

2010 年台灣黴菌抗藥性監測計畫和共生於愛滋病患
口腔中黴菌的分布與對抗黴菌製劑的感受性

Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts of 2010 and
the distribution and antifungal agent susceptibility of yeast oral
colonization in HIV-infected patients

研究生：陳慧婷

Student : Hui-Ting Chen

指導教授：楊昶良

Advisor : Dr. Yun-Liang Yang

羅秀容

Dr. Hsiu-Jung Lo

國立交通大學

分子醫學與生物工程研究所

碩士論文

A Thesis

Submitted to Institute of Molecular Medicine and Bioengineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

in

Biological Science and Technology

July 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國 一 百 年 七 月

國立交通大學

分子醫學與生物工程研究所 碩士論文

2010 年台灣黴菌抗藥性監測計畫和共生於愛滋病患
口腔中黴菌的分布與對抗黴菌製劑的感受性

Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts of 2010 and
the distribution and antifungal agent susceptibility of yeast oral
colonization in HIV-infected patients

研究生：陳慧婷

學號：9829513

指導教授：楊昶良 博士

羅秀容 博士

中 華 民 國 100 年 7 月

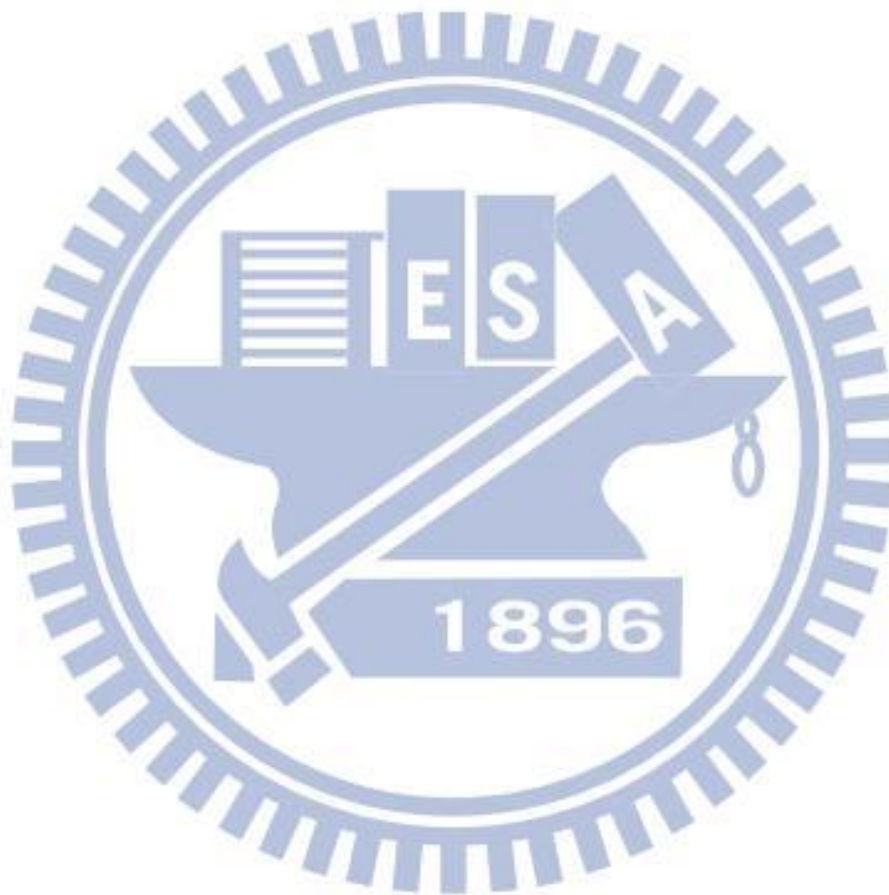
中文摘要

有鑑於念珠菌產生的抗藥性已日益嚴重，故本論文藉由 2010 台灣黴菌抗藥性監測觀察念珠菌分布及對藥物感受性。收集由全台灣 24 家醫院的檢體所分離出的 1124 個臨床菌株中，*Candida albicans* 佔全體 38.0% (427/1124)，其次依序為 23.8% *Candida tropicalis* (267/1124)，23.0% *Candida glabrata* (258/1124)，7.9% *Candida parapsilosis* (89/1124)，1.6% *Candida krusei* (18/1124)，和 25 種其它種類的菌 5.8% (65/1124)。其中受到黴菌菌株感染的部位以尿液比例最高(45.8%)，其次分別為血液(19.4%)和痰液(12.8%)等。利用肉湯稀釋法進行藥物感受性，根據美國臨床實驗室國家標準委員會 (CLSI) 判定標準，有 89 (8.4%) 個臨床菌株對 fluconazole 具抗藥性，78 (7.3%) 個臨床菌株對 voriconazole 具抗藥性，同時對 fluconazole 和 voriconazole 皆具有抗藥性的菌株共 49 株，其中包括 44 株 *C. tropicalis*，3 株 *C. albicans*，2 株 *C. glabrata*，根據歐洲藥檢委員會 (EUCAST) 對 *C. albicans*，*C. tropicalis*，*C. parapsilosis* 的判定標準，有 74 (7.9%) 個臨床菌株對 fluconazole 具抗藥性，48 (6.4%) 個臨床菌株對 voriconazole 具抗藥性，同時對 fluconazole 和 voriconazole 皆具有抗藥性的菌株共 23 株，其中包括 17 株 *C. tropicalis*，5 株 *C. albicans*，1 株 *C. parapsilosis*。5 (0.5%) 株對 anidulafungin 有抗藥性，1 (0.09%) 株對 amphotericin B 有抗藥性。此外，由中國醫藥大學附設醫院、義大醫院、成大醫院的愛滋病患(HIV-infected patients)口腔棉花拭子取得的 716 個檢體中所分離出的 494 個黴菌菌株中一共有 25 個不同的菌種，包括 70.1% *C. albicans* (350/494)，依序為 8.1% *C. glabrata* (40/494)，7.9% *Candida dubliniensis* (39/494)，4.3% *C. tropicalis* (21/494)，1.4% *C. parapsilosis* (7/494)，和 7.5% 20 個其它種類的菌種 (37/494)。利用肉湯稀釋法對 fluconazole 其最小抑菌濃度 ≥ 64 mg/L 視為具抗藥性，有 18 (4.0%) 株臨床菌株對 fluconazole 產生抗藥性；對 voriconazole 最小抑菌濃度 ≥ 4 mg/L 視為具抗藥性，有 13 (2.9%) 株臨床菌株對 voriconazole 產生抗藥性；對 amphotericin B 最小抑菌濃度 > 1 mg/L 視為具抗藥性，有 1 (0.2%) 株臨床菌株對 amphotericin B 產生抗藥性。

Abstract

The emergence of drug resistance by *Candida* species has become an important issue. To study the trend of distribution of *Candida* species and drug susceptibility, we have conducted Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts in 2010. Among the 1124 isolates collected from 24 hospitals, there were 38.0% *Candida albicans* (427/1124), 23.8% *Candida tropicalis* (267/1124), 23.0% *Candida glabrata* (258/1124), 7.9% *Candida parapsilosis* (89/1124), 1.6% *Candida krusei* (18/1124), and 8.37% 25 other different species (89/1124). The most common source of infection was urine (45.8%), followed by blood (19.4%) and sputum (12.8%). The susceptibility to antifungal drugs was determined by broth microdilution methods. 89 (8.4%) of them were resistant to fluconazole and 78 (7.3%) were resistant to voriconazole. There were 49 isolates coresistant to fluconazole and voriconazole, including 44 *C. tropicalis*, 3 *C. albicans*, and 2 *C. glabrata* among the 1124 isolates. According to the breakpoint of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 74 (7.9%) of the clinical isolates were resistant to fluconazole, and 48 (6.4%) of them were resistant to voriconazole. There were 23 isolates coresistant to fluconazole and voriconazole, including 17 *C. tropicalis*, 5 *C. albicans*, and 1 *C. parapsilosis*. According to the breakpoint of European committee for antimicrobial susceptibility. 5 (0.5%) of the clinical isolates were resistant to anidulafungin and 1 (0.09%) of them were resistant to amphotericin B. A total of 716 oral swabs were collected from HIV-infected patients in China Medical University (CMU) Hospital, E-DA Hospital, and National Cheng Kung University (NCKU) Hospital. There were 494 yeast isolates composed of 25 different species. They were 70.9% (350/494) *C. albicans*, 8.1% (40/494) *C. glabrata*, 7.9% (39/494) *Candida dubliniensis*, 4.3% (21/494) *C. tropicalis*, 1.4% (7/494) *C. parapsilosis*, and 7.5% (37/494) consisting of 20 different

species. The drug susceptibility of these isolates have been determined by broth microdilution according to the guidelines of CLSI.18 (4.0%) of clinical isolates were resistant (minimal inhibited concentration ≥ 64 mg/L) to fluconazole, 13 (2.9%) of them were resistant (minimal inhibited concentration ≥ 4 mg/L) to voriconazole, 1 (0.2 %) were resistant (minimal inhibited concentration $\geq > 1$ mg/L) to amphotericin B.



致謝

從第一天開始著手寫論文時就不時想起大家這兩年來的照顧，很開心在楊老師實驗室學到老師引導如何自主學習和羅老師實驗室學習有效率進行實驗和數據分析，也很感謝徐維莉老師答應當口試委員並對論文提供寶貴的意見，還有梁美智老師總是可以一針見血看出問題所在，很有熱心和耐心指導學生的疑問。

剛開始到國衛院的時候認識了很多新朋友(餐廳夥伴馬靈和育果)很開心，最需要謝謝的就是妍寧和惠菁學姊囉，記得我常為了咪聽的投影片而你為了實驗在實驗室奮戰到半夜，有時候還有啟宏哥義氣相挺，三個人伴著微弱的路燈回宿舍，真是熱血~(一直偷住惠菁學姐的宿舍真拍謝)! 謝謝有肩膀的好厝邊德斌(我知道你不喜歡我們叫你大媽 所以我絕對~不會宣揚的)，樣樣都難不倒你(尤其是冷知識)不管是實驗和廚藝上的切磋，都有你的熱心協助，我一定會帶好吃的東西回去孝敬你的；還有初到國衛院才幾天就因為做實驗太晚沒有交通車回家，還有揪甘心司機志兆送回家；好久不見的瑋婷，看著你和琬瑜、丁丁一起為大家伸張正義，鏟奸除惡(我就不指名道姓了 你說是不是阿 綺紅哥)，真是大快人心阿；琬立總是帶可愛小孩出來聚會，熱愛棒球的思璇，昇樺也適應的很好，加油喔；人生總是在下班後，謝謝壁球室的夥伴們：莊老師，楊老師，裕傑和啟宏哥，也懷念和大家一起看足球的時光(現在週末待在家還會習慣轉到體育台)，我愛百鄉鍋燒意麵、吉佈德香腸、環市路臭臭鍋、頂好四神湯(讓我就算在新竹還是想回竹南打包帶走)，還有相見恨晚的李家實驗室的大家，謝謝江大善人這個生統達人常常關心我要不要訂便當，人有沒有這麼好哇；阿啾啾周末都會低調的來做實驗，讓我覺得我不是孤單的(希望你實驗可以快點告一段落)，還有黃培培，你是我心中最貼心的man姐，多少個晚上都跑去妳房間聊天，隔天又打起精神去做實驗，這一切都隨著你出國我工作而不再存在，不過我會一直記得你說過的話~>.^

小楊家的大家最可愛了~阿大一點都不大，內心明明就住了小女孩，體貼的要命；永遠的一姐整個很Q彈 (不要問為什麼，這是一種fu)，希望你早日完成時

驗，你實力超堅強，懂很多分生大智慧；林重延這個紅茶半半哥，你不要再染白髮了，不然我每次跟別人說你是博班學長大家都相信我也沒辦法，祝你早日順利完成口試，當兵變瘦；幸璇是我心目中的拼命三娘(雖然說當一哥馬西耶賽)，標準牡羊座，對什麼事情都好奇有衝勁，每次聽你咪聽時連珠炮和跟老師的互動真的是糾促咪，最愛聽你流利講台語(尤其罵人的時候 嘿)，尤其是學超人特攻隊保母Kelly那一段堪稱經典代表作，小楊家的座位我會幫你鞏固好(不就是把東西亂放疊高高)；方太太你這個神祕的小東西(指)，心口不一的程度讓我很想唱~叫我不”揍”你也難~，不過最感謝你這麼包容我(幾乎是有求必應的程度拉)，希望最認真做實驗的你，唱歌明明就很好聽的你，最近在閉關忙論文的你(還有...一直怕掉髮的你)，未來的一切都心想事成唷~~劉阿白是小楊家燈塔，很愛半夜做實驗(沉思難道是有助實驗進行的秘技!?)，難怪你的實驗那麼順!我的頭號粉絲劉凱薩現在應該頂著光頭在新訓囉，平常最愛看閒書又比我早畢業真是太令人羨慕了吧~春榮神的威力在我心裡大概僅次於交大土地公了，多虧了你讓我這個電器殺手的論文檔案在口試前都沒有出現差錯，整個很罩得住的一個超man學弟；小氣小氣別生氣，雖然林重延每次都看著你喊著我的名，不過我想你在他心目中的地位更重要(咦 沒有人要爭阿)，我們兩個綜藝咖真是相知相惜，只有你懂我(啾)，子喬、克威、游青都好認真，我永遠作夢都想不到會在實驗室遇到大學同學(形象差很大，哈)；我要永遠當大家的小善姐姐。

此外也感謝氣質小琉球教我生統，我想...隔行如隔山就是這這意思吧...，感謝家人對我照顧有加，讓我說嘴到實驗室的大家也都認識妳們，在畢業前適時的督促我論文進度，輪流電話問候的結果就是，都還沒畢業就先去工作拉，蠟燭兩頭燒雖然壓力大但是也很充實，實驗室的訓練讓我在工作上有很大的幫助，希望學校實驗室的大家都可以盡早有計畫的先規劃自己的未來，不要怕吃苦，先苦後甘阿，共勉之~

很少熬夜的我，寫到都要天亮了，大家早安，挖杯睏哪~

目錄

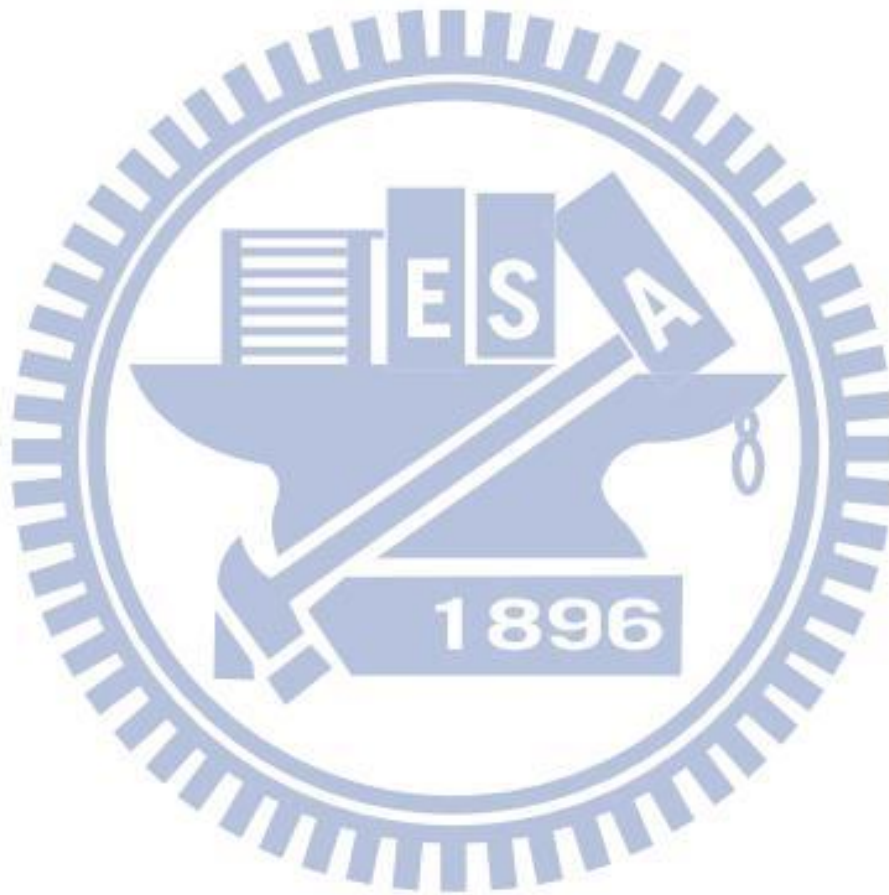
中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
致謝.....	IV
目錄.....	VI
圖目錄.....	X
表目錄.....	VI
一、緒論.....	1
1. 念珠菌菌相.....	1
2. 治療念珠菌感染常使用之抗真菌製劑.....	2
3. 抗藥性的現況.....	3
二、材料與方法.....	5
1. 引子.....	5
2. 藥品試劑.....	5
3. 儀器設備.....	6
4. 臨床菌株的收集，培養和鑑定.....	8
4.1 2010年全國性黴菌抗藥性監測.....	8
4.2 成大醫院、中國醫藥大學附設醫院、義大醫院三家醫院的臨床愛滋病患口 腔檢體的收集.....	9
4.3 微鐵克 2 酵母菌鑑定卡.....	9
4.4 聚合酶連鎖酵素反應.....	10
4.5 製備藥盤.....	10
4.6 肉湯微稀釋法測定臨床菌株的最小抑制濃度分別以美國臨床實驗室國家標準 委員和歐洲藥敏試驗委員會利用肉湯微稀釋法測定臨床菌株的最小抑菌濃度	11
4.7 分別以美國臨床實驗室國家標準委員和歐洲藥敏試驗委員會利用肉湯微稀	

測定臨床菌株的最小抑菌濃度.....	13
三、結果.....	17
1. 2010 全國黴菌抗藥性監測計畫臨床菌株的菌種分布.....	17
2. 利用CLSI和EUCAST方法了解臨床黴菌菌株對抗黴菌製劑的感受性	18
2.1 臨床黴菌菌株對 azoles 類抗黴菌製劑的感受性.....	18
2.1.1 臨床黴菌菌株對 fluconazole 的感受性.....	18
2.1.2 在 Fluconazole 的 Trailing growth 現象.....	19
2.1.3 臨床黴菌菌株對 voriconazole 的感受性.....	20
2.1.4 在Voriconazole的Trailing growth 現象.....	21
2.2 CLSI和EUCAST方法了解臨床黴菌菌株對Amphotericin B (polyene類抗黴菌製劑)的感受性	21
2.3 利用CLSI和EUCAST方法了解臨床黴菌菌株對 Anidulafungin (echinocandin類抗黴菌製劑) 的感受性	22
3. 使用CLSI和EUCAST方法分析受到臨床黴菌菌株感染的不同部位檢體對抗黴菌製劑的感受性.....	22
3.1 由不同感染部位收集的臨床菌株的數量與根據CLSI產生抗藥性的比例	23
3.1.1 利用CLSI方法分析在不同部位感染念珠菌對fluconazole的感受性	23
3.1.2 利用CLSI方法分析在不同部位感染念珠菌對voriconazole 的感受性	24
3.1.3 利用CLSI方法分析在不同部位感染臨床黴菌菌株對amphotericin B的感受性.....	25
3.1.4 利用CLSI方法分析在不同部位感染臨床黴菌菌株對anidulafungin的感受性.....	25
3.1.5 對fluconazole和 voriconazole的共同抗藥(Coresistance)	25
3.2 臨床菌株由各不同感染部位收集的數量與根據EUCAST產生抗藥性的比例.....	25
3.2.1 使用EUCAST方法分析在不同部位感染念珠菌對fluconazole的感受性	25

3.2.2 利用EUCAST方法分析在不同部位感染念珠菌對 voriconazole 的感受性	26
3.2.3 利用EUCAST方法分析在不同部位感染念珠菌對amphotericin B的感受性	27
3.2.4 利用EUCAST方法分析在不同部位感染念珠菌對anidulafungin的感受性..	27
3.2.5 共同抗藥性 (Coresistance)	28
4. 來自共生於成大醫院、中國醫藥大學附設醫院、義大醫院的愛滋病患口腔念珠菌菌種分布及抗藥性比例.....	29
4.1 愛滋病患口腔念珠的菌種分布.....	29
4.1.1 成大醫院的愛滋病患口腔念珠菌的菌種分布.....	29
4.1.2 中國醫藥大學附設醫院的愛滋病患口腔念珠菌的菌種分布.....	30
4.1.3 義大醫院的愛滋病患口腔念珠菌的菌種分布.....	30
4.2 利用CLSI方法了解臨床黴菌菌株對抗黴菌製劑的感受性.....	30
4.2.1 臨床黴菌菌株對 fluconazole 的感受性.....	30
4.2.2不同菌種之間對 fluconazole 的感受性.....	31
4.2.3在 Fluconazole 的 Trailing growth 現象.....	31
4.2.4 臨床黴菌菌株對 voriconazole 的感受性.....	32
4.2.5 不同菌株之間對 voriconazole 的感受性.....	32
4.2.6 在 Voriconazole 的 Trailing growth 現象.....	33
4.2.7 臨床黴菌菌株之間對 amphotericin B 的感受性.....	33
四、討論.....	34
五、結論.....	36
參考文獻.....	86
附錄.....	89

圖目錄

圖一.....	38
圖二.....	38



表目錄

表一、MIC distribution of fluconazole in clinical isolates using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.....	39
表二、MIC susceptibility of fluconazole using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.....	40
表三、MIC distribution of voriconazole in clinical isolates using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.....	42
表四、MIC susceptibility of voriconazole using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.....	43
表五、MIC distribution of amphotericin B in clinical isolates using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.....	45
表六、MIC susceptibility of amphotericin B using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution	46
表七、MIC distribution of anidulafungin in clinical isolates using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.....	48
表八、MIC susceptibility of anidulafungin using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.....	49
表九、The susceptibility to fluconazole of <i>Candida</i> species from different sources according to CLSI method	50
表十、The susceptibility to voriconazole of <i>Candida</i> species from different sources according to CLSI method	52
表十一、The susceptibility to amphotericin B of <i>Candida</i> species from different sources according to CLSI method	54
表十二、The susceptibility to anidulafungin of <i>Candida</i> species from different sources according to CLSI method	56
表十三、The distribution of trailing growth of <i>Candida</i> species to fluconazole with MIC greater than 64 mg/L with CLSI guidelines	57
表十四、The distribution of trailing growth of <i>Candida</i> species to voriconazole with MIC greater than 64 mg/L with CLSI guidelines	58
表十五、The susceptibility to fluconazole of <i>Candida</i> species from different sources according to EUCAST method	59

表十六、The susceptibility to voriconazole of <i>Candida</i> species from different sources according to EUCAST method	61
表十七、The susceptibility to amphotericin B of <i>Candida</i> species from different sources according to EUCAST method	63
表十八、The susceptibility to anidulafungin of <i>Candida</i> species from different sources according to EUCAST method	65
表十九、Identification of clinical isolates from NCKU, CMU, and E-DA hospitals	67
表二十、Identification of clinical isolates from NCKU hospital	69
表二十一、Identification of clinical isolates from CMU hospital	70
表二十二、Identification of clinical isolates from E-DA hospital	71
表二十三、MIC distribution to fluconazole in HIV patients using broth microdilution (CLSI)	72
表二十四、The distribution of <i>Candida</i> species to fluconazole in HIV patients.....	76
表二十五、The distribution of trailing growth of <i>Candida</i> sp. to fluconazole greater than 64 mg/L.....	76
表二十六、MIC distribution to voriconazole in HIV patients using broth microdilution (CLSI)	77
表二十七、The distribution of <i>Candida</i> species to voriconazole in HIV patients with CLSI guidelines	81
表二十八、The distribution of trailing growth of <i>Candida</i> species to voriconazole greater than 64 mg/L.....	81
表二十九、MIC distribution to amphotericin B in HIV patients using broth microdilution (CLSI)	82

一、緒論

1. 念珠菌菌相

在黴菌界約有一百五十萬不同種類的黴菌存在，其中與人類有關聯的約有200種，共生於人體中的黴菌不一定會造成疾病，而白色念珠菌屬於伺機性病原，常發生在免疫力缺乏的病人身上，在常見的黴菌種類中，念珠菌屬最容易造成侵入性黴菌感染。感染念珠菌的種類可能因地域有其不同的重要性，如 *C. glabrata* 在美國是僅次於 *C. albicans* 重要的伺機性病原，*C. parapsilosis* 在拉丁美洲為經常造成感染的菌種，而 *C. tropicalis* 則在其它國家為經常造成感染的菌種；菌種分布也與人體狀態有關聯，如小兒科病患經常感染 *C. albicans* 和 *C. parapsilosis*，白血病患者常感染 *C. albicans* 和 *C. tropicalis*，幹細胞移植病人則容易感染對 azoles 具有內生性抗藥性的菌株如 *C. krusei* 和 *C. glabrata*，*C. lusitaniae* 在愛滋病患身上常見感染的菌種(Cannon et al., 2009)。

念珠菌是共生於正常健康人體腸胃道，女性生殖道等處的菌叢，屬於「伺機性病原」，健康人體的免疫系統會抵抗外來的微生物，使伺機型念珠菌無法對人體造成疾病。然而，當宿主身體免疫狀況低下，如新生兒及老年人、服用抗生素者、進行移植手術時等，才會使念珠菌有機會成為致病原 (Kontoyiannis and Lewis, 2002; White et al., 1998)。依據美國菌血症的病例資料中發現，念珠菌為院內感染的第四常見致病菌 (Wenzel, 1995)。念珠菌感染主要出現在皮膚表面及黏膜部分，若嚴重感染則會引起散播性的全身感染或侵犯到血液造成菌血症 (Kontoyiannis and Lewis, 2002)。全國真菌抗藥性監測始於1999年至今，根據在2006年全國真菌抗藥性監測計畫(Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts, TSARY)念珠菌感染的病例當中，*Candida albicans* 是最容易感染宿主的念珠菌，感染比例為43.5%；其次為 *Candida tropicalis* (25.5%)，*Candida glabrata* (21.9%)，*Candida parapsilosis* (6.4%)，*Candida krusei* (1.5%)，其它(1.2%) (Lo et al., 2008; Yang et al., 2004; Yang et al., 2005a)。

念珠菌除了存在於人體腸胃道及女性生殖道等處以外，也會存在於愛滋病患 (Human Immunodeficiency Virus, HIV) 的口腔、咽喉部及食道 (Vazquez and Sobel, 2006)，在台灣地區的愛滋病患，念珠菌存在的比例明顯相較於一般健康人體高出許多，約有44-88%的患者受到念珠菌感染 (Chen and Kuo, 2007; Yang et al., 2011)。由於目前治療念珠菌感染的抗真菌製劑有限，因此念珠菌的感染對免疫狀況低下的病人或愛滋病患者的健康一直是一大威脅 (Cannon et al., 2009)。

2. 治療念珠菌感染常使用之抗真菌製劑

由於念珠菌屬於真核細胞，因此在使用抗黴菌製劑治療念珠菌感染時也容易對人體造成傷害，選擇不同種類的藥物治療會因為在細胞作用的標的 (target) 的不同而產生不同程度上的副作用。以下四種藥品是目前臨床上治療念珠菌感染常使用之藥物。

2.1 Fluconazole 和 Voriconazole

此兩種藥物屬於 triazole 類抗黴菌製劑 (fungistatic)，fluconazole 與 voriconazole 皆可治療念珠菌感染，屬於 ergosterol biosynthesis inhibitor，此類抗黴菌製劑主要作用在合成細胞膜麥角固醇 (ergosterol) 成分的酵素 lanosterol 14 α -demethylase，屬於 cytochrom p-450 的酵素，抑制 lanosterol 14 α -demethylase 生成而無法生成最終產物 ergosterol，當僅存的 ergosterol 被消耗殆盡後並累積 14 α -methyl-3-6-diol 和 lanosterol 將造成念珠菌細胞膜的壓力 (Cowen and Steinbach, 2008)。此兩種抗黴菌製劑目前使用廣泛且對細胞毒性較低，但相對於其他治療念珠菌的藥物，其篩選出產生抗藥性菌株的比例相對較高 (Pappas et al., 2004)。其抗藥機制產生的途徑有若干方式，例如 ERG11p 發生點突變並持續過度表現，減少和藥物的親和力；幫浦蛋白 ATP-binding cassette protein 或 major facilitator superfamily 過度表現，將攝入的藥物不斷排出細胞降低細胞中藥物濃度，常見於 *C. albicans* 和 *C. glabrata*。

2.2 Amphotericin B

amphotericin B 屬於 polyenes 類抗黴菌製劑 (fungicidal) 其中之一類。amphotericin B 可有效抑制黴菌生長，此類抗黴菌製劑作用於真菌細胞膜 ergosterol (麥角固醇) 成分，而 ergosterol 功能是維持細胞完整性和流動性成分，amphotericin B 鑲嵌於 ergosterol 形成桶狀通道造成細胞內含物在細胞內外離子不平衡而使細胞死亡，但同時對人體的副作用甚大，例如其腎毒性強等(Cowen and Steinbach, 2008; Vazquez and Sobel, 2006)。發現篩選出抗藥性的菌株與 amphotericin B 結合的細胞膜 ergosterol 含量較低，常見於 *C. lusitaniae* 和 *C. guilliermondii*，但其抗藥機制尚未清楚(Cannon et al., 2009)。

2.3 Anidulafungin

此藥物屬於 echinocandins 類抗黴菌製劑 (fungicidal) 其中之一類，是由 *Aspergillus nidulans* 所衍生的半合成的環狀 lipopeptide (Vazquez and Sobel, 2006)。anidulafungin 可有效抑制真菌生長，anidulafungin 可以和細胞壁成分 β -1,3-D-glucan synthase 做非競爭抑制 (non-competitive inhibition) 而抑制真菌細胞壁成分 glucan 的合成(Denning, 2003; White et al., 1998)。文獻指出 anidulafungin 對大多數的念珠菌皆有效，包含一些具內生性抗藥性菌株如 *C. krusei* (對 azoles 具抗藥性)，*Candida lusitaniae* (對 amphotericin B 具抗藥性) (White et al., 1998)。篩選出抗藥菌株的機制為合成細胞壁 glucan 的酵素 $\beta(1,3)$ -glucan synthase 的 subunit Fks1p 發生突變而無法抑制形成細胞壁成份 (Cannon et al., 2009)。

3. 抗藥性的現況

於愛滋病患口腔及婦女陰道受到念珠菌感染已是普遍的問題在目前有限的抗黴菌藥物中，投藥的種類及數量逐漸面臨到抗藥性的問題，因為念珠菌屬中不同菌種對抗黴菌藥物有著不同程度的感受性。如 *C. lusitaniae* 對 amphotericin B 具有抗藥性(Hadfield et al., 1987)；*C. krusei* 與 *C. glabrata* 對 fluconazole 產生抗藥性比例較其它的念珠菌種高 (Kontoyiannis and Lewis, 2002)。另外，雖然 *C. albicans* 是最常引起愛滋病患念珠菌感染的菌種，但是非白色念珠菌 (non-*albicans* *Candida*) 的其它念珠菌導致愛滋病患感染的個例也逐漸增加(Barchiesi et al., 2002)，*C. tropicalis* 是非白色念珠菌中常見菌種之一(Axner-Elings et al., 2011;

Yang et al., 2005b) , 而此菌對 fluconazole 也逐漸篩選出具有抗藥性的菌株(White et al., 1998) , 使得 *C. tropicalis* 感染亦在臨床上扮演了重要的角色。以 1997 至 2001 年大多數國家對 fluconazole 具有抗藥性的 *C. albicans* 其盛行狀況如附錄二所示 , 除了澳洲、法國、中國等少數國家曾出現具較高比例的抗藥性的白色念珠菌 , 大部分的國家出現對 fluconazole 具有抗藥性的白色念珠菌比例皆低於 10%。且如附錄三所示 , 在歐美地區念珠菌屬的分布情況以 *C. albicans* 所佔比例最高 , 約佔全體六至七成左右 , 其次為 *C. glabrata* 約佔全體近兩成 , 其他常見念珠菌屬尚有為 *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* 等(Klepser et al., 2006)。

實驗目的：

近年來，由於免疫力不全的病人增加、抗微生物藥物的不當使用等因素，使念珠菌造成的感染病症逐漸地增加；另一方面，由於目前治療抗念珠菌感染的藥物種類並不多，因此念珠菌感染的情況也日趨嚴重，本研究主要的研究目的如下：

- A. 鑑定在台灣地區醫院所收集的臨床念珠菌種，了解念珠菌分布狀況，以供臨床上參考並做為用藥依據。
- B. 利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測定臨床菌株的最小抑制濃度以觀察近年來念珠菌產生抗藥性菌株的比例和趨勢。

一、 材料與方法

2 引子

primer	sequence	location
ITS1(HJL0735)	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	18S 1769-1787
ITS4(HJL0775)	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	28S 37-57
NL1(HJL01178)	5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3'	28S 37-61
NL4(HJL01179)	5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'	28S 375-393

3 藥品試劑

- RPMI 1640 (Cat. No. 867884)
- Phenol (Cat. No. US75831)
- 1 kb plus DNA ladder (Cat. No. 12308-011)
- Ethidium bromide (Cat. No. K27928515)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Cat. No. S26740)
- Glucose (Cat. No. K33069537)
- Amphotericin B
- Sodium Chloride (NaCl) (Cat. No. K29779304)
- 0.45~0.5% , pH5.0~7.2 NaCl (Cat No. K29779304)
- MastePure™ Yeast DNA Purification Kit (Cat. No. MPY80200)
- DreamTag™ DNA polymerase (5 unit / μ l, Fermentas, Cat. No. EP0701)

BD

- Chromagar *Candida* (Cat. No.254093)
- YPD Agar

2% Bacto-peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose

- BHI broth (Difco, Cat. No. 0037-17)
33.7% Calf brain heart infusion solid, 13.5% Beef heart infusion solid, 27% Proteose peptone, 5.4% Glucose, 13.5% Sodium chloride, 6.7% Disodium phosphate
- 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) (Cat. No.BCBD 0884V)
- Sabouraud dextrose agar (SDA)

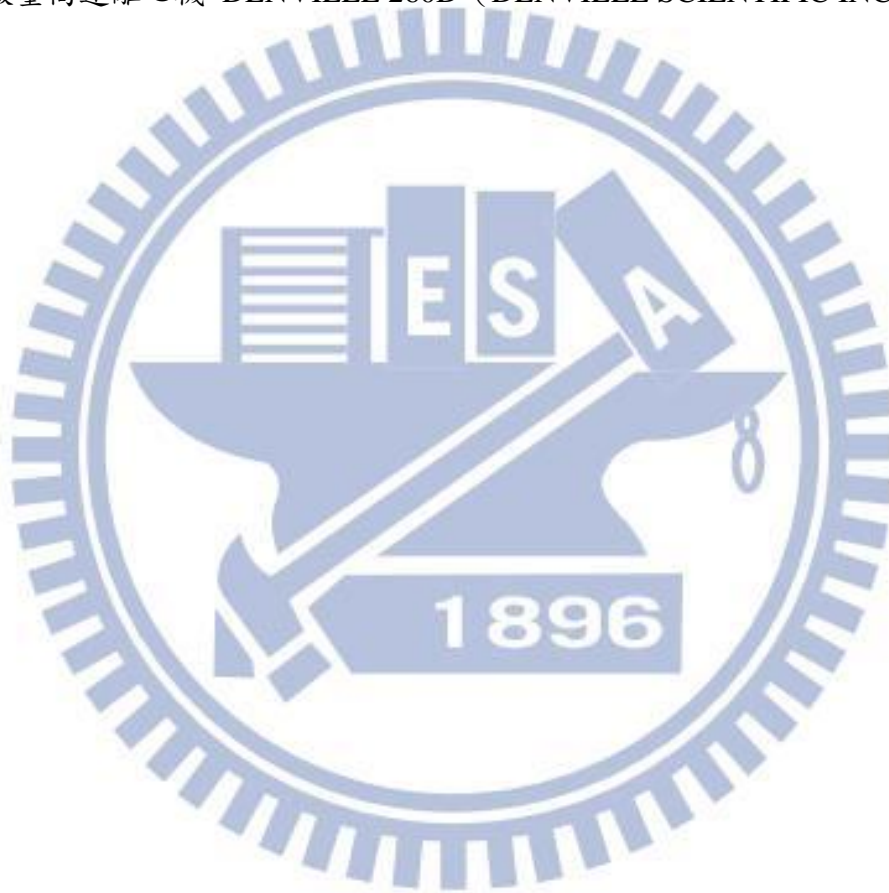
PFIZER

- Fluconazole
- voriconazole
- anidulafungin

4 儀器設備

- VITEK 2 DensiChek Kit 濁度儀
- VITEK 2 Cassette 卡架
- Biotrak II 分光光度儀 (Amersham Biosciences)
- 12x75mm 乾淨的透明塑膠材質試管
- 無菌竹棒
- 試管震盪器 Vortex-2 genie (Scientific Industry)
- 程式溫度控制儀 PTC-200 (MJ Research)
- 電子天平 AT261 DeltaRange (METTLER TOLEDO)
- 電泳影像擷取分析系統 (Alpha Innotech Corporation)
- 水平式電影槽 SUB-CELL GT (BIO-RED)
- 單槽乾浴器 (Violet Bio Science, Inc.)
- 傳統比色計
- 96孔盤 (Cat No.COR3599)
- 震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)

- 加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
- 酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)
- 迴轉式震盪培養箱 (TKS)
- 4°C三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)
- -20°C直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)
- -80°C超低溫冷凍櫃 925/926 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
- 微量高速離心機 DENVILLE 260D (DENVILLE SCIENTIFIC INC.)



5 臨床菌株的收集，培養和鑑定

5.1 2010年全國性黴菌抗藥性監測 (2010 TSARY)

由各家醫院以棉花棒收集病患痰液、血液、膿、導管、微量吸管、口腔、氣管沖洗液、腹水、腹部傷口、膽汁、耳部、尿液、陰部、肺部、指甲、糞便、喉部，傷口，脊髓液等部位的檢體，收集所有來自無菌部位的檢體，非無菌部位白色念珠菌 (*C.albicans*) 以 10 株為上限，非無菌部位非白色念珠菌(*non-albicans Candida*) 以 40 株為上限作為流行病學分析。在參與計畫的 24 家醫院 (財團法人台灣基督教門諾會醫院、行政院衛生署花蓮醫院、花蓮慈濟綜合醫院、彰化基督教醫院、中山醫學大學附設醫院、光田醫療社團法人光田綜合醫院、彰化秀傳紀念醫院、童綜合醫療社團法人童綜合醫院、台中榮民總醫院、財團法人仁愛綜合醫院、澄清醫院、國泰綜合醫院、羅東博愛醫院、天主教靈醫會羅東聖母醫院、敏盛綜合醫院、台北市立聯合醫院和平院區、三軍總醫院、亞東紀念醫院、長庚紀念醫院高雄院區、台灣基督長老教會新樓醫院、財團法人嘉義基督教醫院、國軍高雄總醫院、成大醫院、高雄榮民總醫院) 總共收集了 1117 株臨床菌株運送到國家衛生研究院，其中有 5 個臨床菌株在收菌後無法在 SDA 培養基上生長，由國家衛生研究院再次進行菌種鑑定後，在部分臨床檢體發現有不只單一菌種的情況，再進行菌種鑑定後增加 12 個菌株，總共收集 1124 株臨床菌株進行分析。醫院送來的檢體皆會附上由各醫院菌種鑑定的結果，由羅秀容老師實驗室進行以下的鑑定流程如下，將各醫院初步鑑定為白色念珠菌者進行芽管試驗 (germ tube assay)，若長出芽管則判斷為 *C. albicans*，並將其它 *non-albicans Candida* 的菌種培養在 SDA 培養基取純菌落利用 VITEK 2 酵母菌鑑定卡進行鑑定，菌種鑑定的結果大於等於百分之八十五以上代表鑑定結果可信賴，若小於百分之八十五，則表示菌種鑑定率低 (low discrimination) 或不可鑑定(unidentified)，此時將會再培養於 CHROMagar 培養基以顏色區分確定是否為單一菌種，繼續以 ITS 引子或 D1/D2 引子針對黴菌核糖體 DNA (ribosomal DNA) 片段進行序列分析鑑定菌

種以及部分菌種進行 ID32C 方法再次確認菌種，若鑑定結果與醫院有不符合的情形則需要兩種以上鑑定方法都認為是同一菌種才可信賴。

5.2 成大醫院、中國醫藥大學附設醫院、義大醫院三家醫院的臨床愛滋病患口腔檢體的收集

使用棉花拭子於成大醫院 (流水編號 2009H1001~2009H1330)、中國醫藥大學附設醫院 (流水編號 2009H0001~2009H0282)、義大醫院 (流水編號 2009H2001~2009H2106) 三家醫院的門診愛滋病患 (HIV-infected patients) 口腔兩側進行採樣於民國 98 年 10 月為期四個月，將臨床口腔檢體的棉棒塗在 CHROMagar *Candida* 培養基 (Odds and Bernaerts, 1994; Sahand et al., 2005) 邊緣一小區，再利用滅菌的竹棒以三區畫法劃開，在嗜氧環境 35°C 培養 2-3 天觀察菌落顏色和大小，依顏色區分得到的一種或多種臨床菌株，最後從每一種顏色的菌落取三個單一菌落分別存放在含 50% 甘油的冷凍小管於 -80°C 冰箱保存以供後續實驗使用。CHROMagar 是一種選擇性培養基，其 chloramphenicol 成分可抑制污染性細菌生長，內含可產色的受質與酵母菌和絲狀真菌分泌的酵素反應後產生顏色來區分不同菌種，常見念珠菌屬如 *C. albicans* 呈現淡綠色菌落，*C. tropicalis* 呈現代金屬光澤的深藍紫色菌落，*C. krusei* 呈現帶有白邊的淡粉紅色的扁平菌落，可作為協助初步篩選非單一菌種的鑑定。

4.3 微鐵克 2 (VITEK 2) 酵母菌鑑定卡

先從 -80°C 冰箱取出臨床菌株的凍管，使用滅菌的竹棒取適量菌液培養在 Sabouraud dextrose agar 於 35°C 培養箱 18 至 24 小時，使用滅菌竹棒取足夠的純菌落數均勻混和於 3 ml 濃度 0.45% 且酸鹼值介於 5.0 和 7.2 之間的無菌食鹽水 12×75 mm 塑膠試管中，實驗前先進行電子式 VITEK 2 DensiChek 濁度儀校正 (酸鹼值約 2.94 ± 0.1)，利用 VITEK 2 DensiChek 濁度儀調整菌液濃度約 1.8~2.2 McFarland，等待預先從 4°C 冰箱取出酵母菌鑑定卡回溫後，將菌液及卡片放置在 VITEK 2 卡架上，將檢體資料利用 SCS 輸入在 Cassette 的記憶體或直接輸入電腦，檢查 VITEK 2 的設定是 Cassette Mode 還是 SCS Mode，是否與上述的資料輸入方式有配合，將 Cassette 放入 VITEK 2 中，檢查菌液是否因為輸入檢體資料時間過長所造成菌有沉澱而非均勻混和於塑膠試管中，等待卡片吸取適

當菌液充滿於卡片存放於 VITEK 2 中，將 Cassette 上剩下的試管及菌液等從 VITEK 2 中取出。等待約十八小時後，生化反應鑑定的結果將會輸出在電腦。

4.4 聚合酶連鎖酵素反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

來自台灣各醫院的臨床檢體依照 MastePure™ Yeast DNA Purification Kit 的說明書純化 DNA，利用所設計的引子 (ITS1) 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' 和 (ITS4) 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' 或 (NL1) 5'GCATATCAATAAGCGG A GGAA AAG3'和(NL4) 5'GGTCCGTG TTTCAAGACGG 3' 針對真菌 RNA 核醣體 internal transcribed spacer (ITS) 和 D1/D2 區域欲增幅的片段進行放大，ITS 適用於具致病性的黴菌菌種，亦適合鑑定不同菌屬間的鑑定，而 D1/D2 序列存在於所有黴菌，包括非致病菌種，適用於鑑定於菌種間菌株(Leaw et al., 2006)，總體積 50µl 的混合液包含 5µl 的 10 X DreamTag™ buffer，1.25 unit DreamTag™ DNA polymerase (5 unit /µl, Fermentas, Cat. No. EP0701)，4µl 的 2.5 mM dNTP，1µl 的 25 mM MgCl₂，5µl 的 50µM 的 forward primer 和 reverse primer，0.1~1 µg 的 genomic DNA 模板，1.2 U Tag polymerase (0.25 ul) DNA (2 ul)，補滅菌二次水至 50µl，反應條件：94°C 3 分鐘→94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒 (重複此步驟 30 個循環)→72°C 3 分鐘→4 °C 暫置，接著萃取 DNA 的步驟遵守 FavorPrep™ PCR Clean-UP Kit 說明書使用，將特定區域的序列送到 NCBI 做序列比對。

4.5 製備藥盤

首先將實驗所需的藥物 amphotericin B、anidulafungin、fluconazole、voriconazole 溶於有機溶劑 dimethyl sulfoxide (DMSO) 中後，使用 RPMI 1640 (無 bicarbonate 及含 glutamine 與酸鹼指示劑) 的培養基來稀釋藥物配成本實驗使用最高藥物濃度的二倍濃度：amphotericin B (32 mg/L)、anidulafungin (16 mg/L)、fluconazole (128 mg/L)、voriconazole (16 mg/L)，每一種藥物進行二倍序列稀釋，最終配成十個濃度，故藥物範圍分別是 Amphotericin B (0.0625 ~ 32 mg/L)，anidulafungin (0.0313 ~ 16 mg/L)，fluconazole (0.25 ~ 128 mg/L)，voriconazole (0.0313 ~ 16 mg/L)，分別在 96 孔盤第一到第十個及第十一個孔盤加入 100µl (第十一個孔盤為控制組)，第十二個孔盤加入 200µl (此孔盤不加菌液)。

4.6 肉湯微稀釋法 (broth microdilution)測定臨床菌株的最小抑制濃度

根據美國臨床實驗室國家標準委員會 (Clinical and Laboratory Standards Institute) 所建議的 M27-A3 的修編版本進行實驗 (CLSI, 2008)。實驗操作前須先配製適量 RPMI 1640 broth、無菌 0.85% NaCl，放置於 1 升的血清瓶中，並裝上分注器置於 4°C 冰箱中備用，四種藥物濃度梯度之抗藥性試驗培養盤，放置於 -80°C 冰箱中備用。

作法:

第一天

1. 自 -80°C 冰箱取出標示有編號的單一菌株存菌管以及標準菌株 YLO 6 (ATCC® 6258), YLO 7 (ATCC® 22019), YLO 12 (ATCC® 90028), 用竹棒挖取少許菌液，放到含有 1 ml BHI 的 24 孔盤，置於 35°C 培養箱培養 18-24 小時 (念珠菌培養於此條件，若是培養 *Cryptococcus neoformans* 菌株則是培養於 35°C 約 48 小時)。
2. 取出所需數量的 12×75 mm 玻璃試管，以標示筆標示待測菌株編號，至於鐵架，以鋁箔紙覆蓋後，利用高壓滅菌鍋進行滅菌，滅菌後取出備用。
3. 取無菌離心管，標示待測菌株編號後，放置於鐵架上備用。

第二天

1. 至 -80°C 冰櫃中取出適量已配好的 2 倍濃度梯度之抗藥性試驗培養盤，放置於室溫下回溫備用並將抗藥性試驗培養盤依序標示檢體編號。
2. 取出經 24 小時 35°C 培養的 24 孔盤，利用 Pipet 混合均勻，吸取適量菌液，加入含有 2 ml 0.85% NaCl 的玻璃試管，充分混合均勻後在 530nm 波長下利用比色計測其波長，調整到菌液濃度約為 0.5 McFarland，過高或偏低可利用比色計調整，此時菌液濃度約 $1 \sim 5 \times 10^6$ cells / ml。
3. 將菌液震盪均勻後取 0.1 ml 在 4.9 ml 0.85% NaCl 完成 50 倍稀釋，再從上述菌液中取 0.2 ml 在 3.8 ml RPMI 1640 培養基完成稀釋 20 倍，總共稀釋 1000 倍，

將稀釋好的 RPMI 1640 broth 菌液的離心管混合均勻後，倒入無菌藥品槽，利用 12 爪 Pipet 裝上 11 支 tips，吸取 100 μ l 菌液，同時加入 96 孔盤 A 列 1~11 行的兩倍藥物濃度序列稀釋的藥盤中，第 12 行不加菌液。依序把同一菌液加入 amphotericin B (0.0313 ~ 16 mg/L), fluconazole (0.125 ~ 64 mg/L) 和 voriconazole (0.0156 ~ 8mg/L) 藥盤中，此時藥盤濃度稀釋一倍，更換 tips，依序將菌液分別加入 B~H 列，而菌液稀釋倍率為 2000 倍，最終接種數量約 $0.5 \sim 2.5 \times 10^3$ cells/ml。

4. 添加完畢後，蓋上抗藥性試驗培養盤蓋子，放入 35°C 培養箱中分別培養 24 和 48 小時候測吸光值。

第三天

1. 讀取培養盤菌液生長濃度，開啟 Biotrack II plate reader 電源，於主畫面中進入 select method 中選 YEASTAH 後，機器會進入 YEASTAH 模式。
2. 啟動電腦，在桌面上點選 Bio DC 程式捷徑，開啟視窗後，點選 run，將輸出模式(F3)改選成"serial"直接將數據輸出到電腦存取。
3. 取出已經 35°C 培養 24 小時的抗藥性試驗培養盤，放在具有 96 孔盤專用承載盤的震盪器上，調整震盪速度於 2~3 之間，震盪時間約 1 min。震盪均勻後，將培養盤蓋子移開，將培養盤放置於 Biotrack II plate reader 的讀取槽內。在 Biotrack II plate reader 上輸入該培養盤的編號後，接著選點 run，則培養盤會進入機器內部讀取吸光值。讀取完畢後培養盤會退出，且在電腦程式中顯示出 96 孔盤的 OD 數值。
4. 將培養盤取出，並將培養盤蓋子蓋上，重複操作步驟 3 直到全部的培養盤都讀取完成後，於 Bio DC 點選 finish 將結果匯出到 Excel 並存檔，培養盤放回 35°C 培養箱繼續培養 24hr。

第四天

讀取 48 小時 (*Cryptococcus neoformans* 則是需要測第 72 小時) 培養盤黴菌生長濃度，重複第三天的操作方式，利用 Excel 中 If 函數的功能

[if(value>5,"R",mic conc.)], 在 AmB 若百分比數值值>5 則顯示 R, 若 OD 值<5 則顯示該孔盤的試藥濃度; [if(value <=50,"R",mic conc.)], 在 Flu 若百分比數值>50, 則顯示 R, 若百分比數值<=50 則顯示該孔盤的試藥濃度。讀取 MIC 數值, 並將結果輸入資料庫中。

4.7 分別以美國臨床實驗室國家標準委員 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 和歐洲藥敏試驗委員會(European committee for antimicrobial susceptibility testing, EUCAST)利用肉湯微稀釋法 (broth microdilution) 測定臨床菌株的最小抑菌濃度 (MIC)

根據美國臨床實驗室國家標準委員會所建議的 M27-A3 的修編版本和歐洲藥敏試驗委員會(Rodriguez-Tudela et al., 2003), 兩者在實驗方法有些許差異(見 Appendix 1), 包括(1)葡萄糖濃度在美國臨床實驗室國家標準委員會是 0.2%, 而在歐洲藥敏試驗委員會是 2%; (2) 96 孔盤在美國臨床實驗室國家標準委員會是圓球形底部, 而在歐洲藥敏試驗委員會是扁平形底部; (3)細胞接種在美國臨床實驗室國家標準委員會是 $0.5 \sim 2.5 \times 10^3$ CFU/ml, 而在歐洲藥敏試驗委員會是 $0.5 \sim 2.5 \times 10^5$ CFU/ml; (4) 結果判讀方面在美國臨床實驗室國家標準委員會是肉眼判斷 (約 50%抑制程度), 而在歐洲藥敏試驗委員會則是由測吸光值判斷菌液生長受藥物抑制達百分之五十程度的濃度定義為最小抑菌濃度(minimal inhibited concentration, MIC) (Rodriguez-Tudela et al., 2007)。

實驗操作前須先配製適量 RPMI 1640 培養基 (適用於 CLSI 實驗方法)、RPMI 1640 2%G 培養基 (RPMI 1640 含百分之二葡萄糖, 適用於 EUCAST 實驗方法)、無菌 0.85% NaCl、滅菌二次水, 放置於 1 升的血清瓶中, 並裝上分注器置於 4°C 冰箱中備用, 另外製備下列四種藥物濃度梯度之抗藥性試驗 96 培養孔盤(扁平底部), 放置於-80°C 冰箱中備用。

作法:

第一天

1. 自-80°C 冰箱取出標示有編號的單一菌株存菌管以及標準菌株 YLO 6 (ATCC® 6258), YLO7 (ATCC® 22019), YLO12 (ATCC® 90028), 用滅菌竹棒挖取少許菌液培養在 SDA 培養基, 置於 35°C 培養箱培養 18-24 小時 (念珠菌培養於此條件, 若是培養 *Cryptococcus neoformans* 菌株則是培養於 35°C 約 48 小時)。
2. 取出所需數量的 12×75mm 玻璃試管, 以標示筆標示待測菌株編號, 至於鐵架, 以鋁箔紙覆蓋後, 利用高壓滅菌鍋進行滅菌, 滅菌後取出備用。
3. 取無菌離心管, 標示待測菌株編號後, 放置於鐵架上備用。

第二天

1. 至-80°C 冰櫃中取出適量已配好的 2 倍濃度梯度之抗藥性試驗培養盤, 放置於室溫下回溫備用並將抗藥性試驗培養盤依序標示檢體編號。
2. 取出經 24 小時 35°C 培養的 24 孔盤, 利用 Pipet 混合均勻, 吸取適量菌液, 加入含有 2.5 ml 滅菌的二次水的玻璃試管, 充分混合均勻後在 530nm 波長下利用比色計測其波長, 調整到菌液濃度約為 0.5 McFarland, 過高或偏低可利用比色計調整, 此時可以得到約 $1 \sim 5 \times 10^6$ cells / ml。
3. (CLSI 實驗流程)從步驟 2 的菌液中震盪均勻後取 0.1 ml 在 4.9 ml 0.85% NaCl (稀釋 50 倍), 從上述菌液中取 0.3 ml 在 5.7 ml RPMI 1640 培養基中(稀釋 20 倍), 總共稀釋 1000 倍, 將稀釋好的 RPMI 1640 培養基菌液的離心管混合均勻後, 倒入無菌藥品槽, 利用 12 爪 Pipet 裝上 11 支 tips, 吸取 100 µl 菌液, 同時加入 96 孔盤 A 列 1~11 行的兩倍藥物濃度序列稀釋的藥盤中, 第 12 行不加菌液。依序把同一菌液加入 amphotericin B (0.0313 ~ 16 mg/L), anidulafungin (0.0156 ~ 8 mg/L), fluconazole (0.125 ~ 64 mg/L) 和 voriconazole (0.0156 ~ 8 mg/L) 藥盤中, 此時藥盤濃度稀釋一倍, 更換 tips, 依序將檢體分別加入 B~H 列, 而菌液稀釋倍率為 2000 倍, 最終接種數量約 $0.5 \sim 2.5 \times 10^3$ CFU/ml。

4. (EUCAST 實驗流程)從步驟 2 的菌液中震盪均勻後取 0.6 ml 在 5.4 ml RPMI 1640 添加 2%G 培養基 (稀釋 10 倍)，將稀釋好的 RPMI 1640 添加 2%G 培養液的離心管混合均勻後，倒入無菌藥品槽，利用 12 爪 Pipet 裝上 11 支 tips，吸取 100 μ l 菌液，同時加入 96 孔盤 A 列 1~11 行的兩倍藥物濃度序列稀釋的藥盤中，第 12 行不加菌液，為無菌操作的對照組。依序把同一菌液加入 amphotericin B (0.0313 ~ 16 mg/L)，anidulafungin (0.0156 ~ 8 mg/L)，fluconazole (0.125 ~ 64 mg/L) 和 voriconazole (0.0156 ~ 8mg/L) 藥盤中，更換 tips，依序將檢體分別加入 B~H 列，此時藥盤濃度稀釋一倍，而菌液稀釋倍率為 20 倍，最終接種數量約 $0.5\sim 2.5 \times 10^5$ CFU/ml。
- 添加完畢後，蓋上抗藥性試驗培養盤蓋子，放入 35°C 培養箱中分別培養 24 小時(供 CLSI 和 EUCAST 結果判讀)和 48 小時(供 CLSI 結果判讀)候測吸光值。

第三天

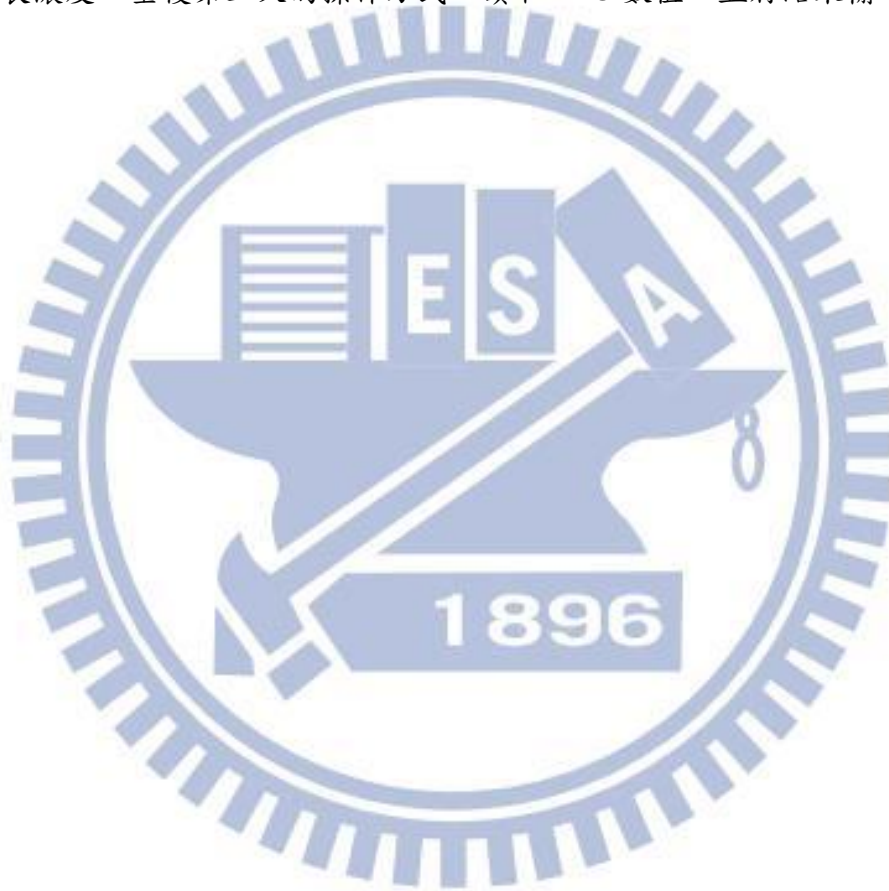
1. 讀取培養盤菌液生長濃度，開啟 Biotrack II plate reader 電源，於主畫面中進入 select method 中選 YEASTAH 後，機器會進入 YEASTAH 模式。
2. 啟動電腦，在桌面上點選 Bio DC 程式捷徑，開啟視窗後，點選 run，將輸出模式(F3)改選成"serial"直接將數據輸出到電腦存取。
3. 取出已經 35°C 培養 24 小時的抗藥性試驗培養盤，放在具有 96 孔盤專用承載盤的震盪器上，調整震盪速度於 2~3 之間，震盪時間約 1 min。震盪均勻後，將培養盤蓋子移開，將培養盤放置於 Biotrack II plate reader 的讀取槽內。在 Biotrack II plate reader 上輸入該培養盤的編號後，接著選點 run，則培養盤會進入機器內部讀取吸光值。讀取完畢後培養盤會退出，且在電腦程式中顯示出 96 孔盤的 OD 數值以供 CLSI 和 EUCAST 方法分析。EUCAST 方法在接菌後的藥盤培養至 35°C 24 小時後若其吸光值(OD₅₉₅)低於 0.5 (常見於 *C. parapsilosis* 和 *C. guilliermondii*)，則必須再培養 12 至 24 小時觀察，若培養

48 小時其 OD 值仍低於 0.5 則需要重測。

- 4.將培養盤取出，並將培養盤蓋子蓋上，重複操作步驟 3 直到全部的培養盤都讀取完成後，於 Bio DC 點選 finish 將結果匯出到 Excel 並存檔，培養盤放回 35°C 培養箱繼續培養 24hr 以供 CLSI 方法分析。

第四天

讀取 48 小時 (*Cryptococcus neoformans* 則是需要測第 72 小時 OD 值)培養盤黴菌生長濃度，重複第三天的操作方式，讀取 MIC 數值，並將結果輸入資料庫中。



二、 結果

1. 2010 全國黴菌抗藥性監測計畫臨床菌株的菌種分布

由在 2010 年全國黴菌抗藥性監測計畫中 (Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts, TSARY) ，總共從台灣 24 醫院收集了 1124 臨床菌株，經國家衛生研究院羅秀容老師實驗室以 VITEK 2 和序列分析對菌種鑑定的結果，總共得到 28 個菌種，分別是：427 株 *C. albicans* ， 267 株 *C. tropicalis* ， 258 株 *C. glabrata* ， 89 株 *C. parapsilosis* ， 18 株 *C. krusei* ， 15 株 *Cryptococcus neoformans* ， 4 株 *Candida nivariensis* ， 8 株 *Candida guilliermondii* ， 7 株 *Trichosporon asahii* ， 4 株 *Kodamaea ohmeri* ， 3 株 *Candida pelliculosa* ， 3 株 *Pichia mississippiensis* ， 2 株 *Trichosporon mucoides* ， 1 株 *Candida catenulate* ， 2 株 *Candida dubliniensis* ， 1 株 *Candida famata* ， 1 株 *Candida haemulonii* ， 1 株 *Candida intermedia* ， 1 株 *C. lusitaniae* ， 1 株 *Candida metapsilosis* ， 1 株 *Candida orthopsilosis* ， 1 株 *Pichia farinosa* ， 1 株 *Candida utilis* ， 1 株 *Cryptococcus albidus* ， 1 株 *Rhodosporidium fluviale* ， 1 株 *Rhodotorula minuta* ， 1 株 *Sterigmatomyces elviae* ， 1 株 *Trichosporon beigeli* ， 以及臨床菌株中有 1 株 *Candida* sp. 和 2 株 *Trichosporon* sp. 菌種鑑定到同屬的結果。

其中，如 Figure 1 所示，以 *C. albicans* 佔所收集之臨床菌株的 38.0% (427/1124) ，是所有念珠菌中比例最高的菌種，接著依序為 *C. tropicalis* 佔所收集之臨床菌株的 23.8% (267/1124) ， *C. glabrata* 佔所收集之臨床菌株的 23.0% (258/1124) ， *C. parapsilosis* 佔所收集之臨床菌株的 7.9% (89/1124) ， *C. krusei* 佔所收集之臨床菌株的 1.6% (18/1124) ，其它部分含 25 種不同種類菌種約佔 5.8% (65/1124) ，相較於 2002 年其它部分 22 種不同種類菌種約佔 10.0% (95/953) 與 2006 年其它 22 種部分不同種類菌種約佔 6.3% (66/1050) 在種類上是增加的，但所佔比例的卻減少。

如 Figure 2 所示：2010 年全國黴菌抗藥性監測計畫各類念珠菌的分布中，*C. albicans* 出現的比例由 2002 年和 2006 年的 43.5% 下降至 2010 年的

38.0%，*C. tropicalis* 出現的比例為 2002 年的 26.8%，2006 年的 25.5% 及 2010 年的 23.8%，然而 *C. glabrata* 出現的比例由 2002 年的 20.6%，2006 年的 21.9% 至 2010 年的 23.0%，*C. parapsilosis* 出現的比例由 2002 年的 6.9%和 2006 年的 6.4%升至 2010 年的 7.9%，*C. krusei* 出現的比例由 2002 年的 1.0%和 2006 年的 1.5%及 2010 年的 1.6%，經由統計檢定後，*C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. glabrata*、*C. parapsilosis*、*C. krusei* 在 1999 年至 2010 年的抗黴菌監測性計畫的菌種分布並無明顯變化 (p value > 0.05)。在結果分析部分，在收集的 1124 株臨床菌株中，其中 1063 符合歐洲藥檢委員會 (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) 的培養條件，其定義中說明接菌後的藥盤培養至 35°C 於 24 小時後若其吸光值(OD₅₉₅)低於 0.5，則必須再培養 12 至 24 小時後觀察，若培養 48 小時後其 OD 值仍低於 0.5 便需要重測，本實驗有 61 個菌株在進行兩次試驗後皆有不符生長情況的情形，故結果以 1063 株臨床菌株作為主要探討重點。

2. 利用 CLSI 和 EUCAST 方法了解臨床黴菌菌株對抗黴菌製劑的感受性

2.1 臨床黴菌菌株對 azoles 類抗黴菌製劑的感受性

最小抑菌濃度 (Minimal Inhibition Concentration, MIC) 的定義為：相對於無藥物濃度的控制組，藥物可抑制百分之五十以上的黴菌生長情形，稱作為「最小抑菌濃度」。

2.1.1 臨床黴菌菌株對 fluconazole 的感受性

在 2010 年全國黴菌抗藥性監測計畫中，根據美國臨床實驗室國家標準委員會 (CLSI) 的判定標準評估，最小抑菌濃度 (MIC) ≥ 64 mg/L 視為具有抗藥性，最小抑菌濃度 (MIC) 位於 16 ~ 32 mg/L 視為劑量依賴型感受性 (susceptible dose-dependent, SDD)，最小抑菌濃度 (MIC) ≤ 8 mg/L 視為具有感受性。從 Table 1 和 Table 2 結果中發現所收集的所有臨床菌株對 fluconazole 產生抗藥性 (resistance, MIC ≥ 64 mg/L) 的比例為 8.37% (89/1063)；具有劑量依賴型感受性 (SDD, MIC 位於 16 ~ 32 mg/L) 的比例為 2.45% (26/1063)；具有感受性 (susceptible, MIC ≤ 8 mg/L) 的比例為 89.2% (948/1063)。

另外，根據Table 1及Table 2結果所示：發現所收集的 *C. albicans* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性($MIC \geq 64$ mg/L)的比例為1.2% (5/402)； *C. tropicalis* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性 ($MIC \geq 64$ mg/L) 的比例為25.8% (69/267)； *C. glabrata* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性 ($MIC \geq 64$ mg/L) 的比例為 3.9% (10/257)； *C. krusei* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性 ($MIC \geq 64$ mg/L) 的比例為 27.8% (5/18)。其中 *C. glabrata* 對 Fluconazole 的會有較低的感受性和 *C. krusei* 對於 fluconazole 具內生性抗藥性(Yang et al., 2005c)，因此 *C. krusei* 對 fluconazole 產生抗藥性的比例高達27.8% (5/18)。而 *C. tropicalis* 對 fluconazole 產生抗藥性的比例為25.8% (69/267)，僅次於 *C. krusei*。

此外根據歐洲委員會藥敏試驗 (European committee for antimicrobial susceptibility testing, EUCAST) 的判定標準評估，最小抑菌濃度(MIC) >4 mg/L視為具有抗藥性，最小抑菌濃度(MIC) ≤ 2 mg/L視為具有感受性。所收集的所有臨床菌株對 fluconazole 產生抗藥性 ($MIC > 4$ mg/L) 的比例為7.4% (79/1063)；中間型感受性 (intermediate, $MIC = 4$ mg/L)的菌株的比例為19.1% (203/1063)；具有感受性 ($MIC \leq 2$ mg/L) 的比例為73.5% (781/1063)。根據Table 1及Table 2結果所示：發現所收集的 *C. albicans* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性 ($MIC > 4$ mg/L) 的比例為 2.0% (8/402)； *C. tropicalis* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性 ($MIC > 4$ mg/L) 的比例為7.5% (20/267)； *C. glabrata* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性($MIC > 4$ mg/L) 的比例為 11.3% (29/257)； *C. parapsilosis* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性 ($MIC > 4$ mg/L)的比例為1.2% (1/85)； *C. krusei* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性 ($MIC > 4$ mg/L) 的比例為94.4% (17/18)；其它菌株對 fluconazole 產生抗藥性 (resistance, $MIC > 4$ mg/L)的比例為8.8% (3/34)， *C. krusei*對 fluconazole 產生抗藥性的比例高達94.4%。

2.1.2 在 Fluconazole 的 Trailing growth 現象

trailing growth 是指在 24 小時時生長情況受到抑制而使對藥物的感受性視為具感受性，而 24 到 48 小時持續生長而改變對藥物的感受性成為抗藥性菌株，然而

這些視為 trailing growth 的菌株在 in vivo 的動物實驗中則顯示與 in vitro 實驗在 24 小時判讀為具有感受性的結果一致，因此 trailing growth 的菌株建議歸類為對藥物具有感受性的類別，然而目前具有 trailing growth 的菌株在抗藥性的角色仍不明(Lee, 2004)。如 Table 13 所示，在對 fluconazole 具抗藥性的菌株中發生 trailing growth 現象的比例佔 97.8% (87/89)，其中有 trailing growth 現象的 *C. albicans* 佔 100% (5/5)，有 trailing growth 現象的 *C. tropicalis* 佔 100% (69/69)，有 trailing growth 現象的 *C. glabrata* 佔 80% (8/10)，和有 trailing growth 現象的 *C. krusei* 佔 100% (5/5)。

2.1.3 臨床黴菌菌株對 voriconazole 的感受性

在 2010 年全國黴菌抗藥性監測計畫中，根據美國臨床實驗室國家標準委員會 (CLSI) 的判定標準評估，最小抑菌濃度 (MIC) ≥ 4 mg/L 視為具有抗藥性，最小抑菌濃度 (MIC) 位於 2 mg/L 視為劑量依賴型感受性 (SDD)，最小抑菌濃度 (MIC) ≤ 1 mg/L 視為具有感受性。從 Table 3 和 Table 4 結果中發現所收集的所有臨床菌株對 voriconazole 產生抗藥性 (MIC ≥ 4 mg/L) 的比例為 7.3% (78/1063)；具有劑量依賴型感受性 (MIC = 2 mg/L) 的比例為 0.7% (7/1063)；具有感受性 (MIC ≤ 1 mg/L) 的比例為 92.0% (978/1063)。另外，*C. albicans* 菌株對 voriconazole 產生抗藥性 (MIC ≥ 4 mg/L) 的比例為 1.2% (5/402)；*C. tropicalis* 菌株對 voriconazole 產生抗藥性 (resistance, MIC ≥ 4 mg/L) 的比例為 26.6% (71/267)；*C. glabrata* 菌株對 voriconazole 產生抗藥性 (resistance, MIC ≥ 4 mg/L) 的比例為 0.8% (2/257)；在 *C. krusei* 和 *C. parapsilosis* 沒有觀察到對 voriconazole 產生抗藥性的菌株。

此外根據歐洲委員會藥敏試驗 (EUCAST) 對 *C. albicans*，*C. tropicalis*，*C. parapsilosis* 的判定標準評估，最小抑菌濃度 (MIC) > 0.125 mg/L 視為具有抗藥性，最小抑菌濃度 (MIC) ≤ 0.125 mg/L 視為具有感受性。根據從 Table 3 和 Table 4 結果所示：從 Table 3 和 Table 4 結果中發現 *C. albicans*，*C. tropicalis*，*C. parapsilosis* 對 voriconazole 產生抗藥性 (MIC > 0.125 mg/L) 的比例為 6.5% (49/754)；具有感受性 (MIC ≤ 1 mg/L) 的比例為 93.5% (705/754)。發現所收集的 *C. albicans* 菌株對 voriconazole 產生抗藥性 (MIC > 0.125 mg/L) 的比例為 1.7% (7/402)；*C. tropicalis*

菌株對 voriconazole 產生抗藥性 (MIC > 0.125 mg/L) 的比例為14.6%(39/267)；*C. parapsilosis* 菌株對 voriconazole 產生抗藥性 (MIC > 0.125 mg/L) 的比例為3.5% (3/85)。

2.1.4 在 Voriconazole 的 Trailing growth 現象

如Table 4所示：Trailing growth 現象是指肉湯培養在24小時判斷為具感受性，而在48小時培養後候判斷為具抗藥性。如Table 14所示，在對 voriconazole 具抗藥性的菌株中有 trailing growth 現象的比例佔97.4% (76/78)，其中有trailing growth 現象的 *C. albicans* 佔60% (3/5)，有trailing growth現象的*C. tropicalis* 佔100% (71/71)，和有trailing growth現象的 *C. glabrata* 佔100% (2/2)。

2.2 利用 CLSI 和 EUCAST 方法了解臨床黴菌菌株對

Amphotericin B (polyene類抗黴菌製劑) 的感受性

最小抑菌濃度 (Minimal Inhibition Concentration, MIC) 的定義為：相對於無藥物濃度的控制組，藥物可抑制百分之九十五以上的黴菌生長情形，稱作為「最小抑菌濃度」。在 2010年全國黴菌抗藥性監測計畫中，根據美國臨床實驗室國家標準委員會 (CLSI) 在48小時的判定標準評估，最小抑菌濃度 (MIC) > 1 mg/L 視為不具感受性，最小抑菌濃度 (MIC) ≤ 1 mg/L 視為具感受性。從Table 5和Table 6所示：只有1株*C. parapsilosis* 對 amphotericin B 產生不具感受性 (nonsusceptible, MIC > 1mg/L)，佔所有臨床菌株的比例為0.09% (1/1063)。

此外從Table 5和Table 6所示：根據歐洲委員會藥敏試驗 (EUCAST) 對*C. albicans*，*C. tropicalis*，*C. glabrata*，*C. parapsilosis*，*C. krusei*的判定標準評估，最小抑菌濃度 (MIC) > 1 mg/L視為具有抗藥性，最小抑菌濃度 (MIC) ≤ 1 mg/L視為具有感受性。發現所收集的所有臨床菌株對 amphotericin B 具抗藥性 (MIC > 1 mg/L) 的比例佔0.5% (5/1063)，具有抗藥性的菌種當中，其中*Candida albicans* 佔0.7% (3/402)，*Candida tropicalis* 佔0.4% (1/267)，*Candida glabrata* 佔0.4% (1/257)。

2.3 利用CLSI和EUCAST方法了解臨床黴菌菌株對

Anidulafungin (echinocandin類抗黴菌製劑) 的感受性

在2010年全國黴菌抗藥性監測計畫中，根據美國臨床實驗室國家標準委員會 (CLSI) 在之前的判定標準，最小抑菌濃度(MIC) >2 mg/L 視為具有抗藥性，最小抑菌濃度 (MIC) ≤ 2 mg/L 視為具有感受性。在2009年新修定的判定標準評估是分別對不同菌種間有相異的判定標準，對於 *C. albicans*，*C. dubliniensis*，*C. krusei*，*C. tropicalis* 最小抑菌濃度 (MIC) ≥ 1 mg/L 視為具有抗藥性，最小抑菌濃度(MIC) ≤ 0.25 mg/L 視為具有感受性；對於 *C. guilliermondii*，*C. lusitaniae*，*C. parapsilosis* 最小抑菌濃度 (MIC) ≥ 8 mg/L 視為具有抗藥性，最小抑菌濃度 (MIC) ≤ 2 mg/L 視為具有感受性；對於 *C. glabrata* 最小抑菌濃度(MIC) ≥ 0.5 mg/L 視為具有抗藥性，最小抑菌濃度(MIC) ≤ 0.125 mg/L 視為具有感受性。如Table 7和Table 8所示：根據新的CLSI判定標準只有1株 *C. glabrata* 不具感受性，佔所有臨床菌株的比例為0.09%(1/1063)。

此外根據歐洲委員會藥敏試驗(EUCAST)對 *C. albicans* 判定標準評估，最小抑菌濃度(MIC) >0.03 mg/L 視為具有抗藥性，最小抑菌濃度(MIC) ≤ 0.03 mg/L 視為具有感受性；對 *C. glabrata*，*C. tropicalis*，*C. krusei* 的判定標準評估，最小抑菌濃度(MIC) >0.06 mg/L 視為具有抗藥性，最小抑菌濃度(MIC) ≤ 0.06 mg/L 視為具有感受性。如Table 7和Table 8所示：發現所收集的所有臨床菌株對 anidulafungin 產生抗藥性的比例為1.7%(18/1063)；根據Table 7和Table 8所示：發現所收集的 *C. albicans* 菌株對 anidulafungin 產生抗藥性 (MIC >0.03 mg/L) 的比例為0.5%(2/402)；*C. tropicalis* 菌株對 anidulafungin 產生抗藥性(MIC >0.06 mg/L) 的比例為3.0%(8/267)；*C. glabrata* 菌株對 anidulafungin 產生抗藥性(MIC >0.06 mg/L) 的比例為2.7%(7/257)；*C. krusei* 菌株對 anidulafungin 產生抗藥性(MIC >0.06 mg/L) 的比例為5.6%(1/18)。

3. 使用CLSI和EUCAST方法分析受到臨床黴菌菌株感染的不同

同部位檢體對抗黴菌製劑的感受性

3.1 由不同感染部位收集的臨床菌株的數量與根據CLSI產生抗藥性的比例

如Tabel 9所示：從各醫院所收集到的感染部位檢體及感染的菌株數量如下：在尿液檢體收集到487個臨床菌株，在血液檢體收集到206個臨床菌株，從痰液檢體收集到136個臨床菌株，從傷口檢體收集到40個臨床菌株，從腹水檢體收集到32個臨床菌株，從膿液檢體收集到26個臨床菌株，從導管收集到21個臨床菌株，從微量吸管收集到13個臨床菌株，從其它部位收集到102個臨床菌株。

在收集的所有檢體中，受到黴菌菌株感染的部位以尿液比例最高，比例為45.8% (487/1063)；其次是血液受臨床真菌菌株感染比例為19.4% (206/1063)；痰液受臨床黴菌菌株感染比例為12.8% (136/1063)；傷口受臨床黴菌菌株感染比例為3.8% (40/1063)；腹水受臨床黴菌菌株感染比例為3.0% (32/1063)；膿受臨床黴菌菌株感染比例為2.4% (26/1063)；導管受臨床黴菌菌株感染比例為2.0% (21/1063)；微量吸管受臨床黴菌菌株感染比例為1.2% (13/1063)；其它部位受臨床黴菌菌株感染比例為9.6% (102/1063)。

3.1.1 利用CLSI方法分析在不同部位感染念珠菌對fluconazole的感受性

如Tabel 9所示：發現在所有收集到的感染部位檢體中，對fluconazole產生抗藥性(MIC \geq 64 mg/L)的比例為8.4% (89/1063)；對fluconazole具有劑量依賴型感受性(MIC=16~32 mg/L)的比例為2.4% (26/1063)；對fluconazole具有感受性(MIC \leq 8 mg/L)的比例為89.2% (948/1063)。另外對fluconazole具有抗藥性的5株*C. albicans*中，有3株分布於尿液檢體，比例為60% (3/5)；1株分布於皮膚傷口檢體，比例為20% (1/5)；1株分布於導管，比例為20% (1/5)。對fluconazole具有抗藥性的69株*C. tropicalis*，有31株分布於尿液檢體，比例為44.9% (31/69)；有13株分布於痰液檢

體，比例為27.7% (13/47)；有10株分布於血液檢體，比例為14.5% (10/69)；有2株分布於腹水檢體，比例為2.9% (2/69)；有2株分布於膿檢體，比例為40% (2/5)；有2株分布於傷口檢體，比例為5% (2/40)；1株分布於導管，比例為1.4% (1/69)；8株分布在其它部位，比例為11.6% (8/69)。同樣對fluconazole 具有抗藥性的10株 *C. glabrata* 中，有8株分布在尿液檢體，比例為 80% (8/10)；1株分布在血液檢體，比例為10% (1/10)；1株分布在其它部位，比例為10% (1/10)。對 fluconazole 具有抗藥性的5株 *C. krusei* 中，有2株分布在血液檢體，比例為40% (2/5)；2株分布在痰液檢體，比例為40% (2/5)；有1株分布在尿液檢體，比例為20% (1/5)。此外我們並沒有發現對 fluconazole 產生抗藥性的 *C. parapsilosis* 菌株。

3.1.2 利用CLSI方法分析在不同部位感染念珠菌對

voriconazole 的感受性

如Tabel 10所示：在收集的所有檢體中，發現在所有收集到的感染部位檢體中，對voriconazole產生抗藥性 ($MIC \geq 4 \text{ mg/L}$) 的比例為7.3% (78/1063)；對voriconazole具有劑量依賴型感受性 ($MIC = 2 \text{ mg/L}$) 的比例為0.8% (8/1063)；對voriconazole具有感受性 ($MIC \leq 1 \text{ mg/L}$) 的比例為92.0% (977/1063)。另外對voriconazole具有抗藥性的5株 *C. albicans* 分布於尿液檢體，比例為80% (4/5)；有1株分布於其它部位檢體，比例為20% (1/5)。

此外，對voriconazole具有抗藥性的71株 *C. tropicalis*，有36株分布於尿液檢體，比例為50.7% (36/71)；有9株分布於血液檢體，比例為12.7% (9/71)；有14株分布於痰液檢體，比例為19.7% (14/71)；有2株分布於傷口檢體，比例為2.8% (2/71)；有3株分布於膿液檢體，比例為4.2% (3/71)；2株分布於傷口檢體，比例為2.8% (2/71)；1株分布於腹水檢體，比例為1.4% (1/71)；4株分布在其它部位，比例為5.6% (4/71)。同樣對 voriconazole 具有抗藥性的2株 *C. glabrata* 中，皆分布在尿液檢體，比例為100% (2/2)。在 *C. parapsilosis* 和 *C. krusei* 沒有觀察到對 voriconazole 產生抗藥性的菌株。

3.1.3 利用CLSI方法分析在不同部位感染臨床黴菌菌株對 amphotericin B的感受性

如Tabel 11所示:在這次的實驗當中，在各感染部位收集到的1063個菌株，只有1株 *C. parapsilosis* ($MIC > 1 \text{ mg/L}$) 在其它部位的檢體發現不具有感受性的臨床菌株，佔其它部位檢體的比例為1.0% (1/102)，而佔全部檢體的比例為0.1% (1/1063)。

3.1.4 利用CLSI方法分析在不同部位感染臨床黴菌菌株對 ani dulafungin的感受性

如Table 12所示：在這次的實驗當中，在各感染部位收集到的1063個菌株，有1株 *C. glabrata* ($MIC \geq 0.5 \text{ mg/L}$) 在其它部位的檢體發現具抗藥性的菌株，佔其它部位檢體的比例為1.0% (1/102)，而佔全部檢體的比例為0.1% (1/1063)。

3.1.5 對fluconazole和voriconazole的共同抗藥(Coresistance)

fluconazole 和 voriconazole 同屬 azoles 類抗黴菌製劑，以美國臨床實驗室國家標準委員會 (CLSI) 判定標準而言，同時對 fluconazole 和 voriconazole 皆具有抗藥性的菌株共49株，其中包括 3株 *C. albicans* (皆出現在尿液檢體中)，2株 *C. glabrata* (皆出現在尿液檢體中)，44株 *C. tropicalis* (其中21株出現在尿液檢體，9株出現在痰液檢體，5株出現在血液檢體，2株出現在膿檢體，2株出現在傷口，1株出現在腹水檢體，4株出現在其它部位)。

3.2 臨床菌株由各不同感染部位收集的數量與根據EUCAST 產生抗藥性的比例

3.2.1 使用EUCAST方法分析在不同部位感染念珠菌對 fluconazole的感受性

如Tabel 15所示:我們發現在所有收集到的感染部位檢體中，對 fluconazole 產

生抗藥性 ($MIC > 4 \text{ mg/L}$) 的比例為7.4% (79/1063)；對 fluconazole 具有感受性 ($MIC \leq 2 \text{ mg/L}$) 的比例為73.6% (782/1063)。

此外，對 fluconazole 具有抗藥性的8株 *C. albicans*，佔全部 *C. albicans* 比例約 2.0% (8/402)，其中有4株分布於尿液檢體，比例為50% (4/8)；2株分布於痰液檢體，比例為25% (2/8)，1株分布於血液檢體，比例1.25%為 (1/8)，1株分布於其它部位，比例1.25%為 (1/8)。對 fluconazole 具有抗藥性的20株 *C. tropicalis*，佔全部 *C. tropicalis* 比例約 7.5% (20/267)，其中有7株分布於尿液檢體，比例為35% (7/20)；有5株分布於痰液檢體，比例為25% (5/20)；有1株分布於膿檢體，比例為5% (1/20)；有3株分布於血液部位，比例為15% (3/20)；有1株分布於微量吸管檢體，比例為5% (1/20)；有3株分布於其它部位，比例為15% (3/20)。同樣對 fluconazole 具有抗藥性的29株 *C. glabrata*中，佔全部 *C. glabrata* 比例約11.3% (29/257)，其中有24株分布在尿液檢體，比例為 82.8%(24/29)；2株分布在血液檢體，比例為6.9% (2/29)；1株分布在痰液檢體，比例為3.4% (1/29)；1株分布在膿檢體，比例為3.4% (1/29)；1株分布在其它部位，比例為3.4% (1/29)。對 fluconazole 具有抗藥性的1株 *C. parapsilosis*，分布在血液檢體，比例為100% (1/1)。對 fluconazole 具有抗藥性的18株 *C. krusei*，佔全部 *C. krusei* 比例約100% (18/18)，有7株分布於痰液檢體，比例為38.9% (7/18)；有3株分布於尿液檢體，比例為16.7% (3/18)；有2株分布於血液檢體，比例為11.1% (2/18)；有1株分布於膿檢體，比例為5.6% (1/18)；有5株分布於其它部位，比例為27.8% (5/18)。

3.2.2 利用EUCAST方法分析在不同部位感染念珠菌對 voriconazole 的感受性

如Tabel 16所示：在收集的所有檢體中，發現在所有收集到的感染部位檢體中，對voriconazole產生抗藥性 ($MIC > 0.125 \text{ mg/L}$) 的比例為10.3% (78/754)；對 voriconazole具有感受性 ($MIC \leq 0.125 \text{ mg/L}$) 的比例為92.0% (676/754)。

其中有3株對voriconazole具有抗藥性 ($MIC > 0.125 \text{ mg/L}$)，分別有1株C.

albicans 分布於痰液檢體，比例為33.3% (1/3)；1株 *C. albicans* 分布於腹水檢體，比例為33.3% (1/3)；有1株分布於其它部位檢體，比例為33.3% (1/3)。對 voriconazole 具有抗藥性的71株 *C. tropicalis*，有35株分布於血液檢體，比例為49.3% (36/71)；有20株分布於尿液檢體，比例為 28.2% (20/71)；有6株分布於痰液檢體，比例為 8.5% (6/71)；有2株分布於導管檢體，比例為 2.8% (2/71)；有2株分布於膿檢體，比例為 2.8% (2/71)；1株分布於傷口檢體，比例為 1.4%(1/71)；1株分布於腹水檢體，比例為1.4% (1/71)；1株分布在微量吸管，比例為1.4% (1/71)；有3株分布於其它部位，比例為 4.2% (3/71)。同樣對 voriconazole 具有抗藥性的1株 *C. parapsilosis* 分布在血液檢體，比例為100% (1/1)。

3.2.3 利用EUCAST方法分析在不同部位感染念珠菌對 amphotericin B 的感受性

如Tabel 17所示:在這次的實驗當中，在各感染部位收集到的1063個菌株，有5株對 amphotericin B 產生不具感受性的臨床菌株，佔全體比例約 0.5%(5/1063)。其中有3株 *C. albicans* 對 amphotericin B 具有抗藥性 (MIC > 1 mg/L)，分別有1株 *C. albicans* 分布於尿液檢體，比例為33.3% (1/3)；2株 *C. albicans* 分布於血液檢體，比例為66.7% (2/3)；對 amphotericin B 具有抗藥性的1株 *C. glabrata*，分布於尿液檢體，比例為100% (1/1)。

3.2.4 利用EUCAST方法分析在不同部位感染念珠菌對 anidulafungin 的感受性

如Tabel 18所示:對 anidulafungin 具有抗藥性 (MIC > 0.06) 的7株 *C. tropicalis*，有4株分布於血液檢體，比例為57.1% (4/7)；有3株分布於尿液檢體，比例為42.9% (3/7)；對 anidulafungin 具有抗藥性 (MIC > 0.06) 的7株 *C. glabrata*，有3株分布於血液檢體，比例為42.9% (3/7)；有1株分布於尿液檢體，比例為 14.3%(1/7)；有1株分布於膿檢體，比例為14.3% (1/7)；有2株分布於其它部位，比例為28.6%

(2/7)。有1株 *C. krusei* 對 anidulafungin 具有抗藥性 (MIC > 0.06)，分布於尿液檢體。
在此沒有發現任何 *C. albicans* 對 anidulafungin 具有抗藥性 (MIC > 0.03 mg/L)。

3.2.5 共同抗藥性 (Coresistance)

fluconazole 和 voriconazole 同屬 azoles 抗黴菌製劑，在所有臨床檢體中，根據歐洲藥檢委員會 (EUCAST) 對 *C. albicans*，*C. tropicalis*，*C. parapsilosis* 的判定標準，同時對 fluconazole 和 voriconazole 皆具有抗藥性的菌株共23株，其中包括5株 *C. albicans* (3株分布於尿液檢體，1株分布於痰液檢體，1株分布在其它部位)，17株 *C. tropicalis* (7株分布於尿液檢體，4株分布於痰液檢體，2株分布於血液檢體，1株分布於膿檢體，1株分布於微量吸管，2株分布於其它部位)，1株 *C. parapsilosis* (此株分布於血液檢體)。



4. 來自共生於成大醫院、中國醫藥大學附設醫院、義大醫院的愛滋病患口腔念珠菌菌種分布及抗藥性比例

4.1 愛滋病患口腔念珠的菌種分布

如 Table 19 所示:收集來自三家醫院的愛滋病患的口腔棉花拭子檢體，在成大醫院收集到的所有 328 位病患的口腔檢體，能夠生長在培養基上的有 193 位病患的口腔檢體，約佔整體 58.8%；在中國醫藥大學附設醫院收集到的所有 282 位病患的口腔檢體，能夠生長在培養基上的有 127 位病患的口腔檢體，約佔整體 45.1%；在義大醫院收集到的所有 106 位病患的口腔檢體，能夠生長在培養基上的有 55 位病患的口腔檢體，約佔整體 51.9%，經菌種鑑定後最後得到 494 株臨床菌株，總共 23 菌種，分別是: 350 株 *C. albicans*，40 株 *C. glabrata*，39 株 *C. dubliniensis*，21 株 *C. tropicalis*，7 株 *C. parapsilosis*，7 株 *C. intermedia*，6 株 *C. guilliermondii*，4 株 *Saccharomyces cerevisiae*，2 株 *C. famata*，2 株 *C. krusei*，2 株 *Stephanoascus ciferrii*，1 株 *Candida galeiformis*，1 株 *C. lusitaniae*，1 株 *Candida inconspicua*，1 株 *C. orthopsilosis*，株 *Candida pulcherrima*，1 株 *Candida rugosa*，1 株 *C. utilis*，1 株 *C. neoformans*，1 株 *Geotrichum klebahnii*，1 株 *K. ohmeri*，1 株 *T. asahii*，1 株 *Trichosporon feacale*。在這些臨床菌株中，1 株 *Metschnikowia sp.*和 1 株 *Trichosporon sp.*只能菌種鑑定目前達到同屬的結果。根據三家醫院菌種鑑定結果，以 *C. albicans* 佔所收集之臨床菌株的 70.9% (350/494)，是所有念珠菌中比例最高的菌種，接著依序為 *C. glabrata* 佔所收集之臨床菌株的 8.1% (40/494)，*C. dubliniensis* 佔所收集之臨床菌株的 7.9% (39/494)，*C. tropicalis* 佔所收集之臨床菌株的 4.3% (21/494)，*C. parapsilosis* 佔所收集之臨床菌株的 1.4% (7/494)，*C. intermedia* 佔所收集之臨床菌株的 1.4% (7/494)，*C. guilliermondii* 佔所收集之臨床菌株的 1.2% (6/494)，*S. cerevisiae* 佔所收集之臨床菌株的 0.8% (4/494)，*C. famata* 佔所收集之臨床菌株的 0.4% (2/494)，*C. krusei* 佔所收集之臨床菌株的 0.4% (2/494)，*S. ciferrii* 佔所收集之臨床菌株的 0.4% (2/494)等，在常見念珠菌的菌種分布情形與其它國家大致上無特別的差異(F. Katiraeet al., 2009)。

而在鑑定菌種方面，可以利用 VITEK 2 成功地鑑定菌種的比例達 94.7% (468/494)，需要利用 ITS 引子對序列作為菌種鑑定的比例約 3.2% (16/494)，利用 D1/D2 引子對序列作為菌種鑑定的比例約 2.0% (10/494)。

4.1.1 成大醫院的愛滋病患口腔念珠菌的菌種分布

如Table 20所示: 在成大醫院收集到的193位病患的口腔檢體, 經菌種鑑定後最後得到259株臨床菌株。根據菌種鑑定結果, 針對菌種出現比例前五名, 以 *C.albicans* 佔所有臨床菌株的68.7% (178/259), 是所有菌種之間比例最高者; 其次依序為 *C. glabrata* 佔所有臨床菌株的9.7% (25/259), *C. dubliniensis* 佔所有臨床菌株的9.3% (24/259), *C. tropicalis* 佔所有臨床菌株的3.5% (9/259), *C. parapsilosis* 佔所有臨床菌株的1.2% (3/259)。

4.1.2 中國醫藥大學附設醫院的愛滋病患口腔念珠菌的菌種分布

如Table 21所示: 在中國醫藥大學附設醫院收集到的127位病患的口腔檢體, 經菌種鑑定後最後得到167株臨床菌株。根據菌種鑑定結果, 針對菌種出現比例前五名, 以 *C. albicans* 佔所有臨床菌株的72.9% (122/167), 是所有菌種之間比例最高者, 其次依序為 *C. dubliniensis* 佔所有臨床菌株的7.7% (12/167), *C. glabrata* 佔所有臨床菌株的6.5% (11/167), *C. tropicalis* 佔所有臨床菌株的4.7% (8/167), *C. guilliermondii* 佔所有臨床菌株的2.4% (4/167)。

4.1.3 義大醫院的愛滋病患口腔念珠菌的菌種分布

如Table 22所示: 在成大醫院收集到的55位病患的口腔檢體, 經菌種鑑定後最後得到68株臨床菌株。根據菌種鑑定結果, 針對菌種出現比例前五名以 *C.albicans* 佔所有臨床菌株的73.5% (50/68), 是所有菌種之間比例最高者; 其次依序為 *C. glabrata* 佔所有臨床菌株的5.9% (4/68), *C. tropicalis* 佔所有臨床菌株的5.9% (4/68), *C. dubliniensis* 佔所有臨床菌株的4.4% (3/68), 而 *C. krusei*, *C. guilliermondii* 和 *C. parapsilosis* 則分別佔所有臨床菌株的1.5% (1/68)。

4.2 利用CLSI方法了解臨床黴菌菌株對抗黴菌製劑的感受性

4.2.1 臨床黴菌菌株對 fluconazole 的感受性

根據美國臨床實驗室國家標準委員會 (CLSI) 的判定標準評估, 最小抑菌濃

度(MIC) $\geq 64\text{mg/L}$ 視為具有抗藥性，最小抑菌濃度 (MIC) 介於 $16\sim 32\text{ mg/L}$ 之間視為劑量依賴型感受性(SDD)，最小抑菌濃度 (MIC) $\leq 8\text{mg/L}$ 視為具有感受性。如Table 23所示:所收集的所有菌株對 fluconazole 產生抗藥性的比例為4.5 % (22/494)；具有劑量依賴型感受性的比例為3.2 % (16/494)；具有感受性的比例為92.3% (456/494)。

4.2.2不同菌種之間對 fluconazole 的感受性

另外根據Table 23所示: 在具有抗藥性的念珠菌種之中,所收集的 *C.albicans* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性 (MIC $\geq 64\text{mg/L}$) 的比例為2.6% (9/350), 其中1株分布在義大醫院, 4株分布在中國醫藥大學附設醫院, 4株分布在成大醫院; 產生劑量依賴型感受性 (MIC介於 $16\sim 32\text{ mg/L}$) 的比例為0.3% (1/350), 此株分布在成大醫院。 *C.tropicalis* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性 (MIC $\geq 64\text{mg/L}$) 的比例為23.8% (5/21), 其中2株分布在義大醫院, 2株分布在中國醫藥大學附設醫院, 1株分布在成大醫院。*C.krusei* 菌株對fluconazole產生抗藥性 (MIC $\geq 64\text{mg/L}$) 的比例為100% (2/2), 其中1株分布在義大醫院, 1株分布在成大醫。*C.glabrata* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性 (MIC $\geq 64\text{mg/L}$) 的比例為2.5% (1/40), 分布在義大醫院, 產生劑量依賴型感受性 (MIC介於 $16\sim 32\text{ mg/L}$) 的比例為37.5%(15/40), 其中1株分布在義大醫院, 5株分布在中國醫藥大學附設醫院, 9株分布在成大醫院。*C.dubliniensis* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性 (MIC $\geq 64\text{mg/L}$) 的比例為2.6%(1/39), 分布在義大醫院; *C.galeiformis* 菌株對 fluconazole 產生抗藥性 (MIC $\geq 64\text{mg/L}$) 的比例為2.5% (1/40), 分布在成大醫院。

其中, *C.krusei* 對於 fluconazole 具內生性抗藥性, 因此對產生較低的感受性, 因此 *Candida krusei* 對 fluconazole 產生抗藥性的比例高達100% (2/2)。

4.2.3在 Fluconazole 的 Trailing growth 現象

Trailing growth 現象是指肉湯培養在24小時判斷為具感受性, 而在48小時培養後候判斷為具抗藥性。如Table 24所示, 觀察培養24小時的菌株發現對

fluconazole 具抗藥性($MIC \geq 64 \text{ mg/L}$)的比例為0.2% (1/494)，具有劑量依賴型感受性($MIC = 16 \sim 32 \text{ mg/L}$)的比例為0.8% (4/494)；具有感受性 ($MIC \leq 1 \text{ mg/L}$) 的比例為99.0% (489/494)。如Table 25所示，在對 fluconazole 具抗藥性的18株中，其中有trailing growth 現象的 *C. albicans* 佔88.9% (8/9)，其餘皆有trailing growth 現象，包含*C. tropicalis* 佔100% (5/5)，*C. krusei* 佔100% (2/2)，*C. glabrata* 佔100% (1/1)，*C. dubliniensis* 佔100% (1/1)。

4.2.4 臨床黴菌菌株對 voriconazole 的感受性

根據美國臨床實驗室國家標準委員會 (CLSI) 的判定標準評估，最小抑菌濃度 (MIC) $\geq 4 \text{ mg/L}$ 視為具有抗藥性，最小抑菌濃度 (MIC) 等於2 mg/L 視為劑量依賴型感受性(SDD)，最小抑菌濃度 (MIC) $\leq 1 \text{ mg/L}$ 視為具有感受性。如Table 26所示:所收集的所有菌株對 voriconazole 產生抗藥性 ($MIC \geq 4 \text{ mg/L}$) 的比例為2.6% (13/494)；具有劑量依賴型感受性 (MIC等於2 mg/L) 的比例為 0.4% (2/494)；具有感受性 ($MIC \leq 1 \text{ mg/L}$) 的比例為97.0% (479/494)。

4.2.5 不同菌株之間對 voriconazole 的感受性

另外根據 Table 26 所示: 在具有抗藥性的念珠菌種之中，所收集的*C. albicans* 菌株對 voriconazole 產生抗藥性 ($MIC \geq 4 \text{ mg/L}$) 的比例為2.6% (9/350)，其中3株分布在義大醫院，3株分布在中國醫藥大學附設醫院，3株分布在成大醫院，產生劑量依賴型感受性 ($MIC=2 \text{ mg/L}$) 的比例為0.3% (1/350)，分布在中國醫藥大學附設醫院。*C. tropicalis* 菌株對 voriconazole 產生抗藥性 ($MIC \geq 4 \text{ mg/L}$) 的比例為14.3% (3/21)，其中2株分布在義大醫院，1株分布在成大醫院。*C. dubliniensis* 菌株對 voriconazole 產生抗藥性 ($MIC \geq 4 \text{ mg/L}$) 的比例為2.6%(1/39)，分布在成大醫院。*C. krusei* 皆對 voriconazole 具感受性，沒有發現對於 voriconazole 具抗藥性的菌株。*C. glabrata* 產生劑量依賴型感受性 ($MIC=2 \text{ mg/L}$) 的比例為2.5% (1/40)，此株分布在成大醫院。

4.2.6 在 Voriconazole 的 Trailing growth 現象

Trailing growth 現象是指肉湯培養在24小時判斷為具感受性，而在48小時培養後候判斷為具抗藥性。如Table 27所示，觀察培養24小時的菌株沒有發現對 voriconazole 具抗藥性 ($MIC \geq 4\text{mg/L}$)，具有劑量依賴型感受性 ($MIC = 2\text{ mg/L}$) 的比例為0.2% (1/494)；具有感受性 ($MIC \leq 1\text{ mg/L}$) 的比例為99.8% (493/494)。

如Table 28所示，對 fluconazole 具抗藥性的13株皆有trailing growth 現象，包含 *C. albicans* 佔100% (9/9)，*C. tropicalis* 佔100% (3/3)，*C. dubliniensis* 佔100% (1/1)。

4.2.7 臨床黴菌菌株之間對 amphotericin B 的感受性

另外根據Table 29所示:在具有抗藥性的念珠菌種之中，只發現1株 *C. dubliniensis* 對 amphotericin B 產生抗藥性 ($MIC > 1\text{mg/L}$) 的比例為2.6% (1/39)，此株分布在成大醫院。在其它常見念珠念皆沒有發現對 amphotericin B 產生抗藥性的菌株。

四、討論

1. 念珠菌症常好發於免疫力低下的愛滋病患，尤其是在愛滋病患咽喉部發現的念珠菌對於一般常使用的抗黴菌製劑（如fluconazole）感受性有降低的趨勢 (Pfaller, 1995)。由於愛滋病患口腔內念珠菌的抗藥性已經是個日益嚴重的議題，目前在2010年全國黴菌抗藥性監測計畫中，以美國臨床實驗室國家標準委員會方法分析所有臨床黴菌對 fluconazole 產生抗藥性的比例為8.37%，其中 *C. tropicalis* 對 fluconazole 產生抗藥性的比例就高達 25.8%；所有臨床黴菌對 voriconazole產生抗藥性的比例為 6.5%，其中*C. tropicalis* 對 voriconazole 產生抗藥性的比例就高達 23.2%。*C. tropicalis*為常見non-*albicans Candida*，在台灣地區具抗藥性比例高於*C. albicans*的原因推測是可能其發展出具有抗藥性的速率高於 *C. albicans* (Yang et al., 2004)，或者醫院長期且廣泛地使用 azoles 類的抗黴菌製劑治療或作為念珠菌症的預防可能是因素之一 (Fichtenbaum et al., 2000; Perea et al., 2001)。另外我們也發現從各醫院所採集的臨床菌株對amphotericin B 和 anidulafungin 抗藥性比例為 0%和 0.09%，由於anidulafungin 的作用標的在黴菌細胞壁，與 azoles 類抗黴菌製劑作用在細胞膜成分 ergosterol 的作用標的不同，兩者同時治療真菌感染並不會產生交互作用，在 in vivo 和 in vitro 皆有良好活性 (Vazquez and Sobel, 2006)，因此未來治療黴菌感染，或許可以考慮使用 azoles 類抗黴菌製劑搭配 amphotericin B 或 anidulafungin。
2. 目前以根據美國臨床實驗室國家標準委員會(CLSI)的標準實驗流程來測定 echinocandins的感受性轉效點 (breakpoint) 建議為 ≤ 2 mg/L，當用此標準來檢視臨床菌株發現只有1株 *Trichosporon mucoides* 具抗藥性，但美中不足的是對於抗黴菌製劑的 breakpoint 並不完整，而影響臨床上黴菌對抗真菌製劑的判讀，目前美國臨床實驗室國家標準委員會 (CLSI)在2011年五月對此在做了新的修訂，對於 echinocandins 的 breakpoint 為應菌種之間的差異而定 (Axner-Elings et al., 2011)， $MIC \geq 1$ mg/L 視為是有抗藥性， $MIC \leq 0.25$ mg/L 視為具有感受性的

菌株包含 *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*; MIC \geq 8 mg/L 視為具有抗藥性, MIC \leq 2 mg/L 視為具有感受性的菌株包含 *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*; MIC \geq 0.5 mg/L 視為是有抗藥性, MIC \leq 0.125 mg/L 視為具有感受性的菌株包含 *C. glabrata*, 當用此標準來檢視臨床菌株發現1株 *Trichosporon mucoides*和1株 *C. glabrata* 具抗藥性, 在這次2010全國真菌抗藥性監測計畫分別利用此兩種相異的標準對於抗藥比例仍無明顯不同。

3. 在部分菌種有減少對抗真菌製劑的感受性的現象如 *C. lusitaniae* 對 amphotericin B 具有抗藥性 (Hadfield et al., 1987)。 *C. krusei* 及 *C. glabrata* 對 fluconazole 較其它念珠菌菌種不具感受性 (Akova et al., 1991; Orozco et al., 1998; Piemonte et al., 1996), *C. parapsilosis* 對 echinocandins 較不具感受性, 而 *Cryptococcus neoformans* 對於 echinocandins 無臨床上的關聯性 (Cowen, 2008), 而 EUCAST 對 *C. parapsilosis* 和 *Cryptococcus neoformans* 並沒有建議適合的抗藥濃度, 而在這次實驗數據也顯示 *C. parapsilosis* 和 *Cryptococcus neoformans* 也有較不具感受性的現象。

4. 如附錄一所示: 美國臨床實驗室國家標準委員會 (CLSI) 和歐洲委員會藥敏試驗 (EUCAST) 皆是測菌對藥物感受性的最小抑菌濃度, 然而兩者在實驗方法上有所相異, 分別條列如下: (1) 葡萄糖濃度在美國臨床實驗室國家標準委員會是 0.2 %, 而在歐洲藥敏試驗委員會是 2 %; (2) 96 孔盤在美國臨床實驗室國家標準委員會是圓球形底部, 而在歐洲藥敏試驗委員會是扁平形底部; (3) 細胞接種在美國臨床實驗室國家標準委員會是 $0.5 \sim 2.5 \times 10^3$ CFU/ml, 而在歐洲藥敏試驗委員會是 $0.5 \sim 2.5 \times 10^5$ CFU/ml; (4) 結果判讀在美國臨床實驗室國家標準委員會是肉眼判斷, 經由目測後菌液生長情況明顯受到藥物抑制的濃度(抑制約 50% 菌液生長程度) 為最小抑菌濃度; 而在歐洲藥敏試驗委員會是測吸光值, 菌液生長受藥物濃度影響達百分之五十為最小抑菌濃度 (MIC) 進行實驗。整體而言在 EUCAST 方法, 培養基添加百分之二的葡萄糖供真菌利用, 且在接種菌量是 CLSI 方法的 100 倍, 以致判讀時間縮短為 24 小時, 而非 CLSI 方法必須等待至

48 小時才能判讀結果。為了方便同時進行兩種實驗方法，本實驗皆使用扁平型底部的96 孔盤作為實驗材料，以及在判讀時使用Biotrak II 分光光度儀測吸光值計算抑制菌株生長50% (適用於anidulafungin, fluconazole, voriconazole) 或95 % (適用於amphotericin B)的最低藥物的濃度取代肉眼判讀可能產生的誤差並提高兩種方法在結果判讀的一致性。

5. 在267株的 *C. tropicalis* 在 Fluconazole, Voriconazole, 和anidulafungin 藥盤在CLSI 24小時皆為具感受性菌株，而在 EUCAST 24小時產生抗藥性菌株數量分別有16株 (6.0%)，39株 (14.6%) 和8株 (3.0%)，發現在24小時判讀黴菌對藥物的感受性使用 EUCAST 方法產生的抗藥性比例較高；而 *C. tropicalis*在 fluconazole 和 voriconazole 藥盤在CLSI 48小時產生抗藥性菌株數量分別有 69 株 (25.8%)，71株 (26.6%)，發現在48小時判讀黴菌對藥物的感受性結果使用 CLSI 方法產生的抗藥性比例較 EUCAST 方法高，因此認為在判斷*C. tropicalis* 菌種對藥物的感受性時使用EUCAST方法可能較為嚴謹。然而，在257株的 *C. glabrata* 在 fluconazole, voriconazole, 和anidulafungin 藥盤在CLSI 24小時皆為產生抗藥性分別有2株 (0.8%)，0株，和1株 (0.4%)，而在EUCAST 24小時產生抗藥性菌株數量分別有29株 (11.3%)，23株 (8.9%) 和7株 (2.7%)，發現在24 小時判讀黴菌對藥物的感受性使用 EUCAST 方法產生的抗藥性比例較高；而 *C. glabrata* 在 fluconazole 和 voriconazole 藥盤在 CLSI 48小時產生抗藥性菌株數量分別有10株 (3.9%)，2株 (0.8%)，發現在48小時判讀黴菌對藥物的感受性結果使用CLSI方法產生的抗藥性比例較EUCAST方法低，因此認為在判斷*C. tropicalis*菌種對藥物的感受性時使用CLSI方法可能較為嚴謹。

五、 結論：

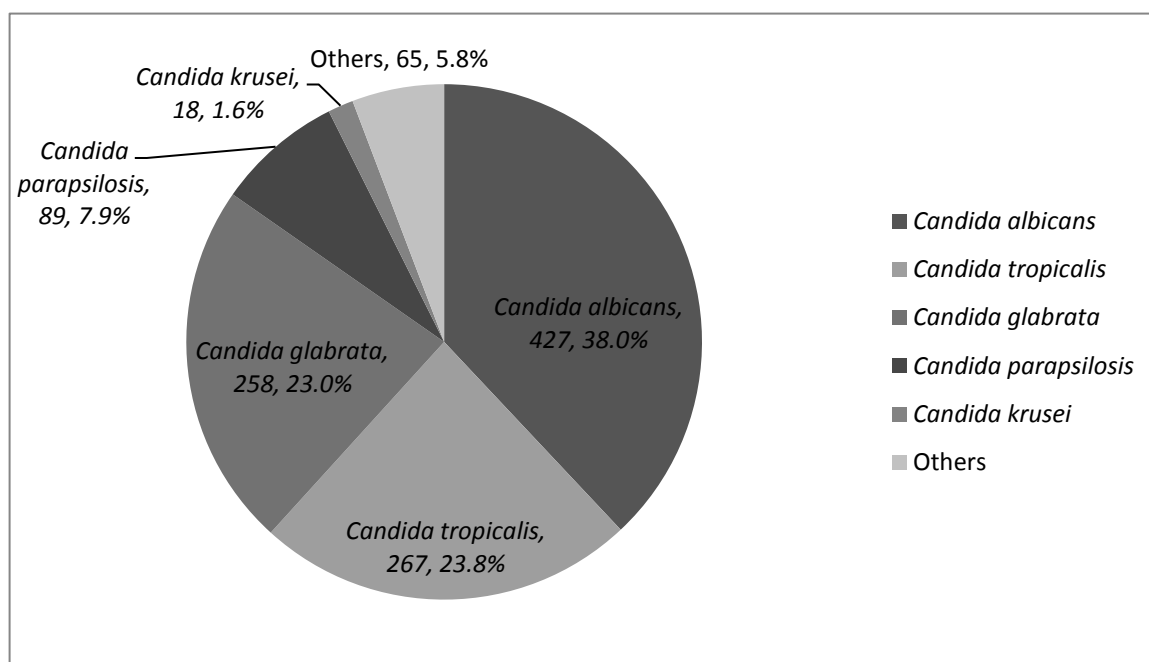
2010 年全國黴菌抗藥性監測計畫的 1124 個臨床菌株和共生於愛滋病患口腔中的的 494 個臨床菌株，皆顯示 *C. albicans*仍為念珠菌中最常見的菌種，其中受到黴菌菌株感染的部位以尿液比例最高(45.8%)。而在藥物感受性方面，

2010 年全國真菌抗藥性監測計畫和共生於愛滋病患口腔中的念珠菌對 azoles 類抗黴菌藥物 (fluconazole 和 voriconazole) 的感受性較 polyene (amphotericin B) 和 echinocandins (anidulafungin) 類抗黴菌藥物低。

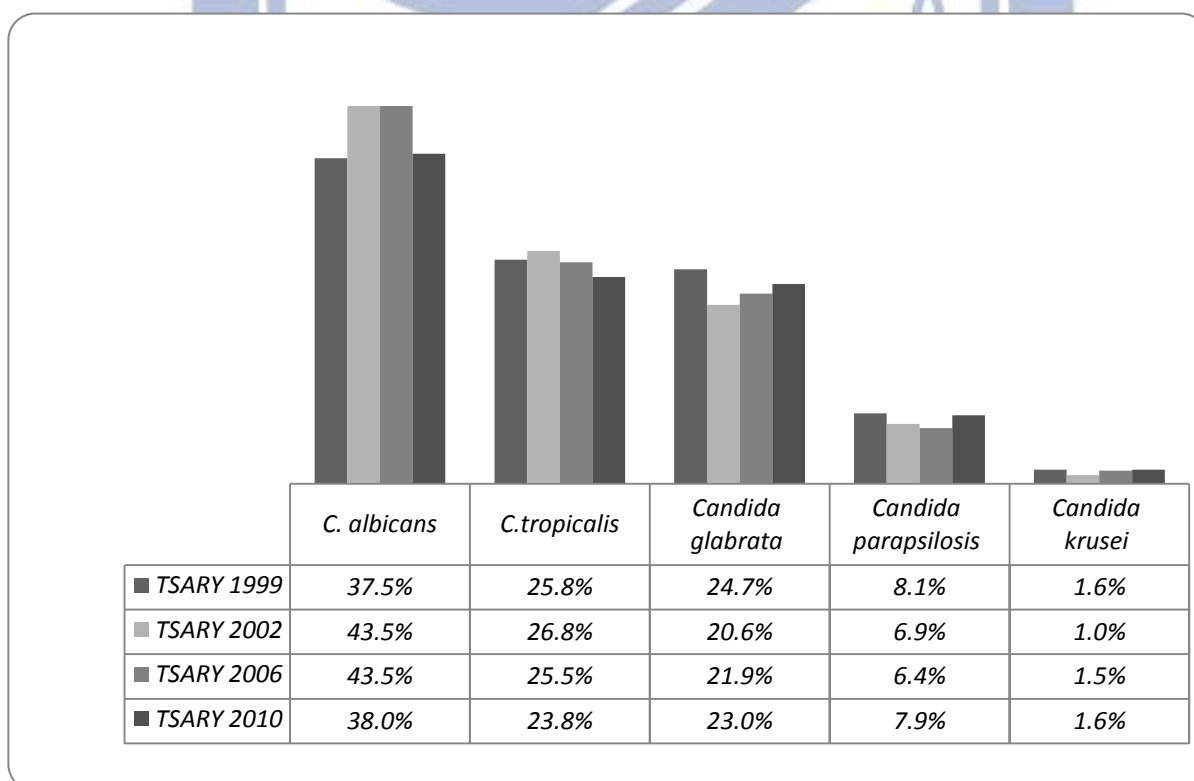
未來展望

1. 對 triazoles 類抗黴菌製劑產生抗藥性的可能有許多因素，包含 target enzyme *ERG11* 發生突變或過度表現，*MDR1* 持續過度表現等，文獻指出發生 trailing growth 的具感受性的白色念珠菌相較於較不具感受性的菌株具有更多的 heterozygous *ERG11* mutations；且發生 trailing growth 的具感受性的白色念珠菌在 *ERG11* 的 hot spot 也有 nucleotide substitution 情形 (Lee, 2004)，因此可以進一步對 *ERG11* 進行 knock out 觀察對藥物感受性是否有影響。
2. 在本實驗中使用 CLSI 和 EUCAST 兩種測黴菌對藥物感受性的方法，可進一步將兩者實驗後得到的最小抑菌濃度數值換算成 \log_2 值，藉由計算其相關係數 (intraclass correlation coefficient, ICC) 在線性迴歸上的意義來判斷分別使用 CLSI 和 EUCAST 兩種方法在結果判讀有無差別。

圖一、念珠菌菌株分布圖



圖二、西元 1999 至 2010 全國黴菌抗藥性監測計畫



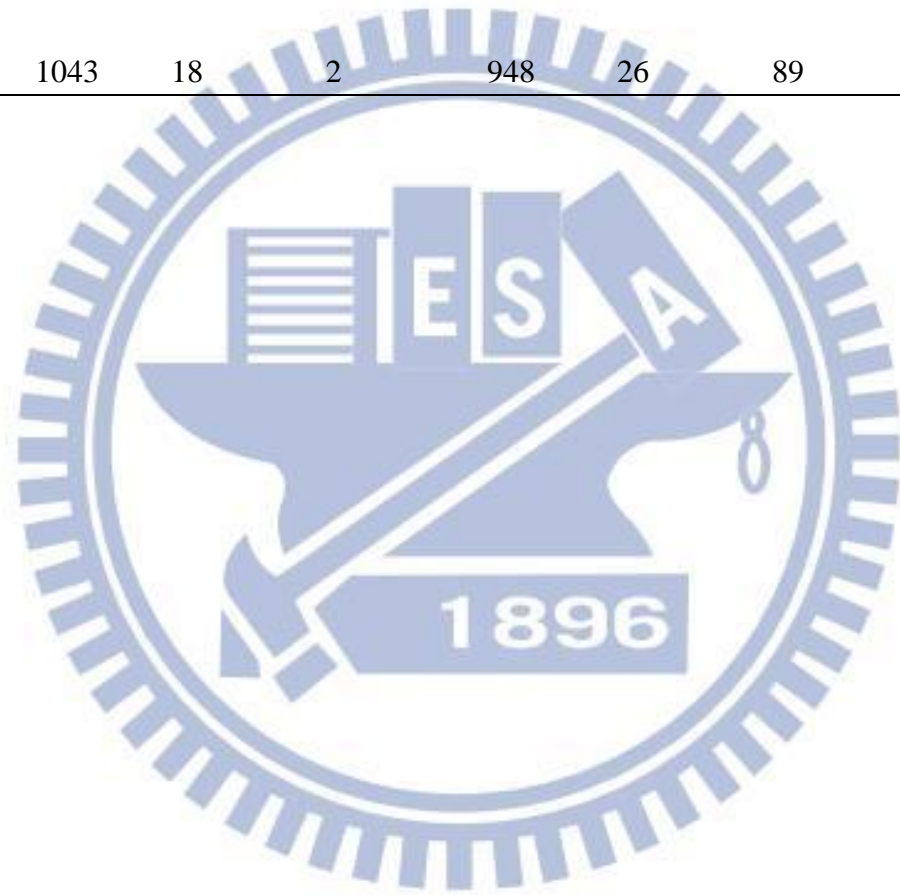
表一、MIC distribution of fluconazole in clinical isolates using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.

species (no. of isolates)	test	MIC (mg/L)									
		0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Candida albicans</i> (402)	CLSI (24h)	291	95	9	4		2		1		
	CLSI (48h)	216	137	20	1		15	4	2	2	5
	EUCAST (24h)	200	174	9		3	8	3	1	0	4
<i>Candida tropicalis</i> (267)	CLSI (24h)	100	146	16	4	1					
	CLSI (48h)	10	96	59	16	2	9	2	2	2	69
	EUCAST (24h)	26	132	60	16	9	5		4	3	13
<i>Candida glabrata</i> (257)	CLSI (24h)	3	15	88	125	1	14		7	2	2
	CLSI (48h)	1		2	34	2	185	19		4	10
	EUCAST (24h)	1	1		4	48	174	14	2	2	11
<i>Candida parapsilosis</i> (85)	CLSI (24h)	9	33	36	6			1			
	CLSI (48h)	3	14	29	30		5	3	1		
	EUCAST (24h)	2	4	43	28	4	3	1			
<i>Candida krusei</i> (18)	CLSI (24h)	1						9	8		
	CLSI (48h)	1								12	5
	EUCAST (24h)	1							7	11	
Others (34)	CLSI (24h)	5	2	4	11		12				
	CLSI (48h)	2	2	5	3	1	16	4	1		
	EUCAST (24h)	3	4	3	4	7	10	2	1		
Total (1063)	CLSI (24h)	409	291	153	150	2	28	10	16	2	2
Total (1063)	CLSI (48h)	233	249	115	84	5	230	32	6	20	89
Total (1063)	EUCAST (24h)	230	313	115	52	71	203	20	15	15	28

表二、MIC susceptibility of fluconazole using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.

species	CLSI						EUCAST		
	MIC (mg/L)								
	24h <= 8	16 ~ 32	>= 64	48h <= 8	16 ~ 32	>= 64	24h <= 2	4	> 4
<i>Candida albicans</i> (402)	401	1	0	393	4	5	386	8	8
<i>Candida tropicalis</i> (267)	267	0	0	194	4	69	239	8	20
<i>Candida glabrata</i> (257)	246	9	2	243	4	10	5	174	29
<i>Candida parapsilosis</i> (85)	85	0	0	84	1	0	81	3	1
<i>Candida krusei</i> (18)	10	8	0	1	12	5	0	0	18
<i>Candida guilliermondii</i> (8)	8	0	0	7	1	0	5	3	0
<i>Candida metapsilosis</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Candida nivariensis</i> (4)	4	0	0	4	0	0	1	1	2
<i>Kodamaea ohmeri</i> (4)	4	0	0	4	0	0	1	3	0
<i>Candida pelliculosa</i> (3)	3	0	0	3	0	0	1	2	0
<i>Pichia mississippiensis</i> (3)	3	0	0	3	0	0	2	1	0
<i>Candida dubliniensis</i> (2)	2	0	0	2	0	0	2	0	0
<i>Candida famata</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Candida haemulonii</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Candida intermedia</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Candida lusitanae</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Candida orthopsilosis</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Candida orthopsilosis</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Candida utilis</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0	0

species	<= 8	16 ~ 32	>= 64	<= 8	16 ~ 32	>= 64	<= 2	4	> 4
<i>Trichosporon mucoides</i> (1)	1	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Trichosporon sp.</i> (2)	2	0	0	2	0	0	2	0	0
Total	1043	18	2	948	26	89	781	203	79



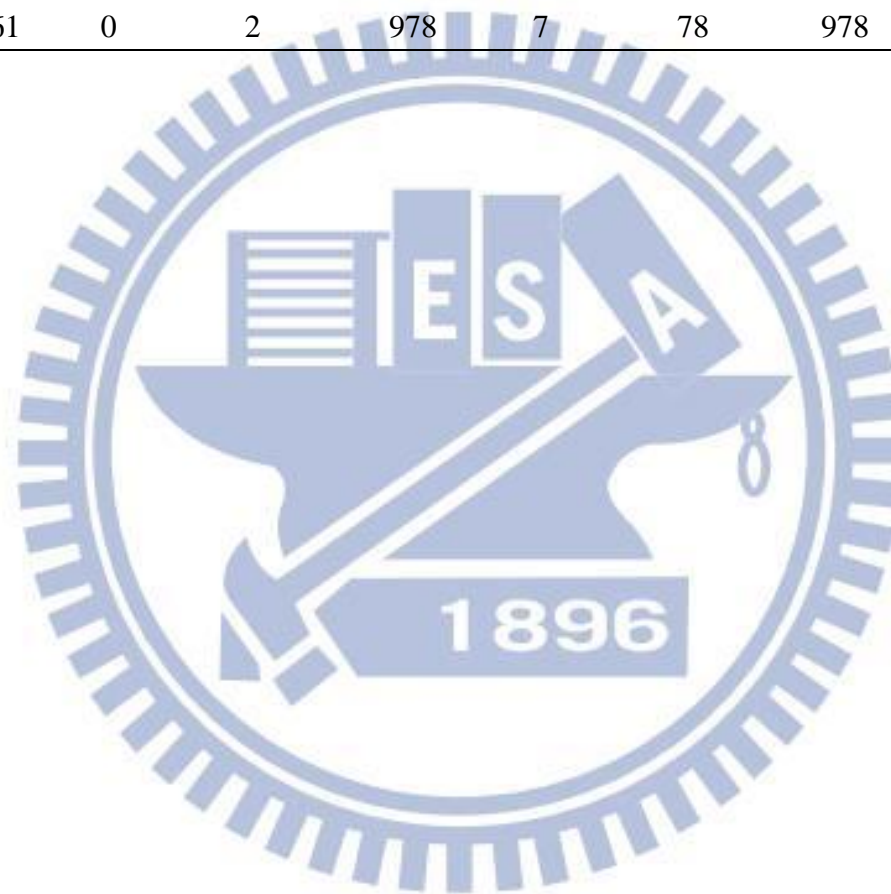
表三、MIC distribution of voriconazole in clinical isolates using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.

species (no. of isolates)	test	MIC (mg/L)										
		0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	
<i>Candida albicans</i> (402)	CLSI (24h)	393	6	1								2
	CLSI (48h)	352	19	14	8	3		1		1	4	
	EUCAST (24h)	377	5	6	7	1	1		1		4	
<i>Candida tropicalis</i> (267)	CLSI (24h)	240	23	4								
	CLSI (48h)	58	74	29	12	10	7	4	2	3	68	
	EUCAST (24h)	163	36	21	8	4	10	2	5	3	15	
<i>Candida glabrata</i> (257)	CLSI (24h)	192	46	7	2	3	5	2				
	CLSI (48h)	3	10	100	114	15	1	7	5		2	
	EUCAST (24h)	8	11	90	125	10	2	1	6	4		
<i>Candida parapsilosis</i> (85)	CLSI (24h)	81	3		1							
	CLSI (48h)	46	28	7	2	2						
	EUCAST (24h)	69	11	1	1	1			1		1	
<i>Candida krusei</i> (18)	CLSI (24h)	2		6	10							
	CLSI (48h)	1				14	3					
	EUCAST (24h)	1			5	11	1					
Others (34)	CLSI (24h)	17	11	5	1							
	CLSI (48h)	8	9	4	10	3						
	EUCAST (24h)	13	7	7	6				1			
Total (1063)	CLSI (24h)	925	89	23	14	3	5	2			2	
Total (1063)	CLSI (48h)	468	140	154	146	47	11	12	7	4	74	
Total (1063)	EUCAST (24h)	631	70	125	152	27	14	3	14	7	20	

表四、MIC susceptibility of voriconazole using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.

species	CLSI			EUCAST				
	MIC (mg/L)						24h	
	24h	48h			24h			
	<= 1	2	>= 4	<= 1	2	>= 4	<= 0.125	>0.125
<i>Candida albicans</i> (402)	400	0	2	397	0	5	395	7
<i>Candida tropicalis</i> (267)	267	0	0	194	2	71	228	39
<i>Candida glabrata</i> (257)	257	0	0	250	5	2	234	23
<i>Candida parapsilosis</i> (85)	85	0	0	85	0	0	82	3
<i>Candida krusei</i> (18)	18	0	0	18	0	0	6	12
<i>Candida guilliermondii</i> (8)	8	0	0	8	0	0	8	0
<i>Candida nivariensis</i> (4)	4	0	0	4	0	0	4	0
<i>Kodamaea ohmeri</i> (4)	4	0	0	4	0	0	4	0
<i>Candida pelliculosa</i> (3)	3	0	0	3	0	0	3	0
<i>Pichia mississippiensis</i> (3)	3	0	0	3	0	0	3	0
<i>Candida dubliniensis</i> (2)	2	0	0	2	0	0	2	0
<i>Candida famata</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>Candida haemulonii</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>Candida intermedia</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>Candida metapsilosis</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>Candida lusitanae</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>Candida orthopsilosis</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>Candida utilis</i> (1)	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>Trichosporon mucoides</i> (1)	1	0	0	1	0	0	0	1

species	<= 1	2	>= 4	<= 1	2	>= 4	<= 0.125	>0.125
<i>Trichosporon sp. (2)</i>	2	0	0	2	0	0	2	0
Total	1061	0	2	978	7	78	978	85



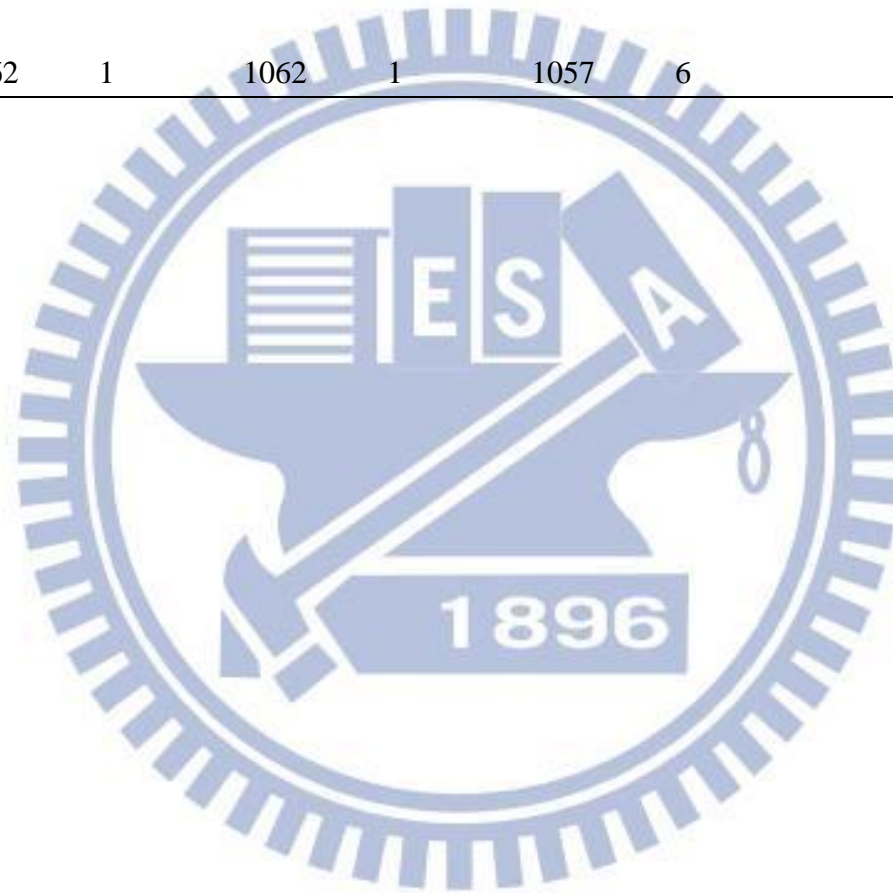
表五、MIC distribution of amphotericin B in clinical isolates using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.

species (no. of isolates)	test	MIC (mg/L)										
		0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	
<i>Candida albicans</i> (402)	CLSI (24h)	4	26	106	158	89	18					1
	CLSI (48h)			8	46	203	145					
	EUCAST (24h)		7	44	142	179	27	3				
<i>Candida tropicalis</i> (267)	CLSI (24h)	4	31	75	108	43	6					
	CLSI (48h)			5	26	155	81					
	EUCAST (24h)		4	24	89	129	20	1				
<i>Candida glabrata</i> (257)	CLSI (24h)	4	7	26	89	109	22					
	CLSI (48h)		1		18	117	121					
	EUCAST (24h)		1	11	54	158	32		1			
<i>Candida parapsilosis</i> (85)	CLSI (24h)	3	11	25	39	6	1					
	CLSI (48h)			1	5	47	31	1				
	EUCAST (24h)		3	5	29	42	6					
<i>Candida krusei</i> (18)	CLSI (24h)	1	1	5	5	5	1					
	CLSI (48h)	1				6	11					
	EUCAST (24h)				1	8	9					
Others (34)	CLSI (24h)	4	7	10	8	4	1					
	CLSI (48h)				8	17	9					
	EUCAST (24h)			5	13	14	2					
Total (1063)	CLSI (24h)	20	83	247	407	256						1
Total (1063)	CLSI (48h)	1	1	14	103	545	398	1				
Total (1063)	EUCAST (24h)		15	89	328	530	96	4	1			

表六、MIC susceptibility of amphotericin B using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.

species	CLSI		EUCAST			
	MIC (mg/L)					
	24h		48h		24h	
	<=1	>1	<=1	>1	<=1	>1
<i>Candida albicans</i> (402)	401	1	402	0	399	3
<i>Candida tropicalis</i> (267)	267	0	267	0	267	0
<i>Candida glabrata</i> (257)	257	0	257	0	256	1
<i>Candida parapsilosis</i> (85)	85	0	84	1	83	2
<i>Candida krusei</i> (18)	18	0	18	0	18	0
<i>Candida guilliermondii</i> (8)	8	0	8	0	8	0
<i>Candida nivariensis</i> (4)	4	0	4	0	4	0
<i>Kodamaea ohmeri</i> (4)	4	0	4	0	4	0
<i>Candida pelliculosa</i> (3)	3	0	3	0	3	0
<i>Pichia mississippiensis</i> (3)	3	0	3	0	3	0
<i>Candida dubliniensis</i> (2)	2	0	2	0	2	0
<i>Trichosporon sp.</i> (2)	2	0	2	0	2	0
<i>Candida famata</i> (1)	1	0	1	0	1	0
<i>Candida haemulonii</i> (1)	1	0	1	0	1	0
<i>Candida intermedia</i> (1)	1	0	1	0	1	0
<i>Candida metapsilosis</i> (1)	1	0	1	0	1	0
<i>Candida lusitanae</i> (1)	1	0	1	0	1	0
<i>Candida orthopsilosis</i> (1)	1	0	1	0	1	0

species	<=1	>1	<=1	>1	<=1	>1
<i>Candida utilis</i> (1)	1	0	1	0	1	0
<i>Trichosporon mucoides</i> (1)	1	0	1	0	1	0
Total	1062	1	1062	1	1057	6



表七、MIC distribution of anidulafungin in clinical isolates using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.

species (no. of isolates)	test	MIC (mg/L)											
		0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8		
<i>Candida albicans</i> (402)	CLSI (24h)	394	8										
	CLSI (48h)	394	8										
	EUCAST (24h)	400	2										
<i>Candida tropicalis</i> (267)	CLSI (24h)	160	93	13	1								
	CLSI (48h)	160	93	13	1								
	EUCAST (24h)	179	77	8									
<i>Candida glabrata</i> (257)	CLSI (24h)	26	206	20	2	2	1						
	CLSI (48h)	26	206	20	2	2	1						
	EUCAST (24h)	174	73	3		1	1	1	1				
<i>Candida parapsilosis</i> (85)	CLSI (24h)	4	1	3	3	11	39	19	5				
	CLSI (48h)	4	1	3	3	11	39	19	5				
	EUCAST (24h)	9	3		3	8	11	44	7				
<i>Candida krusei</i> (18)	CLSI (24h)	1	12	5									
	CLSI (48h)	2	12	4									
	EUCAST (24h)	3	14	1									
Others (34)	CLSI (24h)	7	8	7	3	1	5	2					1
	CLSI (48h)	7	8	7	3	1	5	2					1
	EUCAST (24h)	13	3	5	2	2	2	5	1				1
Total (1063)	CLSI (24h)	592	328	48	9	14	45	21	5				1
Total (1063)	CLSI (48h)	593	328	47	9	14	45	21	5				1
Total (1063)	EUCAST (24h)	773	175	17	5	11	13	50	9				1

表八、MIC susceptibility of anidulafungin using CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution.

species	CLSI 24h		EUCAST 24h	
	MIC (mg/L)			
	≤ 0.25	≥ 1	≤ 0.03	> 0.03
<i>Candida albicans</i> (402)	402	0	395	7
	≤ 0.25	≥ 1	≤ 0.06	> 0.06
<i>Candida dubliniensis</i> (2)	2	0	2	0
<i>Candida krusei</i> (18)	18	0	17	1
<i>Candida tropicalis</i> (267)	267	0	259	8
	≤ 2	≥ 8	≤ 0.06	> 0.06
<i>Candida guilliermondii</i> (8)	8	0	1	7
<i>Candida lusitanae</i> (1)	1	0	0	1
<i>Candida parapsilosis</i> (85)	85	0	2	83
	≤ 0.125	≥ 0.5	≤ 0.06	> 0.06
<i>Candida glabrata</i> (257)	254	1	250	7

表九、The susceptibility to fluconazole of *Candida* species from different sources according to CLSI method.

	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Others	Total
Urine	≥ 64	3	31	8	0	1	0	43 (8.8%)
	16 - 32	1	2	4	0	1	0	8
	≤ 8	126	102	184	14	1	9	436
	subtotal	130	135	196	14	3	9	487
Sputum	≥ 64	0	13	0	0	2	0	15 (11.0%)
	16 - 32	1	0	0	0	5	1	7
	≤ 8	61	34	12	2	0	5	114
	subtotal	62	47	12	2	7	6	136
Blood	≥ 64	0	10	1	0	2	0	13 (6.3%)
	16 - 32	0	2	0	0	0	0	2
	≤ 8	99	29	21	35	0	7	191
	subtotal	99	41	22	35	2	7	206
Wound	≥ 64	1	2	0	0	0	0	3 (7.5%)
	16 - 32	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 8	15	5	4	10	0	3	37
	subtotal	16	7	4	10	0	3	40
Pus	≥ 64	0	2	1	0	0	0	3 (11.5%)
	16 - 32	0	0	0	0	1	0	1
	≤ 8	15	3	0	4	0	0	22
	subtotal	15	5	1	4	1	0	26

	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Others	Total
Tip	≥ 64	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 8	5	5	0	3	0	0	13
	subtotal	5	5	0	3	0	0	13
Ascites	≥ 64	0	2	0	0	0	0	2 (6.3%)
	16 - 32	0	0	0	0	0	0	0
	< 8	22	1	6	0	0	1	30
	subtotal	22	3	6	0	0	1	32
Catheter	≥ 64	1	1	0	0	0	0	2 (9.5%)
	16 - 32	1	0	0	1	0	0	2
	≤ 8	7	5	1	3	0	1	17
	subtotal	9	6	1	4	0	1	21
Others	≥ 64	0	8	0	0	0	0	8 (7.8%)
	16 - 32	1	0	0	0	5	0	6
	≤ 8	43	10	15	13	0	7	88
	subtotal	44	18	15	13	5	7	102
All	≥ 64	5	69	10	0	5	0	89 (8.4%)
	16 - 32	4	4	4	1	12	1	26
	≤ 8	393	194	243	84	1	33	948
	subtotal	402	267	257	85	18	34	1063

表十、The susceptibility to voriconazole of *Candida* species from different sources according to CLSI method.

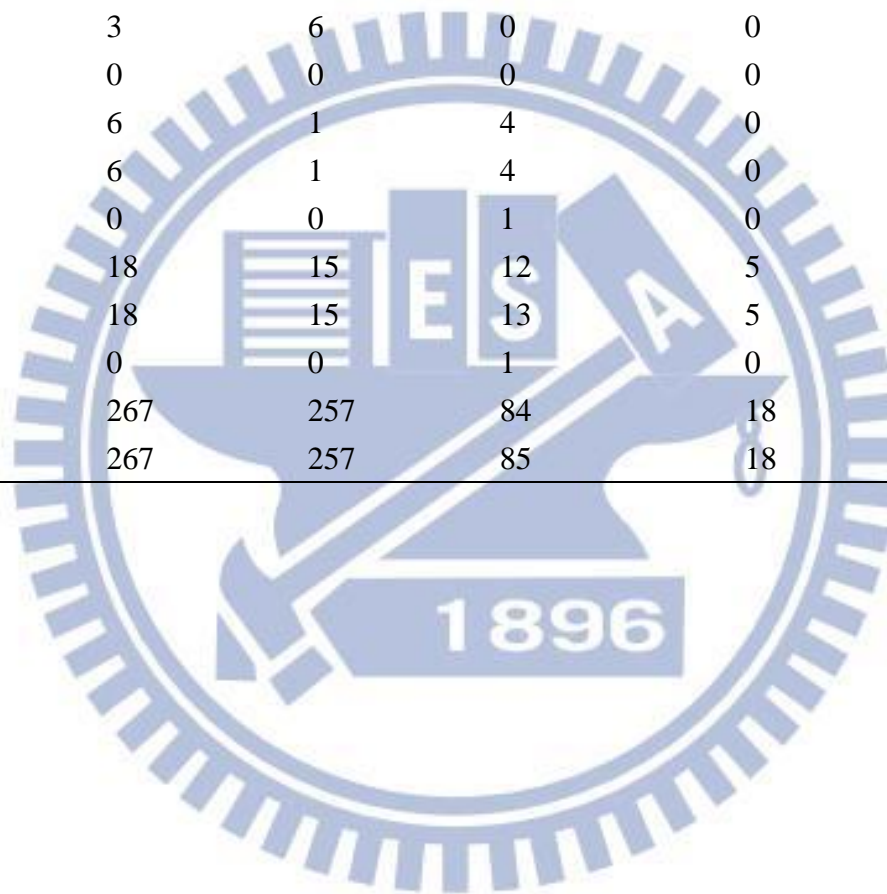
	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Others	Total
Urine	≥ 4	4	36	2	0	0	0	42 (8.6%)
	2	0	0	3	0	0	0	3
	≤ 1	126	99	191	14	3	9	442
	subtotal	130	135	196	14	3	9	487
Sputum	≥ 4	0	14	0	0	0	0	14 (10.3%)
	2	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	62	33	12	2	7	6	122
	subtotal	62	47	12	2	7	6	136
Blood	≥ 4	0	9	0	0	0	0	9 (4.4%)
	2	0	2	1	0	0	0	3
	≤ 1	99	30	21	35	2	7	194
	subtotal	99	41	22	35	2	7	206
Wound	≥ 4	0	2	0	0	0	0	2 (5%)
	2	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	16	5	4	10	0	3	38
	subtotal	16	7	4	10	0	3	40
Pus	≥ 4	0	3	0	0	0	0	3 (11.5%)
	2	0	0	1	0	0	0	1
	≤ 1	15	2	0	4	1	0	22
	subtotal	15	5	1	4	1	0	26

	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Others	Total
Tip	≥ 4	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	subtotal	5	5	0	3	0	0	13
Ascites	≥ 4	0	1	0	0	0	0	1 (3.1%)
	2	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	22	2	6	0	0	1	31
	subtotal	2	3	6	0	0	1	32
Catheter	≥ 4	0	2	0	0	0	0	2 (9.5%)
	2	0	0	0	1	0	0	1
	≤ 1	9	4	1	3	0	1	18
	subtotal	9	6	1	4	0	1	21
Others	≥ 4	1	4	0	0	0	0	5 (4.9%)
	2	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	43	14	15	13	5	7	97
	subtotal	44	18	15	13	5	7	102
All	≥ 4	5	71	2	0	0	0	78 (7.3%)
	2	0	2	5	1	0	0	8
	≤ 1	397	194	250	84	18	34	977
	Total	402	267	257	85	18	34	1063

表十一、The susceptibility to amphotericin B of *Candida* species from different sources according to CLSI method.

	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Others	Total
Urine	> 1	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	130	135	196	14	3	9	487
	subtotal	130	135	196	14	3	9	487
Sputum	> 1	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	62	47	12	2	7	6	136
	subtotal	62	47	12	2	7	6	136
Blood	> 1	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	99	41	22	35	2	7	206
	subtotal	99	41	22	35	2	7	206
Wound	> 1	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	16	7	4	10	0	3	40
	subtotal	16	7	4	10	0	3	40
Pus	> 1	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	15	5	1	4	1	0	26
	subtotal	15	5	1	4	1	0	26
Tip	> 1	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	5	5	0	3	0	0	13
	subtotal	5	5	0	3	0	0	13

	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Others	Total
Ascites	> 1	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	22	3	6	0	0	1	32
	subtotal	22	3	6	0	0	1	32
Catheter	> 1	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	9	6	1	4	0	1	21
	subtotal	9	6	1	4	0	1	21
Others	> 1	0	0	0	1	0	0	1 (1.0%)
	≤ 1	44	18	15	12	5	7	101
	subtotal	44	18	15	13	5	7	102
All	> 1	0	0	0	1	0	0	1 (0.1%)
	≤ 1	402	267	257	84	18	34	1063
	Total	402	267	257	85	18	34	1063



表十二 、 The susceptibility to anidulafungin of *Candida* species from different sources according to CLSI method.

species	<i>C. albicans</i>		<i>C.tropicalis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C.parapsilosis</i>		<i>C.krusei</i>		Others	Total
	≤ 0.25	≥1	≤ 0.25	≥1	≤ 0.125	≥ 0.5	≤ 2	≥ 8	≤ 0.25	≥1		
Urine	130	0	135	0	196	0	14	0	3	0	9	487
Sputum	62	0	47	0	12	0	2	0	7	0	6	136
Blood	99	0	41	0	22	0	35	0	2	0	7	206
Wound	16	0	7	0	4	0	10	0	0	0	3	40
Pus	15	0	5	0	1	0	4	0	1	0	0	26
Tip	5	0	5	0	0	0	3	0	0	0	0	13
Ascites	22	0	3	0	6	0	0	0	0	0	1	32
Catheter	9	0	6	0	1	0	4	0	0	0	1	21
Others	44	0	18	0	14	1(1.0%)	13	0	5	0	7	102
Total	402	0	267	0	256	1 (0.1%)	85	0	18	0	34	1063

表十三、The distribution of trailing growth of *Candida* species to fluconazole with MIC greater than 64 mg/L with CLSI guidelines.

Sources(no. of isolates)	<i>C. albicans</i> (402)		<i>C. tropicalis</i> (267)		<i>C. glabrata</i> (257)		<i>C. krusei</i> (18)		Subtotal		Total
	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	
Urine	0	3	0	36	2	6	0	1	2	46	48
Sputum	0	0	0	14	0	0	0	0	0	14	14
Blood	0	1	0	9	0	1	0	2	0	13	13
Wound	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2
Pus	0	0	0	3	0	1	0	2	0	6	6
Tip	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ascites	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Catheter	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Others	0	0	0	4	0	0	0	0	0	4	4
Total	0	5	0	69	2	8	0	5	2	87	89

表十四、The distribution of trailing growth of *Candida* species to voriconazole with MIC greater than 64 mg/L with CLSI guidelines.

Sources(no. of isolates)	<i>C. albicans</i> (402)		<i>C. tropicalis</i> (267)		<i>C. glabrata</i> (257)		Subtotal		Total
	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	
Urine	2	2	0	36	0	2	2	40	42
Sputum	0	0	0	14	0	0	0	14	14
Blood	0	0	0	9	0	0	0	9	9
Wound	0	0	0	2	0	0	0	2	2
Pus	0	0	0	3	0	0	0	3	3
Tip	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ascites	0	0	0	1	0	0	0	1	1
Catheter	0	0	0	2	0	0	0	2	2
Others	0	1	0	4	0	0	0	5	5
Total	2	3	0	71	0	2	2	76	78

表十五、The susceptibility to fluconazole of *Candida* species from different sources according to EUCAST method.

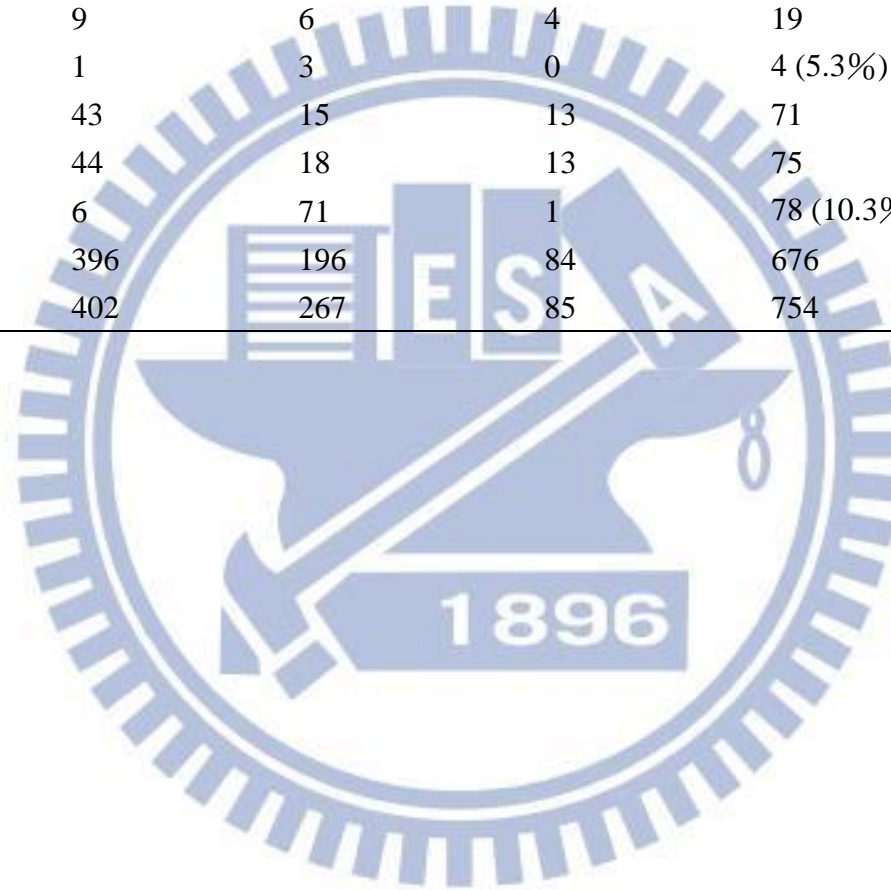
	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Others	Total
Urine	> 4	4	7	24	0	3	1	39 (8.0%)
	4	1	6	133	2	0	2	144
	≤ 2	125	122	39	12	0	6	313
	subtotal	130	135	196	14	3	9	487
Sputum	> 4	2	5	1	0	7	0	15 (11.0%)
	4	3	1	9	1	0	2	16
	≤ 2	57	41	2	1	0	4	105
	subtotal	62	47	12	2	7	6	136
Blood	> 4	1	3	2	1	2	0	9 (4.4%)
	4	2	0	13	0	0	2	17
	≤ 2	96	38	7	34	0	5	180
	subtotal	99	41	22	35	2	7	206
Wound	> 4	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	2	0	0	1	3
	≤ 2	16	7	2	10	0	2	37
	subtotal	16	7	4	10	0	3	40
Pus	> 4	0	1	1	0	1	0	3 (11.5%)
	4	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 2	15	4	0	4	0	0	23
	subtotal	15	5	1	4	1	0	26

	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Others	Total
Tip	> 4	0	1	0	0	0	0	1 (7.7%)
	4	0	0	0	0	0	0	0
	≤ 2	5	4	0	3	0	0	12
	subtotal	5	5	0	3	0	0	13
Ascites	> 4	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	4	0	0	1	5
	≤ 2	22	3	2	0	0	0	27
	subtotal	22	3	6	0	0	1	32
Catheter	> 4	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	1	0	0	0	1
	≤ 2	9	6	0	4	0	1	20
	subtotal	9	6	1	4	0	1	21
Others	> 4	1	3	1	0	5	2	12 (11.8%)
	4	2	1	12	0	0	1	16
	≤ 2	41	14	2	13	0	4	74
	subtotal	44	18	15	13	5	7	102
All	> 4	8	20	29	1	18	3	79 (7.4%)
	4	8	8	174	3	0	9	202
	≤ 2	386	239	54	81	0	22	782
	Total	402	267	257	85	18	34	1063

表十六、The susceptibility to voriconazole of *Candida* species from different sources according to EUCAST method.

	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Total
Urine	> 0.125	3	20	0	23 (8.2%)
	≤ 0.125	127	115	14	256
	subtotal	130	135	14	279
Sputum	> 0.125	1	6	0	7 (6.3%)
	≤ 0.125	61	41	2	104
	subtotal	62	47	2	111
Blood	> 0.125	0	35	1	36 (20.6%)
	≤ 0.125	99	6	34	139
	subtotal	99	41	35	175
Wound	> 0.125	0	1	0	1 (3.0%)
	≤ 0.125	16	6	10	32
	subtotal	16	7	10	33
Pus	> 0.125	0	2	0	2 (8.3%)
	≤ 0.125	15	3	4	22
	subtotal	15	5	4	24
Tip	> 0.125	0	1	0	1 (7.7%)
	≤ 0.125	5	4	3	12
	subtotal	5	5	3	13
	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Total
Ascites	> 0.125	1	1	0	2 (8.0%)
	≤ 0.125	21	2	0	23

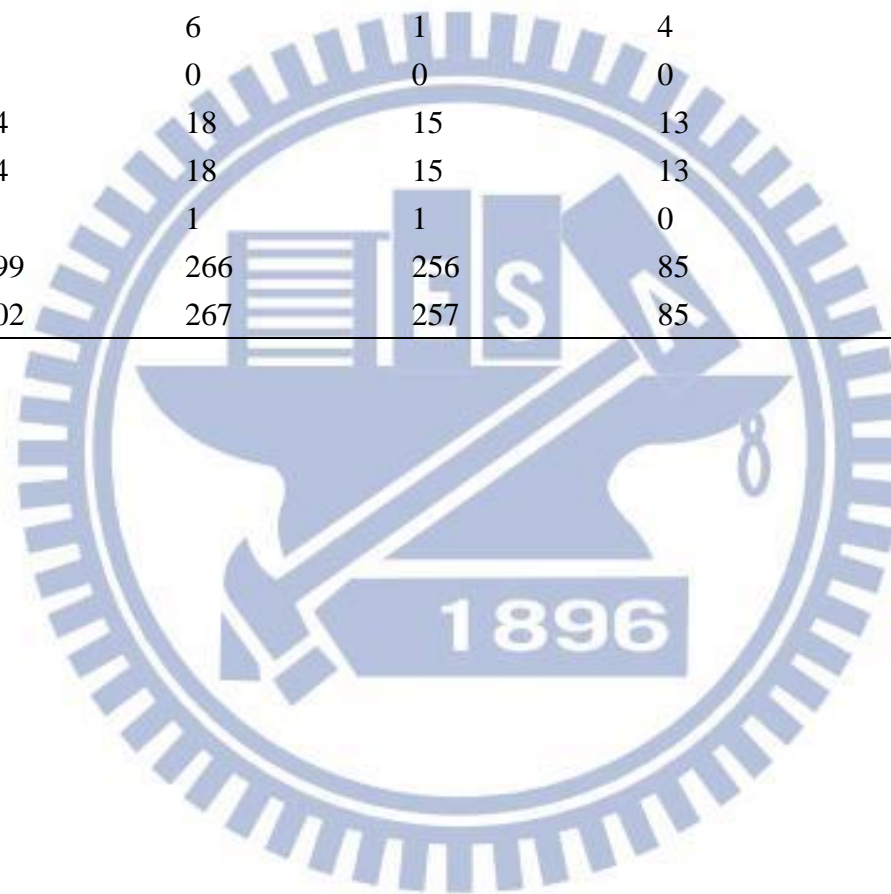
	subtotal	22	3	0	25
Catheter	> 0.125	0	2	0	2 (10.5%)
	≤ 0.125	9	4	4	17
	subtotal	9	6	4	19
Others	> 0.125	1	3	0	4 (5.3%)
	≤ 0.125	43	15	13	71
	subtotal	44	18	13	75
All	> 0.125	6	71	1	78 (10.3%)
	≤ 0.125	396	196	84	676
	subtotal	402	267	85	754



表十七、The susceptibility to amphotericin B of *Candida* species from different sources according to EUCAST method.

	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Total
Urine	> 1	1	1	1	0	0	3 (0.6%)
	≤ 1	129	134	195	14	3	475
	subtotal	130	135	196	14	3	478
Sputum	> 1	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	62	47	12	2	7	130
	subtotal	62	47	12	2	7	130
Blood	> 1	2	0	0	0	0	2 (1.0%)
	≤ 1	97	41	22	35	2	197
	subtotal	99	41	22	35	2	199
Wound	> 1	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	16	7	4	10	0	37
	subtotal	16	7	4	10	0	37
Pus	> 1	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	15	5	1	4	1	26
	subtotal	15	5	1	4	1	26
Tip	> 1	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	5	5	0	3	0	13
	subtotal	5	5	0	3	0	13
Ascites	> 1	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	22	3	6	0	0	31
	subtotal	22	3	6	0	0	31

	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Total
Catheter	> 1	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	9	6	1	4	0	20
	subtotal	9	6	1	4	0	20
Others	> 1	0	0	0	0	0	0
	≤ 1	44	18	15	13	5	95
	subtotal	44	18	15	13	5	95
All	> 1	3	1	1	0	0	5 (0.5%)
	≤ 1	399	266	256	85	18	1025
	Total	402	267	257	85	18	1029



表十八、The susceptibility to anidulafungin of *Candida* species from different sources according to EUCAST method.

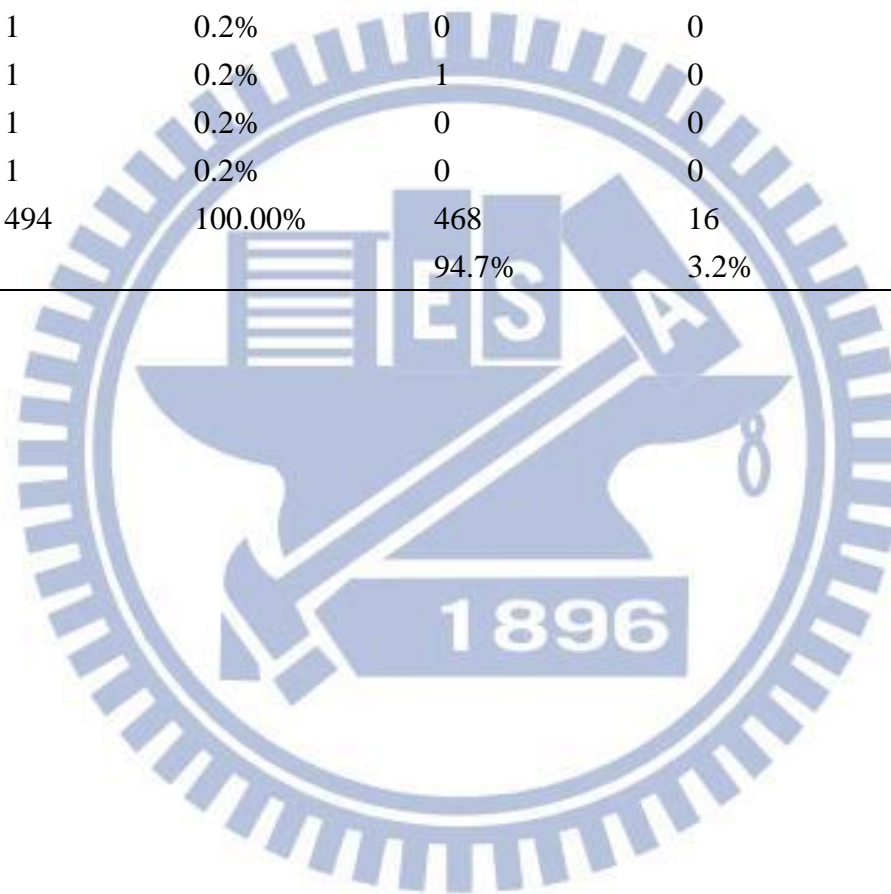
	MIC (mg/L)	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	Total
Urine	> 0.06	3 (2.2%)	1 (0.5%)	0	> 0.03	0	4 (%)
	≤0.06	132	195	3	≤0.03	130	460
	subtotal	135	196	3	subtotal	130	464
Sputum	> 0.06	0	0	0	> 0.03	0	0
	≤0.06	47	12	7	≤0.03	62	128
	subtotal	47	12	7	subtotal	62	128
Blood	> 0.06	4 (9.8%)	3 (13.6%)	0	> 0.03	2 (2.0%)	9 (%)
	≤0.06	37	19	2	≤0.03	97	155
	subtotal	41	22	2	subtotal	99	164
Wound	> 0.06	0	0	0	> 0.03	0	0
	≤0.06	7	4	0	≤0.03	16	27
	subtotal	7	4	0	subtotal	16	27
Pus	> 0.06	0	1 (100%)	0	> 0.03	0	1 (4.5%)
	≤0.06	5	0	1	≤0.03	15	21
	subtotal	5	1	1	subtotal	15	22
Tip	> 0.06	0	0	0	> 0.03	0	0
	≤0.06	5	0	0	≤0.03	5	10
	subtotal	5	0	0	subtotal	5	10

	MIC (mg/L)	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	MIC (mg/L)	<i>C. albicans</i>	Total
Ascites	> 0.06	0	0	0	> 0.03	0	0
	≤0.06	3	6	0	≤0.03	22	31
	subtotal	3	6	0	subtotal	22	31
Catheter	> 0.06	0	0	0	> 0.03	0	0
	≤0.06	6	1	0	≤0.03	9	16
	subtotal	6	1	0	subtotal	9	16
Others	> 0.06	1 (5.6%)	2 (13.3%)	0	> 0.03	0	3 (3.7%)
	≤0.06	17	13	5	≤0.03	44	79
	subtotal	18	15	5	subtotal	44	82
All	> 0.06	8 (2.6%)	7 (2.7%)	1 (5.6%)	> 0.03	2	15 (1.6%)
	≤0.06	259	250	17	≤0.03	400	929
	subtotal	267	257	18	subtotal	402	944

表十九、Identification of clinical isolates from NCKU, CMU, and E-DA hospitals

species	no. of strains	frequency	no. of strains in category		
			ID by VTK2	ID by sequencing (ITS)	(D1/D2)
<i>Candida albicans</i>	350	70.9%	347	3	0
<i>Candida glabrata</i>	40	8.1%	35	4	1
<i>Candida dubliniensis</i>	39	7.9%	37	1	1
<i>Candida tropicalis</i>	21	4.3%	20	0	1
<i>Candida parapsilosis</i>	7	1.4%	4	1	2
<i>Candida intermedia</i>	7	1.4%	7	0	0
<i>Candida guilliermondii</i>	6	1.2%	0	6	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	0.8%	4	0	0
<i>Candida famata</i>	2	0.4%	2	0	0
<i>Candida krusei</i>	2	0.4%	2	0	0
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	2	0.4%	2	0	0
<i>Candida lusitanae</i>	1	0.2%	1	0	0
<i>Candida galeiformis</i>	1	0.2%	0	0	1
<i>Candida inconspicua</i>	1	0.2%	0	0	1
<i>Candida orthopsilosis</i>	1	0.2%	0	1	0
<i>Candida pulcherrima</i>	1	0.2%	1	0	0
<i>Candida rugosa</i>	1	0.2%	1	0	0
<i>Candida utilis</i>	1	0.2%	1	0	0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	0.2%	1	0	0

species	no. of strains	frequency	ID by VTK2	ID by sequencing (ITS)	(D1/D2)
<i>Geotrichum klebahnii</i>	1	0.2%	1	0	0
<i>Kodamaea ohmeri</i>	1	0.2%	1	0	0
<i>Metschnikowia sp.</i>	1	0.2%	0	0	1
<i>Trichosporon asahii</i>	1	0.2%	1	0	0
<i>Trichosporon faecale</i>	1	0.2%	0	0	1
<i>Trichosporon sp.</i>	1	0.2%	0	0	1
TOTAL	494	100.00%	468	16	10
ID percentage			94.7%	3.2%	2.0%



表二十、Identification of clinical isolates from NCKU hospital

species	no. of strains	frequency	no. of strains in category		
			ID by VTK2	ID by sequencing (ITS)	(D1/D2)
<i>Candida albicans</i>	178	68.7%	176	2	0
<i>Candida glabrata</i>	25	9.7%	22	2	1
<i>Candida dubliniensis</i>	24	9.3%	23	0	1
<i>Candida tropicalis</i>	9	3.5%	8	0	1
<i>Candida intermedia</i>	6	2.3%	6	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	3	1.2%	2	0	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	1.2%	3	0	0
<i>Candida famata</i>	1	0.4%	1	0	0
<i>Candida galeiformis</i>	1	0.4%	0	0	1
<i>Candida guilliermondii</i>	1	0.4%	0	1	0
<i>Candida krusei</i>	1	0.4%	1	0	0
<i>Candida inconspicua</i>	1	0.4%	0	0	1
<i>Candida lusitaniae</i>	1	0.4%	1	0	0
<i>Candida pulcherrima</i>	1	0.4%	1	0	0
<i>Candida rugosa</i>	1	0.4%	1	0	0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	0.4%	1	0	0
<i>Metschnikowia sp.</i>	1	0.4%	0	0	1
<i>Kodamaea ohmeri</i>	1	0.4%	1	0	0
TOTAL	259	100.00%	247	5	7
ID percentage			95.4%	1.9%	2.7%

表二十一、Identification of clinical isolates from CMU hospital

<i>species</i>	no. of strains	frequency	no. of strains in category		
			ID by VTK2	ID by sequencing (ITS)	(D1/D2)
<i>Candida albicans</i>	122	72.9%	122	0	0
<i>Candida dubliniensis</i>	12	7.7%	11	1	0
<i>Candida glabrata</i>	11	6.5%	9	2	0
<i>Candida tropicalis</i>	8	4.7%	8	0	0
<i>Candida guilliermondii</i>	4	2.4%	0	4	0
<i>Candida parapsilosis</i>	3	1.8%	2	1	0
<i>Candida famata</i>	1	0.6%	1	0	0
<i>Candida intermedia</i>	1	0.6%	1	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0.6%	1	0	0
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	1	0.6%	1	0	0
<i>Trichosporon asahii</i>	1	0.6%	1	0	0
<i>Trichosporon faecale</i>	1	0.6%	0	0	1
<i>Trichosporon sp.</i>	1	0.6%	0	0	1
TOTAL	167	100.00%	159	8	2
ID percentage			94.1%	4.7%	1.2%

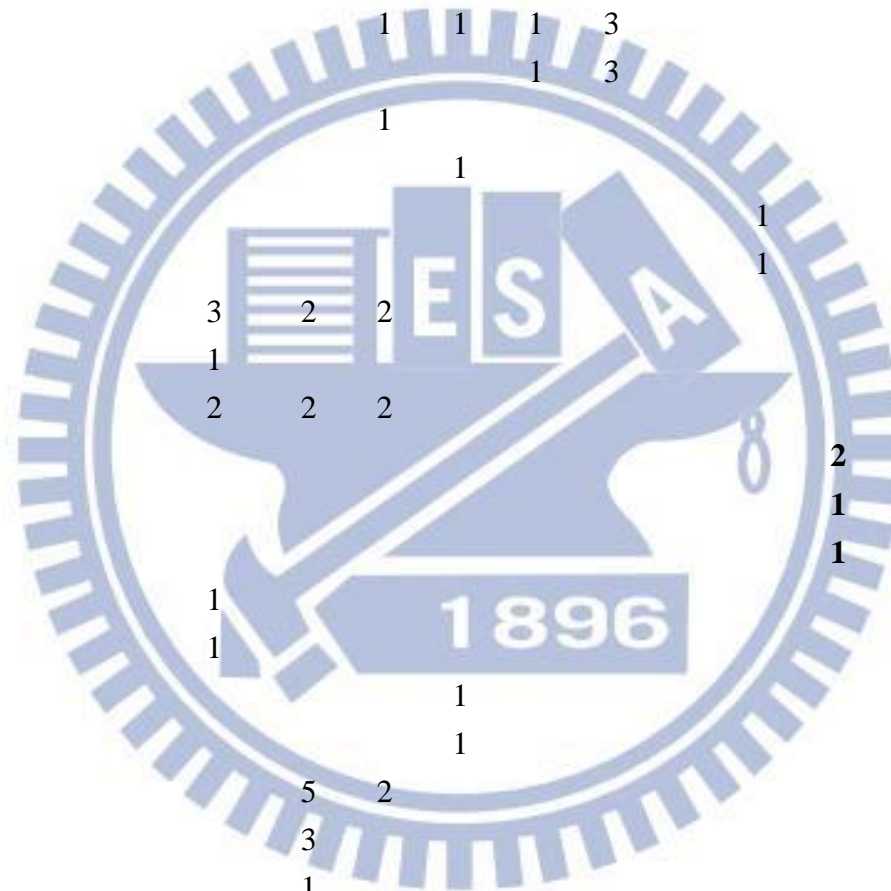
表二十二、Identification of clinical isolates from E-DA hospital

<i>species</i>	no. of strains	frequency	no. of strains in category		
			ID by VTK2	ID by sequencing(ITS)	(D1/D2)
<i>Candida albicans</i>	50	73.5%	49	1	0
<i>Candida glabrata</i>	4	5.9%	4	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	4	5.9%	4	0	0
<i>Candida dubliniensis</i>	3	4.4%	3	0	0
<i>Candida orthopsilosis</i>	1	2.9%	0	1	0
<i>Candida parapsilosis</i>	1	2.9%	0	0	1
<i>Candida guilliermondii</i>	1	1.5%	0	1	0
<i>Candida krusei</i>	1	1.5%	1	0	0
<i>Candida utilis</i>	1	1.5%	1	0	0
<i>Geotrichum klebahnii</i>	1	1.5%	1	0	0
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	1	1.5%	1	0	0
TOTAL	68	100.00%	64	3	1
ID percentage			94.1%	4.4%	1.5%

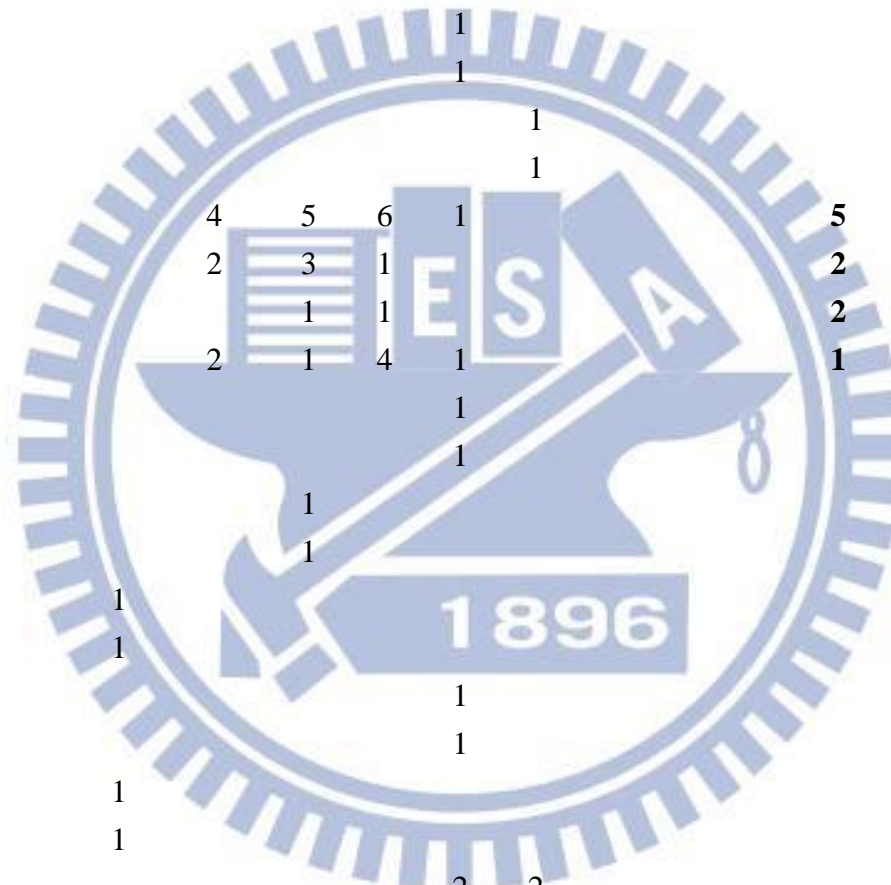
表二十三、MIC distribution to fluconazole in HIV patients using broth microdilution (CLSI)

species	MIC (mg/L)										Total
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	
<i>Candida albicans</i>	132	146	25	30	4		3		1	9	350
CMU	37	62	8	8	1		2			4	122
EDAH	15	21	4	7	2					1	50
NCKU	80	63	13	15	1		1		1	4	178
<i>Candida dubliniensis</i>	20	13	4	1						1	39
CMU	5	7									12
EDAH	2	1									3
NCKU	13	5	4	1						1	24
<i>Candida famata</i>					2						2
CMU					1						1
NCKU					1						1
<i>Candida galeiformis</i>									1		1
NCKU									1		1
<i>Candida glabrata</i>	1					8	29	1		1	40
CMU						2	9				11
EDAH							3			1	4
NCKU	1					6	17	1			25

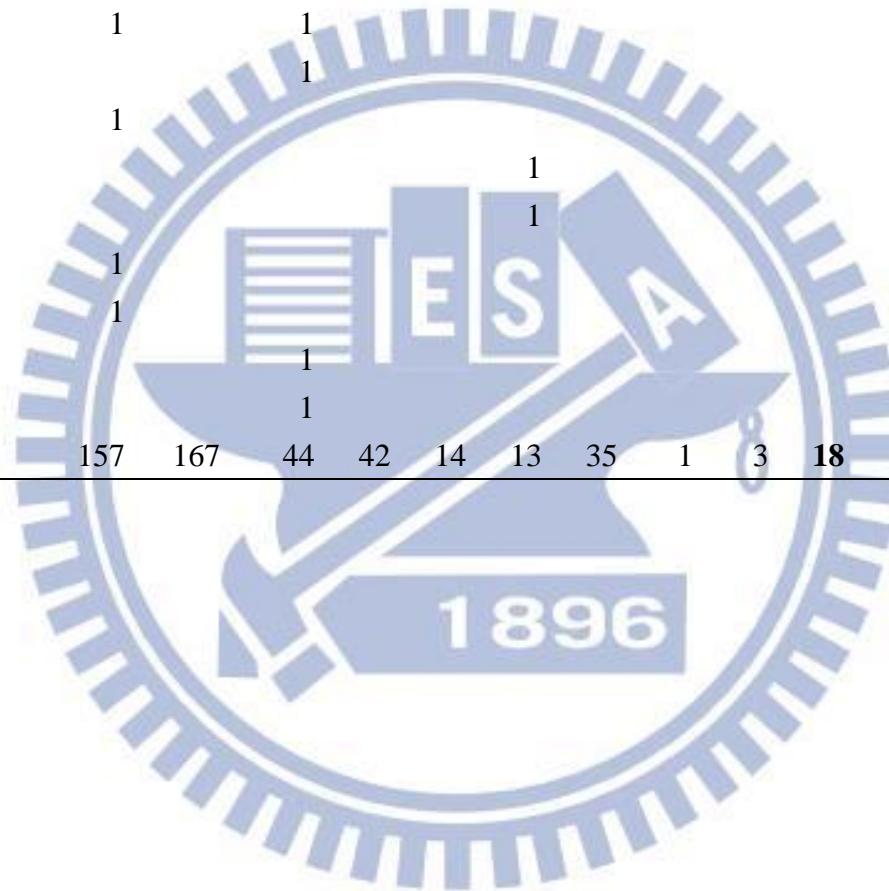
species	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	Total
<i>Candida guilliermondii</i>				1	1	1	3				6
CMU						1	3				4
EDAH				1							1
NCKU					1						1
<i>Candida inconspicua</i>									1		1
NCKU									1		1
<i>Candida intermedia</i>		3	2	2							7
CMU		1									1
NCKU		2	2	2							6
<i>Candida krusei</i>										2	2
EDAH										1	1
NCKU										1	1
<i>Candida lusitaniae</i>		1									1
NCKU		1									1
<i>Candida orthopsilosis</i>					1						1
EDAH					1						1
<i>Candida parapsilosis</i>			5	2							7
CMU			3								3
EDAH			1								1
NCKU			1	2							3



species	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	Total
<i>Candida pulcherrima</i>					1						1
NCKU					1						1
<i>Candida rugosa</i>						1					1
NCKU						1					1
<i>Candida tropicalis</i>		4	5	6	1					5	21
CMU		2	3	1						2	8
EDAH			1	1						2	4
NCKU		2	1	4	1					1	9
<i>Candida utilis</i>					1						1
EDAH					1						1
<i>Cryptococcus neoformans</i>			1								1
NCKU			1								1
<i>Geotrichum klebahnii</i>	1										1
EDAH	1										1
<i>Kodamaea ohmeri</i>					1						1
NCKU					1						1
<i>Metschnikowia sp.</i>	1										1
NCKU	1										1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>					2	2					4
CMU						1					1
NCKU					2	1					3



species	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	Total
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	1		1								2
CMU			1								1
EDAH	1										1
<i>Trichosporon asahii</i>						1					1
CMU						1					1
<i>Trichosporon faecale</i>	1										1
CMU	1										1
<i>Trichosporon sp.</i>			1								1
CMU			1								1
Total	157	167	44	42	14	13	35	1	3	18	494



表二十四、The distribution of *Candida* species to fluconazole in HIV patients

		MIC (mg/L)									
		0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
<i>C.albicans</i> (350)	24h	282	57	6	1	1			1	1	1 (0.3%)
	48h	132	146	25	30	4		3		1	9 (2.6%)
<i>C.glabrata</i> (40)	24h	1				17	21	1			
	48h	1					8	29	1		1 (2.6%)
<i>C.dublinsiensis</i> (39)	24h	32	7								
	48h	20	13	4	1						1 (2.5%)
<i>C.tropicalis</i> (21)	24h	7	14								
	48h		4	5	6	1					5 (23.8%)
<i>C.krusei</i> (2)	24h								1	1	
	48h										2 (100%)
Total (452)	24h	322	78	6	1	18	21	1	2	2	1 (0.2%)
Total (452)	48h	153	163	34	37	5	8	32	1	1	18 (4.0%)

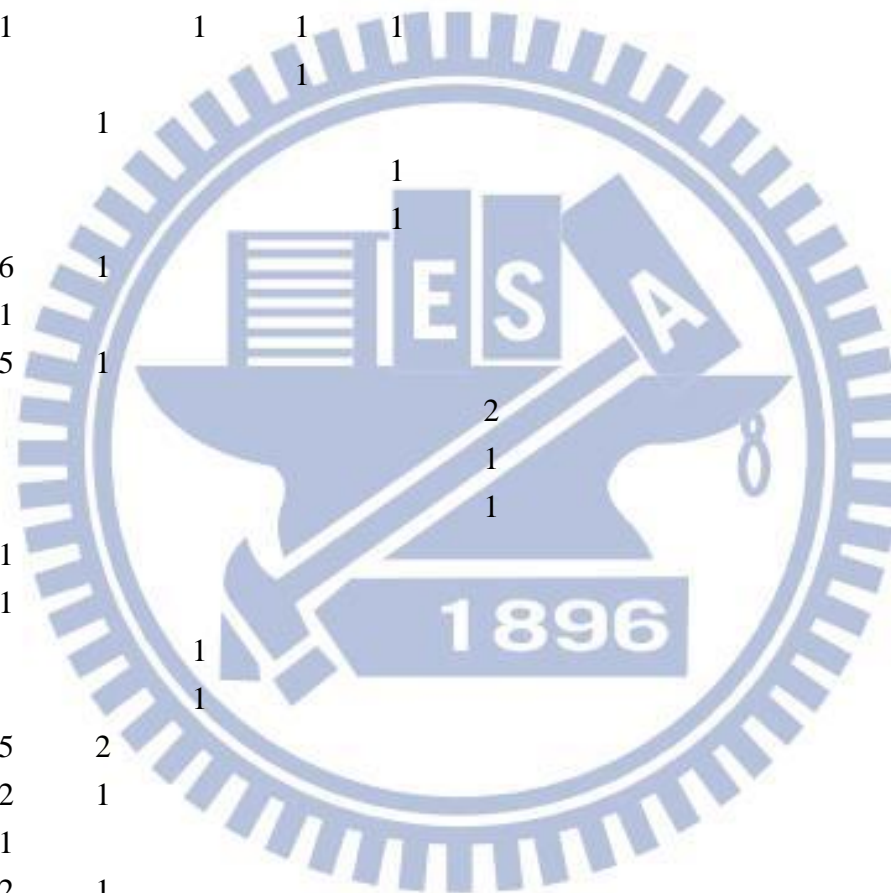
表二十五、The distribution of trailing growth of *Candida* sp. to fluconazole greater than 64 mg/L

species(no. of isolates)	<i>C. albicans</i> (350)		<i>C. glabrata</i> (40)		<i>C. dublinsiensis</i> (39)		<i>C. tropicalis</i> (21)		<i>C. krusei</i> (2)		subtotal		Total
	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	
Fluconazole	1	8	0	1	0	1	0	5	0	2	1	17	18

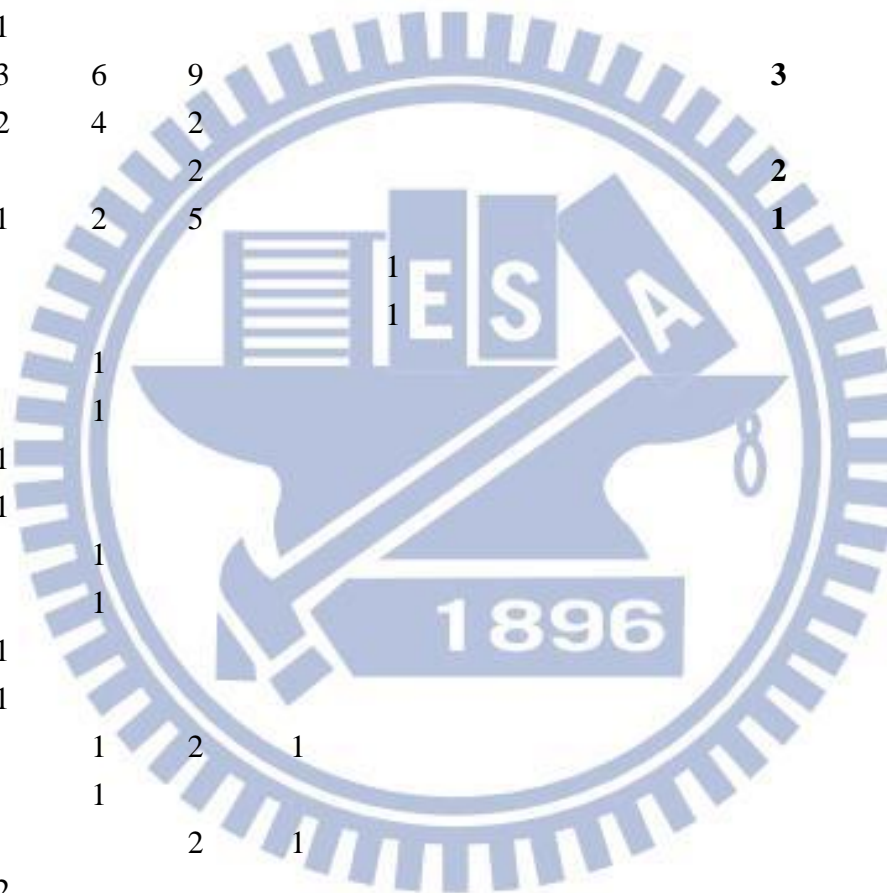
表二十六、MIC distribution to voriconazole in HIV patients using broth microdilution (CLSI)

species	MIC (mg/L)											Total
	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8		
<i>Candida albicans</i>	263	45	18	7	4	3		1		9		350
CMU	101	12	3	1	1			1		3		122
EDAH	35	5	4	1	1	1				3		50
NCKU	127	28	11	5	2	2				3		178
<i>Candida dubliniensis</i>	35	3								1		39
CMU	12											12
EDAH	3											3
NCKU	20	3								1		24
<i>Candida famata</i>			2									2
CMU			1									1
NCKU			1									1
<i>Candida galeiformis</i>				1								1
NCKU				1								1
<i>Candida glabrata</i>	1		2	8	20	7	1	1				40
CMU				4	6	1						11
EDAH					1	2		1				4
NCKU	1		2	4	13	4	1					25

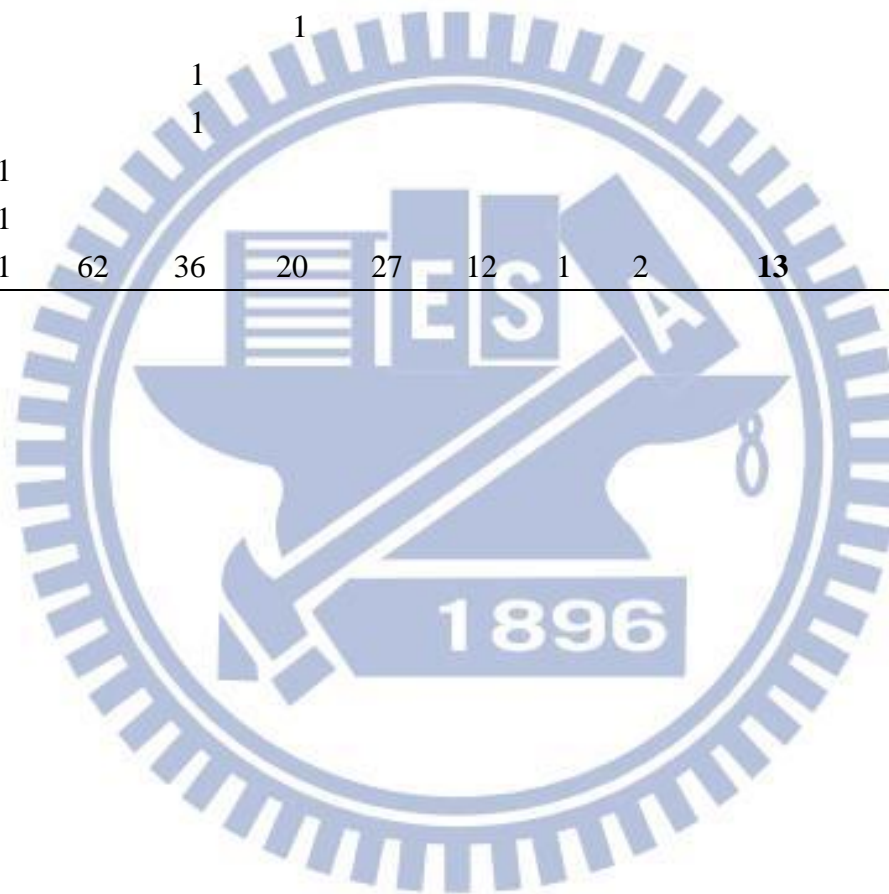
species	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	Total
<i>Candida guilliermondii</i>	1	1	1	2	1						6
CMU	1		1	1	1						4
EDAH				1							1
NCKU		1									1
<i>Candida inconspicua</i>					1						1
NCKU					1						1
<i>Candida intermedia</i>	6	1									7
CMU	1										1
NCKU	5	1									6
<i>Candida krusei</i>						2					2
EDAH						1					1
NCKU						1					1
<i>Candida lusitaniae</i>	1										1
NCKU	1										1
<i>Candida orthopsilosis</i>			1								1
EDAH			1								1
<i>Candida parapsilosis</i>	5	2									7
CMU	2	1									3
EDAH	1										1
NCKU	2	1									3
<i>Candida pulcherrima</i>		1									1
NCKU		1									1



species	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	Total
<i>Candida rugosa</i>	1										1
NCKU	1										1
<i>Candida tropicalis</i>	3	6	9							3	21
CMU	2	4	2								8
EDAH			2							2	4
NCKU	1	2	5							1	9
<i>Candida utilis</i>					1						1
EDAH					1						1
<i>Cryptococcus neoformans</i>		1									1
NCKU		1									1
<i>Geotrichum klebahnii</i>	1										1
EDAH	1										1
<i>Kodamaea ohmeri</i>		1									1
NCKU		1									1
<i>Metschnikowia sp.</i>	1										1
NCKU	1										1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		1	2	1							4
CMU		1									1
NCKU			2	1							3
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	2										2
CMU	1										1
EDAH	1										1



species	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	Total
<i>Trichosporon asahii</i>				1							1
CMU				1							1
<i>Trichosporon faecale</i>			1								1
CMU			1								1
<i>Trichosporon sp.</i>	1										1
CMU	1										1
Total	321	62	36	20	27	12	1	2		13	494



表二十七、The distribution of *Candida* species to voriconazole in HIV patients with CLSI guidelines.

		MIC (mg/L)									
		0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8
<i>Candida albicans</i> (350)	24h	328	3	4	12	3					
	48h	263	45	18	7	4	3		1		9 (2.6%)
<i>Candida glabrata</i> (40)	24h	1	12	13	10	4					
	48h	1		2	8	20	7	1	1		
<i>Candida dubliniensis</i> (39)	24h	37	1	1							
	48h	35	3								1 (2.6%)
<i>Candida tropicalis</i> (21)	24h	17	1	2					1		
	48h	3	6	9							3 (14.3%)
<i>Candida krusei</i> (2)	24h				1	1					
	48h						2				
Total (452)	24h	383	17	20	23	8			1		
Total (452)	48h	302	54	29	15	24	12	1	2		13 (2.9%)

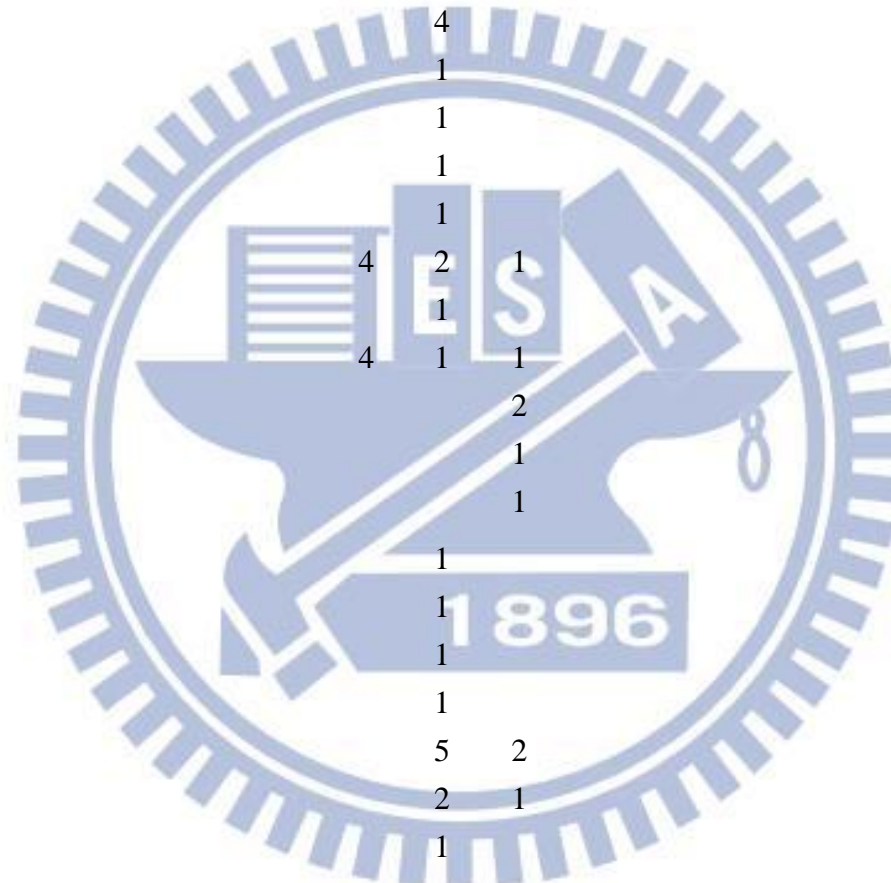
表二十八、The distribution of trailing growth of *Candida* species to voriconazole greater than 64 mg/L

species(no. of isolates)	<i>C. albicans</i> (350)		<i>C. dubliniensis</i> (39)		<i>C. tropicalis</i> (21)		subtotal		Total
	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	
Voriconazole	0	9	0	1	0	3	0	12	13

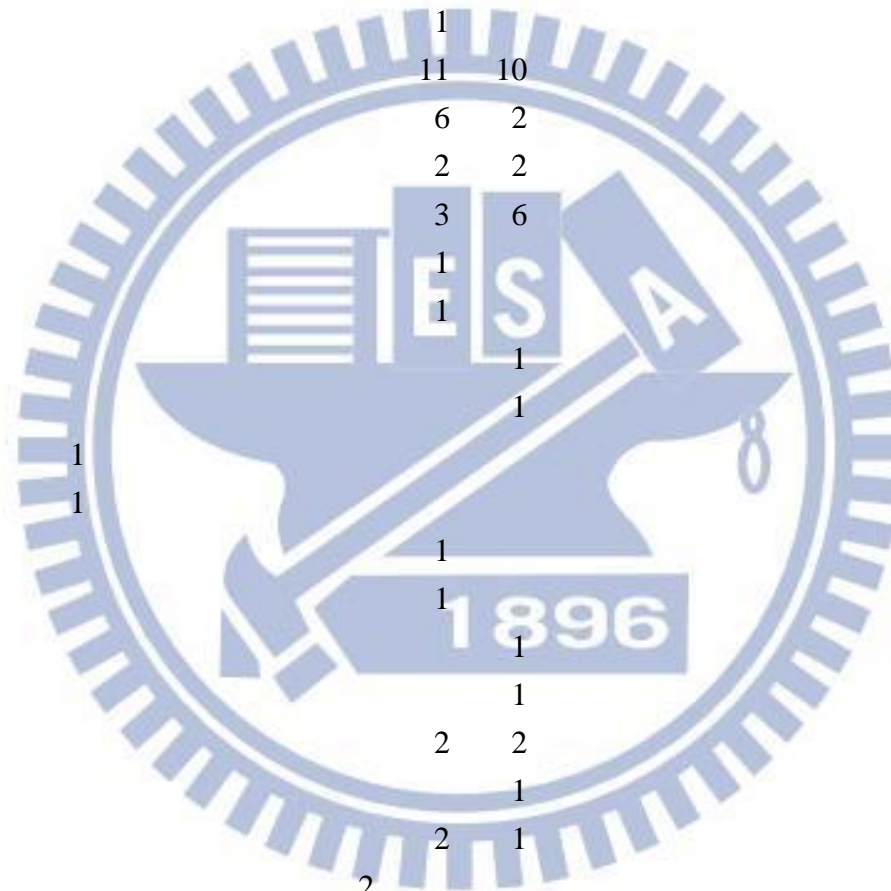
表二十九、MIC distribution to amphotericin B in HIV patients using broth microdilution (CLSI)

species	MIC (mg/L)										Total	
	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16		
<i>Candida albicans</i>					222	128						350
CMU					73	49						122
EDAH					27	23						50
NCKU					122	56						178
<i>Candida dubliniensis</i>		2	8	21	7					1		39
CMU			2	8	2							12
EDAH			1	1	1							3
NCKU		2	5	12	4					1		24
<i>Candida famata</i>					1	1						2
CMU						1						1
NCKU					1							1
<i>Candida galeiformis</i>				1								1
NCKU				1								1
<i>Candida glabrata</i>					9	31						40
CMU					1	10						11
EDAH					1	3						4
NCKU					7	18						25

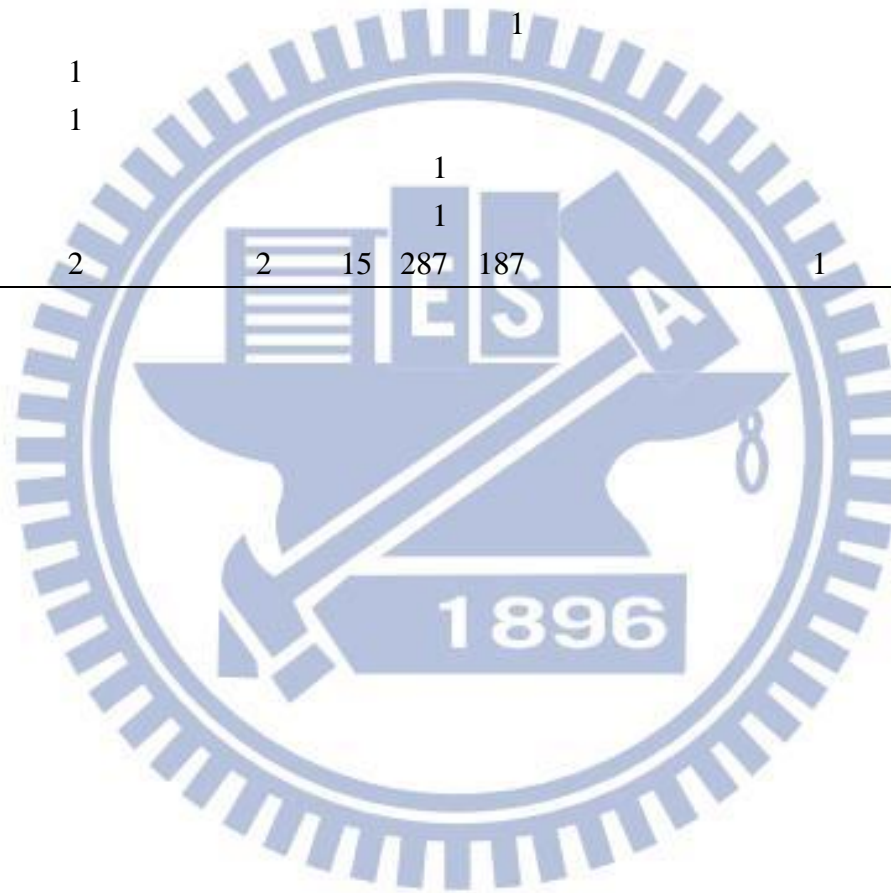
species	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	Total
<i>Candida guilliermondii</i>					6						6
CMU					4						4
EDAH					1						1
NCKU					1						1
<i>Candida inconspicua</i>					1						1
NCKU					1						1
<i>Candida intermedia</i>				4	2	1					7
CMU				1							1
NCKU				4	1	1					6
<i>Candida krusei</i>						2					2
EDAH						1					1
NCKU						1					1
<i>Candida lusitaniae</i>					1						1
NCKU					1						1
<i>Candida orthopsilosis</i>					1						1
EDAH					1						1
<i>Candida parapsilosis</i>					5	2					7
CMU					2	1					3
EDAH					1						1
NCKU					2	1					3
<i>Candida pulcherrima</i>					1						1



NCKU		1		1
<i>Candida rugosa</i>		1		1
NCKU		1		1
<i>Candida tropicalis</i>		11	10	21
CMU		6	2	8
EDAH		2	2	4
NCKU		3	6	9
<i>Candida utilis</i>		1		1
EDAH		1		1
<i>Cryptococcus neoformans</i>			1	1
NCKU			1	1
<i>Geotrichum klebahnii</i>	1			1
EDAH	1			1
<i>Kodamaea ohmeri</i>		1		1
NCKU		1		1
<i>Metschnikowia sp.</i>			1	1
NCKU			1	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		2	2	4
CMU			1	1
NCKU		2	1	3
<i>Stephanoascus ciferrii</i>		2		2
CMU		1		1
EDAH		1		1



species	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	Total
<i>Trichosporon asahii</i>						1					1
CMU						1					1
<i>Trichosporon faecale</i>	1										1
CMU	1										1
<i>Trichosporon sp.</i>						1					1
CMU						1					1
Total	2		2	15	287	187				1	494



參考文獻

1. Axner-Elings, M., Botero-Kleiven, S., Jensen, R.H., and Arendrup, M.C. (2011). Echinocandin Susceptibility Testing of Candida Isolates Collected during a One-year Period in Sweden. *J Clin Microbiol*.
2. Barchiesi, F., Maracci, M., Radi, B., Arzeni, D., Baldassarri, I., Giacometti, A., and Scalise, G. (2002). Point prevalence, microbiology and fluconazole susceptibility patterns of yeast isolates colonizing the oral cavities of HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 50, 999-1002.
3. Cannon, R.D., Lamping, E., Holmes, A.R., Niimi, K., Baret, P.V., Keniya, M.V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A., and Monk, B.C. (2009). Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 22, 291-321, Table of Contents.
4. Chen, Y.M., and Kuo, S.H. (2007). HIV-1 in Taiwan. *Lancet* 369, 623-625.
5. CLSI. (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M27-A3. Wayne, PA.
6. Cowen, L.E., and Steinbach, W.J. (2008). Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell* 7, 747-764.
7. Denning, D.W. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362, 1142-1151.
8. F. Katirae, A.R. Khosravi, V. Khalaj, M. Hajiabdolbaghi, A. Khaksar, M. Rasoolinejad, M.S. Yekaninejad. (2010). Oropharyngeal candidiasis and oral yeast colonization in Iranian Human Immunodeficiency Virus positive patients. *Journal de Mycologie Médicale* 20, 8-14.
9. Fichtenbaum, C.J., Koletar, S., Yiannoutsos, C., Holland, F., Pottage, J., Cohn, S.E., Walawander, A., Frame, P., Feinberg, J., Saag, M., *et al.* (2000). Refractory mucosal candidiasis in advanced human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 30, 749-756.
10. Hadfield, T.L., Smith, M.B., Winn, R.E., Rinaldi, M.G., and Guerra, C. (1987). Mycoses caused by *Candida lusitanae*. *Rev Infect Dis* 9, 1006-1012.
11. Kontoyiannis, D.P., and Lewis, R.E. (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 359, 1135-1144.
12. Leaw, S.N., Chang, H.C., Sun, H.F., Barton, R., Bouchara, J.P., and Chang, T.C. (2006). Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol* 44, 693-699.
13. Lo, H.J., Yang, Y.L., Wang, A.H., Wang, C.W., Cheng, W.T., Li, S.Y., and Hosp, T. (2008). Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in Taiwan

- Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts 2006. *Diagn Microb Infect Dis* 61, 175-180.
14. Michael E. Klepser, Pharm.D., FCCP. (2006). Candida Resistance and Its Clinical Relevance. *Pharmacotherapy* 26, 68-75.
 15. Odds, F.C., and Bernaerts, R. (1994). CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. *J Clin Microbiol* 32, 1923-1929.
 16. Pappas, P.G., Rex, J.H., Sobel, J.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.J., and Edwards, J.E. (2004). Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 38, 161-189.
 17. Perea, S., Lopez-Ribot, J.L., Kirkpatrick, W.R., McAtee, R.K., Santillan, R.A., Martinez, M., Calabrese, D., Sanglard, D., and Patterson, T.F. (2001). Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in Candida albicans strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2676-2684.
 18. Pfaller, M.A. (1995). Epidemiology of candidiasis. *J Hosp Infect* 30 *Suppl*, 329-338.
 19. Rodriguez-Tudela, J.L., Donnelly, J.P., Pfaller, M.A., Chryssantou, E., Warn, P., Denning, D.W., Espinel-Ingroff, A., Barchiesi, F., and Cuenca-Estrella, M. (2007). Statistical analyses of correlation between fluconazole MICs for Candida spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E.Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). *J Clin Microbiol* 45, 109-111.
 20. Rodriguez-Tudela, J.L., F. Barchiesi, J. Bille, E. Chryssanthou, M. CuencaEstrella, D. Denning, J. P. Donnelly, B. Dupont, W. Fegeler, C. Moore, M. Richardson, P. E. Verweij, and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2003). Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin. Microbiol. Infect.* 9:I-VIII.
 21. Sahand, I.H., Moragues, M.D., Eraso, E., Villar-Vidal, M., Quindos, G., and Ponton, J. (2005). Supplementation of CHROMagar Candida medium with Pal's medium for rapid identification of Candida dubliniensis. *J Clin Microbiol* 43, 5768-5770.
 22. Vazquez, J.A., and Sobel, J.D. (2006). Anidulafungin: a novel echinocandin. *Clin Infect Dis* 43, 215-222.
 23. Wenzel, R.P. (1995). Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 20, 1531-1534.
 24. White, T.C., Marr, K.A., and Bowden, R.A. (1998). Clinical, cellular, and molecular

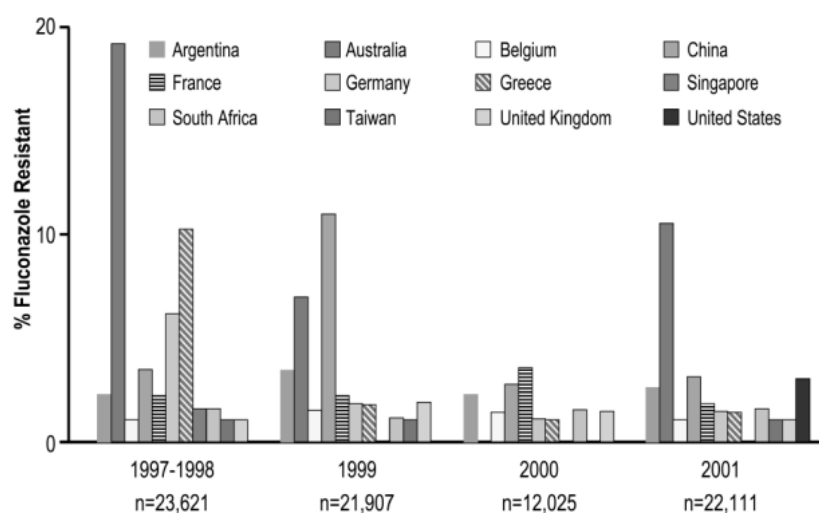
- factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 11, 382-402.
26. Williams, D., and Lewis, M. (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol* 3.
 27. Yang, Y.L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect* 36, 223-228.
 28. Yang, Y.L., Ho, Y.A., Cheng, H.H., Ho, M., and Lo, H.J. (2004). Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25, 60-64.
 29. Yang, Y.L., Hung, C.C., Wang, A.H., Tseng, F.C., Leaw, S.N., Tseng, Y.T., Su, C.L., Chen, H.T., Lauderdale, T.L., and Lo, H.J. (2011). Oropharyngeal colonization of HIV-infected outpatients in Taiwan by yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 48, 2609-2612.
 30. Yang, Y.L., Li, S.Y., Cheng, H.H., and Lo, H.J. (2005a). Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in TSARY 2002. *Diagn Microb Infect Dis* 51, 179-183.
 31. Yang, Y.L., Li, S.Y., Cheng, H.H., and Lo, H.J. (2005b). Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in TSARY 2002. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51, 179-183.
 32. Yang, Y.L., Li, S.Y., Cheng, H.H., and Lo, H.J. (2005c). The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species from 1999 to 2002 in Taiwan. *BMC Infect Dis* 5, 99.

附錄 1

Method	Glucose supplementation (%)	Shape of well	Inoculum (CFU/ml)	Incubation time (h)	Reading	Endpoint for azole drugs
EUCAST AFST	2	Flat bottom	0.5×10^5 – 2.5×10^5	24	Spectrophotometric	Lowest concn of drug that inhibits growth by 50% of that of the control
CLSI M27-A2	0.2	Round bottom	0.5×10^3 – 2.5×10^3	48	Visual	Lowest concn of drug that inhibits growth substantially compared with that of the control

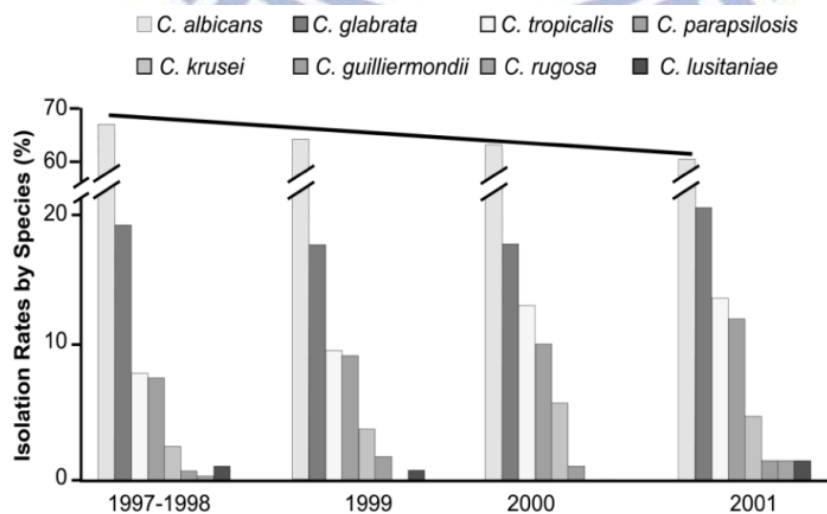
(Rodriguez-Tudela et al., 2007)

附錄 2



(Klepser et al., 2006)

附錄 3



(Klepser et al., 2006)