

臨床真菌之分子鑑定與 DNA 晶片檢測技術

Using of Molecular Methods and DNA Microarray for the Detection and Identification of Clinical Fungal Infections

劉向寧

Shiang Ning Leaw

侵入性真菌感染在近二十年來有逐漸增加的趨勢，目前此類感染症的死亡率大約是 30–50%。傳統的鑑定方法需要不少人力與時間才能正確鑑定菌種。隨著抗真菌藥物的進展，提供了不同種別及抗藥性投藥的多種選擇，使得正確種別鑑定更形重要。所以研發出快速鑑定感染性真菌的方法將有利於迅速給藥，以期提高治療效果與降低死亡的機率。本文從真菌的分類及其所引起的疾病，進一步介紹各種分子鑑定方法，最後討論目前最受矚目的 DNA 晶片與其發展趨勢。

The frequency of invasive fungal infections has increased in the past 20 years. The mortality rate for invasive fungal infection is 30–50%. The conventional methods for fungal identification required are labor-intensive and time consuming. The development of species-specific antifungal drugs has provided more treatment selections, thus identification of the fungal species has becoming more important. Rapid identification of fungal infections will provide appropriate treatment and thus reduce morbidity and mortality. This article will introduce the fungal classification and diseases caused by the infections. Then further describes the commonly used molecular identification methods. Finally DNA array technology is discussed.

一、前言

侵入性真菌感染廣泛地發生在免疫力低下的病患上，且對這類病患的治療日益受到矚目。在過去 20 年裡，侵入性真菌感染的發生不斷地提高，由侵入性真菌感染造成的死亡率有顯著的增加。*Candida* spp. 及 *Aspergillus* spp. 為臨床疾病上最常見的感染病原菌。念珠菌菌血症在血流感染

中排行第四，引起之死亡率為 35–55%⁽¹⁾。念珠菌菌血症中最常見的病原菌為 *C. albicans*，與其他病原菌如 *C. glabrata*、*C. parapsilosis*、*C. tropicalis* 及 *C. krusei* 共引發大約 99% 的念珠菌菌血症病例⁽²⁾。其他菌種如 *Trichosporon*、*Saccharomyces*、*Rhodotorula* 及 *Penicillium* 等，目前也已經逐漸成為重要的病原菌⁽³⁻⁵⁾，所引起的疾病有念珠菌症與隱球菌症等，嚴重的話會造成敗血症及腦膜炎等疾

病。由於這些病原菌對不同的抗真菌藥物具有不同的敏感度，因此菌種的鑑定極為重要，以便進行較有效的藥物治療。

Pfaller 等⁽⁶⁾ 的研究報告發現在 2,047 個血流感染中，*C. albicans* 及 *C. parapsilosis* 是引起嬰兒及小孩感染最主要的病原菌，而 *C. glabrata* 則主要感染大於 65 歲以上的老人。雖然近年來已開發了許多抗真菌藥物，例如 amphoterin B、azole 類及 echinocandins，但不同的菌種對這些抗真菌藥物的敏感性不一樣^(7, 8)。另一方面，侵入性黴菌感染的發病率在過去 10 年間也逐漸上升，尤其是由 *Aspergillus* spp. 所引起的感染最多，其中又以 *Aspergillus fumigatus* 最常見⁽⁹⁾。儘管這些菌種對於目前所使用的抗真菌藥物敏感度很高，死亡率仍高達 50–70%⁽¹⁰⁾。根據 von Eiff 的報告指出，若發生延誤診斷，aspergillosis 的死亡率將大於 70%⁽¹¹⁾。要達到有效的病患治療及管理需要及早診斷，而目前這仍然是一個重大的挑戰。近十年來由罕見菌種所引起的黴菌感染有增加的趨勢，例如 zygomycetes，其他如 *Aspergillus* spp. 及 *Fusarium* spp.，而這些菌種往往都對抗真菌藥物具有抗藥性^(12, 13)。Arendrup 等也指出罕見菌種 *Malassezia* spp. 在新生兒中會造成伺機性感染，而 zygomycosis 近年來則因為其發病率及致死率有增加的趨勢而受到重視。新生兒及幼童的抗真菌藥物治療方法，如藥物種類及劑量仍需要更進一步的探討⁽¹⁴⁾。因此能夠及早鑑定菌種，才可以提供有效的藥物治療，並且降低死亡率。

傳統的真菌檢測方法一般以菌種之生長型態及生化生理反應來鑑定菌種，除了培養時間可能是 3 天至幾星期不等外，這種方法通常需要有經驗或受過訓練的專業人員才能進行正確的菌種辨識，因此整個鑑定過程需要花費較長的時間。近年來利用分子生物技術開發了許多菌種偵測及鑑定技術，比較快速及精準，可用來取代或輔助傳統的檢測方法，這些方法包括聚合酶鏈鎖反應、南方點墨法、限制酶切割分析法、脈衝式電泳分析法、酵素免疫分析法、DNA 序列分析法及 DNA 雜交法。本文將以真菌之分子鑑定方法為主，從傳統式的鑑定方法開始介紹，繼而將敘述各種不同的分子鑑定技術及各方

法所面對之困難，最後將介紹目前熱門的 DNA 晶片之應用。

二、真菌的分類及所引起的疾病

真菌具有真正的細胞核，一般以其行有性生殖時所產生的接合孢子、子囊孢子和擔孢子來做分類，主要可分為接合菌門 (Zygomycota)、子囊菌門 (Ascomycota) 和擔子菌門 (Basidiomycota) 三大類。在臨床上，致病性真菌又可依其菌落型態來做區別，分為黴菌 (mold) 與酵母菌 (yeasts) 這兩大類。黴菌會產生絲狀的分枝菌絲，而酵母菌則是單細胞的真菌。有些酵母菌會呈現圓形或卵圓形的結構，有些則產生無分枝的絲狀菌落；有些酵母菌屬於雙形性真菌，在 37 °C 時呈現酵母菌型態，而室溫培養則以菌絲體生長。

目前臨床上真菌感染的疾病可分為四類，詳述如下：

1. 表皮真菌感染 (Cutaneous Mycoses)

- (1) 感染特徵及部位：主要引起外皮層、表皮、頭髮或指甲感染，僅能侵入表面角質化組織，而不侵入深層組織，通常這一類的真菌不會使宿主產生細胞性免疫反應。
- (2) 引起疾病：花斑癬、皮黴癬病、黑癬及毛幹白節症。
- (3) 主要菌屬：*Malassezia*、*Microsporum*、*Trichophyton*、*Epidermophyton*。

2. 皮下真菌感染 (Subcutaneous Mycoses)

- (1) 感染特徵及部位：主要引起此類疾病的真菌存在土壤中或腐爛的有機物上。真菌由皮膚的傷口侵入皮下組織引起感染。
- (2) 引起疾病：孢子絲菌病、足菌腫、黑色黴菌症、接合菌症與鼻孢子菌症。
- (3) 主要菌屬：*Sporothrix*、*Exophiala*、*Madurella*、*Pseudallescheria*。

3. 全身性真菌感染 (Systemic Mycoses)

- (1) 感染特徵及部位：這種全身性感染的疾病是由

較具致病力的真菌所感染。通常最先遭到傷害的是肺部，患者通常一開始不自覺，然後由肺部症狀擴散引起全身性感染，病人若不及時治療，死亡率通常很高。這種真菌存於土壤及環境中，經由空氣吸入肺部感染。

- (2) 引起疾病：球孢子菌病、組織漿菌病、芽生菌病、巴西副球孢子菌病。
- (3) 主要菌屬：*Coccidioides*、*Histoplasma*、*Blastomyces*、*Paracoccidioides*。

4. 伺機性真菌感染 (Opportunistic mycoses)

- (1) 感染特徵及部位：伺機性真菌在自然界為腐生菌或人體內正常菌叢，在正常情況下不會引起疾病，而在人體免疫功能減弱或抵抗力差時才引起感染。
- (2) 引起疾病：隱球菌病、念珠菌病、麴菌病、白黴菌病。
- (3) 主要菌屬：*Cryptococcus*、*Candida*、*Apergillus*、*Mucor*、*Rhizopus*、*Penicillium*。

三、治療真菌感染的藥物

臨床上重要的抗真菌藥物 (antifungal agents)，如 amphotericin B、fluconazole、voriconazole、caspofungin 及 flucytosine 等，各藥物之作用目標的不同。如 amphotericin B 作用在細胞膜上的麥角脂醇 (ergosterol)，破壞真菌細胞膜的結構；azole 類藥物則是抑制 ergosterol 合成，使真菌細胞膜無法合成；caspofungin 抑制細胞壁的合成，以及 flucytosine 是抑制 DNA 及 RNA 合成，使細胞無法分裂⁽¹⁵⁾。不同的藥物對不同的病原菌有不一樣的治療效果，因此在臨床上，對某些病原菌若能鑑定至種的層次，可以提供臨床醫師足夠的資訊，投以正確的藥物，以有效且不引起嚴重副作用的藥物治療病人。

四、傳統鑑定方法

傳統的鑑定方法主要是以真菌的繁殖構造及

菌落型態、顏色及生化試驗作為鑑別診斷。首先將臨床樣本以鏡檢法檢視菌種之生長型態，同時亦進行培養，將酵母菌種在固體培養基上培養，大約需要 24–72 小時不等的時間，長出一定的菌落後再進行型態上的觀察及生理生化反應。酵母菌種是以菌落型態、芽孢、菌絲及糖類代謝等來分辨菌種。*Candida albicans* 可以用發芽管實驗 (germ tube test) 來鑑定，將菌種放入血清培養 3 小時，然後以顯微鏡觀察菌種是否有發芽管的形成。倘若菌種無發芽現象，則再以特定培養基進行培養，觀察其生長型態，或是進行生化反應來鑑定。目前市面上鑑定酵母菌的生化套組有 Vitek Yeast Biochemical Card、API ID 32C (BioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.) 及 RapID Yeast Plus System (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, Ga.)。將一定濃度的菌液加入生化套組內所含各種不同的試劑中，經過一至二天的培養時間，以菌種對碳水化合物同化作用 (assimilation) 或是發酵作用 (fermentation) 所產生的結果來鑑定菌種。

黴菌一般使用組織病理學及分離培養的型態⁽¹⁶⁾、生化試驗 (如 urease activity, fermentation of carbon compounds 等)⁽¹⁷⁾ 及血清學試驗等方法進行菌種鑑定⁽¹⁶⁾。組織病理學是針對病灶進行組織切片及染色，在顯微鏡下觀察感染的菌種其型態及特徵，再進行鑑定。此方法一般在侵入性感染的菌種中不能夠有效的區別，主要的原因是由於不同菌種在不同的感染部位，有時會有不同的生長型態，造成鑑定上的困難。以組織病理學的方法需要配合培養，才能夠得到正確的鑑定結果。分離培養鑑定將感染部位的病原菌接種到培養基上，長出一定的菌落後，再依據特徵進行鑑定 (例如繁殖構造、菌落顏色、型態、生長溫度、速度與顯微鏡下的型態)。此方法目前為主要的鑑定方法，然而對於某些菌種而言，其型態上相近，常會有鑑定錯誤的情況，因此需要訓練良好的專業人員進行鑑定。然而經由患病部位進行分離，常會出現培養時間過長的情況，而目前市面上並無黴菌的快速鑑定套組。由於進行鑑定需要等待繁殖性構造的產生 (如孢子、孢子囊、孢子柄等)，才能依照這些特徵鑑定不同菌種，但是對某些菌種，繁殖性構造的出現需要較

長的培養時間，又有一些菌種需要特殊培養基才能獲得典型繁殖性構造，所以鑑定上往往需要相當長的時間。

五、分子鑑定方法

1. 聚合酶連鎖反應

目前主要是以核酸 (nucleic acid) 為基礎的檢測，並且以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 為主要的操作技術。此方法的優點在於不需要有繁殖性的構造出現，只要有少量的菌體，即可從中獲得 DNA，進行 PCR 後，便能夠快速且早期檢測真菌的存在。圖 1 為聚合酶連鎖反應之流程，主要是利用兩小段單股 DNA 片段作為引子 (primer)，經過 PCR 的反覆程序：變性 (denaturation)、粘合 (annealing) 及延伸 (extension)，可將欲增殖的 DNA 片段以指數複製。

目前以 PCR 為基礎的分子生物學檢測方法，有下列數種：

(1) 菌屬或菌種單一性引子聚合酶連鎖反應 (PCR with Genus- or Species-Specific Primers)

以具有專一性的引子進行 PCR 反應，則只有要鑑定的菌種 DNA 片段才會被放大，不是所要鑑

定的菌種則沒有 PCR 產物。此法的關鍵在於引子的設計，若是設計不佳，則會造成在不同的菌種間會有交叉反應的結果。Brillowska-Dabrowska 等以專一性引子來區別 *Microsporium audouinii*、*M. canis* 及 *Trichophyton*⁽¹⁸⁾。*E. dermatitidis* 為一種生長緩慢的黑黴菌，臨床上在培養過程中常受到細菌感染，而使得鑑定上有所困難，因此 Nagano 等⁽¹⁹⁾ 利用一組專一性引子可以快速地鑑定此病原菌。

(2) 巢式聚合酶連鎖反應 (Nested PCR)

這種方法是將第一次的 PCR 產物作為第二次 PCR 循環的模版。此方法可以提高特異性及靈敏度。Hummel 等⁽²⁰⁾ 利用這個方法來偵測血液、腦脊髓液及支氣管肺泡樣本中主要引起侵入性麴菌症的 *Aspergillus* 菌種。在 291 個樣本中，其靈敏度及專一性分別為 80% 及 81%。

(3) 多套式聚合酶連鎖反應 (Multiplex PCR)

以特異性的多組引子，加入同一個 PCR 反應中，此法可以同時鑑定多種不同的菌種。Chang 等人以三組引子進行 multiplex PCR，能區別臨床上常見造成血液感染的七種酵母菌⁽²¹⁾。Lau 等人⁽²²⁾ 的研究報告指出，以多套式聚合酶連鎖反應 (multiplex PCR) 由血液培養中鑑定 11 種真菌，並且只需兩個小時。

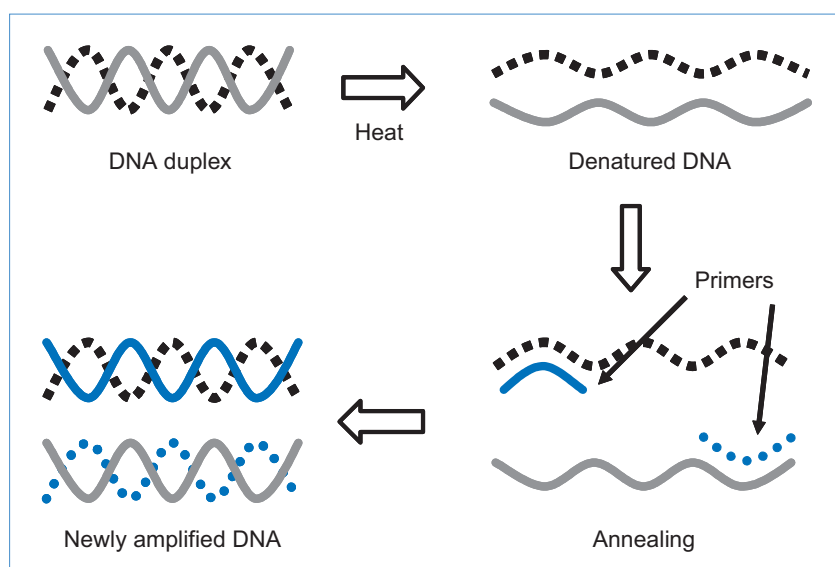


圖 1. 聚合酶連鎖反應之流程。

(4) PCR-RFLP (PCR-restriction Fragment Length Polymorphism)

以 PCR 擴增某一基因之後，再以特定限制酶 (restriction enzyme) 進行該片段的剪切，使 DNA 形成長度不一的片段，以電泳分析，會在膠體上成為一個圖譜，理論上每一種菌有其特定的圖譜，經過比對，便能知道所鑑定的為何種菌。Bontems 等人⁽²³⁾ 利用此方法來區分引起甲癬 (灰指甲) 的皮癬菌 (*Fusarium* spp. 及 *Scopulariopsis brevicaulis*) 及非皮癬菌 (*Aspergillus* spp. 及 *Candida* spp.)，其專一性分別為 81%、71%、52% 及 63%。這個方法比起傳統培養法快速而且靈敏許多。

(5) PCR-ELISA (PCR-enzyme-linked immunosorbent Assay)

在 ELISA plate 中，先固定上 streptavidin 或是抗毛地黃素抗體 (anti-digoxigenin antibody)，再加入標記有 biotin 或是毛地黃素的 PCR 產物，則這些 PCR 產物會與固定在管壁上的 streptavidin 或是抗體結合，之後再利用呈色法即可檢測到 PCR 產物的存在。Badiee 等⁽²⁴⁾ 的研究顯示利用此方法可以對患有惡性血液疾病的病患進行念珠菌感染的早期偵測，可以有效的預防發生全身性念珠菌症。

(6) 即時 PCR 系統 (Real-Time PCR System)

PCR 反應中另外加入一組探針，一個探針上標記有螢光，另一個則標記上具有吸收螢光的物質。在 PCR 反應的過程中探針會先黏合到特定位置，而此時螢光會被抑制，當 PCR 進行 extension

的步驟，探針會被分解，而發出螢光繼而被偵測到。此法能夠進行「即時」檢測，在 PCR 的過程中便能監控 PCR 的產物，其敏感度也得以提高⁽²⁵⁾。Khan 等⁽²⁶⁾ 以此方法區分六種臨床上重要的酵母菌，包括 *Candida albicans*、*C. parapsilosis*、*C. tropicalis*、*C. glabrata*、*C. krusei*、及 *C. dubliniensis*。Wellinghausen 等⁽²⁷⁾ 的研究指出此方法只需要數小時的時間就可以偵測血液樣本中的念珠菌種，比起傳統的血液培養法快三天。另外，*Histoplasma capsulatum* 在傳統培養法需要至少一個月的時間才可以得到結果，然 Simon 等⁽²⁸⁾ 利用 real-time PCR 的方法可以提供快速且準確的鑑定。

上述方法各有其優劣，但大多數僅能鑑定或檢測少數幾種菌種。有些方法專一性雖高，但是靈敏度低，有些方法其再現性不佳，有些方法則是需要耗費較多成本或時間，各有其使用上的限制。

2. 雜交法

首先需由某段 DNA 片段，設計具特異性的 DNA 探針，利用雙股 DNA 的結合特性來偵測及鑑定菌種。把設計好的 DNA 探針固定於尼龍薄膜或硝酸纖維薄膜上，然後與其互補之 DNA 片段結合。一般先以 PCR 方式增殖，同時將呈色物質或螢光物質標記在互補的 DNA 片段上。然後再透過雜交 (hybridization) 反應來偵測或鑑定菌種。Zeng 等⁽²⁹⁾ 利用 PCR 配合這種方法直接由臨床樣本將 22 種重要的真菌鑑定出來，其中包含 *Candida*、*Cryptococcus neoformans* 及 *Aspergillus* 等病原菌。而 Inacio 等⁽³⁰⁾ 則以非專一性的引子增殖 26S rRNA

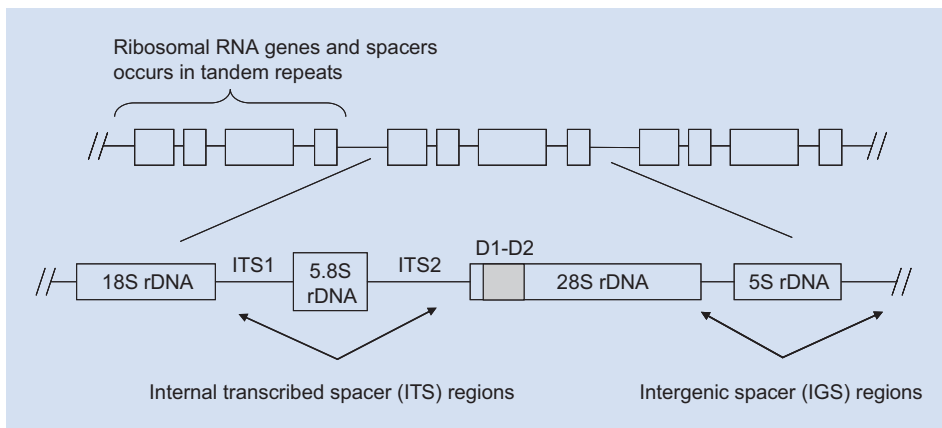


圖 2. 核糖體核酸基因結構圖。

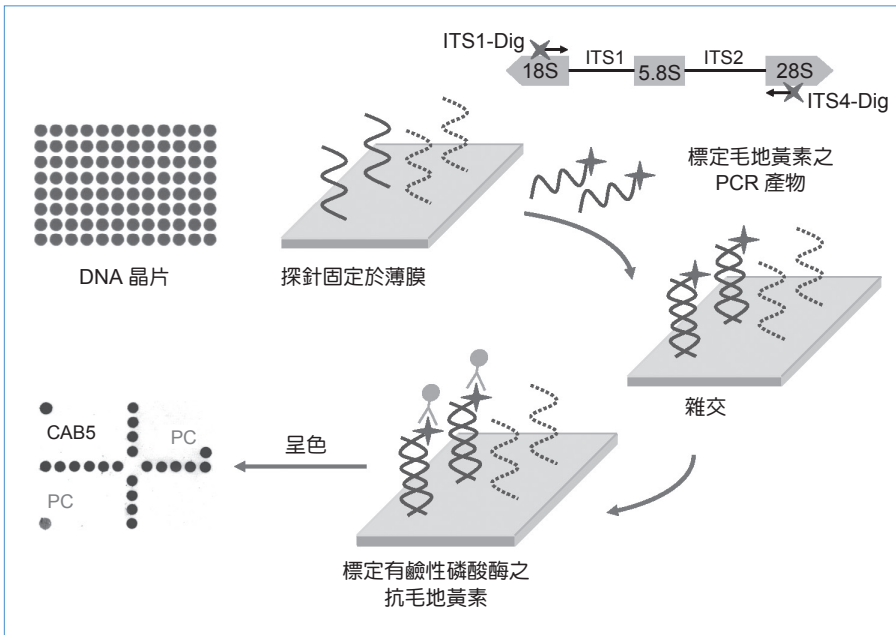


圖 3. DNA 微點陣的製作及反應過程。

基因的一個片段，這個片段與一系列專一性探針進行雜交來鑑定臨床上 8 種重要的念珠菌種，但是偶爾還是會有偽陽性的情況發生。

3. DNA 定序法

DNA 定序法 (DNA sequencing) 為另一種分子生物學的鑑定方法，針對有代表性的基因進行定序，藉由序列上的差異鑑定不同的菌種。這些基因具有種特異性 (species-specific) 或是屬特異性 (genus-specific)。目前在序列分析方面，主要針對幾個主要的基因進行研究，其中包括核糖體 DNA (ribosomal DNA, rDNA)、核糖體內轉錄區 (internal transcribed spacer, ITS) 及基因間間隔區 (intergenic spacer, IGS)。PCR 反應之後，將其產物定序，再將序列的結果與基因資料庫進行比對，即可判別出所檢測的菌和那一種菌最為相近⁽³¹⁾。Leaw 等⁽³²⁾ 及 Li 等⁽³³⁾ 都利用 ITS 區域序列分別鑑定臨床上 86 種重要的酵母菌及 17 種皮癬菌，鑑定率分別大於 96% 及 97%。另外，也有一些以序列鑑定為基礎的商品化套組已經開發出來，例如 MicroSeq D2 Large-Subunit Ribosomal DNA Sequencing Kit (Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland)^(34, 35)。但其資料庫真菌種類不多，並不包含不常見的菌種之序列，使樣本無法比對。

4. DNA 微陣列晶片

DNA 微陣列晶片 (DNA microarray) 是一個可以將 100 個甚至 1000 個以上的 DNA 探針固定一個微小面積上，以進行各種不同的生化檢測。目前發展的 microarray 有許多種，包括 cDNA microarray 與 oligonucleotide microarray。cDNA microarray 主要是利用 PCR 產物經過加熱變性成為單股 DNA 後作為探針，以靜電作用⁽³⁶⁾ 或共價鍵結合⁽³⁷⁾ 的方式固定於玻璃表面進行雜交。探針長度大多為 200 bp 至 800 bp。這種晶片具有高靈敏度但是專一性不夠，主要原因可能為 PCR 增殖過程中或在 PCR 產物進行純化時造成序列或片段的不完整，而使專一性降低。因此此類晶片在設計探針時會以多個探針代表一個目標物來提高專一性。Oligonucleotide microarray 則以化學合成的方式製作較短的探針，長度大約 25 bp 至 80 bp。由於序列較短，使這類晶片的專一性大幅度增加，相對的靈敏度卻會受到影響。因此在設計探針時必須注意每一個探針的解離溫度 (melting temperature, T_m) 需相近 (一般在 5 °C 以內) 或序列是否會產生二級結構，而影響目標物與探針的雜交反應。檢測訊號的方式大多數採用螢光與酵素呈色法這兩種⁽³⁸⁾。各種檢測方法各有其優劣，以螢光的方法靈敏度高，但是使用上較不方便，且需有特殊的儀器，才能判讀

訊號；呈色法雖然靈敏度較螢光法低一些，但是使用上方便，而且能夠直接以肉眼判讀結果，不需要特殊的設備。

DNA 晶片的應用範圍廣泛，可應用於微生物的偵測與鑑定、病原菌的發現、微生物之抗藥性監測及菌種分型等。其優點包括快速簡便、大量篩選及操作統一。Khan 等⁽³⁹⁾ 表示 DNA 晶片可以提供科學家對於人類所患的各種疾病有更深入的了解，在診斷上給予準確的判斷及提供有效的治療。根據 Young 等⁽⁴⁰⁾ 的報告指出，DNA 晶片除了在疾病的診斷及治療上提供有效的訊息外，也可以應用在醫療藥物發展上。在微生物鑑定方面，以 DNA 晶片作為鑑定工具已經有一些成果發表。Anthony 等人在 2000 年，首先發表以 oligonucleotide array 檢測造成菌血症的細菌⁽⁴¹⁾，他們利用尼龍膜片結合呈色法，進行引起菌血症中細菌的快速鑑定，但正確率只達 75.3%。

近年來已有很多研究利用這種技術來鑑定致病性真菌。最常用的目標基因為真菌的 28S rDNA 及內轉錄區。真菌的 DNA 序列中有一段高保守性及重複性的 rRNA 基因，包含 18S、5.8S 及 28S rRNA 基因。在這些 rDNA 基因中有兩段內轉錄區 (ITS)，ITS1 及 ITS2，分別位於 18S 與 5.8S rDNA 之間及 5.8S 與 28S rDNA 基因之間，如圖 2 所示。

目前的研究發現，ITS 在真菌中具有以下特性：ITS 序列在相同菌種之間有相當高的相似性，其相似度可以高達 99–100%，而 ITS 序列在相同菌屬於不同菌種之間有較高的變異性，其相似度介於 40%–95% 之間⁽³²⁾；ITS 區域的長度不長，大約只有 200–400 bp，連同中間 5.8S rRNA 基因，整個長度也大約只有 500–900 bp，使用 PCR 很容易把整個 ITS 區域增幅；由於 rDNA 具有高度保留性，而且在 GenBank 中有相當多菌種的序列資料，所以可以設計通用性的引子 (universal primers)，以 PCR 放大所有真菌的 ITS 區域；另外 rRNA 操作子在染色體中約有 140 套 (copies)⁽⁴²⁾，以 PCR 增幅此區域時，有相當好的靈敏度。真菌的 ITS 還有一項特性就是在細胞中只存在一種序列和長度，所以進行 PCR 後只有單一產物出現，在

定序上相當方便。

Leinberger 等⁽⁴³⁾ 將探針設計在 ITS1 及 ITS2 區域，並發展 DNA 晶片來鑑定引起侵入性真菌感染最常見的 12 種菌種，包括 *C. albicans*、*C. dubliniensis*、*C. krusei*、*C. glabrata*、*C. tropicalis*、*C. parapsilosis*、*C. guilliermondii*、*C. lusitaniae*、*A. fumigatus*、*A. flavus*、*A. niger* 及 *A. terreus*。在 2006 年 Huang 等⁽⁴⁴⁾ 選用了 ITS1 區域為探針設計區，並將目標菌種擴增至分屬於 8 個菌屬的 20 種臨床重要的真菌，其靈敏度可達 15 pg/ml 的 DNA。Spiess 等⁽⁴⁵⁾ 也利用 ITS1 區域來鑑定最常由白血球過低的病患中分離出來的 24 種真菌菌種，包括 *A. fumigatus*、*A. flavus*、*A. terreus*、*C. albicans*、*C. dubliniensis*、*C. glabrata*、*C. lusitaniae*、*C. tropicalis*、*Fusarium oxysporum*、*F. solani*、*Mucor racemosus*、*Rhizopus microsporus*、*Scedosporium prolificans* 及 *Trichosporon asahii*。Campa 等⁽⁴⁶⁾ 則利用 ITS1 及 ITS2 兩個區域針對 24 種 (10 屬) 侵入性及表皮真菌病進行鑑定。其中包含 *C. famata*、*C. kefyri*、*T. cutaneum*、*F. solani* 及 *Penicillium marneffei* 五種新興的菌種。另外，也針對 *C. parapsilosis* 及其相近的兩種菌種 (*C. orthopsilosis* 及 *C. metapsilosis*) 設計探針，並成功地將它們區分。Sato 等⁽⁴⁷⁾ 利用 DNA 晶片來鑑定引起皮膚疾病的真菌。研究報告指出以傳統培養法來鑑定臨床檢體 (指甲)，其鑑定率只有 34% (36/106)，而以 DNA 晶片方式鑑定，其鑑定率則為 92% (98/106)。雖然以上的研究所發展的 DNA 晶片能一次鑑定多種病原菌 (約 20 幾種)，但大部分都還是屬於較常見之菌種。而且大多採用玻璃晶片進行雜交，並使用螢光偵測訊號，需要可觀察螢光之儀器，因此成本較昂貴，比較不適合臨床鑑定使用。

在國內也有研究者發展以尼龍膜片作為基材，針對臨床上重要的酵母菌及黴菌 DNA 晶片，病原菌種類高達 77 種酵母菌⁽⁴⁸⁾ 及 64 種黴菌⁽⁴⁹⁾，其中包含新興及罕見的菌種。圖 3 所示為製作 DNA 微點陣的過程。首先在 ITS 區域設計致病性真菌的專一性探針，將 DNA 探針點製作在尼龍膜片上成微點陣，將要偵測的 DNA 檢體與點陣上的探針做雜

交。其方法是先用有標記毛地黃素的通用性引子 (universal primers) 進行 DNA 檢體的 PCR 擴增，然後將其與已標定酵素的抗毛地黃素抗體結合。當加入受質時，酵素將催化受質，使其呈色，結果可以用肉眼觀察，最後再比對反應點的位置來鑑定真菌的種類。檢驗結果可以提供醫師快速診斷及有效的治療。

Hsiao 等⁽⁴⁹⁾ 利用此技術鑑定臨床上 64 種 (32 屬) 重要的黴菌。這些黴菌會引起表皮、皮下、全身性及伺機性真菌感染。總共測試了 397 株真菌 (290 目標菌種及 107 非目標菌種)，其靈敏度及專一性分別為 98.3% 及 98.1%。而在 2007 年 Leaw 等⁽⁴⁸⁾ 則以此技術鑑定臨床上重要的酵母菌共 77 種 (16 屬)，其靈敏度及專一性高達 100% 及 97%。Li 等⁽⁵⁰⁾ 針對臨床上 17 種皮癬菌發展皮癬菌 DNA 晶片，所鑑定的菌屬包括 *Epidermophyton*、*Microsporum* 及 *Trichophyton* 等菌屬，這些菌種以傳統方法鑑定都需要花費較長的時間，且因菌落型態不一致，常常導致錯誤的鑑定結果。整個過程由菌落分離開始到菌種完成鑑定不超過 24 小時。另外，在臨床上鑑定陽性血瓶中之真菌，尤其是非白色念珠菌種、非酵母菌種及黴菌，相當耗時。Hsiue 等⁽⁵⁾ 利用 Hsiao 等⁽⁴⁹⁾ 及 Leaw 等⁽⁴⁸⁾ 所研發的黴菌及酵母菌 DNA 晶片，總共測試 116 支真菌陽性血瓶，以傳統方式只偵測到 6 個檢體是含有兩種菌種，而利用真菌 DNA 晶片則有 10 個檢體是有兩種菌種的感染。其中有兩個樣本，以 DNA 晶片所鑑定出來額外的菌株 (*C. glabrata* 及 *T. asahii*) 都對抗真菌藥物有很高的感受性。除此之外，有一個樣本以生化套組鑑定為 *Rhodotorula glutinis*，然而使用 DNA 晶片並以序列分析進行確認後，結果為 *R. mucilaginosa*。此 DNA 晶片偵測真菌的靈敏度及專一性都為 100%。由偵測到血瓶內有菌體生長開始，整個鑑定程序可以在 16–24 小時內完成。Bouchara 等⁽⁵¹⁾ 也利用 Hsiao 等⁽⁴⁹⁾ 及 Leaw 等⁽⁴⁸⁾ 所研發的 DNA 晶片，簡化發展出囊性纖維化 (cystic fibrosis) DNA 晶片，由糞便檢體中鑑定造成 CF 病患死亡或發生的呼吸道真菌感染的病原菌。

由於以上 DNA 晶片是將探針固定在尼龍膜片上進行反應，而且反應點的大小為 400 μm ，因此

結果可以由肉眼判斷，不需要昂貴的系統來分析。此外，能夠在同一個樣本中鑑定多種菌種的能力遠超過傳統方法，是一個快速又可靠的分子鑑定方法，可作為臨床上輔助傳統鑑定方法的工具。

5. 商業化 DNA 晶片

市面上有些生物技術大廠如 Affymetrix、Roche、Agilent、Illumina、Luminex 等很早就開始研發 DNA 晶片，然而大多用於人類基因分析。目前這些公司尚未有鑑定真菌菌種的商業化 DNA 晶片。以下簡述各家的 DNA 晶片產品及其特色。Affymetrix 是全美第一家發展 DNA 晶片技術的公司，其所發展的生物晶片產品為 Genechip，這是一個具有超高密度的晶片，使用光罩法 (photolithography) 將 DNA 的 A、T、C、G 四種鹼基固定在矽晶片上。光罩法為一般半導體製成採用的方法，Affymetrix 將此技術改用於製作 DNA 晶片上。它是利用光罩來控制反應的位置，將核甘酸一個一個接上去。這種 DNA 晶片使用的探針長度大約 20–25 bp，並且採用多個探針來偵測目標基因來增加靈敏度及專一性。每片晶片至少有超過 10 萬個探針，因此一次可以進行大量的基因表現篩選。Affymetrix 提供包括 54,000 種基因的多重陣列生物晶片，是較為廣泛使用的商業化平台，但是其製作成本高且製作彈性差，也必須搭配價格昂貴的分析系統。

Roche 的生物晶片產品 Nimblegen，也是具有超高密度的晶片，是利用數位光化學合成法 (maskless photo-mediated synthesis) 將探針固定於矽晶片上。所使用的探針長度約 60 bp，使其擁有較高的靈敏度。與 Gene chip 不同的是，Nimblegen 是多種顏色雜交。Agilent 則以非接觸噴墨方式 (bubblejet printing) 將探針固定於玻璃表面上，在製作上比前述兩種晶片具有彈性，成本相對也比較便宜，使客製化成本降低。除此之外，Agilent 還提供了網路平台 eArray，讓使用者自行設計所需要的 DNA 晶片，此項為免費服務，而且沒有設定最低的晶片製作量。這一點使 Agilent 的生物晶片成為許多只需要少量晶片或特殊晶片設計的研究人員或實驗單位之首要選擇。Illumina 的 beads array

可將 25 萬個長度約 50 mer 的探針放在一個 3 μm 的矽珠上 (silica beads)，而晶片上則設計一個個只能放一個矽珠，由光纖束製作而成的凹槽。此晶片可允許一次同時進行 96 個獨立的反應。這種晶片面積小、製造簡單，適用於需要大量分析的基因分型應用上。

最新由 Luminex 研發的液態生物晶片 (suspension bead arrays)，顛覆傳統只有平面或二維的晶片，也就是三維可於液態中進行雜交反應。其偵測原理是將直徑 5.6 μm 的聚苯乙烯 (polystyrene) 微小珠子用紅綠兩種螢光進行編碼，通過調節不同比例的螢光製造出多達 100 種不同顏色的微小珠子。在將探針固定於微小珠子上進行目標物的偵測。在液態中雜交反應後，分別利用兩組雷射光來偵測微小珠子的編號 (顏色) 以及結合於微小珠子上目標物的螢光強度，再透過電腦分析便可將目標物鑑定出來。

六、結論

目前 DNA 晶片的發展具有前所未有的潛力，可同時且大量偵測以及鑑定上百上千種微生物基因。雖然過去大部分的研究主要利用生物晶片來進行基因表現的分析，但近年來逐漸朝向其他領域發展，例如偵測及鑑定病原菌種、微生物對各種藥物的抗藥性分析、病原菌種的分型、探討宿主與病原菌之間的感染及防禦機制 (基因表現) 來監測病原菌的感染程度，這些研究可以幫助我們更加瞭解相關的感染性疾病。然而現在市面上的檢測平台種類太多，而且不同的平台似乎沒有一致的實驗結果，也就是說沒有一個標準。在臨床上理想的 DNA 晶片平台是沒有複雜的儀器或分析系統、可同時進行多種目標物的偵測、可提供可靠且快速讀取的結果、高靈敏度及高專一性的中低密度之 DNA 晶片。研發市場尤其在臨床真菌的偵測及鑑定這部分尚有很大的成長空間。根據現在生物晶片發展的趨勢，希望在未來可以有更準確、快速及簡便，而且系統更標準化且低價化的真菌 DNA 晶片發展出來，以幫助臨床醫師作正確的診斷及給予最佳的藥物治療，並且可以更進一步瞭解病原菌感染之相關機制。

參考文獻

1. H. Wisplinghoff, T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond, *Clin. Infect. Dis.*, **39**, 309 (2004).
2. M. A. Pfaller and D. J. Diekema, *Clin. Microbiol. Rev.*, **20**, 133 (2007).
3. A. Voss, J. A. Kluytmans, J. G. Koeleman, L. Spanjaard, C. M. Vandenbroucke-Grauls, H. A. Verbrugh, M. C. Vos, A. Y. Weersink, J. A. Hoogkamp-Korstanje, and J. F. Meis, *Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **15**, 909 (1996).
4. K. Jr. Vladimír and G. Kovacicova on behalf of the Slovak Fungaemia study group, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **36**, 7 (2000).
5. H. C. Hsiue, Y. T. Huang, Y. L. Kuo, C. H. Liao, T. C. Chang, and P. R. Hsueh, *Clin. Microbiol. Infect.*, **16**, 493 (2010).
6. M. A. Pfaller, D. J. Diekema, R. N. Jones, S. A. Messer, R. J. Hollis, and SENTRY Participants Group, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 852 (2002).
7. M. A. Pfaller, D. J. Diekema, S. A. Messer, R. J. Hollis, and R. N. Jones, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 1068 (2003).
8. A. K. Zaas, M. Boyce, W. Schell, B. A. Lodge, J. L. Miller, J. R. Perfect, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5233 (2003).
9. G. Maschmeyer, A. Haas, and O. A. Cornely, *Drugs*, **67**, 1567 (2007).
10. A. Upton, K. A. Kirby, P. Carpenter, M. Boeckh, and K. A. Marr, *Clin. Infect. Dis.*, **44**, 531 (2007).
11. M. von Eiff, N. Roos, R. Schulten, M. Hesse, M. Zühlendorf, and J. van de Loo, *Respiration*, **62**, 341 (1995).
12. A. N. Malani and C. A. Kauffman, *Drugs*, **67**, 1803 (2007).
13. O. A. Cornely, *Infection*, **36**, 296 (2008).
14. M. C. Arendrup, B. T. Fisher, and T. E. Zaoutis, *Clin. Microbiol. Infect.*, **15**, 613 (2009).
15. G. Midgley, Y. M. Clayton, and R. J. Hay, *Antifungal Agents*, Chicago: Mosby Wolfe, 148 (1997).
16. C. A. Sharon, C. C. L. Halliday, and W. Meyer, *Med. Mycol.*, **40**, 333 (2002).
17. G. S. Hoog, J. Guarro, G. Gené, and M. J. Figueras., *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, The Netherlands, 39 (2000).
18. A. Brillowska-Dabrowska, A. Swierkowska, D. M. Lindhardt Saunte, and A. C. Arendrup, *Med. Mycol.*, **48**, 486 (2010).
19. Y. Nagano, J. S. Elborn, B. C. Millar, C. E. Goldsmith, J. Rendall, and J. E. Moore, *J. Cyst. Fibros.*, **7**, 576 (2008).
20. M. Hummel, B. Spiess, J. Roder, G. von Komorowski, M. Dürken, K. Kentouche, H. J. Laws, H. Mörz, R. Hehlmann, and D. Buchheidt D, *J. Med. Microbiol.*, **58**, 1291 (2009).
21. H. C. Chang, S. N. Leaw, A. H. Huang, T. L. Wu, and T. C. Chang, *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 3466 (2001).
22. A. Lau, T. C. Sorrell, S. Chen, K. Stanley, J. Iredell, and C. Halliday, *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 3021 (2008).
23. O. Bontems, P. M. Hauser, and M. Monod, *Br. J. Dermatol.*, **161**, 791 (2009).

24. P. Badiee, P. Kordbacheh, A. Alborzi, M. Zakernia, and P. Haddadi, *Jpn. J. Infect. Dis.*, **62**, 1 (2009).
25. M. C. Hsu, K. W. Chen, H. J. Lo, Y. C. Chen, M. H. Liao, Y. H. Lin, and S. Y. Li, *J. Med. Microbiol.*, **52**, 1071 (2003).
26. Z. Khan, A. S. Mustafa, and F. F. Alam, *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **42**, 290 (2009).
27. N. Wellinghausen, D. Siegel, J. Winter, and S. Gebert, *J. Med. Microbiol.*, **58**, 1106 (2009).
28. S. Simon, V. Veron, R. Boukhari, S. Blanchet, and C. Aznar, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **66**, 268 (2010).
29. X. Zeng, F. Kong, C. Halliday, S. Chen, A. Lau, G. Playford, and T. C. Sorrell, *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 2872 (2007).
30. J. Inácio, O. Flores, and I. Spencer-Martins, *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 713 (2008).
31. P. Abliz, K. Fukushima, K. Takizawa, and K. Nishimura, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **40**, 41 (2004).
32. S. N. Leaw, H. C. Chang, H. S. Sun, R. Barton, J. P. Bouchara, and T. C. Chang, *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 693 (2006).
33. H. C. Li, J. P. Bouchara, M. M. Hsu, R. Barton, S. Su, and T. C. Chang, *J. Med. Microbiol.*, **57**, 592 (2008).
34. L. Hall, S. Wohlfiel, and G. D. Roberts, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5099 (2003).
35. B. Ninet, I. Jan, O. Bontems, B. Léchenne, O. Jousson, R. Panizzon, D. Lew, and M. Monod, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 826 (2003).
36. A. Ehrenreich, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 255 (2006).
37. G. Cheung, M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi, R. Kucheralapati, and G. Childs, *Nat. Genet.*, **21**, 15 (1999).
38. J. Adamczyk, M. Hesselsoe, N. Iversen, M. Horn, A. Lehner, P. H. Nielsen, M. Schloter, P. Roslev, and M. Wagner, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6875 (2003).
39. J. Khan, M. L. Bittner, Y. Chen, P. S. Meltzer, and J. M. Trent, *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1423**, M17 (1999).
40. R. A. Young, *Cell.*, **102**, 9 (2000).
41. R. M. Anthony, T. J. Brown, and G. L. Frence, *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 781 (2000).
42. P. C. Iwen, S. H. Hinrichs, and M. E. Rupp, *Med. Mycol.*, **40**, 87 (2002).
43. D. M. Leinberger, U. Schumacher, I. B. Autenrieth, and T. T. Bachmann, *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4943 (2005).
44. A. Huang, J. W. Li, Z. Q. Shen, X. W. Wang, and M. Jin, *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 3299 (2006).
45. B. Spiess, W. Seifarth, M. Hummel, O. Frank, A. Fabarius, C. Zheng, H. Mörz, R. Hehlmann, and D. Buchheidt, *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 3743 (2007).
46. D. Campa, A. Tavanti, F. Gemignani, C. S. Mogavero, I. Bellini, F. Bottari, R. Barale, S. Landi, and S. Senesi, *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 909 (2008).
47. T. Sato, A. Takayanagi, K. Nagao, N. Tomatsu, T. Fukui, M. Kawaguchi, J. Kudoh, M. Amagai, N. Yamamoto, and N. Shimizu, *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 2357 (2010).
48. S. N. Leaw, H. C. Chang, R. Barton, J. P. Bouchara, and T. C. Chang, *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 2220 (2007).
49. C. R. Hsiao, L. Huang, J. P. Bouchara, R. Barton, H. C. Li, and T. C. Chang, *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 3760 (2005).
50. H. C. Li, J. P. Bouchara, M. M. Hsu, R. Barton, and T. C. Chang, *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 3160 (2007).
51. J. P. Bouchara, H. Y. Hsieh, S. Croquefer, R. Barton, V. Marchais, M. Pihet, and T. C. Chang, *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 142 (2009).



劉向寧小姐為國立成功大學醫學工程博士，曾任國家衛生研究院感染症研究組博士後研究員。

Shiang Ning Leaw received her Ph. D. in biomedical engineering from National Cheng Kung University. She was a post-doctoral fellow in National Health Research Institutes.