專　欄

探討結核桿菌北京株不同基因型與疾病傳播及抗藥性的相關性

張嘉茹　杜鴻運

國家衛生研究院　感染症研究組

時至醫藥發達的今日，結核病仍是全世界所關心的健康議題，根據世界衛生組織 (World Health Organization; WHO) 的估算，全球約有三分之一的人口曾受到結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的感染，每年約有三百萬人死於結核病。雖然結核病在台灣的發生率與死亡率從 1950 年後呈現穩定下降的趨勢，但在 2001 年卻仍有 14,486 個感染案例，每十萬人就有 65 人曾遭受到感染，因此，結核病在台灣仍是個需要高度監控的傳染性疾病[1]。

能夠造成感染的結核桿菌株有許多種，其中的北京株 (Beijing strain) 因具有快速的傳播能力，且常與結核病的大爆發有關[2-4]，因此備受全球關注。目前北京株的感染率佔全球結核桿菌感染案例的 10% 以上，在東亞及東南亞地區甚至高達 50 % 以上[3,5]，報導也指出具有多重抗藥性 (multiple drug resistance; MDR) 的菌株大多屬於北京株[4-6]。最近的研究發現全球主要的致病菌株是摩登型 (Modern strain) 北京株 (在染色體上的 *NTF* 基因有 IS6110 片段嵌入) [7-13]，但古老型 (Ancient strain) 北京株 (染色體上保留完整的 *NTF* 基因) 卻是日本主要的流行菌株[14,15]。我們之前的研究指出台北地區出現的結核桿菌北京株大多屬於摩登型北京株，推測經過時間的演化，摩登型北京株已經變成區域性的疾病了[16,17]，因此台灣地區北京株演化的調查，對於了解病菌為何具有高度致病性以及如何適應台灣地區的宿主條件都有很大的幫助。本篇研究利用單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphisms; SNPs) 變異[14,15]、在 NTF 基因上有無 IS6110 片段嵌入、有無大片段多型性基因 (RD105、RD207、RD181、RD142 和 RD150) 出現 [18,19] 以及在 DNA 修復基因 (*mutT2*、*mutT4* 和 *ogt*) 上有無非同義單核苷酸多型性 (non-synonymous

SNPs; nsSNPs) 出現[10]等方法來對樣本進行分析，最後再利用結核桿菌散置重複單位分析-變異性重複序列分析法 (Mycobacterium interspersed repetitive units -Variable number of tandem repeats; MIRU-VNTR) 將所有樣本進行分析[20]，推算患者間可能的流行病學關聯性。本篇的分析結果能夠幫助更加了解北京株的基因結構並能擴大從 VNTR 方法所得到的訊息。

結核桿菌北京株的分子多型性和抗藥性

所收集的 338 株北京株結核桿菌可再細分出九種亞型 (表一)，其中的 ST11 和 ST26 亞型株因具有完整的 RD181 變異區和 *NTF* 基因，因此在演化年齡上是相對古老的菌株，而其他的 ST3、ST10、ST19、ST22、ST25、STK 和本研究所發現的 STN 亞型，因為 RD181 變異區均有缺失，有些還同時有 IS6110 片段嵌入 *NTF* 基因，因此這些亞型株在演化年齡上是相對摩登的菌株[14,16,17,19]。在所發現的亞型株中以 ST10 (53.3%) 的出現率最高其次分別為 ST19 (14.8%) 及 ST22 (14.5%)，而這三株亞型均屬於摩登型北京株。

將所有 338 株臨床菌株進行藥物感受性試驗 (isoniazide、rifampicin、ethambutol 和 streptomycin)，若對上述

表一　各不同北京株分枝桿菌的抗藥性與次族群的特性

Beijing sublineage[1]	Allele in indicated SNP position of H37Rv:										Age	No.(%) of isolates of the indicated strain		
	797736	909166	147759	154814	169206	189201	237613	253261	282558	413782		S[3]	R[4]	MDR[5]
ST11 (4)	C	C	C	G	A	T	A	G	T	C	57.5	4 (100)	0	0
ST26 (27)	C	T	C	G	A	T	A	G	T	C	53.5	18 (66.7)	4 (14.8)	5 (18.5)
ST3 (13)	T	C	C	G	A	T	A	G	G	C	61.6	8 (61.5)	5 (38.5)	0 (0)
STK (4)	T	T	C	G	A	T	A	G	G	C	69	4 (100)	0 (0)	0 (0)
ST19 (50)	T	T	C	G	A	C	A	G	G	T	64.1	41 (82)	6 (12)	3 (6)
ST25 (7)	T	C	C	G	A	C	A	G	G	T	52.2	6 (85.7)	1 (14.3)	0 (0)
ST22 (49)	T	T	T	G	A	C	G	A	G	T	65.3	41 (83.7)	8 (16.3)	0 (0)
ST10 (180)	T	T	T	G	A	C	A	G	G	T	58.4	142 (78.9)	24 (13.3)	14 (7.8)
STN (4)[2]	T	C	T	G	A	C	A	G	G	T	63	3 (75)	1 (25)	0 (0)
Total (338)												267 (79)	49 (14.5)	22 (6.5)

[1]Types of sequence of Beijing sublineages; designations from Fillol et al: [5] and Iwamoto et al: [14].

[2]New sublineage found in this study.

[3]Sensitive to any one of the four anti-TB drugs.

[4]Resistant to any one of the anti-TB drugs.

[5]Resistant to isoniazid and rifampicin.

四種藥物均有感受性則標示為 S，若對其中任何一種藥物具有抗藥性則標示為 R，若同時對 isoniazide 和 rifampicin 具有抗藥性則標示為 MDR (表一)。結果顯示在北京株九種亞型中，ST26 亞型出現多重抗藥性菌株的比例 (18.5%) 較其他八種亞型高。

過去的研究指出，Ag85 複合體上的 *fbp*A 和 *fbp*B 基因的單核苷酸多型性可用來區分古老型北京株和摩登型北京株[21]，但本篇研究結果發現，只有 *fbp*B 基因上密碼子 238 的位置產生單核苷酸多型性變異可用來區分是否為摩登型北京株 (表二)。本研究並檢測與 DNA 修復相關的基因 (*mutT2*、*mutT4*、*ogt12* 和 *ogt37*) 是否有錯譯突變存在，結果發現上述四個基因在所有摩登型北京株亞型中 (ST3、ST10、ST19、ST22、ST25、STK 和 STN) 均有不同比例的突變出現，而古老型北京株亞型 ST11 和 ST26 在這四個基因中並無任何的突變產生，這樣的結果推論，摩登型北京株的菌株其與 DNA 修復相關的基因都有突變存在，但這些突變與多重抗藥性的產生並無相關 (表一)。另外，ST10 亞型有相對高的群組形成率，表示其具有高度的傳染力。

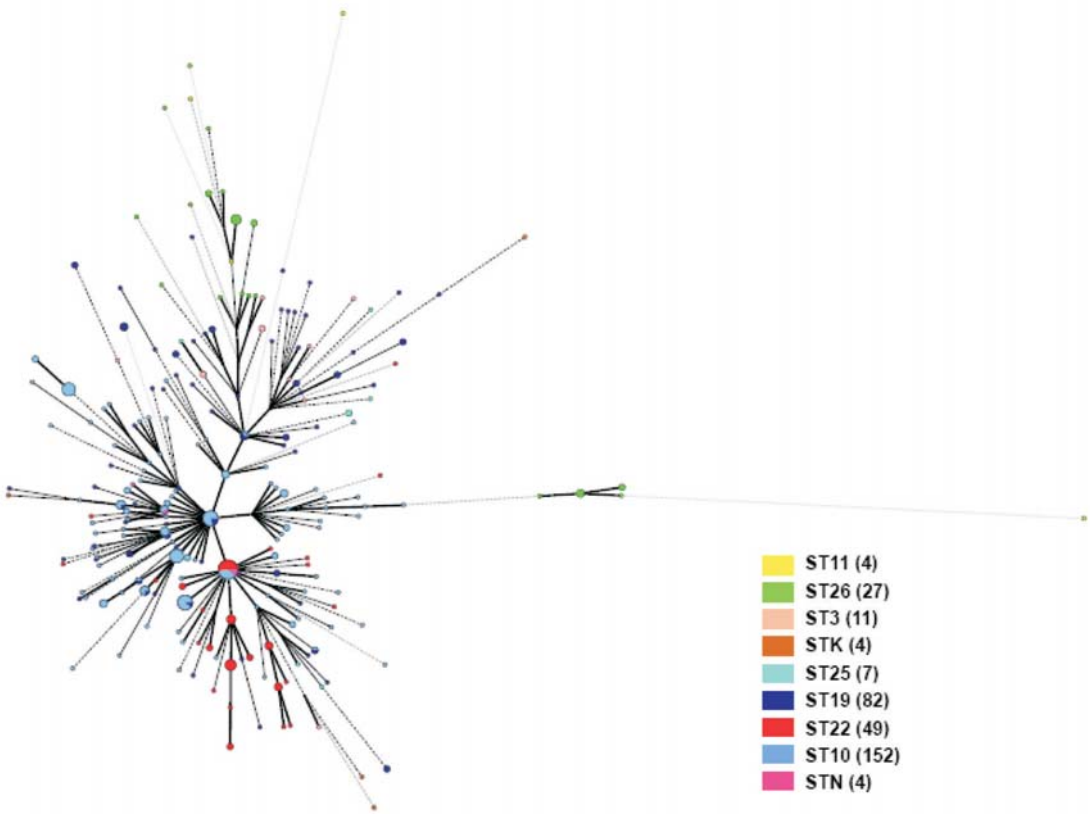
MIRU-VNTR 和 RD 分型將北京株進行演化分類

利用 24 個基因位點的 MIRU-VNTR 分析法將實驗樣本進行群組分類 (圖一)，結果發現此法對於摩登型北京株的解析力不佳，無法將摩登型北京株做進一步的細分，此與之前日本研究團隊所發表結果相近[22]。而古老型北京株 ST11 和 ST26 在最小生成樹 (minimal spanning tree; MST) 中的

表二　各不同北京株分枝桿菌的相關基因特性

Beijing sublineage	% of N branch[1]	Point mutations in indicated putative repair genes (%)				SNP in fbpA[156] and fbpB[238] (%)		No. of cluster	No. of cases in cluster	No. of VNTR pattern
		Mut2	Mut4	Ogt12	Ogt37	fbpA[156]	fbpB[238]			
ST11 (4)	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	4
ST26 (27)	100%	0	0	0	0	30	0	5	13	19
ST3 (13)	77%	0	15	0	0	8	78	2	4	11
STK (4)	75%	0	25	0	0	0	50	0	0	4
ST19 (52)	71%	12	98	0	58	0	98	5	10	47
ST25 (7)	57%	0	86	0	43	0	100	1	2	6
ST22 (49)	4%	100	100	100	100	100	98	8	32	25
ST10 (180)	2%	99	99	99	1	0	99	25	71	134
STN (4)	0%	100	100	100	0	0	50	1	2	3

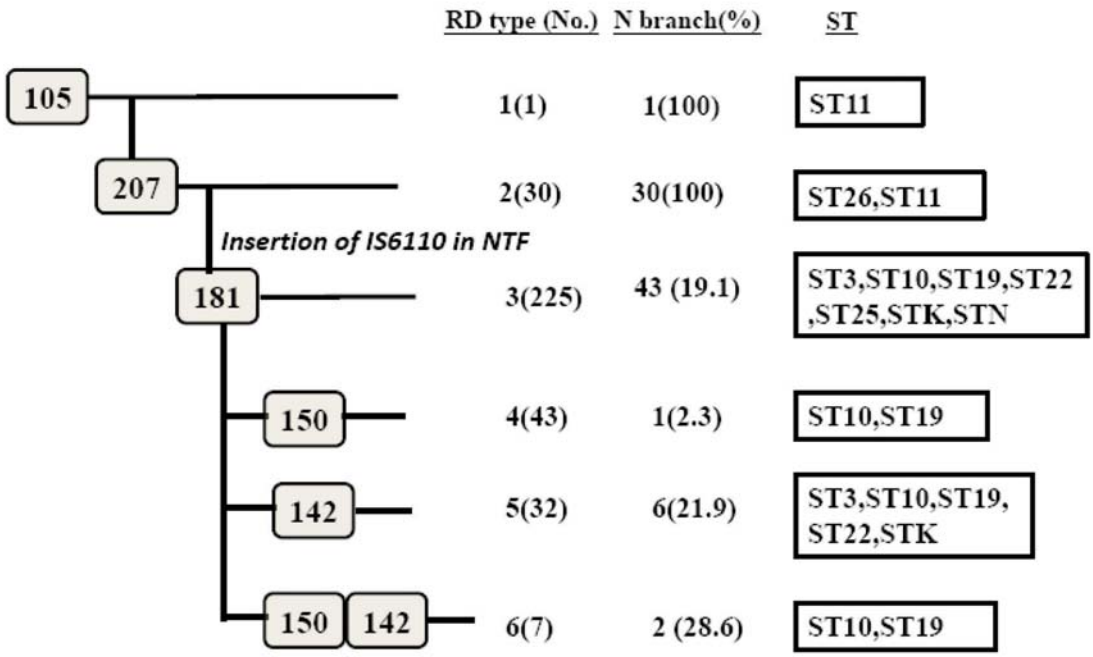
[1]Defined by IS6110 insertion in the NTF region



圖一　以 24-MIRU-VNTR 基因型分析 338 株北京型分枝桿菌之演化圖形

位置遠離其他北京株亞型，表示 ST11 和 ST26 與摩登型北京株只有遙遠的基因關係。

為了更有效的重現變異區 (RD) 分析所呈現的演化結果，我們加入所有樣本的單核苷酸多型性分析結果進行進一步的解析。RD 群組 1 (RD105 變異區有缺失)，只有 1 個 ST11 亞型的菌株屬於此群組；RD 群組 2 (DR105 和 RD207 變異區有缺失)，30 個 ST11 和 ST26 亞型的菌株屬於此；RD 群組 3 (RD105、RD207 和 RD181 變異區有缺失)，225 個分屬 ST3、ST10、ST19、ST22、STK 和 STN 亞型的菌株屬於此；RD 群組 4 (RD105、RD207、RD181 和 RD150 變異區有缺失)，43 個 ST10 和 ST19 亞型的菌株屬於此；RD 群組 5 (RD105、RD207、RD181 和 RD142 變異區有缺失)，32 個分屬 ST3、ST10、ST19、ST22 和 STK 亞型的菌株屬於此；DR 群組 6 (RD105、RD207、RD181、RD142 和 RD150 變異區有缺失)，7 個 ST10 和 ST 19 亞型的菌株屬於此。在 RD 群組 1 和 2 中，RD181 變異區並無缺失，在 *NTF* 基因上也無 IS6110 片段嵌入，表示此兩群組為相對古老的北京株群組 (圖二)。



圖二　結核桿菌北京株各菌株間的關係[5,14]

結語

結核桿菌北京株為何能在全球成功的散播，原因還不清楚，推測可能和不同的宿主相關因素有關，例如：人類族群的遷移[9]、全球 BCG 疫苗的普及所造成的選擇性壓力、對於抗藥性菌株無效的治療等，均會增加結核桿菌的傳播時間。另外，細菌對於壓力環境有高度的適應性可能也是原因之一，例如：宿主免疫反應的馴化或是抗結核桿菌藥物的使用，使得細菌的突變機率增加進而提高其生存率，對細菌而言反而是一個有利的選擇條件。在北京株中與 DNA 修復相關的基因如：*mutT2*、*mutT4* 和 *ogt* 等都存在有獨特的錯譯突變[10]，但最近的研究結果指出 *mutT2* 與 DNA 的修復無關，其功能與有效調節細胞苷三磷酸 (cytidine-triphosphate; CTP) 的利用有關，或許這是北京株能夠表現突變 *mutT2* 基因的原因[23]，而摩登型北京株的傳播率和感染率近年來有逐漸上升的趨勢，推論和 *mutT2* 及 *mutT4* 基因突變有關[24]。本研究發現除了 ST11 和 ST26 亞型外，所有北京株的 *mutT2*、*mutT4* 和 *ogt* 基因均有突變產生，但這些基因的突變與菌株多重抗藥性的產生並無相關。本篇研究也發現，ST26 亞型的菌株產生多重抗藥性的機率較其他亞型的菌株高。另外研究結果顯示古老型北京株來自兩

個不同的起源 (圖一)，這與 Dr. Wada 團隊之前的研究結果相似[22]，但這雙起源的可能性還需要再做進一步的研究。

之前的分析顯示傳統亞型 ST1 為台灣地區北京株最主要的型式[16]，近年來由於生物技術的進步讓我們可以再細分出 ST3、ST10、ST19、ST22 和 ST25 等數種亞型，這些摩登型北京株因具有高度傳染力因此可以快速的在全球各地散播，過去有研究指出 BCG 疫苗的接種對摩登型北京株而言是一種正向的選擇壓力[12]，本研究結果支持這樣的論點。

我們之前的研究結果指出結核桿菌在台灣地區主要的流行菌株為摩登型北京株[16,17]，最近的研究發現，80% 的摩登型北京株會產生大量的酚醣脂 (phenolic glycolipid; PGL)，其會抑制宿主細胞前發炎因子的產生，推測北京株因此較具致病性[25]。結核桿菌所產生的 Ag85 複合體可以幫助其逃脫宿主的免疫防禦機制[26]，雖然 Dr. Chuang 的研究團隊指出，檢測 Ag85 複合體內 *fbp*A 和 *fbp*B 基因的單核苷酸多型性變異可以區分出古老型和摩登型北京株[21]，但本研究發現，只有 *fbp*B 基因的單核苷酸多型性分析有此區分功能。本研究證實大多數北京株的 *mutT* 基因有突變存在且在 RD181 變異區有缺失產生。雖然 ST26 亞型的北京株產生多重抗藥性的比例偏高，但此亞型菌株的 *mutT2*、*mutT4* 和 *ogt* 基因並無單核苷酸多型性變異存在，表示這些基因與多重抗藥性的產生並無相關。本研究顯示不同的北京株族群對於宿主免疫反應及藥物的適應機制均不相同。

參考文獻

1. Center for Disease Control, DOH, Taiwan: Tuberculosis Annual Report 2002:22-8.
2. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, et al: Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* w-Beijing family strains. Trends Microbiol 2002;10:45-52.
3. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al: *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: Mining the fourth international spoligotyping database (spoldb4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol 2006;6:23.
4. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al: Worldwide occurrence of Beijing/w strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review. Emerg Infect Dis 2002;8:843-9.
5. Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, et al: Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. J Clin Microbiol 2003;41:1963-70.
6. Drobniewski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V, et al: Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. JAMA 2005;293:2726-31.
7. Kurepina NE, Sreevatsan S, Plikaytis BB, et al: Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS6110 elements in *Mycobacterium tuberculosis*: Non-random integration in the dnaa-dnan region. Tuber Lung Dis 1998;79:31-42.
8. Mokrousov I, Jiao WW, Valcheva V, et al: Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. J Clin Microbiol 2006;44:2851-6.
9. Mokrousov I, Ly HM, Otten T, et al: Origin and

primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: Clues from human phylogeography. Genome Res 2005;15:1357-64.

10. Ebrahimi-Rad M, Bifani P, Martin C, et al: Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the w-Beijing family. Emerg Infect Dis 2003;9:838-45.
11. Hanekom M, van der Spuy GD, Gey van Pittius NC, et al: Evidence that the spread of *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype is human population dependent. J Clin Microbiol 2007;45:2263-6.
12. Kremer K, van-der-Werf MJ, Au BK, et al: Vaccine-induced immunity circumvented by typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains. Emerg Infect Dis 2009;15:335-9.
13. Mokrousov I, Jiao WW, Sun GZ, et al: Evolution of drug resistance in different sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:2820-3.
14. Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, et al: Population structure analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family indicates an association between certain sublineages and multidrug resistance. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:3805-9.
15. Wada T, Iwamoto T, Maeda S: Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in east Asia revealed through refined population structure analysis. FEMS Microbiol Lett 2009;291:35-43.
16. Dou HY, Tseng FC, Lin CW, et al: Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Mycobacterium tuberculosis* in Taipei. BMC Infect Dis 2008;8:170.
17. Dou HY, Tseng FC, Lu JJ, et al: Associations of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes with different ethnic and migratory populations in taiwan. Infect Genet Evol 2008;8:323-30.
18. Plikaytis BB, Marden JL, Crawford JT, et al: Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain w of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1994;32:1542-6.
19. Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, et al: Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights from genomic deletions in 100 strains. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:4865-70.
20. Supply P, Allix C, Lesjean S, et al: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2006;44:4498-510.
21. Chuang PC, Chen YM, Chen HY, et al: Single nucleotide polymorphisms in cell wall biosynthesis-associated genes and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* lineages. Infect Genet Evol 2010;10:459-66.
22. Wada T, Iwamoto T: Allelic diversity of variable number of tandem repeats provides phylogenetic clues regarding the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family. Infect Genet Evol 2009;9:921-6.
23. Moreland NJ, Charlier C, Dingley AJ, et al: Making sense of a missense mutation: Characterization of mut2, a nudix hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis*, and the g58r mutant encoded in w-Beijing strains of *M. tuberculosis*. Biochemistry 2009;48:699-708.
24. Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, et al: A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. J Clin Microbiol 2007;45:1483-90.
25. Reed MB, Domenech P, Manca C, et al: A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. Nature 2004;431:84-7.
26. Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, et al: Disruption of the genes encoding antigen 85a and antigen 85b of *Mycobacterium tuberculosis* h37rv: Effect on growth in culture and in macrophages. Infect Immun 2000;68:767-78.