

印尼籍外籍勞工之人芽囊原蟲基因型研究

陳立軒¹ 李淑玲² 楊誠嘉³ 李元民^{2,4}

¹ 聖保祿醫院 內科部

² 新生醫護專科學校 護理科

³ 聖保祿醫院 教學研究部

⁴ 元培科技大學 醫學檢驗生物技術系

摘要

人芽囊原蟲 (*Blastocystis hominis*) 是人類腸胃道最常見的原蟲類寄生蟲，在許多開發中國家都有很高的盛行率。本研究是針對來台工作的印尼籍外籍勞工進行人芽囊原蟲的分子流行病學研究。研究中共收集了128位印尼籍勞工糞便檢體，經由顯微鏡檢查共三十位 (21.8%) 具腸道寄生蟲感染，其中28位為人芽囊原蟲感染。利用人芽囊原蟲的小次單元核糖體基因 (small subunit ribosomal RNA gene, SSU rRNA) 進行聚合酶 (*polymerase chain reaction*, PCR) 反應以進行基因分型時，28個檢體中有25個樣本 (89.2%，25/28) 有PCR反應，基因型別中以ST3為最常見的感染型 (52.0%，13/25)，其次為ST2 (36.0%，9/25)，另外有3位感染ST1 (12.0%，3/25)。演化樹分析中發現的ST2和ST3的基因序列主要和已發表的人類感染來源序列間有很高的親源性，並且於序列間自己形成一個主要的叢集，ST1的序列和源於紅毛猩猩與豬隻的感染序列有很高的親源性，顯示部份人類與動物的感染可能源自於共同的感染來源。人芽囊原蟲為人畜共通疾病，其感染途徑主要是經由糞口傳染，而目前研究顯示源自不同動物而發現的基因型別也越來越多。因此未來需要更多衛生教育與人員管理，將可減少人芽囊原蟲散播與感染。

關鍵詞：人芽囊原蟲 (*Blastocystis hominis*)

小次單元核糖體基因 (Small subunit ribosomal RNA gene, SSU rRNA)

基因型 (Subtype, ST)

前言

人芽囊原蟲 (*Blastocystis hominis*) 是一種寄生於人類消化道中的寄生性原蟲 (protozoan)，型態大小約為4~15 μm，屬厭氧生活。但是長久以來人芽囊原蟲一直未被重視，直到近年

來研究顯示人芽囊原蟲會引發腸道細胞發炎現象，導致患者腹瀉與消化道疾病。感染人芽囊原蟲較常出現的有食慾不振、噁心、腹脹、腹痛、腹瀉等臨床症狀。人類的感染主要是藉由動物接觸而食入受污染的食物或飲水導致的糞口感染¹⁻²。

人芽囊原蟲的分佈是全球性的，其宿主也相當廣泛，研究中顯示其可於昆蟲、鳥類、魚類、爬蟲類、哺乳類動物腸道中發現³。以人芽囊原蟲的核糖體RNA (small subunit ribosomal RNA gene, SSU- rRNA) 基因序列加以分型，目前已經超過17種基因型(subtype, ST)被發現。人類感染的人芽囊原蟲基因型主要以ST1~ST4為主，其中以ST3最為常見，而ST5~ST9散見於人類和動物間接觸的感染^{4,5}。

由於社會環境的變遷，台灣地區開放外國勞工的輸入及跨國婚姻的仲介以來，短期居留及長期居住於國內的外籍人士就急劇增加。根據101年底內政部網頁之統計資料中顯示，在我國外籍人士(不含大陸人士)共計68萬人，其中持居留簽證者計54萬6千人，持停留及其他簽證者13萬4千人。外籍勞工中以印尼籍占42.9%、越南籍占22.5%及菲律賓籍占19.5%較多；而近5年之居留人數變動觀察，外籍勞工之原屬國籍以印尼籍者比率大幅增加10.6個百分點變動最大，菲律賓籍及泰國籍者則逐年減少⁶。以工作性質區分可區分為產業外籍勞工和社福外籍勞工，而其中與台灣民眾生活上接觸最為頻繁的社福外籍勞工中，也以印尼籍勞工佔最高的比例⁷。

目前衛生福利部疾病管制署針對國內的外籍人士也分別依其不同性質，定出初檢和半年檢的檢疫要求。這些外籍人士中屬東南亞籍者高達九成八主要來自東南亞的國家，寄生蟲的感染率較高。因此各醫療單位除配合檢疫篩檢措施外，對外籍人士常罹患的疾病及感染情況也應有進一步的瞭解。

疾病管制署於95年公告的受聘僱外國人入國後健康檢查作業規範中，人芽囊原蟲感染本屬於要求建議服藥治療之疾病，但於98/3/13行政院衛生署署授疾字第0980000293號修訂版的受聘僱外國人入國後健康檢查作業規範中，則將人芽囊原蟲感染視為合格不需治療⁸。因此人芽囊原蟲的傳染即可能成為潛隱性的致病因子。目前研究顯示台灣的外籍勞工的腸道寄生蟲感染中又以人芽囊原蟲的感染率最高達14~24%⁹。相

較於台灣北部地區健康成年人的調查中，人芽囊原蟲的陽性率僅1.13%高出許多¹⁰。而且也尚無對外勞人芽囊原蟲的基因型的相關發表，因此本研究嘗試針對擔任社福外籍勞工中佔最多的印尼籍外籍勞工進行糞便篩檢，以了解其腸道寄生蟲感染情形；並分析印尼籍外籍勞工於人芽囊原蟲感染之盛行率與基因型；更以基因演化樹推估其感染來源和親源關係，期望對人芽囊原蟲感染來源有更進一步的瞭解，將可提供疾病診斷和醫療防疫上的參考。

材料與方法

一、糞便檢體

本研究針對某區域教學醫院之外籍勞工健康檢查中，經說明並取得同意函的個案，共收集128位印尼籍外籍勞工糞便檢體進行腸道寄生蟲檢查和人芽囊原蟲基因分析。腸道寄生蟲檢查是以硫汞-碘-福馬林離心沉澱法(merthiolate-iodine-formalin concentration sedimentation method, MIF)進行寄生蟲顯微鏡檢查¹¹。當檢體中發現人芽囊原蟲陽性個案時，將取同一個案之另一份新鮮糞便進行人芽囊原蟲基因的抽取。

二、人芽囊原蟲基因分型

人芽囊原蟲的基因型是參考學者的發表，以SSU rRNA基因採巢式多聚合酵素反應(nest polymerase-chain-reaction, nest PCR)方式進行序列增幅與序列分析。簡述其做法是以QIAamp DNA Stool Mini Kit先進行糞便中DNA的提取，做法皆依照作業說明進行，再以人芽囊原蟲SSU rRNA特有的RD3、RD5引子進行第一次PCR增幅分析¹²。另取適量PCR產物與自行設計BH2F2 (5'-AGTAGCGATGTTTCCTTTCAAG-3')與BH2R (5'-CCTAGTCGGTATCGTTTATAG-3')引子進行第二次PCR，PCR反應進行是以95°C，5分鐘，再以94°C，48°C和72°C各1分鐘進行30個循環的增幅，再以72°C，5分鐘後終止反應。將產物以1.2% agarose gels進行產物分析。當獲得正確約720 bps的產物後，並進行direct sequence的序列分析。

基因序列分析

搜尋基因庫網站(美國國家衛生研究院NCBI網站, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)所收集公佈之17種人芽囊原蟲的基因型相互比較, 演化樹分析時排除了不完整的序列片段ST11~ST13和差異性較大的ST10, ST14~17序列而保留ST1~ST9序列, 分析中也特別加入於動物和人類腸道所發現的基因株以進行親源演化樹分析。演化樹分析片段大小為nest PCR所產生之702 bps產物序列。

一、軟體

人芽囊原蟲基因序列之排序是使用BioEdit 7.0.5.3序列軟體操作, 並以軟體中附加之Clustal W程式進行基因之多株排序, 以取得基因序列間共同位置之基因片段。基因演化的分析是利用MEGA 5.2演化樹軟體, 分析共同序列間之相關性。演化樹的畫法是以neighbor-joining方式排序, 並以距離法(distance method)設定bootstrap為重複1000次以取得相關性數值百分比。當基因演化樹呈現後, 再利用最大相似度方式(maximum likelihood method)排序做為基因演化樹的正確性複查, 以評估基因演化樹可能的不同呈現方式。

結果

本研究收集之128位印尼籍勞工糞便檢體中, 有30位寄生蟲檢查呈陽性結果佔23.4%(30/128)。以寄生蟲檢出之種類分析, 單獨感染

者有28位其中26位為人芽囊原蟲, 另兩位感染分別感染鞭蟲(*Trichuris trichiura*)和大腸阿米巴原蟲(*Entamoeba coli*); 雙重感染者有2位, 其中一位同時感染鞭蟲和人芽囊原蟲, 一位感染糞小桿線蟲(*Strongyloides stercoralis*)和人芽囊原蟲(表一), 綜合結果128位印尼籍勞工糞便檢體中人芽囊原蟲感染有28位(28/128, 21.8%)、鞭蟲感染2位(2/128, 1.6%), 糞小桿線蟲和大腸阿米巴原蟲感染各一位(1/128, 0.7%)。

針對28個人芽囊原蟲感染的陽性檢體進行其基因分型分析時, 25個檢體有PCR反應產物(25/28, 89.3%), 有三個檢體無PCR產物產生。將PCR反應產物進行核酸序列分析後, 皆順利得到人芽囊原蟲基因序列。利用NCBI網站所收集公佈之人芽囊原蟲基因型加以比較, 可得知25個檢體中ST3為最常見的感染基因型別有13個(13/25, 52.0%), 其次為ST2有9個(9/25, 36.0%), ST1有3個(3/25, 12.0%)。

利用本研究所發現的人芽囊原蟲SSU-rRNA基因序列和目前人類感染常見的基因型別進行基因演化樹分析, 其結果中顯示ST1的3個序列中I8和I15和源於猴子與紅毛猩猩感染來源序列有99.4%(698/702)的相似度, 其bootstrap值為63, 而I30和源於豬隻的感染株的bootstrap值為甚至高達99。而發現的ST2和ST3的基因序列主要和已發表的人類感染來源序列間有很高的相似度, 並且於序列間自己形成一個主要的叢集, 其bootstrap值為72~96之間, 例如ST2中的I6、I9、I16、I21與I27; ST3中的I4和I13,

表一：三十名印尼籍外籍勞工之腸道寄生蟲種類統計

寄生蟲種類	感染人數	百分比 (N= 128, %)
單一感染		
人芽囊原蟲 (<i>B. hominis</i>)	26	20.3
鞭蟲 (<i>T. Trichiura</i>)	1	0.8
大腸阿米巴 (<i>Entamoeba coli</i>)	1	0.8
雙重感染		
人芽囊原蟲 (<i>B. hominis</i>) + 糞小桿線蟲 (<i>S. stercoralis</i>)	1	0.8
人芽囊原蟲 (<i>B. hominis</i>) + 鞭蟲 (<i>T. Trichiura</i>)	1	0.8
合計	30	23.4

也有幾個序列和發現於豬隻、牛隻或猿猴的感染基因序列間有很高的相似度例如 I3、I11、I12 (圖一)。

討論

隨著社會型態改變，境外之外籍勞工被大量引進，人芽囊原蟲在外勞例行性體檢的陽性率又遠高於台灣本土居民的感染率。尤其來自高感染區開發中國家的外籍社福勞工提供台灣家庭老人的醫療看護與日常協助，於國人的飲

食和日常生活上就有了關係密切，所以對外籍勞工盛行的疾病研究是國人健康管理中不可或缺的一環。

本研究分析當中，128位印尼籍勞工糞便檢體中人芽囊原蟲感染有28位呈現最高的陽性比率 (28/128, 21.8%)。而國內相關研究針對1434位越南的女性新移民糞便篩檢中也發現其腸道寄生蟲陽性率37.7%，其中也以人芽囊原蟲陽性率最高為20.4%¹³。但是特別要注意的是本研究可能低估或未能真實反映印尼籍勞工於腸



圖一：印尼籍外籍勞工所感染的人芽囊原蟲基因序列演化樹分析。演化樹畫法是以人芽囊原蟲SSU rRNA基因以Neighbor-Joining方式進行，排序基因序列標示出人芽囊原蟲基因型別、基因序列標號、檢出之來源宿主及國家。印尼籍外籍勞工發現之人芽囊原蟲基因特以(●)標示。

道寄生蟲陽性率，因為國外學者對中東卡達地區的外籍勞工腸道寄生蟲陽性率調查中指出，新入境的外籍勞工和入境後定期篩檢的外籍勞工於腸道寄生蟲陽性率會產生明顯的差異，主要是牽涉到仲介公司對輸出勞工做了不同程度的篩選，甚至會於入境前幾天給予腸道寄生蟲的投藥，因此在不同的研究調查當中，更會產生陽性率明顯的差異¹⁴。

廣泛的針對野生動物感染的人芽囊原蟲基因型比較中顯示，人類除外的其他靈長類動物(例如：猩猩、猿猴)主要感染ST1, ST3和ST5，偶蹄類動物(例如：豬、牛、羊)主要感染ST1, ST5和ST10，單蹄類動物(例如：斑馬、犀牛、驢)主要感染ST1和ST5，長鼻目(例如：大象)主要感染ST11，食肉目動物(例如：獅、虎、豹)主要感染ST1和ST7，嚙齒目動物(例如：老鼠、松鼠、水鼠)主要感染ST3和ST4，有袋目類動物(例如：袋鼠、負鼠)主要感染ST4和ST13，鳥類動物(例如：雁鴨、鴛鴦、野雞)主要感染ST6和ST7。人類可藉由接近這些野生動物而遭受到人芽囊原蟲的感染，而目前發表的人類感染人芽囊原蟲基因型共9型為ST1~ST9¹⁵。

綜合不同的區域和國家的人芽囊原蟲基因型研究中顯示，人類的感染以ST1~ST4為主，其中又以ST3為最常見的感染型別。ST1基因型於非洲的利比亞、奈及利亞和南美的巴西佔最高的比例，分別為50%, 45.5%及45.2%；ST2主要發現在歐洲、非洲及中東地區約佔12.7~13.5%；ST4基因型於歐洲通常是僅次於ST3的檢出約佔13~76%，目前ST5僅於英國和巴基斯坦檢出分別佔0.7%和3.9%；ST6和ST7在歐洲、亞洲和非洲國家約佔1.6%~19.6%¹⁶。本研究對印尼籍外籍勞工得檢查中，ST3也佔最高的比例佔52.0%，而ST2佔36.0%，ST1有佔12.0%，但鄰近國家中的泰國和新加坡以醫院病患的研究中，主要發現的人芽囊原蟲基因型為ST3和ST1，並無ST2的檢出，可能是研究對象不同而造成結果的差異¹⁷⁻¹⁹。

基因演化樹分析可以評估各基因型間的親

源關係，也能適切反應感染源間的傳遞模式。有學者以感染人類和動物感染來源的大量ST3和ST4感染株進行人芽囊原蟲基因型之多重基因座序列分型(*multilocus sequence typing*; MLST)研究，其基因序列的親緣分析中顯示出感染人類的ST3株自成一個叢集而且和感染動物的ST3型的序列間已經有許多的差異，因此可以推估感染人類的ST3能有效的人傳人。人類感染的ST4株和源自於老鼠及天竺鼠的ST4株之間有很大的相似度，因此ST4應該源自於鼠類感染源，人類可能是食入遭受污染的食物或水源而導致感染²⁰。

印尼籍外籍勞工所感染的人芽囊原蟲基因序列當中ST2和ST3主要都和人類感染的基因株之間有很高的相似度，而且序列自成一個叢集，顯示感染株之間有很高的親源性。另外ST1的3個基因序列中I8和I15和源於猴子與紅毛猩猩來源的序列有很高的相似度達99.4%，相似度甚至高於源於泰國發現的ST1人類感染株，特別是紅毛猩猩的自然產地僅在印尼和馬來西亞部分區域，因此，推估此感染株的來源應為人類進入熱帶雨林後，於環境中接觸到與動物感染相同的感染來源；同時I30基因序列和源於豬隻的感染株之bootstrap值為甚至高達99，也顯示感染來源可能導因於人類與家畜密切生活而導致的感染。

研究顯示，這些不同生活習慣的外籍人士和家庭成員中的生活接觸中也可能造成傳染²¹。但衛福部疾病管制署目前針對外國籍人士之勞工健診規範中，人芽囊原蟲感染認定為合格，不需管制與治療。因此本院目前在進行外籍勞工健檢的空檔，即對外籍勞工進行適當的衛生教育，以期能降低疾病傳染和散播的可能性。同時，未來臨床醫師在面對有腸胃道症狀並且家中有外勞服務的病患時，將不能忽略是否為腸胃道寄生蟲感染的可能性。

誌謝

本研究由聖保祿醫院研究計畫(計畫編號SPMRP-U4-5004)經費補助。

參考文獻

1. Sheehan DJ, Raucher BG, McKittrick JC. Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 548-50.
2. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, et al. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2010; 106: 1033-8.
3. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*--past and future. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 61-79.
4. Stensvold CR. *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Trop Parasitol* 2013; 3: 26-34.
5. Parija SC, Jeremiah S. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop Parasitol* 2013; 3: 17-25.
6. 內政部統計處資料：http://www.moi.gov.tw/stat/news_content.aspx?sn=7134。
7. 勞工委員會職業訓練局資料：http://www.evta.gov.tw/content/list.asp?mfunc_id=14&func_id=57。
8. 受聘僱外國人入國後健康檢查作業規範：<http://www.cdc.gov.tw/list.aspx?treeid=aa2d4b06c27690e6&nowtreeid=a2a57028683a49bf>。
9. 陳哲民、陳建志、郭冠良、林光洋、顏慕庸。臺灣北部某區域醫院外籍女性人芽囊原蟲之盛行率及治療分析。 *北市醫學雜誌* 2011; 23:112-18。
10. Chen TL, Chan CC, Chen HP, et al. Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis hominis* in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69(2): 213-6.
11. Hsieh MH, Lin WY, Dai CY, et al. Intestinal parasitic infection detected by stool examination in foreign laborers in Kaohsiung. *Kaohsiung J Med Sci* 2010; 26: 136-43.
12. Parkar U, Traub RJ, Kumar S, et al. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology* 2007; 134: 359-67.
13. Lu CT, Sung YJ. Epidemiology of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites among the immigrant population in northeastern Taiwan by routine physical examination for residence approval. *J Microbiol Immunol Infect* 2009; 42: 505-9.
14. Abu-Madi MA, Behnke JM, Ismail A, Al-Olaqi N, Al-Zaher K, El-Ibrahim R. Comparison of intestinal parasitic infection in newly arrived and resident workers in Qatar. *Parasit Vectors* 2011; 4: 211.
15. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, et al. Genetic diversity of *blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* 2013; 164: 497-509.
16. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop* 2013; 126: 11-8.
17. Thathaisong U, Worapong J, Mungthin M, et al. *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 967-75.
18. Wong KH, Ng GC, Lin RT, Yoshikawa H, Taylor MB, Tan KS. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitol Res* 2008; 102: 663-70.
19. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, et al. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol Res* 2004; 92: 22-9.
20. Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect Genet Evol* 2012; 12: 263-73.
21. Guglielmetti P, Cellesi C, Figura N, Rossolini A. Family outbreak of *Blastocystis hominis* associated gastroenteritis. *Lancet* 1989; 2: 1394.

Genetic variability of *Blastocystis hominis* in Indonesian Immigrant Workers

Li Hsuan Chen¹, Shu Lin Lee², Cherng Chia Yang³, and Yuan Ming Lee^{2,4}

¹Department of Internal Medicine, St. Paul's Hospital;

²Department of Nursing, Hsin Sheng College of Medical Care and Management;

³Department of Medical Education and Research, St. Paul's Hospital;

⁴Department of Clinical Laboratory, St. Paul's Hospital

Blastocystis hominis is one of the most common intestinal protozoans in human. The prevalence of *Blastocystis hominis* infection is higher in developing countries. The aim of this study was to determine the molecular epidemiology of *Blastocystis hominis* in Indonesian immigrant workers in Taiwan. Total 128 fresh fecal samples were collected and examined by microscope for parasitology study. Thirty of the total 128 examined immigrants (21.8%) are positive for intestinal parasitic infections, and 28 immigrant workers are *Blastocystis hominis* infection. After DNA extracted from positive for *Blastocystis hominis* infection stool samples, Small subunit ribosomal RNA (SSU-rRNA) genotyping was performed by nested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis. The 25 of the 28 (89.2%, 25/28) samples are positive in PCR study and the most common genotypic is subtype 3 (52.0%, 13/25), the second is subtype 2 (36.0%, 9/25) and subtype 1 is following (12.0%, 3/25). In phylogenetic analysis, the ST2 and ST3 sequences were clustered and with high simulated to the isolates found in human. The ST1 sequences also appears to specific related the isolates from of *Pongo pygmaeus* and pig origin infection. The studies indicated that some of *Blastocystis hominis* in humans were closely related to animals. Considering that *Blastocystis hominis* is a zoonotic infection, which is transmitted by the fecal-oral route, and many studies have shown that existence of different host specificity among many different genotypes of *Blastocystis*. More public education and proper management in the future may help to reduce *Blastocystis hominis* transmission and contamination. (J Intern Med Taiwan 2014; 25: 199-205)