

計畫編號：DOH96-DC-2018

行政院衛生署疾病管制局九十七年度科技研究發展計畫

瘧疾分子檢驗及基因型別鑑定系統之建立

Establishment of molecular diagnosis and drug resistant survey of Malaria

總研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：嵇達德

研究人員：詹志文、郭明珠

執行期間：94年1月1日至97年12月31日

\*本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見\*

## 目 錄

	頁碼
封面	
目錄	(2)
摘要	(3)
前言	(5)
材料與方法	(7)
結果	(9)
討論	(12)
參考文獻	(15)
圖表	(17)

共 (23)頁

## 中文摘要

關鍵詞：瘧疾、即時聚合酶連鎖反應、恆溫環形核酸增幅法、基因分型、*Pfcr*、*Pfmdr1*、聖多美普林西比共和國

瘧疾為世界上最重要的傳染病之一，感染惡性瘧嚴重感染者，由於其病程發展極快，在數天至數小時內即可發展為腦性瘧疾，甚或死亡，故需儘速治療的惡性瘧患者。故發展更快速的檢驗方法可縮短診斷時間，減少患者致死的機率，本研究已發展 SSU rDNA nested PCR 外也發展出 TaqMan 即時聚合酶連鎖反應(Real time PCR)及恆溫環形核酸增幅法(LAMP)方法，可準確區分四種人類惡性瘧原蟲，可將由自血液抽取核酸至完成 PCR 檢驗時間縮短到 2.5 小時內。本計劃報告首例人類於菲律賓巴拉望島自然感染猴子瘧疾 *P. knowlesi* 的病例。*P. knowlesi* 瘧原蟲的形態與三日瘧非常相似，只有一些細微的結構有所不同，容易混淆。因此，需加注意致病性 *P. knowlesi* 引入台灣猴群，再傳染到人類族群，造成新興猴子瘧疾的傳播。以惡性瘧原蟲 *mssl* 及 *mss2* 基因建立基因分型系統，分析近年的惡性瘧陽性檢體，發現不同型別的惡性瘧沒有特殊地理分佈。近年來間日瘧在亞洲的感染率已有增加的趨勢及所造成的病症也較過去嚴重，每年約有 1.3-4.35 億人感染。間日瘧常有復發的問題，原因為需加以釐清。利用所建立的間日瘧基因分型系統，分析 93 年至今的 3 個間日瘧復發(relapse)病患個案後，發現有兩位病患前後兩次發病的血液檢體中，間日瘧原蟲的型別不同，可能在第一次被瘧蚊叮咬感染間日瘧原蟲時，同時間就已經同時感染不同型別的蟲株，而其中某些型別的蟲株在過一段時間後才再復發。

上述檢驗技術與先前發展的熱帶瘧原蟲 *Pfcr* 及 *Pfmdr1* 抗藥基因分析方法也已用於我友邦聖多美普林西比共和國的瘧疾防治，協助聖國 RDT 瘧疾篩驗檢體的蟲株種類及抗藥性的分析。結果顯示 RDT 陰性檢體的陽性比太高達 89.3%，瘧原蟲混合感染比率增加特別是惡性瘧及間日瘧的混合感染。分析 20 例惡性瘧陽性檢體皆發現 *Pfcr* 76 位點上核苷酸的突變，可能對 chloroquine 有抗性，其中 17 例 *Pfmdr1* 亦有不同程度的突變，也可能對 amodiaquine、mefloquine 和 artemisinin 產生抗藥性。將 22 例惡性瘧檢體進行 *MSP1* 基因的分子分型，結果顯示可分為 A、B、C 和 E 型共 4 型。

## 英文摘要

關鍵詞：Malaria, Real-time PCR, LAMP, genotyping, *Pfcr1*, *Pfmdr1*, Democratic Republic of Sao Tome and Principe

Malaria is one of the most important infectious diseases. Severe malaria case may develop to cerebral malaria within several hours to days, even cause of death. In order to treat the falciparum malaria as soon as possible, the development of rapid diagnostic methods may reduce the detecting time and mortality. In this study we had developed SSU rDNA nested PCR and TaqMan Real time PCR and LAMP methods both could differentiate four human malarias and reduce the diagnostic time to 2.5 hr. A case of naturally acquired infection with simian malaria, *Plasmodium knowlesi*, in Palawan Island, Philippines, was first reported here. Although the morphology of malaria parasites in the patient was similar to those typically seen in *P. malariae*, some minor different patterns were found to differentiate with *P. malariae*. Therefore, *P. knowlesi* shall be taken precaution against the re-mergence of simian malaria in human when they are introduced into local wild primate populations in Taiwan. *P. falciparum msp1* and *msp2* gene genotyping system had been established to analyze the falciparum malaria cases recent years. The distribution of different genotypes of malaria didn't have correlation with their geographic distributions. Recent years vivax malaria infection was found to be increasing in Asia and cause more serious disease than before. Vivax malaria often relapses after patients recovered from primary malaria. After analyses three *Plasmodium vivax* relapsed cases, we found primary infected and relapsed vivax malaria was different types from two patients. Only one patient had same type of primary infected and relapsed vivax malaria infection. This might because more than two types of *Plasmodium vivax* were introduced to patient body by one single mosquito bite. Some particular strains may relapse and develop in patient liver after some times.

The diagnostic methods as described above, and *Pfcr1* and *Pfmdr1* typing methods had been use to help the malaria control project in Democratic Republic of Sao Tome and Principe for the analysis of *Plasmodium* species and drug resistance on the malaria RTD screened samples. The results indicated there was a highly false negative rate in RDT negative samples (89.3%), and malaria mixed infections were increasing, especially *P. falciparum* and *P. vivax*. Analysis of 20 *P. falciparum* samples revealed that they all had *Pfcr1* K76T mutation might resist to chloroquine. Among this 20 *P. falciparum* samples, 17 samples had different mutations on *Pfmdr1* might resist to modiaquine、mefloquine 和 artemisinin. *MSP1* geneotyping of 22 *P. falciparum* cases indicated Type A, B, C and E, total four types.

## 前言

瘧疾為世界上最重要的傳染病之一，1993 年 WHO 度報告指出，全球 40% 人口身處疫區，全球每年約有十億人口感染瘧疾，每年死於瘧疾人數逾二百萬人，所耗社會資源難以算計。2005 年世界衛生組織世界瘧疾報告(WHO World Malaria Report)更指出全球瘧疾感染有不減反升現象。目前在中國大陸、東南亞、南美洲及非洲等地區，瘧疾仍是一相當嚴重的傳染病[1]；此外，近年來隨著瘧蚊及瘧原蟲抗藥性問題的日益嚴重，也正逐漸加重瘧疾防治的困難性[2]。

台灣地區自 1965 年 WHO 宣佈瘧疾根除後即進入保全期，迄今大多為零星的境外移入病例。除 1966 年 7 月至 1973 年 8 月北部地區四縣二市因越戰引入間日瘧流行事件，1995 年 10 月因北部某醫院因注射顯影劑共用導管所導致之瘧疾院內感染事件及 2003 年 9 月台東縣太麻里鄉因國人出國工作感染瘧疾回台所造成的兩例介入感染病例等，其餘瘧疾患者皆為境外移入個案。然而，隨著國際交通日益頻繁、外勞的引進、國人觀光甚至出國工作人數的增加等因素，近四十年，每年仍有數十起境外移入個案，其中以感染惡性瘧(32%)及間日瘧(61%)最多。

然台灣瘧疾防治在進入保全階段後，病例減少，相關的檢驗、治療及防治人才逐漸式微，特別是鏡檢人才難覓，訓練亦非短期可成。疾病管制局檢驗中心現僅有一人負責通報病例之檢驗確認業務，但需面對瘧疾疫區入境之熱患檢疫、瘧蚊滋生區熱患篩檢及本土病例疫調等之大量檢驗工作，實在倍感吃力。因其篩檢工作是以敏感度較高之厚層血片鏡檢為主，耗時耗力，另鏡檢對於混合瘧原蟲感染較不易辨識，薄層血片鏡檢之敏感度不足，無法勝任篩檢工作。因此本計劃已發展一套較為自動化之分子檢驗系統，來輔助傳統鏡檢，流程如圖一。

目前，分子檢驗是以四種感染人類之瘧原蟲之 small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) 基因序列之特異性為基石，採用聚合酶連鎖反應之技術，自血液中抽取核酸後，進行特定瘧原蟲基因增幅反應，藉產物之有無、大小或序列診斷瘧原蟲之存在與否及種別判定 [3]，本實驗室現已將此方法用於常規的瘧患通報檢體的檢驗，輔助傳統鏡檢，及機場發燒病患的瘧患篩檢。然而自血液抽取核酸至完成 PCR 增幅，需耗時 5 個半小時，始可診斷是否有瘧原蟲之存在。如需更進一步判別種別，則還需要 5 個小時。對於需儘速治療的熱帶瘧患者，此長時間的診斷方式恐會造成患者致死的機率，預後不良的機會，故本計畫也試著發展可以縮短檢驗時間的方法。目前，我們已發展 TaqMan 即時聚合酶連鎖反應(Real time PCR)及新型恆溫環形核酸增幅法(LAMP)方法，可以將檢驗時程時間縮短至 2.5 個小時。

近些年來許多傳染病如禽流感及 SARS 等跨物種間之傳播，已造成人類健康極大的威脅，也引起國際共同的重視的課題。許多野生猴類及動物則為這些致病原在自然界的保蟲宿主。目前有至少 26 種瘧原蟲存在於猴類族群中，其中如 *Plasmodium knowlesi*、*P. simium*、*P. brasilianum*、*P. inui* 及 *P. Cynomolgi* 已被證實可自然感染人類產生瘧疾症狀(Coatney et al.,

2003)。2004年 Balbir Singh 等人報告在馬來西亞婆羅洲島(Borneo)發現大規模人類自然感染 *P. knowlesi* 的病例後，已引起醫學界的重視〔4〕。2008年 Cox-Singh 等人更進一步發現相當數量的自然感染 *P. knowlesi* 的病例廣泛分佈在婆羅洲的沙巴、沙勞越與馬來半島的彭亨(Pahang)等地，並發現四例因感染諾氏瘧原蟲死亡的病例，這顯示感染諾氏瘧原蟲是有潛在致死的可能〔5〕。因此，*P. knowlesi* 已被認為可能是前述四種人類瘧疾以外的第五種人類瘧疾〔6〕。由於檢驗猴子瘧疾血片需要良好的經驗，在形態學上又常與人類瘧疾相似而誤判，而無法真正做正確的判定，如 *P. knowlesi* 顯微鏡下的形態非常類似 *P. malariae*，易亦引誤判，需以分子生物學的方法加以區分。我們已報告台灣所發現的第一例由菲律賓巴拉望島自然感染 *P. knowlesi* 猴子瘧疾的病例。希望國人注意未來 *P. knowlesi* 猴子瘧疾引入台灣 *Macaca cyclopis* 猴類族群，在傳播給民眾的潛在危機。

瘧疾病患偶有發現於治療後幾個月甚至數年又再度發病之案例，其可能原因包括：瘧原蟲抗藥株的產生、病患未完成完整療程又再發病，及再感染新的瘧原蟲。然而，同一病患除非感染不同種類的瘧原蟲，若是感染同種瘧原蟲，則是否為舊病復發或是再感染，將很難只藉由其病史及出國史就可加以釐清，需再以分子生物學方法做基因型別的鑑定，以了解其感染蟲株及模式，並釐清是否為間日瘧復發(relapse)或是惡性瘧再發作(recrudescence)。間日瘧原蟲的 *mssl*、*mss3 α* 及 *csp* 基因為現行最具共識之基因型別分型標的，這些基因皆具 polymorphism，而且以變異數目之重複排列之方式呈現 [7,8]。同樣的惡性瘧原蟲的 *mssl* 及 *mss2* 基因亦為現行國際間最具共識之基因型別分型標的，這些基因也皆具 polymorphism，而且以變異數目之重複排列之方式呈現 [9]。

本計劃也已建立惡性瘧及間日瘧蟲株間的基因分型、惡性瘧抗藥性分析系統，將感染病患之瘧原蟲進一步做型別及抗藥性鑑定，並同時與臨床症狀、感染地區及發病潛伏期等資料建立資料庫，與世界先進國家之資料庫銜接，完整詳盡的瘧疾之基因資料庫及分子流行病學可提供疫情時追蹤感染源及感染途徑之依據，是防疫策略中極重要的一環，另一方面之資料如瘧原蟲抗藥性、藥物敏感度、病例個體差異亦可輔助臨床診斷與治療。此外，目前熱帶非洲，大多數的國家均尚未進行大規模有效的滅瘧行動，我非洲八個友邦均屬瘧疾流行疫區，身受瘧疾戕害。我國自2004年11月協助聖多美普林西比共和國（以下簡稱聖國）進行瘧疾防治，開始展開以亞滅寧（alphacypermethrin）室內殘效噴灑（indoor residual spraying）為主的瘧疾防治工作後，九歲以下孩童瘧疾罹患率有明顯下降，聖國各省區的瘧疾罹患率從噴灑前的35.4—10.2%降至噴灑後之5.3—1%，顯示已達到瘧疾防治的初期目標 [10, 11]。目前聖國瘧疾是屬於低度流行(hypoendemic)，其特色是小孩與大人都是瘧疾感染之高危險群，季節性爆發流行之風險相當高，須針對瘧疾診斷、瘧疾治療、瘧患追蹤及瘧蚊監控等四個方向加以監控，逐漸朝瘧疾根除邁進。協助非洲友邦撲滅瘧疾計畫已有助台聖雙邊合作關係與邦誼之提升。歐美各國及世界衛生組織(WHO)對非洲國家撲滅瘧疾計畫均甚為重視。我國協助聖國邦撲滅瘧疾計畫已吸引歐美各國及世界衛生組織(WHO)之注意及肯定。2008年4月聖國已完成瘧疾快速檢驗(RDT)法的全面篩檢，結果顯示瘧疾盛行率為3.5%，若此結果為真即全國仍約有五千多名瘧疾病患散佈各省區，離達到清除前期盛行率低於0.1%的標準尚有一段距離，須加以分析證實。因此，本實驗室也協助我國駐

聖國的瘧疾防治小組進一步分析 RDT 的檢驗結果，以 PCR 評估 RDT 的敏感性及後續使用的可能，並了解瘧原蟲防治後蟲株種類的變化、再感染率或復發率之機率及抗藥性發生種類與機轉，此將有助上述聖國未來瘧疾治療藥物之使用與規劃。

本計劃的研究目標為建立瘧疾之分子檢驗及型別鑑定系統，同時收集台灣地區瘧疾病例之檢體，進行瘧原蟲之種別、基因型別鑑定、抗藥性及臨床資料調查分析，以建立完整詳盡的境外移入及本土瘧疾病源之基因資料庫及分子流行病學，計劃將分為四年進行：

第一年：收集台灣地區所有瘧疾病例之檢體及臨床資料，以顯微鏡檢查為參考標準，利用 PCR-cloning 及 sequencing 定出所收集之瘧原蟲之 Small ribosomal subunit RNA 基因 (SSU-rDNA) 序列，並進而比對分析，尋求感染人類瘧原蟲之 SSU-rDNA 中序列之異同。

第二年：建立瘧原蟲分子檢驗之實驗室模式，針對通報檢體進行瘧原蟲檢驗及種別分析。並同時建立以分析熱帶瘧原蟲 *msh1* 及 *msh2* 等之基因型別鑑別系統，進行初步分型工作。

第三年：根據瘧原蟲之 Small ribosomal subunit RNA 基因 (SSU-rDNA) 序列之異同，建立單管或多管 real-time PCR 檢驗方法，做為瘧原蟲分子檢驗方式，以期增加檢驗敏感性及縮短檢驗時間。並同時也將以間日瘧原蟲 *csp* 及 *msh1* 等之基因為標的，建立基因型別鑑別系統，進行初步分型工作。

第四年：將近一、兩年蒐集的熱帶瘧原蟲檢體，針對 *pfprt* 及 *pfmdr* 基因，利用 PCR-cloning 及 sequencing 定出序列，以了解其與 chloroquine 及青蒿素抗藥性的關係，建立基因資料庫。以了解各瘧疾輸入國瘧原蟲抗藥性分布狀況，並提供我國醫生用藥的參考，減少病人的損傷。

# 材料與方法

## 瘧患血液檢體收集

本研究收集台灣通報之瘧疾病例檢體例，主要來自東南亞地區、非洲、中國及大洋洲，其中大洋洲(Papua New Guinea 及 Soloman's Islands)為國人新興旅遊、投資、打工的地區，為今年台灣瘧疾境外移入病例最主要的來源國，所得檢體將先建立 Bar Code 存檔，再分為三種保存方式保存及進行後續檢驗工作：1. 加入抗凝劑 EDTA 保存之全血、2. 滴於濾紙 (Watmann 3mm chromatography grade paper) 陰乾保存之 dry blood spotted 檢體、及 3. 血液抹片(厚片與薄片)，後者將先進行鏡檢作為參考指標，前兩者將抽取核酸及進行聚合酶連鎖反應。針對每一病例，將收集基本資料、旅遊史、感染及發病日期、對抗瘧藥物之反應、是否復發等資料建立資料庫。聖多美普林西比共和國瘧疾 dry blood spotted 檢體。

## DNA 抽取純化

採用 QIAamp™ BLOOD KIT (Qiagen)，本品可使用全血或是 dry spot，經初步試驗 DNA 之純度及回收量均佳，使用上尚稱方便。

## Malaria PCR diagnosis

利用 PCR 可快速並鑑定出瘧原蟲的種別，所用的引子如下： PlasR (5'-GTA TCT GAT CGT CTT CAC TCC C-3')、falF (5'-AAC AGA CGG GTA GTC ATG ATT GAG-3')、vivF (5'-CGG CTT GGA AGT CCT TGT-3')、ovaF (5'-CTG TTC TTT GCA TTC CTT ATG C-3')、malF (5'-CGT TAA GAA TAA ACG CCA AGC G-3') 四組反應在同一試管中進行 [12]。以 human $\beta$ -globin DNA 為 Internal control 的標的，期增幅引子為 BG07 (5'-GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG G-3') 及 BG08 (5'-TGG TCT CCT TAA ACC TGT CTT G-3') 增幅產物為 262 bp [3]。Positive control 則以鏡檢及上述選殖之 rDNA clone 作對照。*P. knowlesi* 專一性檢測所用的引子如下：for SSU rRNA gene：Pmkr8：GTT AGC GAG AGC CACAAA AAA GCG AAT 及 mkr9：ACT CAA AGT AAC AAAATC TTC CGT A；for *csp* gene：PkCSP-F：TCCTCCACATACTTATATACAAGA 及 PkCSP-R：GTACCGTGGGGGACGCCG [4]。

## 熱帶瘧原蟲 *crt* 抗藥基因之分析系統

利用 PCR 擴增出此段 *Pfcrt* 基因，再以 *ApoI* 限制酵素切割，來區分此位點是否發生突變。如果 *ApoI* 限制酵素可以將 146bp 大小的 *Pfcrt* 基因切成 98bp、48bp 兩個片段，即表示此惡性瘧原蟲株可能為 chloroquin 敏感株；如果無法切動，即表示此惡性瘧原蟲株可能為 chloroquine 的抗藥性株 [13]。

## 熱帶瘧原蟲 *mdr1* 抗藥基因之分析系統



利用 PCR 擴增出此段 *Pfmdr1* 基因，再以 *ApoI* 限制酵素切割，來區分此位點是否發生突變。如果 *ApoI* 限制酵素可以將 560bp 大小的 *Pfmdr1* 基因切成 490 bp、70 bp 兩個片段，即表示此惡性瘧原蟲株可能具有抗藥性；如果切成 230 bp、260 bp、70 bp 三片段，即表示此惡性瘧原蟲株可能不具抗藥性 [14, 15]。

## ***P. vivax* 的基因分型**

以 *P. vivax* 的 *csp* 及 *msp3 α* 基因作為分子標記 [7,8]，選用引子對及產物大小。以 PCR 對 *P.vivax* 的 *csp* 進行增幅，並使用 *AluI* 和 *BstNI* 限制酵素作用，即可分區 VK210 和 VK247 group type。將 *msp3 α* 增幅，並使用限制酵素 *AluI* 和 *HhaI* 作用，可以進一步區分同一 group 內的不同型別的蟲株。

## **LAMP 檢驗方法建置**

依據 *Plasmodium* genus 的 18S rRNA 基因作為模板 DNA，設計可以鑑定出 4 種瘧原蟲的 *Plasmodium* genus 引子組和可以區分 4 種瘧原蟲的 *Plasmodium* species 引子組 [16]。

## **Real Time PCR**

選擇 *Plasmodium* genus 的 18S rRNA 基因作為模板 DNA，並從其中設計可以分別區分 *P.falciparum*、*P.vivax*、*P.malariae* 和 *P.ovale* 的探針(Probe)，再用利 real time PCR 中的 Taq man 方法，在探針上標誌上螢光物質，已偵測瘧原蟲 DNA [17]。

## **Sensitivity**

以國人通報病例 34 例為材料，鏡檢當 Gold standard，做 PCR、LAMP、Real-time PCR 的 sensitivity。

## **聖多美檢體檢驗**

已收集到聖多美 RTD 陽性病患以 FTA classic 濾紙片收集之乾血液檢體 162 件、陰性檢體 28 件。以 PCR 方式評估 RDT 的敏感性及後續使用的可能，並了解瘧原蟲防治後蟲株種類的變化、再感染率或復發率之機率及抗藥性發生種類與機轉。

## 結果

94年：開始收集台灣地區所有瘧疾病例之檢體及臨床資料，以鏡檢為參考標準，建立人類瘧原蟲 SSU-rDNA 的種別分析方法，並定序建立資料庫以利後續基因比對，協助防治。

本計劃原計劃主持人離職而中斷9個月，新計劃主持人到職後才恢復正常工作。

### 瘧疾病患流行病學資料

94年至97年10月底止，共有80例瘧疾境外移入病例，其中以 *Plasmodium falciparum* 病例最多有47例，其中重症1例死亡；其次為 *P. vivax* 有26例；*P. falciparum/P. vivax* 混合感染有3例，其中重症死亡1例，由緬甸移入；*P. falciparum/P. ovale*、*P. ovale*、*P. falciparum/P. malariae*、*P. malariae* 及 *P. knowlesi* 各有1例。死亡2例皆為女性，分別由印尼及烏干達移入。移入地區非洲有35例，亞洲有32例，大洋洲13例。*P. vivax* 皆由亞洲移入。本年度較特別之發現為檢驗出境外移入之人類自然感染 *P. knowlesi* 猴子瘧疾病例。所有病患除做血片檢驗外，亦採血抽取核酸後進行PCR增幅反應，以進行後續之基因分型工作；病患病歷及流行病學資料以建立資料庫，供後續資料分析用。

### 瘧原蟲種類之分子分型

利用以 SSU rDNA 為標的之 multiplex PCR 分子檢驗，可以藉產物之有無及大小區分四種人類瘧原蟲是否存在及加以區分種別 (如圖二)，所得之瘧原蟲種別判定結果皆與血片判定結果一致，敏感度亦較高，但病人血中瘧原蟲數過少時，則常發生鏡檢可看到蟲，但 PCR 檢驗為陰性的情形。

### 人類自然感染猴子瘧原蟲之境外移入案例探討

2005年四月，一位60歲之男性病患自菲律賓巴拉望島從事生態旅遊回國約4-5天後，因發燒、頭痛、間歇性冷顫、發汗及身體不適至埔里基督教醫院門診就診，判斷其可能感染瘧疾，故採取血片送驗，初步確認為三日瘧 (*P. malariae*)。病患除發燒至39.4°C及心跳較快(91次/分鐘)，實驗室的生化檢測值皆在標準範圍內，如表一。病人在接受 chloroquine 治療後三天血中即無法鏡檢到瘧原蟲，體溫及心跳皆恢復正常。由薄層血片觀察發現其中之瘧原蟲多為活動體，形態與三日瘧非常相似，呈現帶狀活動體。但瘧原蟲感染之紅血球邊緣會呈現棘狀凸出的結構，同時瘧原蟲染色質分佈情況及 Mulligan 斑點的結構亦與三日瘧有所不同(圖三)。因此，懷疑可能是它種瘧原蟲，並進行瘧原蟲 SSU rDNA 的選殖、定序與序列比較(如圖一)。發現最相似的瘧原蟲為 *P. knowlesi* (相似度為99.0%)。進一步以 CSP 基因進行 PCR、選殖、定序與序列比較，也發現最似 *P. knowlesi* (相似度為91.0%)。因此，判定此病患感染之瘧原蟲為 *P. knowlesi*，為台灣首次發現的猴子瘧疾境外移入病例。此 *P. knowlesi* 與馬來西亞分離之 KH35 株最相近，但與其他馬來西亞之分離株及標準株 Nuri 與 W1 距離較遠(如圖四)。

95年：建立瘧原蟲常規分子檢驗實驗室，針對通報檢體進行瘧原蟲檢驗及種別分析。並建立熱帶瘧原蟲 *mssl* 及 *mss2* 等之基因型別分析系統，進行後續分型工作。

## 惡性瘧原蟲 *msp1* 及 *msp2* 基因型別鑑定系統之建立

94 年至今年 8 月共有惡性瘧陽性檢體 25 件(表二)，可以 *Msp1* 基因做基因型別鑑定標的，增幅 *msp1* block2 區段，定序後以電腦分析區分型別。結果顯示 K1-type 蟲株來自馬拉威、烏干達、布吉那法索、奈及利亞、迦納、莫三比克及喀麥隆等非洲國家，和屬於大洋洲的巴布亞新幾內亞、亞洲的印尼；MAD20-type 來自非洲的馬拉威、剛果，和大洋洲的巴布亞新幾內亞、亞洲的印度、泰國、印尼；RO33-type 來自大洋洲的所羅門及非洲的馬拉威和大洋洲的巴布亞新幾內亞(圖五)，不同型別的惡性瘧沒有特殊地理分佈，但病例數以 K1-type 最多 14 例，MAD20-type 次之 8 例，RO33-type 只有 3 例，其中有一例烏干達病例為 K1 及 MAD20 混合感染，另一例馬拉威病例為 K1 及 RO33 混合感染。

並以 *msp2* 基因做基因型別鑑定標的，增幅 *Msp2* block3 區段，定序後以電腦分析區分型別。結果屬於 IC/3D7-type 的有馬拉威、烏干達、布吉那法索、奈及利亞、迦納、喀麥隆及莫三比克等非洲國家，和屬於大洋洲的巴布亞新幾內亞、所羅門，亞洲的印度和印尼；FC27-type 的有非洲的馬拉威、烏干達、剛果，和大洋洲的巴布亞新幾內亞及亞洲的泰國(圖六)。不同型別的惡性瘧也沒有特殊地理分佈，但病例數以 IC/3D7-type 最多 18 例，FC27-type 有 7 例，與 *msp1* 基因分型的不同點是 *msp2* 基因分型沒有發現混合感染。

## 間日瘧疑似再復發個案分析

個案為 51 歲男性國人，從事玻璃原料業，於印尼經營玻璃砂工廠，長期往返於印尼邦加島與台灣。2006 年 1 月 14 日個案自印尼返台，1 月 16 日即因出現發燒、畏寒等症狀，前往台北某醫院求診，該院初步診斷個案疑似感染瘧疾，血液檢體並經本局確認為間日瘧感染後，個案先以氯奎寧(chloroquine)治療 2 天後，再以普爾奎寧(primaquine)治療 14 天。個案經每日追蹤採檢，完成療程，並確認血中無原蟲後，才完治出院返家。同年 2 月 16 日至 6 月 6 日間，個案再度赴印尼邦加島工作，並自述分別於 4 月初、4 月底 5 月初及 5 月 23 日再度出現發燒、畏寒等瘧疾症狀，並且 3 次均自行在當地就醫及服用奎寧 5 天治療。俟其 6 月 6 日返國後又自覺不適，於次日前往桃園市衛生所要求採檢血液，送本局昆陽實驗室檢驗，送檢結果亦為間日瘧感染。

只根據個案之出國史及發病經過並無法釐清個案第二次間日瘧感染是為復發或再次感染。因此，本實驗室遂以分子生物學方式進行兩次間日瘧蟲 *msp1* 及 *csp* 基因型別的比對，確認皆為間日瘧並命名為 INBK01 及 INBK02，以釐清個案感染原因，給予病人最有效之治療用藥及適當防護措施之建議。INBK01 及 02 *csp* 基因之 PCR 片段長度不同分別為 1042bp 及 960bp，序列結果顯示兩片段皆有 GDRAAGQPA 胺基酸序列，兩者皆屬於 vk210 group[8,18]。兩核酸序列相似度為 90%，但 INBK02 序列中有長達 54 bp 及其他小的序列刪除(deletion)，再與 GenBank 中其他間日瘧原蟲的 *csp* 基因序列做親緣關係比對，畫成親緣演化樹(圖七)，亦顯示這兩條序列分屬於不同群(group)。INBK01 及 02 *msp1* block 2 之 PCR 片段長度分別為 1236bp 及 1224bp，序列相似度只達 88%，INBK02 序列中同樣有數處較長的序列刪除。與 GenBank 中其他間日瘧原蟲的 *msp1* block 2 基因片段序列做親緣關係比對，亦顯示這兩條序列分屬於不同群(圖八)。綜合以上結果，顯現此兩株間日瘧原蟲為不同型別，個案應為再感染新的日瘧原蟲，排除了為舊病復發的疑慮。

96年：已根據瘧原蟲之SSU-rDNA序列，建立單管或多管real-time PCR檢驗方法，做為瘧原蟲分子檢驗方式，以期增加檢驗敏感性及縮短檢驗時間。並也建立以間日瘧原蟲csp及msp1等基因為標的之基因型別鑑別系統，進行分型工作。

### ***P. vivax* 基因分型別鑑定**

已選定 *P. vivax* 的 *msp1* block 2、*msp3*  $\alpha$  及 *csp* 基因作為分子標記，建立 PCR 及基因定序系統，並以電腦分析區分型別。此方法已成功用於鑑別 2006 年發生的一例於 1 月及 6 月份兩度自印尼返國，並皆發病通報之瘧疾病患，並將此二間日瘧原蟲命名為 INBK01 及 INBK02 株，並已發表於疫情報導[19]。利用 PCR 可增幅出 1.1kb 大小的 *csp* 基因片段，分別使用 *AluI* 或 *BstNI* 限制酵素切割。當使用 *AluI* 限制酵素切割後，屬於 VK247 group 的蟲株，會有 700 bp 大小的 DNA 片段，而 VK210 group 的蟲株則無此片段（圖九），而使用 *BstNI* 限制酵素切割後，屬於 VK210 group 的蟲株，則會出現 800 bp~1.1 Kb 大小的 DNA 片段，而 VK247 group 的蟲株則無此大小的片段（圖十）。因此，利用 PCR-RFLP 方法可將間日瘧原蟲作 group 的區分。同樣的 1.9kb 大小的 *msp3*  $\alpha$  基因片段，可用 *AluI* 或 *HhaI* 限制酵素切割。*AluI* 限制酵素可切成 27~537 bp 大小不等的 DNA 片段（圖十二）。而 *HhaI* 限制酵素切割可切成 63~975 bp 大小不等的 DNA 片段（圖十三），由其片段的數目、大小，可以將同一個 *csp* group 的蟲株進一步區分出來。

### **復發患者間日瘧之基因分型**

檢討 93 年至今的間日瘧病患中，發現有 3 個復發(relapse)個案。間日瘧的復發是否與 primaquine 治療失敗有關須加以探討，故將其復發前後所收集的 6 個血液樣本，進行 *csp* 基因的 PCR-RFLP 分子分型，結果顯示其中病患 A 及 B 的兩對檢體中的蟲株皆屬於 VK210 group，而另一個病患 C 的一對檢體則為 VK247 group（圖十一）。再使用 *msp3*  $\alpha$  基因做 *AluI* 限制酵素切割分型，發現 Patient A 及 B 屬於 *csp* VK210 group 蟲株的 4 個檢體中，復發前後蟲株 DNA 片段呈現不同大小及數目（圖十二），所以 Patient A 及 B 復發應為不同的型別蟲株所引起，而 Patient C 屬於 VK247 group 復發前後的 2 個檢體 DNA 片段一致，應屬同一型別復發所引起。再使用 *HhaI* 限制酵素切割後，發現所有 VK210 group 蟲株的片段大小及數目皆相同（圖十三），而屬於 VK247 group 蟲株的 2 個檢體亦然。因此，Patient C 的復發應為一型別復發所引起。

97年：蒐集近年的熱帶瘧原蟲檢體，針對pfprt及pfmdr基因分析，建立基因資料庫，以了解各瘧疾輸入國瘧原蟲抗藥性分布狀況，並提供我國醫生用藥的參考。建立LAMP等新瘧原蟲分子檢驗方式，以縮短檢驗時間，並應用所發展的基因分型及抗藥性分析技術協助聖多美普林西比共和國的瘧疾防治工作。

### **熱帶瘧原蟲 crt 及 mdr1 抗藥基因之分析系統**

最近的許多研究顯示惡性瘧原蟲株 *crt* (*Pfprt*) 基因可能與 chloroquine resistance 有關，當其 76 位點上的核苷酸發生突變 (K76T)，會使惡性瘧原蟲株產生抗藥性（圖十四）。我們已分別針對 96 及 97 年來自不同地區的 17 例惡性瘧原蟲陽性檢體分析，*Pfprt* 基因的分

析顯示有三例來自非洲馬拉威(2)和烏干達(1)的惡性瘧原蟲株可能為 chloroquin 敏感株，而其他來自緬甸(2)、巴布雅紐幾內亞(2)、印度(1)、布吉納法索(2)、奈及利亞(2)、迦那(1)、所羅門(1)、印尼(2)、泰國(1) 的惡性瘧原蟲株則可能為 chloroquine 抗藥性株，此結果顯示 *Pfcr*t resistance strains 在東南亞及大洋洲有較廣泛的分布，及 chloroquine 現已不適合作任何惡性瘧的治療。

惡性瘧原蟲株的 *mdr1* (*Pfmdr1*)基因則可能與 chloroquine、amodiaquine、mefloquine 和 artemisinin 等抗瘧藥物的抗藥性或多重抗藥性有關，當 *Pfmdr1* 基因 86 位點上的核苷酸發生突變 (K86N)，再輔以 184、1034、1042、1246 等位點的突變，會使惡性瘧原蟲株產生不同程度的抗藥性或多重抗藥性 (圖十五)。我們亦已分別針對 96 及 97 年來自不同地區的 17 例惡性瘧原蟲陽性檢體分析，結果顯示馬拉威(2)、烏干達(1)、印度(1)、泰國(1)、布吉納法索(2)、迦那(1)、緬甸(2)、巴布雅紐幾內亞(1)和奈及利亞(1)的惡性瘧原蟲株可能為敏感株，巴布雅紐幾內亞(1)、奈及利亞(1)、印尼(2)和所羅門(1)具有抗藥性的蟲株，只有巴布雅紐幾內亞(1)和奈及利亞(1)同時具有抗藥性及敏感性兩種惡性瘧原蟲株。此結果顯示 *Pfmdr1* resistance strains 已逐漸有擴大的趨勢，但 *Pfmdr1* 位點的突變與 amodiaquine、mefloquine 和 artemisinin 等抗瘧藥物的抗藥性的關聯還需進一步分析。

### LAMP 檢驗方法建置

LAMP 方法是 2000 年由日本 Notomi 等人所研發出來，利用 4 對可認 DNA 模板上 6 個區段的引子對 DNA 進行增幅。由於此方法操作簡單，不需要特殊的儀器，只需要溫度可達 60-65°C 的恆溫水浴槽或乾熱板，配合特殊的 DNA 聚合酶即可將所需要偵測的基因增幅出來，可用於如非洲等研究較落後的地區。所以我們選擇此方法來發展瘧疾檢驗，以期可以縮短檢驗時程和簡化操作過程。依據設計出的 *Plasmodium* genus 引子對，已可以成功增幅出 4 種瘧原蟲(圖十六)。再進一步使用可以區分 4 種瘧原蟲的 species 引子對，結果亦可以成功的區分出 4 種瘧原蟲(圖十七)。我們已可利用此瘧疾 LAMP 方法再 3 小時內，在不需特殊 PCR 儀器下檢驗出 4 種瘧原蟲。

### Real Time PCR

近年來已有數篇瘧疾即時 PCR 研究方法的論文發表，然而，常因檢體樣本太少或檢體取樣有偏差，所得結果未必適合用在所有的瘧疾流行國家，因此要運用在我國的日常檢驗上還需要再加以評估，選擇適當的方法並改進其缺點才可應用。因此，本研究依據 Rougemont 的報告 [17]，所設計的引子及探針加以修改，並搭配 Rio-Raid 的 iQ Multiplex Powermix 以 CFX96 機器進行即時 PCR 反應，測試這組引子對及 4 種探針分別對 4 種瘧原蟲的專一性。結果顯示，以 genus-specific 的探針及引子檢測，可分別將 4 種瘧原蟲增幅出來，Ct 值與蟲的數量有關 (圖十八)。再分別以 4 種 species-specific 的探針及引子對增幅，也可以將 *P. falciparum* (Pf) (圖十九)、*P. vivax* (Pv) (圖二十)、*P. malariae* (Pm) (圖二十一)、*P. ovale* (Po) (圖二十二) 等 4 種瘧原蟲分別區分出來。

### Sensitivity among microscopy, LAMP method and Real Time PCR

利用鏡檢計算血液中惡性瘧原蟲蟲數，將已知蟲數的血液加入沒有感染任何瘧原蟲者的血液做 10 倍連續稀釋 (6,000 copy 至 0.6 copy)，結果 LAMP 和 nested PCR 的 Genus-specific 最低可以偵測到 600 copy，而 Real-Time PCR 最低可以偵測到 0.6 copy。由

於本批血液樣本來自聖多美的瘧患並皆為混合感染，故無法做 species-specific 的 sensitivity 的比較。若將我國的瘧疾通報病例檢體，以鏡檢作為 gold standard，對 nested PCR、LAMP、Real-time PCR 作 sensitivity 的比較。結果顯示，34 例國人通報檢體中，有 *Pf*、*Pv* 各為 14 例；*Pm*、*Po* 各為 1 例；Mix infection 有 4 例，分別為 *Pf/Pv* 混和感染 3 例，*Pv/Pm* 為 1 例（表三）。Nested PCR 結果在 Genus、species 和 mix infection 項目完全和鏡檢相符 sensitivity 為 100%，而 LAMP 的 sensitivity 則只有 Genus、species 為 100%，在 mix infection 的 sensitivity 則只有 75%。Real-Time PCR 在 species 的 sensitivity 為 100%，但在 Genus 和 mix infection 則分別只有 70.59% 和 75%。

### 聖多美瘧疾 RTD 陽性檢體之分析

已收集到聖多美 RTD 陽性病患以 FTA classic 濾紙片收集之乾血液檢體 162 件、陰性檢體 28 件。以 PCR 方式評估 RDT 的敏感性及後續使用的可能，並了解瘧原蟲防治後蟲株種類的變化、再感染率或復發率之機率及抗藥性發生種類與機轉。先以 nested PCR 方式作瘧原蟲 Genus 鑑定，結果其中 1 個 RTD 陽性檢體抽不到 DNA，所以共有 161 個 RTD 陽性檢體進行 nested PCR，結果顯示只有 34 個檢體為瘧疾 Genus 陽性。然而，若使用 Real-Time PCR 進行 Genus 陽性檢體鑑定，則結果可得 160 例 RTD 陽性檢體，中有 134 例為陽性，27 例為陰性；28 例 RTD 陰性檢體，中有 25 例為陽性，3 例為陰性（表四）。

以 nested PCR 鑑定 Genus 陽性的瘧原蟲檢體進行 species 鑑定，結果 34 個檢體中有 25 個呈現 *Pf* 陽性、9 個混合感染，其中 *Pf/Po* 有 1 個；*Pf/Pv* 有 6 個；*Pf/Pm* 有 2 個。

將 25 個惡性瘧陽性檢體進行惡性瘧抗藥性分析，結果有 20 個陽性檢體可以擴增出 *Pfcr* 及 *Pfmdr1* 抗藥性基因，再以限制酵素 *ApoI* 切割作用。結果顯示 20 個陽性檢體中皆有 *Pfcr* chloroquine 抗藥性基因的突變位點，而其中 17 個也具有不同程度的 *Pfmdr1* 抗藥性基因的突變為點可能對 amodiaquine、mefloquine 和 artemisinin 產生抗藥性。

再將這 25 個惡性瘧檢體，進行 *MSP1* 基因的分子分型，結果顯示有 22 個檢體可以擴增出 *msh* 基因，再以限制酵素 *DraI* 切割作用，結果顯示惡性瘧原蟲可分為 A (5 例)、B (2 例)、C (3 例) 和 E (12 例) 型共 4 型（圖二十三）。而其中除 B 及 C 型各 1 例同時具有 *mdr1* 抗藥性和不具 *mdr1* 抗藥性惡性瘧蟲株。其餘 A (5 例)、B (1 例)、C (2 例) 和 E (12 例) 型皆具有 *mdr1* 抗藥性的惡性瘧蟲株。

## 討論

### 94 年：

94 年至 97 年 10 月底止，共有 80 例瘧疾境外移入病例，其中以 *Plasmodium falciparum* 病例最多有 47 例，其中重症 1 例死亡；其次為 *P. vivax* 有 26 例；*P. falciparum/P. vivax* 混合感染有 3 例，其中重症死亡 1 例，由緬甸移入；*P. falciparum/P. ovale*、*P. ovale*、*P. falciparum/P. malariae*、*P. malariae* 及 *P. knowlesi* 各有 1 例。死亡 2 例皆為女性，分別由印尼及烏干達移入。移入地區非洲有 35 例，亞洲有 32 例，大洋洲 13 例。*P. vivax* 皆由亞洲移入。但因有兩例死亡病例，未來需加強實驗室之檢驗及通報速率；與醫生在用藥方面的知識及習慣和對瘧疾的警覺心。94 年兩例 Pf/Pv 混合感染皆由緬甸移入及造成瘧疾重症，其中一人死亡。因此，未來若發現 Pf/Pv 混合感染，特別是由緬甸移入時，需特別加以注意病人後續發展成重症的可能性。

94 年三例由印尼及所羅門群島移入的病例，血中 gametocytes 無法迅速清除，仍留院觀察長達 30-40 天。是否來自印尼及所羅門群島的瘧原蟲對 primaquine 有抗性，因此不易清除。未來將比較這些印尼及所羅門群島的瘧原蟲與其他來源之瘧原蟲在基因分型之差異，找出可能的原因。*P. knowlesi* 的形態與 *P. malariae* 非常相似，在做診斷時常會誤判，本次病例就被以 *P. malariae* 先做通報。所以當作血片鏡檢時，若發現有不典型之瘧原蟲時，需加注釋及加做分子分型鑑定以免誤判。此次檢出之 *P. knowlesi* 蟲株與馬來西亞的 KH35 株最為相近 [4]，需進一步了解兩者的地理關係。是否台灣之猴子及蚊媒只能攜帶及傳播非致病性 *P. knowlesi* 還需進一步做調查，以了解未來致病性 *P. knowlesi* 引入台灣的可能性。

### 95 年：

#### 惡性瘧原蟲基因型別鑑定

Msp1 基因與 msp2 基因常被用作惡性瘧原蟲的分型依據，以了解病患感染與或瘧原蟲的關係，前者可分為 K1、MAD20 及 RO33-type，後者可分 IC/3D7 及 FC272-type。95 年 25 件惡性瘧陽性檢體以上述方法分型都發現不同型別的惡性瘧沒有特殊地理分佈，同型的惡性瘧可在亞、非或大洋洲發現，顯示瘧原蟲在世界傳播的速率可能大於原蟲產生變異的速率，所以在原蟲產生變異前即已傳播世界各處(圖五及六)。其中有兩例為 K1 及 MAD20 混合感染與 K1 及 RO33 混合感染，其原因可能為病患受到兩種型別之瘧原蟲同時感染，或是受到一種同時帶有兩種 msp1 型別之瘧原蟲感染，還需進一步研究(表三)。

進一步比較則可以發現，在巴布亞新幾內亞、及馬拉威國家有 3 種 msp1-type 和 2 種 msp2-type，顯示這些國家的瘧原蟲可能具有較多變異的種類；而在烏干達、布吉納法索及印尼的國家中則只有 K1 一種 msp1-type。比較特別的是屬於亞洲國家的印尼，只有 IC/3D7 一種 msp2-type，而烏干達、布吉納法索則有 IC/3D7、FC272 種 msp2-type。

#### 間日瘧基因分型鑑定

本年度個案在短短數個月間即感染數次瘧疾，顯示國人在瘧疾高盛行的國家工作或旅遊時，需時時注意自己的健康，若有瘧疾症狀時需立刻在當地就醫，若是回國後才出現症狀，亦需立刻就醫並主動告知醫生旅遊史，可能感染瘧疾，請其加做瘧疾檢驗，以免延

誤病情及可能的誤診。個案前後兩次發病血液檢體中之瘧原蟲，經 Giemsa 染色鏡檢及進行 SSU-rDNA 基因 PCR 檢測，皆為間日瘧。但因間日瘧在人體內若未治療或未治療完全，常會在數週至五年內復發，所以需要再做基因分型以區分此二蟲株。若同型則可能為復發，需再確認其是否有 primaquine 的抗藥性或耐受性，並考慮更換其他抗瘧藥物，以免延誤病情；若不同型則可能為再感染，以此個案為例即可再使用原來 chloroquine 加 primaquine 的治療方式。因此，分析蟲株型別，瞭解變異位置，將可提供有效的防治手段。

此二間日瘧原蟲以 *csp* 基因定序分型，顯示皆有屬於 vk210 group 的 GD RAAGQPA 胺基酸序列[8]，與屬於 vk247 group 的 ANGAGNQPA 胺基酸序列不同。兩者核酸序列顯示這兩條序列分屬於不同群，INBK01 序列與同樣來自印尼的 Indonesia V 最相似，而 INBK02 則與其他數個來自不同國家地區之 *csp* 基因序列群組在一起(圖六)。綜合以上結果，顯現此兩株間日瘧原蟲為不同型別，個案應為再感染新的日瘧原蟲，排除了為舊病復發的疑慮。由於個案兩次感染皆可以 chloroquine 加 primaquine 治療痊癒，未來若有相同型別的間日瘧原蟲感染，可使用相同的處方，或參考疾病管制局之瘧疾預防及治療用藥指引[20]。台灣近年瘧患主要為境外移入者，發展分子檢驗及基因型別鑑定系統，可因應未來病例感染源確定、復發(relapse)與再感染(reinfection)之釐清。

## 96 年：

### 復發患者間日瘧之基因分型

間日瘧在世界除 western 及 central sub-Saharan Africa 外皆有分佈，每年約有 1.3-4.35 億人感染[20]。近年來間日瘧在亞洲的感染率已有增加的趨勢及所造成的病症也較過去嚴重，值得加以重視。因間日瘧感染痊癒後常有復發的問題，是因為存在於肝臟中相同型別的蟲株產生抗藥性或藥物較不易到達，未被殺死後再次發作，或是由不同型別的蟲株所引起，需加以釐清。因此，本年度收集並分析 93 年至今的 3 個間日瘧復發(relapse)病患個案。發現這三個病患得間日瘧皆為境外移入，在發病後即給予投藥治療，治療完成後，血液中已無瘧原蟲。但分別經過三個月、五個月及八個月後又再次發病，期間這些病患皆沒有出國紀錄，所以研判為間日瘧復發。經由間日瘧 *csp* 及 *m<sub>sp</sub>3a* 的 PCR-RFLP 基因分型，可將 3 個間日瘧復發個案檢體分型，結果顯示，Patient A 及 Patient B 兩次不同時間發病的血液檢體中，間日瘧原蟲的型別不一樣(圖十二)，這表示引起第二次復發的蟲株和第一次發病的蟲株不一樣，可能的原因是在第一次被瘧蚊叮咬感染間日瘧原蟲時，同時間就已經同時感染不同型別的蟲株，而其中某些型別的蟲株可能具有較高的抗藥性或一侵犯肝臟後就發展成休眠子(hypnozoite)，當一段時間後才再復發。Imwong et al.[21]及 Chen et al. [22]已分別發表最近在泰國及東帝汶所做的論文中證實上述推論，有 71%的復發病患是具有多種型別的蟲株所造成，也發現在一次的瘧蚊叮咬中即可送入不同型別的蟲株，但是由不同的病人取得不同型別的蟲株在蚊體中發育 sporozoite 或是由蚊體中同一個 oocyst 所發育不同型別的 sporozoite 可引起復發，原因仍舊未知[23]。而 Imwong et al.[21]也發現約 40%可引起復發的間日瘧原蟲基因型別與第一次發作同一種，本研究中 Patient C 復發前後的間日瘧原蟲基因型別亦為同一種，是否有某些特定的型別容易引起復發，仍有待進一步研究。



97 年：

### 熱帶瘧原蟲 *crt* 及 *mdr1* 抗藥基因之分析系統

由 *Pfcrtr* 基因的抗藥性分析結果來看，顯示台灣 88% 以上境外移入之惡性瘧原蟲在 76 位點上的核苷酸已發生突變，可能具有 chloroquine 抗藥性，且與目前世界上抗藥性惡性瘧原蟲株的分佈比大致相同[13]。由於台灣為瘧疾根除區，因此也不建議台灣惡性瘧的治療使用 chloroquine，因為很有可能遇到抗藥株而延誤治療。

由 *Pfmdr1* 基因的抗藥性分析顯示，抗藥性蟲株除 86 位點上的核苷酸發生突變外，也可會在其他 184、1034、1042、1246 等位點發生突變[14, 15]。因此，使得我們在抗藥性蟲株的來源國的分析較為紛亂，也不確定蟲株的抗藥性程度。同時，我們所收集的檢體數量亦嫌不足，所以無法以上述檢體做出結論。然而，國人與印尼和所羅門的接觸頻繁，而兩國目前又以參加 WHO 推廣 artemisinin-combination therapy (ACT)，所以當 *Pfmdr1* 發生抗藥性突變是值得注意的事情，應有效追蹤病患使用 ACT 的療效，避免 *Pfmdr1* 抗藥性株的擴大。

### LAMP 和 Real Time PCR

目前，瘧疾的分子檢驗多以四種感染人類瘧原蟲之 small ribosomal subunit RNA 基因序列間之特異區段之差異為基石，建立 PCR 方法，同時多為 nested PCR 方法。然而，自血液抽取核酸至完成 PCR 增幅，一般需耗時 5 個半小時以上，始能完成瘧原蟲的診斷。如需進一步判定種別，則還需要 5 個小時，進行種別鑑定的 nested PCR。由於惡性瘧患者的病程發展極快，在數天至數小時內即可發展為腦性瘧疾，甚或死亡，故需儘速治療的惡性瘧患者。故發展更快速的檢驗方法可縮短診斷時間，減少患者致死的機率。因此無論利用 LAMP 或 TaqMan Realtime PCR 方法，皆可將檢驗時間縮短到 2.5 小時內。

在 LAMP 方面研究結果顯示，以瘧原蟲 genus-specific 的探針及引子，可以將 4 種瘧原蟲成功增幅出來。由於 LAMP，方法操作簡單，只需要溫度可達 60-65°C 的恆溫水浴槽或乾熱板，配合特殊的 DNA 聚合酶即可將所需要偵測的基因增幅出來，所以非常適用於非洲落後地區或機場熱患等一般發燒病患的初步快速篩檢，當檢測到瘧原蟲之後，再進一步使用 4 種 species-specific 的探針及引子，進行瘧原蟲種別的鑑定。

在 Real-Time PCR 方面研究結果顯示，Real-Time PCR 可以將 4 種瘧原蟲成功增幅出來，從 DNA 抽取至完成鑑定只需花費不到 2.5 小時。此方法的缺點就是儀器設備昂貴，耗材比起 PCR 及 LAMP 方法是稍微高了一點，不是一般的實驗室能夠使用，但也由於其只需 1 個 copy 的 DNA 即可被偵測出來，所以可以用來研究 PCR 無法鑑定的檢體樣本。

在目前 Genus 的鑑定結果中，nested PCR 和 LAMP 的 Sensitivity 比 Real-Time PCR 好很多，這可能是做 Sensitivity 的檢體 DNA 是取自有加入 EDTA 的血液，且抽取 DNA 步驟，最後一步用 TE Buffer 當 elution buffer，而這些緩衝液可能干擾 Real-Time PCR 的進行，降低其靈敏度，尤其是遇到較少量的模板 DNA。所以之後抽取 DNA 時，可以改用無菌水替代 elution buffer。

### 聖多美瘧疾 RTD 陽性檢體之分析

已收集到聖多美 RTD 陽性病患以 FTA classic 濾紙片收集之乾血液檢體 161 件、RTD 陰性檢體 28 件鑑定。先以 nested PCR 方式作 161 件 RTD 陽性血液檢體的瘧原蟲 Genus 鑑

定，結果顯示只有 32 例為陽性，而 RTD 陰性血液檢體有 2 例為陽性。若以此 nested PCR 結果為標準則 RTD 有高達 32/161 (80.1%) 的偽陽性及 2/28 (7.14%) 的偽陰性。會有此情形可能是由於血液中瘧原蟲蟲數太少，而 nested PCR 至少需要 600 原蟲/反應才可以檢測出，及 nested PCR 產物較大而不同檢體中所含 DNA 片段大小不一，有些檢體無法增幅。此 RDT 結果與 nested PCR 結果不一致的現象亦見其他文獻報告。Real-Time PCR 只需 1 原蟲/反應即可偵測，所以再採用 Real-Time PCR 方法再進行鑑定。然而，若使用 Real-Time PCR 進行 Genus 陽性檢體鑑定，則結果可得 160 例 RTD 陽性檢體，中有 134 例為陽性，27 例為陰性；28 例 RTD 陰性檢體，中有 25 例為陽性，3 例為陰性。此方法雖然增加了 RTD 陽性病患的檢出率 134/161，但也提高了 RTD 陰性血液檢體中瘧原蟲的檢出率 25/28，此 Real-Time PCR 結果還需進一步分析是否有人為的實驗誤差或檢體登錄錯誤的問題。否則聖國的瘧疾防治將出現問題。

在 nested PCR 鑑定為陽性的瘧原蟲檢體進行 species 鑑定，結果 34 個檢體中有 25 個呈現 *Pf* 陽性、9 個混合感染，其中 *Pf/Po* 有 1 個；*Pf/Pv* 有 6 個；*Pf/Pm* 有 2 個，顯示瘧原蟲混合感染比率有增加，特別是惡性瘧及間日瘧的混合感染。聖國是位於西非的島國，而一般西非國家的人民因具有 Duffy 抗原缺陷間日瘧無法感染，所以聖國間日瘧的增加須加以注意，可能與聖國的人種多為黑人與白人的混血，使得間日瘧可以感染，或是聖國的間日瘧發生突變而可感染人民，亦須進一步研究[24]。

將 25 個惡性瘧陽性檢體進行惡性瘧抗藥性分析，結果有 20 個陽性檢體可以擴增出 *Pfcr* 及 *Pfmdr1* 抗藥性基因，結果顯示所有陽性檢體中皆有 *Pfcr* chloroquine 抗藥性基因的突變(T76N)位點，這與聖國先前的研究報告一致[25]，聖國已不再使用 chloroquine 做任何瘧疾治療。而其中 17 個惡性瘧檢體也具有不同程度的 *Pfmdr1* 抗藥性基因的突變為點可能對 amodiaquine、mefloquine 和 artemisinin 產生抗藥性，這裡須加注意是否會對聖國 ACT 的治療造成影響[26,27]。

再將 22 個惡性瘧檢體進行 *MSP1* 基因的分子分型，結果顯示可分為 A (5 例)、B (2 例)、C (3 例) 和 E (12 例) 型，共 4 型 (圖二十三)。而其中 A 和 E 型皆具有 *mdr1* 抗藥性突變，而 B 及 C 型各 1 例同時具有正常 *mdr1* 和 *mdr1* 抗藥性突變株。惡性瘧 *MSP1* 基因型別與 *Pfmdr1* 抗藥性突變株間的關係，及抗藥種類和程度的關係亦須加注意，特別是 *MSP1* A 和 E 型中的抗藥性變化。

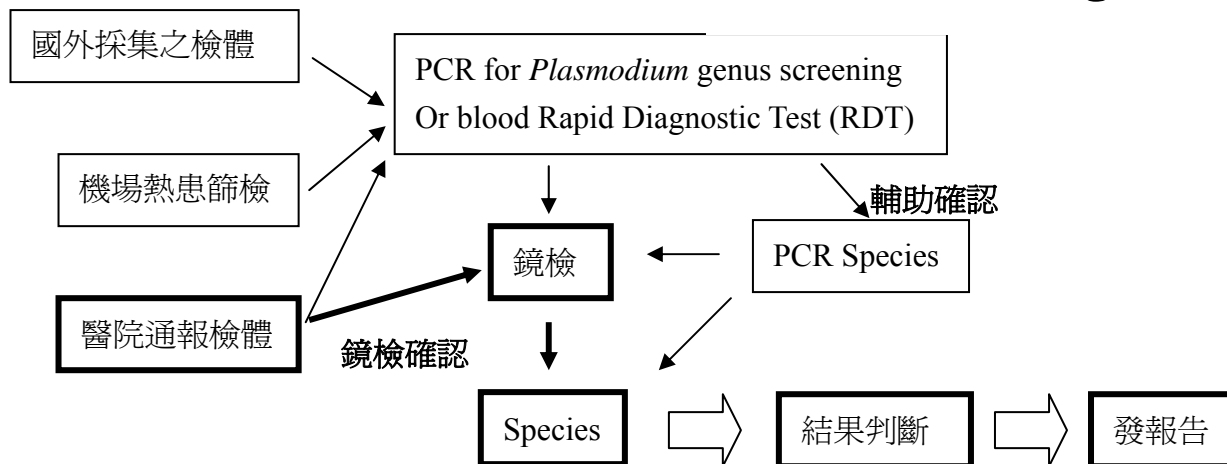
## 參考文獻

1. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 327-36.
2. Sowunmi A, Fateye BA. *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Nigerian children: before, during and after treatment with antimalarial drugs. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 783-92.
3. Snounou, G., S. Viriyakosol, et al. (1993). "High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction." *Mol Biochem Parasitol* **61**(2): 315-20.
4. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 2004; 363: 1017-24.
5. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*. 2008; 46:165-71.
6. White NJ. *Plasmodium knowlesi* : the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan 15; 46: 172-3.
7. Imwong M, Pukrittayakamee S, Gruner AC, Renia L, Letourneur F, Looareesuwan S, White NJ, Snounou G. Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using *Pvcs* and *Pvmsp1*. *Malar J* 2005; 4:1-13
8. Zakeri S, Barjesteh H, Djadid ND. Merozoite surface protein-3alpha is a reliable marker for population genetic analysis of *Plasmodium vivax*. *Malar J*. 2006. 5:53.
9. Cattamanchi, A., Kyabayinze, D., Hubbard, A., Rosenthal, P. J., and Dorsey, G. 2003. Distinguishing recrudescence from reinfection in a longitudinal antimalarial drug efficacy study: comparison of results based on genotyping of *msp-1*, *msp-2*, and *glurp*. *Am J Trop Med Hyg* **68**: 133-139.
10. Hagmann R, Charlwood JD, Gil V, Ferreira C, do Rosário V, Smith TA. Malaria and its possible control on the island of Príncipe. 2003. *Malar J*. 2:15.
11. Tseng LF, Chang WC, Ferreira MC, Wu CH, Rampão HS, Lien JC. Rapid control of malaria by means of indoor residual spraying of alphacypermethrin in the Democratic Republic of São Tomé and Príncipe. 2008. *Am J Trop Med Hyg*. 78(2):248-50.
12. Padley, D., Moody, A. H., Chiodini, P. L., and Saldanha, J. (2003). Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Ann Trop Med Parasitol* 97, 131-137.
13. Maguire, J. D., Susanti, A. L., Sismadi, P., Fryauff, D. J. and Baird, J. K. (2001) The T76 mutation in the *pfprt* gene of *Plasmodium falciparum* and clinical chloroquine resistance phenotypes in Papua, Indonesia. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 95(6):559-572
14. Duraisingh, M. T., Seidlein, L., Jepson, A., Jones, P., Sambou, I., Pinder, M. and Warhurst, D. C. (2000) Linkage disequilibrium between two chromosomally distinct loci associated with increased resistance to chloroquine in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 121:1-8
15. Lopes, D., Rungsihirunrat, K., Nogueira, F., Seugorn, A., Gil J. P., Rosario, V. E. and Cravo, P. (2002) Molecular characterization of drug-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Malaria journal*.1:1-11.
16. Han E. T., Watanabe R., Sattabongkot J., Khuntirat B., Sirichaisinthop J., Iriko H., Jin L. Takeo S. and Tsuboi T. 2007 Detection of Four *Plasmodium* Species by Genus- and Species-Specific Loop-Mediated Isothermal Amplification for Clinical Diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 45:2521-2528.
17. Rougemont M., Saanen M.V., Sahli R., Hinrikson H.P., Bille J. and Jatou K. 2004. Detection of four plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene Subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 42:5636-5643.
18. Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, Sattabongkot J, Hall T, Waters AP, and Prasittisuk C. 1989. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science* **245**:973-976.
19. 江亭誼、郭明珠、詹志文、柯海韻、嵇達德. 2007. 重複感染間日瘧疾之境外移入案例. 疫情報導 Vol. 23:

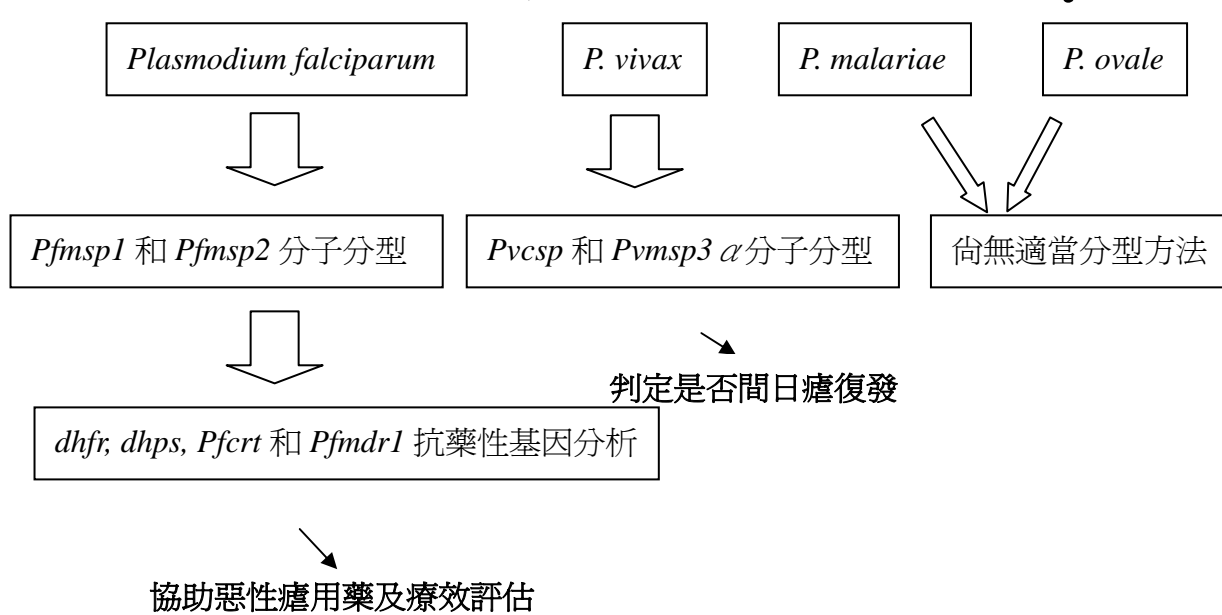
86-96.

20. 瘧疾預防及治療用藥指引. 2006. 疾病管制局. [http://www.cdc.gov.tw/file/ 38901\\_4756365741 瘧疾治療預防及用藥指引修正版-950703.pdf](http://www.cdc.gov.tw/file/38901_4756365741_瘧疾治療預防及用藥指引修正版-950703.pdf)
21. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, Guthmann JP, Nosten F, Carlton J, Looareesuwan S, Nair S, Sudimack D, Day NP, Anderson TJ, White NJ. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis.* 2007. 195(7): 927-33.
22. Chen N, Auliff A, Rieckmann K, Gatton M, Cheng Q. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. *J Infect Dis.* 2007. 195(7):934-941.
23. Collins WE. Further understanding the nature of relapse of *Plasmodium vivax* infection. *J Infect Dis.* 2007. 195(7):919-20.
24. Culleton RL, Mita T, Ndounga M, Unger H, Cravo PV, Paganotti GM, Takahashi N, Kaneko A, Eto H, Tinto H, Karema C, D'Alessandro U, do Rosário V, Kobayakawa T, Ntoumi F, Carter R, Tanabe K. Failure to detect *Plasmodium vivax* in West and Central Africa by PCR species typing. 2008. *Malar J.* 11;7:174.
25. Ferreira ID, Lopes D, Martinelli A, Ferreira C, do Rosário VE, Cravo P. In vitro assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from São Tomé and Príncipe. 2007. *Trop Med Int Health.* 12(3):353-62.
26. Gil VS, Ferreira MC, d'Alva FS, d'Abreu JA, Will IM, Gomes ML, Castelli F, Taylor WR, Oliaro P, D'Alessandro U. Efficacy of artesunate plus chloroquine for uncomplicated malaria in children in Sao Tome and Principe: a double-blind, randomized, controlled trial. 2003. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 97(6):703-6.
27. Lopes D, Nogueira F, Gil JP, Ferreira C, do Rosário VE, Cravo P. *pfert* and *pfmdr1* mutations and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from São Tomé and Príncipe, West Africa. 2002. *Ann Trop Med Parasitol.* 96(8):831-4.

## For malaria diagnosis



## For malaria study



圖一、瘧疾檢驗及研究流程圖

表一、猴子瘧疾病患之臨床生化資料

Body temperature	39.4°C
Heartbeat	91 beats/min
Hb (Hemoglobin)	12.x g/dL
Hct	35.7%
Erythrocyte count	4.15x10 <sup>6</sup> cells/ $\mu$ l
WBC	6110 cells/ $\mu$ l
Segment	63%
Lymphocyte	22%
Monocyte	13%
Platelet count	104,520 / $\mu$ l
Reticulocyte	0.6%
GOT	26
GPT	72
Bil(T)	1.01
LDH	459
BUN	15.5
Creatine	0.76
CRP	6.02
Urine analysis	normal

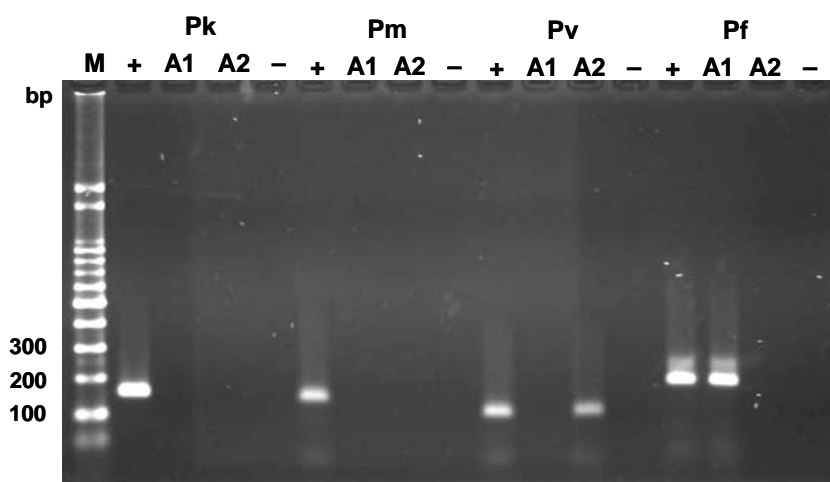


圖 2、瘧疾聚合酶鏈鎖反應(PCR)分子檢測



圖 3. Giemsa-stained thin blood films depicting growing trophozoites

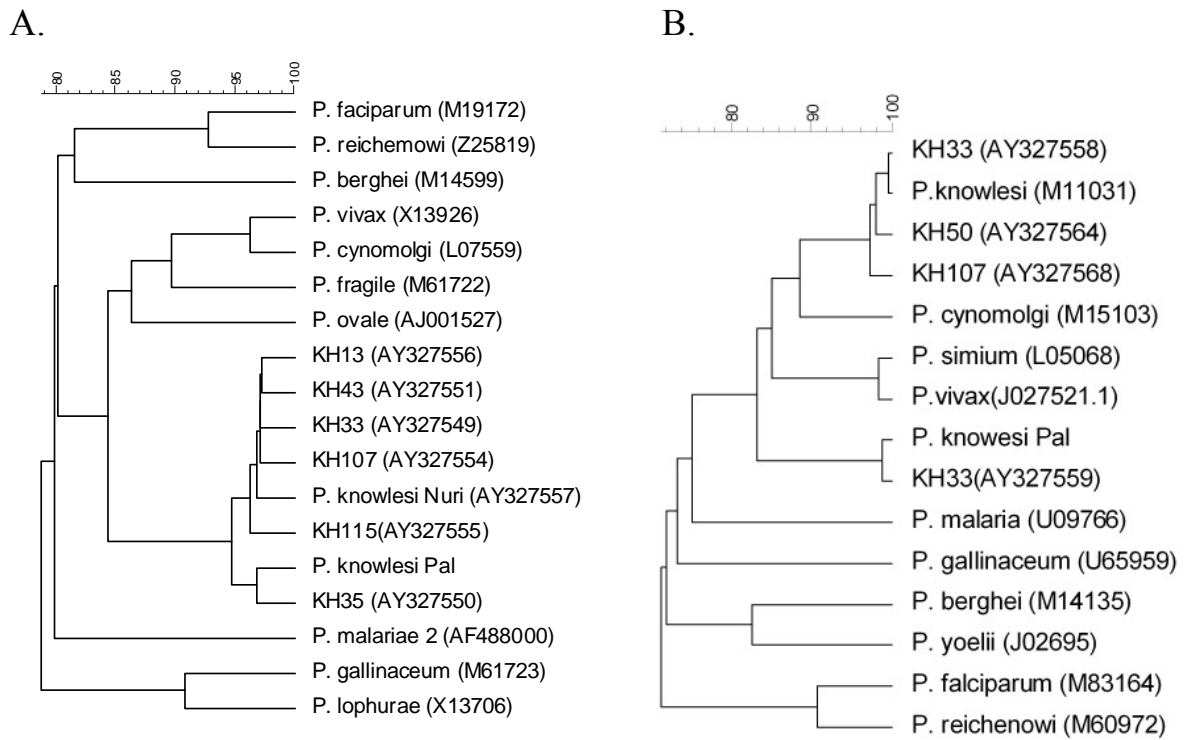


圖 4. Phylogenetic tree based on the SSU rRNA (A) and CSP (B) sequences of *Plasmodium* species exhibited by the neighbour-joining method.

表二、瘧疾病患之感染國別疾惡性瘧原蟲型

編號	地點	日期	Msp1-type	Msp2-type
1	馬拉威	2005/03/16	K1/RO33	IC/3D7
2	馬拉威	2005/05/07	K1	FC27
3	巴布亞新幾內亞	2005/06/19	K1	IC/3D7
4	印度	2005/07/05	MAD20	IC/3D7
5	烏干達	2005/07/10	K1	FC27
6	布吉那法索	2005/08/15	K1	IC/3D7
7	布吉那法索	2005/08/16	K1	IC/3D7
9	奈及利亞	2005/10/11	K1	IC/3D7
10	迦納	2005/10/13	K1	IC/3D7
11	所羅門	2005/11/02	RO33	IC/3D7
12	印尼	2005/11/21	K1	IC/3D7
13	印尼	2005/11/21	K1	IC/3D7
15	泰國	2006/02/06	MAD20	FC27
16	巴布亞新幾內亞	2006/02/19	MAD20	FC27
17	莫三比克	2006/04/06	K1	IC/3D7
18	馬拉威	2006/04/06	MAD20	IC/3D7
19	馬拉威	2006/04/07	MAD20	FC27
20	烏干達	2006/04/19	K1/MAD20	IC/3D7
21	剛果	2006/04/05	MAD20	FC27
22	巴布亞新幾內亞	2006/05/28	MAD20	IC/3D7
23	布吉那法索	2006/08/05	K1	FC27
24	布吉那法索	2006/08/08	K1	IC/3D7
25	巴布亞新幾內亞	2006/08/21	RO33	IC/3D7
26	印尼	2006/08/22	MAD20	IC/3D7
27	喀麥隆	2006/08/21	K1	IC/3D7



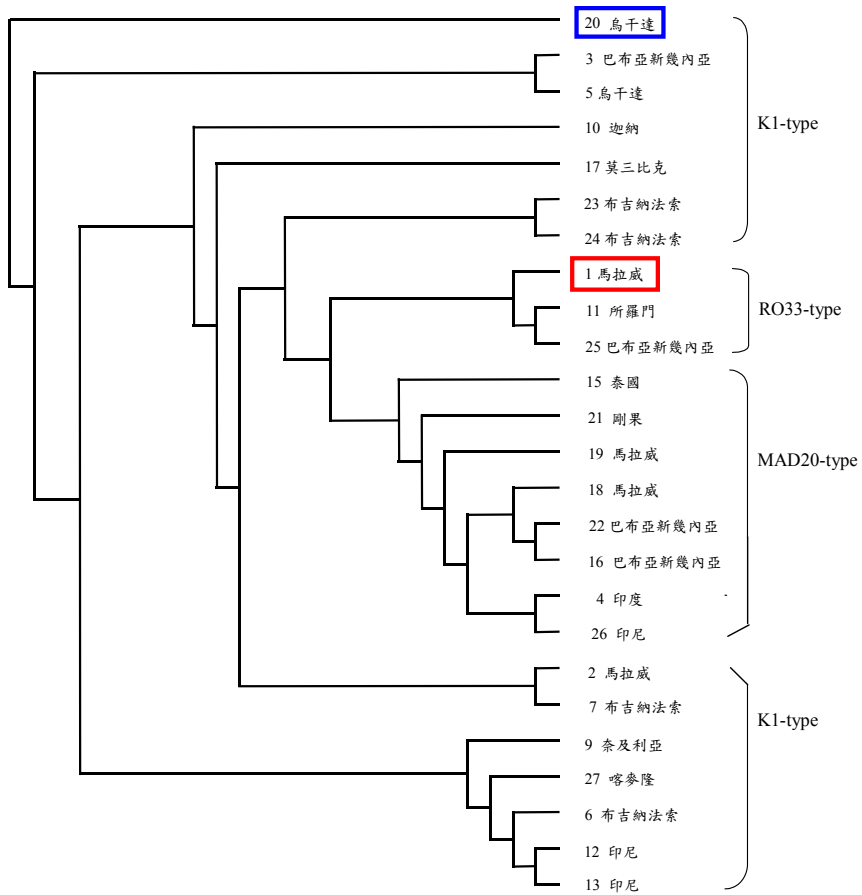


圖 5、 *Plasmodium falciparum* 之 msp1 block2 基因親緣關係圖

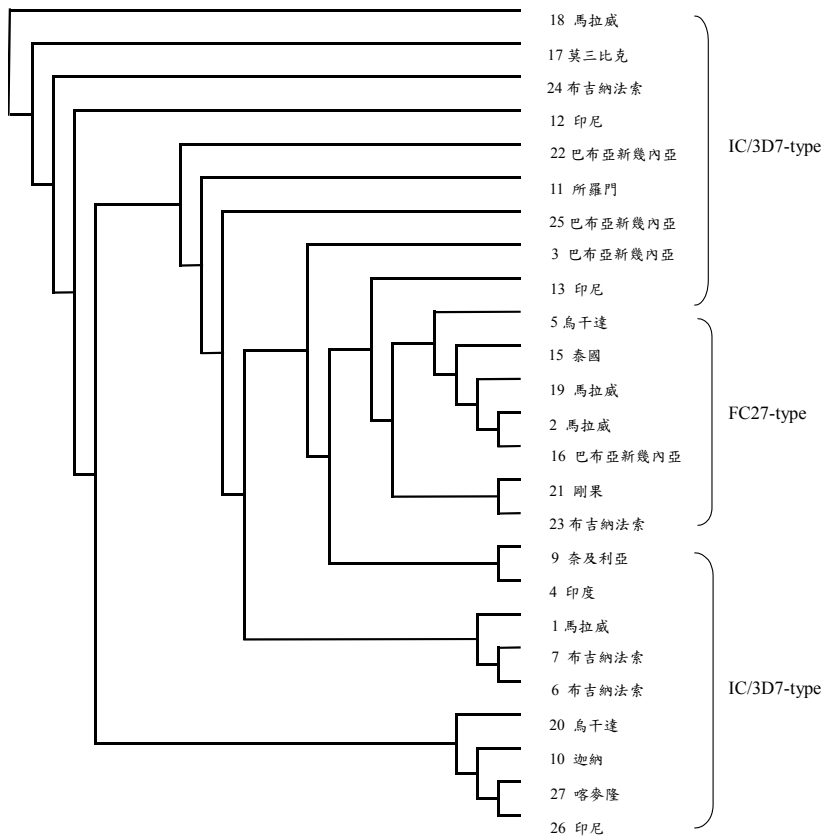
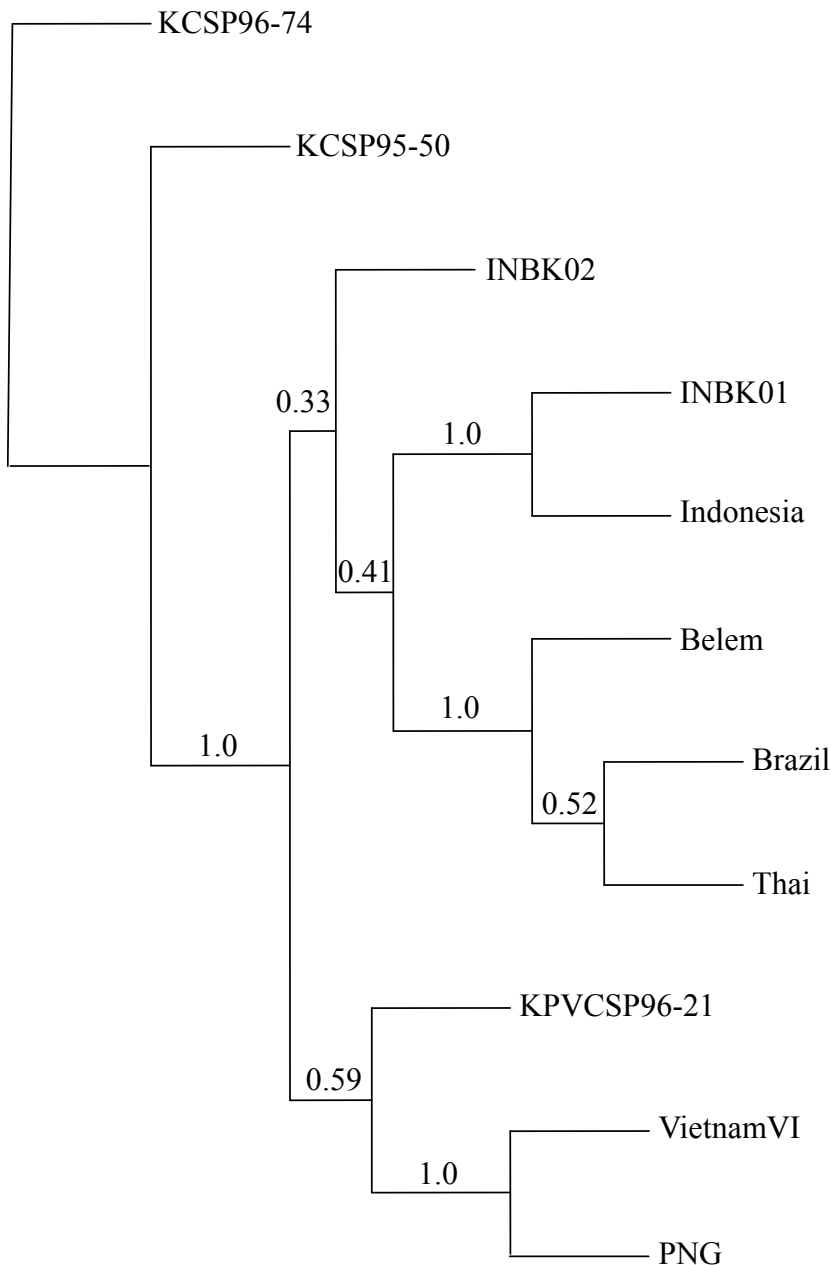


圖 6、 *Plasmodium falciparum* 之 msp2 block3 基因親緣關係圖



-100

圖 7、*P. vivax* 之 *csp* 基因親緣關係樹。INBK01：為 95 年 1 月份檢體；INBK02：為 95 年 6 月份檢體。KCSP96-74 (accession number:AF164608)、KCSP95-50 (AF164604) 及 KPVCSP96-21 (AJ400910)：Isolates from South Korea；Indonesia (DQ156135)：Isolate from Indonesia；Thai (M34697)：Isolate from Thailand；VietnamVI (DQ156141)：Isolate from Vietnam；PNG (M69059)：Isolate from Papua New Guinea；Belem (M11926) 及 Brazil (DQ156132)：Isolates from Brazil

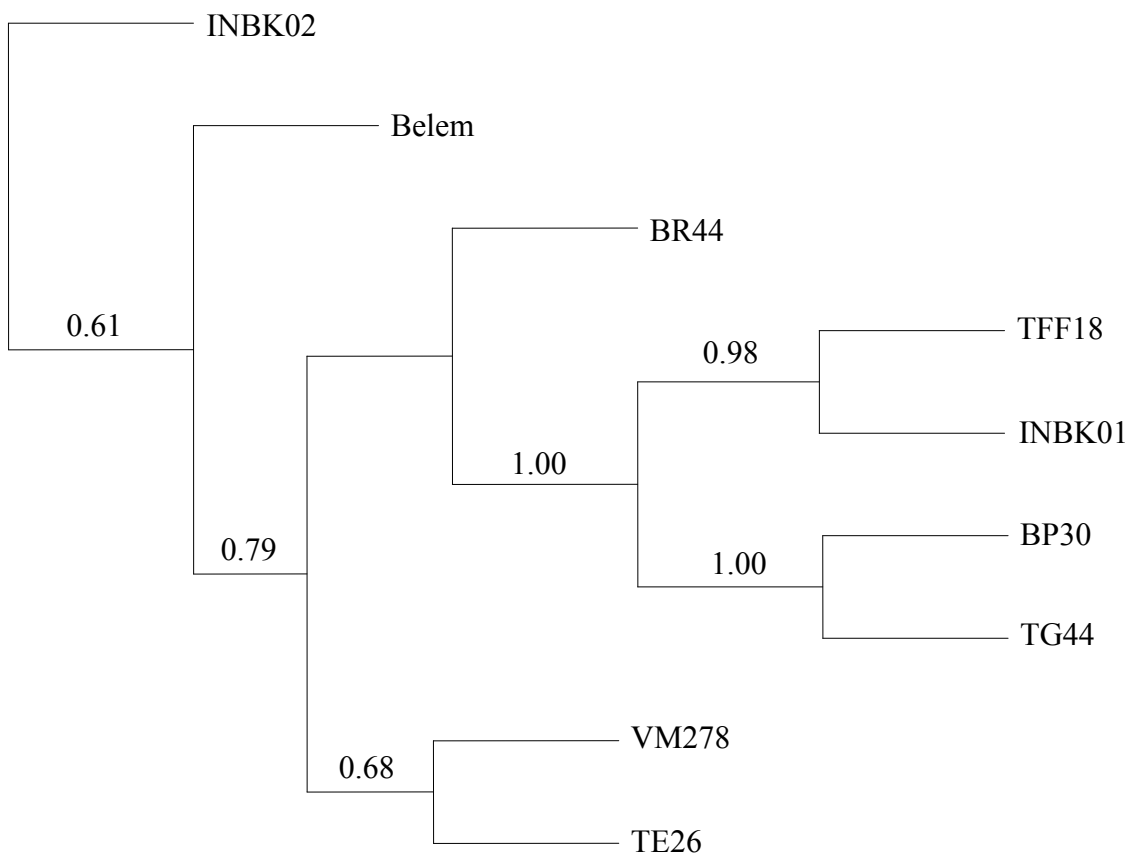
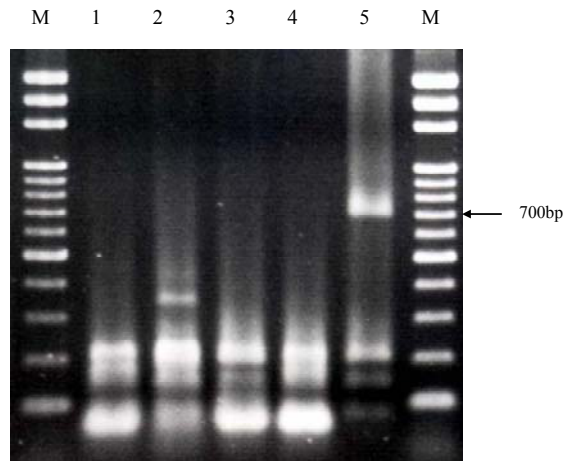
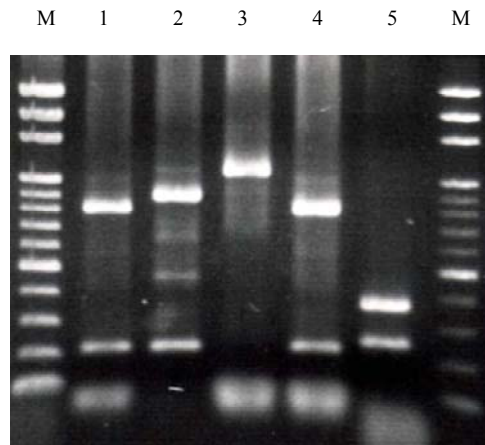


圖 8、*P. vivax* 之 *msp1* block2 基因親緣關係樹。INBK01：為 95 年 1 月份檢體；INBK02：為 95 年 6 月份檢體。VM278 (accession number:AF435634)：Isolate from Malakula；TE26 (AF435605)、TG44 (AF435610) 及 TFF18 (AF435608)：Isolates from Thailand；Belem (AF435594)、BP30 (AF435625) 及 BR44 (AF435631)：Isolates from Brazil

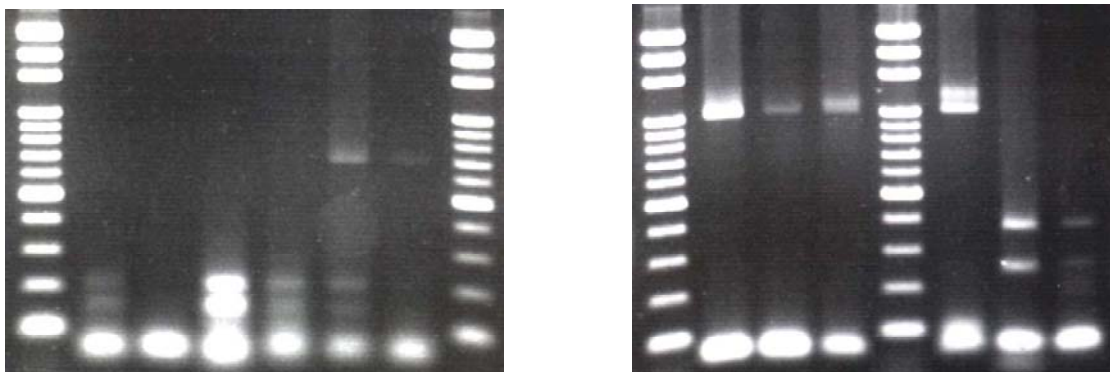


圖一 9、 *Plasmodium vivax* 之 *csp* 基因片段，經 *AluI* 限制酵素作用，1-4 為 VK210 group，無 700bp 大小的片段。5 為 VK247 group，有 700bp 大小的片段。M：100bp ladder。

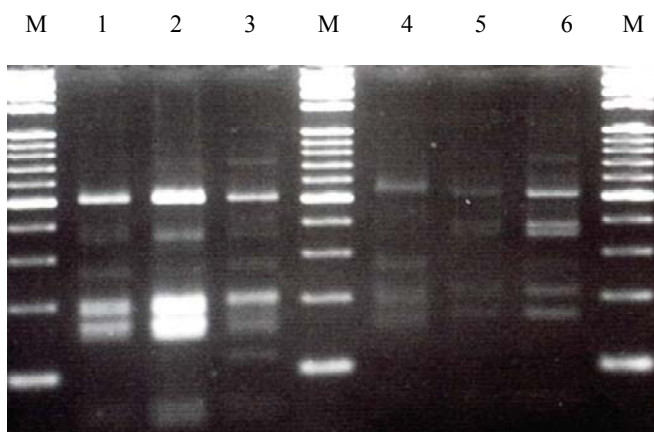


圖二 10、 *Plasmodium vivax* 之 *csp* 基因片段，經 *BstMI* 限制酵素作用，1-4 為 VK210 group，有 800bp~1.1kp 大小的片段。5 為 VK247 group，無 800bp 以上的片段。M：100bp ladder。

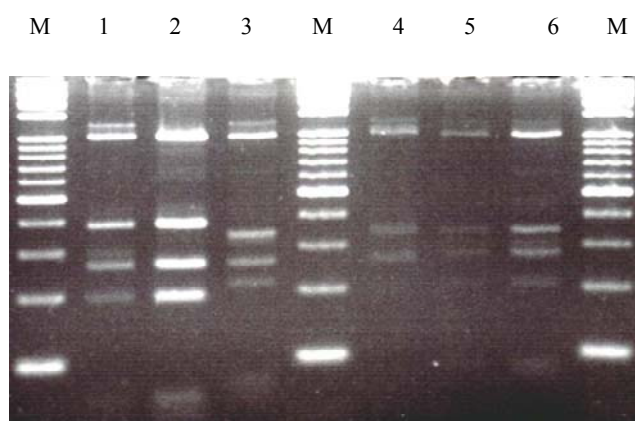
(a) M 1 2 3 4 5 6 M      (b) M 1 2 3 M 4 5 6



圖三 11、 *Plasmodium vivax* 之 *csp* 基因片段，(a)經 *AluI* 限制酵素作用；(B) 經 *BstMI* 限制酵素作用。1、2：Patient A 復發前後檢體，3、4：Patient B 復發前後檢體，5、6：Patient C 復發前後檢體，M：100bp ladder



圖四 12、*Plasmodium vivax* 之 *msp3 α* 基因片段，經 *AluI* 限制酵素作用。1、2：Patient A 復發前後檢體，3、4：Patient B 復發前後檢體，5、6：Patient C 復發前後檢體，M：100bp ladder



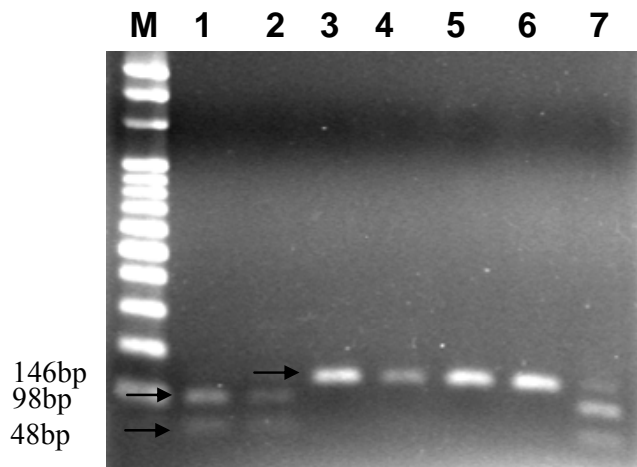
圖五 13、*Plasmodium vivax* 之 *msp3 α* 基因片段，經 *HhaI* 限制酵素作用。1、2：Patient A 復發前後檢體，3、4：Patient B 復發前後檢體，5、6：Patient C 復發前後檢體，M：100bp ladder

表四 3、台灣瘧疾境外移入病患之 PCR、LAMP 及 Real-Time PCR 之 sensitivity 比較

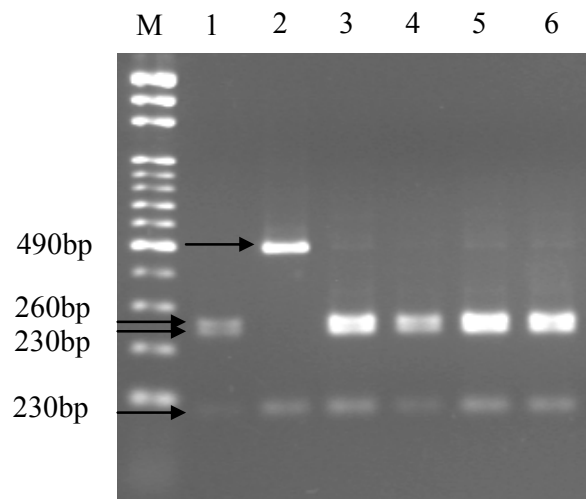
Infection species	results (% sensitivity)						
	Microscopy	Nested PCR		LAMP		Real-Time PCR	
Genus	34	34	(100)	34	(100)	24	(70.59)
<i>P. falciparum</i>	14 P.f	14 P.f	(100)	14 P.f	(100)	14 P.f	(100)
<i>P. vivax</i>	14 P.v	14 P.v	(100)	14 P.v	(100)	14 P.v	(100)
<i>P. malarie</i>	1 P.m	1 P.m	(100)	1 P.m	(100)	1 P.m	(100)
<i>P. ovale</i>	1 P.ovale	1 P.ovale	(100)	1 P.ovale	(100)	1 P.ovale	(100)
<i>Mixed</i>	3 P.f ,P.v	3 P.f ,P.v	(100)	2 P.f ,P.v	(75)	2 P.f	(75)
	1 P.v, P.m	1 P.v, P.m		1 P.v		1 P.v	
Total	34	34		34		34	

表五 4、聖多美檢體 RTD、PCR、Real-Time PCR 檢驗結果的比較

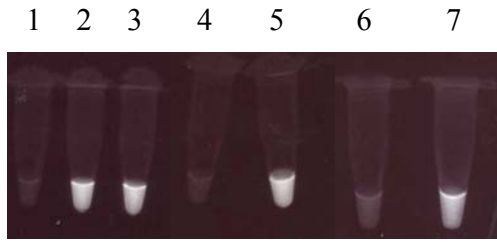
RTD result (cases)	Genus results with			
	PCR		Real-Time PCR	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive (161)	32 (16.9%)	129 (68.2%)	134 (70.9%)	27 (14.3%)
Negative (28)	2 (1.1%)	26 (13.8%)	25 (13.2%)	3 (1.6%)
Total (189)	34 (20.0%)	155 (82.0%)	159 (84.1%)	30 (15.9%)



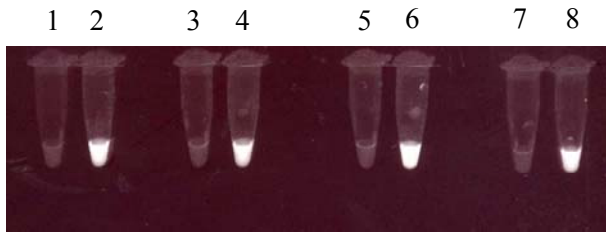
圖一 14：惡性瘧原蟲 *Pfcrt* 基因之 PCR-RFLP 分析。惡性瘧原蟲 *Pfcrt* 基因之 PCR 產物使用 *ApoI* 限制酵素作用，sample1、2、7 可以被切成 98bp、48bp 兩段；sample3、4、5、6 則無法被切動，表具有抗藥性。



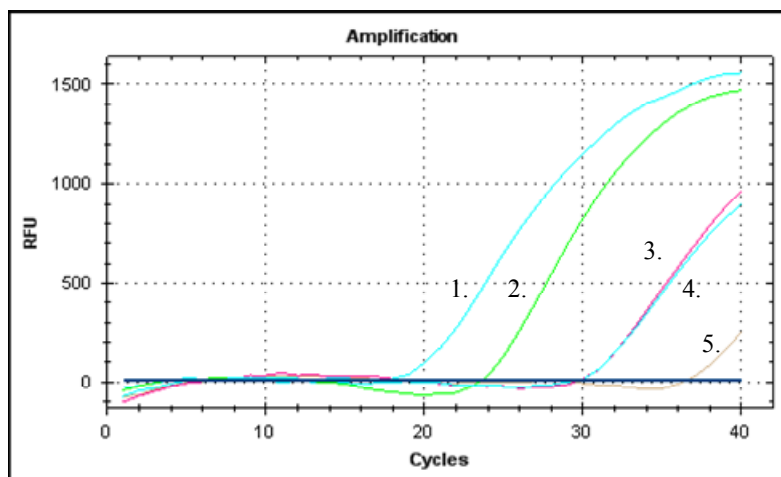
圖二 15：惡性瘧原蟲 *Pfmdr1* 基因 PCR-RFLP 分析。惡性瘧原蟲 *Pfmdr1* 基因使用 *ApoI* 限制酵素作用，sample1、3、4、5、6 可以被切成 230bp、260bp、70bp 三片段；sample2 可以被切成 490bp、70bp 兩片段表具有抗藥性。



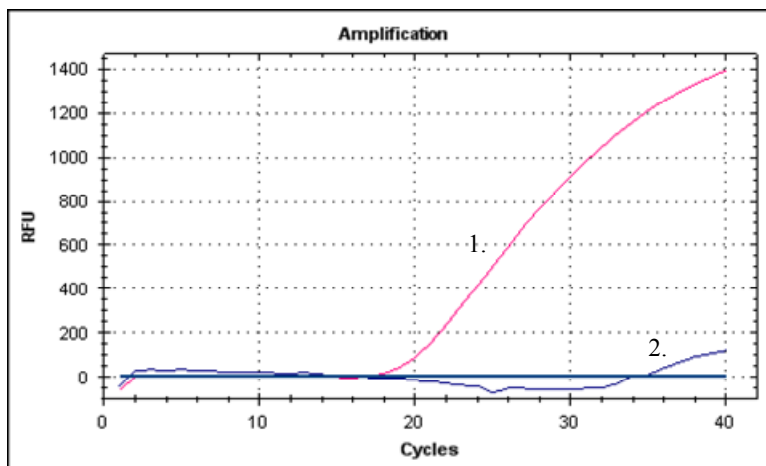
圖三 16： *Plasmodium* genus 進行 LAMP 擴增結果。  
 1. negative 2. *P. falaparium* 3. *P. vivax* 4. negative 5. *P. malaria* 6. negative 7. *P. ovale*



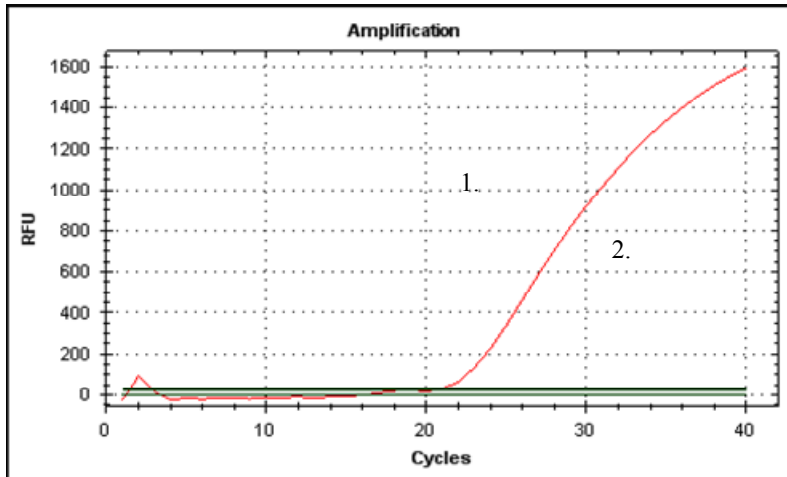
圖四 17： *Plasmodium* species 進行 LAMP 擴增結果。  
 1. negative 2. *P. falaparium* 3. negative 4. *P. vivax* 5. negative 6. *P. malaria* 7. negative 8. *P. ovale*



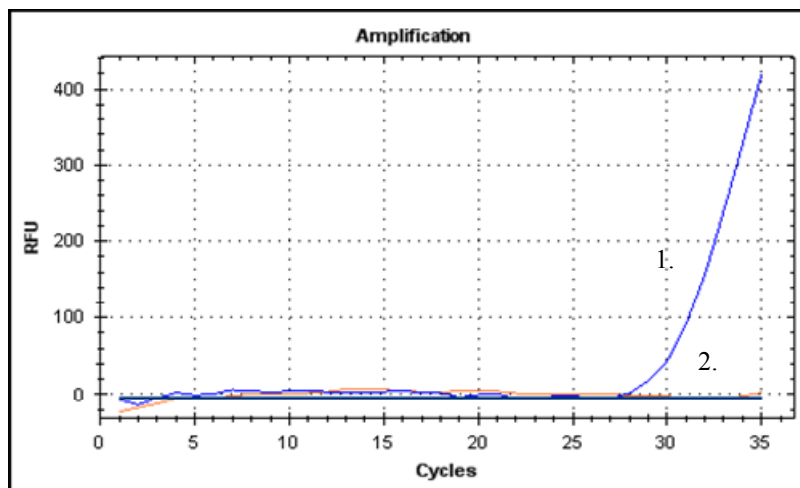
圖五 18、Amplification Curves of the *Plasmodium* genus.  
 1: *P. falciparum* 2: *P. vivax* 3: *P. malaria* 4: *P. ovale* 5: Human DNA



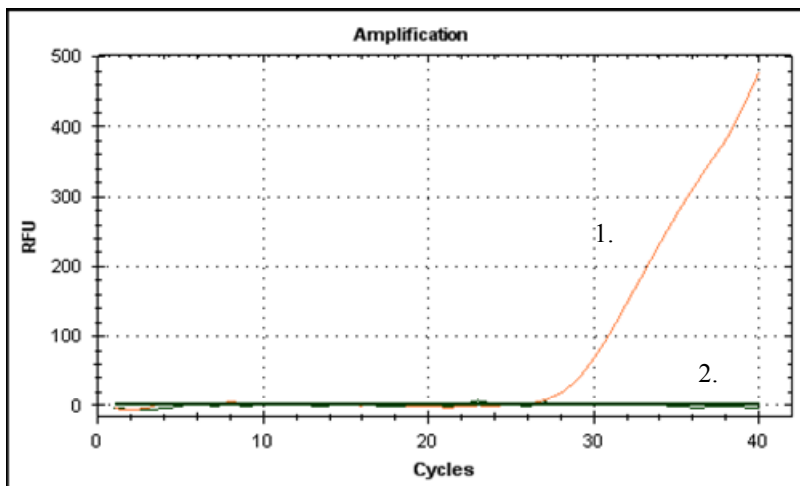
圖六 19、Amplification Curves of *Plasmodium falciparum*. 1: *P. falciparum* 2: Human DNA



圖七 20、Amplification Curves of *Plasmodium vivax*. 1: *P. vivax* 2: Human DNA

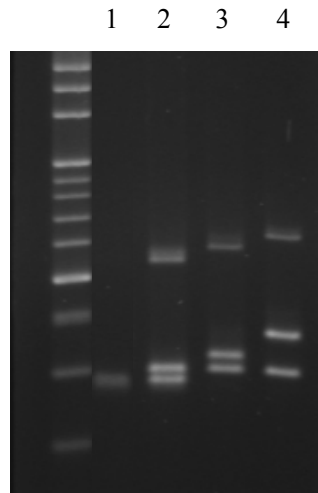


圖八 21、Amplification Curves of *Plasmodium malariae*. 1: *P. malariae* 2: Human



圖九 22、Amplification Curves of *Plasmodium ovale*. 1: *P. ovale* 2: Human DNA





圖十 23、惡性瘧 *msp1* 基因 PCR-RFLP。 1：A 型 2：B 型 3：C 型 4：E 型