

出國報告（出國類別：研究）

病原真菌抗藥性敏感性試驗及放線菌鑑定技術之建立

服務機關：行政院衛生署疾病管制局

姓名職稱：陳國緯 聘任研究助理

派赴國家：日本

出國期間：97年05月11日至97年06月07日

報告日期：97年09月03日

## 摘要

四週的研習活動主要至千葉大學真菌真菌醫學研究中心的系統化學、真菌感染、高分子活性、真菌資源開發、機能形態等部門進行相關學習，研習重點主要區分為四個項目。

### 一、病原真菌抗藥性檢測：

從菌種培養、培養基配製、抗真菌劑準備及稀釋、菌液濃度之調整及 MIC 值之判定等步驟，以 CLSI guideline 的內容為主軸並搭配日本的 JSMM 的標準，於菌液調整及 MIC 值之判定等項目均有修正的方法。

### 二、放線菌鑑定系統之建立：

放線菌屬間的鑑定主要是利用化學分類法，*Nocardia*種間分類主要是利用生理生化學性狀、藥劑感受性以及分子生物學遺傳基因之方法。

### 三、檢體組織漿菌之鑑定：

學習膠凝集法(LA)、免疫擴散法(ID)、補體結合試驗(CF) 及酵素結合免疫吸附法 (ELISA)等血清診斷方法。

### 四、真菌菌株保存：

觀摩學習各種菌株保存技術，由於真菌菌株的多樣性，發展多種菌種保存之技術有其必要性。

目次

壹、目的-----	4
貳、過程-----	5
參、心得與建議事項-----	11

## 壹、目的

學習主題期望能對研究及檢驗業務有所幫助，抗藥性檢測有助於檢驗分析所有念珠菌屬的抗藥性，若有其他重要的絲狀真菌亦能分析比較。病原性放線菌檢驗不僅涵蓋所有屬的放線菌且包括奴卡氏菌，若有檢體窗口來的奴卡氏菌株需鑑定，完整的檢驗流程能做正確的鑑定。隨著國際間交流更為頻繁，一些外來的高病原性的真菌受到重視，其種類包含粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)及組織漿菌(*Histoplasma capsulatum*)，又組織漿菌流行涵蓋範圍更廣，因此檢體組織漿菌之血清診斷技術更形重要。

## 貳、過程

出國研習前已事先與三上所長就學習內容做多次聯繫與溝通，期望學習主題能對研究及檢驗業務有所幫助，因此所有的研習項目都能很順利的進行。為期四週的研習活動主要至系統化學、真菌感染、高分子活性、真菌資源開發、機能形態等部門學習，分為四個主題，真菌抗藥性檢測由宇野博士指導，放線菌鑑定之實驗由矢澤博士指導，組織漿菌鑑定由龜井教授指導，菌株保存技術由橫山准教授指導，指導方式是以實驗操作或是內容講解，因此依主題分項敘述。

### 1. 酵母型真菌及絲狀真菌抗藥性檢測：

酵母型真菌抗藥性檢測，其實驗流程為先於SDA培養 1-2 天 → 稀釋抗真菌藥（濃度依藥的種類而有不同，Fluconazole及Flucytosine為 0.125-64 ug/ml，Miconazole, Micafungin與Amphotericin B為 0.03-16 ug/ml，Itraconazole與Voriconazole為 0.015-8 ug/ml）→ 調整菌液最適濃度至  $0.5-2.5 \times 10^3$ ，調菌溶液用 0.85%NaCl溶液 → 35°C 培養(培養基採用RPMI1640)→於 24 及 48hrs的時間點測 OD530nm。

絲狀真菌抗藥性檢測，其步驟相似於酵母型真菌抗藥性檢測，其中有四個部分有些差異，(1)培養的步驟至產生孢子為止，有時要歷時一週左右。(2)調菌液用 0.85%NaCl+0.05%Tween80，使菌液中的孢子更能分散。(3)使用過濾器濾除菌液中的菌絲而留下孢子，過濾器的選用可採用Iwaki G1 的玻璃材質漏斗形過濾器，孔徑為 160-250  $\mu\text{m}$ 。(4)調整之菌液最適濃度為  $0.4-5 \times 10^4$ ，因絲狀真菌生長較為緩慢，因此接種的菌液濃度較為高。

抗真菌藥最小抑制濃度 MIC 值的判定，參考日本 JSMM 改良之標準判定區分為五個等級，其百分比為真菌生長濃度之百分比。以 20%的生長濃度的做為 MIC 最終濃度之判定標準，其方法是 OD530nm 測量值輔以目測判斷。

+++ : 100%(positive control)

++ : 80%

+ : 20%

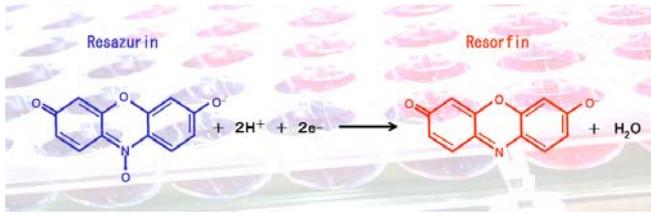
± : 5-10%

- : 0%(negative control)

35 °C 培養時間依菌種不同而有差異，酵母狀真菌中的 *Cryptococcus neoformans* 72hrs，絲狀真菌的接合菌 *Rhizopus spp.* 21-26 hrs, 皮膚真菌 *Pseudallescheria boydii* 70-74 hrs。

爲了要讓濃度判讀更易觀察及正確，利用化學反應變色的方法來幫助 MIC 判定亦不失爲一個好方法，極東化學製藥的 ASTY 抗藥性檢測套組，原理是 Resazurin 指示劑原本是藍色的，與真菌生長後產生氧化還原反應後產生紅色的 Resorfin(圖一)。另外也絲狀真菌檢測也可利用另外一種 alamar blue 藍色變爲紅色的氧化還原指示劑幫助判別。

圖一、Resazurin 指示劑自藍色變為紅色之反應方程式



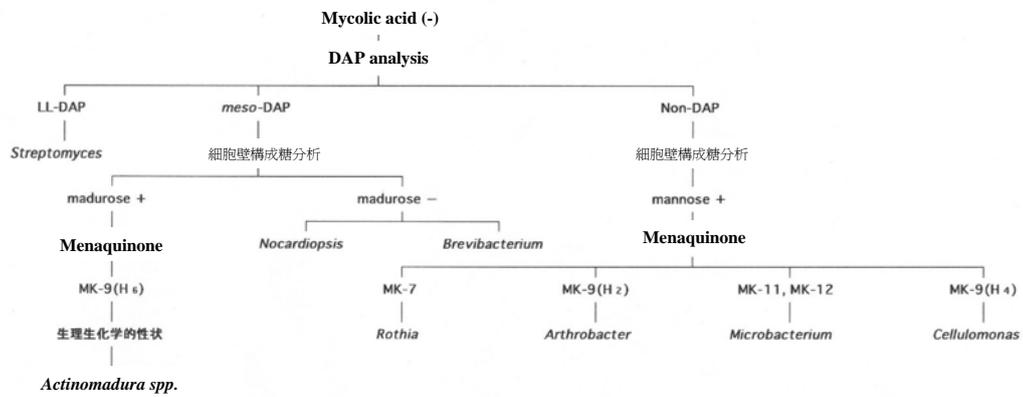
## 2. 放線菌鑑定系統之建立

放線菌屬間的鑑定主要是利用化學分類法(圖二及圖三)，*Nocardia*種間分類主要是利用生理生化學性狀、藥劑感受性以及分子生物學遺傳基因之方法。

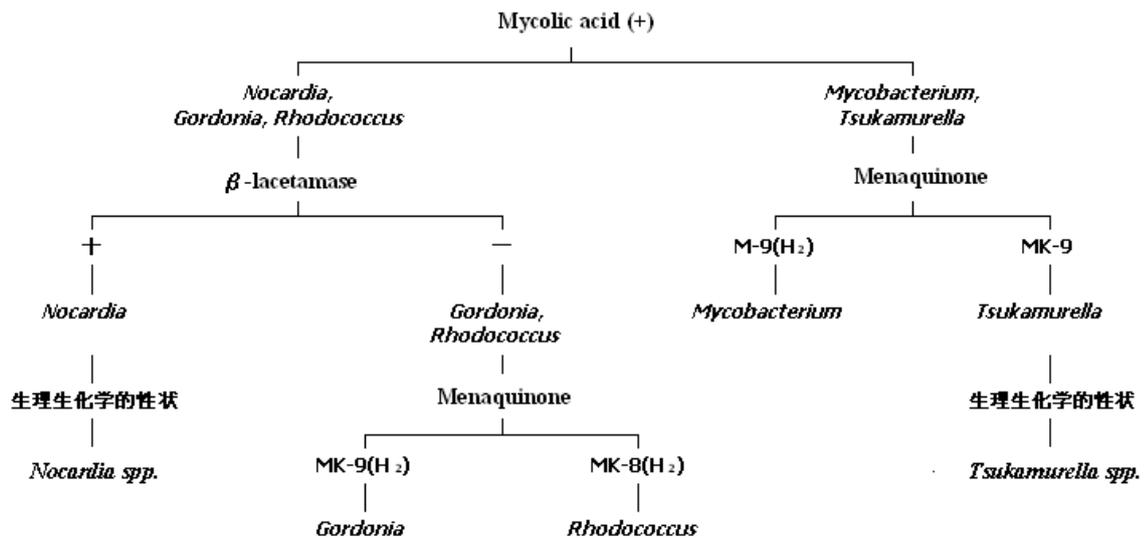
### a. 化學分類法：

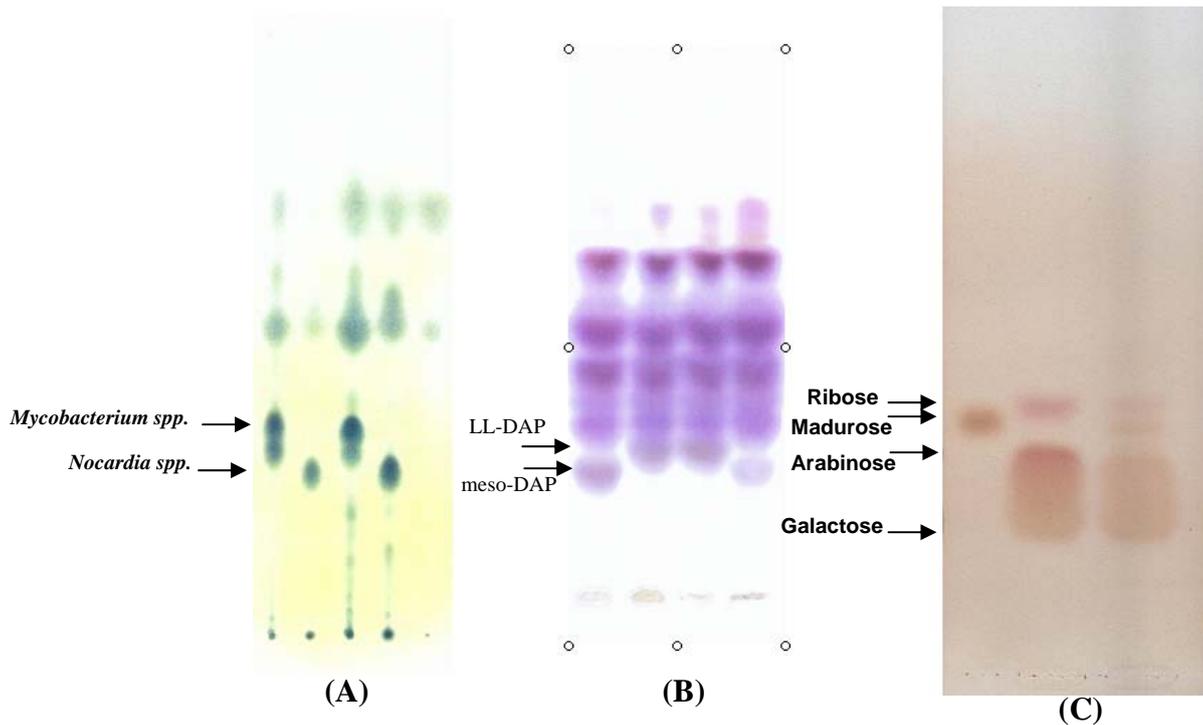
包含Mycolic acid assay、Menaquinone assay、Diaminopimelic acid(DAP)、細胞壁構成糖之分析，針對不同的細胞構成成分利用薄層分析法來區分(圖四)。

圖二、放線菌屬不含 Mycolic acid 的鑑定流程



圖三、放線菌屬含 Mycolic acid 的鑑定流程



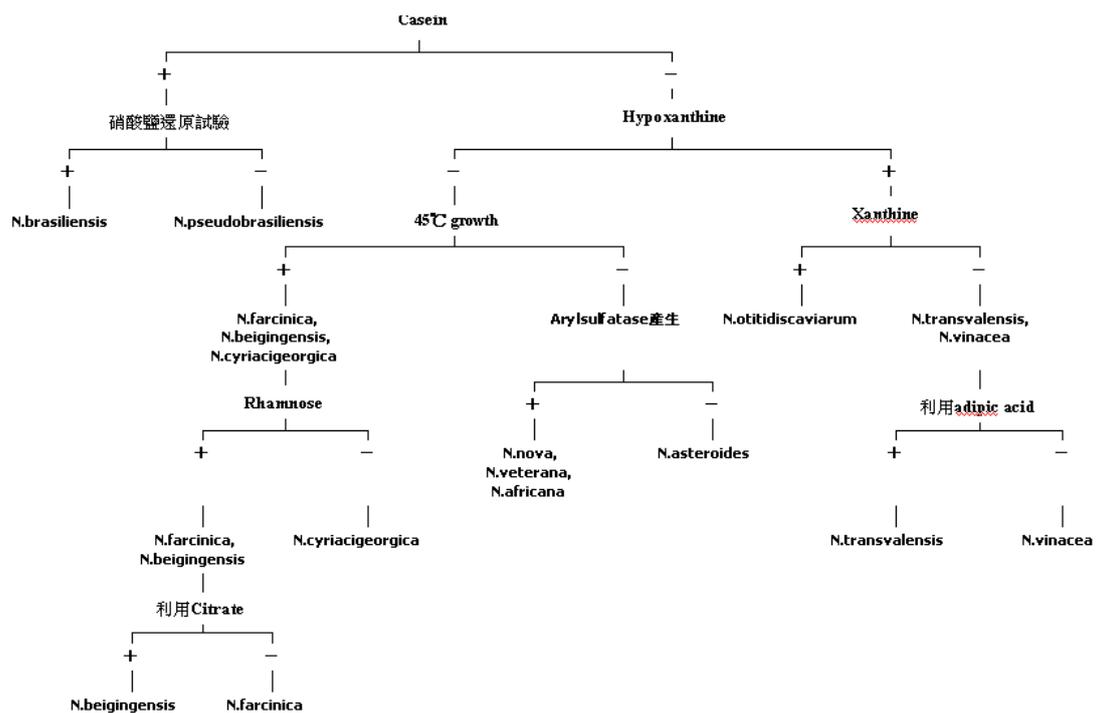


圖四、化學鑑定法之薄層分析(A)Mycolic acid assay (B)DAP assay (C)細胞壁構成糖分析

b.生化反應分類法：

培養基試驗(adenine, hypoxanthine, tyrosine, xanthine, casein, urea)、利用糖產酸試驗、45°C在MulHinten Agar是否能生長、利用citrate試驗、Arylsulfatase試驗、 $\beta$ -lacetamase試驗及硝酸鹽還原試驗等(圖五)。

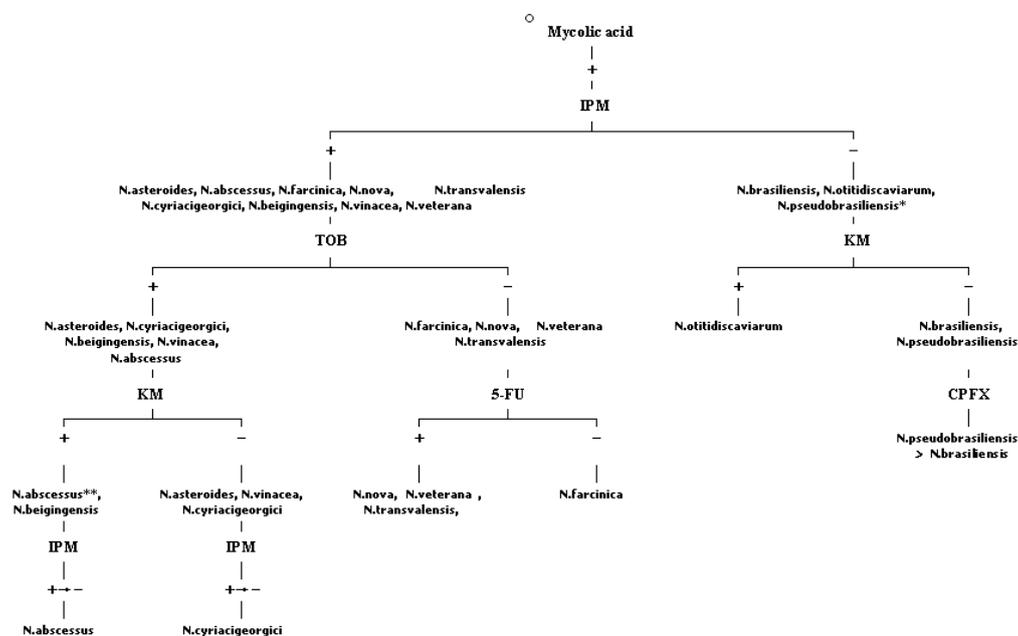
圖五、Nocardia spp. 鑑定之生化反應試驗之流程圖



b. 藥劑感受性：

利用六種抗生素之感受性來區分 *Nocardia spp.*，抗生素有 Imipenem (IPM)、Tobramycin (TOB)、Kanamycin (KM)、ciprofloxacin (CPFX)、Gentamycin (GM) 及 5-fluorouracil (5-FU) (圖六)。

圖六、*Nocardia spp.* 鑑定之藥劑感受性試驗之流程圖



c. 分子生物學遺傳基因法：

分析16SrDNA與gyrB基因序列並做成系統樹分析，將未知菌與資料庫內所有其它菌株比較，做為分類比較之依據。

3. 檢體組織漿菌之鑑定

組織漿菌依據病原體微生物危險性等級屬於 RG3，為双形性之真菌，自然環境下為菌絲形，於宿主体內變為酵母形。主要流行之地區在美國中央部密西西比溪谷至俄亥俄溪谷、中南美洲、東南亞、澳洲、歐洲及中非洲，分佈的地區廣。病原性組織漿菌區分為三種，*H. capsulatum var. capsulatum*, *H. capsulatum var. duboisii* 及 *H. faciminosum*。台灣及日本主要的感染病原菌為 *H. capsulatum var. capsulatum*，而中非洲為 *H. capsulatum var. duboisii*。本菌存在於土壤、蝙蝠及鳥類的糞便中，因此在污染地區的土木建築工地以及到有蝙蝠生存的洞窟進行探險較有集體感染的情形發生。

可用以培養的檢體來源為血液、咳痰、支氣管肺泡灌洗液(BALF)、膿、肺組織及骨髓等，菌生長緩慢需時 4-6 週。

血清診斷的的檢體來源為血清、尿、腦脊髓液及 BALF 等，診斷方法可用乳膠凝集法(LA)、免疫擴散法(ID)、補體結合試驗(CF) 及酵素結合免疫吸附法(ELISA)。LA 及 ID 可直接用 IMMY 的檢驗套組做，ID 法較為耗時需置於 25°C

條件下反應 48hrs 後觀察結果。CF 法是使用 IMMY 的 Antigen (Yeast 及 Mycelial) 以及生研的補體檢測套組，血清檢體的稀釋濃度範圍 1:2-1:256，對照組稀釋濃度範圍 1:2-1:16，陽性反應的判讀條件為必需血清檢體陽性，對照組為陰性，否則結果為偽陽性。ELISA 分析使用兩種抗原 AntigenH 及 AntigenM，依序加入檢體及二抗後測 OD450nm，因為目前還沒有建立 cutoff 值，只做為抗體的比較試驗用。

#### 4. 真菌菌株保存

因為真菌的種類非常多且與細菌相較有較複雜的胞器構造，菌種保存對於保有生物材料以及將來做研究是相當重要的，因此了解各種菌種保存方法是相當重要的課題，因此將各種菌種保存方法詳列如下。

##### (1) 斜面培養基繼代培養保存法

定期繼代特別是皮膚絲狀真菌，注意要定期更換培養基。

##### (2) 液態石蠟多層保存法

液態石蠟經過 121°C, 60mins 高壓滅菌後，再於 170°C, 60mins 乾熱滅菌，經冷卻後加入 1-2cm 至真菌生長的斜面培養基，乾燥及阻隔氧氣之影響，使細胞保持在休眠狀態。

##### (3) 滅菌水保存法

有旋蓋的試管加二次水經滅菌後，取孢子或酵母細胞置入滅菌水中呈懸濁狀，若為絲狀真菌的菌叢部則切 3-4mm 大小直接浸入水中。

##### (4) 凍結保存法

為了防止凍結時對細胞的傷害，於溶媒中加 10% DMSO 或 glycerol，保菌管中菌液濃度為  $10^7$ - $10^8$  cells/ml，降溫速度以 1°C/min 降至 -30°C，之後再置入冷凍庫內。菌株若要回溫使用，可置於 40°C 條件下急速解凍。

##### (4) 液態氮保存法

保存的溫度最低，優點是保存效果好，缺點是需定期補充液態氮及管理複雜。

##### (5) 矽膠保存法

有旋蓋的試管加入 180°C, 60mins 乾熱滅菌加入 3-4g 無色矽膠及藍色數顆的矽膠作為乾燥程度的指標，加入 5% 脫脂乳內含菌溶液，因矽膠吸水性高可瞬間使管內乾燥，達到保存之目的。

##### (6) 土壤保存法

土壤去除雜物後加入 25% 水，經 121°C, 60mins 高壓滅菌後，置常溫可作為皮膚絲狀真菌長期安定之保存。

##### (7) 凍結乾燥保存法

菌株加入脫脂乳等保護劑，於 -30 至 -70°C 真空凍結乾燥，去除細胞內自由水使生理反應停止，封管後於 5-7°C 保存，此方法適用於酵母型真菌，若是絲狀真

菌採用 L-乾燥保存法。

(8)L-乾燥保存法

此方法之特徵於真空凍結之條件下仍保持液態以避免凍結之傷害，過程為加菌於乾燥補助劑(Phosphate buffer 中含 5% monosodium glutamate, 5% lactose, 6% PVP(polyvinylpyrrolidone K-30), 0.1% polyetherpolyol 等成分)，之後塞入棉花，於真空乾燥兩小時後封管。

## 參、心得與建議

此次出國的研習活動收穫十分豐碩，真菌抗藥性檢測雖然 CLSI 有 M27-A2 針對酵母型真菌及 M38-A 針對絲狀真菌的 guideline，但有些實驗之細節及結果判定的經驗及注意事項是非常重要的。放線菌的鑑定部分，從培養基的使用到化學分類、生化反應分類至抗生素敏感度試驗等，不僅能正確鑑定菌株且能提供送驗單位之參考。組織漿菌在病原體微生物危險性等級屬於 RG3，疾病流行的範圍廣，東南亞都涵蓋其範圍內，雖然免疫力較差易感染此病原，但致死率高必需注意。以亞洲鄰近國家日本為例，從以往累積至今的 58 個病例中，死亡率高達 31.3%，相較其他外來的高危險性的真菌症之球孢子菌症(coccidioidomycosis)與副球孢子菌症(paracoccidioidomycosis)，近 3 年來有大幅上升之趨勢。由文獻記載不僅台灣近幾年來也有零星個案發生，且大多是經由國外旅遊而感染，因此建立血清診斷及 DNA 檢驗技術是必要的。當有外來的未知真菌菌株，必需經過正確的鑑定才將菌株保菌入庫，日本方面的做法是綜合形態鑑定、ITS 定序與 DNA chip 等結果，才判定菌株種類。我們目前的做法是結合 ITS 定序及生化反應，有些絲狀真菌的形態鑑定正逐步建立中。

從回國至今已針對所學的技術落實於研究及檢驗上，將酵母型及絲狀真菌抗藥性檢測的完整技術建立在實驗室，因抗藥性對真菌的分子流行病學探討非常重要，有些之前自其他機構蒐集的菌株，即使缺少抗藥性資料也可自行完成抗藥性之檢測。放線菌的奴卡氏菌屬已完成 13 株標準菌株及 6 株臨床菌株的生化反應及藥劑感受性試驗。

由於技術建立是此次研習之目標，基於此原則有以下建議事項：

- 一、真菌抗藥性試驗不僅在於臨床菌株之抗藥性測試，希望未來能落實於 CAP 的檢測的項目中。
- 二、除了目前持續建立奴卡氏菌屬的鑑定方法外，繼續完成放線菌屬的鑑定方法。
- 三、組織漿菌的鑑定方法建立方面，先完成血清診斷(LA, ID 及 CF)及 DNA 的檢驗方法，之後再建立 ELISA 鑑定方法。
- 四、目前實驗室菌種保存採用滅菌水保存法及凍結保存法，未來隨著菌株種類的多樣性，可考慮其他的保菌方法並評估其存活率。