

瘧疾的青蒿素抗藥性現況與基因分析

李淑英^{1*}、亞倫.尼爾²、林子琦¹、盧欣嶸¹、鄧華真¹、許珍禎¹、許世芬¹

摘要

瘧疾(malaria)迄今仍為重要公衛議題，以青蒿素(Artemisinin)為基礎的聯合療法 (Artemisinin-based combination therapies, ACTs)，療效極佳，已被世界衛生組織推薦為一線治療惡性瘧原蟲感染。

2008年以來，在大湄公河次區域 (Greater Mekong Subregion) 陸續出現對 ACT 抗藥性的報導。ACTs 的療效隨著普遍使用而逐漸下降。現今全球密切關心青蒿素抗藥性以及 ACT 多重抗藥性的傳播。*PfKelch-13* 基因的變異是產生 Artemisinin 抗藥性的原因之一，本文建立 *pfK13* 基因的多型性監測，並初步評估 2018 年分別由肯亞、索羅門群島、烏干達境外移入臺灣的 4 例惡性瘧對青蒿素的抗藥性，結果發現 *pfK13* 基因皆無突變。

為了防堵瘧疾境外移入，除透過臨床觀察及旅遊史詢問，血液抹片鑑定及後續追蹤外，對於來自抗藥性疫區，且治療後血中瘧原蟲仍未完全清除者，須考慮可能是抗藥性瘧疾之情形產生。必要時結合瘧疾抗藥性基因定序，以適時調整治療策略。這些結果可更有效的管理抗瘧藥物的使用，延緩抗藥性的產生並維持青蒿素的有效性。

關鍵字：瘧疾，惡性瘧，青蒿素，抗藥性

前言

瘧疾迄今仍為重要公衛議題。據世界衛生組織(World Health Organization, WHO) 的統計，2017 年全球仍有 90 個國家與地區受到瘧疾的肆虐，有 2 億 1 千 900 萬感染以及 43 萬 5 千例死亡的案例[1]。瘧疾藥物治療是防治瘧疾重要利器，

¹ 疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

² 美國國家衛生研究院國家過敏與

傳染病研究所臨床研究組

DOI : 10.6524/EB.202012_36(24).0001

通訊作者：李淑英^{1*}

E-mail : yingv02@cdc.gov.tw

投稿日期：2019 年 05 月 31 日

接受日期：2019 年 07 月 16 日

然而目前使用的抗瘧疾藥物，幾乎皆陸續出現抗藥性。在惡性瘧原蟲(*Plasmodium falciparum*)中，已觀察到對所有目前使用的抗瘧疾藥物：阿莫地喹(Amodiaquine)、氯奎寧(Chloroquine)、美爾奎寧(Mefloquine, MQ)、奎寧(Quinine)、磺胺多辛-乙胺嘧啶(Sulfadoxine/Pyrimethamine)以及最近對青蒿素(Artemisinin)衍生物產生抗藥性，對瘧疾防治形成極大的隱憂[2]。

Chloroquine 於 1945 年開始用於治療瘧疾。於 1957 年泰國柬埔寨邊境發現第一起 Chloroquine 抗藥性案例，隨後抗藥性從東南亞興起，接著傳播到非洲，在 1960 和 1970 年代，Chloroquine 逐漸失去治療效果[3]。因此，在多數地區 Chloroquine 已不再被推薦作為治療惡性瘧的治療用藥。Chloroquine 的替代藥物也先後快速失效，如 Sulfadoxine/Pyrimethamine 抗藥性在使用後一年產生；至於 Mefloquine 的抗藥性則是於使用五年後失效[4]。

青蒿素是抗瘧疾的代表性新藥劑，在 1971 年被引入，被認為是歷史上最安全、作用最快速的抗瘧疾藥物[5]。WHO 建議以青蒿素(Artemisinin)為基礎，結合其它不同作用機制的抗瘧疾藥物的聯合療法(Artemisinin-based combination therapies, ACTs)，作為無併發症之惡性瘧原蟲感染的第一線治療。針對單純的無併發症的瘧疾感染案例，WHO 建議五種 ACTs 組合，包括：Artemether+umefantrine(AL)，Artesunate+Amodiaquine(ASAQ)，Dihydroartemisinin+piperazine(DHA-PPQ)，Artesunate+Mefloquine(ASMQ)和 Artesunate+Sulfadoxine-Pyrimethamine (ASSP)[6]。ACTs 可以克服 Artemisinin 在血液當中半衰期極短的缺點，而且可以減緩瘧原蟲對於其中任何一種藥物產生抗藥性[7]。ACTs 耐受性良好，療效極佳，且近年來成本降低，其廣泛使用使得全球瘧疾高度流行地區的發病率和死亡率急劇下降。但，由其他藥物如 Chloroquine、Mefloquine 快速發展出抗藥性的前車之鑒可預知，ACTs 的療效也會隨著其普遍使用而逐漸下降。柬埔寨西部在 2008 年首次報導惡性瘧原蟲對青蒿素及其衍生物已出現抗藥性。發現青蒿素產生抗藥性後，2008 年柬埔寨轉向使用 DHA-PPQ，DHA-PPQ 亦為現今少數對多重抗藥性瘧疾(multidrug-resistant malaria)仍有效的治療之一[8]。然無可避免的，2013 年以來柬埔寨出現了高比率的 DHA-PPQ 治療失敗率，顯示瘧原蟲亦發展出對 piperazine(PPQ)的抗藥性[5,6]。抗藥性接著傳至泰國、然後寮國，最後傳至越南。對 ACTs 有抗藥性的惡性瘧原蟲(*Pf*)迅速於大湄公河次區域(Greater Mekong Subregion)地區廣泛傳播，嚴重威脅防治成效[7]。先前兩種抗瘧藥 Chloroquine 和 Sulfadoxine/Pyrimethamine 的抗藥性問題，也最早出現於大湄公河次區域地區，顯現大湄公河次區域地區（尤其是柬普寨流行地區）是多重抗藥性崛起的中心。

瞭解抗青蒿素藥惡性瘧原蟲性抗藥性機制及追蹤其族群傳播，對於全球瘧疾防治甚為重要。因此，應善用基因分析工具監測 ACTs 抗藥性相關基因變異，以即時追蹤瘧疾寄生蟲對 Artemisinin 及其搭配藥物(partner drugs)的抗藥性情形。青蒿素作用機制目前仍然不是完全瞭解，但證據顯示 *pfKelch-13* 基因的變異是產生 Artemisinin 抗藥性的原因之一。Ariey 等人並於 2014 年首次報導了 *pfK13* 基因中

螺旋槳區域(K-13 propeller domain)與青蒿素抗藥性之間的關聯[8]。從那以後，許多青蒿素抗藥性相關的 *pfK13* 螺旋槳基因突變被發現，主要在東南亞地區。文獻指出 N458Y、Y493H、R539T、R561H、I543T 和 C580Y 已經證實與青蒿素抗藥性有關 [6]。這些突變存在東南亞地區，其中 C580Y 是最普遍的[9]。迄今，在 *pfK13* 螺旋槳基因中報導了 200 個左右非同義突變。目前防疫單位關心的重點為青蒿素抗藥性之基因是否已向西傳播到非洲。幸運的是，在非洲只有一些關於使用 ACT 後寄生蟲清除延遲的報導。AL 和 ASAQ 是非洲第一線用藥，且目前在撒哈拉以南非洲地區瘧原蟲對 Sulfadoxine/Pyrimethamine 有抗藥性但其他搭配藥物仍然有效。在引入後迅速出現幸好儘管 *K13* 突變廣泛存在，Artesunate-Mefloquine 仍是完全有效的。顯現當其搭配藥物仍然有效時，ACT 仍會是有效的治療選擇。

柬埔寨停止使用 Mefloquine 轉而使用 Piperaquine 以後，Mefloquine 敏感性迅速恢復，顯示 Piperaquine 和 Mefloquine 這兩種藥物的抗藥性並不會共存。截至目前為止，尚未發現同時對青蒿素之 Piperaquine 和 Mefloquine 具有抗藥性的瘧原蟲[10]。基於 Piperaquine 和 Mefloquine 抗藥不會同時出現，可將 DHA-PPQ 改為 DHA-Mefloquine。新的治療方向為接續使用不同的 ACTs 或開發三重 ACTs (Triple artemisinin combination therapy, Triple ACTs, TACTs)如青蒿素衍生物+Piperaquine + Mefloquine 或者如青蒿素衍生物+lumefantrine + amodiaquine，不過仍須評估潛在的毒性問題。

本篇也建立 *pfK13* 螺旋槳基因的 Artemisinin 抗藥性基因定序，針對 2018 年境外移入惡性瘧病例進行青蒿素抗藥性監測。

材料與方法

針對台灣 2018 年之所有惡性瘧病例之血液檢體，進行 *pfK13* 螺旋槳基因的 Artemisinin 抗藥性基因定序。

透過巢式 PCR 的方式放大片段基因。利用有矯正功能的 Platinum PCR supermix 放大片段，*pfK13* 螺旋槳基因的第一對引子序列 *pfK-13*(REV): 5'-GGGAATCTGGTGGTAACAGC；New *pfK-13* 2.0-Primary(FWD): 5'-GGGAAAATCATAAACAATCAAGTAATGTG。第二對引子序列 New *pfK13*-Nested (REV): 5'-CTTCTTAAGAAATCCGTTAACTATAACCC；New *pfK13*-Primary (FWD): 5'-TTATAAAATGTGCATGAAAATAAATATTAAAGAAG。送定序時的引子 *pfK13*-N1(REV): 5'-GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA 和 New *pfK13*-Primary(FWD): 5'-TTATAAAATGTGCATGAAAATAAATATTAAAGAAG 分析核酸序列時，進行 nested PCR 第一次反應：1.5µl template DNA，14.1µl Platinum PCR supermix，0.45µl outer forward primer，0.45µl outer reverse primer，最終體積為 16.5µl。第 1 次 PCR 反應條件：95°C 加熱 5 分鐘後，進行 40 個循環，每個循環為 denature 95°C，30 秒；annealing 52°C，30 秒；extension 62°C，30 秒以及 65°C，2 分 30 秒，再進行 65°C，5 分鐘。第 2 次 PCR 反應：3.0µl template DNA，28.2µl Platinum PCR supermix，

0.9µl inner forward primer, 0.9µl inner reverse primer, 最終體積為 33µl。第 2 次 PCR 反應條件: 95°C 加熱 5 分鐘後, 進行 40 個循環, 每個循環為 denature 95°C, 30 秒; annealing 50°C, 30 秒; extension 62°C, 30 秒以及 65°C, 1 分鐘, 再進行 65°C, 5 分鐘。再透過分析軟體 (如: MEGA 7.0) 將其利用彼此相同序列排成連續體和野生株(wild type)相互比較其常見的基因突變。

結果

本研究建立惡性瘧血液檢體 *pfK13* 螺旋槳基因的 Artemisinin 抗藥性基因定序。2018 年臺灣境外移入瘧疾病例共 7 例, 其中惡性瘧原蟲感染病例僅有 4 例, 分別由肯亞、索羅門群島、烏干達境外移入, 其中 1 病例有血中瘧原蟲延遲清除的情形 (表)。分析結果發現這 4 例惡性瘧的 *K13* 螺旋槳基因與野生株序列皆一致, 並無突變的區域, 表示無青蒿素抗藥性突變發生。推測可能因感染者皆自目前無抗藥性之非洲及大洋洲地區返國, 故該結果係屬合理。

表、2018 年境外移入 4 例惡性瘧血液的國別與病原陰轉日數

案例	輸入國別	採檢日期	採檢日與第 1 次陰轉日距 (日)
1	肯亞	107.08.16	13
2	索羅門群島	107.09.06	3
3	烏干達	107.10.05	3
4	烏干達	107.10.06	3

討論

全球氣候變遷加劇, 增長瘧蚊繁殖[11]。國際間旅遊頻繁更是助長了瘧疾傳播[12]。目前雖有多種新型抗瘧疾藥物正在研製中, 但仍未達大範圍使用階段, Artemisinin 仍然是目前最好的抗瘧藥物。因此, 應採取行動以避免再重蹈 Chloroquine 抗藥性的覆轍, 遏止抗青蒿素瘧原蟲從大湄公河次區域傳播到孟加拉和印度, 進而傳至非洲。若多重抗藥性基因傳至病例最多的非洲 (2017 年佔全球 92% 瘧疾病例), 將造成嚴重後果並打擊根除瘧疾的希望。

臺灣近年來境外移入病例來源國東南亞高居第二位, 需密切留意境外移入瘧疾病例是否有青蒿素抗藥性。為了防堵瘧疾境外移入, 除透過旅遊史詢問及臨床觀察, 血液抹片鑑定及後續追蹤外, 對於來自抗藥性疫區, 且治療後血中瘧原蟲仍未完全清除, 須考慮可能是抗藥性瘧疾之情形產生。必要時結合瘧疾抗藥性基因定序, 如: *pfKelch-13* 和 *Pfmdr1* 基因的多型性評估青蒿素及其搭配藥物的抗藥性, 以適時調整治療策略。最近新進展為利用次世代定序(next generation sequencing, NGS)技術進行瘧原蟲抗藥性分子監測, 追蹤瘧疾抗藥寄生蟲。能夠同時收集多個惡性瘧原蟲的全長抗藥基因 (*Pfprt*, *Pfmdr1*, *pfKelch-13*, *Pfdhfr*, *Pfdhps*, 和 *cytochrome B*) 以及粒線體基因組等位基因頻率的數據及單核苷酸多態性的信息, 提供即時監測抗藥

性的利器[13]。這些結果可更有效的抗瘧藥物管理和提供有用的建議，延緩抗藥性的產生並維持青蒿素的有效性。

誌謝

感謝疾病管制署：MOHW106-CDC-C-315-000104、MOHW107-CDC-C-315-000108 及 MOHW108-CDC-C-315-000126（特殊寄生蟲感染之檢驗及監測）三項研究計畫的經費支持。

參考文獻

1. WHO. World Malaria Report 2018. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf?ua=1>.
2. WHO. Guidelines for the treatment of malaria - Third edition. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549127>.
3. Randrianarivelojosa M, Raveloson A, Randriamanantena A, et al. Lessons learnt from the six decades of chloroquine use (1945-2005) to control malaria in Madagascar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 3–10.
4. Price RN, Uhlemann A-C, Brockman A, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet* 2004; 364: 438–47.
5. Leang R, Barrette A, Bouth DM, et al. Efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Cambodia, 2008 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 818–26.
6. WWARN K13 Genotype-Phenotype Study Group. Association of mutations in the *Plasmodium falciparum* Kelch13 gene (Pf3D7_1343700) with parasite clearance rates after artemisinin-based treatments—a WWARN individual patient data meta-analysis. *BMC Med* 2019; 17: 1.
7. Amato R, Pearson RD, Almagro-Garcia J, et al. Origins of the current outbreak of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a retrospective genetic study. *Lancet Infect Dis* 2018; 18: 337–45.
8. Arie F, Witkowski B, Amaratunga C, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2014; 505: 50–5.
9. Ocan M, Akena D, Nsoya S, et al. K13-propeller gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* parasite population: a systematic review protocol of burden and associated factors. *Syst Rev* 2018; 7: 199.
10. WHO. Status report on artemisinin resistance and ACT efficacy (August 2018). Available at: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/artemisinin-resistance-august2018/en/>.
11. Kim YM, Park JW, and Cheong HK. Estimated effect of climatic variables on the

- transmission of *Plasmodium vivax* malaria in the Republic of Korea. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 1314–9.
12. Tatem AJ, Jia P, Ordanovich D, et al. The geography of imported malaria to non-endemic countries: a meta-analysis of nationally reported statistics. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: 98–107.
 13. Talundzic E, Ravishankar S, Kelley J, et al. Next-generation sequencing and bioinformatics protocol for malaria drug resistance marker surveillance. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62: e02474–17.