

# 新興致病酵母菌-耳念珠菌的培養鑑定與藥敏試驗

中山醫學大學醫技系 林世傑助理教授

2009 年 Satoh 等人從日本東京都老人醫院一名 70 歲患中耳炎女性的耳道檢體，分離出一株酵母菌，經過生化試驗鑑定及 rDNA 定序確認是念珠菌屬的一個新菌種，故以耳朵的拉丁文 *auris* 當作種名，命名為耳念珠菌(*Candida auris*)。此文發表後韓國學者將以前凍存菌株重新分析比對，驚訝地發現在 1996 年韓國總共有 15 名慢性中耳炎患者，當時的鑑定以為是石鱸魚念珠菌(*Candida haemulonii*)，證明其實都是耳念珠菌感染。自此之後耳念珠菌已成為一種新興的多重抗藥性的致病酵母菌，它有幾個特色包括:具有容易在患者和醫院之間傳播的能力，且可在環境表面長期的存活，容易在危急或重症病患者中迅速傳播；也是這些患者的主要伺機致病菌，且曾多次爆發院內感染。它也常造成菌血症，因有多重抗藥性，不易治療，有很高的死亡率。不論使用傳統鑑定方法或商業化的手工或自動化鑑定系統，甚至新近開發的 MALDI-TOF MS 系統，若未能將耳念珠菌的鑑定特性加入資料庫中，就會導致系統只能從舊資料庫中找到親緣性相近的其他菌種，例如最常見的錯誤是 *Candida haemulonii*，另外也可能出現 *Candida lusitaniae*、*Candida famata*、*Candida sake*，甚至是 *Rhodotorula glutinis*....等，以致鑑定錯誤，因而造成診斷錯誤及不當治療。

全球感染耳念珠菌病例如雨後春筍般越來越多，根據美國 CDC 截至 2020 年 3 月統計目前已在全球六大洲 40 國傳出疫情，台灣也於 2018 年 4 月在台南奇美醫院出現第一個案例，幸好是輕症並無大礙。使用全基因體定序(WGS)進行遺傳分析，發現耳念珠菌目前至少有四個不同的演化(地理)分支(I~IV)存在，不同分支有數以萬計的單核苷酸多形性(SNPs)的差異存在，導致遺傳的多樣性：南亞洲(分支 I：印度、巴基斯坦、英國、美國)，東亞洲(分支 II：日本、南韓)，非洲(分支 III：南非)和南美洲(分支 IV：哥倫比亞、美國、委內瑞拉)，最近在伊朗可能又出現另一個新的分支。東亞洲(II)分支(含有耳念珠菌的典型分離株)似乎主要感染耳朵，而其他的 I、III、IV 分支則是較嚴重的侵襲性感染或醫院和照護機構的院內感染為主。而對抗黴菌藥物抵抗力方面，I、III、IV 分支抗藥性比 II 分支要嚴重。

## 一、高危險群和感染：

耳念珠菌主要感染免疫力低下者，如體弱的老年人、新生兒、糖尿病患者、重症加護病房患者、手術後患者、使用廣效性抗生素或抗黴菌藥物患者等，對正常免疫力的族群很少造成感染。耳念珠菌最常造成菌血症感染，也會產生中耳炎、心包炎、泌尿道感染及肺炎等。

## 二、培養特徵：

耳念珠菌在顯微鏡下呈圓形或橢圓形，單一、成雙或呈團狀的出芽酵母菌，大小約  $2.0\sim 3.0 \times 2.5\sim 5.0 \mu\text{m}$ ，在 BAP、Chocolate agar、BHI agar、SDA 這些培養基皆可生長良好，長成白色到奶油色圓形菌落，這些特性皆與白色念珠菌相似。但是添加 0.01~0.1% Cycloheximide 抑制劑的培養基則無法生長，這種特性可用於初步判斷可能是耳念珠菌。若使用產色的 CHROMagar Candida 培養，隔夜長成小型白色菌落並

無特色，但第二天後密集區小型菌落長成淡粉紅色，而獨立的大型菌落會出現中央為粉紅或紫紅色的白色菌落；這是耳念珠菌很明顯重要的菌落特徵。而在 Brilliance Candida agar 長成米黃色菌落。最適合的生長溫度為 37~40°C，在 42°C 也可生長，這是念珠菌屬的其他菌種中少見的特徵；故可做為耳念珠菌初步判斷的依據；這點與其親緣關係最密切的 *Candida haemulonii* 在 42°C 無法生長剛好相反，很容易地把兩者區分開來。同時這種耐 30~42°C 高溫的特性也被認為是耳念珠菌在人體內有高存活率的原因之一，然後再從人體散佈到週遭的人或環境中成為傳染源，尤其最常造成免疫力低下族群的嚴重感染。

### 三、選擇性及鑑定培養基：

Welsh 等人利用耳念珠菌和其他念珠菌在醣類利用、氮源利用及耐鹽性的差異，研製出兩種高敏感度和特異性的培養基(Salt SAB Broth 和 Salt YNB)，這兩種培養基可以幫助醫檢師從環境或臨床檢體中高效地分離和鑑定耳念珠菌，特異性和敏感度都是 100%。方法是將 10% NaCl、gentamicin、chloramphenicol、dulcitol、mannitol 或 dextrose 可分別加入 Sabouraud broth 或 Yeast nitrogen base (YNB)中配製成液體培養基，接種檢體後，需置於 42°C 培養，可抑制所有其他酵母菌的生長。但是使用含葡萄糖的 Sabouraud broth，若培養溫度低於 42°C 時，光滑念珠菌(*C.glabrata*)也可生長；因為它對高鹽類也有耐受性。這種配製簡單又便宜的方法，已有不少實驗室在使用。

Kumar 等人將 CHROMagar candida 和 Pal's(向日葵種子) medium 兩種培養基合併在一起，可以完美的區分 *C.auris* 和 *C.haemulonii*。Pal's medium 最初是設計用於鑑定 *Cryptococcus neoformans*；並有助於將 *Candida albicans* 跟都柏林念珠菌(*Candida dubliniensis*)區分開來。而在這種合併的培養基，耳念珠菌可在 42°C 生長，且呈現白到奶油色光滑融合生長菌落，不產生假菌絲。而 *C. haemulonii* 在 42°C 生長不良的淺粉紅色菌落，會產生假菌絲。但是要先用表現型鑑定初步判斷是這兩個菌種之一，來排除念珠菌屬的其他菌種，才能得到正確結果。

### 四、生化試驗鑑定：

以下是日本分離的耳念珠菌的生化試驗特性：

- (一)醣類發酵試驗陽性：glucose、sucrose(weak)、trehalose(weak)。
- (二)醣類發酵試驗陰性：galactose、maltose、lactose、raffinose。
- (三)醣類同化試驗陽性：glucose、sucrose、maltose、D-trehalose、D-raffinose、D-melezitose、inulin (weak)、soluble starch、ribitol (weak)、galactitol、D-mannitol、sorbitol、citrate。
- (四)醣類同化試驗陰性：D-galactose、L-sorbose、D-cellobiose、lactose、melibiose、D-xylose、L-arabinose、Aarabinose、ribose、L-rhamnose、D-glucosamine、N-acetyl-D-glucosamine、methanol、ethanol、glycerol、erythritol、 $\alpha$ -methyl-D-glucoside、D-gluconate、salicin、DL-lactate、succinate、inositol、hexadecane、2-keto-D-gluconate、xylitol。
- (五)氮源利用試驗陽性：ammonium sulfate、cadaverine、L-lysine。
- (六)氮源利用試驗陰性：sodium nitrite、potassium nitrate、ethylamine、Starch 生成試驗、urease 活性試驗、diazonium blue 試驗皆是陰性。

在不合維生素培養基會生長，也可在 50%葡萄糖或 10%NaCl/5%葡萄糖培養基生長，有高度耐鹽性。不會產生假菌絲、芽管和厚膜孢子。

### 五、演化分支的特性差異：

不同的演化分支的特性會有差異存在，從日本、韓國分離出的菌株與印度、非洲和巴西的菌株在 N-acetyl-D-glucosamine(NAG)同化試驗存在明顯差異；日韓菌株為陰性，而後者各國分離株為陽性。相對的 L-rhamnose 同化試驗在非洲菌株為陽性，其他各國分離株均為陰性。而 Cornmeal Tween 80 上產生假菌絲的能力方面，南亞洲菌株 84% 會產生假菌絲，相反的在非洲和東亞洲菌株則不會產生假菌絲。耳念珠菌至少有兩種細胞形態存在：聚集細胞和非聚集細胞，利用蠟蛾(*Galleria mellonella*)感染模型研究發現非聚集細胞比聚集細胞的毒性和致病力更強。綜上所述，耳念珠菌在細胞形態、氮源和碳源的吸收利用、毒力和致病性及抗藥性等表現型特徵具有高度的複雜性，主要就是因為各分支有不同的單核苷酸多形性的差異所造成。

### 六、抗黴菌藥敏試驗：

目前用於耳念珠菌抗黴菌藥敏試驗的方法，包括美國 CLSI 或歐洲 EUCAST 這兩個組織都建議使用肉湯微量稀釋法(Broth microdilution method)，這也是與其他藥敏試驗方法比較時的黃金標準。另外利用梯度擴散法(Gradient diffusion method)的 E-test 或是 VITEK 2 抗黴菌藥敏系統都是臨床常用的方法。但是需特別注意的是有報告指出 VITEK 2 在 amphotericin B 和 caspofungin 的最低抑菌濃度有假性升高的現象，因為 caspofungin(屬於 echinocandin 類)是治療耳念珠菌感染的第一線藥物，故有疑問時應再用標準方法加以確認。

根據 CLSI 的指引(<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>)，所有分離的耳念珠菌都必須進行抗黴菌藥敏試驗。儘管耳念珠菌通常具有多重抗藥性，但是不同分離株之間的抗黴菌抗藥性的差異很大。當前尚無專用於耳念珠菌藥敏試驗的判斷標準(Breakpoint)。因此，美國 CDC 的暫時性判斷標準是參考相關的念珠菌種和專家意見而產生的：fluconazole  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ ，amphotericin B  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ (或使用 Etest  $\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$ )，anidulafungin 和 micafungin  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ，caspofungin  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ 。目前尚不清楚這判斷標準與臨床結果之間的相關性。因此，上列標準應被視為一般指引，而不是抗藥性的確定性判斷標準；故要特別注意，若發現抗黴菌藥的最低抑菌濃度升高，並不一定表示此藥不可使用，特別是如果患者對其他抗黴菌藥的治療都無效時，仍可考慮使用。

耳念珠菌從 2009 發現至今已超過十一年，但是微生物鑑定相關的原文教科書都尚未把此菌收錄到書中，以致於多數人對耳念珠菌還是相當陌生，所以微生物實驗室的醫檢師要養成閱讀期刊的習慣，隨時補充新知，將新菌種的特性加入鑑定表中，才有可能正確鑑定出來。而商業化鑑定系統的資料庫則有部分公司已更新，然而也還有許多系統仍未將耳念珠菌納入資料庫中，所以使用商業化鑑定系統之前應先洽詢廠商；是否可鑑定所有不同分支的耳念珠菌，避免使用舊版資料庫，導致鑑定錯誤的窘境。生化試驗鑑定結果若不典型或可信度不高時，就記得一定要操作其他追加試驗，也可轉請有 MALDI-TOF MS 實驗室或送請疾管署代為鑑定。而在抗黴菌藥敏試驗方面，最好使用肉湯微量稀釋法或是梯度

擴散法為之，結果判讀方面僅能以暫時性的 MIC 判斷標準當參考，實際用於臨床治療時應以病人病情表現為準。

參考文獻：

1. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, and Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel Ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol. Immunol.* 2009;53:41–44.
2. Jeffery-Smith A, Taori SK, Schelenz S, Jeffery K, Johnson EM, Borman, A, et al. *Candida auris*: a review of the literature. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31:e00029-17.
3. Sekyere JO. *Candida auris*: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. *MicrobiologyOpen.* 2018;7:e578.
4. ElBaradei A. A decade after the emergence of *Candida auris*: what do we know? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(9):1617-1627.