

重複感染間日瘧疾之境外移入案例

江亭誼¹、郭明珠¹、詹志文¹、柯海韻²、嵇達德¹

¹ 衛生署疾病管制局研究檢驗中心

² 衛生署疾病管制局第一分局

摘要

2006 年發生一例於 1 月份及 6 月份兩度自印尼返國，並皆發病通報之瘧疾病患，個案前後兩次發病血液檢體之瘧原蟲，經鏡檢及 SSU-rDNA 基因 PCR 檢測，皆為間日瘧，為釐清是否為舊病復發或是再感染，進一步以 *csp* 及 *mSP1* block 2 基因定序分型方式，比較兩次間日瘧原蟲型別之差異。序列分析的結果顯示，個案第二次感染瘧原蟲之 *csp* 序列中一長達 54 bp 及其他較小的序列缺失，*mSP1* block 2 序列也有數處較長的序列缺失。與 GenBank 中其他間日瘧原蟲的 *csp* 及 *mSP1* block 2 基因序列做親緣關係比對，亦顯示這兩條序列分屬於不同群組，此兩株間日瘧原蟲應為不同型別。因此，推論個案第二次發病應為再感染新的間日瘧原蟲所致。

背景介紹

瘧疾 (malaria) 是一種藉由瘧蚊叮咬所傳播的原蟲性傳染病，常見於氣候溫暖的熱帶及亞熱帶地區。主要症狀為週期性的寒顫、高燒、發汗，嚴重時可導致多重器官衰竭及昏迷甚至死亡。主要感染人類的瘧原蟲有惡性瘧原蟲 (*Plasmodium falciparum*)、間日瘧原蟲 (*P. vivax*)、卵型瘧原蟲 (*P. ovale*) 及三日瘧原蟲 (*P. malariae*) 等四種，其中以惡性瘧原蟲所引起的臨床併發症最嚴重、致死率最高[1]。

世界衛生組織 (WHO) 1993 年的資料顯示，全球約有十億人口感染瘧

民國 95 年 10 月 27 日受理；民國 96 年 1 月 7 日接受刊載

通訊作者：嵇達德；聯絡地址：台北市南港區昆陽街 161 號

E-mail: jidarder@cdc.gov.tw

疾，每年死於瘧疾人數逾二百萬人[2]。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[3]。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[4]。

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（衛生署疾病管制局統計資料及[5]）。

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。

本文將就 2006 年一例出現兩次瘧疾發病之境外移入病患做病例報告。

個案報告

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 天以殺死血液中之瘧原蟲後，再以普爾奎寧

(primaquine) 治療 14 天清除藏於肝臟中之瘧原蟲。個案經每日追蹤採檢，完成療程，並確認血中無瘧原蟲後，才算治療完全，准其出院返家。

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 *mssl* 及 *csp* 基因型別的比對，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。

材料與方法

- 一、**病例定義**：臨床症狀出現連續性或週期性發燒，伴隨惡寒、頭痛、發汗、噁心、嘔吐、下痢、咳嗽等，嚴重者可導致昏迷、腎衰竭、肺水腫及死亡。且血液鏡檢發現瘧原蟲即為確定病例。
- 二、**瘧原蟲顯微鏡檢查**：利用病人血液製作厚層及薄層抹片，將新鮮配製之 5% Giemsa 染色液 (pH 7.0~7.2)，覆滿血片，染色約 40~50 分鐘後退染，再將玻片斜立使其自然乾燥。使用光學顯微鏡 1,000 倍油鏡鏡檢，薄片檢視至少 300 個視野，每個血片約檢視 5~10 分鐘，厚片則全範圍檢視。
- 三、**DNA 抽取純化及聚合酶鏈鎖反應 (PCR)**：採用 QIAamp™ BLOOD KIT (Qiagen)，自病人血液中抽取核酸後，進行特定瘧原蟲四種感染人類之瘧原蟲之 Small ribosomal subunit RNA 基因 (SSU-rDNA) 序列增幅反應，藉產物之有無、大小或序列診斷瘧原蟲之存在與種別判定[6,7]。另外以 *P. vivax* 之 *mssl* block 2 及 *csp* 基因為分子標記，進行 PCR 增幅反應，各基因選用之引子對及產物大小[8,9]如表一。

四、序列分析:將 *m*sp1 block 2 及 *csp* 基因片段接進 pCR 4-TOPO (Invitrogen™) 基因載體中,再轉形入 *Escherichia coli* 中選殖後,進行上述二基因片段之定序,再以 GCG 軟體比對分析,以尋求序列之異同。

結果

個案前後兩次發病血液檢體中之瘧原蟲,經 Giemsa 染色後鏡檢原蟲型態及進行 SSU-rDNA 基因 PCR 皆可得一 1.6kb 產物(結果未顯示),因此確認皆為間日瘧並命名為 INBK01 及 INBK02。

進一步以 *m*sp1 block 2 及 *csp* 基因定序分型方式,來檢視兩次間日瘧原蟲的型別。個案 2006 年 1 月份檢體(INBK01)及 2006 年 6 月份檢體(INBK02)之 *csp* 基因 PCR 片段長度分別為 1042bp 及 960bp,序列分析結果顯示,此兩片段皆有 GDRAAGQPA 胺基酸序列,因此依據 1989 年 Rosenberg 等人的報告[7],兩者皆屬於 vk210 group。兩核酸序列再經 alignment 比對,顯示其相似度為 90% (圖一),但兩者並不相同,INBK02 序列中有一長達 54 bp 及其他較小的序列缺失(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(圖二),亦顯示這兩條序列分屬於不同群(group)。

INBK01 及 INBK02 之 *m*sp1 block 2 之 PCR 片段長度分別為 1236bp 及 1224bp,序列經過 alignment 比對,相似度只達 88%,INBK02 序列中同樣有數處較長的序列缺失(圖三)。與 GenBank 中其他間日瘧原蟲的 *m*sp1 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(圖四)。

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間日瘧原蟲,排除了為舊病復發的疑慮。

討論

瘧疾至今仍為世界上最重要的傳染病之一,其防治工作一直為國際公共衛生界所關注,我國至今每年仍有數十例境外移入病例,但隨著國際間瘧原

蟲株基因的不斷變異及抗藥性的產生，不同蟲株基因表現的差異，常常影響到防治成效。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。本次個案主動就醫並提供旅遊史與醫療訊息，即為良好的範例。

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，並考慮調整 primaquine 之治療劑量及療程，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 GDRAAGQPA 胺基酸序列[10]，與屬於 vk247 group 的 ANGAGNQPA 胺基酸序列不同。兩者核酸序列相似度雖達 90%（圖一），但並不相同，與 GenBank 中其他間日瘧原蟲做親緣關係比對，亦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 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（圖二）。因為 GenBank 中並無來自印尼的間日瘧原蟲 *mssl* block 2 基因片段序列，所以 INBK01 序列與泰國的 TFF18 最相似，而 INBK02 則與巴西的 Belem 最相似。

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間日瘧原蟲，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[11]。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。

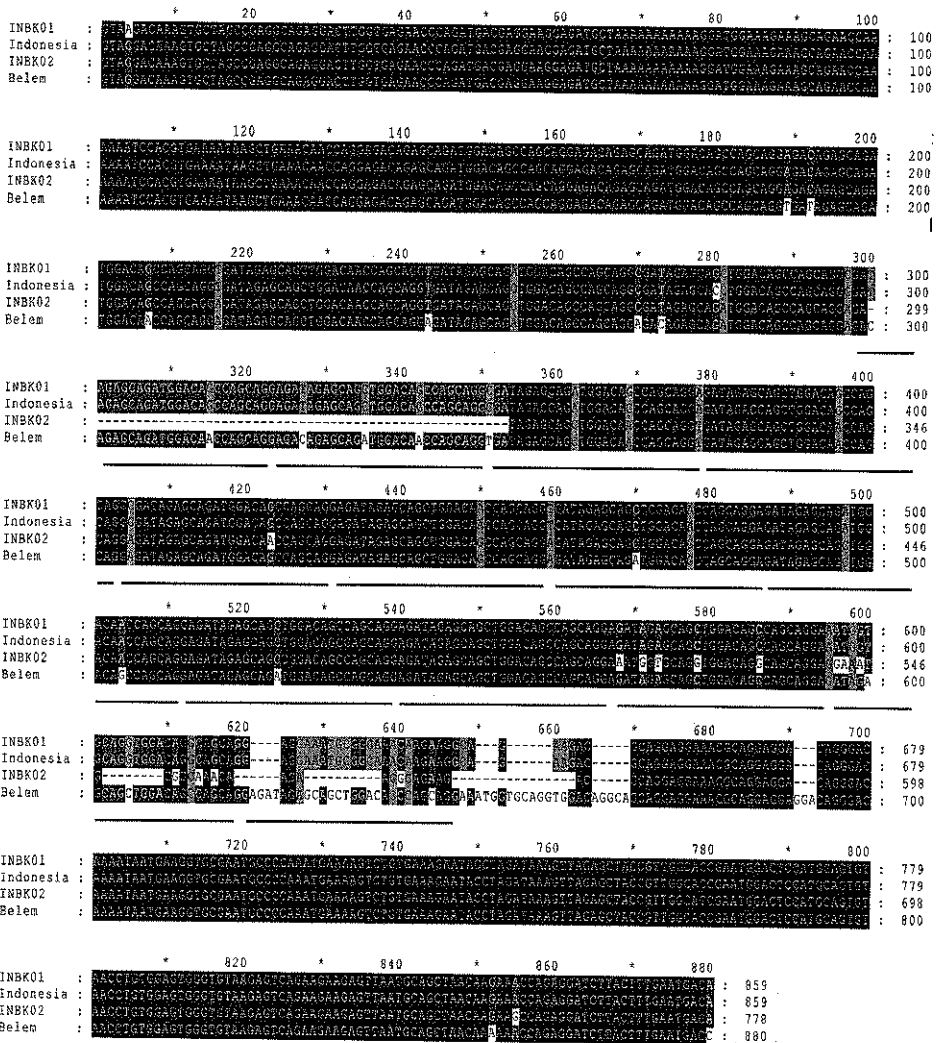
參考文獻

1. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, et al. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 327-36.
2. World Health Organization. The world health report 2003: shaping the future. 2003.
3. World Health Organization. The world malaria report 2005: roll back malaria. 2005.
4. Sowunmi A, Fateye BA. *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Nigerian children: before, during and after treatment with antimalarial drugs. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 783-792.
5. 行政院衛生署。臺灣撲瘧紀實。民國八十二年六月。
6. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, et al. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 687-692.
7. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61: 315-320.
8. Imwong M, Pukrittayakamee S, Gruner AC, et al. Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using *Pvcs* and *Pvmsp1*. *Malar J* 2005; 4: 1-13
9. Cattamanchi A, Kyabayinze D, Hubbard A, et al. 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* 2003; 68: 133-9.

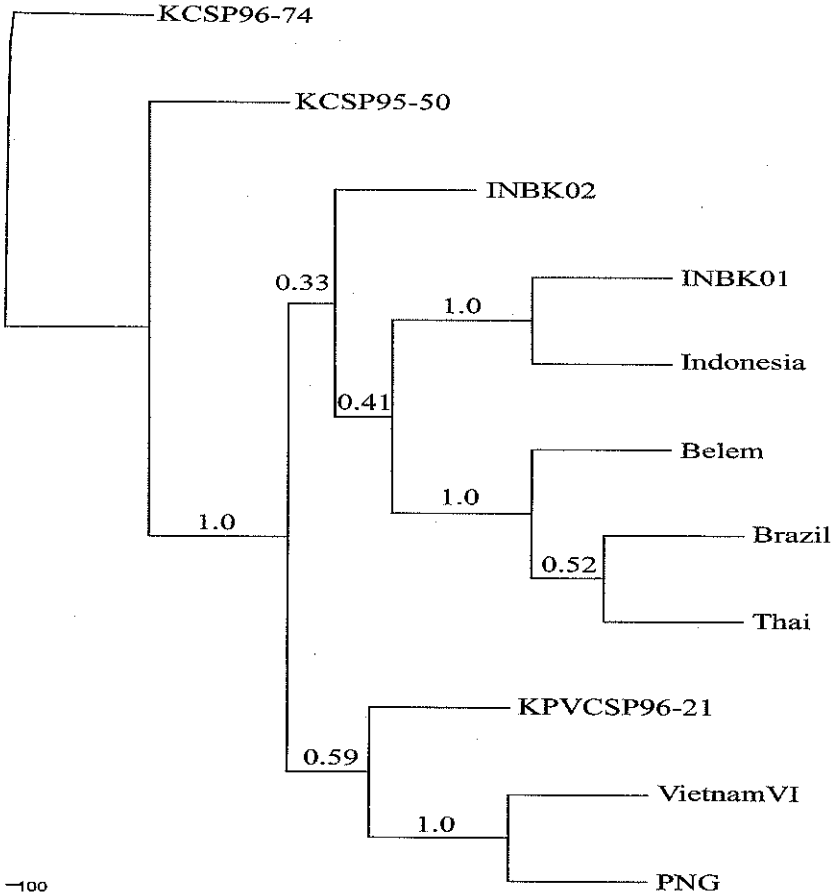
10. Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, et al. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. Science 1989; 245: 973-976
11. 衛生署疾病管制局。瘧疾預防及治療用藥指引。http://www.cdc.gov.tw/file/38901_4756365741 瘧疾治療預防及用藥指引修正版-950703.pdf

表一、*P. vivax* 的 *msp1* 及 *csp* 基因作為分子標記，選用引子對及產物大小如下：

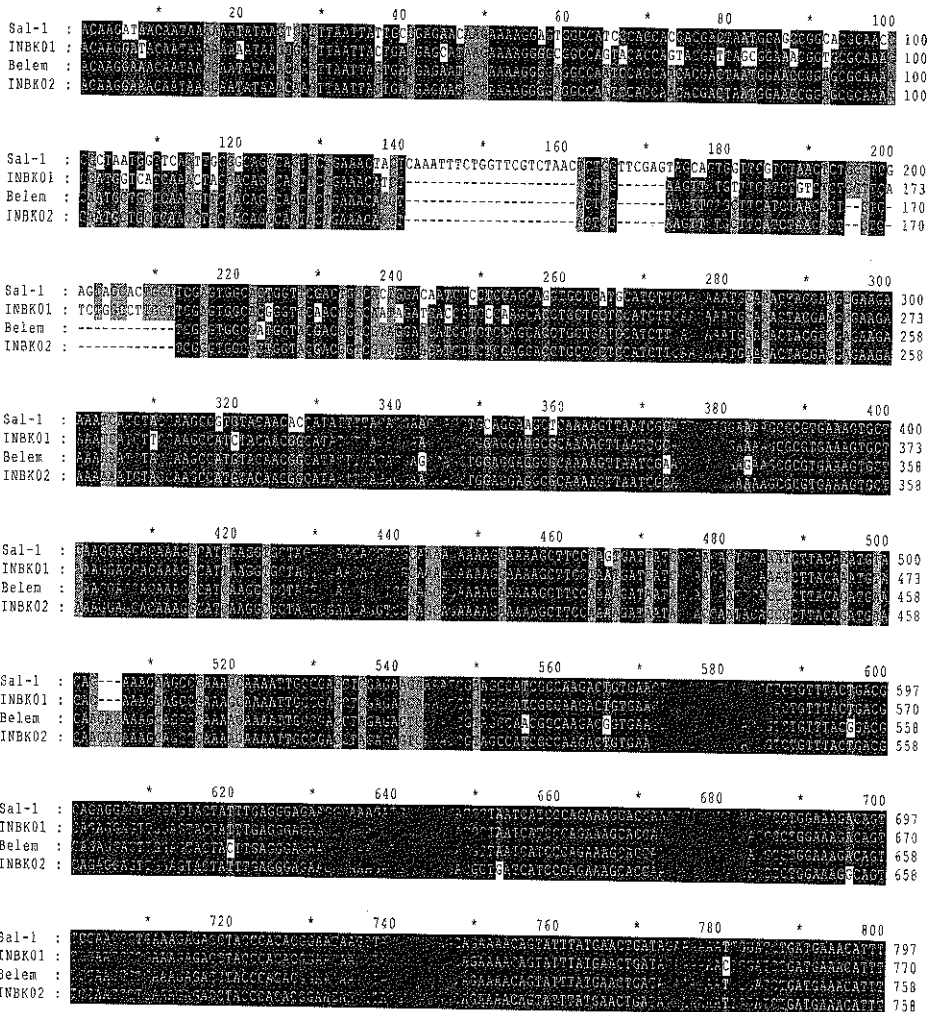
locus	primer pairs	PCR products
SSU-rDNA	rPLU1 : 5'-TCAAAGATT AAG CCATGCAAGTGA -3'	1.6 kb
	rPLU5 : 5'- CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC -3'	
<i>msp1</i> block 2	VM1-O1R: 5'-CCACTCCATGAAACTGAAGTGTTTA -3'	1.0kb
	VM1-N1F: 5'-CGATAATTGGAAAATTGGAGACCTTCATCAC -3'	
<i>csp</i>	VCS-OF: 5'-ATGTAGATCTGTCCAAGGCCATAAA -3'	1.1kb
	VCS-OR: 5'-TAATTGAATAATGCTAGGACTAACAATATG -3'	



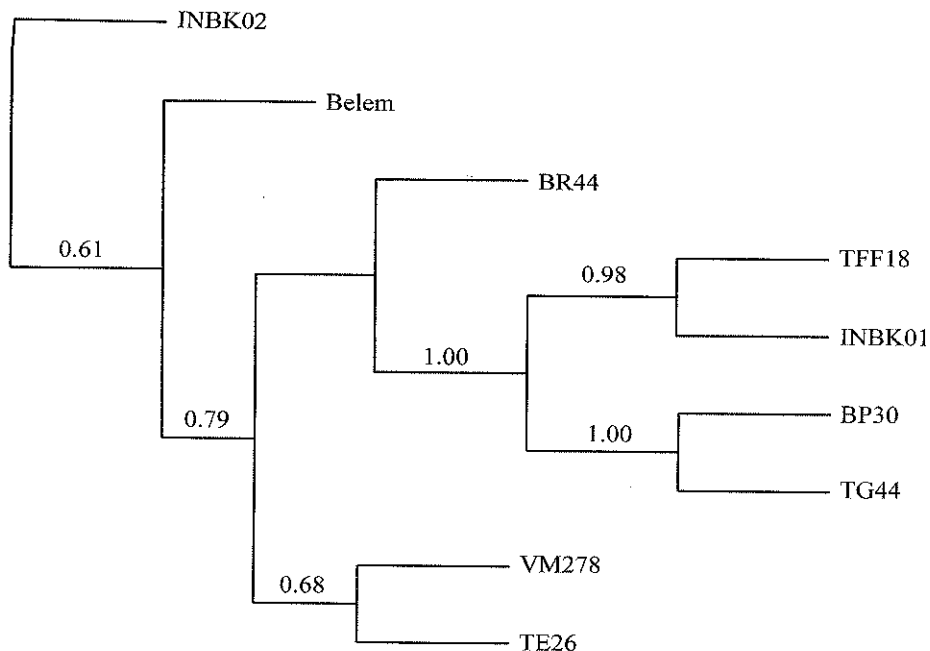
圖一、*P. vivax* 之 *csp* 基因 alignment 比對。依據 Belem Strain 序列第 311 核酸位置至 1190 位置比對結果。INBK01：為 2006 年 1 月份檢體；INBK02：為 2006 年 6 月份檢體。IndonesiaV (accession number:DQ156135)：Isolate from Indonesia；Belem (M11926)：Isolate from Brazil；粗底線：GDRAAGQPA 胺基酸重複序列。



圖二、*P. vivax* 之 *csp* 基因親緣關係樹。INBK01：為 2006 年 1 月份檢體；INBK02：為 2006 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



圖三、*P. vivax* 之 *msp1* block2 基因 alignment 比對。依據 Belem Strain 序列第 624 核酸位置至 1381 位置比對結果。INBK01：為 2006 年 1 月份檢體；INBK02：為 2006 年 6 月份檢體。Belem (accession number:AF435594)：Isolate from Brazil；Sal-1 (AF435593)：Isolate from Brazil



圖四、*P. vivax* 之 *msp1* block2 基因親緣關係樹。INBK01：為 2006 年 1 月份檢體；INBK02：為 2006 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