

結核分枝桿菌東非印度株在台灣、新加坡及柬埔寨之遺傳多樣性

張嘉茹 杜鴻運

財團法人國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

儘管自 1950 年以來，結核病的發病率和死亡率持續下降，但它仍舊是目前全球重大的公共衛生問題，也是台灣地區主要的傳染性疾病。在結核菌的亞型中，北京株 (Beijing) 是許多亞洲地區國家，包括台灣、日本、韓國、中國、泰國、新加坡等的主要盛行菌株，而北京株常與多重抗藥性及致病性有密切的關連性。結核菌另一個常見的亞型東非-印度 (EAI) 株，首次是在幾內亞比紹被發現，是最古老的 MTB 菌株之一，在許多亞洲國家也是盛行很高的結核菌菌株。Wirth 等人利用統計和實驗數據推算，結核分枝桿菌存在的時間大約有 4 萬年，與人類從非洲大陸往外擴展的時間一致。他們的研究結果顯示，大約在 1 萬年前 EAI 株和拉丁美洲-地中海 (LAM) 株出現，並從美索不達米亞擴散出去。而最近的研究顯示 EAI 株在北迴歸線及赤道地區國家，

如印度 (64.3%)、孟加拉 (60%)、緬甸 (48.4%)、越南北部 (38.5%)、台灣南部 (32.1%)、新加坡 (25.6%) 及阿拉伯 (23.8%) 等都有很高的盛行率。在某些熱帶地區國家中 EAI 株有著更高的盛行率，但其原因未知，可能與社區衛生、人口密度、卡介苗接種、宿主免疫力、細菌致病機制等環境與生物性因素有關。因此，了解造成結核菌感染與傳播的主要因素，對於疾病的預防與疫苗的研發有著絕對的重要性。Chen 等人最近的研究結果發現，台灣地區的 EAI 株會誘發大量的促發炎激素 (Proinflammatory cytokine) 分泌，而現代型北京株 (Modern Beijing) 所誘發促發炎激素的量反而不高，這樣的結果或許可以推論台灣地區北京株較 EAI 株盛行的原因。

本研究目的有：1. 分析台灣、新加坡與及柬埔寨三個地區 EAI 株

基因分型的結果，估算這些熱帶亞洲國家間潛在的流行病學關聯。2. 推算 EAI 株高盛行地區之散置重複單位 (MIRU) 位點的多樣性指數 (HGDI) 值，藉以快速區分結核菌北京株與 EAI 株的不同。

台灣、新加坡及柬埔寨結核菌 EAI 株的特徵

本研究收集 2007 年至 2008 年間，台灣地區 325 位病人檢體所分離出來之結核桿菌進行 Spoligotyping 與 MIRU-VNTR 分型。結果顯示台灣地區盛行率最高的為北京株 (40%) 其次是 EAI 株 (21.85%)。將此分析結果與 2007~2008 年間，熱帶國家新加坡與柬埔寨的資料進行比較，發現柬埔寨 EAI 株的盛行率顯著偏高 (60%)，而新加坡 EAI 株的群聚率 (Clustering rate) 則明顯高於台灣與柬埔寨。在這三個國家中，柬埔寨 EAI 株具有 MDR 的比例高達 32%，遠遠高於台灣 (表一)。

表一 台灣、新加坡及柬埔寨 EAI 株之特性

Characteristic	Taiwan	Singapore [9]	Cambodia [10]
Total isolates	162	269	105
EAI (%)	59 (36.43%)	69 (25.62%)	63 (60.00%)
MDR isolates (%)	0%	N.D.	32%
Cluster distribution of EAI family strains			
Unique isolates	29	2	47
Number of clusters	8	23	7
Cluster of isolates	30	67	16
Clustering rates	37.29%	63.77%	14.29%

Multi-drug resistance (MDR) is defined as resistance to at least isoniazid and rifampicin

MIRU-VNTR 的鑑別能力

為了確認 MIRU-VNTR 分型結果能否有效區分不同的 EAI 菌株，我們將台灣、新加坡和柬埔寨的 MIRU-VNTR 結果進行分析比對並計算其多樣性指數 (HGDI)。結果顯示，MIRU-VNTR 分型法對於台灣、新加坡及柬埔寨 EAI 株的 Mtub21 基因位點之鑑別指數大於 0.6；對於新加坡 EAI 株的 Mtub21、Qub11b、ETR-A、ETR-B、及 Qub26 等五個基因位點和柬埔寨 EAI 株的 VNTR52、ETR-A、MIRU04 及 Mtub21 四個基因位點的鑑別指數均大於 0.6；對於台灣地區的 EAI 株，只有 Qub11b 基因位點的鑑別指數大於 0.6，其他基因位點的鑑別指數均小於 0.3 (表二)。

為了能快速鑑別區分北京株與 EAI 株，我們選擇台灣地區鑑別指數大於 0.15 的 7 個基因位點進行等位基因多樣性 (Allelic diversity) 分析。結果顯示同時利用這 7 個基因位點的

表二 台灣、新加坡及柬埔寨 EAI 株之多樣性指數 (HGDI)

MIUR-VNTR locus	Taiwan	Singapore	Cambodia
MIRU02	0	0	0.0317
VNTR53 (Qub 4156)	0	0	0.0317
ETR-C	0	0	0.2289
MIRU26	0	0.0571	0.0317
MIRU24	0	0.1108	0.0317
VNTR47 (Mutb30)	0	0.2916	0
MIRU16	0	0.3615	0.1751
MIRU23	0	0.4932	0.3763
MIRU40	0	0.5712	0.2801
MIRU20	0.0339	0	0.0625
MIRU27	0.0339	0	0.1792
VNTR46 (Mutb 29)	0.0339	0	0.0317
MIRU10	0.0339	0.1125	0.2345
VNTR42 (Mutb04)	0.0339	0.4987	0.2488
VNTR52 (Mutb39)	0.0339	0.5878	0.6621
ETR-A	0.0339	0.7165	0.7317
VNTR49 (Mutb34)	0.0666	0	0
Qub26	0.0666	0.7511	0.5576
MIRU04	0.1303	0.2796	0.7337
MIRU31	0.1625	0.4689	0.3825
MIRU39	0.1888	0.208	0.1208
ETR-B	0.2227	0.7319	0.5648
Qub11b	0.6254	0.8308	0.362
Mtub21	0.7493	0.659	0.6542

MIRU-VNTR 組合對於北京株的鑑別指數為 0.9674，對於 EAI 株的鑑別指數為 0.9509。若再與 Spoligotyping 的結果結合，對所有菌株的鑑別指數值為 0.9925、北京菌株為 0.9689、EAI 菌株為 0.9670 (表三)。

台灣，新加坡和柬埔寨結核桿菌 EAI 株的演化

為了進一步了解這三個熱帶亞洲國家 EAI 株的演化情形，我們針對特定 VNTR 基因位點進行基因重複數的相似性分析。在三個國家中，

表三 六個選定位點之等位基因多樣性分析對於台灣兩種主要流行結核桿菌菌株之鑑別能力

Population	Strain	Type	Cluster (strain)	HGDI
6-loci only				
All	162	90	23 (95)	0.9791
Beijing	68	33	11 (46)	0.9346
EAI	59	34	7 (32)	0.9421
6-loci and spoligotyping				
All	162	119	22 (65)	0.9930
Beijing	68	45	10 (33)	0.9737
EAI	59	46	7 (21)	0.9871

特定 VNTR 基因位點的基因重複數相同大於 80% 者定義為高度相似性位點；在至少兩個國家中，特定 VNTR 基因位點的基因重複數相同大於 60% 者定義為中度相似性位點；在至少兩個國家中，特定 VNTR 基因位點的基因重複數相同只大於 40% 者定義為低度相似性位點；在至少兩個國家中，特定 VNTR 基因位點的基因重複數沒有相同大於 40% 者定義為高度差異性位點。在三個國家中，MIRU02、MIRU10、MIRU20、MIRU24、MIRU26、MIRU27、MIRU39、VNTR46、VNTR47、VNTR49、VNTR53 和 ETRC 這 12 個基因位點有高度的相似性；Qub11b 和 Qub26 則有高度的差異性。

台灣、新加坡和柬埔寨均屬熱帶氣候國家，並在幾世紀前就有貿易和文化的交流。有鑑於這些遺傳和文化因素的連結，我們分析比較了這三

個國家 EAI 株的關聯性，而 EAI 株也是印度的主要流行菌株，因此也將孟買的資料結果納入比較。圖一以不同的顏色代表台灣、新加坡、柬埔寨及孟買等地區，發現台灣和新加坡的 EAI 株大多座落在於同一群聚中；少部份新加坡的 EAI 株則和柬埔寨的 EAI 株坐落於同一個群聚中；而來自孟買的 EAI 株與這三個國家相比，不但遺傳距離相對較遠，基因的重疊性也很低，特性與這三個國家有很大的不同。

討 論

EAI 株是結核菌最古老的菌株之一，在印度西南部分離出 EAI 株的比例為 64.3%、柬埔寨為 60%，並往鄰近國家遞減。中國是鄰近印度及柬埔寨人口最多的國家，但其 EAI 株只有在臨海的福建省被發現 (7/2,346; 0.3%)。EAI 株在熱帶地區國家盛行



圖一 台灣、新加坡及柬埔寨之結核桿菌菌株所形成之最小生成樹 (Minimum Spanning Tree)

的原因仍不清楚，可能與不同的環境壓力和其他的選擇性因素有關，若要真正釐清原因則需要再做更進一步的調查研究。

如本研究所示，柬埔寨所分離出 EAI 株的比例 (60%) 比台灣和新加坡地區高出約三倍 (表一)，或許是因為當地地理環境因素使得 EAI 菌株較易於傳播，但柬埔寨的 EAI 菌株群聚率確顯著低於其他兩個國家，表示 EAI 菌株可能長期存在於該地區 (表一)。值得注意的是，來自柬埔寨的 EAI 株有 32% 是 MDR 菌株，表示該國目前的感控政策應該進行修正，才能有效的控制肺結核的傳播。

24 位點 MIRU-VNTR 是目前常用於結核菌株的分型方法，利用此法分析台灣、新加坡及柬埔寨地區

的菌株，在這三個國家得到的結果有很大不同。在台灣有 22 個 MIRU-VNTR 位點的鑑別指數 (HGDI) 小於 0.3，低鑑別指數的位點比其他兩國多許多；而新加坡有 11 個位點和柬埔寨有 9 個位點的鑑別指數大於 0.3 (表二)。此外，來自新加坡和柬埔寨的 8 個相同基因位點 (MIRU23、VNTR52、ETR-A、Qub26、MIRU31、ETR-B、Qub11b 和 Mtub21) 其鑑別指數均大於 0.3。為了試圖提供台灣地區快速鑑別北京株和 EAI 株的方法，我們選擇並進一步分析 7 個基因位點 (HGDI > 0.15; Qub26、MIRU04、MIRU31、MIRU39、ETR-B、Qub11b 和 Mtub21)。Luo 等人之前的研究顯示，以下 9 個基因位點 (VNTR-9、

MIRU26、MIRU40、VNTR42、Qub26、MIRU31、Qub11b、Mtub21、Qub18 和 VNTR2372) 的實驗結果共同分析能達到與 VNTR-15 分型法相似的解析力，並對北京株和非北京株有良好的鑑別能力(所有菌株 0.989；北京株 0.985；非北京株 0.993)。而本研究所選定的 7 個基因位點分析可以達到與上述 9 個位點相近的鑑別率(所有菌株 0.9882；北京株 0.9674；EAI 菌株 0.9509)，若再合併 Spoligotyping 的結果，則能夠達到與 Luo 等人所使用的 9 個基因位點分析相當的鑑別率(所有菌株 0.9925；北京菌株 0.9689；EAI 株 0.9670)。台灣地區最常見的結核菌株是北京株，其次為 EAI 株，因此，使用 7 個選定的基因位點進行分析可以快速區分台灣或其他地區的北京株和 EAI 株(表三)。

分子人類學研究經常使用組織相容性抗原 (Human leukocyte antigen, HLA) 進行族群分類。台灣地區主要的族群分類有閩南、客家、榮民和原住民等，最初居住在華南地區的閩南和客家族群人口數佔總人口的約 85%，Yang 等人根據 HL-B*15 等位基因頻率來進行近鄰連接演化樹分析，發現台灣、南韓、新加坡華人和香港華人緊密聚在一起形成一個南亞亞群，而北京漢族則主要集中在包括有北漢族、回族和藏族的北方族群。而 Lin 等人利用 ODEN 分析軟體和 HLA-A，-B 和 -C 的等位基因頻率也

進行了近鄰連接演化樹分析，結果顯示閩南族群和客家族群融合在一起並與泰國和新加坡華人聚集在同一個群落。台灣是柬埔寨的主要貿易夥伴，而新加坡和台灣則有著密切的文化交流，為了進一步了解這三個國家間遺傳和演化的關係，我們分析了 2007 年至 2008 年間從台灣、新加坡和柬埔寨所收集 MIRU-VNTR 24 個基因位點的分析結果，並建構最小生成樹 (Minimum Spanning tree) (圖一)。發現許多來自台灣和新加坡的結核菌株會聚集在一起形成群落或散置在附近，與 Yang 等人 and Lin 等人利用 HLA 等位基因頻率所建構的近鄰連接演化樹結果相似，圖形並顯示印度與其他亞洲國家之間的遺傳關係相對遙遠，但此假設需經由種族追溯調查才能進一步證實。

結語

本研究確認了台灣地區 EAI 株和新加坡及柬埔寨 EAI 株的相對演化關係，此結果可能有助於流行病學和人類學的進一步研究。另外，我們也提供了一個簡便的方法，利用 7 個選定的基因位點進行分析即可區分台灣或其它地區的北京株和 EAI 株。

參考文獻

1. Chen YY, Chang JR, Huang WF, et al: Genetic diversity of the Mycobacterium tuberculosis Beijing family based on SNP and VNTR

- typing profiles in Asian countries. *PLoS One* 2012;7:e39792.
2. Wirth T, Hildebrand F, Allix-Beguec C, et al: Origin, spread, and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000160.
 3. Dou HY, Huang SC, Su IJ: Prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan: a model for strain evolution linked to population migration. *Int J Evol Biol* 2011;2011:ID 937434.
 4. Chen YY, Chang JR, Huang WF, et al: The pattern of cytokine production in vitro induce by ancient and modern Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strains. *PLoS One* 2014;9:e94296.
 5. Dou HY, Chen YY, Kou SC, et al: Prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* strain genotypes in Taiwan reveals a close link to ethnic and population migration. *J Formos Med Assoc* 2015;114:484-8.
 6. Luo T, Yang C, Pang Y, et al: Development of a hierarchical variable-number tandem repeat typing scheme for *Mycobacterium tuberculosis* in China. *PLoS One* 2014;9:e89726.
 7. Yang G, Deng YJ, Qin H, et al: HLA-B*15 subtypes distribution in Han population in Beijing, China, as compare with those of other populations. *Int J Immunogenet* 2010;37:205-12.
 8. Lin M, Chu CC, Chang SL, et al: The origin of Minnan, Hakka, the so-called "Taiwanese", inferred by HLA study. *Tissue Antigens* 2001;57:192-9.
 9. Lim LK, Sng LH, Win W, et al: Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Singapore, 2006-2012. *PLoS One* 2013;8:e84487
 10. Zhang J, Heng S, Le Moullec S, et al: A first assessment of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Cambodia. *BMC Infect Dis* 2011;11:42-7.