

出國報告（出國類別：參加國際會議）

次世代測序法診斷免疫缺陷患兒口腔
真菌定植的多樣性
(參加「2018 年第 36 屆歐洲兒科
傳染病學會年會」報告)

服務機關：臺中榮民總醫院兒童醫學中心

姓名職稱：黃芳亮 科主任

派赴國家：瑞典 瑪爾默

出國期間：107 年 5 月 28 日至 107 年 6 月 3 日

報告日期：107 年 6 月 24 日

摘要（含關鍵字）

兒童癌症病人因化學藥物治療，白血球減少、口腔黏膜受損，使得免疫力低下，所以容易造成黴菌伺機性感染。我們挑選黴菌伺機性感染陽性之病童與對照組樣品進行次世代定序 (Next Generation Sequencing , NGS)，分析病患與正常族群口腔真菌菌叢的多樣性以及數量的差異。國內尚未見使用此法研究兒童伺機性黴菌感染。我們將此結果投稿今年 5 月 28 日至 6 月 2 日，於瑞典瑪爾默舉行的歐洲兒科傳染病學會年會 (36th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, ESPID 2018)獲得論文發表的機會，藉此與國際學者專家交流並吸收最新研究知識與趨勢。由於此研究主要為臨床的研究，對於臨床病患的治療較為助益，建議免疫力低損的孩童應有一定的黴菌感染的警覺與預防。

關鍵字

免疫力低損、兒童癌症，黴菌伺機性感染

目 次

目的	4
過程	4
心得	6
建議	7

內文

一、 目的

職於臨床上主要照顧兒童血液腫瘤患者，且本身具有感染與血液症的雙次專執照，平日專精於免疫力低損的感染問題，尤其是侵襲性黴菌方面的感染。兒童癌症病人因化學藥物治療，白血球減少、口腔黏膜受損，使得免疫力低下，所以容易造成黴菌伺機性感染。我們挑選陽性之病童與對照組樣品進行次世代定序 (Next Generation Sequencing , NGS)，分析病患與正常族群口腔真菌菌叢的多樣性以及數量的差異。在 LH-PCR 與 NGS 之分析中，出現 *C. albicans*、*C. dubliniensis* 與 *C. parapsirosis* 之病患檢體數高於對照組。顯示 LH-PCR 和 NGS 可能可以有效評估於兒童癌症病患口腔念珠菌感染。國內尚未見使用此法研究兒童伺機性黴菌感染。我們將此結果投稿今年 5 月 28 日至 6 月 2 日，於瑞典瑪爾默舉行的歐洲兒科傳染病學會年會 (36th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, ESPID 2018)獲得論文發表的機會。藉此與國際學者專家交流並吸收最新研究知識與趨勢。

二、 過程

由於此為綜合性歐洲兒童感染症會議，雖名為歐洲會議，但是仍有來自世界各國的代表與專家，所以包含的主題項目很多，舉凡與兒童感染的議題都有。整個主要的熱門議題為各種病毒感染流行病學與疫苗的研究方向與應用，例如四價流感疫苗施打建議、口服輪狀病毒疫苗的流行病學與效價、亞洲區的新型日本腦炎的疫苗應用與登革熱疫苗的發展等。此行除了論文



的發表外，職也參加一些有興趣的演講如流感於兒童的預防等議題的大會節目，吸收一些國外專家最新的兒童流感的研究與建議(右圖)。整個會議的過程，內容充實與新穎。

我們於會議給予的 5 月 29 日時間，發表電子壁報論文(下頁右圖)。

如同我們之前提出的發表重點：

一、侵襲性黴菌感染是免疫力低損患童的主要死亡原因，而侵襲性黴菌的感染多以口腔與腸道的念珠菌感染為先，因應念珠菌的改變，及檢驗方法日新月異，可應用分子生物技術於臨床黴菌學上。

二、分子技術廣泛地應用於念珠菌之感染檢測，利用分子技術分析黴菌 rRNA 的內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer ,ITS) 序列，具高敏感度、快速及操作簡便等優點。檢測 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 區域所使用之通用引子除了 *Candida*

species，亦可偵測其它黴菌種類。而這些分子技術，例如即時定量 PCR、LH-PCR 和次世代定序 (Next Generation Sequencing , NGS) 等方法可以不需要培養，而直接檢測臨床檢體的黴菌。

三、本研究收集了 30 例血液癌症患兒的口腔沖洗液和 25 例健康對照個案。進行了口

The diversity of fungal colonization over oral cavity in immunocompromised children is diagnosed by the method of next generation sequencing.

Fang-Liang Huang MD, Infectious disease and hematological sections, department of pediatrics, Taichung Veterans General Hospital, Taichung, Taiwan



Introduction:
The oral microbiome, which includes oral candida species, are the most complex and diverse in the human body. Oral fungi such as *Candida* species or non-*Candida* species can either prevent or cause infections. *Candida* species, especially *C. albicans* is the most commonly identified fungus in the oral cavity and is considered a major pathogen of oral candidiasis. So, the oral cavity is a primary target for opportunistic fungal infection in immunocompromised individuals such as patients with hematological cancer. However, several studies indicated that non-*Candida* species could also be pathogenic, causing altered diversity of the oral fungal flora with an increase in resistant species against antifungal agents. The traditional culturing methods for the diagnosis of fungal infection are time consuming and laborious. Instead, molecular genetic analysis of next generation sequencing (NGS) provided a simple and rapid way. Recently, NGS methods surveying 16S rRNA in oral microbial flora have been developed and revealed a vast complexity of species.

Method:
The oral rinse solution from 30 children with hematological cancer under neutropenic status and 25 healthy controls were collected in this study.

DNA extraction from oral rinse was performed. We quantified the fungal populations using real-time PCR of the fungal internal transcribed spacer region in these DNA samples. Sequences obtained from samples were analyzed together. For each sequence, nearest-neighbor species with more than 98% identity were selected as candidates.

Results:
The total number of 9 samples (5 patients and 4 healthy controls) was analyzed by NGS to find out the diversity and abundance of fungal species in these samples. There are 19 different fungal species identified from these specimens including 4 *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*) in the study. These *Candida* species are the predominant fungus in four patients (80%, 4/5) but none of healthy control. The NGS results demonstrated that the abundance of *Candida* species in patients is significantly higher than controls, at least one species among *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*.

Conclusion:
These results suggest that high *Candida* biodiversity might be involved in the pathogenesis of oral candidiasis and NGS may be a useful technique for investigating oral fungal infections.

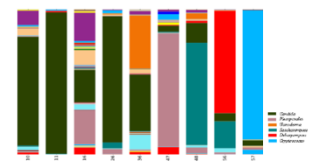
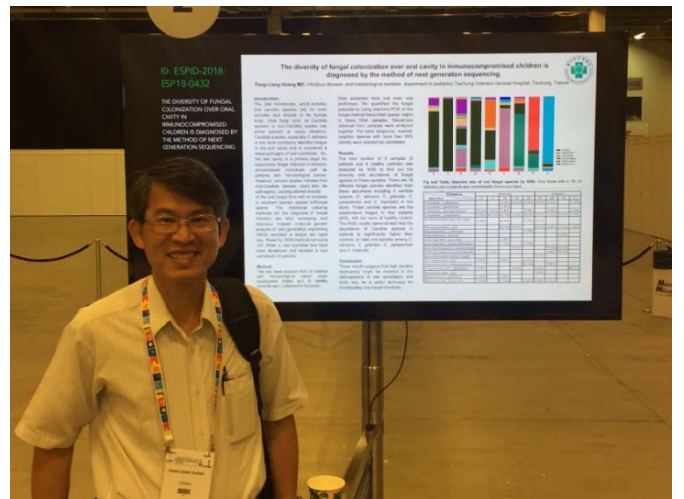


Fig and Table. Detection rate of oral fungal species by NGS. Only those with ≥ 1% of detection rate in patients and control health children are listed.

Species	Patients	Control
<i>Candida albicans</i>	4/5 (80%)	0/4 (0%)
<i>Candida glabrata</i>	1/5 (20%)	0/4 (0%)
<i>Candida parapsilosis</i>	0/5 (0%)	0/4 (0%)
<i>Candida tropicalis</i>	0/5 (0%)	0/4 (0%)
Other species	4/5 (80%)	4/4 (100%)



Presentation | 10A. SCIENCE: FUNGAL INFECTIONS
E-POSTER VIEWING - MAY 28-JUNE 2 - EXHIBITION HOURS



THE DIVERSITY OF FUNGAL COLONIZATION OVER ORAL CAVITY IN IMMUNOCOMPROMISED CHILDREN IS DIAGNOSED BY THE METHOD OF NEXT GENERATION SEQUENCING.

下午6:35-下午9:00 EXHIBITION AREA
週二 5月29日

- Fang-Liang Huang: Speaker
THE DIVERSITY OF FUNGAL COLONIZATION OVER ORAL... >
- e-Poster
THE DIVERSITY OF FUNGAL COLONIZATION OVER ORAL... >
Fang-Liang Huang

腔沖洗的 DNA 提取。在這些 DNA 樣本中，我們用即時 PCR 技術對真菌的內部轉錄間隔區進行定量分析。從樣品中獲得的序列進行分析。對於每個序列，超過 98% 個標識的最近的黴菌種類作為候選個案。

四、共有 9 例(5 名患者和 4 個健康對照)的進行分析，找出這些樣品中真菌種類的多樣性。在研究中從這些標本中發現了 19 種不同的真菌種類，其中包括 4 種主要的念珠菌，呈現出二組不同的表現。

五、結論：這些結果顯示口腔念珠菌生物多樣性可能涉及口腔念珠菌病的發病機制，次世代定序分析方法可以是一個有用的方法來調查口腔真菌感染。

與會學者專家也提出建議與疑問，例如個案數目的較少、患者的免疫力不等等問題，但也肯定此研究，有助於臨床患童的侵襲性黴菌感染的預防方向。

三、心得

很高興有此機會參與兒童國際感染會議，並提出研究的結果並發表，與會期間也參加了其他教育或論文發表的一些節目，由於會議內容項目很多，且皆為同時數個主題在進行，所以只能挑選有興趣的主題參加，儘管如此，仍然覺得收穫很多。對於本身較有研究與興趣的議題，免疫力低損患童的黴菌感染部分，雖然並非兒童感染的主流議題，但也有其他專家的論文發表，並有專家於會場提出看法與意見，增進交流，此為與會的最大收穫。感謝院方長官的支持，讓職有機會參加高水準的國際學術會議，一定對國際視野的提升以及未來學術研究的動力與



方向有所助益。

四、 建議事項（包括改進作法）

- I. 國際會議有助於國際視野提升，以及促進學術研究的動力與方向，職會於部內找尋有興趣的年輕醫師，鼓勵他們多參與，讓年輕醫師也有研究的目標與方向。
- II. 由於此研究主要為臨床的研究，對於臨床病患的治療較為助益，建議免疫力低損的孩童應有一定的黴菌感染的警覺與預防。