et al: Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;44:196-9.
 161. Heritier C, Poirel L, Fournier PE, et al: Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005;49:4174-9.
 162. Walther-Rasmussen JHoiby N: OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006;57:373-83.
 163. Hu WS, Yao SM, Fung CP, et al: An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007;51:3844-52.
 164. Wang H, Guo P, Sun H, et al: Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007;51:4022-8.
 165. Poirel L Nordmann P: Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene bla(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006;50:1442-8.
 166. Tomas MDM, Beceiro A, Perez A, et al: Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005;49:5172-5.
 167. Dupont M, Pages JM, Lafitte D, et al: Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Proteome Research* 2005;4:2386-90.
 168. Hooper DC: Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7:337-41.
 169. Piddock LJV: Mechanisms of fluoroquinolone resistance: An update 1994-1998. *Drugs* 1999;58:11-8.
 170. Pasca MR, Guglielame P, Arcesi F, et al: Rv2686c-rv2687c-rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004;48:3175-8.
 171. Marrer E, Schad K, Satoh AT, et al: Involvement of the putative ATP-dependent efflux proteins PatA and PatB in fluoroquinolone resistance of a multidrug-resistant mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006;50:685-93.
 172. Hamouda AAmyes SGB: Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii*

- resistant to ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004;54:695-6.
173. Vila J, Ruiz J, Goni P, et al: MUTATION IN THE GYRA GENE OF QUINOLONE-RESISTANT CLINICAL ISOLATES OF ACINETOBACTER-BAUMANNII. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995;39:1201-3.
 174. Vila J, Ruiz J, Goni P, et al: Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997;39:757-62.
 175. Moreau NJ, Houot S, JolyGuillou ML, et al: Characterisation of DNA gyrase and measurement of drug accumulation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* resistant to fluoroquinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1996;38:1079-83.
 176. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, et al: Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004;54:821-3.
 177. Huang LY, Chen TL, Lu PL, et al: Dissemination of multidrug-resistant, class 1 integron-carrying *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:1010-9.
 178. Mazel D: Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology* 2006;4:608-20.
 179. Gomes AR, Westh Hde Lencastre H: Origins and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006;50:3237-44.
 180. Ito T, Katayama Y, Asada K, et al: Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001;45:1323-36.
 181. 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.
 182. Latreille P, Norton S, Goldman BS, et al: Optical mapping as a routine tool for bacterial genome sequence finishing. *Bmc Genomics* 2007;8.
 183. Chen Q, Savarino SJ, Venkatesan 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.
 184. Shukla SK, Kislou 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.
 185. Yu YS, Yang O, Xu XW, et al: Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in a Chinese hospital. *Journal of Medical Microbiology* 2004;53:653-6.
 186. 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.
 187. 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.
 188. 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.
 189. 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.
 190. 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.
 191. Towner KJ, Chopade BA: BIOTYPING OF ACINETOBACTER-CALCOACETICUS USING THE API 20NE SYSTEM. *Journal of Hospital Infection* 1987;10:145-51.
 192. 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.
 193. 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.
 194. 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.
 195. Rello J, Quintana E, Mirelis B, et al: POLYMICROBIAL BACTEREMIA IN CRITICALLY ILL PATIENTS. *Intensive Care Medicine* 1993;19:22-5.
 196. 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.

197. Dizbay M, Altuncekcic A, Sezer BE, et al: Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008;32:29-32.
198. Chen TL, Wu RCC, Shaio MF, et al: Acquisition of a plasmid-borne bla(OXA-58) gene with an upstream IS1008 insertion conferring a high level of carbapenem resistance to *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008;52:2573-80.
199. Bratu S, Landman D, Martin DA, et al: Correlation of antimicrobial resistance with beta-lactamases, the OmpA-Like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York city. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008;52:2999-3005.
200. Gutierrez O, Juan C, Cercenado E, et al: Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007;51:4329-35.
201. Corvec S, Caroff N, Espaze E, et al: AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:629-35.
202. Heritier C, Poirel L, Nordmann P: Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:123-30.
203. Segal H, Nelson E, Elisha BG: Genetic environment and transcription of ampC in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:612-4.
204. Chen JW, Iannone MA, Li MS, et al: A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension. *Genome Research* 2000;10:549-57.
205. Levy SB, Marshall B: Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 2004;10:S122-S9.
206. Lockhart SR, Abramson MA, Beekmann SE, et al: Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the united states between 1993 and 2004. *Journal of Clinical Microbiology* 2007;45:3352-9.
207. Jacoby GA: Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases* 2005;41:S120-S6.
208. Bugg TDH, Wright GD, Dutkamalen S, et al: MOLECULAR-BASIS FOR VANCOMYCIN RESISTANCE IN ENTEROCOCCUS-FAECIUM BM4147 - BIOSYNTHESIS OF A DEPSIPEPTIDE PEPTIDOGLYCAN PRECURSOR BY VANCOMYCIN RESISTANCE PROTEINS VANH AND VANA. *Biochemistry* 1991;30:10408-15.
209. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, et al: Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *New England Journal of Medicine* 2003;348:1342-7.
210. Livermore DM, Woodford N: Carbapenemases: a problem in waiting? *Current Opinion in Microbiology* 2000;3:489-95.
211. Turton JF, Ward ME, Woodford N, et al: The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *Fems Microbiology Letters* 2006;258:72-7.
212. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, et al: *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:284-92.
213. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, et al: Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46:2659-64.
214. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al: Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46:842-9.
215. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al: Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *Journal of Clinical Microbiology* 2007;45:1735-45.
216. Nguyen MH, Peacock JE, Morris AJ, et al: The changing face of candidemia: Emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *American Journal of Medicine* 1996;100:617-23.
217. Brito LR, Guimaraes T, Nucci M, et al: Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycology* 2006;44:261-6.
218. Moudgal V, Little T, Boikov D, et al: Multitechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005;49:767-9.
219. Sarvikivi E, Lyytikainen O, Soll DR, et al: Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:2729-35.

220. Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, et al: Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 2009;47:2392-7.
221. Hensgens LA, Tavanti A, Mogavero S, et al: AFLP genotyping of *Candida metapsilosis* clinical isolates: Evidence for recombination. *Fungal Genet Biol* 2009.
222. Forrest GN, Weekes E, Johnson JK: Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect* 2008;56:126-9.
223. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, et al: In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2008;46:150-6.
224. Laverdiere M, Labbe AC, Restieri C, et al: Susceptibility patterns of *Candida* species recovered from Canadian intensive care units. *J Crit Care* 2007;22:245-50.
225. Espinel-Ingroff A: In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2003;20:121-36.
226. Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, et al: A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008;52:2305-12.
227. Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Raoux D, et al: Mutations in the *fks1* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the EUCAST method. *Antimicrob Agents Chemother* 2008.
228. Ghannoum MA, Chen A, Buhari M, et al: Differential in vitro activity of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* isolates recovered from a burn unit. *Clinical Microbiology and Infection* 2009;15:274-9.
229. Fundyga RE, Kuykendall RJ, Lee-Yang W, et al: Evidence for aneuploidy and recombination in the human commensal yeast *Candida parapsilosis*. *Infect Genet Evol* 2004;4:37-43.
230. Reissa E, Lasker BA, Iqbal NJ, et al: Molecular epidemiology of *Candida parapsilosis* sepsis from outbreak investigations in neonatal intensive care units. *Infect Genet Evol* 2008;8:103-9.
231. Enger L, Joly S, Pujol C, et al: Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 2001;39:658-69.
232. Lasker BA, Butler GL, Ott TJ: Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. *J Clin Microbiol* 2006;44:750-9.
233. Brillowska-Dabrowska A, Schon T, Pannanusorn S, et al: A nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* in southern Sweden verified by genotyping. *Scand J Infect Dis* 2008;1-7.
234. 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.
235. 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. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;49:189-96.
236. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ: Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;21:9-14.
237. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, et al: An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;29:147-53.
238. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, et al: Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:452-6.
239. Shin JH, Park MR, Song JW, et al: Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. *J Clin Microbiol* 2004;42:4025-31.
240. Chen K-W, Chen Y-C, Lin Y-H, et al: The molecular epidemiology of serial *Candida tropicalis* isolates from ICU patients as revealed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Infection, Genetics and Evolution* 2009;9:912-20.
241. Tavanti A, Hensgens LAM, Ghelardi E, et al: Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *Journal of Clinical Microbiology* 2007;45:1455-62.
242. Miranda LN, van dHI, Costa SF, et al: *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect* 2009;72:9-16.
243. Trofa D, Gacser AN, Osanchuk JD: *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:606-25.
244. Kojic EMD, Rouiche RO: Comparison of adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to

silicone catheters in vitro and in vivo. *Clinical Microbiology and Infection* 2003;9:684-90.

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 javanicus</i>	BCRC 35511
<i>Penicillium marneffeii</i>	CBS 344.59
	CBS 549.77
<i>Absidia corymbifera</i>	BCRC 33078
<i>Apophysomyces elegans</i>	BCRC 33107
<i>Mucor hiemalis f. corticola</i>	BCRC 32109

表一、試驗菌株 (續)

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

表 二、微珠陣列系統偵測絲狀真菌 DNA 的最低濃度

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

表 三、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 subsp. 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 subsp. pneumoniae</i>	2	ATCC13883
<i>Proteus mirabilis</i>	1	ATCC29906
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	ATCC14990
<i>Staphylococcus capitis subsp. 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、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 五、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 ^a
<i>S. aureus</i>	SA	CTAGATAAGTAAGTAAAATATAGA	49-117	355-808	3
<i>P. aeruginosa</i>	PA	CACTGGTGATCATTCAAGTCAAGGTA	44-125	1004-1589	8
<i>A. baumannii</i>	AB	ATTAGTGTGATCTGACGAAGACACATTAAC	33-71	332-989	4.7
<i>C. albicans</i>	CA	ATTGCTTGCGGCGGTAACGT ^b	45-130	635-1983	4.9

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

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

表 六、相同比例多重病原偵測結果

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

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

表 七、臨床 *Acinetobacter* 菌種 55 株之 Real-time PCR Tm 值、*gyrA* 基因的 QRDR 序列與 ciprofloxacin 的最小抑制濃度測試

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

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

^bCIP: ciprofloxacin

表 八、臨床 81 株 *Acinetobacter* spp. 之 carbapenemase 相關基因及 imipenem 的最小抑制濃度

Species	No. of isolates	No. of isolates						
		MIC (mg/L) of imipenem			PCR positive for			
		≥ 16	8	≤ 4	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{VIM-11}	<i>ISAbal-bla</i> _{OXA-51-like}	<i>bla</i> _{OXA-58}
<i>A. baumannii</i>	53	18	17	18	0	0	47	0
Genospecies 3	13	4	0	9	4	0	0	4
Genospecies 13TU	15	1	0	14	1	2	0	3
Total	81	23	17	41	5	2	47	7

表 九、7 株具 MBL 基因 *Acinetobacter* spp. 之 E-test MBL 結果與 imipenem 水解測試

No.	Species	MBL	Upstream sequence of <i>bla</i> _{OXA-58}	MIC (mg/L) ^a		Sp. act. (nmol/min/mg of protein) ^b	
				IPM	IPM+EDTA	Crude extract	Crude extract + 2mM EDTA
1	3	<i>bla</i> _{IMP-1}	<i>ISAb3</i>	16	<1	1001	2.32
2	3	<i>bla</i> _{IMP-1}	<i>ISAb3</i>	16	<1	720	1.23
3	3	<i>bla</i> _{IMP-1}	<i>ISAb3</i>	16	<1	862	1.42
4	3	<i>bla</i> _{IMP-1}	<i>ISAb3</i>	16	<1	537	1.06
5	13TU	<i>bla</i> _{IMP-1}	<i>ISAb3</i>	24	<1	499	1.25
6	13TU	<i>bla</i> _{VIM-11}	<i>ISAb3</i>	<4	<1	0.48	NA ^c
7	13TU	<i>bla</i> _{VIM-11}	<i>ISAb3</i>	4	2	0.84	NA

^a IPM, imipenem

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

^c NA, not assay

表 十、胜肽鑑定分析

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

表十一、偵測多重抗藥性菌株所用引子

Name	Nucleotide sequence (5'-3')	Location	Reference
Ab-GF	ACAAGAAATCTGCTCGT	<i>gyrA</i>	36
Ab-GR	CGAAGTTACCCTGACCATC	<i>gyrA</i>	36
5'-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	Integron	18
3'-CS	AAGCAGACTTGACCTGA	Integron	18
ACI10	GCTGAACGCGATAAACTTC	<i>ISAbal</i> of <i>bla</i> _{AmpC}	5
ACI2	TAGTACTGCTATTTACGGCT	<i>bla</i> _{AmpC}	5
IMP-A	GAAGGYGTTTATGTTTCATAC	<i>bla</i> _{IMP}	29
IMP-B	GTAMGTTTCAAGAGTGATGC	<i>bla</i> _{IMP}	29
VIM2004A	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	<i>bla</i> _{VIM}	29
VIM2004B	AATGCGCAGCACCAGGATAG	<i>bla</i> _{VIM}	29
OXA23-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	<i>bla</i> _{OXA-23}	40
OXA23-R	ATTTCTGACCGCATTTCAT	<i>bla</i> _{OXA-23}	40
OXA24-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	<i>bla</i> _{OXA-24-like}	40
OXA24-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	<i>bla</i> _{OXA-24-like}	40
OXA51-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	<i>bla</i> _{OXA-51-like}	40
OXA51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG	<i>bla</i> _{OXA-51-like}	40
OXA-58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	<i>bla</i> _{OXA-58}	40
OXA-58-R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC	<i>bla</i> _{OXA-58}	40
OXA-58A	CGATCAGAATGTTCAAGCGC	<i>bla</i> _{OXA-58}	31
OXA-58B	ACGATTCTCCCCTCTGCGC	<i>bla</i> _{OXA-58}	31
ISAb3B	CGTTTACCCCAAACATAAGC	<i>tnpA</i> of <i>ISAb3</i> but not in <i>ISAb3-like</i>	31
ISAb3C	AGCAATATCTCGTATACCGC	<i>tnpA</i> of <i>ISAb3-like</i> and <i>ISAb3</i>	31
ISAb1-F	GGATCCCTCTGTACACGAYAAATTC	<i>ISAb1</i>	This study
OXA23-R1	GAATTCTTAAATAATATTCAGCTGTTTTAATG	<i>bla</i> _{OXA-23}	This study
OXA51-R1	GAATTCCTATAAAATACCTAATTGTTCTAAAC	<i>bla</i> _{OXA-51-like}	This study

表十二、75株不動桿菌臨床菌株的抗藥性樣式

MIC (mg/L) of	No. of isolates		
	<i>A. baumannii</i> (n = 53)	<i>A. genosp.</i> 13TU (n = 20)	<i>A. genosp.</i> 3 (n = 2)
Ciprofloxacin			
≥ 4 (R)	45 (44) ^a	2 (2)	1 (1)
2(I)			
Levofloxacin			
≥ 8 (R)	24 (24)	1 (2)	1 (1)
4(I)	19 (19)		
Amikacin			
≥ 64 (R)	15 (15) ^b	2 (2)	
32(I)	2 (0)		
Gentamicin			
≥ 16 (R)	43 (40)	2 (1)	
8(I)		4 (2)	
Tobramycin			
≥ 16 (R)	40 (39)	1 (1)	
8(I)	2 (0)	1 (1)	
Ceftazidime			
≥ 32 (R)	44 (44) ^c	5 (1)	
16(I)	1 (0)	2 (1)	1 (0)
Cefepime			
≥ 32 (R)	34 (34)	6 (2)	1 (0)
16(I)	8 (8)	1 (0)	
Imipenem			
≥ 16 (R)	19 (17) ^d	2	
8(I)	5 (4)	2	
Meropenem			
≥ 16 (R)	20 (18)	2	
8(I)	4 (3)	1	

^a The numbers in brackets for fluoroquinolones were indicated the amount of *Acinetobacter* spp. isolates with GyrA mutations.

^b The numbers in brackets for aminoglycosides were indicated the amount of *Acinetobacter* spp. isolates with integrons.

^c The numbers in brackets for cephalosporins were indicated the amount of *Acinetobacter* spp. isolates with IS*Aba1*-*bla*_{AmpC} structure.

^d The numbers in brackets for carbapenems were indicated the amount of *A. baumannii* isolates with IS*Aba1*-*bla*_{OXA-51-like} structure.

表十三、75株不動桿菌臨床菌株的抗藥性基因

Antibiotic-resistant genes	No. of isolates		
	<i>A. baumannii</i> (n = 53)	<i>A. genosp.</i> 13TU (n = 20)	<i>A. genosp.</i> 3 (n = 2)
QRDR of GyrA			
Ser83 (TCA)	9	18	1
Ser83Leu (TTA)	44	1	1
Ser83Phe (TTT)		1	
Integron			
non-present	13	15	2
<i>aacA4-catB8-aadA1</i>	35		
<i>aacC1-orfX-orfX'-aadA1</i>	3		
<i>arr-3-aacA4</i>		2	
<i>arr-3-aacA4+ bla_{VIM-11}</i>		1	
<i>dhfrXII-orfF-aadA2</i>	2		
<i>bla_{IMP-1}-aac(6')-II-aadA4</i>		2	
AmpC			
non-present	1	18	2
<i>bla_{AmpC}</i>	8		
<i>ISAbal-bla_{AmpC}</i>	44	2	
CHDLs and MBLs			
non-present		15	2
<i>ISAbal-bla_{OXA-23} + ISAb3-bla_{OXA-58}</i>		1	
<i>ISAb3-bla_{OXA-58} only</i>		1	
<i>ISAb3-bla_{OXA-58} + bla_{IMP-1}</i>		2	
<i>ISAb3-bla_{OXA-58} + bla_{VIM-11}</i>		1	
<i>ISAbal-bla_{OXA-23} + bla_{OXA-51-like}</i>	1		
<i>bla_{OXA-24-like} + bla_{OXA-51-like}</i>	1		
<i>bla_{OXA-51-like} only</i>	27		
<i>ISAbal-bla_{OXA-51-like} only</i>	24		

表十四、各種鮑氏不動桿菌的抗藥性

包括臨床菌株 6AB11; 參考株 ATCC 15151; 以及 ATCC15151 帶有 pAT801, pOXA23, 和 pOXA66 重組構築質體.

β -lactam(s) ^a	MIC (mg/L) of					
	<i>A. baumannii</i> 6AB11 (IS <i>Aba1</i> - <i>bla</i> _{OXA-66})	<i>A. baumannii</i> 6AB15 (IS <i>Aba1</i> - <i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-66})	<i>A. baumannii</i> ATCC 15151	<i>A. baumannii</i> ATCC 15151 -pAT801	<i>A. baumannii</i> ATCC 15151 -pOXA23 (IS <i>Aba1</i> - <i>bla</i> _{OXA-23})	<i>A. baumannii</i> ATCC 15151 -pOXA66 (IS <i>Aba1</i> - <i>bla</i> _{OXA-66})
Ampicillin	≥ 32	≥ 32	16	≥ 32	≥ 32	≥ 32
Ampicillin/Sulbactam	≥ 32	≥ 32	≤ 2	16	≥ 32	16
Piperacillin	≥ 128	≥ 128	16	≥ 128	≥ 128	≥ 128
Piperacillin/Tazobactam	≥ 128	≥ 128	≤ 4	≤ 4	≥ 128	16
Ceftazidime	≥ 64	≥ 64	4	4	8	4
Cefepime	≥ 64	≥ 64	4	4	≥ 64	4
Imipenem ^b	≥ 32	≥ 32	0.25	0.25	≥ 16	≥ 32
Meropenem	≥ 16	≥ 16	0.25	0.25	≥ 16	≥ 16

^a The MICs of β -lactams were detected by Vitek 2 except imipenem.

^b The MIC of imipenem was detected by Etest

表十五、台大 50 株 *Candida. tropicalis* 分離株之菌株資料及藥敏試驗結果。

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

表十六、201 株 *Candida albicans* Clade 與不同 phenotype 之關係.

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

表十七、*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%

表十八、*C. parapsilosis* , *C. orthopsilosis* 與 *C. metapsilosis* 菌株分布及其分離部位

Anatomic source	No. (%) of isolates			Total
	Organism			
	<i>C.</i>	<i>C.</i>	<i>C.</i>	
Blood	54	2	3	59
Derm ^a	8	3	0	11
Urine	4	1	4	9
CVC	5	1	1	7
Sputum	2	0	0	2
Bile	2	0	0	2
Ascites	2	0	0	2
Tongue	1	0	0	1 (1)
Drain	0	0	1	1 (1)
CAPD	2	0	0	2
Unknown	1	0	0	1 (1)
Total	81	7 (7.2)	9 (9.3)	97

^aThe skin specimens included pus, biopsy and tissue

Abbreviations : CVC, central venous catheter ; CAPD,

表十九、*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* 菌株的藥敏性測試

Antifungal	MIC (µg/ml)		Species		
			<i>C. parapsilosis</i> (No. of isolates/ patients =81/61)	<i>C. orthopsilosis</i> (No. of isolates/ patients =7/6)	<i>C. metapsilosis</i> (No. of isolates/ patients =9/4)
Amphotericin B	Range	24 h	0.03-0.125	0.03-0.125	0.03-0.125
		48 h	0.03-0.5	0.06-1	0.06-0.5
	MIC50	24 h	0.06	0.06	0.06
		48 h	0.25	0.25	0.25
	MIC90	24 h	0.125	0.125	0.125
		48 h	0.5	1	0.5
	Mean *	24 h	0.05 ^a	0.055 ^a	0.073 ^a
		48 h	0.236 ^a	0.323 ^a	0.313 ^a
Fluconazole	Range	24 h	0.125-2	0.125-0.5	0.125-32
		48 h	0.125-4	0.5-2	1-128
	MIC50	24 h	0.25	0.5	0.5
		48 h	1	1	32
	MIC90	24 h	1	0.5	8
		48 h	2	2	128
	Mean *	24 h	0.375 ^a	0.773 ^a	3.125 ^b
		48 h	0.78 ^a	1.25 ^a	16.25 ^b
Voriconazole	Range	24 h	0.03	0.03	0.03-0.125
		48 h	0.03-0.06	0.03-0.06	0.03-0.25
	MIC50	24 h	0.03	0.03	0.03
		48 h	0.03	0.03	0.125
	MIC90	24 h	0.03	0.03	0.125
		48 h	0.03	0.06	0.25
	Mean *	24 h	0.03 ^a	0.03 ^a	0.05 ^b
		48 h	0.031 ^a	0.4 ^a	0.085 ^b
Flucytosine	Range		0.125-1	0.125-0.5	0.125-2
	MIC50	48 h	0.125	0.125	0.25
	MIC90		0.5	0.5	0.25
	Mean *		0.222 ^a	0.271 ^a	0.289 ^a
Caspofungin	Range		0.03-2	0.125-1	0.03-1
	MIC50	24 h	0.5	0.05	0.25
	MIC90		2	1	1
	Mean *		1.954 ^a	1.750 ^a	0.875 ^b
Micafungin	Range		0.03-2	0.06-0.25	0.03-0.25
	MIC50	24 h	0.125	0.06	0.06
	MIC90		1	0.5	0.25
	Mean *		1.275 ^a	0.417 ^b	0.192 ^b

* Means within a row followed by the same letter (^a or ^b) are not significantly different by a Least Significant Difference test at $P > 0.05$

表二十、*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 forarm	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 forarm	nil.	nil.
N. brasiliensis-7	10	F	nil.	nil.	2 pustules	right forarm & left palm	nil.	nil.
N. brasiliensis-8	38	F	house dust	nil.	nodulo-pustular pyoderma	right check	right cervical lymphadenitis	nil.
N. brasiliensis-9	62	M	hot spring	myathenia 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.

圖 一、利用微珠陣列系統測試鑑定絲狀真菌菌株

Organism	Identification no	S/B ratio																							
		Ascla	Asfla	Asfum	Assid	Assig	Aster	Asver	Fumop	Fuox	Fusol	Pajav	Pemar	Abcor	Apclc	Muhic	Murac	Muram	Rampus	Rpam	Rpory	Savas	Syrac	Cocci	
<i>Aspergillus clavatus</i>	BCRC 31136	■																							
<i>Aspergillus flavus</i>	BCRC 30007	■	■																						
	BCRC 30008	■	■																						
	BCRC 30144	■	■																						
	BCRC 33516	■	■																						
<i>Aspergillus fumigatus</i>	BCRC 30099		■	■																					
	BCRC 30502		■	■																					
	BCRC 33380		■	■																					
<i>Aspergillus nidulans</i>	BCRC 30100			■	■																				
	BCRC 31120			■	■																				
	BCRC 33355			■	■																				
	ATCC 10074			■	■																				
<i>Aspergillus niger</i>	BCRC 30506					■	■																		
	BCRC 31512					■	■																		
	BCRC 32731					■	■																		
	BCRC 32734					■	■																		
	BCRC 32735					■	■																		
ATCC 16404					■	■																			
<i>Aspergillus terreus</i>	BCRC 30135						■	■																	
	BCRC 31128						■	■																	
	BCRC 32068						■	■																	
<i>Aspergillus versicolor</i>	BCRC 30225							■	■																
<i>Fusarium moniliforme</i>	BCRC 31492								■	■															
<i>Fusarium oxysporum</i>	BCRC 31611									■	■														
	BCRC 32107									■	■														
	BCRC 32139									■	■														
<i>Fusarium pallidroseum</i>	BCRC 33554									■	■														
BCRC 33555	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 二、以微珠陣列系統偵測多重絲狀真菌混合實驗

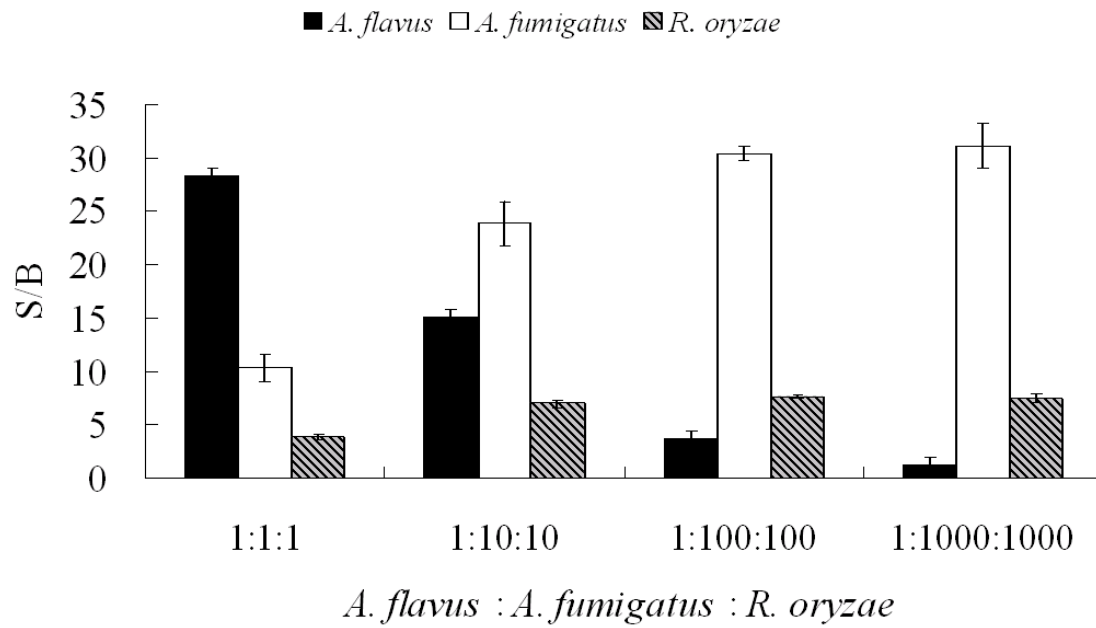


圖 三、以 spiked 的血液測試微珠陣列系統運用臨床檢驗可行性及靈敏度

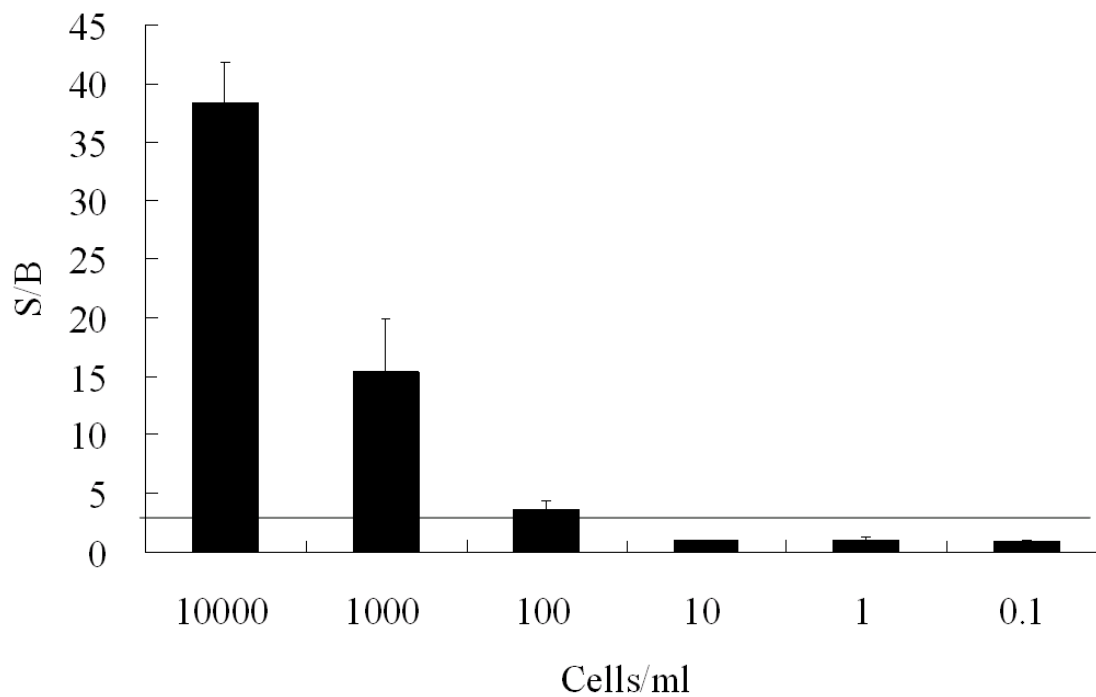


圖 四、利用 multiplex PCR 採二對通用型引子對(universal primers) 增幅單獨或混合樣本 DNA

Lane 1 和 lane 12 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*

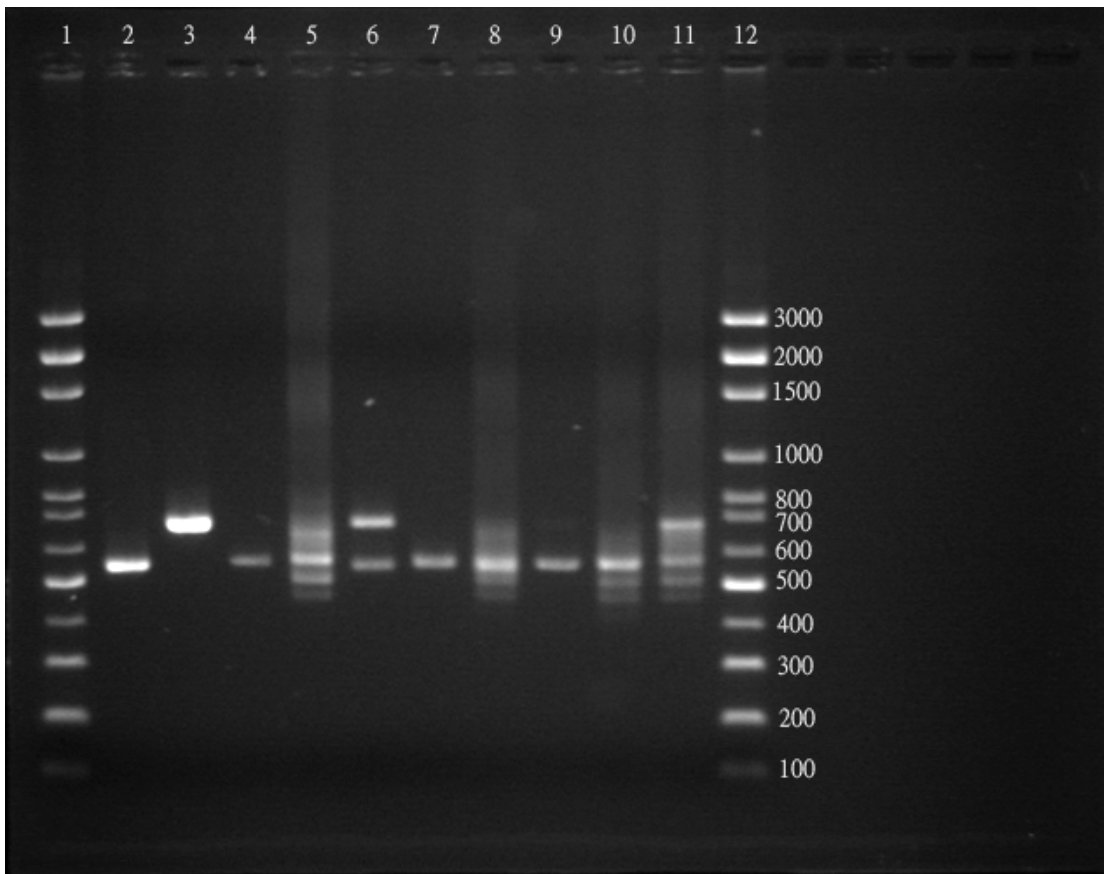


圖 五、流式微珠陣列之流程圖

(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。

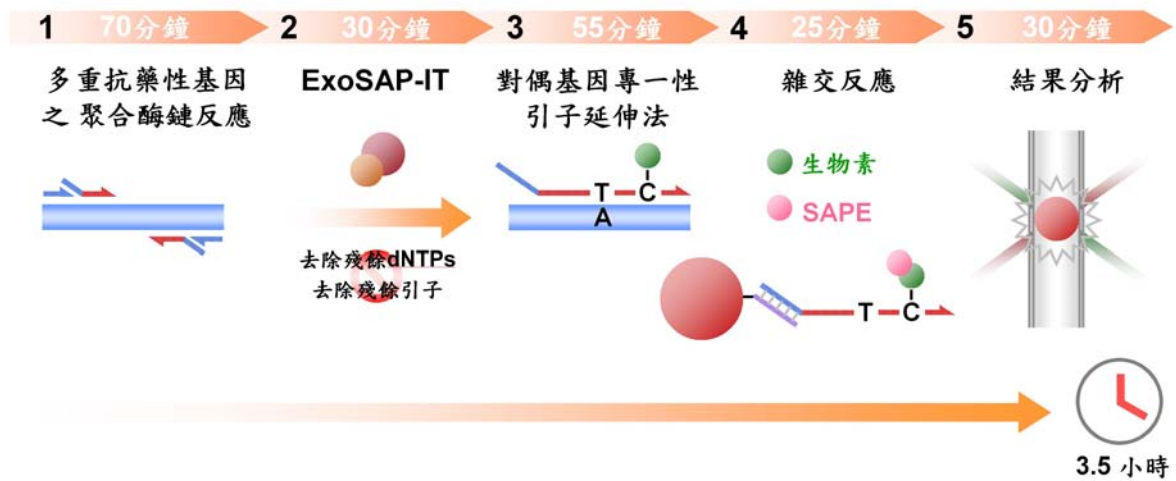


圖 六、以流式微珠陣列偵測 *S. aureus*、*S. epidermidis*、*E. faecalis* 與 *E. faecium* 之 multiplex PCR 產物

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

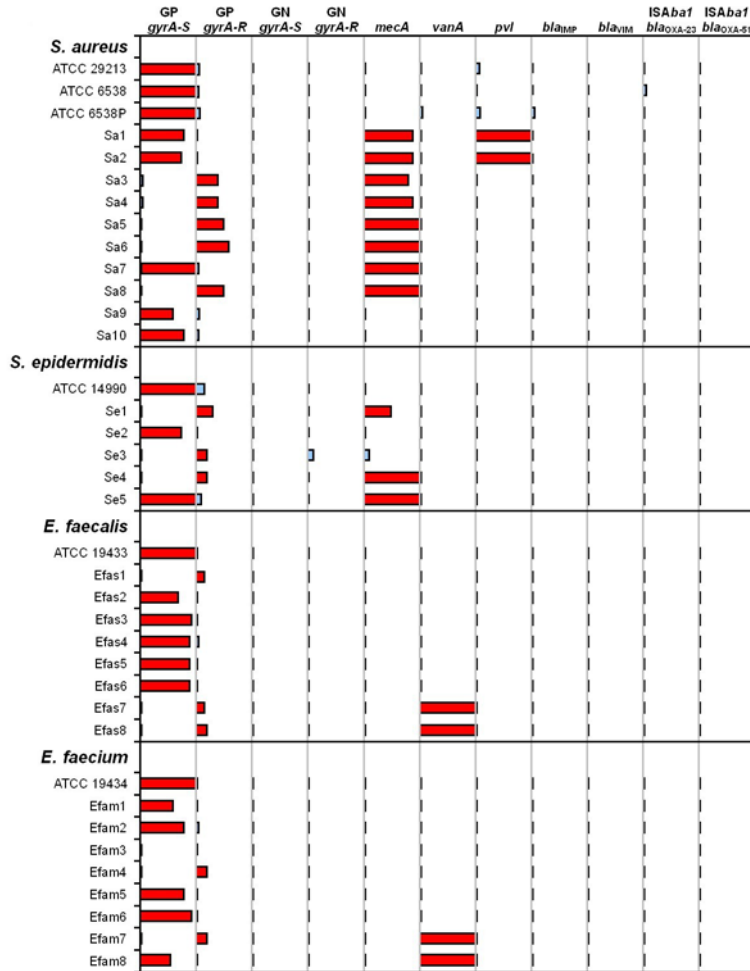


圖 七、以流式微珠陣列偵測 *P. aeruginosa* 與 *Acinetobacter* spp. 之 multiplex PCR 產物

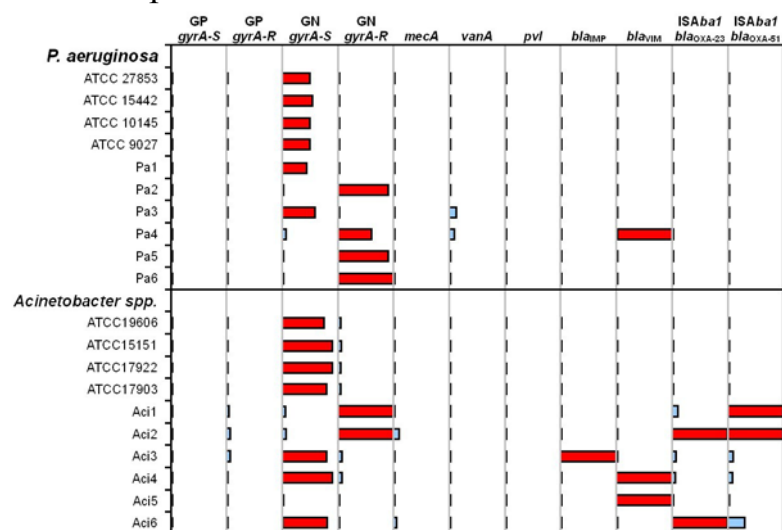


圖 八、以流式微珠陣列偵測 *K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*E. coli*、*E. aerogenes* 與 *E. cloacae* 之 multiplex PCR 產物

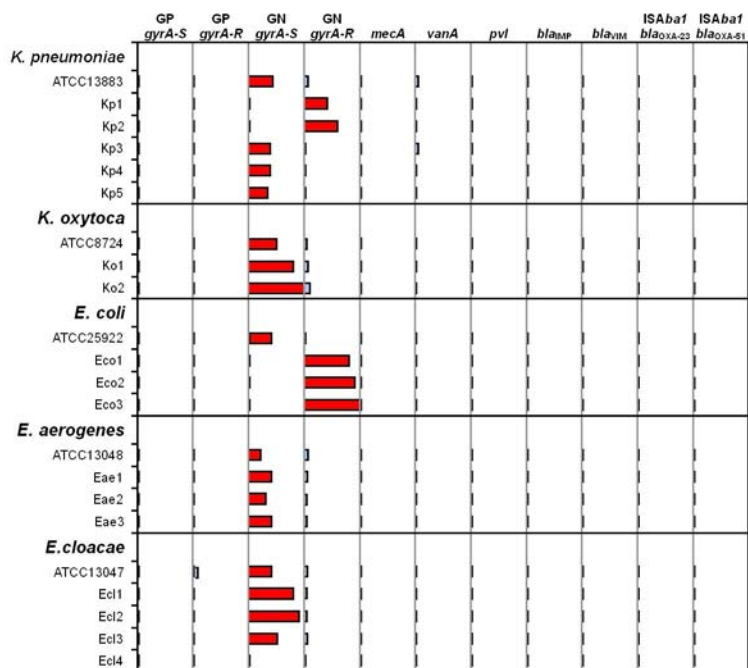


圖 九、四個 *Acinetobacter* spp. 菌株 *gyrA* 基因的 QRDR 序列排列 (Alignment)。框起來的序列為 *gyrA* 基因的 QRDR。下標的序列指出改變的胺基酸。兩個箭頭表示所設計的兩個探針 Ab-FL3 和 Ab-LC3 序列

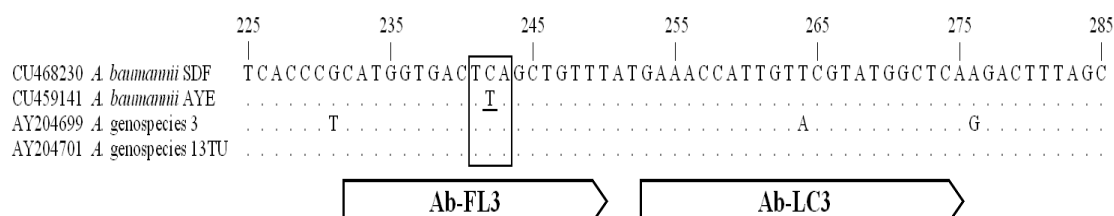


圖 十、10 株 *Acinetobacter* spp. 臨床菌株之 Melting-curve 分析
T_m 值在 52°C 的分別為 2 株 *A. baumannii*、2 株 *genospecies* 3 與 2 株 *genospecies* 13TU；在 T_m 值 50°C 的為 2 株 *genospecies* 3；T_m 值在 47°C 的為 2 株 *A. baumannii*。

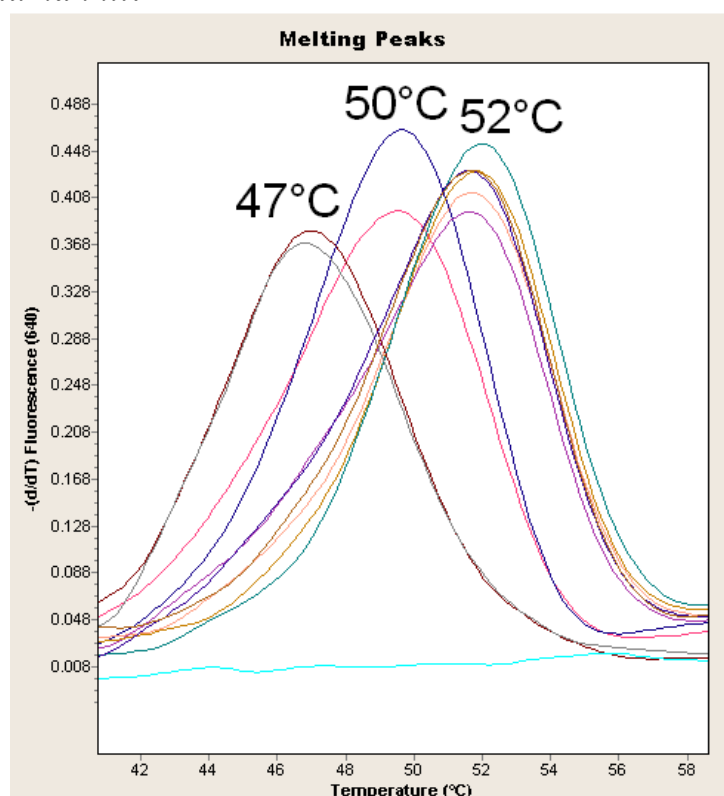


圖 十一、7 株具 MBL 基因 *Acinetobacter* spp. 菌株之 PFGE 分析

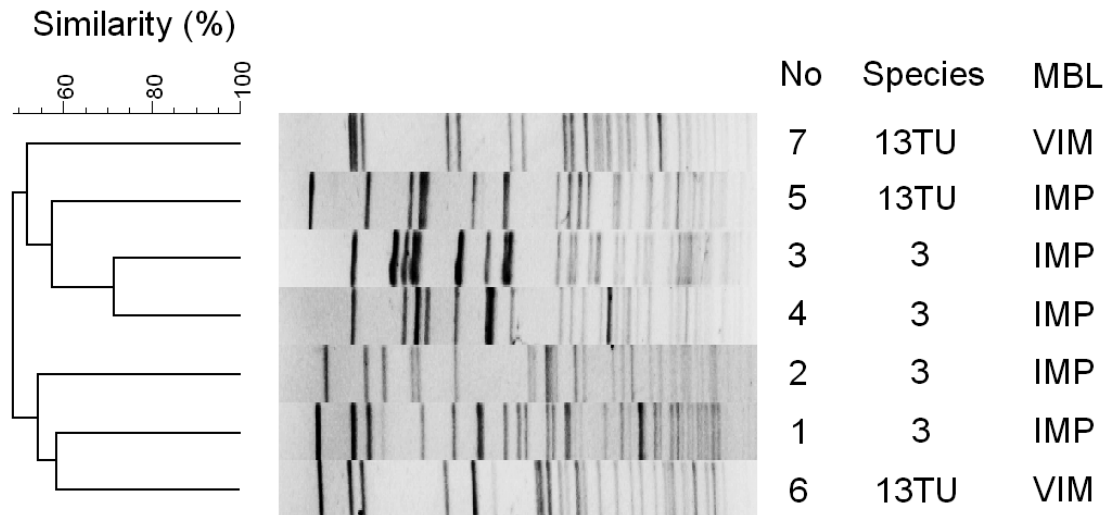


圖 十二、3 株具 MBL 基因 *Acinetobacter* genospecies 13TU 菌株之 E-test MBL 分析

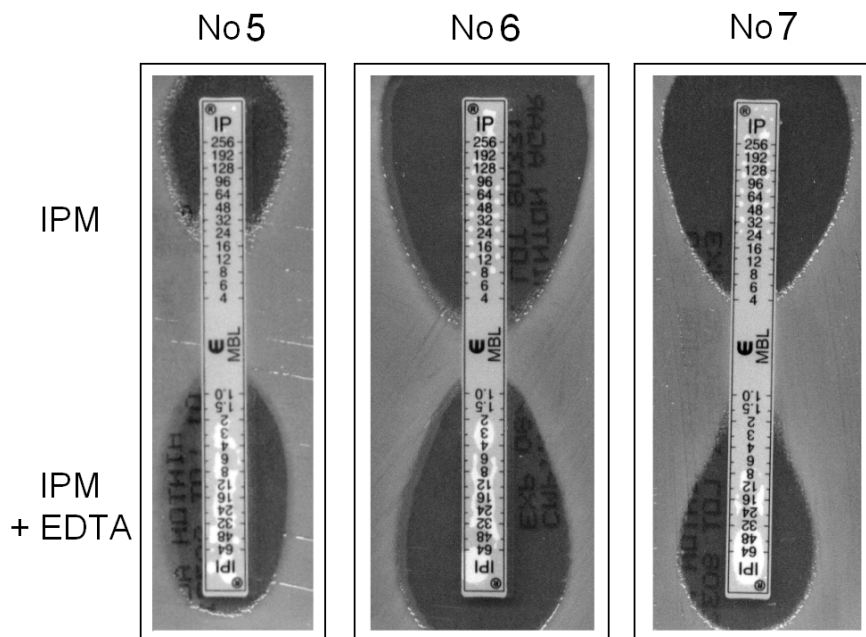


圖 十三、SDS-PAGE 分析 3 株具 MBL 基因的 *Acinetobacter* genospecies 13TU 之 OMPs

標示線指出不同分子量相對位置。英文字母(A-F)相對應的箭頭指出進行 LC-MS/MS 後續分析的條紋。

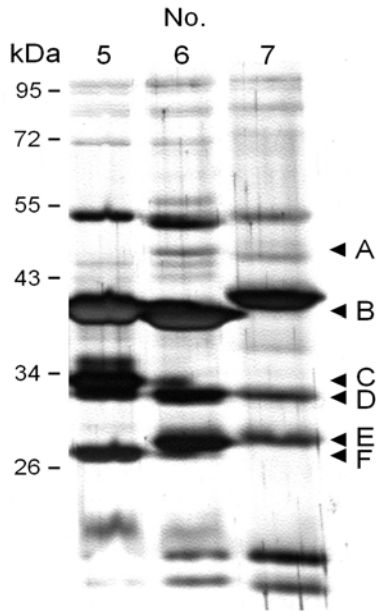


圖 十四、*bla*_{OXA-23} 和 *bla*_{OXA-66} 在 *A. baumannii* ATCC15151 之表現。

Lane 1, *A. baumannii* 6AB11 (*ISAbal-bla*_{OXA-66}); lane 2, *A. baumannii* 6AB15 (*ISAbal-bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-66}); lane 3, *A. baumannii* ATCC 15151; lane 4, *A. baumannii* ATCC 15151 (pAT801); lane 5, *A. baumannii* ATCC 15151 (pOXA23); lane 6, *A. baumannii* ATCC 15151 (pOXA66). 箭號指向 2 轉殖株在 30-kDa 和 32-kDa 處有增加表現 (lane 5 and 6)。Lane M 代表分子量指標。

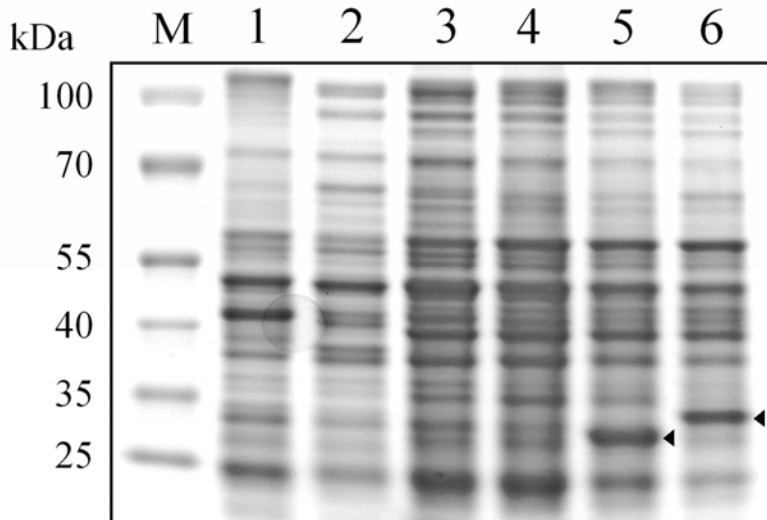


圖 十五、台大 50 株 *Candida tropicalis* 分離株的 MLST 分析

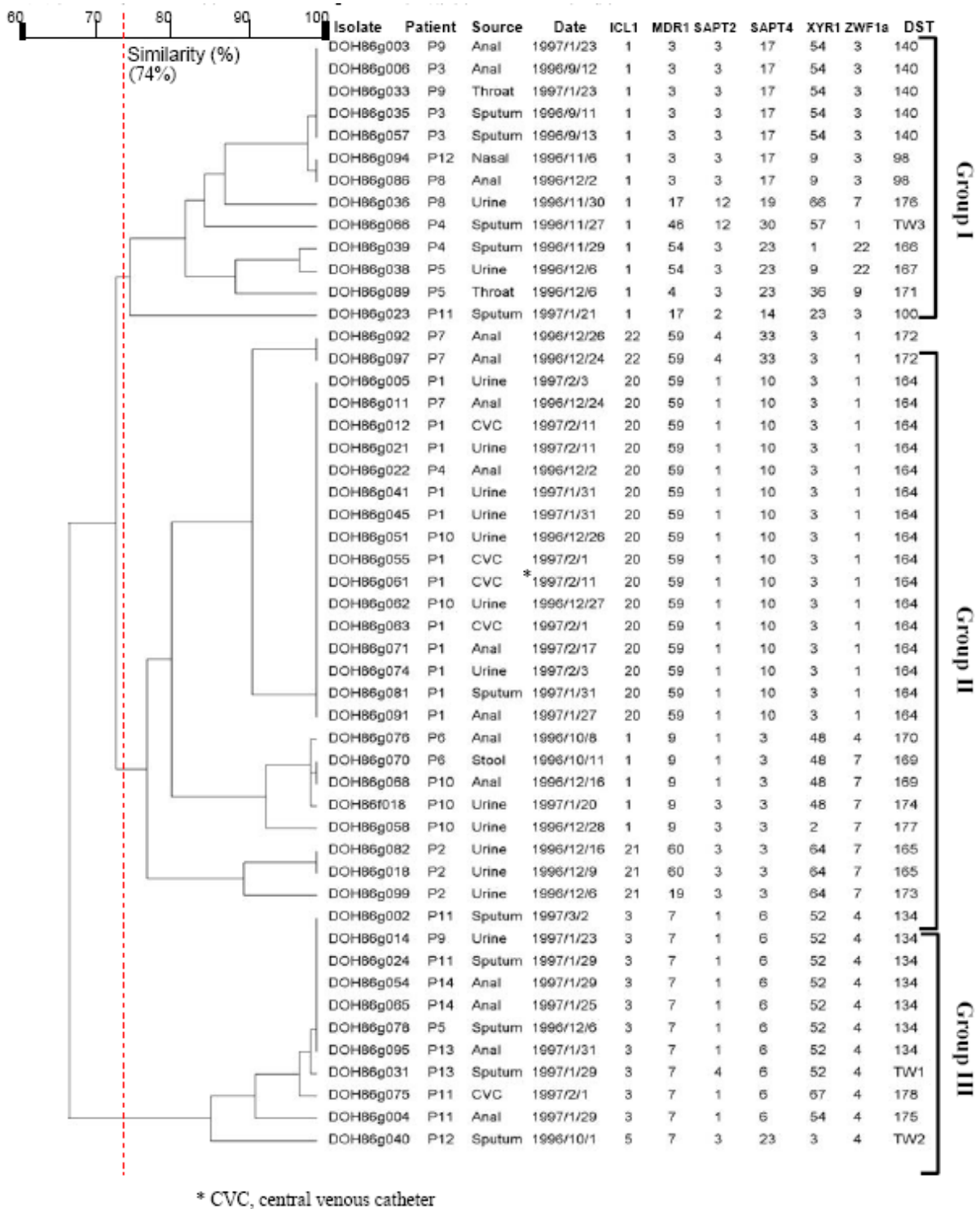


圖 十六、台大 50 株 *Candida tropicalis* 分離株的 PFGE 分析

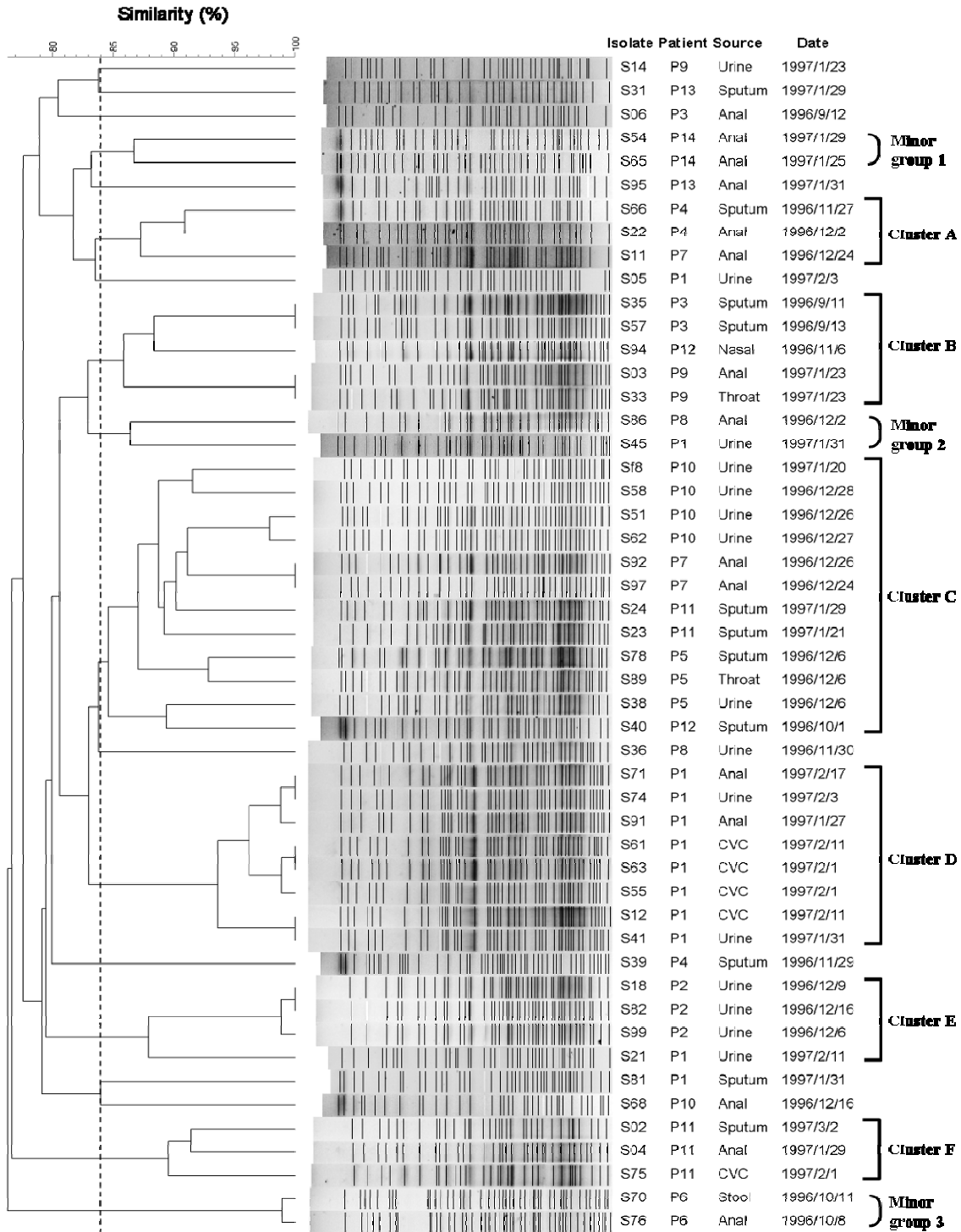


圖 十七、205 株台灣及國際 *C. tropicalis* MLST UPGMA 樹狀圖
(右邊數字顯示為台灣分離株的 eBURST cluster)

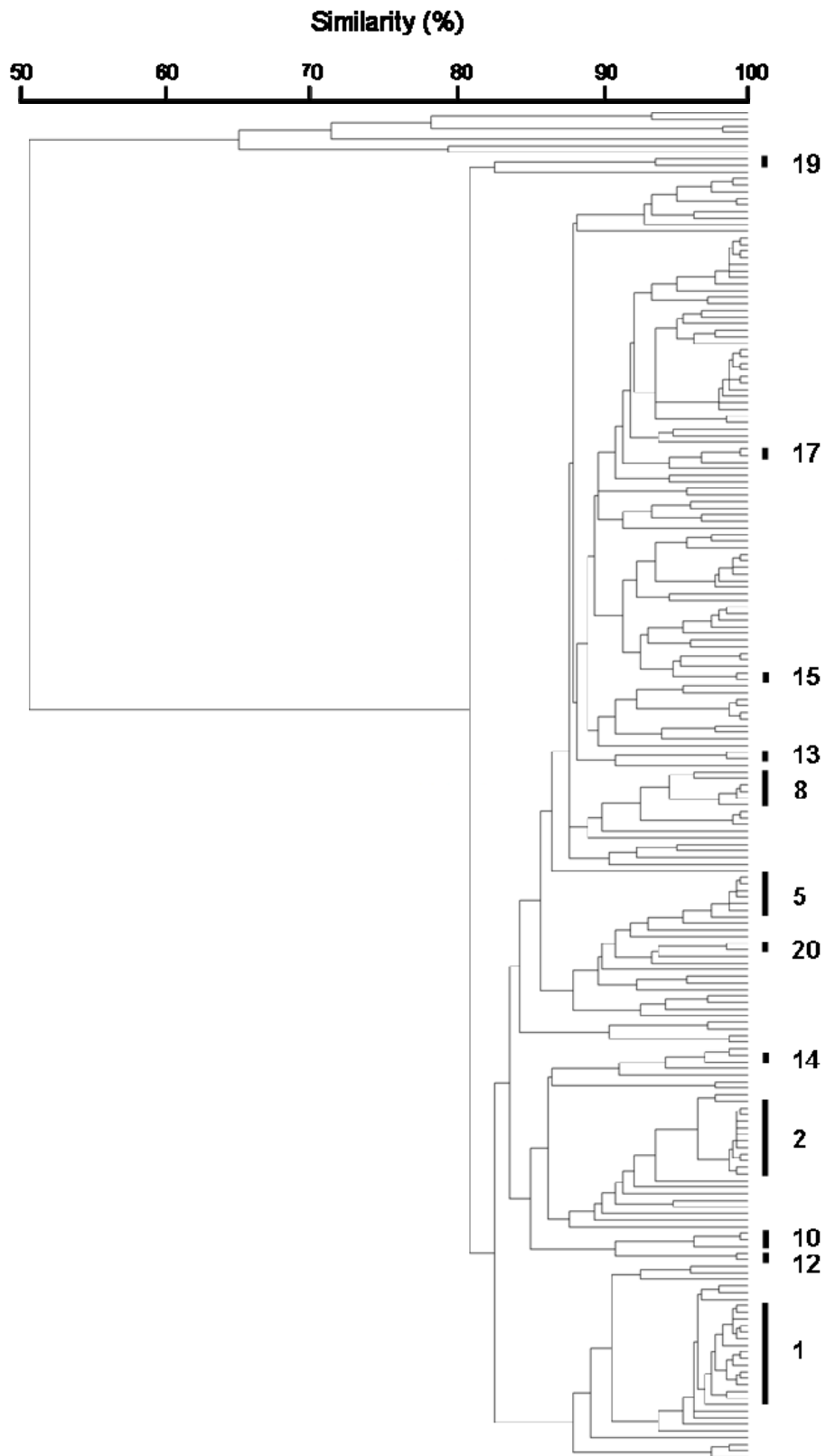


圖 十八、台灣 201 株(1997-2006)*Candida albicans* 的 UPGMA tree
(Clade number 後括弧數為菌株數)

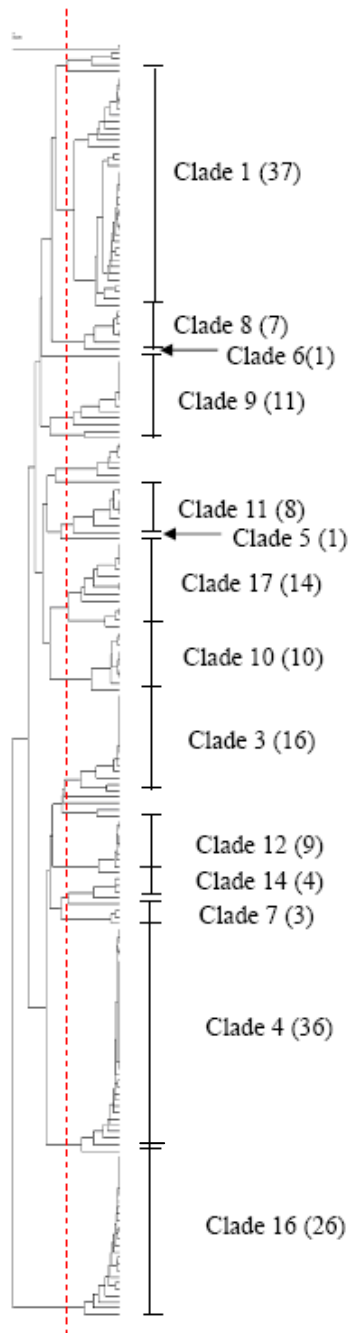


圖 十九、台灣 201 株(1997-2006) *Candida albicans* 的 Minimum Spanning tree

(數字顯示為主要之 clonal cluster)

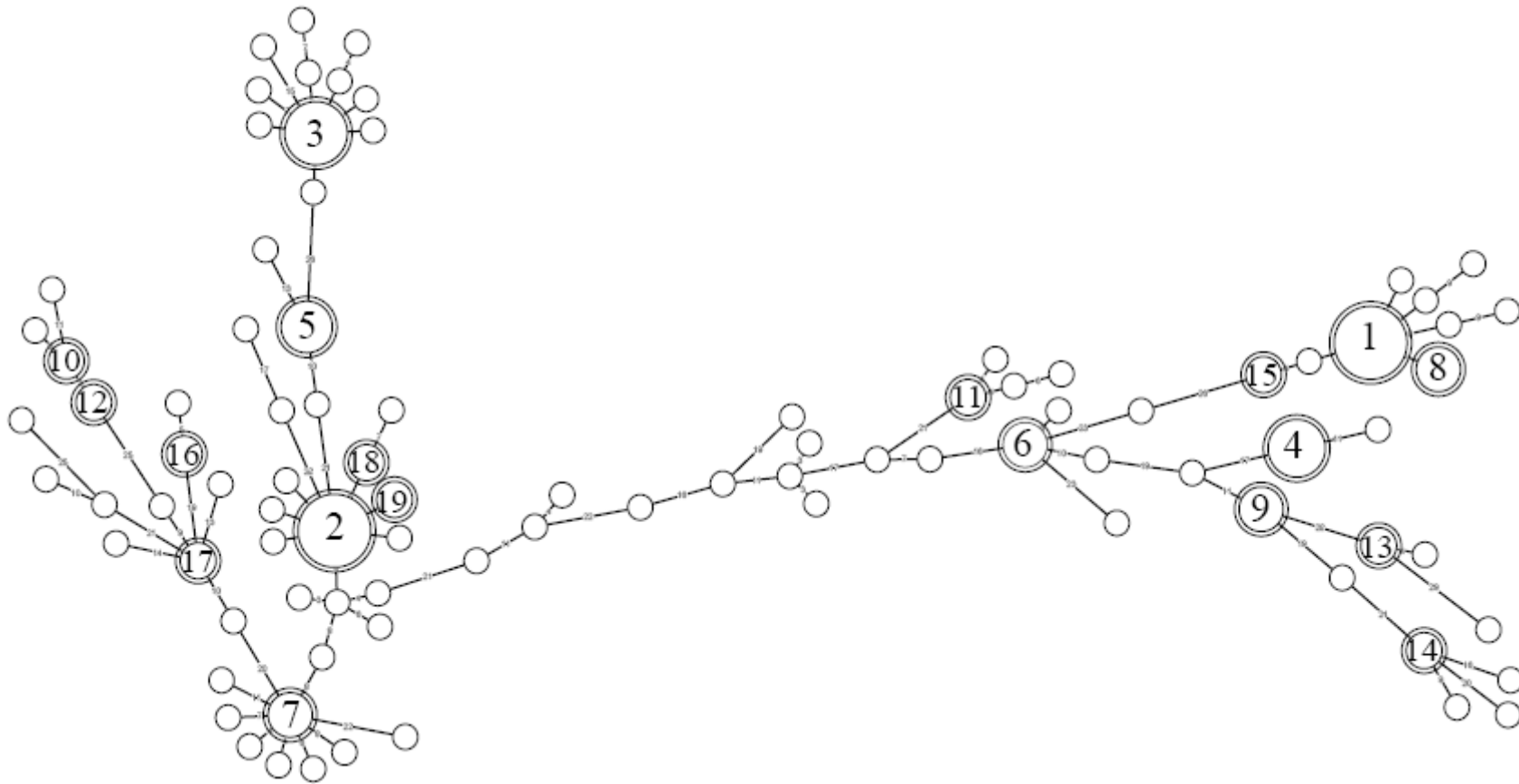


圖 十九 (續) 長方形內數字為 DST 號碼

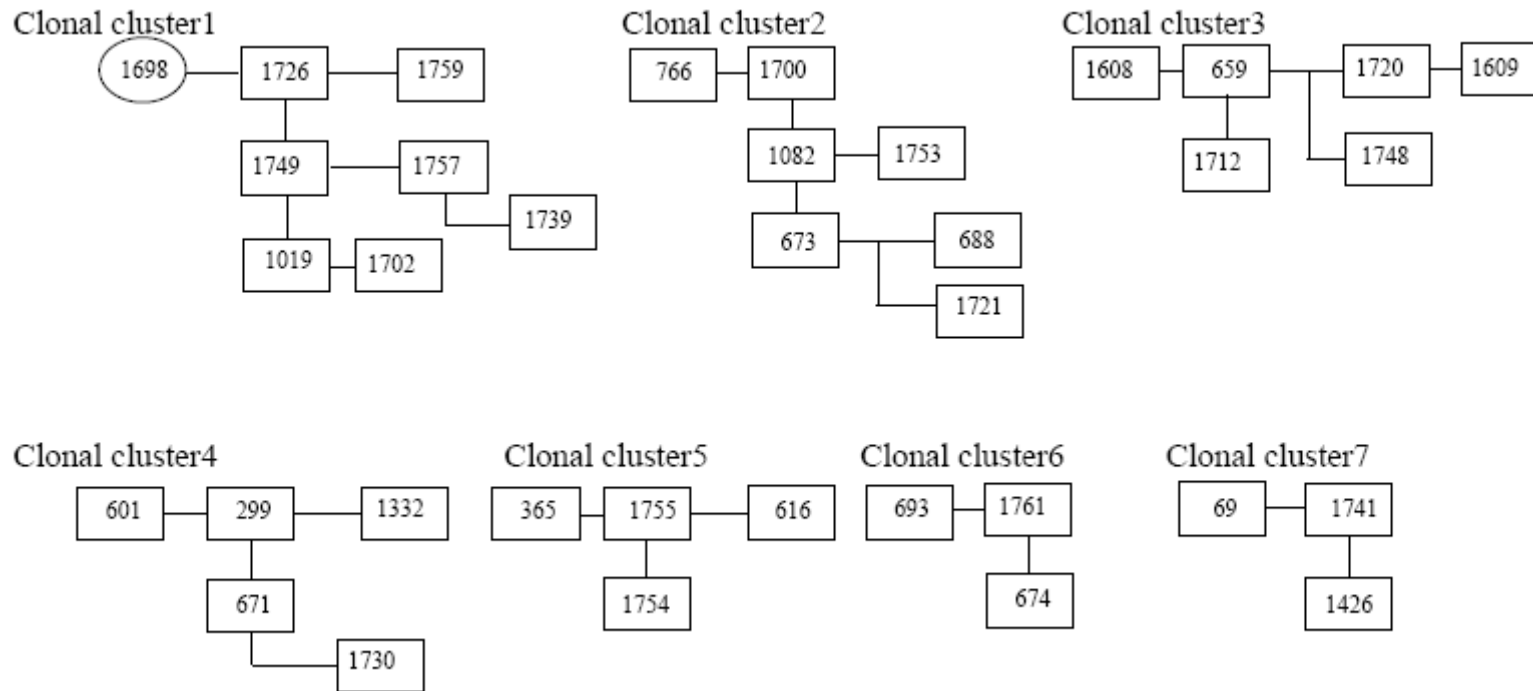


圖 十九 (續) 長方形內數字為 DST 號碼

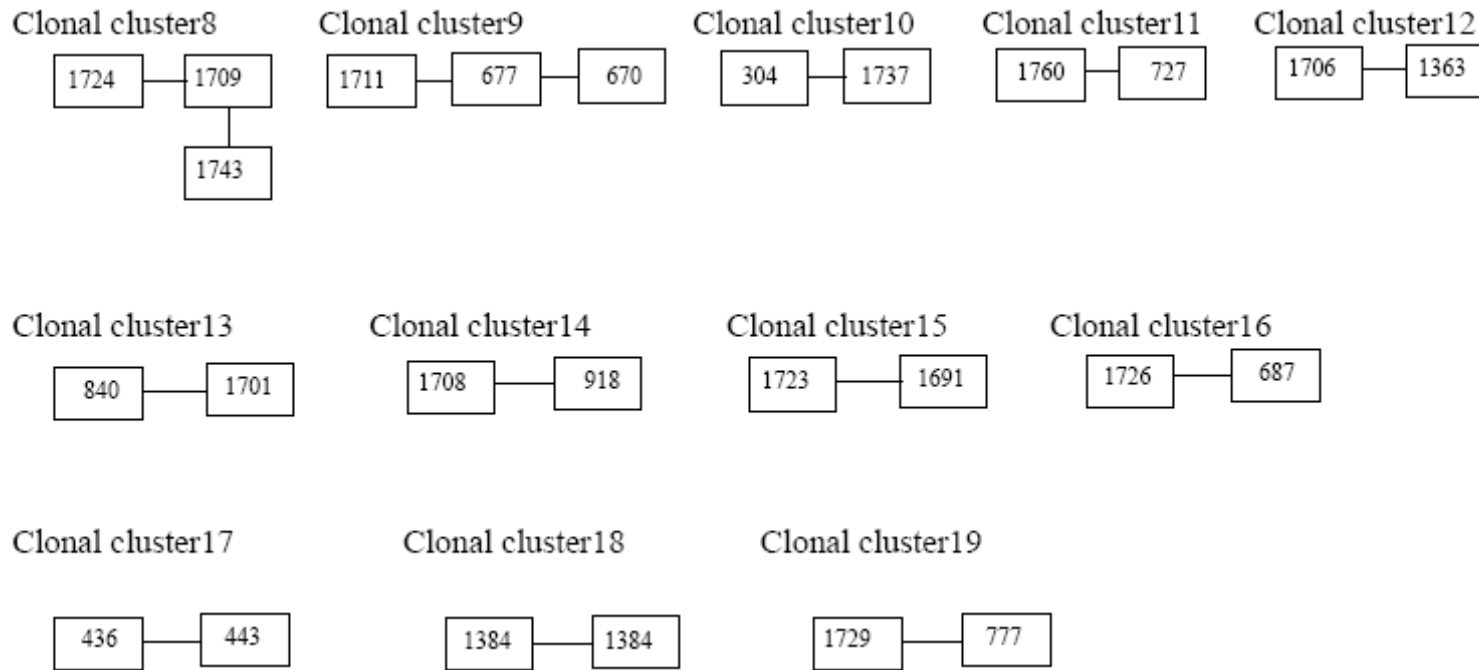
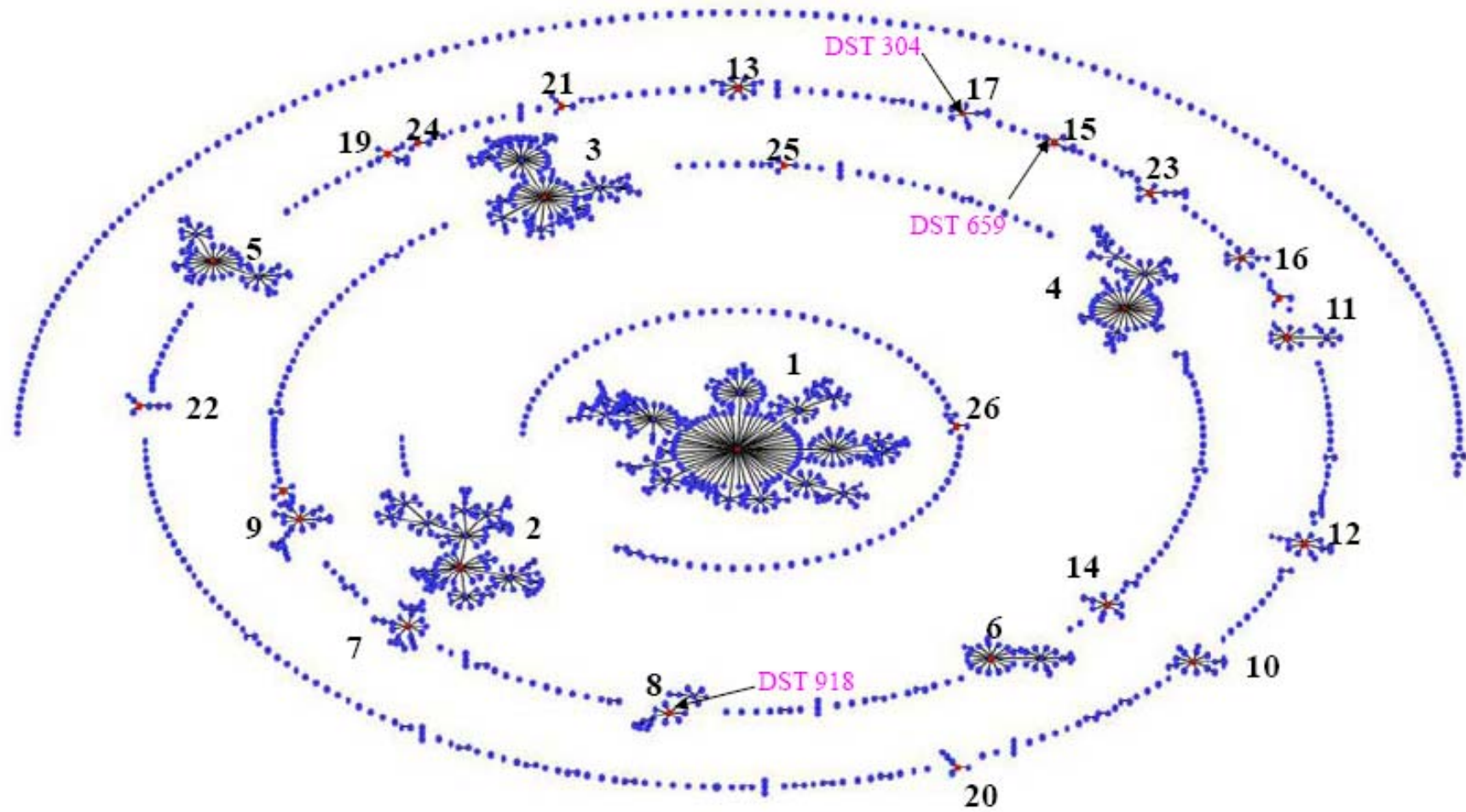
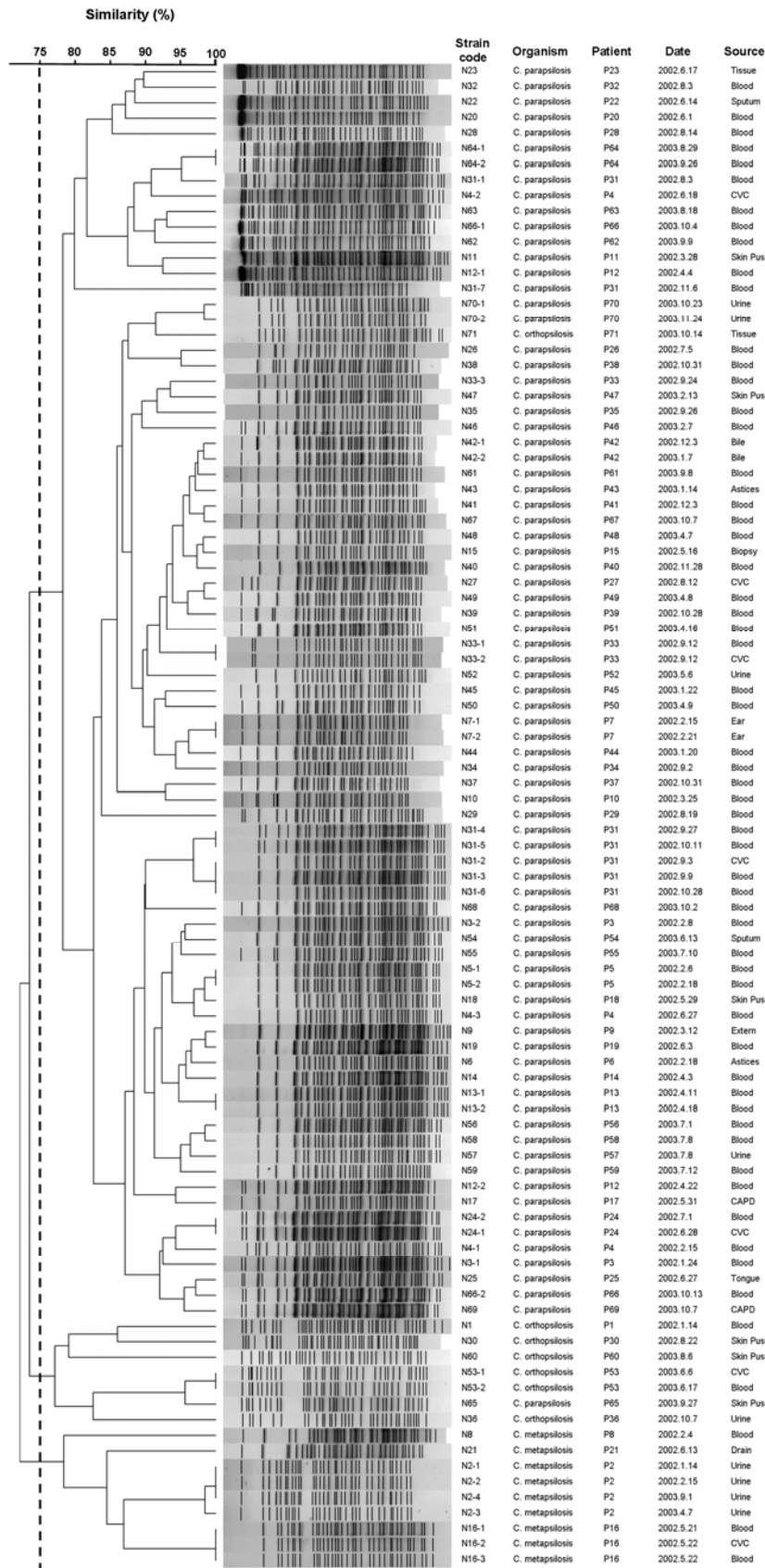


圖 二十、台灣與國際菌株 *Candida albicans* 1508 個 DST 之 eBURST 圖

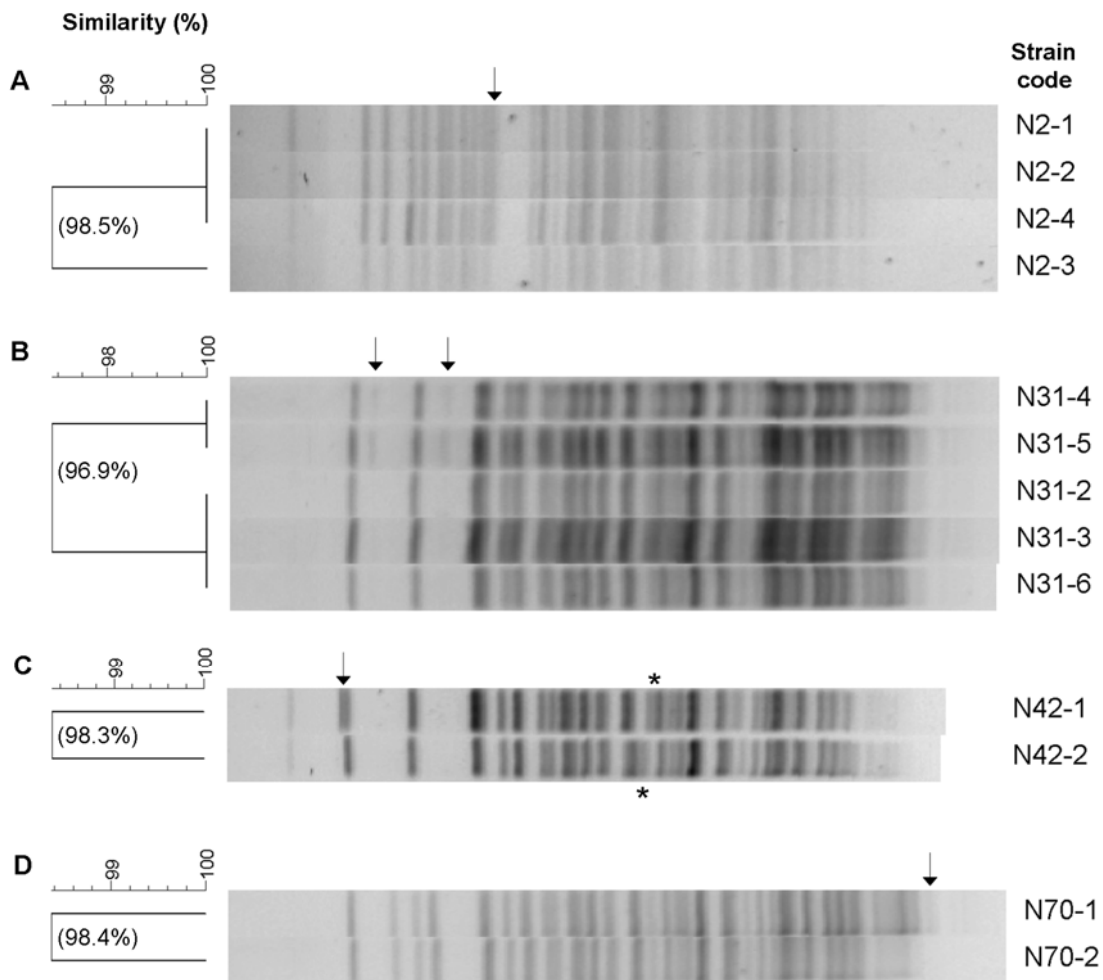
(數字顯示為 clonal cluster 之 group)



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

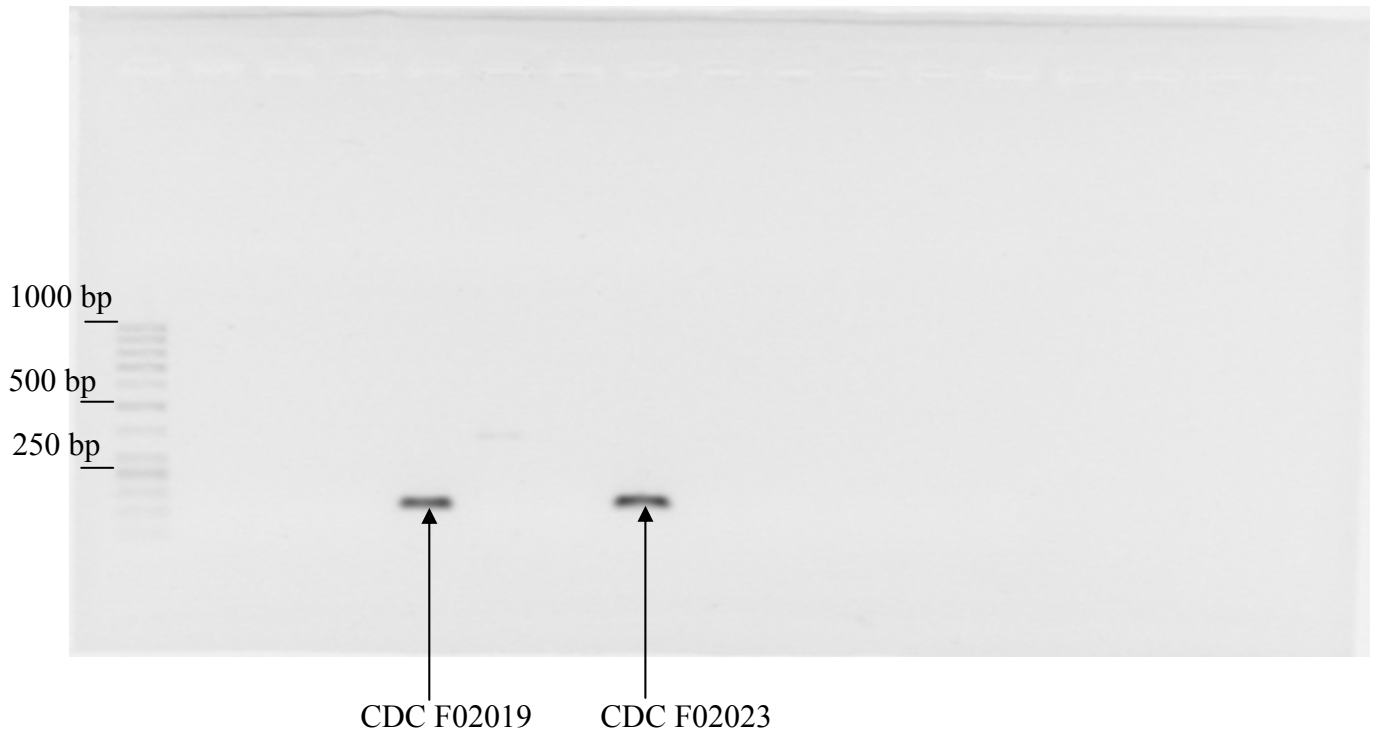


圖二十二、利用 PFGE-*BssHII* DNA 圖譜觀察 *C. parapsilosis* 微演化現象
C. parapsilosis 菌株分別採集自 P2 之尿液(A)、P31 之血液及 CVC(B)、P42 之膽汁(C)與 P70 之尿液(D)。箭頭表示條帶差異，星號為條帶位置之改變。

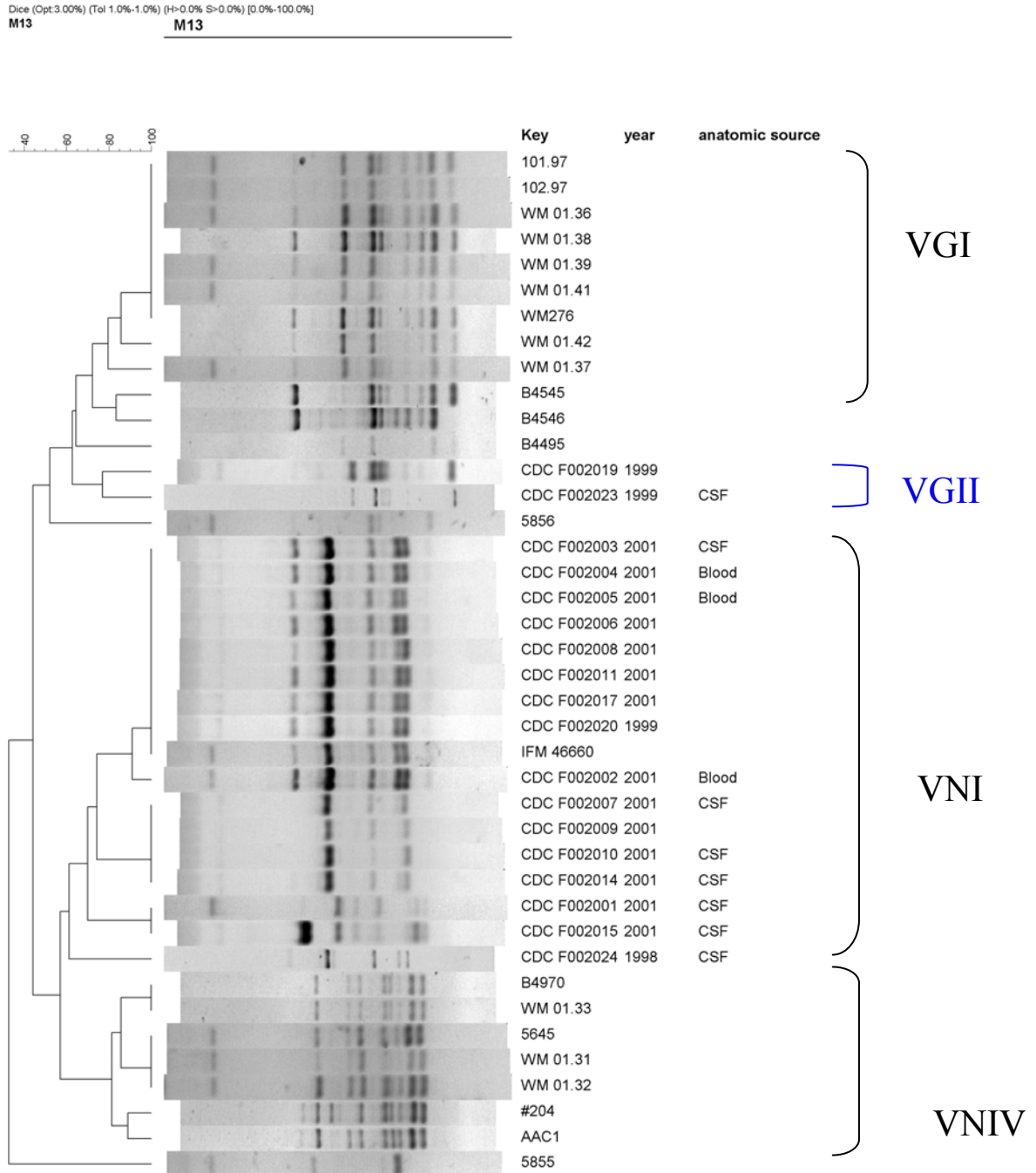


圖二十三、新型隱球菌 *Cryptococcus gattii* VGII 鑑定(IGS)

(大小約在 150 bp 左右有訊號出現即可確定為 VGII)



圖二十四、新型隱球菌分子分型鑑定(M13 typing)

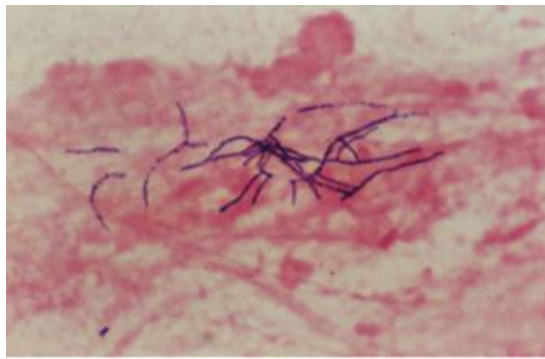


圖二十五、*Nocardia brasiliensis* 的病症表現及診斷細胞學圖

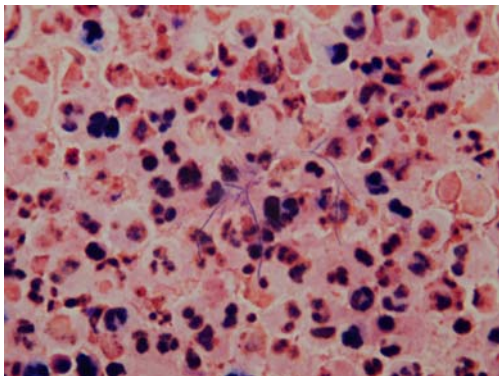
(以 *N. brasiliensis*-3 為例)



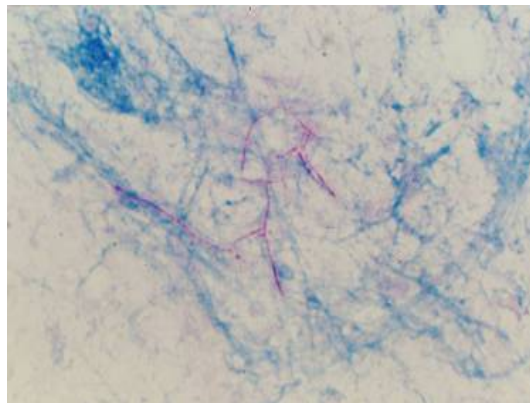
(a)右臂膿皮症



(b) OL: 1000X

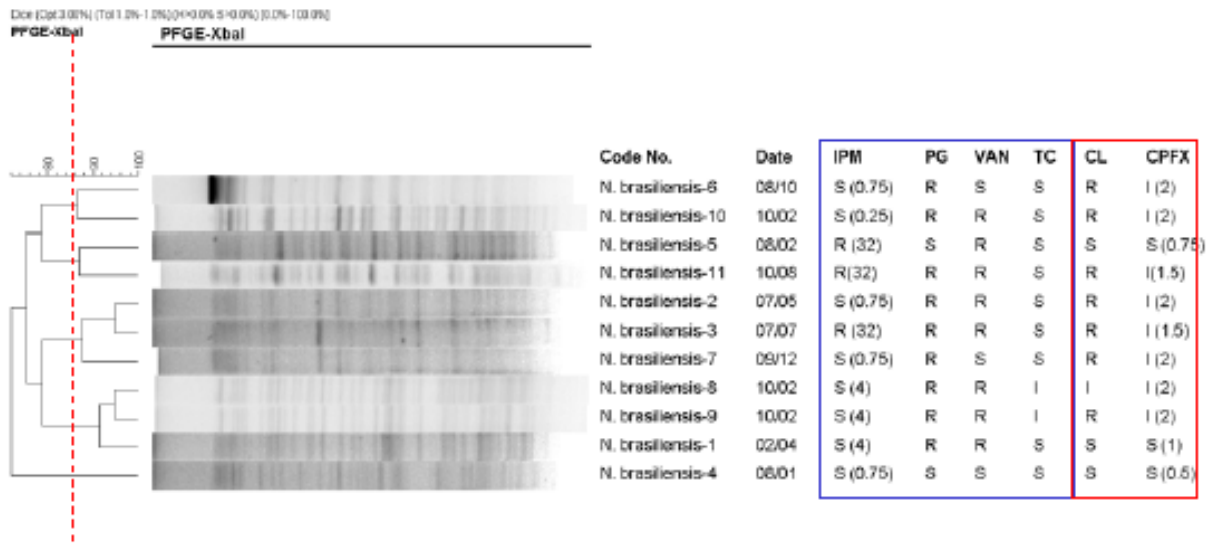


(c) OL: 1000X

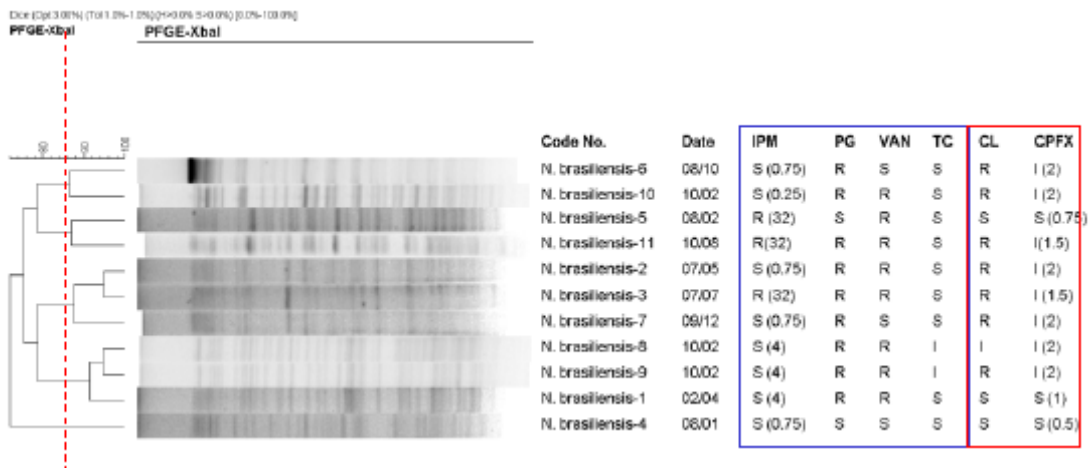


(d) OL: 1000X

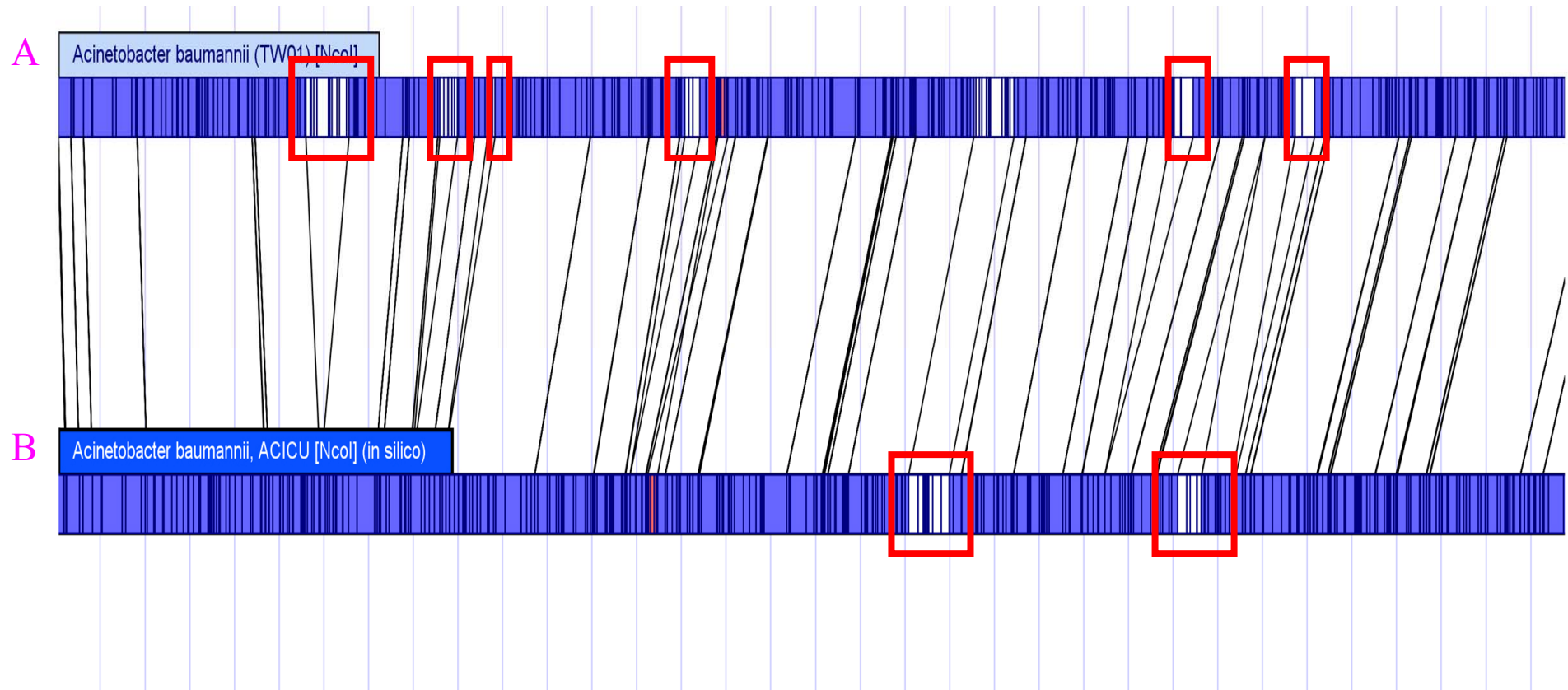
圖二十六、11 株奴卡菌 *Nocardia brasiliensis* 16S rRNA 類緣關係圖



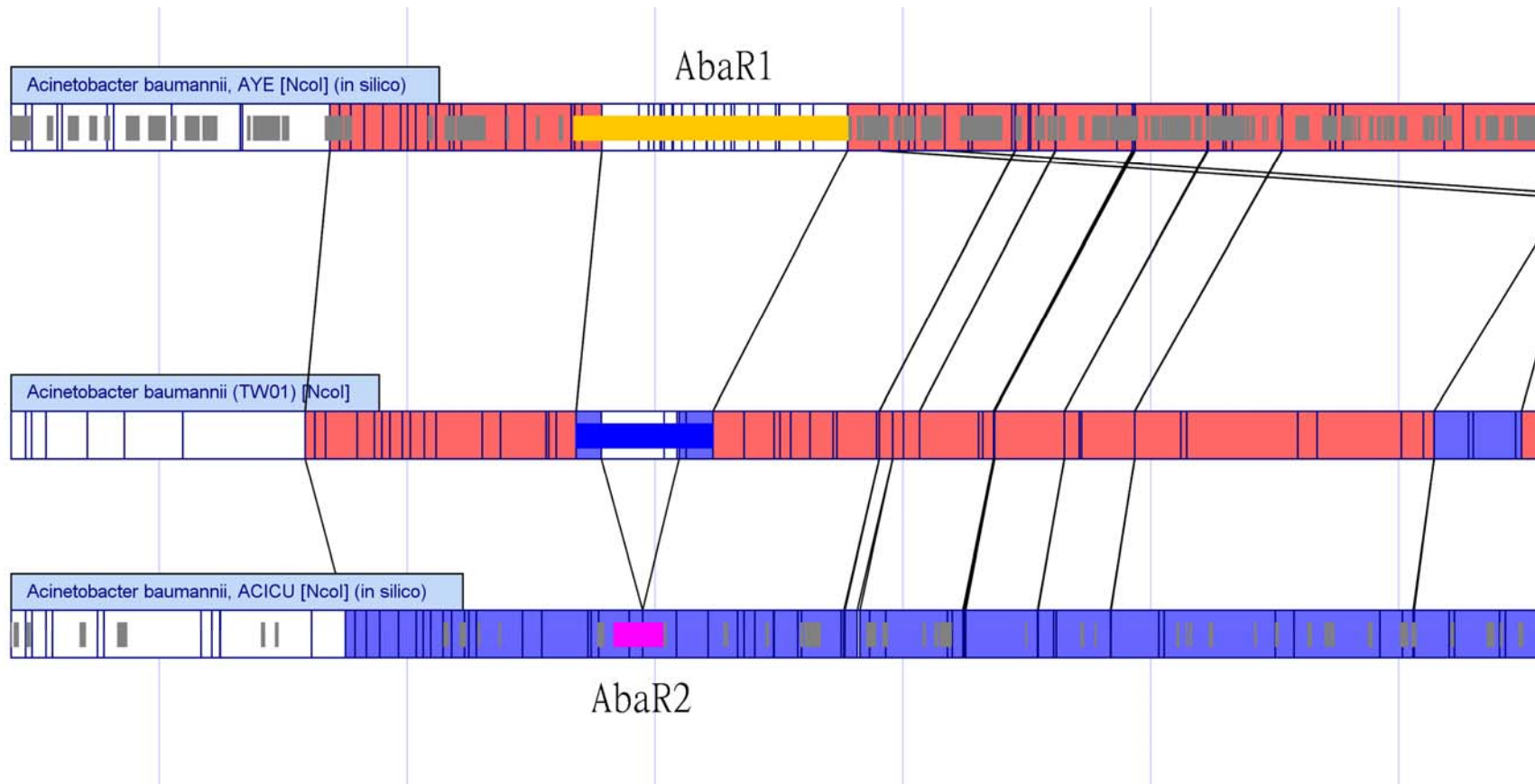
圖二十七、*Nocardia brasiliensis* PFGE-XbaI 類緣關係圖



圖二十八、光學圖譜 Optical Mapping 分析 *Acinetobacter baumannii*



圖二十九、Optical Mapping analysis of Resistance Island in *Acinetobacter baumannii*



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九篇論文 (3 篇 SCI 及 1 篇疫情報導已發表；5 篇 SCI 論文投寄中)，一篇專利(駁回答辯中)。

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. Yee-Chun Chen, Yu-Hsin Lin, Kuo-Wei Chen, Joanne Lii, Hwa-Jen Teng, **Shu-Ying Li*** (2010) Molecular Epidemiology and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in Taiwan ***Diagn Microbiol Infect Dis.* 68: 284-292** (SCI, 通訊作者, Impact factor:2.451, Ranking Microbiol. 45/94, 47.9%, Infect. Dis. 29/57, 50.9%)
7. Yu-Chi Lin, Ko-Chiang Hsia, Yee-Chun Chen, Wang-Huei Sheng, Shan-Chwen Chang, Mei-Hui Liao, **Shu-Ying Li*** (2010) Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter* spp. clinical isolates in Taiwan. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(5) 2078-2084** (SCI, 通訊作者, Impact factor:4.802, Ranking Microbiol. 16/94, 17.02%)
8. Yu-Chi Lin, Wang-Huei Sheng, Yee-Chun Chen, Shan-Chwen Chang, Ko-Chiang Hsia, **Shu-Ying Li*** (2010) Differences in carbapenem-resistant genes among *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* genospecies 3, and *Acinetobacter*

genospecies 13TU in Taiwan. **International Journal of Antimicrobial Agents** 35(5):439-443 (SCI, 通訊作者, Impact factor:3.032, Ranking Microbiol. 31/94, 33%, Infectious Diseases 16/57, 28.1%) (被引用 1 次)

9. Ming-Ching Liu, Chia-En Lien, Ching-Fen Ko, Ung-Chao Lei, Jih-Hui Lin, Shu-Ying Li, Mei-Chu Lee, Jiunn-Shyan Julian Wu, Jenn-Huei Renn, Nan-Yueh Lin, Yeong-Sheng Lee (2010) Hospital Outbreak of Mixed Infection of Influenza Virus and *Mycoplasma pneumoniae* in Hualien, 2009. Taiwan. **Epidemiology Bulletin** 26(18)320-330

專利申請

1. 李淑英, 林鈺棋, 以流式微珠陣列法快速鑑定不動桿菌種類之方法, 案號 20090253128. Filing date 04/03/2008, publication date 10/08/2009, 目前駁回答辯中。

本多年期計畫 95-98 年在真菌及特殊病原研究上計發表 19 篇 SCI 論文

10. **Shu-Ying Li**, Yun-Liang Yang, Yu-Hsin Lin, Hui-Ching Ko, An-Huei Wang, Kuo-Wei Chen, Chih-Wei Wang, Hsin Chi, Hsiu-Jung Lo* Tsary Hospitals (2009) Two closely related fluconazole-resistant *Candida tropicalis* clones circulating in Taiwan from 1999 to 2006. **Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology & Disease**. 15(3):205-10, 2009 Sep (第一作者, Impact factor:1.989, Ranking Infectious Disease 58/94, 61.7%, Infectious Diseases 39/57, 68.4%) (被引用 1 次)
11. Kuo-Wei Chen, Yee-Chun Chen, Yu-Hsin Lin, Hsiao-Hui Chou, **Shu-Ying Li*** (2009) The molecular epidemiology of serial *Candida tropicalis* isolates from ICU patients as revealed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis **Infect. Genetic Evolut.** 9 (5) 912-920 (通訊作者, Impact factor:3.223, Ranking Infectious Diseases 14/57, 24.6%) (被引用 1 次)
12. Wang-Huei Sheng, Yu-Chi Lin, Jann-Tay Wang, Yee-Chun Chen, Shan-Chwen Chang, Ko-Chiang Hsia, Ruei-Jiuan Wu, **Shu-Ying Li*** (2009) Identification of distinct ciprofloxacin susceptibility in *Acinetobacter* spp. by detection of the *gyrA* gene mutation using real-time PCR **Mol. Cel. Probe** 23 (3-4) pp. 154-156 (通訊作者, Impact factor:1.899, Ranking Biomedical 44/65=67.7%, Biotechnol. 74/150, 49.3%) (被引用 1 次)
13. Yun-Liang Yang, An-Huei Wang, Chih-Wei Wang, Wei-Ting Cheng, **Shu-Ying Li**, Hsiu-Jung Lo* (2008) Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in TSARY 2006, **Diagn**

- Microbiol Infect Dis.** 61:175-180 (Impact factor:2.451, Ranking Microbiol. 45/94, 47.9%, Infect. Dis. 29/57, 50.9%) (被引用 8 次)
14. Mette D. Jacobsen, Amanda D. Davidson, **Shu-Ying Li**, Duncan J. Shaw, Neil A.R. Gow, and Frank C. Odds* (2008) Molecular phylogenetic analysis of *Candida tropicalis* isolates by MLST. **Fungal Genetics & Biology** 45:1040-1042 (Note, Impact factor:2.961, Ranking Mycol. 3/19, 15.8%) (被引用 5 次)
 15. Yu-Chi Lin, Wang-Huei Sheng, Jann-Tay Wang, Yee-Chun Chen, Shan-Chwen Chang, Ray-Juan Wu, Ko-Chiang Hsia, **Shu-Ying Li*** (2008) Application of a microsphere-based array for rapid identification of *Acinetobacter* spp. with distinct antimicrobial susceptibilities. **J. Clin. Microbiol.** 46(2):612-617 (通訊作者, Impact factor:4.162, Ranking Microbiol. 18/94, 19.2%). (被引用 7 次)
 16. Chi-Yang Lin, Yee-Chun Chen, Hsiu-Jung Lo, Kuo-Wei Chen, **Shu-Ying Li*** (2007) Assessment of *Candida glabrata* Strain Relatedness by Pulsed-field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing. **J. Clin. Microbiol.** 45(8): 2452-2459 (通訊作者, Impact factor:4.162, Ranking Microbiol. 18/94, 19.2%). (被引用 12 次)
 17. Hsiao-Hui Chou, Hsiu-Jung Lo, Kuo-Wei Chen, **Shu-Ying Li*** (2007) Multilocus Sequence Typing of *Candida tropicalis* Shows Clonal Cluster Enriched in Isolates with Resistance or Trailing growth to Fluconazole **Diagn Microbiol Infect Dis.** 58 (4): 427-433 (通訊作者, Impact factor:2.451, Ranking Microbiol. 45/94, 47.9%, Infect. Dis. 29/57, 50.9%). (被引用 8 次)
 18. Ying-Yan Chen, Chung-Ter Huang, Shu-Man Yao, Yi-Ching Chang, Pei-Wun Shen, Chen-Ying Chou, **Shu-Ying Li*** (2007) Molecular Epidemiology of group A Streptococcus Causing Scarlet Fever in Northern Taiwan. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 58(3): 289-295 (通訊作者, Impact factor:2.451, Ranking Microbiol. 45/94, 47.9%, Infect. Dis. 29/57, 50.9%).(被引用 5 次)
 19. Frank C. Odds*, Marie-Elisabeth Bougnoux, Duncan J. Shaw, Judith M. Bain, Amanda D. Davidson, Dorothée Diogo, Mette D. Jacobsen, Maud Lecomte, **Shu-Ying Li**, Arianna Tavanti, Martin C.J. Maiden, Neil A.R. Gow, and Christophe d'Enfert (2007) Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell** 6(6):1041-1052 (Impact factor:3.806, Microbiology 23/94, 24.5%) (被引用 54 次)
 20. Min-Chih Hsu, Tsun-Mei Lin, Chung-Ter Huang, Mei-Hui Liao, **Shu-Ying Li*** (2007) *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections in Taiwan. **Microbiol Immunol** 51(5) :539-542 (通訊作者, Impact factor:1.562, Ranking Microbiology 73/94, 77.7%; Immunology 107/128, 83.6%). (被引用 2 次)
 21. JS Wang, **Shu-Ying Li**, Y-L Yang, Hsiao-Hui Chou, H-J Lo (2007) Association between fluconazole susceptibility and genetic relatedness among *Candida tropicalis* Isolates in Taiwan.. **J Med. Microbiol.** 56(5):650-653 (Note, Impact factor:2.272, Ranking Microbiology 52/94, 55.3%). (被引用 5 次)
 22. Yu-Chi Lin, Shu-Man Yao, Jer-Jea Yan, Ying-Yan Chen, Chuen-Sheue Chiang, Ho-Sheng Wu, **Shu-Ying Li*** (2007) Epidemiologic shift in the prevalence of pertussis in Taiwan Implications for

- pertussis vaccination. **J Med Microbiol.** 56(4):533-537. (通訊作者, Impact factor:2.272, Ranking Microbiology 52/94, 55.3%). (被引用 4 次)
23. Hsiao-Hui Chou, Chien-Shun Chiou, Kuo-Wei Chen, **Shu-Ying Li*** (2007) The suitable restriction enzymes for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Candida tropicalis*. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 57(4) 451-454 (note, Impact factor:2.451, Ranking Microbiol. 45/94, 47.9%, Infect. Dis. 29/57, 50.9%) (通訊作者). (被引用 3 次)
24. Yu-Chi Lin, Shu-Man Yao, Ying-Yan Chen, Miao-Ju Hsiao, Chen-Ying Chou, Hsun-Pi Su, Ho-Sheng Wu, **Shu-Ying Li*** (2006) Molecular epidemiology of Bordetella pertussis in Taiwan, 1993-2004: suggests one possible explanation for the outbreak of pertussis in 1997. **Microbes and Infection** 8 (8) 2082-2087 (通訊作者, Impact factor:2.757, Ranking: Immunology 64/128, 50.0%; Microbiology 39/94, 41.5%) (被引用 12 次)
25. Ying-Yan Chen, Shu-Man Yao, Chen-Ying Chou, Yi-Ching Chang, Pei-Wun Shen, Chung-Ter Huang, Hsun-Pi Su, **Shu-Ying Li*** (2006) Surveillance of Invasive *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan, 2002-2003 **J. Med. Microbiol.** 2006; 55 (Pt 8):1109-1114. (通訊作者, Impact factor:2.272, Ranking Microbiology 52/94, 55.3%) (被引用 6 次)
26. Kuo-Wei Chen, Yee-Chun Chen, Hsiu-Jung Lo, Frank C. Odds, Tzu-Hui Wang, Chi-Yang Lin, **Shu-Ying Li*** (2006) Multilocus Sequence Typing for Analyses of Clonality of *Candida albicans* strains in Taiwan. **J. Clin. Microbiol.** 44(6):2172-2178 (通訊作者, Impact factor:4.162, Ranking Microbiol. 18/94, 19.2%) (被引用 13 次)
27. Min-Chih Hsu, Pei-Yi Tsai, Kow-Tong Chen, Lan-Hui Li, Chien-Chou Chiang, Jih-Jin Tsai, Liang-Yin Ke, Hour-Young Chen, **Shu-Ying Li*** (2006) Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from Clinical Specimens in Taiwan. **J Med Microbiol.** Mar;55(Pt 3):301-308. (通訊作者, Impact factor:2.272, Ranking Microbiology 52/94, 55.3%) (被引用 15 次)
28. **Li Shu-Ying**, Yang YL, Chen KW, Cheng HH, Chiou CS, Wang TH, Lauderdale TL, Hung CC, Lo HJ. (2006) Molecular Epidemiology of Long-term Colonization of *Candida albicans* Strains from HIV-infected Patients. **Epidemiology and Infection** 134(2):265-9 (第一作者, Impact factor:2.365, Ranking Infectious Disease 31/57, 54.4%, Public Health 39/122, 32.0%) (被引用 7 次)

附錄二：圖表目錄

表 一、試驗菌株.....	89
表 二、微珠陣列系統偵測絲狀真菌DNA的最低濃度.....	91
表 三、Bacterial and fungal strains used in this study.....	92
表 四、廣效性的簡併性引子(degenerate primers)序列.....	93
表 五、用來鑑定四種常見院內感染病原菌的探針序列.....	93
表 六、相同比例多重病原偵測結果.....	94
表 七、臨床 <i>Acinetobacter</i> 菌種 55 株之Real-time PCR Tm值、 <i>gyrA</i> 基因的QRDR序列與ciprofloxacin的最小抑制濃度測試.....	94
表 八、臨床 81 株 <i>Acinetobacter</i> spp.之carbapenemase相關基因及imipenem的最小抑制濃度.....	95
表 九、7 株具MBL基因 <i>Acinetobacter</i> spp.之E-test MBL結果與imipenem水解測試... ..	95
表 十、胜肽鑑定分析.....	96
表十一、偵測多重抗藥性菌株所用引子.....	97
表十二、75 株不動桿菌臨床菌株的抗藥性樣式.....	98
表十三、75 株不動桿菌臨床菌株的抗藥性基因.....	99
表十四、各種鮑氏不動桿菌的抗藥性.....	100
表十五、台大 50 株 <i>Candida. tropicalis</i> 分離株之菌株資料及藥敏試驗結果.....	101
表十六、201 株 <i>Candida albicans</i> Clade與不同phenotype之關係.....	102
表十七、 <i>C. albicans</i> 臨床菌株對 5 種抗真菌藥物之抗藥性.....	103
表十八、 <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> 與 <i>C. metapsilosis</i> 菌株分布及其分離部位.. ..	103
表十九、 <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> 菌株的藥敏性測試.....	104
表二十、 <i>Nocardia brasiliensis</i> 菌株基本資料.....	105
圖 一、利用微珠陣列系統測試鑑定絲狀真菌菌株.....	106
圖 二、以微珠陣列系統偵測多重絲狀真菌混合實驗.....	107
圖 三、以spiked的血液測試微珠陣列系統運用臨床檢驗可行性及靈敏度.....	107
圖 四、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.....	108
圖 五、流式微珠陣列之流程圖.....	109
圖 六、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.....	110
圖 七、以流式微珠陣列偵測 <i>P. aeruginosa</i> 與 <i>Acinetobacter</i> spp. 之multiplex PCR產物.....	111
圖 八、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.....	111
圖 九、四個 <i>Acinetobacter</i> spp.菌株 <i>gyrA</i> 基因的QRDR序列排列(Alignment)。.....	112
圖 十、10 株 <i>Acinetobacter</i> spp.臨床菌株之 Melting-curve分析.....	112
圖 十一、7 株具MBL基因 <i>Acinetobacter</i> spp.菌株之PFGE分析.....	113
圖 十二、3 株具MBL基因 <i>Acinetobacter</i> genospecies 13TU菌株之E-test MBL分析.. ..	113
圖 十三、SDS-PAGE分析 3 株具MBL基因的 <i>Acinetobacter</i> genospecies 13TU之OMPs.....	114

圖 十四、 <i>bla</i> _{OXA-23} 和 <i>bla</i> _{OXA-66} 在 <i>A. baumannii</i> ATCC15151 之表現.....	114
圖 十五、台大 50 株 <i>Candida tropicalis</i> 分離株的 MLST 分析	115
圖 十六、台大 50 株 <i>Candida tropicalis</i> 分離株的 PFGE 分析	116
圖 十七、205 株台灣及國際 <i>C. tropicalis</i> MLST UPGMA 樹狀圖	117
圖 十八、台灣 201 株(1997-2006) <i>Candida albicans</i> 的 UPGMA tree	118
圖 十九、台灣 201 株(1997-2006) <i>Candida albicans</i> 的 Minimum Spanning tree	119
圖 二十、台灣與國際菌株 <i>Candida albicans</i> 1508 個 DST 之 eBURST 圖	122
圖二十一、台大 97 株 <i>Candida parapsilosis</i> 分離株的 PFGE- <i>BssHII</i> 分析	123
圖二十二、利用 PFGE- <i>BssHII</i> DNA 圖譜觀察 <i>C. parapsilosis</i> 微演化現象.....	124
圖二十三、新型隱球菌 <i>Cryptococcus gattii</i> VGII 鑑定(IGS).....	125
圖二十四、新型隱球菌分子分型鑑定(M13 typing)	126
圖二十五、 <i>Nocardia brasiliensis</i> 的病症表現及診斷細胞學圖	127
圖二十六、11 株奴卡菌 <i>Nocardia brasiliensis</i> 16S rRNA 類緣關係圖	128
圖二十七、 <i>Nocardia brasiliensis</i> PFGE- <i>XbaI</i> 類緣關係圖	128
圖二十八、光學圖譜 Optical Mapping 分析 <i>Acinetobacter baumannii</i>	129
圖二十九、Optical Mapping analysis of Resistance Island in <i>Acinetobacter baumannii</i>	130