

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-000126

衛生福利部疾病管制署 108 年委託科技研究計畫

計畫名稱：特殊寄生蟲感染之檢驗及監測

年度研究報告

執行機構：疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：李淑英主任

協同計畫主持人：

研究人員：許世芬、盧欣嶸、林子琦

執行期間：108 年 01 月 01 日至 108 年 12 月 31 日

*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

目次	頁碼
壹、摘要.....	(5)
貳、本文	
一、前言.....	(7)
二、材料與方法.....	(9)
三、結果.....	(13)
四、討論.....	(16)
五、結論與建議.....	(18)
六、重要研究成果及具體建議.....	(19)
七、參考文獻.....	(19)
八、圖表.....	(20)

圖次	頁碼
圖一、兩廠牌快篩檢驗結果.....	(20)
圖二、利用 RPA 試劑放大基因檢測.....	(21)
圖三、利用快篩試劑條檢測瘧疾檢體.....	(22)

表次	頁碼
表一、痢疾阿米巴送檢人數百分比.....	(23)
表二、痢疾阿米巴陽性於各族群送檢數百分比.....	(23)
表三、以各分區管制中心轄下送檢之痢疾阿米巴陽性百分比.....	(23)
表四、陽性個案占外籍勞工的陽性率.....	(24)
表五、非痢疾阿米巴鏡檢結果百分比.....	(25)

計畫中文摘要

全球性的新興與再浮現傳染性疾病發生率逐年上升且迅速成長；除此之外，由於人類與動物之間的頻繁接觸與野生環境的開發，傳染性疾病中人類與野生動物間傳播的人畜共通傳染病也佔有相當大的比例。而其中影響疾病流行的多種社會層面中，醫療體系與外在環境則是傳染病預防體系中之著力點。美國國家衛生研究院之重要新興與再浮現傳染病分類，第三大類傳染病中更列出許多被忽略之熱帶疾病 (NTD) 的病原體，其為防疫上之死角，在社會中、國際上都是一個被長期忽略的部分，尤其在一些資源較缺乏之國家或發展中的國家造成地區性的流行；另一方面由於全球化與全球暖化之影響，使得疾病有逐漸蔓延至其他國家之趨勢，因此對於其之流行預防，是未來的防疫重要目標。本計畫則以寄生蟲感染之監測與防範流行、高效率且準確的檢驗病原體為主要之方向。本計畫包括：

- 一、建立寄生蟲感染源監測網路：建立良好之傳染病通報網路，以即時監測疾病之流行情況包含法定與非法定寄生蟲傳染病。
- 二、未知或新興寄生蟲檢驗技術與檢測平台之開發：包括分子生物學之診斷工具，如：巢式 PCR、即時定量 PCR、恆溫式圈環形核酸增幅法與病原體之培養等，透過適當地擷取各種技術之優點，建立偵測病原的檢測方法，包括未知病原的檢測。
- 三、建立病原體防疫資料庫：進行陽性個案之病原體基因序列分析，以基因演化樹分析法，區別蟲株之間差異性與是否屬於人畜共通傳染病原。
- 四、評估新式瘧疾檢驗方法之確效與現行方法差異比較：現行瘧原蟲採取巢式 PCR 作為分子生物檢測方法，本計畫蒐集市售瘧原蟲商業化套組或借鏡他國實驗室之檢測方法與現行方法進行比對，以作為日後現行檢測方法精進之參考。

透過上述要項之執行，本計畫以即時鑑定法定傳染病原體、發現新興病原體為短期目標，以強化防疫時效並且減少社會衝擊，並以累積足夠的實驗室檢驗能量與他國建立共同合作關係，於未來面對疫並之流行時，可成為主動之協助者。

關鍵詞：新興/再浮現傳染病、寄生蟲感染症、被忽略之熱帶疾病

計畫英文摘要：

Globalization of emerging and reemerging infectious diseases is occurring and increasing at an unprecedented speed due to increased contact between humans and animals. In addition, due to the development of wildlife habitats and zoonotic diseases account for the majority of emerging and reemerging diseases. Among the emerging and reemerging infectious diseases, parasitic diseases are usually neglected in developed countries. However, the resurge and importation of malaria in many countries and outbreaks of cryptosporidiosis in targeted high risk groups have underscored the importance of detection of parasitic diseases. In this study, parasites diagnostic platforms made by adequately integrating many kinds of molecular diagnostic techniques enables the detection of thousands of known or unknown pathogens in the same time. Our goals are include: 1. to build up an unknown parasites surveillance network; 2. to develop an emerging/re-emerging parasitic infectious diseases diagnostic platform including molecular biological diagnosis and parasite culture; 3. to establish a parasite gene sequence database ; 4. to develop a new molecular malaria detection method. Our aim is to diagnose parasites infection and discover the novel parasite infections in the short run and further strengthen the effectiveness of disease prevention as well as reduce the social impact. In the long run, we hope to accumulate enough techniques and cooperate with examination centers of other countries to be a more constructive role in the global health.

keywords : emerging and reemerging infectious diseases, parasitism, neglected tropical diseases

一、前言

全球化的過程使國際貿易、海外旅遊與居住者遷徙的頻率顯著增加，而這些因子對於新興與再浮現傳染性疾病的傳播，扮演了一個相當重要的角色。在 21 世紀，這些全球性的傳染性疾病，不僅發生率增加且預料之外地速度迅速成長；除此之外，由於人類與動物之間的頻繁接觸與野生環境的開發，因此與新興與再浮現傳染性疾病中人類與野生動物間傳播的人畜共通傳染病也佔有相當大的比例。新興與再浮現傳染病的流行，可歸因於多種社會的不同的層面，如：公共衛生、醫療體系、外在環境、動物健康、食品安全、公共政策等多個層面，而這些是相當重要且需要受到重視的，其中醫療體系與外在環境則是傳染病預防體系中之著力標的。

根據美國國家衛生研究院其將新興與再浮現傳染病分成三大部分，第一類為近 20 年來被新鑑定之傳染性疾病、第二類則涵蓋再浮現之傳染病，第三大類包含可利用於生物恐怖攻擊潛在威脅之傳染性疾病，而第三大類傳染病中更列出許多被忽略之熱帶疾病 (NTD) 的病原體。被忽略之熱帶疾病在過去一直都被視為防疫上之死角，其在社會中、國際上都是一個被長期忽略的部分，但在一些資源較缺乏之國家或發展中的國家，仍造成地區性的流行；另一方面由於全球化與全球暖化之影響，使得被忽略之熱帶疾病有逐漸蔓延至其他國家之趨勢，因此對於被忽略之熱帶疾病的流行預防，是未來的防疫重要目標之一。以下則以被忽略熱帶疾病之常見寄生蟲感染分別論述之：

由痢疾阿米巴原蟲 (*E. histolytica*) 所引起的疾病，主要寄生於腸道，偶爾會伺機穿過腸道黏膜侵入身體其他器官；主要引發下痢腸炎，嚴重者有肝膿瘍的發生。痢疾阿米巴生活史主要有囊體及活動體 (trophozoite) 兩種階段，其傳染途徑為糞口傳染。全球每年估計有五億人感染過阿米巴痢疾，導致十萬人死亡，世界衛生組織將之列為極重要之熱帶腸道寄生蟲傳染病。雖然有些人感染 *E. histolytica* 沒有症狀，但仍可能侵入黏膜，造成潰瘍或膿瘍，而感染 *E. dispar* 的人則不會，因此 WHO 建議只對 *E. histolytica* 的病人加以治療，因此正確診斷 *E. histolytica* 感染非常重要，影響後續 amoebiasis 的投藥治療策略。

弓形蟲感染症為第四類法定傳染病，而人類感染弓形蟲可區分為後天性與先天性感染。於美國有超過 6 千萬名民眾感染該疾病，先天性弓形蟲感染大多是孕婦懷孕過程中

第一次感染弓形蟲，弓形蟲經由胎盤傳染給胎兒。曾有報告國外的弓形蟲感染率約是每 1000 名活產兒有 1~5 名發生感染，但受感染的嬰兒只有 20% 會出現臨床症狀。國內健康捐血者調查血液中弓形蟲抗體發現感染率大約是 10% 左右[1]。有關懷孕婦女經調查發現有 30% 的婦女感染該疾病後，產生可以保護胎兒不被感染的抗體，無保護抗體的懷孕婦女可能面對如胎兒死亡和先天畸形的可能性風險發生。是以，弓形蟲感染對於正懷孕之婦女民眾為具有威脅性之疾病之一，本計畫針對弓形蟲感染之高風險族群(如懷孕婦女、免疫缺陷疾患等)持續進行疾病監測要務，以期瞭解可能之感染途徑與族群，作為未來防疫政策擬訂與疾病相關領域之研究參考。

瘧疾 (Malaria) 為經瘧蚊叮咬而感染瘧原蟲寄生於人體紅血球或經輸入帶瘧原蟲者的血液而感染的蟲媒疾病。臨床以週期性寒顫、發熱、頭痛、出汗和貧血、脾腫大為特徵。該疾病感染之嚴重程度與瘧原蟲破壞紅血球的程度成正相關。臨床症狀發作時，依序出現惡寒、高燒、出汗三個典型階段，疾病發作間隔時間以各種瘧原蟲在人體血液內進行之無性分裂之生殖週期而定，間日瘧及卵形瘧均為 48 小時、三日瘧為 72 小時、惡性瘧則不規則。感染之症狀又以惡性瘧最嚴重，一旦診斷確定後必須馬上治療。至於間日瘧、三日瘧、卵形瘧則較不具致命性，但仍絲毫不能鬆懈。即時檢驗瘧原蟲存在與否提供防疫人員採取必要作為是刻不容緩的任務。

面對此類之新興傳染病時，除能快速偵測比對病原體、瞭解其可能的感染源、疾病的流行趨勢及協助疫情調查外，還可獲取更多生物資訊以增進對該病原的瞭解及認識，作為未來防疫政策擬訂及相關疾病研究的重要參考。

二、材料與方法

(一) 寄生蟲法定傳染病監測網路：

1、 檢體來源：

國內醫院病例通報收集之新鮮糞便檢體、弓形蟲陽性個案之血液檢體或特殊檢體來源。截至本(108)年 11 月 1 日，檢體件數累積為 4,666 件，已達年度規範之 4,200 件。

2、 檢體處理及保存：

(1) DNA 萃取：

- i. 將檢體與 guanidine thiocyanate (GIT) 溶液混合均勻，置於控溫震盪加熱器 95°C 加熱 30 分鐘。
- ii. 冷卻至室溫，置於高速離心機以 13,000 rpm 離心 3 分鐘。
- iii. 移取 250 µl 上清液至檢體槽(Sample Cartridge)。
- iv. 將檢體槽置入核酸萃取器(MagNA Pure LC)進行 DNA 萃取。
- v. 檢體 DNA 最後溶於 100 µl 萃取緩衝液(Elution Buffer)。
- vi. 移取檢體 DNA 至 1.5 mL 離心管，置於 4°C 冰箱冷藏保存。

3、 弓形蟲、隱孢子蟲、痢疾阿米巴、梨形鞭毛蟲與環孢子蟲等食媒性寄生蟲之盛行率調查：

(1) Nested PCR 檢測系統：

<i>Giardia spp.</i>	G7	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC
	G759	GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC
	GiarF	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG
	GiarR	CTCGACGAGCTTCGTGTT
<i>Entamoeba spp.</i>	uEnta-1	AGCGAAAGCATTTTACTCA
	uEnta-2	ATTCACCTCTTTATTCAATCG
<i>Cryptosporidium</i>	Crypto_outF	ATA GTC TCC GCT GTA TTC
	Crypto_outR	GCA GAG GAA CCA GCA TC
	Crypto_inF	TCC GCT GTA TTC TCA GCC
	Crypto_inR	GAG ATA TAT CTT GGT GCG
<i>Toxoplasma gondii</i>	Outter-F	CCTTTGAATCCCAAGCAAAACATGAG
	Outter-R	GCGAGCCAAGACATCCATTGCTGA

	Inner-F	GTGATAGTATCGAAAGGTAT
	Inner-R	ACTCTCTCTCAAATGTTCTT
<i>Cyclospora spp.</i>	CCITS2-F	GCAGTCACAGGAGGCATATATCC
	CCITS2-R	ATGAGAGACCTCACAGCCAAAC

分析核酸序列時，用 TopTaq Master Mix Kit 進行 nested PCR 反應：5 μ l template DNA，12.5 μ l TopTaq master mix，1 μ l outer forward primer，1 μ l outer reverse primer，2.5 μ l coralloid concentrate 及 3 μ l RNase-free water，最終體積為 25 μ l，進行第 1 次 PCR 反應。94°C 加熱 5 分鐘後，進行 35 個循環，每個循環為 denature 94°C 30 秒；annealing 50°C 30 秒以及 extension 72°C 1 分鐘。第 2 次 PCR 反應：2 μ l template DNA，12.5 μ l TopTaq master mix，1 μ l inner forward primer，1 μ l inner reverse primer，2.5 μ l coralloid concentrate 及 6 μ l RNase-free water，最終體積為 25 μ l。94°C 加熱 5 分鐘後，進行 35 個循環，每個循環為 denature 94°C 30 秒；annealing 54°C 30 秒以及 extension 72°C 1 分鐘。

(2) Real-time PCR 檢測系統：

i. 針對弓形蟲的 B1 及 RE 基因設計引子 (primer) 與探針及條件如下：

<i>Toxoplasma gondii</i> B1 gene	Toxo-B1F	GGAGGACTGGCAACCTGGTGTCG
	Toxo-B1R	TTGTTTCACCCGGACCGTTTAGCAG
	Toxo-B1 probe	YAK-CGGAAATAGAAAGCCATGAGGCACTCC
<i>Toxoplasma gondii</i> RE gene	Toxo-REF	AGGCGAGGGTGAGGATGA
	Toxo-RER	TCGTCTCGTCTGGATCGAAT
	Toxo-RE probe	FAM-GCCGGAAACATCTTCTCCCTCTCC

ii. *Entamoeba histolytica/dispar* 基因設計引子 (primer) 與探針條件如下：

<i>E. histolytica / dispar SSU-rDNA</i>	EntaTaq-L	GGACACATTTCAATTGTCCTA
	EntaTaq-R	CATCACAGACCTGTTATTGCTG
<i>E. histolytica/dispar</i> differentiation	EntaTaq1463H	YAK-TGTAGTTATCTAATTTTCGGTTAGACC
	EntaTaq1465D	FAM-TGTTAGTTATCTAATTTTCGATTAGAACTC

Real-time PCR 反應總體積為 25 μ l，其組成內容物分別為：5 μ l DNA template，12.5 μ l KAPA SYBR FAST qPCR master mix，6.5 μ l PCR-grade water，10mM 0.5 μ l forward primer 及 10mM 0.5 μ l reverse primer。PCR 增幅條件，先以 95°C 反應 3 分鐘後，另以 95°C 反應 1 分鐘、55°C 反應 20 秒、72°C 反應 30 秒，進行 40 次循環，並在每次循環結束後偵測螢光訊號。

4、弓形蟲檢測-抗體檢測部分：利用生物梅里埃(BioMerieux)出品之 Vidas® (Toxo IgM、IgG 與 IgG avidity kit 進行測定。檢體前處理：將不含有抗凝劑之血清檢體分裝於冷凍保存管，以冷凍標籤依序標示。

(1) 實驗流程包括弓形蟲抗體檢測部分。實驗步驟如下：

將檢體放入離心機中離心 (3,000 rpm、10 min)。從冰箱試劑盒中取出一個試劑條 (strip) 及一支 SPR。取 100 μ L 檢體加入試劑條置入 biomerieux 公司出產 miniVIDAS®機器之第一個檢體置放位置(IgG 親和力測試需進行稀釋後再測試)；選擇一個測試室狀況為「Available」可進行新檢體分析的測試室 (例如 Section A) 作為測試檢體之用，將測試室灰色門往上打開，小心平緩的沿著凹槽將試劑條推入最底部；打開 SPR 置放管外門，比照先前試劑條放置位置將 SPR 放入 SPR 置放槽內；依所放置檢體之測試室，按【Start】鍵開始工作鍵；待測試完成後，儀器會自動列印報告，顯示結果；將使用過之試藥條及 SPR 丟棄，並將報告黏貼於檢驗單上後將報告發出。

(二) 瘧疾抗藥性分析與快篩試劑評估：

包括即時定量 PCR 檢測系統 (real-time PCR)、multiplex PCR、分生檢測等，建立可同時偵測多種病原與快速且有效率的監測方式，包括未知病原的檢測，以即時、有效達到新興傳染病監測及檢驗研究之目的。

1、瘧疾抗藥性分析：菁蒿素 (artemisinin)係為治療瘧原蟲感染極具效用之藥

品，近年來於東南亞之惡性瘧原蟲感染患者上發現對該藥品具有抵抗性之病原株，搜尋文獻表示，惡性瘧原蟲上之 pfK13 螺旋槳基因序列突變對於 artemisinin 抗藥性具有關鍵性影響，故本年度計畫針對惡性瘧感染患者進行檢測。

- 2、本實驗透過巢式 PCR 的方式放大 pfK13 螺旋槳基因片段，實驗步驟敘述如下：備有矯正功能的 Platinum PCR supermix 以放大片段，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' -GGGAAAATCATAACAATCAAGTAATGTG。第二對引子序列 New pfK13-Nested (REV) : 5' -CTTCTTAAGAAATCCGTTA ACTATAACCC ; 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 (定序分析核酸序列)。進行 nested PCR 條件之第一次配方為：1.5 μ l template DNA，14.1 μ l Platinum PCR supermix，0.45 μ l outer forward primer，0.45 μ l outer reverse primer，最終體積為 16.5 μ l。第 1 次 PCR 反應條件為：95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘後，進行 40 個循環，每個循環為 denature 95 $^{\circ}$ C，30 秒；annealing 52 $^{\circ}$ C，30 秒；extension 62 $^{\circ}$ C，30 秒以及 65 $^{\circ}$ C，2 分 30 秒，再進行 65 $^{\circ}$ C，5 分鐘。第 2 次 PCR 反應配方為：3.0 μ l template DNA，28.2 μ l Platinum PCR supermix，0.9 μ l inner forward primer，0.9 μ l inner reverse primer，最終體積為 33 μ l。第 2 次 PCR 反應條件為：95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘後，進行 40 個循環，每個循環為 denature 95 $^{\circ}$ C，30 秒；annealing 50 $^{\circ}$ C，30 秒；extension 62 $^{\circ}$ C，30 秒以及 65 $^{\circ}$ C，1 分鐘，再進行 65 $^{\circ}$ 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 [2]。

- 3、快篩試劑評估：

目前進口 1 廠牌 (BinaxNow) 之瘧原蟲快篩試劑，其功用可區分惡性瘧與其他瘧疾感染。該試劑係針對惡性瘧原蟲特有之 *Plasmodium falciparum* histidine rich protein 2 (PfHRP2) 與人類瘧原蟲均有之 genus-specific aldolase (pan-aldolase) 進行檢測，截至本年度 5 月 31 日，送檢之瘧原蟲分生檢測陽性計 1 件，經快篩試劑檢測結果相符。刻正進口其它廠牌之快篩試劑進行結果比對。

(三) 新興寄生蟲檢驗技術開發：本年度預計開發以 RPA (recombinase polymerase amplification) 原理進行瘧原蟲檢測方法，實驗步驟與初步成果如敘述。

1. 實驗步驟：

利用 TwistAmp nfo 試劑來做 RPA 實驗。檢測惡性瘧原蟲的引子為 PfFwd:5' - GTGTTTCATAACAGACGGGTAGTCATGATTGAGT-3' ; PfRevbio5' -Biotin ACATCTGAATACGAATGCCCCAAAGATACTCC -3' , 探針為 5 - dT-FAM - GTGTTTGAATACTACAGCATGGAATAACAAXTATGAATAAGCTAATTATT-Spacer C3-3' (X 為 dSpacer)。檢測瘧原蟲的引子為 Plas genus F: 5' - CATGGCTATGACGGGT AACGGGGAATTAGA ; Plas genus R: 5' -digoxigenin - AATTGGGTAATTTACGCGCCTGCT GCCTTC ; 探針為 5' - dT- FAM - CATGGCTATGACGGGTAACGGGGAATTAGAXTTCGA TTCCGGAGAG-Spacer C3-3' (X 為 dSpacer)。引子體積各為 2.1 μ l, 探針體積為 0.6 μ l, 緩衝液體積為 29.5 μ l, DNA 體積為 2 μ l, 水體積為 11.2 μ l, 混合均勻再加入 2.5 μ l 280mM 的 MgOAc, MgOAc 加入後 RPA 便開始作用, 作用 37°C 四分鐘後上下搖晃八到十次, 並且再持續加熱 11 分鐘。加熱後取反應產物 2 μ l, 加 buffer 98 μ l 混勻後, 加入檢驗試劑條放置十五分鐘後觀察結果[3] [4]。

三、結果：

(一) 建立寄生蟲感染源監測網絡：

1. 寄生蟲法定傳染病部分，截至本(108)年 11 月 1 日，檢體件數累積為 4,666 件，已達年度規範之 4,200 件，分述如下：

(1) 弓形蟲感染症：本年度截至 11 月 1 日止，合計檢測 95 人，檢測結果如下：

- i. 弓形蟲即時定量 PCR 檢測：檢體種類包含血液(94 件)、CSF(4 件)、羊水 4 件和組織 3 件。無陽性檢體，陽性率為 0%。
- ii. 弓形蟲血清抗體：檢測 95 人中，血清綜合研判陽性 14 人，陽性率為 14.7% (14/95)。

(2) 痢疾阿米巴部分：

- i. 阿米巴原蟲即時定量 PCR 檢測：至本年 11 月 1 日止，本年合計 924 人接受即時定量 PCR 檢測(如表一)，檢體種類包含糞便、膿瘍等，陽性率 52.8% (488/924)，包含痢疾阿米巴與迪斯帕阿米巴(*Entamoeba histolytica*/*E. dispar*)。其中痢疾阿米巴之總陽性率為 27.5% (255/924)，非致病性迪斯帕阿米巴為 25.3% (234/924)。
- ii. 外籍勞工檢體共 631 人接受痢疾阿米巴原蟲即時定量 PCR 檢測，佔整體之 68.2% (631/924)，於該族群痢疾阿米巴之陽性率為 26.9% (170/631)。(如表二)
- iii. 國人共 293 人接受痢疾阿米巴原蟲即時定量 PCR 檢測，佔整體之 31.7% (293/924)，於該族群痢疾阿米巴之陽性率為 28.6% (84/293)。(如表二)

(3) 痢疾阿米巴即時定量 PCR 陽性分析：

- i. 分析即時定量 PCR 陽性外籍與國人計 255 名個案(外籍：170 名、國人 85 名)後進行區域性(搭配本署各區管制中心轄區範圍)分析顯示，台北區陽性個案比例為 37.6%最多[外籍：37.1%，63/170、國人：38.8%，33/84]；以總通報人數換算亦為台北區 10.3% 最高[外籍：9.9%，63/631、國人：3.4%，33/293]。
- ii. 分析即時定量 PCR 陽性外籍計 85 名個案後進行國人(搭配中華民國內政部戶政司全球網)分析顯示，若以陽性個案占區域性的陽性率來看，高屏區盛行率最高 0.000016(60/3698112)，再來是台北區盛行率 0.000012(96/7637240) (如表三)。
- iii. 分析即時定量 PCR 陽性外籍計 170 名個案後進行國家間移民(搭配中華民國統計資訊網)分析顯示，以陽性個案占各國的通報檢體數的

陽性率來看，印尼為外籍通報檢體數最多，也是陽性盛行率最高：37.4% (145/388)，再者為菲律賓盛行率 17.5% (22/126)。若以陽性個案占外籍勞工的陽性率來看，印尼陽性盛行率也為最高 0.053% (145/273605)，再者是菲律賓的盛行率 0.014% (126/156248) (如表四)。

iv. 若以採取分區與國人、非國人(外籍)所佔之痢疾阿米巴即時定量 PCR 陽性比例分析如下：

甲、外籍部分：台北區送檢 172 名，其中 63 名痢疾阿米巴陽性率 36.6% 最高；高屏區送檢 123 名外籍個案，其中 38 名為痢疾阿米巴陽性率 30.9% 為次高。

乙、國人部分：東區送檢 6 名國人個案，其中 2 名為痢疾阿米巴陽性率 33.3% 為最高；高屏區送檢 67 名，其中 22 名痢疾阿米巴陽性率 32.8% 次高。

2. 非法定傳染病傳染病之特殊寄生蟲感染監測網路：

(1) 特殊非法定傳染病寄生蟲檢測部分：

i. 截至本年 10 月 31 日止該項目總數計 2 件，分別為：錐形蟲、利什曼原蟲各 1 件。其中檢體種類皆是血液檢體。檢測結果均為陰性。

ii. 非痢疾阿米巴鏡檢結果：(如表五)

痢疾阿米巴通報檢體中，本年度計有 631 人進行鏡檢檢查，除 3 人未鏡檢出非痢疾阿米巴和非迪斯帕阿米巴外其他腸道寄生蟲外，其餘均檢出腸道寄生蟲，經分析其中以人芽囊原蟲 (*Blastocystis hominis*) 為最多，佔 31.7% (200/631)，尚有大腸阿米巴 (*Entamoeba coli*) 佔 2.5% (16/631)、哈門氏阿米巴 (*Entamoeba hartmani*) 佔 7.3% (46/631)、微小阿米巴 (*Endolimax nana*) 佔 4.7% (22/631)、嗜碘阿米巴 (*Iodamoeba butschlii*) 佔 0.5% (3/631) 與梨形鞭毛蟲 (*Giardia lamblia*) 佔 0.5% (3/631)。

(二) 瘧疾抗藥性分析與快篩試劑評估：

1. 瘧疾抗藥性分型：

寄生蟲法定傳染病部分，截至本(108)年 11 月 1 日，瘧疾陽性件數累積為 7 件，惡性瘧原蟲件數為 3 件：以 CN10802、CN10803、CN10804 為其編號，

CN10802 感染地為奈及利亞、CN10803 感染地為烏干達、CN10804

感染地為剛果，其 3 件 K13 基因均未檢出抗藥性基因，與野生型一致。

2. 快篩試劑評估：

先前進口 1 廠牌(BinaxNow)之瘧原蟲快篩試劑，其功用可區分惡性瘧與其瘧疾感染。該試劑係針對惡性瘧原蟲特有之 *Plasmodium falciparum* histidine rich protein 2 (PfHRP2)與人類瘧原蟲均有之 genus-specific aldolase (pan-aldolase) 進行檢測，截至本年度 11 月 4 日，送檢之瘧原蟲分生檢測陽性計 7 件，經快篩試劑檢測結果，以 CN10801 為男性，感染間性瘧原蟲，感染地是衣索比亞；以 CN10802 為女性，感染惡性瘧原蟲，感染地是奈及利亞；以 CN10803 為男性，感染惡性瘧原蟲，感染地是烏干達；以 CN10804 為男性，感染為惡性瘧原蟲，感染地是剛果，以 CN10805 為男性，感染為間性瘧原蟲，感染地為索羅門群島；以 CN10806 為女性，感染為三日瘧原蟲，感染地是巴布亞紐幾內亞，CN10807 為男性，感染為間日瘧原蟲，感染地是衣索比亞。廠牌(BinaxNow)之瘧原蟲快篩試劑有五個結果符合預期，唯獨 CN10805 和 CN10806 不符合。於期中後購入進口 1 廠牌(SD)之瘧原蟲快篩試劑，此瘧原蟲快篩試劑有六個結果符合預期，唯獨 CN10806 不符合(如圖一)。

- (三) 新興寄生蟲檢驗技術開發：本年度預計開發以 RPA (recombinase polymerase amplification) 原理進行瘧原蟲檢測方法，本實驗的檢體分別為 CN10704、CN10705，感染皆為惡性瘧原蟲，皆於偵測 Genus 和 Species 都有出現檢驗條，CN10701 感染為間日瘧原蟲、CN10706 感染為三日瘧原蟲、CN10402 感染為卵圓瘧原蟲、CN8403 感染為諾氏瘧原蟲，偵測 Genus 有出現檢驗條(如圖三)，透過跑膠的方式，也可以透過 DNA 的大小判斷確實有產物存在(如圖二)。

四、討論：

寄生蟲感染源監測網路之法定傳染病監測結果：因弓形蟲為貓科動物寄生蟲，人

類並非主要宿主，主要食入受污染的食物所感染。故當蟲體進入體內後，較不容易第一時間引起宿主臨床症狀且大部分感染者無明顯臨床症狀，導致患者無就醫之意願，推測可能為弓形蟲蟲株抗原陽性率較低之因素。然而弓形蟲抗體陽性率(急性期)較歷年高。有關阿米巴部分，因台北區管制中心轄區內之人口數最多，陽性個案數最高是可以預期的，分析各區管制中心之送檢數統計陽性率，外籍部分台北區管制中心轄區陽性率為最高，與去(107)年度陽性率最高之北區管制中心不同，其原因仍待探討。然而國人部分台北區管制中心最高，與去(107)年台北區最高之情況相同。

本年度評估之瘧疾快篩試劑，有兩間廠牌，分別為 BinaxNow 和 SD 兩快篩試劑，用於判別本年度瘧疾通報案例分析後發現對於惡性瘧原蟲能夠高度吻合，在 BinaxNow 的說明書表示偵測惡性瘧原蟲的敏感性能夠到 100%，特異性到達 94.7%；偵測間日瘧原蟲的敏感性能夠到達 81.6%，特異性到達 99.7%；偵測極限惡性瘧為血液每 μl 有 1001-1500 隻寄生蟲；間日瘧為血液每 μl 有 5001-5500 之寄生蟲。在 SD 的說明書表示偵測惡性瘧原蟲偵測惡性瘧原蟲的敏感性能夠到 100%，特異性到達 99.7%，偵測極限可以到每 μl 有 51-100 隻寄生蟲。而 BinaxNow 偵測的 T1 測試條是偵測惡性瘧原蟲的 HRP2，而 T2 測試條是偵測瘧原蟲的 Aldolase；SD 偵測惡性瘧原蟲的也是 HRP2，而偵測瘧原蟲的 Pan 則是 pLDH。透過這兩種廠牌快篩，在 CN10806 為女性，感染為三日瘧原蟲都未檢測出陽性，本實驗室透過鏡檢和分生判斷此病人帶蟲數少，故快篩偵測為陽性，而在 CN10805 為男性，感染為間性瘧原蟲的篩檢結果，SD 偵測為陽性；BinaxNow 偵測為陰性。可以比較出 SD 比 BinaxNow 的檢測結果如說明書寫得來的佳。而我們也做了 pLDH 和 Aldolase 的檢驗在於陽性投藥後複檢的檢測，可以發現如先前文獻所示，pLDH 較符合鏡檢的檢測推測，而 Aldolase 會鏡檢未發現，卻仍快篩還是陽性的現象。

本年度新興寄生蟲檢驗技術開發以 RPA (recombinase polymerase amplification) 原理進行瘧原蟲檢測方法，透過於室溫便能放大核酸的方式，並透過試驗試紙來判讀是否有瘧原蟲的感染，先前文獻已有透過此方式成功檢驗出判讀瘧原蟲和諾式瘧原蟲，本實驗將其的引子改成偵測惡性瘧原蟲和瘧原蟲 Genus 的偵測方式，透過跑膠和各項

樣品皆有成功檢測出相對應的結果，會再作後續調整以增加穩定性[3][4]。

五、結論與建議：

藉由本研究計畫結論與建議如下：

(一) 寄生蟲感染源監測網路：法定傳染病監測結果：

1. 弓形蟲部分：弓形蟲蟲株檢驗結果陽性率為 0%；弓形蟲血清綜合研判陽性率為 14.7%。
2. 痢疾阿米巴部分：
 - (1) 痢疾阿米巴檢驗結果總陽性率為 27.5%，若區分族群(國人與外籍)，陽性率分別為 28.6%與 26.9%(國人與外籍)。
 - (2) 痢疾阿米巴陽性分區比例：台北區陽性個案數最多，所佔之陽性比例最高(37.6%)，如採計算總通報人數之陽性比例亦為台北區最高(10.3%)
 - (3) 陽性外籍個案占各國的通報檢體數的陽性率來看，印尼為外籍通報檢體數最多，也是陽性盛行率最高:37.4%，再者為菲律賓盛行率 17.5%。若以陽性個案占外籍勞工的陽性率來看，印尼陽性盛行率也為最高 0.053%，再者是菲律賓的盛行率 0.014%。
 - (4) 採計分區送檢與族群類別(國人、非國人-外籍)進行分析，有關外籍送檢陽性比率台北區為最高(36.6%)，高屏區次之(30.9%)；國人送檢陽性為東區最高(33.3%)，高屏區次之(32.8%)。

(二) 瘧疾抗藥性分析與快篩試劑評估：

1. 瘧疾抗藥性部分：

本年度瘧疾案例無抗藥性案例，皆和野生株序列一致。

2. 快篩試劑評估：

本年度評估之瘧疾快篩試劑，有兩間廠牌，分別為 BinaxNow 和 SD 兩快篩試劑，而 SD 的快篩試劑較為敏感，pLDH 也較能反應鏡檢結果。

(三) 新興寄生蟲檢驗技術開發：

RPA (recombinase polymerase amplification) 原理進行瘧原蟲檢測方法，本試驗偵測

惡性瘧原蟲和瘧原蟲 Genus 的偵測方式，皆有成功檢測出相對應的結果，會再作後續調整以增加穩定性。

六、重要研究成果及具體建議：

藉由本計畫執行，可獲得：


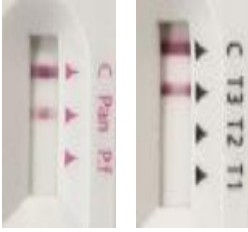

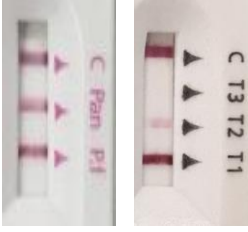



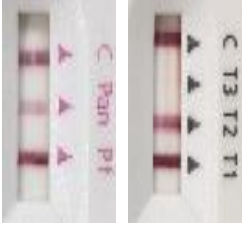



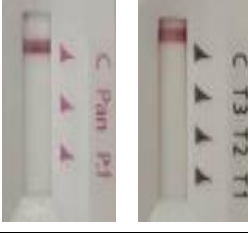
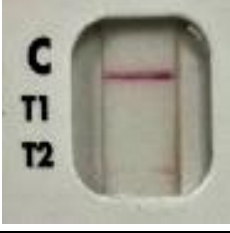

- (一) 法定傳染病之陽性率與地區分布情形，弓形蟲部分血清綜合研判陽性率與歷年相近；有關痢疾阿米巴部分：外籍送檢陽性率最高落於台北區管制中心轄區內，其原因值得探討；然而，國人送檢陽性率最高則在台北區管制中心轄區內，符合預期。整體而言，因台北區管制中心轄區因陽性個案最多，如以送檢總數來觀察後陽性率最高。
- (二) 持續驗證與開發特殊寄生蟲檢驗方法，以符合未來醫療院所或公衛防治需求。並且會再透過購買其他瘧疾快篩試劑來比對其效能，以獲得最為準確的快篩檢測準確度。
- (三) 本年度新興寄生蟲檢驗技術開發 RPA (recombinase polymerase amplification) 原理進行瘧原蟲檢測方法，以應在沒有加熱器或是野外時可以透過此方法來檢測。綜合本年度研究成果，可探究有關罹病人口之地區分布，惟外籍移工之國籍統計囿於無法從送驗單獲得相關資訊，須跨組室蒐集資料始能完成，建議來年如執行監測計畫時，可嘗試與相關組室進行洽詢，以獲得更加完整之資料進行分析。

七、參考文獻

1. Domingos A, Ito LS, Coelho E, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* IgG antibody in HIV/AIDS-infected individuals in Maputo, Mozambique. *Revista de saude publica* 2013;47:890-6.
2. K13-propeller Alleles, MDR1 Polymorphism, and Drug Effectiveness at Day 3 after Artemether-Lumefantrine Treatment for *Plasmodium falciparum* Malaria in Colombia, 2014-2015
3. Recombinase Polymerase Amplification Combined with a Lateral Flow Strip for the Detection of *Plasmodium knowlesi* *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 98(3), 2018, pp. 700–703 doi:10.4269/ajtmh.17-0738
4. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis Kersting et al. *Malaria Journal* 2014

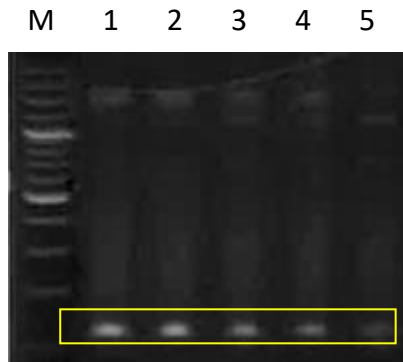
圖表：

圖一：兩廠牌快篩檢驗結果

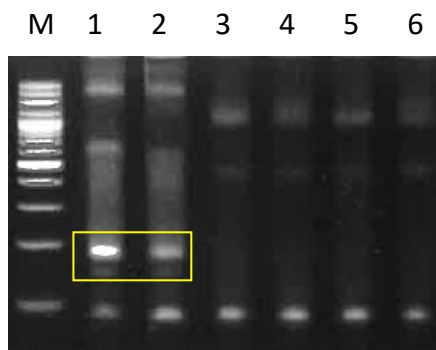
案例號	BinaxNow	SD	感染型別
CN10801			間日瘧原蟲
CN10802			惡性瘧原蟲
CN10803			惡性瘧原蟲
CN10804			惡性瘧原蟲
CN10805			間日瘧原蟲
CN10806			三日瘧原蟲
CN10807			間日瘧原蟲

說明：廠牌(BinaxNow)之瘧原蟲快篩試劑有五個結果符合預期，唯獨 CN10805 和 CN10806 不符合。於期中後購入進口 1 廠牌(SD)之瘧原蟲快篩試劑，此瘧原蟲快篩試劑有六個結果符合預期，唯獨 CN10806 不符合。

圖二:利用 RPA 試劑放大基因檢測

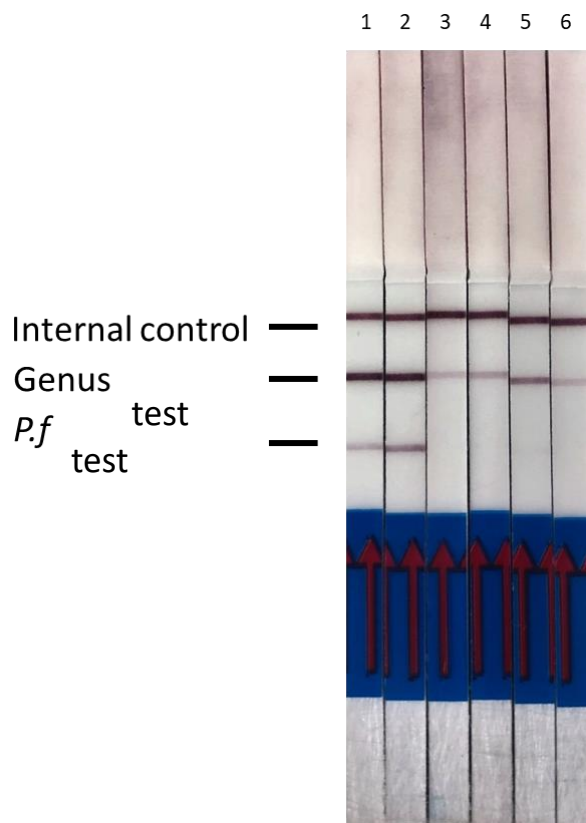


(M : Marker ; 1~5 : 加 Plas genus F; Plas genus R 及探針 ; 1 : Sample 為惡性瘧原蟲陽性檢體，2 : Sample 為間日瘧原蟲陽性檢體，3 : Sample 為卵形瘧原蟲陽性檢體，4 : Sample 為三日瘧原蟲陽性檢體，5 : Sample 為諾式瘧原蟲陽性檢體。黃框處陽性檢體產物：115bp)



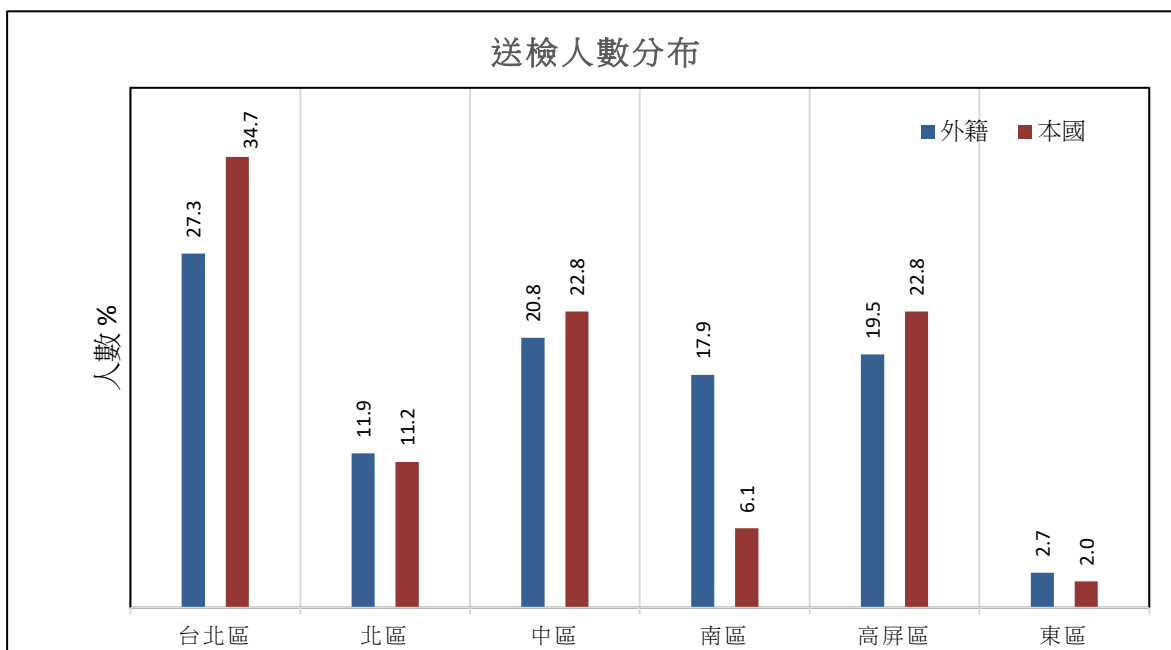
(M : Marker ; 1~6 : 均加 PfFwd; PfRevbi 及探針 ; 1, 2 : Sample 為惡性瘧原蟲陽性檢體，3 : Sample 為間日瘧原蟲陽性檢體，4 : Sample 為卵形瘧原蟲陽性檢體，5 : Sample 為三日瘧原蟲陽性檢體，6 : Sample 為諾式瘧原蟲陽性檢體。黃框處為陽性結果產物：173bp)

圖三:利用快篩試劑條檢測瘧疾檢體



(; 1, 2 : Sample 為惡性瘧原蟲陽性檢體，3 : Sample 為間日瘧原蟲陽性檢體，4 : Sample 為卵形瘧原蟲陽性檢體，5 : Sample 為三日瘧原蟲陽性檢體，6 : Sample 為諾式瘧原蟲陽性檢體。右圖處為標準結果)

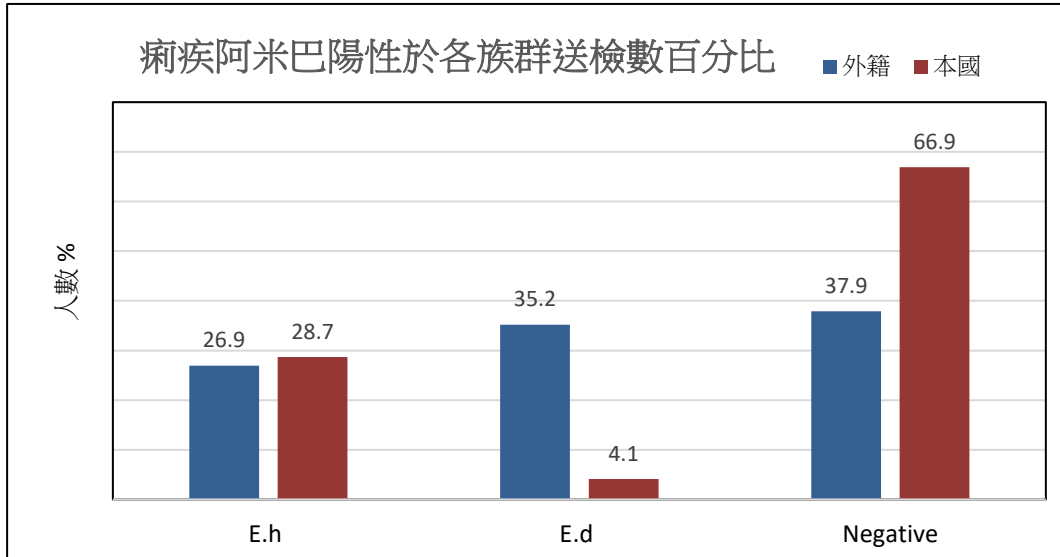
表一：痢疾阿米巴送檢人數百分比



說明：由送檢人數百分比可知，台北區管制中心轄區內不論為外籍或本國送檢數量比

例最多(外籍 27.3%、本國 34.7%)

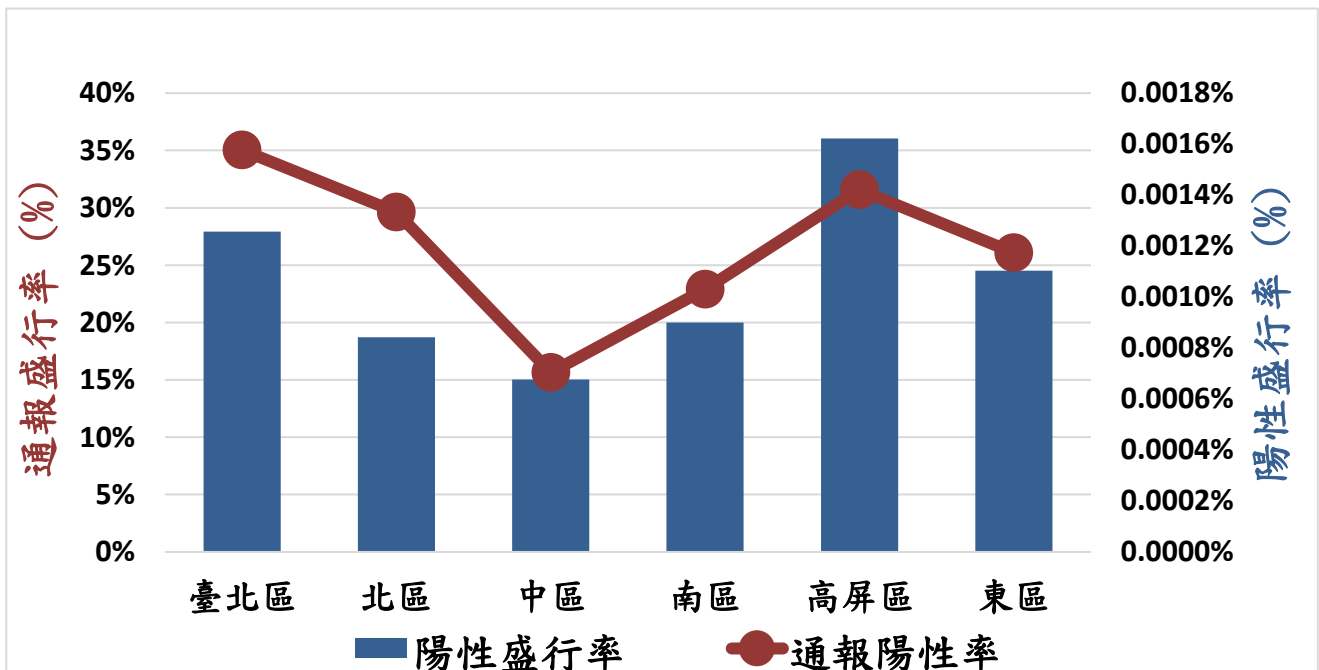
表二：痢疾阿米巴陽性於各族群送檢數百分比



說明：由各族群(本國、外籍)送檢數之痢疾阿米巴陽性可知：外籍陽性比率 26.9%

本國陽性比率為 28.7%

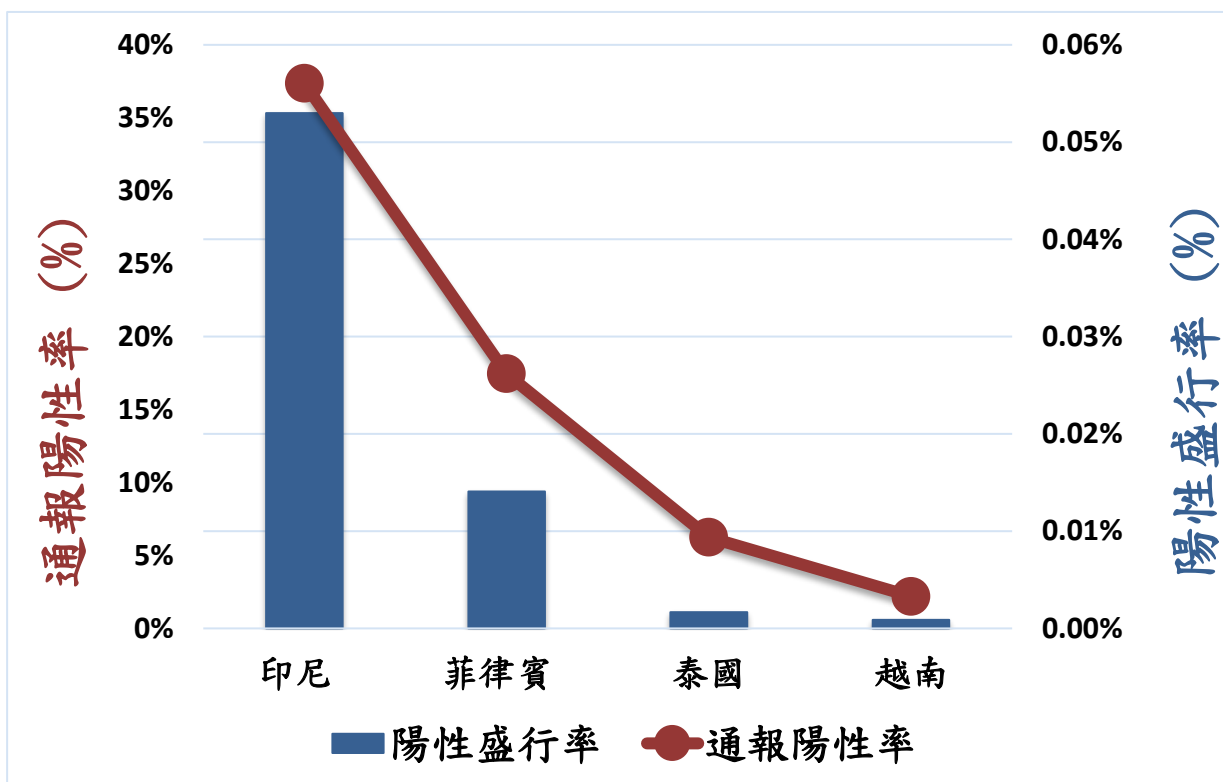
表三：以各分區管制中心轄下送檢之痢疾阿米巴陽性百分比



說明：高屏區區域陽性盛行率最高： 0.000016(60/3698112)，再來是台北區盛行率

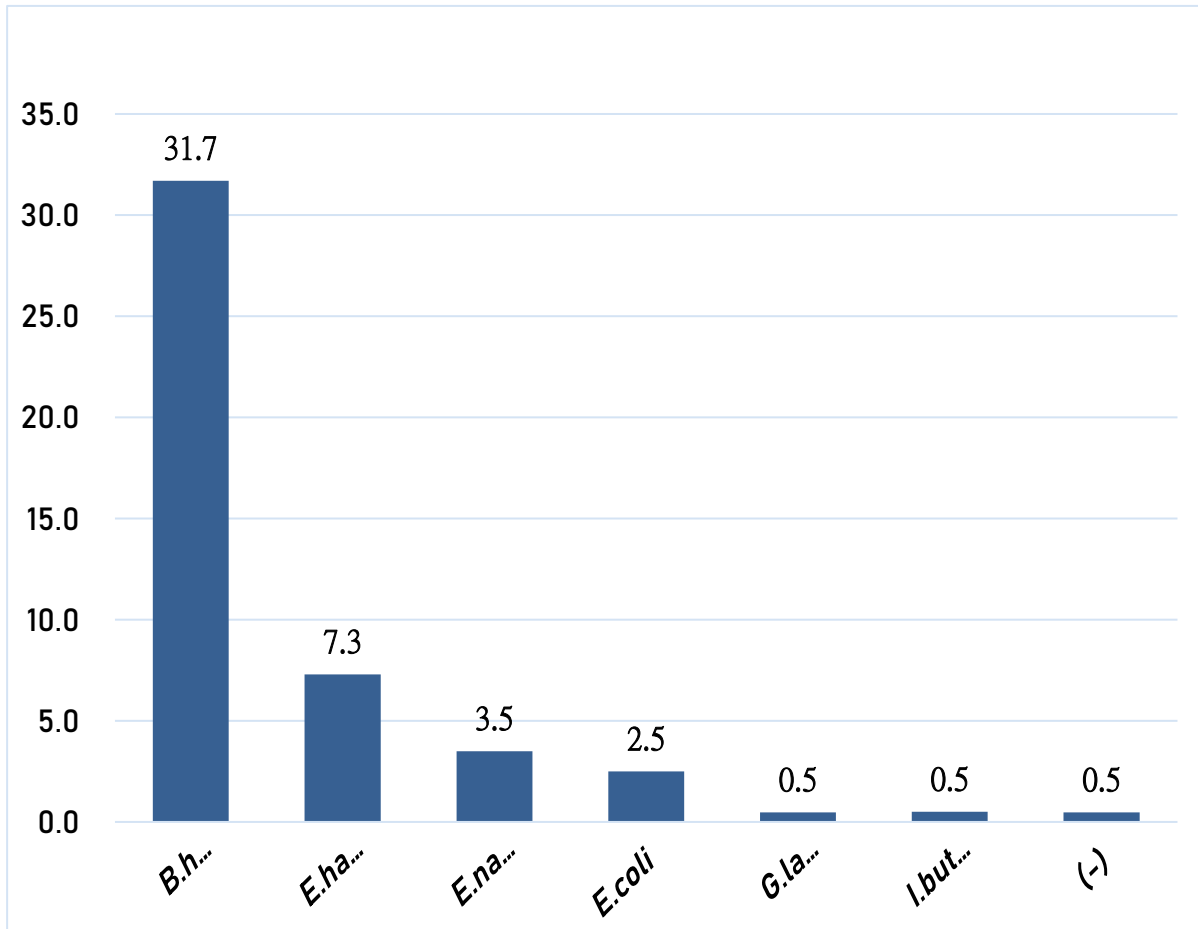
0.000012(96/7637240)

表四：陽性個案占外籍勞工的陽性率



說明：以陽性個案占各國的通報檢體數的陽性率來看，印尼為外籍通報檢體數最多，也是陽性盛行率最高：37.4% (145/388)，再者為菲律賓盛行率 17.5% (22/126)。若以陽性個案占外籍勞工的陽性率來看，印尼陽性盛行率也為最高 0.053% (145/273605)，再者是菲律賓的盛行率 0.014% (126/156248)

表五：非痢疾阿米巴鏡檢結果百分比



說明：非痢疾阿米巴鏡檢結果百分比顯示人芽囊原蟲(*B.hominis*)鏡檢檢出率最多，哈式阿米巴(*E.hartmani*)次之。

代號備註：

Blastocystis hominis：人芽囊原蟲

Entamoeba hartmani：哈門氏阿米巴

Endolimax nana：微小阿米巴

Entamoeba coli：大腸阿米巴

Iodamoeba butschlii：嗜碘阿米巴

Giardia lamblia：梨形鞭毛蟲

衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫

期末審查意見回復

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-000126

計畫名稱：特殊寄生蟲感染之檢驗及監測

計畫主持人：李淑英

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	要有足夠病例才能確認快速檢驗準確性。	感謝委員意見。	無
2	用檢出陽性率與人口盛行率的方式去做比較，是非常好的作法。	感謝委員意見。	無
3	值得繼續進行，以提供寄生蟲疾病防治與即時診斷。	未來將依循委員建議對更多臨床檢體進行瘧疾快篩試劑檢測，以評估該試劑之檢驗效能。	無
4			
5			

備註：請將此表單附在期末報告後方，如有修正期末報告內容請註明頁碼，並務必至 GRB 系統完成資料抽換。