

東海大學生命科學系

碩士論文

指導教授: 汪碧涵

Pi-Han Wang

李美芳

Mey-Fann Lee

台灣中部之空氣致過敏真菌菌相調查與血清流行病學  
之研究

Airborne-allergenic fungal spora and seroepidemiology  
in central Taiwan

研究生: 石豐銘

Feng-Ming Shih

中華民國 105 年 08 月



東海大學生命科學系碩士論文

台灣中部之空氣致過敏真菌菌相調查與血清流行病學  
之研究

Airborne-allergenic fungal spora and seroepidemiology  
in central Taiwan

研究生：石豐銘

Feng-Ming Shih

指導教授：汪碧涵

Pi-Han Wang

李美芳

Mey-Fann Lee

中華民國 105 年 08 月

東海大學生命科學系  
碩士論文學位考試審定書

生命科學系碩士班研究生 石豐銘 君所撰寫之論文

(中文)

台灣中部之空氣過敏原真菌菌相調查與血清流行病學

(英文)

Airborne-allergenic fungal spora and seroepidemiology in central Taiwan

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

陳怡均

(簽名)

委員

洪恩涵

李美芳

中華民國 105 年 7 月 21 日

## 誌 謝

本篇論文能夠完成，首先我要感謝的是汪碧涵老師，從我升大三的暑假開始就進入汪老師的實驗室學習，回頭看跟在老師身邊學習也有五年了。真的非常感謝老師對於我的教導，不論是在實驗方面的指導、建議、論文用字遣詞的重要性，或是生活上的幫助，以及待人處事的道理，真的從老師身上學習到很多也受用無窮。我也要感謝另一位李美芳老師，謝謝老師對於分生實驗方面的指導和建議，更感謝老師對於我的耐心和包容。感謝台中榮總陳怡行醫師對於真菌過敏患者參與採樣的招募上提供心力以及受試者過敏期和非過敏期的判斷所提供的專業協助。感謝上述三位老師在百忙之中能夠抽空擔任論文口試委員，提供寶貴意見以及專業指導。

我也要感謝真菌學實驗室的詩菁學姐，對於實驗上連絡患者採樣時間和實驗操作上的幫助、宛柔學姐幫助我解決統計方面的問題、田志仁學長和李東蔚學長指導實驗操作和菌種鑑定。還有微生物免疫學實驗室的沛澎學長，感謝你在實驗忙碌的時候抽空指導我有關分生實驗上的操作，失敗的時候也提供我非常多的建議；感謝姿玫學姐協助進行皮膚試驗和採血。感謝二間實驗室所有的學弟妹們，謝謝你們幫忙我實驗中一些大大小小的事情。謝謝所有參與本論文實驗中的所有受試者，沒有你們的幫助我的論文不會完成。

最後我要感謝我的爸爸、媽媽和弟弟，謝謝你們一直在我背後提供援助，支持我所做的任何決定，讓我無後顧之憂的順利完成學業。  
僅以此篇論文獻給我的老師、家人及所有關心我的人，謝謝。

石豐銘 謹誌於

東海大學 生命科學系研究所

中華民國 105 年 08 月 08 日

## 目 錄

目 錄 .....	1
中文摘要 .....	5
英文摘要 .....	7
第一章 研究背景 .....	9
第一節 過敏疾病簡介 .....	9
第二節 真菌過敏之研究 .....	10
1. 真菌過敏之發現 .....	10
2. 總真菌量與過敏反應 .....	10
3. 致過敏真菌與過敏反應 .....	11
4. 臨床真菌過敏篩檢 .....	13
4.1 皮膚穿刺試驗 (Skin Prick Test, SPT) .....	13
4.2 血清檢驗 .....	14
5. 台灣致過敏真菌研究現況 .....	14
第三節 研究動機與目的 .....	15
第二章 實驗材料和方法 .....	18
第一節 化學藥品與器材 .....	18
1. 一般化學試劑 .....	18
2. 培養基 .....	18

3. 蛋白質電泳相關藥品 .....	18
第二節 重要器材及儀器 .....	18
1. 空氣採集器 .....	18
2. 電泳設備 .....	18
3. 其它器材 .....	19
第三節 真菌過敏患者居家環境中空氣致過敏真菌相調查 ....	19
1. 招募真菌過敏患者 .....	19
2. 真菌過敏患者之過敏期與非過敏期判斷 .....	19
3. 採樣方法 .....	20
4. 真菌孢子濃度計數及菌種鑑定 .....	21
5. 統計分析 .....	22
6. 致敏閾值 .....	22
第四節 七種優勢真菌之血清流行病學研究 .....	22
1. 菌株培養 .....	22
2. 真菌粗蛋白萃取 .....	23
3. 皮膚穿刺實驗 (skin prick test) .....	23
4. 檢體收集 .....	24
5. 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) .....	24
6. 蛋白質電泳分析 .....	25



6.1 聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)	25
6.2 CBR 染色法 (Coomassie brilliant blue stain)	27
6.3 西方墨點法 (Western blotting)	27
第三章 結 果	29
第一節 受試者背景	29
第二節 受試者家中空氣中菌相調查鑑定與優勢菌種	29
第三節 受試者居家環境空氣中真菌的總菌量	30
第四節 受試者居家環境中七種優勢真菌的孢子濃度	30
第五節 致過敏閾值	31
第六節 皮膚穿刺過敏原試驗	32
第七節 臨床篩檢為非真菌過敏患者血清中的 IgE 與七種致 過敏真菌反應之圖譜	33
第八節 以 SDS-PAGE 與免疫轉漬法分析致敏真菌圖譜	34
第四章 討 論	35
第一節 受試者居所空氣中的總真菌量、優勢菌種與過敏的關 係	35
第二節 致過敏閾值	36
第三節 台灣本土真菌過敏原盛行率	39
第四節 商業化套組對台灣本土真菌過敏患者之適用性	40

第五節 <i>Cladosporium cladosporioides</i> 致過敏蛋白圖譜 .....	44
第五章 結 論 .....	46
參考文獻 .....	47
表目錄 .....	59
圖目錄 .....	60
表 .....	62
圖 .....	70
附錄一 .....	79
附錄二 .....	88
附錄三 .....	93
個人資料 .....	96

## 中文摘要

在引起呼吸道過敏症超過 80 屬的真菌中，以鏈格孢屬 (*Alternaria*)、枝孢菌屬 (*Cladosporium*)、麴菌屬 (*Aspergillus*)、青黴菌屬 (*Penicillium*) 和念珠菌屬 (*Candida*) 為臨床重要的致過敏真菌屬。臨床常規以商業化套組檢測患者血清中的 IgE 抗體，做為確診罹患過敏症與檢測過敏原類別的依據，套組採用文獻中各屬最重要的致過敏菌種製做檢驗試劑的抗原；目前台灣診斷真菌過敏及研究真菌過敏盛行率多以商業化套組 ImmunoCAP 為工具。為了解台灣真菌過敏患者的致過敏真菌種類，本研究調查台灣中部真菌過敏患者居家空氣中可能引起過敏的真菌過敏原。經由比較患者過敏期與非過敏期家中的菌相，發現 7 種優勢真菌，其中 6 種並未包含於常規檢測套組中。以 paired-t test 檢定患者過敏期與非過敏期孢子數量，發現尖孢枝孢菌 (*Cladosporium oxysporum* Berk. & M.A. Curtis)、芽枝狀枝孢菌 (*Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries) 與黑麴菌 (*Aspergillus niger* van Tiegh) 在患者過敏期家中空氣裡的孢子量顯著高於非過敏期 ( $p = 0.03$ ,  $p = 0.04$ ,  $p = 0.01$ )。為證明此 7 種真菌為可能致過敏菌種，招募 49 位受試者接受室內空氣中常見過敏原與供試菌之皮膚試驗 (Skin Prick Test, SPT)，結果發現受試者中，有 67% 對常見過敏原呈陽性反應，其受試者中，對真菌呈陽性反應者占 27%，此

盛行率明顯高於臨床常規真菌過敏檢驗的結果 (10%)，推論係目前臨床使用的進口試劑引用菌種與我國致敏菌種不同，產生偽陰性反應，致使未能正確檢測出真菌過敏的患者。以 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 篩選套組檢測真菌過敏陰性反應的過敏患者對 7 種真菌過敏的盛行率，實驗測試真菌粗蛋白質對 100 位 ImmunoCAP 真菌檢驗陰性的過敏患者之血清的過敏原專一性 IgE 反應，結果發現高達 55% 為陽性反應，顯示目前常規使用的商業套組不適國人使用。由本研究結果分析，使用 *C. oxyspoum*、*C. cladosporioides* 和 *Penicillium brevicompactum* 三種菌株即可 100% 檢測出本土真菌過敏患者。這個研究調查了亞熱帶台灣空氣中致過敏真菌菌種及評量我國臨床常規檢測套組的診斷偽陰性比率，提供開發熱帶國家適用的診斷工具之重要依據。

關鍵字：空氣孢子、真菌過敏、過敏原、偽陰性、酵素免疫聯結法、盛行率

## 英文摘要

There are more than eighty fungal genera that cause respiratory allergies. Among these genera, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Candida* are the most common allergenic genera in clinical reports. The routine commercial kits are used to detect IgE antibodies in patients' sera for diagnosing patients' allergens. The most important allergenic fungal species of each genus in the clinical reports are used as target species in the kits. Commercial kits ImmunoCAP are used as the major tools for diagnosing fungal allergy and studying allergenic fungi prevalence in Taiwan. In order to clarify which species the population of Taiwan is allergic to, my study investigates the airborne fungal spora in patients' homes in central Taiwan. Comparing the air spora in patients' allergic periods with non-allergic periods, I found seven dominant fungal species; six of them were not included in the kits. *Cladosporium oxysporum* (Berk. & M.A. Curtis), *Cladosporium cladosporioides* ([Fresen.] G.A. de Vries), and *Aspergillus niger* (van Tiegh) were significantly higher in spore concentration during patients' active stage than in their inactive stage by paired- t test with  $p$  values = 0.03, 0.04, 0.01 respectively. To prove these seven species of fungi were the allergens, forty-nine subjects were recruited for the skin prick test (SPT) with common indoor allergens and seven tested fungi. The data showed that 67% of subjects had positive reactions to common indoor allergens, and 27% of these were allergic to fungi higher than testing with the kits by about 10%. It is inferred that the difference in results from the skin prick test and the imported ImmunoCAP kits is

because the kits differ in target species selection and detection ability. Therefore, I used Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to investigate the prevalence of seven fungal allergens in screening 100 non-fungal allergic patients diagnosed by ImmunoCAP; 55% of them showed positive reactions, which means that the routine commercial kits are not suitable for sufficient testing in Taiwan. Furthermore, the results also showed that the local patients' fungal allergies can be 100% detected using *C. oxysporm*, *C. cladosporioides*, and *Penicillium brevicompactum* as target species. By doing this study, I provided accurate environmental allergenic fungal species and evaluated the false negative prevalence in diagnoses by routinely used antibody detection kits in Taiwan; this knowledge will provide an important foundation for development of a diagnosis kit that is more suitable for Taiwan.

Keywords : airborne fungi spore, fungal allergic, allergen, false-negative, ELISA, prevalence

## 第一章 研究背景

### 第一節 過敏疾病簡介

過敏 (allergy) 指個體對外來無害物質產生過度的免疫反應，所引起組織或器官發炎的疾病。此概念 1906 年由維也納小兒科醫師 von Pirquet 提出，他觀察接種馬血清或天花疫苗的病人，在第二次施打時出現更快速、不良的反應，將此現象稱為 allergy，該詞源於希臘文 allos (other) 和 ergon (work)，意指不正常的反應。

全世界有超過 30% 的人口受到各種過敏疾病的影響，是已開發國家中最常見的疾病，也是重要的健康問題 (Singh and Shahi 2008)。臨床醫師或患者所稱過敏疾病，多指第 I 型由 IgE 抗體媒介之立即型過敏反應。患者通常在接觸過敏原後三十分鐘內引起症狀，如哮喘、打噴嚏、眼睛紅腫、蕁麻疹等。症狀種類與嚴重程度依過敏原之免疫特性、進入人體途徑及暴露量而有所不同。臨床診斷上，除患者過敏病史外，可使用過敏原皮膚穿刺試驗或檢測血液中過敏原專一性免疫球蛋白 E (allergen-specific IgE) 確診 (Scolozzi et al. 1989)。

過敏原指引起過敏反應的環境物質，多數為蛋白質。暴露路徑可分為四大類，(一) 吸入性過敏原：花粉、塵蟎、真菌及動物毛髮等，(二) 食入性過敏原：蝦子、花生及藥物等，(三) 注入性過敏原：蜜蜂叮咬和藥物注射等，以及 (四) 接觸性過敏原：有毒植物和乳膠等。

其中，敏感族群最難避免的風險因子為吸入性過敏原，患者暴露在特定空氣過敏原之中，直接由呼吸道吸入，造成患者產生持續性的過敏反應 (Gold 2000, von Mutius 2000, Sircar et al. 2012)。

## 第二節 真菌過敏之研究

### 1. 真菌過敏之發現

早於 von Pirquet 在 1906 年提出過敏的概念時，真菌就被認為是導致呼吸不良症狀的潛在因素。1726 年 Floyer 首次報導一位患者去發酵中的酒窖後，發生嚴重氣喘；約 1.5 世紀後，Blackley 於 1873 年描述患者吸入 *Penicillium glaucum* 孢子後引發胸悶及支氣管黏膜炎；1924 年，van Leeuwen 提出吸入真菌孢子可能會導致氣喘。(Twaroch et al. 2015)

真菌普遍存在於環境中，動物、植物、土壤及人類的活動都是空氣中真菌的主要來源 (Li and Kendrick 1994)，其孢子無時無刻存在大氣中，佔空氣中生物顆粒最大的比例 (D'Amato and Spiekma 1995, Lacey 1996)，濃度通常遠高於其它顆粒，甚至高於花粉粒的濃度 (Hamilton 1963, Horner et al. 1995)。

### 2. 總真菌量與過敏反應

真菌通常引起第 I 型的過敏反應，由 IgE 所調控，其症狀包括氣喘、鼻炎、過敏性支氣管炎及過敏性肺炎 (Burge 1989, Terr 2004,



Wiszniewska et al. 2009, Hamilos 2010), 占呼吸道過敏反應的 20 - 30% (Wüthrich 1989, Cole and Hoch 1991, Chowdary et al. 2011)。

大氣中真菌過敏原的濃度可能與氣喘症狀惡化有關 (Wüthrich 1989, Cole and Hoch 1991, Pongracic et al. 2010, Chakrabarti et al. 2012), 真菌孢子濃度增加, 會使患者肺功能降低、感冒增加、呼吸急促, 產生哮喘等呼吸道問題和慢性肺病 (Hargreaves et al. 2003)。紐奧良地區空氣中孢子濃度與季節性氣喘發作有相關性 (Salvaggio and Aukrust 1981)。室內空氣與灰塵中的真菌與呼吸道過敏發生有關 (Flannigan et al. 1991, Verhoeff and Burge 1997, Cvetnić and Pepeljnjak 2001), 哈佛大學調查 4,600 位兒童居家環境發現, 兒童呼吸道問題與家中真菌及潮濕有關 (Brunekreef et al. 1989), 顯示居住在有潮濕問題的建築物中, 民眾常有氣喘或呼吸道問題, 可能與室內真菌孢子的暴露有關。家中真菌過敏原濃度與受試者氣喘就診的次數有關 (Cakmak et al. 2002)。然而, 有關總真菌量與患者過敏的研究中, 也有報告指出總真菌量與患者過敏並無顯著相關, 真菌孢子濃度與室內潮濕、霉味指數無顯著相關 (Hamilos 2010)。

### 3. 致過敏真菌與過敏反應

已知的 100,000 種真菌中 (Prillinger et al. 2002), 有 40,000 餘種 (宋等人, 2000), 藉空氣傳播, 其中只有數百種被描述為伺機性病原

菌 (Horner et al. 1995)，這些伺機性病原真菌中，約有 80 屬是引起敏感族群第 I 型過敏的過敏原 (Simon-Nobbe et al. 2008)。常見與過敏反應相關的菌屬有 *Alternaria*、*Aspergillus*、*Aureobasidium*、*Botrytis*、*Candida*、*Cephalosporium*、*Cladosporium*、*Curvularia*、*Drechslera*、*Epicoccum*、*Fusarium*、*Gliocladium*、*Helminthosporium*、*Paecilomyces*、*Penicillium*、*Phoma*、*Scopulariopsis*、*Stachybotrys*、*Trichoderma*、*Trichophyton*、*Trichothecium*、*Ulocladium*、*Saccharomyces* 及 *Stemphylium* (Kurup et al. 2000)。其中最重要的致過敏真菌屬為 *Alternaria*、*Cladosporium* 和 *Aspergillus*，其次為 *Penicillium* 和 *Candida* (Yunginger et al. 1980, Beaumont et al. 1985, Brunekreef et al. 1989, Mari et al. 2003, Cramer et al. 2006)。對於致過敏真菌蛋白研究，目前世界衛生組織與國際免疫學會聯盟的過敏原命名委員會 (World Health Organization and International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee, [www.allergen.org](http://www.allergen.org)) 收錄 16 屬 29 物種共 111 種真菌過敏原。

美國最常引起過敏的真菌是 *Alternaria alternata*，空氣中孢子濃度大於或等於 100 spores/m<sup>3</sup> 就會引起過敏症狀 (Blackley 1873, Yunginger et al. 1980)，*A. alternata* 為重要致過敏菌種，其主要過敏原為 Alt a 1 (Paris et al. 1991)。*Cladosporium* 孢子濃度大於 3,000 spores/m<sup>3</sup> 會引起過敏反應 (Blackley 1873, D'Amato and Spiekma

1995, Lacey 1996)，其中 *C. herbarum* 是環境中常見真菌，其主要過敏原為 Cla h 1 和 Cla h 2，引發過敏性鼻炎及氣喘 (Kurup et al. 2000)。當 *Aspergillus* 在灰塵中劑量大於 25,000 CFU/g 時會增加過敏的風險 (Jacob et al. 2002)，*Aspergillus fumigatus* 為重要致過敏真菌 (Kurup et al. 2000)。

#### 4. 臨床真菌過敏篩檢

臨床真菌過敏診斷，除查閱患者過敏病史外，給予患者施行皮膚穿刺測試或檢驗血液中引起過敏之專一性免疫球蛋白 E (allergen-specific IgE)，可證實是否對真菌過敏。

##### 4.1 皮膚穿刺試驗 (Skin Prick Test, SPT)

表皮上皮膚試驗是臨床上常規檢視 IgE-mediated 立即型過敏反應的 gold-standard 做法。臨床常用檢測真菌過敏菌種包括 *Alternaria alternata*、*Aspergillus fumigatus*、*Candida albicans*、*Cladosporium herbarum*、*Penicillium notatum* 等真菌萃取物。檢測方法以細針沾取過敏原後，輕戳前臂皮膚約 2 mm 深，20 - 40 分鐘後檢測部位會有局部的膨疹反應，之後測量皮膚膨疹 (wheal) 及紅暈 (flare) 範圍直徑與陰性控制組 (saline) 比對，較大判斷為有反應，相同或較小為無反應，反應程度分級依照皮膚膨疹和紅暈大小與正控制組 (histamine) 比對 (Dreborg 1989)。皮膚試驗具有潛在危險性，嚴

重過敏病患不宜使用，可能導致過敏性休克等情況。

## 4.2 血清檢驗

過敏體質患者血液中過敏原專一性 IgE 含量比一般非過敏的人高，血液中 IgE 含量檢測可判斷是否過敏。商品化血清檢驗系統中，台灣臨床檢驗採用較普遍且準確的過敏原專一性 IgE 檢測系統為 ImmunoCAP system (Phadia AB, Thermo fisher, USA)。ImmunoCAP 系統套組中，最常使用於檢測真菌過敏的套組是混合六種過敏原的 Mx2，包含 m1 (*Penicillium notatum*)、m2 (*Cladosporium herbarum*)、m3 (*Aspergillus fumigatus*)、m5 (*Candida albicans*)、m6 (*Alternaria alternata*)、m8 (*Helminthosporium halodes*) 等六種真菌萃取物混合，亦有六種單項過敏原可供使用。ImmunoCAP 可定量血清中特異性 IgE，濃度單位以 KU/L 表示，檢驗項目值大於 0.35 KU/L 為陽性，低於 0.35 KU/L 為陰性。

## 5. 台灣致過敏真菌研究現況

真菌過敏患者占全球總人口 3% - 10% (Twaroch et al. 2015)，佔全球呼吸道過敏疾病及過敏性皮炎患者的 10% - 80% (Bush et al. 2006, Beezhold et al. 2008, Simon-Nobbe et al. 2008, Chang et al. 2011)。在台灣，約有 10% 氣喘病人 (Tsai and Chen 1999) 與 1.3% - 9.3% 過敏性鼻炎患者對真菌過敏 (Tsai and Chen 1999, Huang et al. 2006, Liang et

al. 2006)。Su 等人的研究發現台灣空氣中優勢真菌孢子為 *Cladosporium*、*Aspergillus*、*Penicillium* 及 *Alternaria* 屬真菌 (Su et al. 2001)，認為我國民眾的真菌性過敏與上述優勢菌屬孢子有關。Shen 及 Chou 等人發表多篇有關台灣空氣中所分離真菌之致過敏蛋白質分析的論文，包括 *Aspergillus flavus* (Chou et al. 1999)，*A. fumigatus* (Shen et al. 2001a)，*A. oryzae* (Shen et al. 1998)，*Cladosporium cladosporioides* (Chou et al. 2008)，*Penicillium chrysogenum* (Tai et al. 2010)，*P. citrinum* (Shen et al. 1997)，*P. notatum* (Shen et al. 1991)，*P. oxalicum* (Shen et al. 2001b)，*Fusarium proliferatum* (Chou et al. 2014)，*Rhodotorula mucilaginosa* (Chou et al. 2005)。上述研究均由生物資源保存及研究中心所購本土菌株作為研究材料，缺乏真菌過敏患者於居家環境直接暴露的證據支持患者過敏症狀的產生與真菌菌種之間的關連。

### 第三節 研究動機與目的

真菌過敏的研究多數著重於潮濕或總真菌量 (Mendell et al. 2011)，但有證據顯示空氣中過敏原的濃度未必與總孢子量相關，而是與特定真菌濃度及孢子萌發狀態有關 (Barnes et al. 2000, Brito et al. 2012)，釐清本土真菌致過敏菌種有其重要性。然而，在分子過敏學的領域或其它關於吸入性過敏原研究的回顧文章中，真菌過敏原經常

被忽視 (Cramer et al. 2006, Custovic and Simpson 2012)。

真菌過敏的盛行率研究，大多由醫療院所採用商業化套組檢測所獲，國際使用率較高的商業化套組品牌為瑞典 Phadia AB 公司開發生產的 ImmunoCAP，檢測患者血清中的對於不同標的真菌的特異性 IgE 抗體，以 *Cladosporium herbarum* 為最常使用的標的菌種 (Kespohl et al. 2013)。台灣亦採用此商業化套組檢測真菌過敏與調查盛行率，國泰綜合醫院與台北榮民總醫院調查發現氣喘患者對 *Penicillium notatum* 和 *C. herbarum* 過敏盛行率分別為 10% (Tsai and Chen 1999) 和 6.6% (Chiang et al. 2005)。然而台灣空氣中並未有套組檢驗所用之 *C. herbarum* 的記錄 (陳與劉 1997, Su et al. 2001, Wu et al. 2007)，誘發我國患者過敏反應菌種需要釐清。

本研究首先以臨床確診為真菌過敏患者為研究對象，經由比較患者過敏期與非過敏期居所空氣中的菌相，了解居家環境空氣中的菌相變化與致過敏真菌分佈。其次，以血清流行病學方法研究居所中發現的真菌是否為引起患者過敏之過敏原，及其盛行率。最後以臨床套組診斷為非真菌過敏患者之血清為目標，確認其對於台灣本土真菌過敏原是否有陽性反應，藉以了解真菌商業化 ImmunoCAP 套組對台灣本土真菌過敏患者的適用性。

本研究目的為調查亞熱帶台灣環境中致過敏真菌菌種及評量我

國臨床常規檢測套組的診斷偽陰性比率，以提供開發熱帶國家適用的  
診斷工具之重要依據。

## 第二章 實驗材料和方法

### 第一節 化學藥品與器材

#### 1. 一般化學試劑

藥品購自 Sigma 與 Merck 公司。

#### 2. 培養基

PDA 與 Czapek-Dox broth 購自 BD Pharmingen 公司。

#### 3. 蛋白質電泳相關藥品

(1) pre-stained protein markers 購自 Fermentas。

(2) CBR、TEMED、 $\beta$ -mercaptoethanol、SDS、APS、

N-N-methylenediacrylamide (Bis) 購自 Bio-Rad 公司。

(3) 西方墨點法分析二次抗體：Anti-human IgE 購自

BD Pharmingen 公司。

(4) 轉漬膜：0.45  $\mu$ m PVDF membrane 購自 Millipore (USA)。

### 第二節 重要器材及儀器

1. 空氣採集器：科氏力快速生物氣膠採樣系統 (Coriolis<sup>®</sup>  $\mu$  型, Bertin 公司, 法國)。

#### 2. 電泳設備：

(1) 蛋白質電泳：採用 Hoefer 蛋白質電泳系統。

(2) 電泳轉印槽：採用 Bio-Rad semi-dry。



### 3. 其它器材

- (1) 解剖顯微鏡：Nikon SMZ800。
- (2) 光學顯微鏡：Nikon ECLPSE80i。
- (3) 血球計數器：Bright-Line, Marienfeld。
- (3) 電源供應器：Bio-Rad 300。
- (4) 酵素免疫分析儀：Sunrise。
- (5) pH meter：JENCO electronic。

### 第三節 真菌過敏患者居家環境中空氣致過敏真菌相調查

#### 1. 招募真菌過敏患者

本研究共招募年滿 20 歲 10 位真菌過敏患者與 2 位非真菌過敏患者。上述患者皆為定期接受台中榮總免疫風濕科診治，並接受 ImmunoCAP System™ (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 檢測混合真菌過敏原 (Mx2) 特異性免疫球蛋白 E (Immuno globuling E, IgE) 血清檢驗，正反應檢驗值大於 0.35 KU/L。本研究依法獲得台中榮總人體試驗委員會 (Institutional Review Board, IRB) 核可 (IRB No：CE11245)。

#### 2. 真菌過敏患者之過敏期與非過敏期判斷

患者過敏符合全球氣喘創議組織 (Global Initiative for Asthma,

GINA) 2006 年版之氣喘診斷要件 (<http://www.ginasthma.org>) 及過敏性鼻炎對氣喘的影響創議組織 (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma, ARIA) 之過敏性鼻炎診斷要件 (WHO et al. 2007)，過敏期與非過敏期由台中榮民總醫院免疫風濕科陳怡行醫師判斷。患者自身與醫師對過敏徵狀總體評分減少超過自身最佳值 50% 以上時，即判斷為過敏症狀惡化和患者正處於過敏期；患者自身與醫師總體評分維持自身最佳值超過三個月，則認為患者處於非過敏期。

### 3. 採樣方法

參照我國環境保護署所公告「室內空氣中總真菌數檢測方法」(NIEA E401.11C，附錄一) 執行採樣。以高流量 (100 - 300 L/min) 生物氣膠採樣器科氏力快速生物氣膠採樣系統 (Coriolis<sup>®</sup>  $\mu$  型，Bertin 公司，法國)，收集空氣中的生物氣膠。採樣前，先進行訪談與居所觀察，將受試者長時間所處之空間 (客廳、房間)，列為優先採集地點，其次為抱怨引起不適的房間。採樣器放置於房間中央，距離地面 120 至 150 公分，距離牆壁或角落至少 50 公分以上。採集前以 70% 酒精擦拭清潔採集器的進氣口與採樣瓶連接口，經滅菌處理的無菌採樣瓶中加入 7.5 ml 緩衝液 (0.005% Triton-X100) 後組裝收集樣本，空氣流速定在 300 L/min，收集 30 分鐘，共收集 9 立方公尺空氣中的懸浮微粒。採集過程中，每隔 10 分鐘補足緩衝液。採集時，人員避免在

進氣口附近走動。所獲樣品冷藏送回實驗室。

#### 4. 真菌孢子濃度計數及菌種鑑定

採集之 7.5 ml 孢子懸浮液以 13,000 rpm 離心濃縮至 1 ml 後，以兩種方式計數總孢子量與優勢菌濃度。一、直接計數 (direct count)：取 10  $\mu$ l 均勻懸浮的濃縮樣液至血球計數器 (Counting chamber, Marienfeld, Germany) 上，以光學顯微鏡計數總孢子濃度，每個樣本計算三重複。二、活性計數 (viable count)：取 20  $\mu$ l 均勻懸浮的濃縮樣液以 0.005% Triton-X100 稀釋 10 倍，將樣液與 10 倍稀釋液分別取 50  $\mu$ l 塗盤至 1/2 馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA, Difco, USA)，每濃度各三重複，在室溫下培養 3–5 天，計數總菌落數及優勢菌種菌落數。依據顯微形態特徵 (Tzean et al.1990, Tzean et al. 1994, 曾等人, 2009) 以及 rDNA ITS 序列鑑定菌種。選用 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') 及 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White et al., 1990) 引子對，參考 Wang 等人 (2003) 的方法進行 PCR 增量複製菌絲 rDNA 的 ITS 區域。將增幅後的 PCR 產物定序 (明欣生物科技公司，台北)。rDNA 核酸序列利用 NCBI 網站提供的 BLAST 功能，與 GenBank 內的核酸序列資料庫比對，以獲得物種資料。

## 5. 統計分析

以 logistic regression 方法分析總孢子量與患者過敏之間的相關性，以 paired-T test 分析優勢菌種在目標患者過敏期之孢子量是否顯著高於非過敏期， $p$  值小於 0.05 為統計上有顯著差異。各分析均以 R 統計軟體 (R version 3.1.2, The Foundation for Statistical Computing) 進行。

## 6. 致敏閾值

以 ImmunoCAP 檢測血清對特定真菌之 IgE 為陽性反應的目標菌過敏患者，其真菌孢子致過敏濃度閾值應高於非過敏期家中該菌的最高濃度，微生物族群量以 log 值等級比較，推測致過敏閾值。

### 第四節 七種優勢真菌之血清流行病學研究

比較患者過敏期與非過敏期家中的菌相，發現七種真菌可能為致患者過敏的真菌，其中六種並非常規檢測套組 (ImmunoCAP) 採用檢測菌種。為證明此七種真菌為可能致過敏菌種，進行以下血清流行病學研究。

#### 1. 菌株培養

七種真菌先以馬鈴薯葡萄糖瓊指培養基在 25°C 下培養 7 天後，接種至察氏液態培養基 (Czapek-Dox broth) 的錐形瓶，內含 8.75 克

Czapek-Dox broth、1.25 克酵母抽出物 (yeast extract)、0.25 克磷酸二氫鉀 ( $K_2HPO_4$ ) 和 7.5 克蔗糖 (sucrose)，在 25°C 下靜置培養 14 天 (Chou et al. 2008)。

## 2. 真菌粗蛋白萃取

將培養 14 天後菌絲團取出，以無菌水沖洗殘餘培養液後吸乾，加入液態氮以研鉢研磨至粉狀，依比重 1g : 5 ml 比例加入 PBS 緩衝液 (內含 protease inhibitor cocktail, biotool.com) 後，分裝 1 ml 至 2 ml 的離心管中，加入 2 顆 5 mm 鋼珠，4°C 下以 3,000 rpm 震盪以打破細胞，各菌種所需震盪時間不同，*Cladosporium oxysporum* 30 分鐘；*C. cladosporioides* 3 分鐘；*Aspergillus niger* 5 分鐘；*A. flavus* 10 分鐘；*A. fumigatus* 5 分鐘；*Penicillium oxalicum* 10 分鐘；*P. brevicompactum* 5 分鐘。震盪後以 12,500 rpm 在 4°C 下離心 30 分鐘，去除細胞碎片，吸取含蛋白質之上清液，以 Bradford method 測定蛋白濃度後，保存於 -70°C，供日後實驗所用。

## 3. 皮膚穿刺實驗 (skin prick test)

為確認七種優勢真菌為致過敏真菌及探討其盛行率，本研究隨機招募受試者進行皮膚穿刺實驗。檢測內容包含七種供試真菌和室內空氣主要過敏原塵蟎和美國蟑螂。檢測方法以細針沾取過敏原後，輕戳

前臂皮膚約 2 mm 深，20 分鐘內檢測部位會有局部的發炎反應，測量皮膚膨疹 (wheal) 及紅暈 (flare) 範圍直徑與陰性控制組 (saline) 比對，較大判斷為有反應，相同或較小為無反應。反應程度依照皮膚紅腫和紅斑大小與正控制組 (histamine) 比對分級。紅暈直徑小於正控制組的 1/2 為 1<sup>+</sup>；相當為 2<sup>+</sup>；大於為 3<sup>+</sup>；大於並有膨疹為 4<sup>+</sup> (Dreborg, 1989)。

#### 4. 檢體收集

本研究自行招募為皮膚穿刺試驗之受試者，於檢測後在其同意之下採集血液。血液採集後置於室溫 1 小時，待凝血後，以 420×g 離心 20 分鐘，取上層血清至 15 ml 離心管，置於 -20°C 保存。

收集臨床有過敏症狀，但 ImmunoCAP 檢驗各項檢驗項目數值小於 0.35 KU/L 之患者剩餘檢體共 100 支。

#### 5. 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA)

為了解 ImmunoCAP 套組在臨床上篩檢本土真菌過敏患者的適用性，本實驗測試 Mx2 檢驗為陰性反應的 100 位過敏患者血清中是否有本研究篩選出的七種本土優勢真菌的 IgE 抗體，及 Mx2 檢測我國患者偽陰性的比例，實驗係以七種優勢真菌之蛋白萃取物進行 ELISA 檢測。在 96 孔盤中加入 100 μl 真菌粗蛋白，使其總量為 1

µg/well, 37°C 培養 2 小時後，以 1% BSA 在室溫下靜置處理 2 小時以去除非專一性結合，加入 100 µl 10 倍稀釋之受試者血清，4°C 隔夜處理後，加入二級抗體 (alkaline phosphatase-labeled mouse anti-human IgE 1 : 1,000) 室溫下培養 2 小時，加入呈色劑 para-Nitrophenylphosphate 室溫下呈色 60 分鐘後，以 ELISA 分析儀 (Tecan, Austria) 偵測 405 nm 波長的吸收光，並以波長 595 nm 作為背景值。ELISA 分析結果，是以對照組 10 位皮膚穿刺實驗反應為全陰性者之 OD 值之平均值 + 2 個標準差 (cut-off value = mean + 2SD) 界定陽性或陰性反應。

## 6. 蛋白質電泳分析

### 6.1 聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)

#### (1) 分離膠體配置 (separating gel)

##### Separating gel-12%

ddH <sub>2</sub> O	3.35	ml
30% acrylamide / bis (29 : 1)	4	ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5	ml
10% SDS	50	µl
10% APS	100	µl
TEMED	10	µl

上述液體混合後加入鑄膠台，再緩緩加入 ddH<sub>2</sub>O 於凝膠上方，靜置 30 分鐘待交界面形成後，倒掉 ddH<sub>2</sub>O，繼續製作焦集膠體。

## (2) 焦集膠體配置 (Stacking gel)

### Stacking gel-4%

ddH <sub>2</sub> O	3	ml
30% acrylamide / bis (29 : 1)	0.65	ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25	ml
10% SDS	50	μl
10% APS	50	μl
TEMED	10	μl

混合上述溶液後加入已凝固之分離膠體上後，插入梳狀模板於凝膠上方，待凝固後取下模板，完成製作。

## (3) 電泳緩衝液製備

取 3.05 g Trizma base、14.4 g 甘胺酸 (glycine) 和 1 g SDS 後加入 ddH<sub>2</sub>O 至總體積 1 公升，為含有 25 mM Tris-HCl，192 mM glycine，0.1% SDS 之電泳緩衝液。

## (4) 電泳條件

將製作完成之 SDS-PAGE 安裝於直立式電泳槽後，加入電泳緩衝液及樣本，利用低溫循環水浴槽 (Firstek<sup>TM</sup>) 控制恆溫 12°C，先以



15 mA 電流進行上膠電泳 40 分鐘後，改以 30 mA 電流進行下膠電泳 30 分鐘。待指示劑移至膠體底部即完成電泳。膠體可直接進行染色或進行西方墨點法分析。

## 6.2 CBR 染色法 (Coomassie brilliant blue stain)

將膠體放入染色液 (0.1% Coomassie Blue R-250、10% acetic acid、40% methanol) 中染色 45 分鐘後，將膠體移入退染液 (10% acetic acid、40% methanol) 退染至背景接近透明。此方法為最常用的蛋白質染色法。

## 6.3 西方墨點法 (Western blotting)

欲檢測之蛋白質先以 SDS-PAGE 進行電泳分離，完成後將膠體浸於 Towbin buffer 中 15 分鐘，同時準備四張 8 × 5.5 公分和二張 9 × 6 公分濾紙一同浸於 Transfer buffer 中，轉漬用 Polyvinylidene Fluoride membrane (PVDF membrane) 8 × 5.5 公分一張浸於 methanol 中 1 分鐘。依序將二張大濾紙、二張小濾紙、PVDF membrane、蛋白質膠體、二張小濾紙放入半乾式轉漬器 (Bio-Rad) 中疊起，小心趕走氣泡，外接電源控制器設定 20 伏特，轉漬 27 分鐘。完成後膠體以 CBR 染色，PVDF membrane 置入 1% 脫脂牛奶，室溫下震盪 2 小時進行 blocking 以除去抗體非專一性結合；之後再以 PBST 浸泡 10 分鐘，

洗除脫脂牛奶，重複三次；加入一級抗體（患者血清稀釋比例 serum : PBST = 1 : 10），置於 4°C 反應 16 - 18 小時。完成後以 PBST 浸泡 10 分鐘，洗除未結合抗體，重複三次；加入以 PBST 稀釋 1,000 倍的 AKP anti-human IgE (BD PharmingenTW) 於室溫下反應 2 小時；以 PBST 浸泡 10 分鐘共三次後，加入 BCIP/NBT/AP 呈色劑，避光反應約 12 分鐘，以 ddH<sub>2</sub>O 沖洗去除呈色劑，避光乾燥使呈色完全。

#### Transfer buffer

Trizma base	5.82	g
Glycine	2.93	g
10% SDS	3.75	ml
Methanol	200	ml
加 ddH <sub>2</sub> O 至	1,000	ml

#### Towbin buffer

Trizma base	3.03	g
Glycine	14.4	g
Methanol	200	ml
加 ddH <sub>2</sub> O 至	1,000	ml

### 第三章 結 果

#### 第一節 受試者背景 (表一)

本研究依法獲台中榮總人體試驗委員會核可，於臨床門診共招募 12 位受試者，其中 10 位為真菌過敏患者，2 位為對照組患者。10 位患者中，4 號、5 號及 10 號受試者為非呼吸道過敏患者。10 位真菌過敏患者接受 Mx2 的六種混合真菌過敏原特異性免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 檢驗值皆大於 0.35 KU/L。根據 ImmunoCAP 個別菌種測試，9 位患者對 m1 (*Penicillium notatum*) 過敏；7 位患者對 m2 (*Cladosporium herbarum*) 過敏；8 位患者對 m3 (*Aspergillus fumigatus*) 過敏；9 位患者對 m5 (*Candida albicans*) 過敏；5 位患者對 m6 (*Alternaria alternata*) 過敏。其中 P4, P7, P9 和 P10 對全部六種真菌過敏原過敏。

#### 第二節 受試者家中空氣中菌相調查鑑定與優勢菌種

本研究調查 12 位受試者家中空氣真菌相，依據顯微形態特徵 (附錄二) 及 rDNA ITS 序列 (附錄三) 鑑定菌種，有七種優勢真菌 (圖一)，分別為尖孢枝孢菌 (*Cladosporium oxysporum* Berk. & M.A. Curtis)，芽枝狀枝孢菌 (*Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries)，黃麴霉 (*Aspergillus flavus* Link)，黑麴霉 (*Aspergillus niger* van Tieghem)，煙麴霉 (*Aspergillus fumigates* Fresenius)，草酸青黴

(*Penicillium oxalicum* Currie & Thom) 和短密青黴 (*Penicillium brevicompactum* Dierckx)。

### 第三節 受試者居家環境空氣中真菌的總菌量 (圖二)

受試者過敏期居家環境中的總真菌量，以直接計數和活性計數估算分別為  $3.2 - 451 \times 10^3$  spores/m<sup>3</sup> 和  $34 - 1,014$  CFU/m<sup>3</sup>；非過敏期分別為  $1.9 - 28 \times 10^3$  spores/m<sup>3</sup> 和  $10 - 446$  CFU/m<sup>3</sup>。兩種調查方式獲得不同的總真菌量，直接計數計算可見的孢子量，但是無法區別孢子的存活狀態；活性計數獲得可培養之孢子量。

由以上結果可看出受試者過敏期居所的平均總真菌量，無論以直接計數或活性計數皆高於非過敏期；但以 logistic regression 分析結果顯示，過敏症狀的惡化與以直接計數 ( $p = 0.23$ ) 和活性計數 ( $p = 0.232$ ) 兩種方法估算的總真菌量無顯著相關。

### 第四節 受試者居家環境中七種優勢真菌的孢子濃度

表二為 12 位受試者過敏期與非過敏期居所空氣中七種優勢真菌的孢子量。比較目標菌過敏患者過敏症狀的發生與菌量的關係，可以看出 *C. oxysporum* 平均孢子濃度在目標菌過敏患者 (P1, P2, P4, P6, P7, P9, P10) 之過敏期為  $8.7 - 620.6$  CFU/m<sup>3</sup>；非過敏期為  $0.9 - 88.3$  CFU/m<sup>3</sup>。*C. cladosporioides* 平均孢子濃度在目標菌過敏

患者之過敏期為 0.9 - 157.3 CFU/m<sup>3</sup>；非過敏期為未測得至 26.2 CFU/m<sup>3</sup>。 *C. oxysporum* 和 *C. cladosporioides* 分析結果，二者孢子濃度在目標菌過敏患者過敏期皆顯著高於非過敏期 ( $p = 0.03$ ,  $p = 0.04$ ) (圖三)。*P. brevicompactum* 平均孢子濃度在目標菌過敏患者 (除 P3 外的 9 位) 之過敏期為未測得至 26.2 CFU/m<sup>3</sup>；非過敏期為未測得至 17.5 CFU/m<sup>3</sup>。*P. oxalicum* 平均孢子濃度在目標菌過敏患者之過敏期為未測得至 35 CFU/m<sup>3</sup>；非過敏期為未測得至 26.2 CFU/m<sup>3</sup>。*P. brevicompactum* 和 *P. oxalicum* 二者孢子濃度在目標菌過敏患者過敏期和非過敏期並無顯著差異 ( $p = 0.055$ ,  $p = 0.13$ ) (圖四)。*A. niger* 孢子濃度在目標菌過敏患者過敏期皆顯著高於非過敏期 ( $p = 0.02$ )；平均孢子濃度在目標菌過敏患者 (P1, P2, P3, P4, P6, P7, P9, P10) 之過敏期為未測得至 35 CFU/m<sup>3</sup>；非過敏期為未測得至 12.2 CFU/m<sup>3</sup>。*A. falvus* 和 *A. fumigatus* 平均孢子濃度在目標菌過敏患者之過敏期分別為未測得至 17.5 CFU/m<sup>3</sup> 和未測得至 15.7 CFU/m<sup>3</sup>；非過敏期分別為未測得至 3.5 CFU/m<sup>3</sup> 和未測得至 7 CFU/m<sup>3</sup> (圖五)。由於 *A. falvus* 和 *A. fumigatus* 在只在 1 和 2 位目標患者家中測得，因此無法進行統計分析。

### 第五節 致過敏閾值

過敏患者對目標真菌的致過敏閾值應高於該菌在所有患者非過

敏期居所的最高值。7 位 m2 (*Cladosporium herbarum*) 目標患者居所中，非過敏期出現 *C. oxysporum* 最高濃度的為 P6 患者家中的 88.3 CFU/m<sup>3</sup>。因此，將 *C. oxysporum* 誘發過敏之孢子量閾值定為 100 CFU/m<sup>3</sup>。m3 (*Aspergillus fumigatus*) 目標患者中，只有 P9 患者過敏期時家中 *Cladosporium* 屬二種孢子量低於致過敏閾值，過敏症狀應由 *A. niger* 引起，致過敏閾值為 10 CFU/m<sup>3</sup>。*P. brevicompactum* 亦為 10 CFU/m<sup>3</sup>。

#### 第六節 皮膚穿刺過敏原試驗 (表三、圖六)

為確認七種優勢真菌為致過敏真菌，本研究隨機招募共 49 位受試者進行室內主要過敏原之皮膚穿刺實驗。49 位受試者中 33 位 (67%) 對於皮膚試驗呈陽性反應，16 位 (33%) 對這些過敏原呈陰性反應 (圖六，A)。33 位皮膚試驗陽性的受試者中，對於本研究所獲之七種供試真菌有陽性反應者為 9 人，盛行率為 27%；對蟑螂呈陽性反應者有 7 人，盛行率為 21%，對塵蟎呈陽性反應者有 29 人，盛行率為 88% (圖六，B)。

對於七種供試真菌呈陽性反應的 9 人中，對 *C. cladosporioides*、*P. oxalicum* 和 *P. brevicompactum* 呈陽性反應者有 4 人；*C. oxysporum*、*A. niger*、*A. flavus* 和 *A. fumigatus* 呈陽性反應者有 5 人。由皮膚穿刺實驗結果證明受試者家中所獲之七種優勢真菌為致過敏

真菌。

## 第七節 臨床篩檢為非真菌過敏患者血清中的 IgE 與七種致過敏真菌反應之圖譜 (表四)

為了解臨床檢驗過敏用 ImmunoCAP 套組對於篩檢本土真菌過敏患者的適用性，本研究篩選 ImmunoCAP 室內真菌過敏原套組 Mx2 檢驗為陰性反應之過敏患者，檢測他們的血清是否對於本研究中七種供試致過敏真菌有陽性反應，及其比例。以 100 位臨床檢驗真菌過敏反應為陰性的過敏患者的血清為實驗組，10 位皮膚穿刺實驗反應全為陰性反應者的血清為負對照組。檢測二組 110 個樣本血清與 7 種供試致過敏真菌蛋白萃取物的 ELISA 呈正反應者，實驗組分別有 27、59、10、11、9、11 和 14 位患者的血清與 *C. oxysporum*、*C. cladosporioides*、*A. niger*、*A. flavus*、*A. fumigatus*、*P. oxalicum* 和 *P. brevicompactum* 蛋白萃取物反應。總計 100 位臨床檢驗對真菌為陰性反應的過敏患者中，有 63 位對於七種供試致過敏真菌呈陽性反應。七種致過敏真菌在 63 位過敏患者之個別盛行率為 14% - 94% (圖七)；兩兩交叉比對發現 63 位中，有 62 位患者 (98%) 血清會與 *C. oxysporum* 和(或) *C. cladosporioides* 反應；60 位患者 (95%) 血清會與 *C. cladosporioides* 和(或) *P. brevicompactum* 反應；將上述 3 種菌混合比對，全部 63 位患者 (100%) 血清會有正反應 (表五)。

## 第八節 以 SDS-PAGE 與免疫轉漬法分析致敏真菌圖譜 (圖八)

從上述結果發現，七種致過敏真菌各有其盛行率，其中以 *Cladosporium cladosporioides* 盛行率最高。為了解七種致過敏真菌蛋白質圖譜，進行 SDS-PAGE 分析 (圖八，A)，與免疫轉漬法分析 9 位真菌過敏患者血清對於 *C. cladosporioides* 蛋白粗萃物之 IgE 反應圖譜 (圖八，B)。結果顯示有 6 位患者血清對於 39 kDa 和 5 位患者血清對於 49 kDa 及 29 kDa 的蛋白有反應。



## 第四章 討 論

### 第一節 受試者居所空氣中的總真菌量、優勢菌種與過敏的關係

許多文獻指出空氣中真菌孢子濃度與氣喘等過敏疾病的發生有相關性 (Wüthrich 1989, Cole and Hoch 1991, Pongracic et al. 2010, Chakrabarti et al. 2012)。本研究數據顯示患者過敏症狀的出現與總真菌量之間並無顯著相關；有關的研究報告有四篇，Holme 等人分析 98 位氣喘、82 位鼻炎過敏期的兒童臥室空氣中空氣總真菌量與 172 位對照組兒童家沒有顯著差異 (Holme et al. 2010)；Su 等人比較過敏與非過敏患者家中空氣總真菌量，結果也沒有顯著差異 (Su et al. 2001)。早期，Barnes 等人 (2000) 指出空氣中過敏原的濃度並非總是與總孢子量相關，而是與特定真菌濃度有關。Ross 等人 (2000) 指出總真菌濃度與患者至急診次數有關，雖未達統計上的顯著，然而 *Alternaria* 屬真菌孢子濃度與與患者因氣喘而失眠的比率達統計相關。顯示空氣中總真菌濃度與患者過敏無統計上相關，但致過敏菌屬的孢子濃度才是真正應該被注意且考慮為引起患者過敏的真正原因 (Barnes et al. 2000, Brito et al. 2012)。

空氣中致過敏真菌濃度與患者過敏相關的研究中，多數只鑑定至屬，未鑑定到種，例如 *Cladosporium* 屬孢子濃度與氣喘急診人數呈正相關 (Lewis et al. 2000)、長期暴露於 *Penicillium* 屬環境中，嬰兒

氣喘及咳嗽比率增高 (Garrett et al. 1998)、和 *Alternaria*、*Penicillium* 和 *Cladosporium* 屬孢子濃度與幼兒哮喘以及後期鼻炎的發展有相關性 (Behbod et al. 2013)；暴露於較高 *Cladosporium*、*Alternaria*、*Aspergillus* 和 *Penicillium* 屬孢子濃度者氣喘惡化程度高出 36% - 48% (Sharpe et al. 2015)，上述研究均以屬的層級探討孢子濃度對於過敏患者的影響；本研究則是以種的分類層級探討孢子濃度對於過敏患者過敏症狀惡化的影響，發現 7 種致過敏真菌中，*C. oxysporum*、*C. cladosporioides*、*A. niger* 和 *P. brevicompactum* 在十位患者過敏期居所空氣中的濃度顯著高於非過敏期，為導致患者過敏症狀惡化的主要菌種；而 *A. flavus*、*A. fumigatus* 及 *P. oxalicum* 為次要致過敏菌種。例如 P4 患者，過敏期家中 *C. oxysporum*、*C. cladosporioides*、*A. flavus*、*A. niger* 和 *P. oxalicum* 孢子濃度皆高於非過敏期，*C. oxysporum* 為導致該患者過敏症狀惡化之主要菌種，以其孢子濃度 306 CFU/m<sup>3</sup> 為例，考量一般成年人每分鐘呼吸量為 6 至 9 公升，每小時孢子吸入量達 1.1 - 1.6 × 10<sup>6</sup> CFU。

## 第二節 致過敏閾值

7 位 m2 (*Cladosporium herbarum*) 目標患者中，P1、P2 及 P4 過敏期家中 *C. oxysporum* 濃度皆高於致過敏閾值，P6、P7、P9 及 P10 家中該菌則未達致過敏閾值。*C. cladosporioides* 在 7 位目標患者家中

濃度低於 *C. oxysporum*，P1 患者過敏期家中 *C. cladosporioides* 濃度最高，達 153.7 CFU/m<sup>3</sup>，根據 *C. oxysporum* 致過敏濃度 100 CFU/m<sup>3</sup>，*C. cladosporioides* 達致過敏濃度，與 358.4 CFU/m<sup>3</sup> 的 *C. oxysporum* 共同使該患者過敏，同屬不同種的致過敏反應可能有加成作用 (Zureik et al. 2002)。 *C. cladosporioides* 在目標患者家中，非過敏期菌量均偏低 (<26.2 CFU/m<sup>3</sup>)，過敏期的菌量呈連續分布 (26.2、35.0、43.7、69.9、153.7 CFU/m<sup>3</sup>) 且均有更高的 *C. oxysporum* 孢子量覆蓋，因此不易探討 *C. cladosporioides* 的致過敏孢子濃度。

m3 (*Aspergillus fumigatus*) 目標患者中，居所有 *A. flavus* 與 *A. fumigatus* 者，均有高量的 *C. oxysporum* 孢子引起過敏，導致不易區辨 *A. flavus* 與 *A. fumigatus* 的致敏能力。致過敏孢子濃度閾值的歸納，除應高於非過敏期孢子濃度以外，須有居所環境中沒有他種致過敏菌種干擾的目標患者居所樣本數據作為判讀依據。

m1 (*Penicillium notatum*) 目標患者非過敏期 *P. oxalicum* 最高孢子量為 P5 家中的 26.2 CFU/m<sup>3</sup>，而目標患者 P6 過敏期孢子量也達 26.2 CFU/m<sup>3</sup>，需要更多數據歸納分析其致過敏閾值。參考 *P. brevicompactum* 的致過敏濃度為 10 CFU/m<sup>3</sup>，26.2 CFU/m<sup>3</sup> 的 *P. oxalicum* 極有可能致過敏；P6 目標患者家中達 26.2 CFU/m<sup>3</sup> 而未過敏，有可能因為以 ImmunoCAP 測得為目標菌患者，檢測的是對套

組中 *P. notatum* 的致敏蛋白有抗體反應，對 *P. notatum* 抗體反應者，未必對 *P. oxalicum* 過敏，以致在 26.2 CFU/m<sup>3</sup> 的 *P. oxalicum* 濃度下，沒有過敏反應，這需要進一步請該患者做皮膚測試或獲取其血液樣本做 ELISA 測試以驗證並釐清此問題，也突顯檢測過敏原需考慮在地菌相與生態。

過去文獻的致過敏真菌的菌量閾值估算皆以菌屬訂定，Jacob 等人 (2002) 報告每克灰塵中 *Cladosporium* 屬和 *Penicillium* 屬孢子量高於 5,000 CFU、*Aspergillus* 屬孢子量高於 25,000 CFU 會使過敏患者增加過敏風險。本研究 *Cladosporium* 屬致過敏閾值為 100 CFU/m<sup>3</sup>，*Aspergillus* 屬及 *Penicillium* 屬致過敏閾值為 10 CFU/m<sup>3</sup>，與 Jacob 等人研究不同。值得探討的有以下幾點，一、本研究則是調查空氣中懸浮真菌孢子量，Jacob 等人調查家中灰塵中的真菌孢子量。相較已沉降的灰塵，患者隨時吸入懸浮於空氣中真菌孢子，其累積量很可觀，一般成年人每分鐘呼吸量為 6 至 9 公升，每小時吸入 360 到 540 m<sup>3</sup> 空氣，10 CFU/m<sup>3</sup> 與 100 CFU/m<sup>3</sup> 閾值代表每小時吸入  $3.6 \times 10^3$  到  $5.4 \times 10^4$  CFU 的致過敏菌量。二、Jacob 等人的研究比較過敏患者與非過敏患者家中 *Cladopsorium*、*Aspergillus* 和 *Alternaria* 屬孢子量差異，本研究調查目標菌種過敏患者居所在過敏期與非過敏期的目標菌種的相關菌種濃度。三、閾值估算方法不同，

Jacob 等人採計過敏患者家中灰塵內孢子前 25% 的菌屬孢子量為該屬致過敏閥值暴露量，本研究直接比對患者過敏期與非過敏期家中空氣中的真菌孢子量，歸納菌種的致過敏閥值。

*Alternaria* 為重要致過敏菌，由於 *Alternaria* 為多細胞的磚格孢子 (dictyospore)，孢子體積 (23 - 34 × 7 - 10 μm) 遠比 *Cladosporium* (4 - 25 × 28 - 56 μm)、*Aspergillus* (3 - 5 × 2 - 5 μm) 或 *Penicillium* (3 - 6 × 2 - 4 μm) 的單胞孢子大，其沉降係數較高，在空氣中懸浮力差、懸浮時間短，很快沉降入地面灰塵中，因此，Jacob 等人由灰塵樣本獲得 *Alternaria* 屬的菌量；本研究探討空氣中的真菌對呼吸道過敏患者的影響，調查空氣中懸浮之真菌孢子，*Alternaria* 出現率與族群量極低，非優勢菌種，因而未列入後續研究。

許多研究指出 *Candida* 在引起過敏疾病的發生中扮演重要的角色 (Savolainen et al. 1993, Tanaka et al. 1994, Morita et al. 1999, Faergemann 2002)。*Candida* 常發現於人體皮膚、腸胃道和泌尿道中；本研究為探討空氣中之真菌孢子，因此未列入後續研究。

### 第三節 台灣本土真菌過敏原盛行率

空氣中的孢子鑑定仰賴孢子形態，需有專業能力與經驗的鑑定人員，需要大量時間，且大多只能歸類至屬，只有少數種能完成鑑定。由於方法學上的限制，少有致過敏菌種的生態學調查研究，導致多仰

賴臨床上以商業化套組的菌種檢測患者血清中過敏原專一性 IgE，估算套組菌種的過敏原盛行率 (Kespohl et al. 2013)，一般視為菌種的盛行率，被詮釋為對商業套組採用菌種的致過敏盛行率，認為台灣過敏患者有 10% 對真菌過敏。但是，製造商大多以當地優勢空氣真菌相報告做為建立商業化套組菌種選擇的參考 (Esch 2004)，臨床使用的進口試劑包括六屬的供試菌種，只有 *A. fumigatus* 與本研究生態調查結果相符，其他三屬的六種致敏菌種不在套組中，同屬不同菌種抗原的抗體檢測效率不詳，可能有偽陰性反應產生，相較於套組測試的 10% 盛行率，本研究由真菌過敏患者家中所分離出的台灣本土致敏真菌菌株，經皮膚試驗發現其盛行率為 27%。與過去相比，可看出低估真菌過敏疾病在台灣盛行率，但仍需更多樣本驗證。

本研究參考我國臨床調查真菌過敏盛行率，以生態調查為基礎所獲之菌相進行篩檢，顯示採用國內調查所獲之關鍵菌種有助於正確篩檢我國真菌過敏患者。這個研究整合生態調查與臨床檢驗，使我們了解以國內致過敏菌種進行臨床檢驗有其必要性與重要性。

#### **第四節 商業化套組對台灣本土真菌過敏患者之適用性**

本研究針對以臨床檢驗過敏用 ImmunoCAP 套組檢驗為陰性反應患者之血清，檢測顯示有 63% 患者係屬偽陰性反應，對本土真菌過敏原有陽性反應，顯示商業化套組對我國真菌過敏患者並不適用，

致使低估我國真菌過敏患者的盛行率。

過敏患者對於七種致過敏真菌的 ELISA 測試呈陽性反應的比率不同 (圖七)，以 *C. cladosporioides* 盛行率最高，為台灣最主要的致過敏真菌。在商業套組中，該屬多以 *C. herbarum* 作為抗原代表，因為 *C. herbarum* 是溫帶地區最優勢與最主要的致過敏真菌 (Sakiyan and Inceoglu 2003, Kasprzyk and Worek 2006, O’Gorman and Fuller 2008, Oliveira et al. 2009)，致過敏蛋白被大量研究。Chiang 等人在台北以商業套組檢測數據研究統計，顯示 579 位氣喘患者約有 6.6% 對 *C. herbarum* 過敏 (Chiang et al. 2005); 但本研究並未在台中任何受試者家中調查到 *C. herbarum*，優勢菌種是 *C. oxysporum* 與 *C. cladosporioides*。Chiang 等人的研究以套組引用溫帶優勢菌種作為論述，而台灣位於亞熱帶地區，生態環境中，*C. herbarum* 並非 *Cladosporium* 屬的主要菌種，在過去生態調查報告並未出現 (陳與劉 1997, Su et al. 2001, Wu et al. 2007)。

根據本研究 SDS-PAGE 圖譜，同屬不同種的真菌 (如 *C. oxysporum* 與 *C. cladosporioides*)，蛋白質圖譜有明顯差異，表示菌種有特有的抗原，導致同屬不同菌種有不同的盛行率，非代表菌株可以概括而論。依據 WHO-IUIS 過敏原命名委員會資料顯示，同屬不同種之間其過敏原蛋白不盡相同，例如 *Penicillium brevicompactum*

已知致過敏蛋白為 Alkaline serine protease 與 Acidic ribosomal prot. P1，而 *P. chrysogenum* 已知致過敏蛋白為 Alkaline serine protease、Vacuolar serine protease、N-acetyl-glucosaminidase、Calreticulin 與 Transaldolase。兩種真菌都有致過敏蛋白 Alkaline serine protease，其它均不相同，真菌過敏患者若對共有的致過敏蛋白不反應，供試菌種就未能測出另一菌種的抗體，篩檢出正確的過敏原與致敏原因。因此，需比較分析我國患者致敏菌種的盛行率，我的 ELISA 實驗發現以 *C. oxysporum*、*C. cladosporioides* 及 *P. brevicompactum* 為抗原，即可 100% 檢驗出對本土 7 種真菌過敏的 63 位臨床偽陰性反應患者 (表五)。此結果突顯根據對本土致過敏菌種的了解以篩檢患者過敏原的重要性。

由 ImmunoCAP 篩檢為真菌過敏患者，其中，血清中具有對 *C. herbarum* 抗原呈反應的患者，在過敏期家中沒有 *C. herbarum* 記錄，以 *C. oxysporum* 有最高菌量，*C. cladosporioides* 其次。在沒有 *C. herbarum* 的環境中，本研究以 *C. herbarum* 篩檢出的過敏患者三位受試者主要對 *C. oxysporum* 過敏。

以 ImmunoCAP 篩得的非真菌過敏患者對 *C. cladosporioides* 有最高盛行率，而非 *C. oxysporum*，ImmunoCAP 採用的 *C. herbarum* 抗原未能檢測出具有 *C. cladosporioides* 抗體的患者族群，顯示



ImmunoCAP 可檢測出過敏患者血清中的 *C. oxysporum* 抗體而未能檢測出 *C. cladosporioides* 抗體，導致套組檢測非真菌過敏患者對 *C. cladosporioides* 有最高的盛行率。

商業化套組採用 *C. herbarum* 的抗原可篩檢出 *C. oxysporum* 的抗體，顯示它們有泛過敏原 (pan-allergen)；較不能夠篩檢出 *C. cladosporioides* 的抗體，顯示它們的泛過敏原很少。

因此，本研究調查真菌過敏患者居家環境中的優勢真菌孢子濃度所參與的受試者，係由 ImmunoCAP 的 *C. herbarum* 抗原篩檢出具 *C. oxysporum* 抗體的過敏患者，這些受試者家中有高量 *C. oxysporum* 以及少量 *C. cladosporioides*，沒有 *C. herbarum*。

本研究調查非真菌過敏患者血清中的 IgE 與七種致過敏真菌反應之圖譜實驗中，供試血清的患者，係由 ImmunoCAP 六種真菌抗原篩檢出的非真菌過敏患者，也就是他們不具有 *C. herbarum* 的抗體，卻有 *C. cladosporioides* 的高盛行率。顯示他們的生活環境中，有足以致過敏量的 *C. cladosporioides*，未來可供調查研究並分析其致過敏閾值。

*C. herbarum*、*C. oxysporum* 與 *C. cladosporioides* 之間有不同的泛過敏原，可用血清-抗原競爭的 western blot 試驗釐清，同時了解是否有 *Cladosporium* 菌屬新的重要過敏原，導致國人的真菌性過

敏，且非國外套組可檢測，進而開發適合我國與其它熱帶國家使用的檢測用菌種與套組。

對於真菌過敏的人口盛行率調查，應先調查當地環境中優勢致過敏菌種，針對優勢菌種進行個別盛行率比較後選出重要標的菌種進行臨床篩檢，有助於釐清當地真菌過敏人口盛行率。本研究結果可作為開發適用於熱帶地區的檢驗套組之基礎資料。

### 第五節 *Cladosporium cladosporioides* 致過敏蛋白圖譜

Chou 等人 (2008) 研究 *C. cladosporioides* 的致過敏蛋白，發表主要是分子量 36 kDa 的 Cla c 9 (Vacuolar serine protease) 與分子量 36.5 kDa 的次要致過敏蛋白 Cla c 14 (Transaldolase)。本研究分析 *C. cladosporioides* 致過敏蛋白圖譜結果與 Chou 等人 (2008) 的研究明顯不同，經比對發現，Chou 等人研究用菌株 BCRC 30812 (*C. cladosporioides*) 已被生物資源保存及研究中心更名為 *C. tenuissimum* Cooke，因此，*C. cladosporioides* 的致過敏蛋白待繼續研究，分析致過敏蛋白分子量與鑑定致過敏蛋白。

對於各菌種致過敏閾值的估計仍需有大尺度的研究。受試者多數同時具有呼吸道和皮膚過敏疾病，未來可研究真菌孢子濃度對於不同類型的過敏疾病的影響。此外，本研究發現 *C. oxysporum* 與 *C.*

*cladosporioides* 之致過敏蛋白並未有研究發表，對於此二種真菌致過敏蛋白研究有其必要性。

## 第五章 結 論

1. 導致空氣真菌過敏患者過敏症狀惡化的主要因子不是環境中總真菌濃度，而是特定的真菌之孢子濃度。
2. 真菌過敏患者家中發現七種致過敏真菌，依據目標患者家中的有效數據推估 *C. oxysporum* 的致過敏閾值為 100 CFU/m<sup>3</sup>，*A. niger* 與 *P. brevicompactum* 的致過敏閾值為 10 CFU/m<sup>3</sup>。
3. 七種台灣本土真菌的過敏盛行率為 27%。
4. 高達 63% 臨床檢驗為真菌過敏陰性反應患者對於本研究測試之七種致過敏真菌呈陽性反應，ImmunoCAP 商業化套組並不適用於台灣真菌過敏患者篩檢及真菌過敏盛行率調查。
5. 建議以 *C. oxysporum*、*C. cladosporioides* 以及 *P. brevicompactum* 為檢測菌種，輔助現行套組。
6. 生態調查所獲菌種由血清流行病學研究驗證為本土致過敏菌種，提供後續台灣本土致過敏真菌研究與檢測工具研發及適用於熱帶地區檢驗套組開發的基礎資料。

## 參考文獻

- 宋凌浩、宋偉民、施瑋、蔣榮芳，2000，上海市大氣微生物污染物對兒童呼吸系統健康的影響，環境健康雜誌 **17**:135-138。
- 陳瑞青、劉錦惠，1997，台東地區空中真菌孢子相之研究，行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告 (NSC 85-2311-B002-002-B14)。
- 曾顯雄、黃子葳，2009，進口植物或其產品潛在真菌病原之鑑定專誌 (II)，農委會動植物防疫檢驗局。
- Barnes, C., K. Schreiber, F. Pacheco, J. Landuyt, F. Hu, and J. Portnoy. 2000. Comparison of outdoor allergenic particles and allergen levels. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **84**:47-54.
- Beaumont, F., H. Kauffman, H. Sluiter, and K. De Vries. 1985. Sequential sampling of fungal air spores inside and outside the homes of mould-sensitive, asthmatic patients: a search for a relationship to obstructive reactions. *Annals of allergy* **55**:740-746.
- Beezhold, D. H., B. J. Green, F. M. Blachere, D. Schmechel, D. N. Weissman, D. Velickoff, M. B. Hogan, and N. W. Wilson. 2008. Prevalence of allergic sensitization to indoor fungi in West Virginia. *Allergy and Asthma Proceedings* **29**:29-34.
- Behbod, B., J. E. Sordillo, E. B. Hoffman, S. Datta, M. L. Muilenberg, J. A. Scott, G. L. Chew, T. A. E. Platts-Mills, J. Schwartz, H. Burge, and D. R. Gold. 2013. Wheeze in infancy: protection associated with yeasts in house dust contrasts with increased risk associated

- with yeasts in indoor air and other fungal taxa. *Allergy* **68**:1410-1418.
- Behbod, B., J. E. Sordillo, E. B. Hoffman, S. Datta, T. E. Webb, D. L. Kwan, J. A. Kamel, M. L. Muilenberg, J. A. Scott, G. L. Chew, T. A. E. Platts-Mills, J. Schwartz, B. Coull, H. Burge, and D. R. Gold. 2015. Asthma and allergy development: contrasting influences of yeasts and other fungal exposures. *Clinical & Experimental Allergy* **45**:154-163.
- Blackley, C. H. 1873. *Experimental researches on the causes and nature of catarrhus aestivus (hay-fever or hay-asthma)*. Baillière, Tindall & Cox.
- Brito, F. F., A. Alonso, J. Carnés, R. Martín-Martín, E. Fernández-Caldas, P. Galindo, T. Alfaya, and M. Amo-Salas. 2012. Correlation between Alt a 1 levels and clinical symptoms in *Alternaria alternata*-monosensitized patients. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* **22**:154-159.
- Brunekreef, B., D. W. Dockery, F. E. Speizer, J. H. Ware, J. D. Spengler, and B. G. Ferris. 1989. Home dampness and respiratory morbidity in children. *The American review of respiratory disease* **140**:1363-1367.
- Burge, H. 1989. Airborne allergenic fungi: classification, nomenclature, and distribution. *Immunology and allergy clinics of North America* **9**:307-319.
- Bush, R. K., J. M. Portnoy, A. Saxon, A. I. Terr, and R. A. Wood. 2006. The medical effects of mold exposure. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **117**:326-333.

- Cakmak, S., R. E. Dales, R. T. Burnett, S. Judek, F. Coates, and J. R. Brook. 2002. Effect of airborne allergens on emergency visits by children for conjunctivitis and rhinitis. *The Lancet* **359**:947-948.
- Chakrabarti, H. S., S. Das, and S. Gupta-Bhattacharya. 2012. Outdoor airborne fungal spora load in a suburb of Kolkata, India: its variation, meteorological determinants and health impact. *International journal of environmental health research* **22**:37-50.
- Chang, F. Y., J. H. Lee, Y. H. Yang, H. H. Yu, L. C. Wang, Y. T. Lin, and B. L. Chiang. 2011. Analysis of the Serum Levels of Fungi-Specific Immunoglobulin E in Patients with Allergic Diseases. *International Archives of Allergy and Immunology* **154**:49-56.
- Chiang, C. H., K. M. Wu, C. P. Wu, H. C. Yan, and W. C. Perng. 2005. Evaluation of Risk Factors for Asthma in Taipei City. *Journal of the Chinese Medical Association* **68**:204-209.
- Chou, H., W. L. Lin, M. F. Tam, S. R. Wang, S. H. Han, and H. D. Shen. 1999. Alkaline serine proteinase is a major allergen of *Aspergillus flavus*, a prevalent airborne *Aspergillus species* in the Taipei area. *International Archives of Allergy and Immunology* **119**:282-290.
- Chou, H., M. F. Tam, L. H. Lee, C. H. Chiang, H. Y. Tai, R. C. Panzani, and H. D. Shen. 2008. Vacuolar serine protease is a major allergen of *Cladosporium cladosporioides*. *International Archives of Allergy and Immunology* **146**:277-286.
- Chou, H., M. F. Tam, S. S. Lee, H. Y. Tai, C. Y. Chang, C. T. Chou, and H. D. Shen. 2005. A vacuolar serine protease (Rho m 2) is a major allergen of *Rhodotorula mucilaginosa* and belongs to a class of

- highly conserved pan-fungal allergens. *International Archives of Allergy and Immunology* **138**:134-141.
- Chou, H., K. G. Wu, C. C. Yeh, H. Y. Tai, M. F. Tam, Y. S. Chen, and H. D. Shen. 2014. The transaldolase, a novel allergen of *Fusarium proliferatum*, demonstrates IgE cross-reactivity with its human analogue. *Plos One* **9**:e103488.
- Chowdary, S., L. Prasanna, V. Sangram, S. Rani, and V. Kumar. 2011. Role of fungi (molds) in allergic airway disease-An analysis in a South Indian Otolaryngology center. *Indian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* **25**:67-78.
- Cole, G. T., and H. C. Hoch. 1991. The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Pages 379-401. Plenum Press.
- Cramer, R., M. Weichel, S. Fluckiger, A. G. Glaser, and C. Rhyner. 2006. Fungal allergies: a yet unsolved problem. *Chemical Immunology and Allergy* **91**:121-133.
- Custovic, A., and A. Simpson. 2012. The role of inhalant allergens in allergic airways disease. *The Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* **22**:393-401.
- Cvetnić, Z., and S. Pepeljnjak. 2001. Indoor airborne moulds. *Periodicum Biologorum* **103**:55-59.
- D'Amato, G., and F. T. Spiekma. 1995. Aerobiologic and clinical aspects of mould allergy in Europe. *Allergy* **50**:870-877.
- Dreborg, S. 1989. The skin prick test in the diagnosis of atopic allergy. *Journal of the American Academy of Dermatology* **21**:820-821.
- Esch, R. E. 2004. Manufacturing and standardizing fungal allergen products. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*



**113**:210-215.

Faergemann, J. 2002. Atopic Dermatitis and Fungi. *Clinical Microbiology Reviews* **15**:545-563.

Flannigan, B., E. McCabe, and F. McGarry. 1991. Allergenic and toxigenic micro-organisms in houses. *Journal of Applied Bacteriology* **70**:61S-73S.

Floyer, J. 1726. Violent asthma after visiting a wine cellar. A treatise in asthma. Innys and Parker.

Garrett, M. H., P. R. Rayment, M. A. Hooper, M. J. Abramson, and B. M. Hooper. 1998. Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children. *Clinical & Experimental Allergy* **28**:459-467.

Gold, D. R. 2000. Environmental tobacco smoke, indoor allergens, and childhood asthma. *Environmental health perspectives* **108 Suppl 4**:643-651.

Hamilos, D. L. 2010. Allergic fungal rhinitis and rhinosinusitis. *Proceedings of the American Thoracic Society* **7**:245-252.

Hamilton, E. D. 1963. Pollen and fungus spore counts. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **56**:220-221.

Hargreaves, M., S. Parappukkaran, L. Morawska, J. Hitchins, C. He, and D. Gilbert. 2003. A pilot investigation into associations between indoor airborne fungal and non-biological particle concentrations in residential houses in Brisbane, Australia. *Science of the Total Environment* **312**:89-101.

Holme, J., L. Hägerhed-Engman, J. Mattsson, J. Sundell, and C. G.

- Bornehag. 2010. Culturable mold in indoor air and its association with moisture-related problems and asthma and allergy among Swedish children. *Indoor air* **20**:329-340.
- Horner, W. E., A. Helbling, J. E. Salvaggio, and S. B. Lehrer. 1995. Fungal allergens. *Clinical Microbiology Reviews* **8**:161-179.
- Huang, H. W., K. H. Lue, R. H. Wong, H. Sun, J. Sheu, and K. H. Lu. 2006. Distribution of allergens in children with different atopic disorders in central Taiwan. *Acta paediatrica Taiwanica* **47**:127-134..
- Jacob, B., B. Ritz, U. Gehring, A. Koch, W. Bischof, H. E. Wichmann, and J. Heinrich. 2002. Indoor exposure to molds and allergic sensitization. *Environmental Health Perspectives* **110**:647-653.
- Kasprzyk, I., and M. Worek. 2006. Airborne fungal spores in urban and rural environments in Poland. *Aerobiologia* **22**:169-176.
- Kespohl, S., S. Maryska, E. Zahradnik, I. Sander, T. Brüning, and M. Raulf-Heimsoth. 2013. Biochemical and immunological analysis of mould skin prick test solution: current status of standardization. *Clinical & Experimental Allergy* **43**:1286-1296.
- Kurup, V. P., H. D. Shen, and B. Banerjee. 2000. Respiratory fungal allergy. *Microbes and infection* **2**:1101-1110.
- Lacey, J. 1996. Spore dispersal — its role in ecology and disease: the British contribution to fungal aerobiology. *Mycological Research* **100**:641-660.
- Lewis, S. A., J. M. Corden, G. E. Forster, and M. Newlands. 2000. Combined effects of aerobiological pollutants, chemical pollutants

- and meteorological conditions on asthma admissions and A & E attendances in Derbyshire UK, 1993–96. *Clinical & Experimental Allergy* **30**:1724-1732.
- Li, D. W., and B. Kendrick. 1994. Functional relationships between airborne fungal spores and environmental factors in Kitchener-Waterloo, Ontario, as detected by Canonical correspondence analysis. *Grana* **33**:166-176.
- Liang, K. L., M. C. Su, and R. S. Jiang. 2006. Comparison of the Skin Test and ImmunoCAP System in the Evaluation of Mold Allergy. *Journal of the Chinese Medical Association* **69**:3-6.
- Mari, A., P. Schneider, V. Wally, M. Breitenbach, and B. Simon-Nobbe. 2003. Sensitization to fungi: epidemiology, comparative skin tests, and IgE reactivity of fungal extracts. *Clinical & Experimental Allergy* **33**:1429-1438.
- Mendell, M. J., A. G. Mirer, K. Cheung, and J. Douwes. 2011. Respiratory and allergic health effects of dampness, mold, and dampness-related agents: a review of the epidemiologic evidence. *Environmental Health Perspectives* **119**:748-756.
- Morita, E., M. Hide, Y. Yoneya, M. Kannbe, A. Tanaka, and S. Yamamoto. 1999. An Assessment of the Role of *Candida albicans* Antigen in Atopic Dermatitis. *The Journal of Dermatology* **26**:282-287.
- O’Gorman, C. M., and H. T. Fuller. 2008. Prevalence of culturable airborne spores of selected allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *Atmospheric Environment* **42**:4355-4368.
- Oliveira, M., H. Ribeiro, J. L. Delgado, and I. Abreu. 2009. The effects of

- meteorological factors on airborne fungal spore concentration in two areas differing in urbanisation level. *International Journal of Biometeorology* **53**:61-73.
- Paris, S., J. P. Debeaupuis, M. C. Prevost, M. Casotto, and J. P. Latge. 1991. The 31 kd major allergen, Alt a I1563, of *Alternaria alternata*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **88**:902-908.
- Pongracic, J. A., G. T. O'Connor, M. L. Muilenberg, B. Vaughn, D. R. Gold, M. Kattan, W. J. Morgan, R. S. Gruchalla, E. Smartt, and H. E. Mitchell. 2010. Differential effects of outdoor versus indoor fungal spores on asthma morbidity in inner-city children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**:593-599.
- Prillinger, H., K. Lopandic, W. Schweigkofler, R. Deak, H. J. Aarts, R. Bauer, K. Sterflinger, G. F. Kraus, and A. Maraz. 2002. Phylogeny and systematics of the fungi with special reference to the Ascomycota and Basidiomycota. *Chemical Immunology* **81**:207-295.
- Ross, M. A., L. Curtis, P. A. Scheff, D. O. Hryhorczuk, V. Ramakrishnan, R. A. Wadden, and V. W. Persky. 2000. Association of asthma symptoms and severity with indoor bioaerosols. *Allergy* **55**:705-711.
- Sakiyan, N., and O. Inceoglu. 2003. Atmospheric Concentrations of *Cladosporium* Link and *Alternaria* Nées Spores in Ankara and the Effects of Meteorologic Factors. *Turkish Journal of Botany* **27**:77-81.
- Salvaggio, J., and L. Aukrust. 1981. Mold-induced asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **68**:327-346.

- Savolainen, J., K. Lammintausta, K. Kalimo, and M. Viander. 1993. *Candida albicans* and atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Allergy* **23**:332-339.
- Scolozzi, R., A. Boccafogli, L. Vicentini, A. Baraldi, and B. Bagni. 1989. Correlation of MAST chemiluminescent assay (CLA) with RAST and skin prick tests for diagnosis of inhalant allergic disease. *Annals of Allergy* **62**:193a-193b.
- Sharpe, R. A., N. Bearman, C. R. Thornton, K. Husk, and N. J. Osborne. 2015. Indoor fungal diversity and asthma: A meta-analysis and systematic review of risk factors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **135**:110-122.
- Shen, H. D., K. B. Choo, S. R. Wang, W. L. Lin, Z. N. Chang, and S. H. Han. 1991. Immunoblot analysis of components of *Penicillium notatum* recognized by human IgE antibodies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **88**:802-807.
- Shen, H. D., W. L. Lin, S. F. Liaw, M. F. Tam, and S. H. Han. 1997. Characterization of the 33-kilodalton major allergen of *Penicillium citrinum* by using MoAbs and N-terminal amino acid sequencing. *Clinical & Experimental Allergy* **27**:79-86.
- Shen, H. D., W. L. Lin, M. F. Tam, H. Chou, C. W. Wang, J. J. Tsai, S. R. Wang, and S. H. Han. 2001a. Identification of vacuolar serine proteinase as a major allergen of *Aspergillus fumigatus* by immunoblotting and N-terminal amino acid sequence analysis. *Clinical & Experimental Allergy* **31**:295-302.
- Shen, H. D., W. L. Lin, M. F. Tam, S. R. Wang, J. J. Tsai, H. Chou, and S. H. Han. 1998. Alkaline serine proteinase: a major allergen of

- Aspergillus oryzae* and its cross-reactivity with *Penicillium citrinum*. International Archives of Allergy and Immunology **116**:29-35.
- Shen, H. D., C. W. Wang, W. L. Lin, H. Y. Lai, M. F. Tam, H. Chou, S. R. Wang, and S. H. Han. 2001b. cDNA cloning and immunologic characterization of Pen o 18, the vacuolar serine protease major allergen of *Penicillium oxalicum*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine **137**:115-124.
- Simon-Nobbe, B., U. Denk, V. Pöll, R. Rid, and M. Breitenbach. 2008. The Spectrum of Fungal Allergy. International Archives of Allergy and Immunology **145**:58-86.
- Singh, A. B., and S. Shahi. 2008. Aeroallergens in clinical practice of allergy in India- ARIA Asia Pacific Workshop report. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology **26**:245-256.
- Sircar, G., H. S. Chakrabarti, B. Saha, and S. Gupta-Bhattacharya. 2012. Identification of aero-allergens from *Rhizopus oryzae*: an immunoproteomic approach. Journal of Proteomics **77**:455-468.
- Su, H. J., P. C. Wu, H. L. Chen, F. C. Lee, and L. L. Lin. 2001. Exposure Assessment of Indoor Allergens, Endotoxin, and Airborne Fungi for Homes in Southern Taiwan. Environmental Research **85**:135-144.
- Tai, H. Y., M. F. Tam, H. Chou, D. W. Perng, and H. D. Shen. 2010. Pen ch 13 major fungal allergen decreases CD44 expression in human bronchial epithelial cells. International Archives of Allergy and Immunology **153**:367-371.
- Tanaka, M., S. Aiba, N. Matsumura, and et al. 1994. IGe-mediated

- hypersensitivity and contact sensitivity to multiple environmental allergens in atopic dermatitis. *Archives of Dermatology* **130**:1393-1401.
- Terr, A. I. 2004. Are indoor molds causing a new disease? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**:221-226.
- Tsai, J. J., and W. C. Chen. 1999. Different age of asthmatic patients affected by different aeroallergens. *Journal of microbiology, immunology, and infection* **32**:283-288.
- Twaroch, T. E., M. Curin, R. Valenta, and I. Swoboda. 2015. Mold allergens in respiratory allergy: from structure to therapy. *Allergy, Asthma & Immunology Research* **7**:205-220.
- Tzean, S. S., J. L. Chen, G. Y. Liou, C. C. Chen and W. H. Hsu. 1990. *Aspergillus* and related teleomorphs from Taiwan. *Mycological Monograph of the Food Industry Research & Development Institute* (1).
- Tzean, S. S., S. C. Chiu, J. L. Chen, S. H. Hseu, G. H. Lin, G. Y. Liou, C. C. Chen and W. H. Hsu. 1994. *Penicillium* and related teleomorphs from Taiwan. *Mycological Monograph of the Food Industry Research & Development Institute* (9).
- Verhoeff, A. P., and H. A. Burge. 1997. Health risk assessment of fungi in home environments. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **78**:544-556.
- von Mutius, E. 2000. The environmental predictors of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105**:9-19.
- von Pirquet, C. 1906. *Allergie*. Munchen: Med Wehnschr 53.
- Wang, P. H., Y. T. Wang, and J. G. White. 2003. Species-specific PCR

- primers for *Pythium* developed from rivosomal ITS1 region. *Letters in Applied Microbiology* **37**: 127-132.
- WHO, GA<sup>2</sup>LEN, AllerGen and Wonca. 2007. Management of allergic rhinitis and its impact on asthma pocket guide. ARIA work shop.
- White T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Academic Press*, Pages 315-322.
- Wüthrich, B. 1989. Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *International Archives of Allergy and Immunology* **90**:3-10.
- Wu, Y. H., C. C. Chan, C. Y. Rao, C. T. Lee, H. H. Hsu, Y. H. Chiu and H. J. Chao. 2007. Characteristics, determinants, and spatial variations of ambient fungal levels in the subtropical Taipei metropolis. *Atmospheric Environment* **41**:2500-2509.
- Wiszniewska, M., D. Swierczyńska-Machura, P. Cezary, and J. Walusiak-Skorupa. 2009. Fungal allergy among art conservators: prevalence, risk factors and clinical symptoms. *Medycyna pracy* **61**:133-141.
- Yunginger, J. W., R. T. Jones, M. E. Nesheim, and M. Geller. 1980. Studies on *Alternaria* allergens: III. Isolation of a major allergenic fraction (Alt-i). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **66**:138-147.
- Zureik, M., C. Neukirch, B. Leynaert, R. Liard, J. Bousquet, and F. Neukirch. 2002. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *BMJ* **325**:411-417.



## 表目錄

表一、12 位受試者資料表.....	62
表二、12 位受試者過敏期與非過敏期家中空氣收集樣本以活性計數 之真菌孢子量 (CFU/m <sup>3</sup> ) .....	63
表三、受試者九種過敏原皮膚穿刺試驗結果.....	64
表四、Mx2 陰性過敏患者的血清與七種供試真菌之蛋白萃取物進行酵 素連結免疫吸附分析法分析結果.....	66
表五、交叉比對 63 位 Mx2 偽陰性患者對七種致過敏真菌之盛行率 .....	69

## 圖目錄

- 圖一、真菌過敏患者家中七種優勢真菌，以 PDA (馬鈴薯葡萄糖瓊脂) 27°C 培養 2 週的菌落形態。*Cladosporium oxysporum* (A) ; *C. cladosporioides* (B) ; *Penicillium oxalicum* (C) ; *P. brevicompactum* (D) ; *Aspergillus flavus* (E) ; *A. niger* (F) ; *A. fumigatus* (G).....70
- 圖二、受試者過敏期與非過敏期居家環境空氣中的總真菌量，採鏡檢計數 (A) 和活性計數 (B) 的結果。r-1 與 r-2 表示居家二個不同房間。.....71
- 圖三、*Cladosporium* 屬 *C. oxysporum* (A) 和 *C. cladosporioides* (B) 在目標患者過敏期與非過敏期居所的孢子濃度 (CFU/m<sup>3</sup>) 之盒鬚圖.....72
- 圖四、*Penicillium* 屬 *P. oxalicum* (A) 和 *P. brevicompactum* (B) 在目標菌患者過敏期與非過敏期居所孢子濃度 (CFU/m<sup>3</sup>) 之盒鬚圖.....73
- 圖五、*Aspergillus* 屬 *A. niger* (A)、*A. flavus* (B) 和 *A. fumigatus* (C) 在目標菌患者過敏期與非過敏期居所孢子濃度 (CFU/m<sup>3</sup>) 之盒鬚圖.....75
- 圖六、室內主要過敏原皮膚穿刺試驗結果。49 位受試者呈過敏反應之比例 (A) ; 三項不同過敏原對於呈過敏反應之受試

者的盛行率 (B)。Cra 為蟑螂；Dp 為塵蟎.....	76
圖七、七種致過敏真菌在 63 位偽陰性患者之個別盛行率.....	77
圖八、以考馬斯藍染色之七種真菌 SDS-PAGE 電泳分析圖 (A)；以免疫轉漬法分析 <i>Cladosporium cladosporioies</i> 蛋白粗萃物與過敏患血清之 IgE 反應 (B)。Land M: prestained protein marker；Lane 1: <i>C. cladosporioies</i> 蛋白粗萃物；Lanes 2-10: 9 位真菌過敏患者血清；Lanes 11-12: 負控制組血清.....	78

表一、 12 位受試者資料表。

Table 1. Demographics of 12 subjects.

Patient	Immuno CAP	symptom	mx2	<b>m1</b>	<b>m2</b>	<b>m3</b>	<b>m5</b>	<b>m6</b>
				( <i>Penicillium notatum</i> )	( <i>Cladosporium herbarum</i> )	( <i>Aspergillus fumigatus</i> )	( <i>Candida albicans</i> )	( <i>Alternaria alternata</i> )
1		A, AR	6.55	2.87	0.41	6.59	—	2.43
2		AR, AD	1.98	1.91	1.08	3.94	9.17	—
3		AR, AD	0.59	—	—	0.73	1.29	—
4		AD	2.27	1.72	0.88	0.77	4.9	0.48
5		AD	2.64	0.35	—	—	8.03	—
6		AR, AD	1.98	0.8	0.62	2.88	4.56	—
7		A, AR, AD	32	8.53	4.9	16.5	6.22	27.1
8		A, AR	1.37	0.69	—	—	4.26	—
9		AR, AD	3.23	12.1	1.18	1.47	1.84	0.7
10		AD	1.16	1.94	0.82	1.05	1.6	0.44
C1		A	0.04	—	—	—	—	—
C2		AR	—	—	—	—	—	—

A: asthma; AR: allergic rhinitis; AD: allergic dermatitis

Unit= kU/L

Positive >0.35 Ku/L

表二、12 位受試者過敏期與非過敏期家中空氣收集樣本以活性計數之真菌孢子量 (CFU/m<sup>3</sup>)。

Table 2. The viable count (CFU/m<sup>3</sup>) of air samples in 12 patients' houses in active and inactive stages.

No.	No. sample	<i>C. oxysporum</i> avtive/inactive	<i>C. cladosporioies</i> avtive/inactive	IgE to <i>C. herbarum</i>	<i>A. flavus</i> avtive/inactive	<i>A. fumigatus</i> avtive/inactive	<i>A. niger</i> avtive/inactive	IgE to <i>A. fumigatus</i>	<i>P. brevicompactum</i> avtive/inactive	<i>P. oxalicum</i> avtive/inactive	IgE to <i>P. notatum</i>
P1	r-1	358.4/47.2	153.7/4.4	0.41	ND/0.9	ND	ND	6.59	17.5/ND	8.7/0.9	2.87
	r-2	131.1/26.2	43.7/1.7		ND/0.9	ND	8.7/1.7		26.2/ND	ND	
P2	r-1	620.6/4.4	69.9/ND	1.08	ND/0.9	ND/0.9	17.5/0	3.94	ND	ND/0.9	1.91
	r-2	463.3/5.2	43.7/1.7		ND	ND	ND/0.9		ND	ND/2.6	
P3	r-1	7.9/2.6	4.4/ND	0.24	ND	15.7/7.0	ND/0.9	0.73	ND	ND	0.12
	r-2	13.1/0.9	7.0/0.9		ND	2.6/ND	ND/12.2		ND	ND/1.7	
P4	r-1	305.9/36.7	35.0/0.9	0.88	17.5/3.5	ND	8.7/0.9	0.77	ND	35.0/1.7	1.72
	r-2	87.4/31.5	17.5/7.0		8.7/0.9	ND	35.0/1.7		ND	26.2/2.6	
P5	r-1	38.5/61.2	13.1/8.7	0.24	ND/2.6	ND/8.7	ND/5.2	0.17	3.5/ND	6.1/26.2	0.35
	r-2	28.8/34.1	5.2/ND		8.7/8.7	ND/3.5	ND/8.7		2.6/ND	ND/17.5	
P6	r-1	28.8/62.9	0.9/12.2	0.62	0.9/ND	ND	ND	2.28	ND	26.2/8.7	0.8
	r-2	33.2/88.3	6.1/26.2		0.9/ND	8.7/ND	ND		8.7/ND	2.6/8.7	
P7	r-1	52.4/40.6	1.7/8.7	4.9	ND	ND	ND	16.5	ND/17.5	1.7/7.9	8.53
	r-2	8.7/10.5	0.9/ND		ND	ND	ND		ND	0.9/ND	
P8	r-1	45.5/35.8	17.5/4.4	0.18	8.7/ND	ND	4.4/0.9	0.31	ND	5.2/ND	0.69
	r-2	16.6/166.1	4.4/17.5		ND/1.7	ND	0.9/1.7		ND	1.7/8.7	
P9	r-1	43.7/8.7	0.9/0.9	1.18	ND	ND	8.7/ND	1.47	ND	35.0/ND	12.1
	r-2	17.5/0.9	17.5/ND		ND	ND	26.2/ND		1.7/ND	8.7/ND	
P10	r-1	39.3/17.5	26.2/0.9	0.82	ND	ND	ND/0.9	1.05	ND	3.5/ND	1.94
	r-2	17.5/8.7	8.7/ND		ND	ND	0.9/ND		ND	ND	
CK1	r-1	515.7/65.6	87.4/ND	—	ND/7	ND/3.5	ND/1.7	—	ND/8.7	8.7/17.5	—
	r-2	139.9/78.7	32.3/ND		0.9/0.9	8.7/3.5	ND/5.2		ND/1.7	2.6/8.7	
CK2	r-1	305.9/183.6	17.5/6.1	—	ND	ND	ND/0.9	—	ND	ND/2.6	—
	r-2	35.4/271	ND/17.5		ND/6.1	ND/17.5	ND/0.9		ND	8.7/0.9	

表三、受試者九種過敏原皮膚穿刺試驗結果。

Table 3. Skin prick test result of nine allergens.

No. \ Species	Co	Cc	An	Afla	Afumi	Po	Pb	CraA	Dp
S1	1 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	1 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	2 <sup>+</sup>	-
S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S4	-	-	-	1 <sup>+</sup>	1 <sup>+</sup>	-	-	-	3 <sup>+</sup>
S5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S6	-	-	-	-	-	-	-	-	3 <sup>+</sup>
S7	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S9	-	-	-	-	-	-	-	2 <sup>+</sup>	4 <sup>+</sup>
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S11	-	-	-	3 <sup>+</sup>	1 <sup>+</sup>	-	-	-	3 <sup>+</sup>
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S13	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S15	-	-	-	-	-	-	-	-	3 <sup>+</sup>
S16	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S17	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S18	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S19	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S20	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S21	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S22	-	-	-	-	-	-	-	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>
S23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S24	-	-	-	-	-	-	-	-	3 <sup>+</sup>

續表三

Table 3. continued.

S25	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S26	2 <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S28	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S30	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S31	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	-	1 <sup>+</sup>
S32	-	-	-	-	-	-	-	3 <sup>+</sup>	4 <sup>+</sup>
S33	-	-	3 <sup>+</sup>	-	-	-	3 <sup>+</sup>	-	4 <sup>+</sup>
S34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S36	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	4 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>	-	-
S37	-	-	-	-	-	-	-	3 <sup>+</sup>	3 <sup>+</sup>
S38	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S41	2 <sup>+</sup>	1 <sup>+</sup>	1 <sup>+</sup>	-	-	-	-	1 <sup>+</sup>	-
S42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S43	-	-	-	-	-	3 <sup>+</sup>	-	-	-
S44	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S45	-	-	-	-	-	-	-	-	4 <sup>+</sup>
S46	-	-	-	-	-	-	-	3 <sup>+</sup>	4 <sup>+</sup>
S47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S49	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表四、Mx2 陰性過敏患者的血清與七種供試真菌之蛋白萃取物進行酵

素連結免疫吸附分析法分析結果。

Table 4. Result of screening Mx2 negative patients' serum with proteins of 7 molds using ELISA.

No \ Species	Co	Cc	An	Afla	Afumi	Po	Pb
m1	-	-	-	-	-	-	-
m2	+	+	+	+	-	-	+
m3	-	-	-	-	-	-	-
m4	-	-	-	-	-	-	-
m5	+	-	-	-	-	-	-
m6	-	-	-	-	-	-	-
m7	-	-	-	-	-	-	-
m8	+	+	+	+	+	+	+
m9	-	+	-	-	-	-	-
m10	+	+	-	-	-	-	-
m11	-	+	-	-	-	-	-
m12	-	-	-	-	-	-	+
m13	+	+	+	+	+	+	+
m14	-	-	-	-	-	-	-
m15	+	+	-	+	+	+	+
m16	-	+	-	-	-	-	-
m17	-	-	-	-	-	-	-
m18	+	+	+	+	+	+	+
m19	+	-	-	-	-	-	-
m20	-	+	-	-	-	-	-
m21	+	+	+	-	-	-	+
m22	-	-	-	-	-	-	-
m23	+	+	-	-	-	-	-
m24	-	-	-	-	-	-	-
m25	-	-	-	-	-	-	-
m26	-	-	-	-	-	-	-
m27	-	+	-	-	-	-	-
m28	-	-	-	-	-	-	-
m29	-	-	-	-	-	-	-
m30	+	-	-	-	-	-	-
m31	+	+	-	-	+	+	+
m32	-	-	-	-	-	-	-



續表四

Table 4. continued

m33	-	+	-	-	-	-	-
m34	-	-	-	-	-	-	-
m35	-	+	-	-	-	-	-
m36	-	+	-	-	-	-	-
m37	+	+	-	+	-	-	-
m38	-	+	-	-	-	-	+
m39	-	-	-	-	-	-	-
m40	-	+	-	-	-	+	+
m41	-	-	-	-	-	-	-
m42	+	+	+	+	-	+	-
m43	-	+	-	-	-	-	-
m44	+	+	-	-	-	-	-
m45	-	+	-	-	-	-	-
m46	-	+	-	-	-	-	-
m47	-	-	-	-	-	-	-
m48	-	+	-	-	-	-	-
m49	-	-	-	-	-	-	-
m50	+	+	+	+	+	+	+
m51	-	-	-	-	-	-	-
m52	-	-	-	-	-	-	-
m53	-	-	-	-	-	-	-
m54	-	+	-	-	-	-	-
m55	+	+	-	-	-	-	-
m56	-	-	-	-	-	-	-
m57	-	+	-	-	-	-	-
m58	-	+	-	-	-	-	-
m59	-	-	-	-	-	-	-
m60	-	+	-	-	-	-	-
m61	-	+	-	-	-	-	-
m62	+	+	-	-	-	-	-
m63	+	+	-	-	-	-	-
m64	-	-	-	-	-	-	-
m65	-	+	-	-	-	-	-
m66	-	+	-	-	-	-	-
m67	-	-	-	-	-	-	-
m68	-	-	-	-	-	-	-

續表四

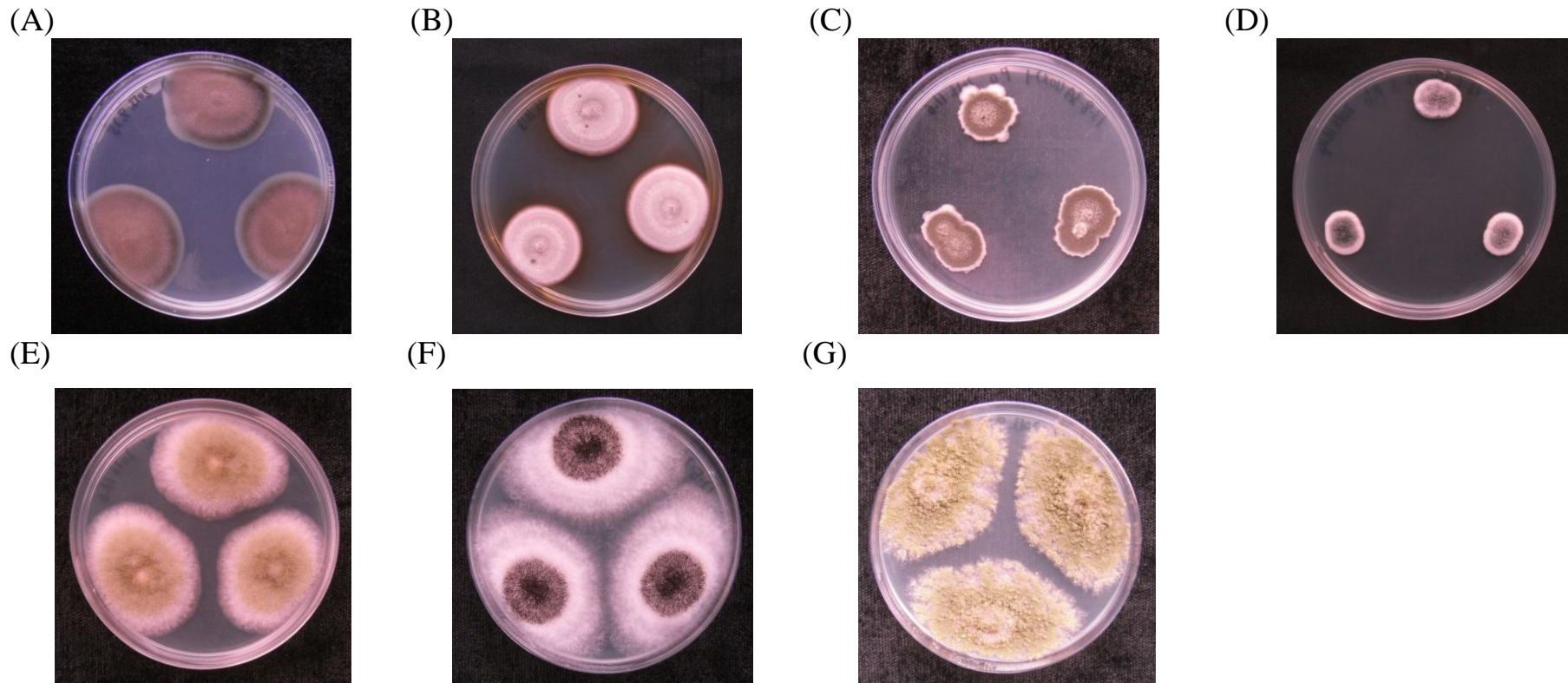
Table 4. continued

m69	-	-	-	-	-	-	-
m70	+	+	-	-	-	-	-
m71	+	+	+	+	-	+	+
m72	+	+	+	+	+	+	+
m73	-	-	-	-	-	-	-
m74	-	-	-	-	-	-	-
m75	+	+	-	-	-	-	-
m76	+	+	-	-	-	-	-
m77	-	+	-	-	-	-	-
m78	-	+	-	-	-	-	-
m79	-	+	-	-	-	-	-
m80	+	+	-	-	-	-	-
m81	-	+	-	-	-	-	-
m82	-	+	-	-	-	-	-
m83	+	+	+	+	+	+	+
m84	-	-	-	-	-	-	-
m85	-	-	-	-	-	-	-
m86	-	+	-	-	-	-	-
m87	-	+	-	-	-	-	-
m88	-	-	-	-	-	-	-
m89	-	+	-	-	-	-	-
m90	-	+	-	-	-	-	-
m91	-	-	-	-	-	-	-
m92	-	+	-	-	-	-	-
m93	-	+	-	-	-	-	-
m94	-	+	-	-	+	-	-
m95	-	-	-	-	-	-	-
m96	-	-	-	-	-	-	-
m97	-	-	-	-	-	-	-
m98	-	+	-	-	-	-	-
m99	+	+	-	-	-	-	-
m100	-	+	-	-	-	-	-
Total	27	59	10	11	9	11	14

表五、交叉比對 63 位 Mx2 偽陰性患者對七種致過敏真菌之盛行率。

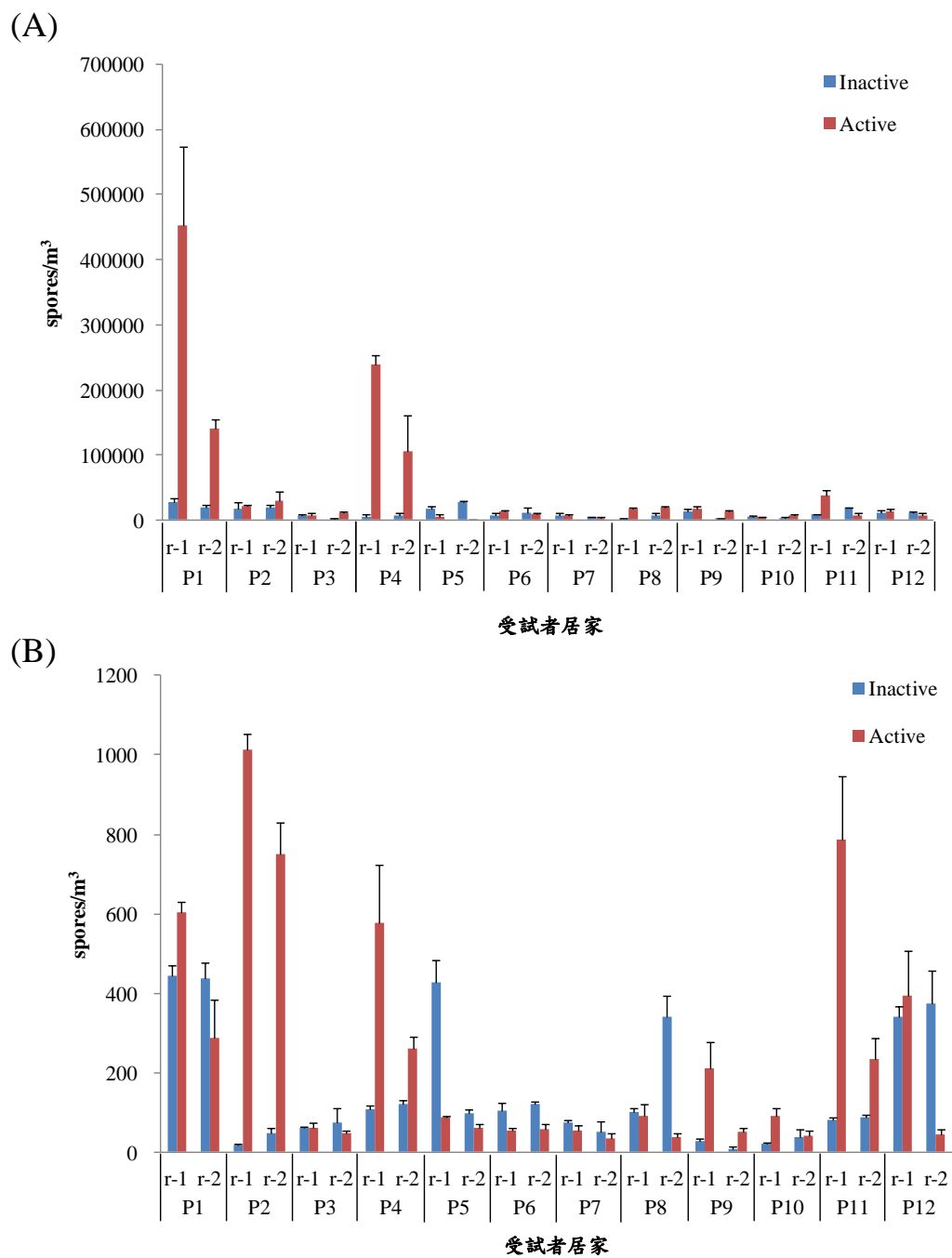
Table 5. The cross-matching prevalence of 7 allergenic fungi to 63 Mx2 false negative patients.

Species	Co	Cc	An	Afla	Afumi	Po	Pb
Co	43%						
Cc	98%	94%					
An	43%	94%	16%				
Afla	43%	94%	19%	17%			
Afumi	44%	94%	21%	21%	14%		
Po	44%	94%	21%	21%	19%	17%	
Pb	48%	95%	24%	25%	24%	24%	22%
Co+Cc	98%	98%	98%	98%	98%	98%	<b>100%</b>



圖一、真菌過敏患者家中七種優勢真菌，以 PDA (馬鈴薯葡萄糖瓊脂) 27°C 培養 2 週的菌落形態。*Cladosporium oxysporum* (A) ; *C. cladosporioides* (B) ; *Penicillium oxalicum* (C) ; *P. brevicompactum* (D) ; *Aspergillus flavus* (E) ; *A. niger* (F) ; *A. fumigatus* (G)。

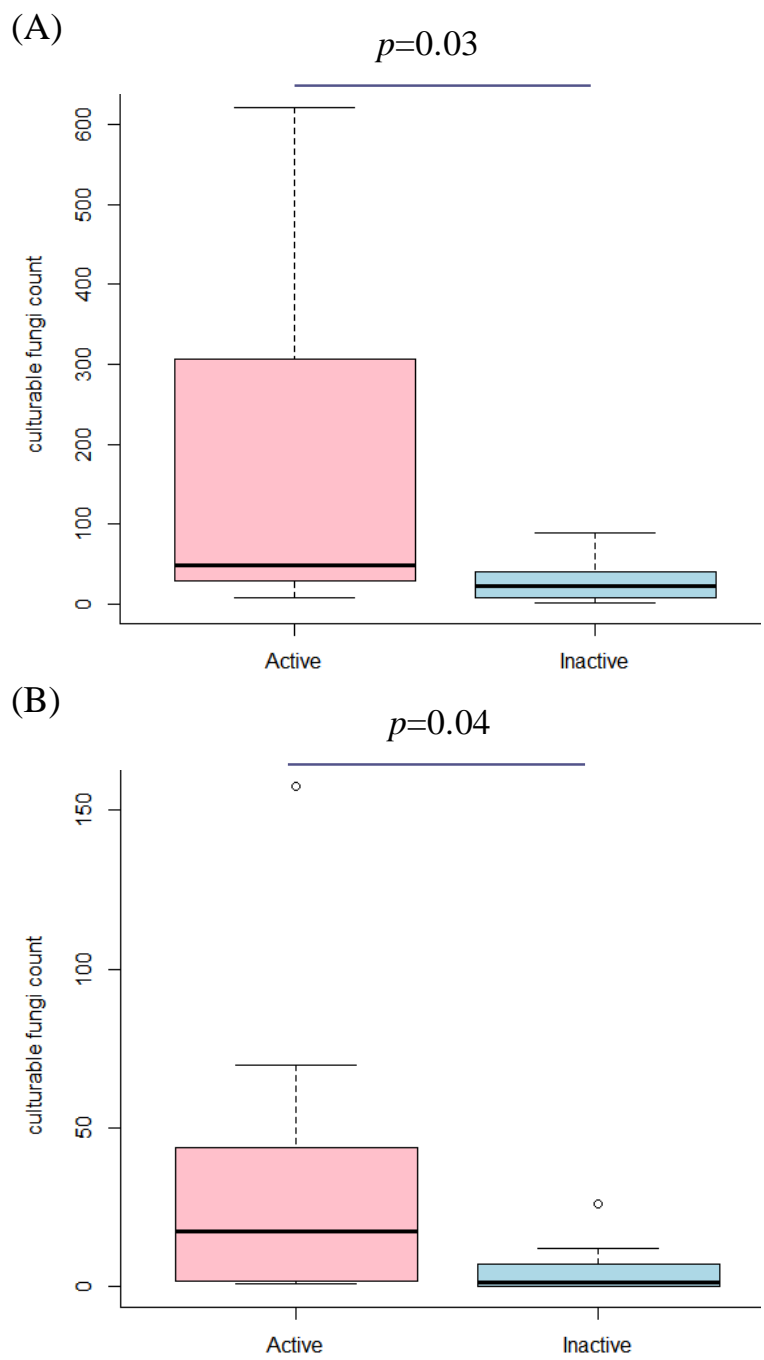
Figure 1. Colony morphology of seven dominant fungi from fungi allergic patients' home. (A) *Cladosporium oxysporum*, (B) *C. cladosporioides*, (C) *Penicillium oxalicum*, (D) *P. brevicompactum*, (E) *Aspergillus flavus*, (F) *A. niger*, (G) *A. fumigatus* with PDA in 27°C for 2 weeks.



圖二、受試者過敏期與非過敏期居家環境空氣中的總真菌量，採鏡檢

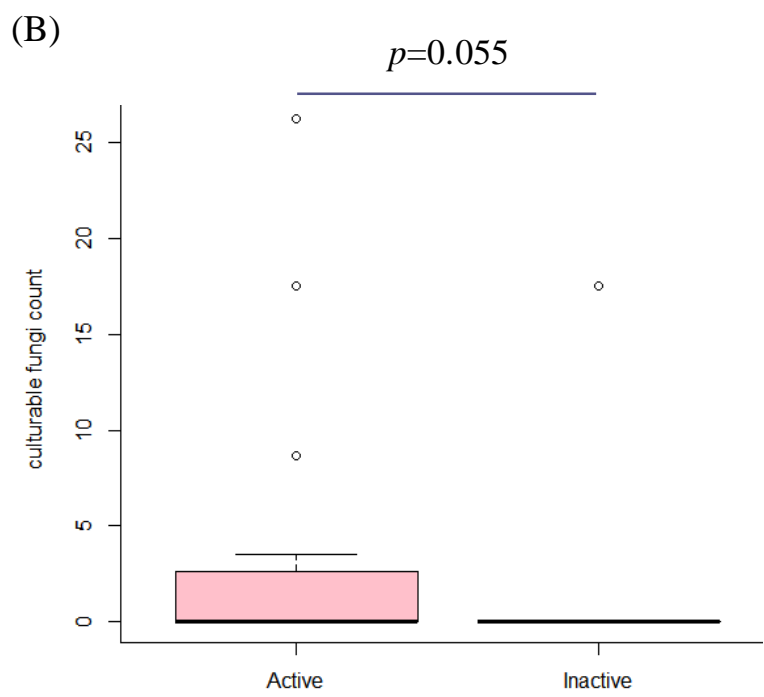
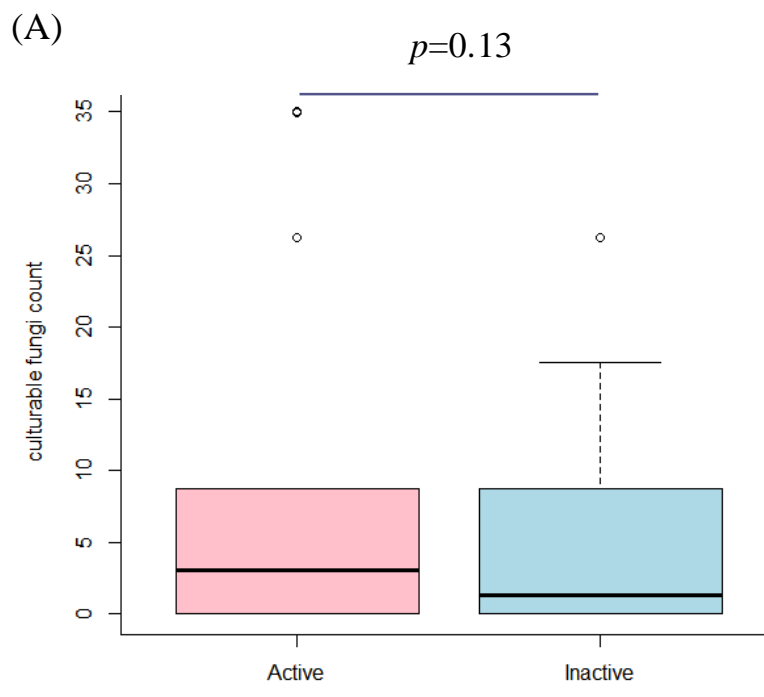
計數 (A) 和活性計數 (B) 的結果。r-1 與 r-2 表示居所的二個房間。

Figure 2. (A) Direct count and (B) viable count of total fungal spore concentration in the subjects' house during their active and inactive stages of allergy. r-1 and r-2 denote mean spore counts in two rooms.



圖三、*Cladosporium* 屬 *C. oxysporum* (A) 和 *C. cladosporioides* (B) 在目標患者過敏期與非過敏期居所的孢子濃度 (CFU/m<sup>3</sup>) 之盒鬚圖。

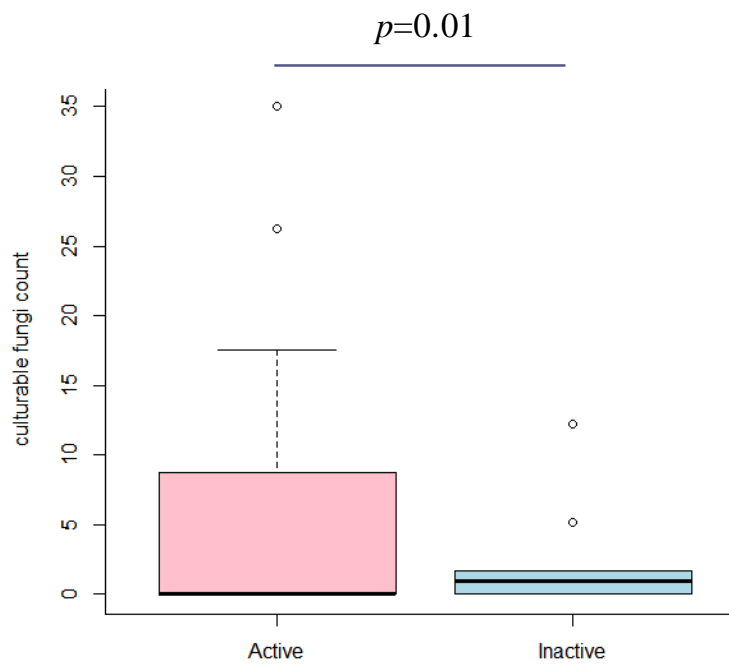
Figure 3. The Box-and-Whisker plot of *Cladosporium* spp. spore concentration (CFU/m<sup>3</sup>) in the active and inactive stages of target patients. (A) *C. oxysporum* and (B) *C. cladosporioides*.



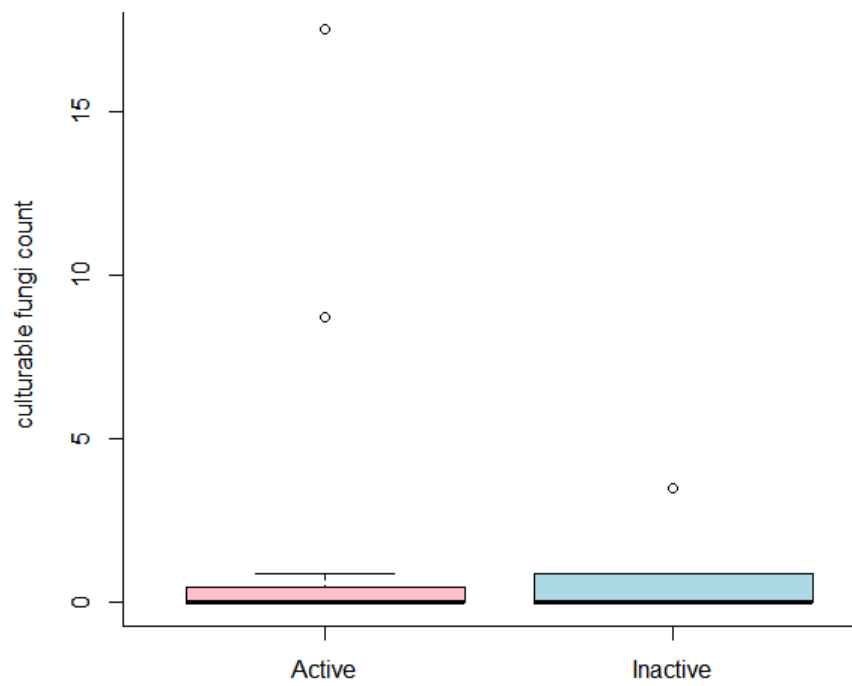
圖四、*Penicillium* 屬 *P. oxalicum* (A) 和 *P. brevicompactum* (B) 在目標菌患者過敏期與非過敏期居所孢子濃度 (CFU/m<sup>3</sup>) 之盒鬚圖。

Figure 4. The Box-and-Whisker plot of *Penicillium* spp. fungal spore concentration (CFU/m<sup>3</sup>) in the active and inactive stages of target patients. (A) *P. oxalicum* and (B) *P. brevicompactum*.

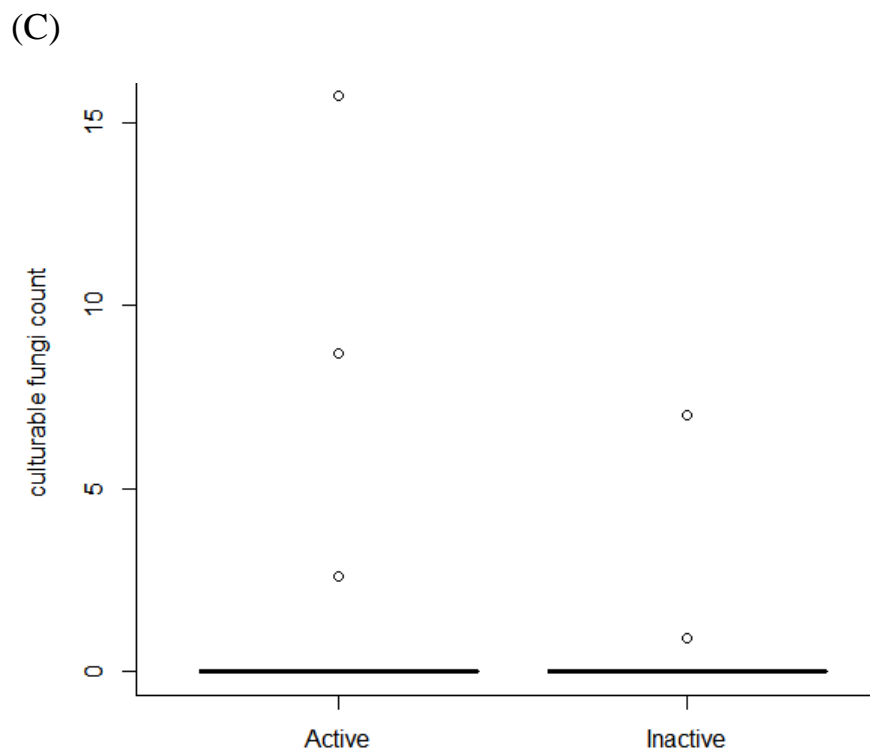
(A)



(B)

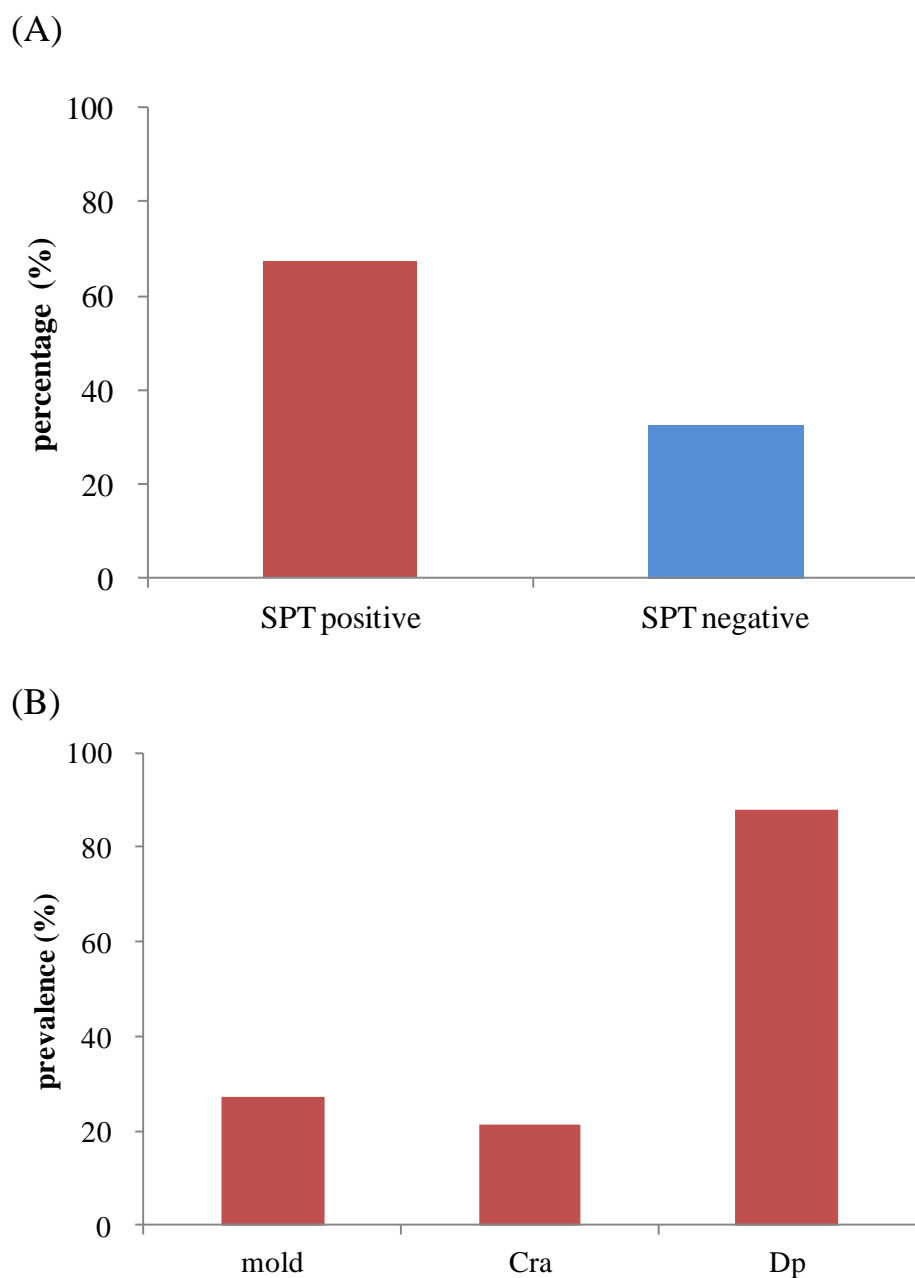






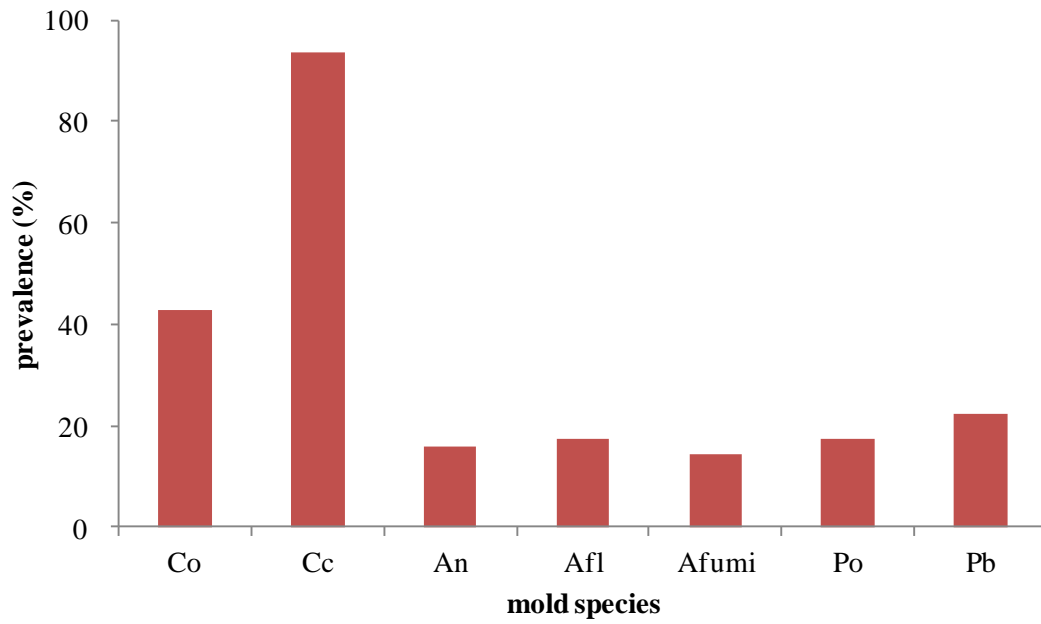
圖五、*Aspergillus* 屬 *A. niger* (A)、*A. flavus* (B) 和 *A. fumigatus* (C) 在目標菌患者過敏期與非過敏期居所孢子濃度 (CFU/m<sup>3</sup>) 之盒鬚圖。

Figure 5. The Box-and-Whisker plot of *Aspergillus* spp. fungal spore concentration (CFU/m<sup>3</sup>) in the active and inactive stages of target patients. (A) *A. niger*, (B) *A. flavus* and (C) *A. fumigatus*.



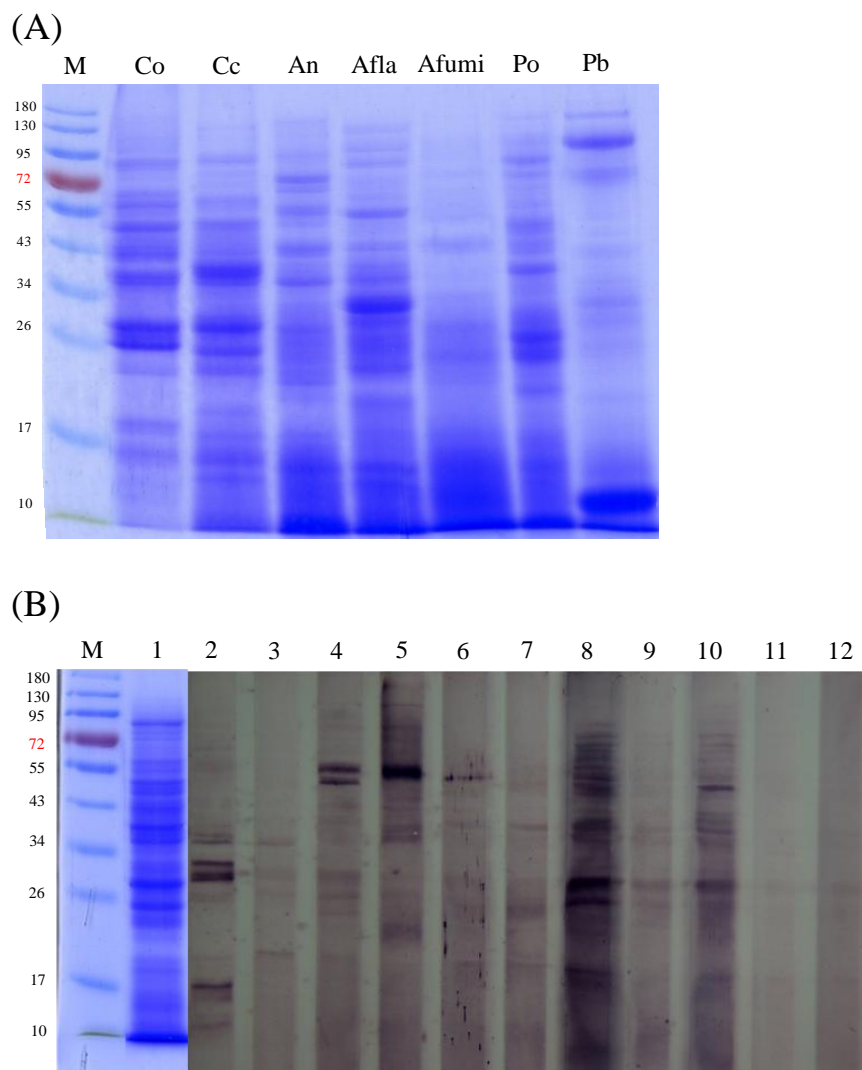
圖六、室內主要過敏原皮膚穿刺試驗結果。49 位受試者呈陽性反應之比例 (A)；三項不同過敏原對於個別呈陽性反應之受試者的盛行率 (B)。Cra 為蟑螂； Dp 為塵蟎。

Figure 6. Skin prick test result of major indoor allergens. (A) The percentage of positive reaction to allergens among 49 subjects. (B) The prevalence of three allergens among positive reaction subjects. Cra: cockroach, Dp: dust mite.



圖七、七種致過敏真菌在 63 位偽陰性患者之個別盛行率。

Figure 7. The prevalence of 7 allergenic fungi in 63 false negative patients.



圖八、以考馬斯藍染色之七種真菌 SDS-PAGE 電泳分析圖 (A)；以免疫轉漬法分析 *Cladosporium cladosporioies* 蛋白粗萃物與過敏患血清之 IgE 反應 (B)。Lane M: prestained protein marker；Lane 1: *C. cladosporioies* 蛋白粗萃物；Lanes 2-10: 9 位真菌過敏患者血清；Lanes 11-12: 負控制組血清。

Figure 8. (A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE of 7 fungi and (B) IgE immunoblotting of *Cladosporium cladosporioies*. Lane M: prestained protein marker, Lane 1: crude protein extract of *C. cladosporioies*, Lanes 2 to 10: nine mold allergic patients' sera, Lanes 11 to 12: normal serum control.

附錄一 室內空氣中總真菌數檢測方法。

Appendix 1. Detection method of total fungal concentration in indoor .

### 室內空氣中總真菌數檢測方法

中華民國 97 年 12 月 23 日環署檢字第 0970102006A 號公告

自中華民國 98 年 4 月 15 日起實施

NIEA E401.11C

#### 一、方法概要

本方法係使用衝擊式採樣器抽吸適量體積之空氣樣本，直接衝擊於適合真菌生長之培養基上。並於  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  培養  $4\pm 1$  天生長後，計數培養基上真菌之總菌落數，以計算一立方公尺空氣中之總真菌數。

#### 二、適用範圍

本方法適用於室內場所空氣中總真菌數之檢測。

#### 三、干擾

(一) 採樣器之幫浦及蓄電池功能異常或功率衰減，造成採樣器操作時流量變異，將影響微粒注入。

(二) 空氣體積計算的誤差可能來自流量誤差及(或)採樣時間測量。

通常以流量控制設備用以減少空氣體積計算的誤差，此外亦可使用計時器將採樣時間測量的誤差減至最小。

(三) 採樣器不可直接放置於空調進出口下方或正對空調進出口。

(四) 細菌數量過多可能影響總真菌數之判讀與計數。

#### 四、設備

- (一) 可攜型衝擊式採樣器。
- (二) 培養箱：溫度能保持保持  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  者者。
- (三) 加熱板：可調溫度，並附磁石攪拌功能者。
- (四) 天平：能精稱至 0.01 g 者。
- (五) 菌落計數器：用於計算菌落數目。
- (六) 乾熱滅菌器（烘箱）：用於玻璃器皿等用具之滅菌。溫度能保持  $160^{\circ}\text{C}$  達 2 小時或  $170^{\circ}\text{C}$  達 1 小時以上者。
- (七) 高壓滅菌釜：能以中心溫度  $121^{\circ}\text{C}$ （壓力約  $15\text{ lb/in}^2$  或  $1.1\text{ kg/cm}^2$ ）滅菌 15 分鐘以上者。
- (八) 培養皿：選用適合於採樣器之滅菌玻璃培養皿或市售無菌塑膠培養皿，底面平滑無氣泡、刮傷或其他缺點者。塑膠培養皿，底面平滑無氣泡、刮傷或其他缺點者。
- (九) 三角錐瓶：一般使用 250 至 2000 mL 能耐高壓滅菌之硼矽玻璃製品。
- (十) 冰桶：溫度能保持在  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  者。
- (十一) 水浴槽：溫度能保持在約  $48 \pm 2^{\circ}\text{C}$  者。
- (十二) 無菌操作檯。
- (十三) 流量校正器。

## 五、試劑

(一) 試劑水：蒸餾水或去離子水，導電度在 25°C 時小於 2  $\mu\text{mho} / \text{cm}$  ( $\mu\text{S} / \text{cm}$ )。

(二) 培養基

1. 麥芽抽出物(Malt extract)之培養基 (Malt Extract Agar)

每一公升之 Malt extract Agar 培養基含下列成份：

麥芽 (Maltose)	12.75 g
糊精 (Dextrin)	2.75 g
甘油 (Glycerol)	2.35 g
蛋白 (Peptone)	0.78 g
瓊脂 (Agar)	15.0 g

將上述成分 33.6 g 溶於 1 公升蒸餾水中 pH=4.7  $\pm$  0.2 (在 25 °C)，經 121°C 滅菌 15 分鐘。置於 48  $\pm$  2°C 的水浴槽中冷卻，冷卻後分裝適量之培養基至 培養皿中，置於室溫下凝固，保存期限 14 天。

2. 培養基添加細菌抑制劑氯黴素 (Chloramphenicol, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，可抑制細菌生長，減少細菌的污染。配置方法：秤取 100 mg 氯黴素溶於 2 mL 95% 酒精 (ethanol)，全數加入滅菌完成溫度已降至 50°C 之五、(二)1.所述麥芽抽出物培養基，

混合均勻後，分裝適量之培養基至培養皿中，置於室溫下凝固，保存期限 14 天。

(三) 70%酒精：消毒擦拭用。

## 六、採樣與保存

(一) 採樣前應先進行室內場所之調查及現場觀察，發現有滲漏水漬跡，微生物生長痕跡，抱怨有不適感的地方，及公眾聚集進出或聚集量高之場所，皆應列為優先採樣地點，以能採得代表性之樣品。

(二) 採樣前應先行評估微生物濃度之範圍（如先行預採或文獻查詢等），濃度太高應減少採樣的時間，濃度太低應增加採樣的時間，以免正式採樣時濃度太高或偏低。

(三) 進行採樣點規劃時，原則上每 500 - 1000 平方公尺採集 1 點，所選定之採樣點以能涵蓋高、中、低樓層或左、中、右區段為宜。但採樣人員可視場所內不同樓層或不同分區之公眾使用情形及環境狀況（如六、(一)所述列為優先採樣之地點），增加採樣點數目。

(四) 進行採樣時段規劃時，應充分考量該場所不同營運之特性，可選擇 2 至 4 個不同時段。採樣時段應包括室內空氣品質最惡劣的情況（如人潮最多的時候）。採樣點之佈置應避開如電梯出



入口、走道等人行干擾，或如吸煙區、影(打)印室等其他污染物干擾的位置，並選擇受干擾影響最小之處採樣。

(五) 室內場所可能有不同的個別通風及空調系統分區，採樣點應平均分佈於不同分區中。採樣點應距離其區隔(如牆壁)或角落最少 50 公分以上。

(六) 採樣前應先進行採樣器的流量校正。校正時應置入充填有培養基的培養皿，以校正器調整採樣器流量至原製造廠商建議之設計流量。

(七) 採樣前先以 70% 酒精擦拭採樣器放置培養基之部位。

(八) 採樣前、後培養皿應避免於運送或搬運期間受到污染(如以石蠟膜(paraffin)或透氣膠帶封存等)，並保存於  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  的冰桶中。

## 七、步驟

(一) 採樣時應將採樣器置於平台處，不可以人員手持採樣器方式進行採樣，以避免採樣人員本身造成的污染。採樣器應置於距離地面約 120 至 150 公分之高度。應紀錄採樣時採樣器流速、採集時間和收集空氣樣品之體積等，並同時記錄採樣點環境之溫度及溼度。

- (二) 採樣時將含培養基之培養皿放置於採樣器內，設定抽取適量之空氣體積，以衝擊方式將生物氣膠微粒收集到培養基上，最佳量之菌落數為 10 - 100 個菌落之間，但抽吸時間不可超過 10 分鐘，以免造成微生物因脫水乾燥而無法培養。採樣皆需進行二重複，採樣後應於 24 小時內運送至實驗室培養。設備空白樣品應將含培養基之培養皿置入採樣器內，置放時間與樣品採樣時間相同，但不進行抽氣。
- (三) 進行下一個採樣前，需再以 70% 酒精擦拭採樣器放置培養皿之部位後，才能進行下一次的採樣。
- (四) 採樣後將培養皿置於  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  培養箱內培養  $4\pm 1$  天。即培養 3 天後需注意菌落生長情形，以利紀錄數據。但應注意菌落計數前，應儘可能不去擾動生長在培養基上的黴菌菌落，以免孢子飛散形成新的菌落，造成計數不正確。
- (五) 檢測人員應具備區別細菌和真菌之能力（如觀察菌落型態及特徵或進行革蘭氏染色等），或選用五（一）2.所述之添加氯黴素的麥芽抽出物培養基，以使總真菌數之計數更為正確。
- (六) 計數各培養皿中所產生的真菌菌落，並記錄之。若菌落太多或雜菌菌落數太多造成判讀困難，則以”菌落太多無法計數”（Too numerous to count；TNTC）表示。

## 八、結果處理

- (一) 二重覆的兩個培養皿真菌菌落數相加計算其平均值。惟使用單  
(多) 階多孔洞採樣器 (Single or Multi-stage multi-orifice sampler) 之菌落數計算方式，應於完成菌落計數後，參照採樣器原製造廠商提供之校正表 (positive hole correction table) 先行換算，再計算其平均值。
- (二) 平均值除以採樣時所抽取之總空氣體積(需以採樣前後之平均流量求取總空氣體積)，得到一立方公尺空氣中總真菌數的濃度，單位以 CFU/m<sup>3</sup> (colony forming unit/cubic meter) 表示。
- (三) 檢測紀錄須註明採樣時間、培養起始及終了時間、培養基名稱、培養溫度等。

## 九、品質管制

- (一) 微生物採樣人員及檢測人員應具備微生物基本訓練及知識。
- (二) 進行微生物檢測時，所用的盛裝器具均應經滅菌處理。
- (三) 每次採樣時，應進行運送空白。每批次需進行一次設備空白。  
空白樣品經培養後均不得檢出。
- (四) 每個採樣點需至少進行二重複。
- (五) 培養基需保存於 4± 2°C，保存期限不得超過 14 天。

(六) 採樣器需進行採樣前之流量校正及採樣後之流量量測，所測得之流量前後差異不得超過 $\pm 10\%$ 。且流量校正器需定期一年校正一次。

#### 十、精密度與準確度

略

#### 十一、參考文獻

- (一) American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment, AGGIH, Cincinnati, 1989.
- (二) American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Bioaerosols: Assessment and Control, AGGIH, Cincinnati, 1999.
- (三) American Conference of Governmental Industrial Hygienists. “1994-1995 Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices.” ACGIH, Cincinnati, 1994.
- (四) Hung, L.-L., Miller, J. D., Dillon, H. K., Field guide for the determination of biological contaminants in environmental samples (2nd Edition) . AIHA. 2005.
- (五) Standard guide for using probability sampling methods in studies of indoor air quality in buildings (D5791-95) . ASTM Standards on indoor air quality. ASTM , 2002.

- (六) Storey, E., Guidance for clinicians on the recognition and management of health effects related to mold exposure and moisture indoors. UConn Health Center. 2004.
- (七) World Health Organization (WHO). Ambient air quality monitoring and assessment. Guidelines for air quality. Geneva. WHO 82-104, 2000
- (八) Yang, C. S., Heinsohn, P., Sampling and analysis of indoor microorganisms. John Wiley & Sons, Inc. publication. 2007.
- (九) 蘇慧貞。室內空氣品質調查評估：都會區辦公大樓之室內空氣品質調查與建立室內空氣品質之可行性，行政院環境保護署 87 年度科技發展研究, 1998。
- (十) 香港特別行政區政府室內空氣質素管理小組，辦公室及公眾場所室內空氣質素管理指引, 2003。

附錄二 優勢菌種特徵鑑定。

Appendix 2. Characterization of seven domination fungi.

*Cladosporium oxysporum* Berk. & M.A. Curtis

菌落形態:

在 25°C 下於 PDA 培養基培養 14 天，菌落為綠褐色、深灰色或灰褐色天鵝絨般絮狀，菌落邊緣呈灰褐色至白色羽毛狀，規則的稀疏氣生菌絲；培養基背面菌落為綠褐色或深灰色。菌落呈低凸狀。

顯微特徵:

分生孢子梗淺棕色至灰棕色，外表平滑，直線或略微扭曲，中間或末端會略微膨脹，無側分支，長  $64 - 493 \times 4 - 6 \mu\text{m}$ 。分生孢子為淺棕色橢圓形或檸檬形或骨頭狀圓柱形，壁厚，大小  $4 - 18 \times 3.2 - 5.6 \mu\text{m}$ ，外表平滑。分生孢子形成分枝狀短鏈。

*Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries

菌落形態:

在 25°C 下於 PDA 培養基培養 14 天，菌落生長直徑約 2 公分，表面呈絨狀或粉粒狀，常有褶皺，呈橄欖綠至橄欖褐色，背面呈橄欖墨色。

顯微特徵:

分生孢子柄筆直偶有彎曲，呈灰橄欖褐色， $88 - 200 \times 4.0 - 4.5$

$\mu\text{m}$ ，窄柱形至柱形，偶而呈絲狀，無膨大，末端與側邊有分支承接分支之分生孢子鏈。分生孢子數量多易釋出， $4.8 - 25.6 \times 2.8 - 4.4$   $\mu\text{m}$ ，呈橄欖褐色，橢球狀、檸檬形至狗骨頭狀長圓柱形，壁表光滑或有輕微疣凸，單細胞，偶有深色橫隔，兩極有深色疤。

### *Aspergillus flavus* Link

菌落形態:

在  $25^{\circ}\text{C}$  下於 PDA 培養基培養 7 天，菌落生長直徑約 5 公分，表面有不規則皺褶，分生孢子柄頂端膨大形成輻射狀至柱形的分生孢子頭 (conidial head)，分生孢子豐富，顏色從黃色、深黃至橄欖綠。菌絲呈白色，菌落背面暗黃色至奶黃色。

顯微特徵:

柄長  $110 - 780 \times 5.4 - 23$   $\mu\text{m}$ ，顯著粗糙。頂囊 (vesicle)  $11.1 - 60.0$   $\mu\text{m}$  寬，呈球形、近球形、梨形至橢圓形。頂囊上 Aspergilli 通常兩輪生，單輪生或同一頂囊兼具兩種形式較少，梗基 (metulae) 或瓶梗覆蓋頂囊  $3/4$  至全部表面，梗基大小  $4.0 - 21.4 \times 2.8 - 9.1$   $\mu\text{m}$ ，瓶梗大小  $5.6 - 13.5 \times 2.4 - 5.4$   $\mu\text{m}$ 。分生孢子 (conidia) 呈圓形至橢圓形，略粗糙至粗糙， $3.0 - 5.6 \times 2.4 - 5.1$   $\mu\text{m}$ 。有時存在菌核 (sclerotia)，球形至近球形，深褐色至黑色。

### *Aspergillus niger* van Tieghem

菌落形態:

在 25°C 下於 PDA 培養基培養 14 天，菌落生長直徑約 5 公分，表面呈羊毛絨狀或顆粒狀，通常有溝紋。分生孢子頭 (conidial head) 深褐色至橘黃色，呈輻射狀至開裂成數個柱形。菌絲呈白色，背面呈象牙黃至橘黃色。灰色無光澤。無色素沉澱。

顯微特徵:

柄長 2,210 - 2,460 × 4.4 - 24.µm，光滑無色至灰黃棕色。頂囊 (vesicle) 16.0 - 80.0 µm 寬，呈球形。Aspergilli 兩輪生，梗基 (metulae) 覆蓋頂囊 3/5 至全部頂囊表面。梗基大小 5.6 - 58.0 × 3.8 - 13.1 µm，少有橫隔。瓶梗大小 3.6 - 14.3 × 2.4 - 5.2 µm。分生孢子 (conidia) 略呈球形至球形，呈粗糙或有不規則之脊或條紋，大小 3.2 - 4.8 µm。

### *Aspergillus fumigates* Fresenius

菌落形態:

菌落以 PDA 培養呈煙灰綠色，成熟後期轉為青綠色，生長快速。質地為毛絨絮狀上帶有些許顆粒。

顯微特徵:

菌絲為透明有隔板。分生孢子梗，壁光滑，無色，長 88 - 440 × 4 - 12 µm。頂囊 6.4 - 24.0 µm 寬。瓶梗排列為緊密的單列，覆蓋頂囊 1/2 至 2/3 表面，大小 4.4 - 11.2 × 2.0 - 4.0 µm。分生孢子頂端為緊密



柱狀，表面細緻粗糙，近球形，大小 2.4 - 3.8  $\mu\text{m}$ 。

### *Penicillium oxalicum* Currie & Thom

菌落形態:

以 MEA 培養菌落呈平面，絮狀，邊全緣。白色菌絲。大量分生孢子，呈深綠色或灰綠色。表面滲液及有可溶性色素產生。

顯微特徵:

分生孢子柄從表面菌絲長出，柄長 100 - 300  $\times$  3.2 - 4.0  $\mu\text{m}$ ，光滑厚壁。帚狀分生孢子柄 (penicilli) 大部分為兩輪生、少數單輪生。梗基光滑以 2 - 3 (5) 個輪生，15.5 - 21.8  $\times$  3.2 - 3.9  $\mu\text{m}$ ；瓶梗呈光滑瓶形至圓柱體，以 5 - 7 個輪生，9.6 - 12.8  $\times$  2.8 - 3.2  $\mu\text{m}$ 。瓶梗束短，大部份非常窄。分生孢子呈橢球形，有時呈球形，平滑至略粗糙，薄壁，大小 2.4 - 6.0  $\times$  2.4 - 4.0  $\mu\text{m}$ 。

### *Penicillium brevicompactum* Dierckx

菌落形態:

在 25°C 下於 PDA 培養基培養 14 天，菌落生長直徑約 2 公分，隆起褶皺，表面呈緻密絨毛狀或毛狀，有溝紋，全緣。產孢豐富，顏色從綠灰色至灰綠色。菌絲呈白色、菌落背面顏色為黃灰至灰黃色。

顯微特徵:

分生孢子柄從表面菌絲或氣生菌絲中長出，柄長 23 - 260  $\times$  2.8 - 5.1

$\mu\text{m}$ ，光滑無色。帚狀分生孢子柄 (penicilli) 大部分為三輪生，較少兩輪生、單輪生或不規則。歧支孢子梗 (rami) 光滑，每群 1 - 2 個， $12.4 - 189.0 \times 3.4 - 4.0 \mu\text{m}$ ；梗基光滑以 2 - 4 個輪生， $9.5 - 14.7 \times 3.6 - 5.1 \mu\text{m}$ ；瓶梗呈光滑瓶形，以 3 - 7 個輪生， $6.6 - 10.5 \times 2.4 - 3.3 \mu\text{m}$ 。分生孢子呈球形、近球形至橢圓形，薄壁無色，略粗糙至粗糙，大小  $2.8 - 7.1 \times 2.4 - 4.0 \mu\text{m}$ 。

附錄三 七種優勢菌種 rDNA ITS 序列。

Appendix 3. rDNA ITS sequences of seven domination fungi.

>*Cladosporium oxysporum*

AAGTGACCCCGGTCTAACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTT  
GTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGG  
GGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCT  
GAGTAAACTTAATTAATAAATTAATAAACTTTTAACAACGGATCTCT  
TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA  
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA  
CATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT  
CATTTCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCC  
GCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAG  
CGTTGTGGAAACTATTCGCTAAAGGGTGCTCGGGAGGCTACGC  
CGTAAAACAAACCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG  
GATACCCG

>*C. cladosporioides*

AGTGACCCCGGTTTACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGT  
CCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGG  
CTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGA  
GTAAACTTAATTAATAAATTAATAAACTTTTAACAACGGATCTCTTG  
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT  
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA  
TTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA  
TTTCACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGC  
CGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCG  
TTGTGGAAACTATTCGCTAAAGGGTGCTCGGGAGGCTACGCCGT  
AAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT  
ACC

>*Aspergillus niger*

TTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGTCT  
ATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTCGGCCGCC  
GGGGGGGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACC  
CCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTG  
AATGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCG

GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATT  
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC  
CCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGC  
CCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGG  
GGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCC  
TCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGG  
CGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGG  
ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

>*A. flavus*

GATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTG  
ACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCT  
GCCTTTGGGGCCCCGTCCCCCCCCGGAGAGGGGACGACGCCA  
ACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAG  
GCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG  
ACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCAT  
TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGT  
TGAAAGTTTTAACTGATTGCGATAACAATCAACTCAGACTTCACT  
AGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCCG  
GGGCTGAGAGCCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCCGCCGA  
AGCAACTAAGGTACAGTAAAC

>*A. fumigatus*

TTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTCT  
ATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGTTTCGACGGCCGC  
CGGGGAGGCCTTGCGCCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACC  
CCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTA  
TCGTAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGG  
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG  
CAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC  
CCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC  
CTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCCGTCCCCCTCTCCCGG  
GGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCT  
CGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCTGCTCTGTAGGCCCGGCCGGC  
GCCAGCCGACACCCAACCTTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCGGAT  
CAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA

>*Penicillium oxalicum*

CTTCCGTAGGGGGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGG  
GCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATCGTACCTTGTT  
GCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGGGCATCCGCC  
CCGGGCCCGCGCCCCGCCGAAGACACACAAACGAACCTCTTGCTCT  
GAAGATTGCAGTCTGAGTACTTGACTAAATCAGTTAAAACCTTTC  
AACAAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCG  
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG  
AGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCAT  
GCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGT  
TGGGCTCTCGCCCCCGCTTCCGGGGGGCGGGGCCCGAAAGGCA  
GCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTC  
ACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCCGCCGGCGAACACCAT  
CAATCTTAACCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCT  
GAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

>*P. brevicompactum*

TGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACC  
TCCCACCCGTGTTTATTTACCTTGTTGCTTCGGCGAGCCTGCCT  
TTTGGCTGCCGGGGGACGTCTGTCCCCGGGTCCGCGCTCGCCG  
AAGACACCTTAGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGATTAA  
ATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGG  
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTG  
CAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC  
TCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC  
CTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTCCGTCCTCCTTCCGGGG  
GACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCA  
AGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTTTGTAGGACTGGCCGGCGC  
CTGCCGATCAACCAAACCTTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGG  
TAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA