

人類自然感染猴子瘧原蟲之 境外移入案例探討

郭明珠¹、江亭誼¹、詹志文¹、蔡文石²、嵇達德¹

1. 疾病管制局研究檢驗中心
2. 財團法人埔里基督教醫院

摘要

2005年3月份發生一例於自菲律賓巴拉望島旅遊返國發病並通報之瘧疾病患，初步鏡檢發現瘧原蟲形態特別，成熟滋養體呈阿米巴形態，也有部分營養體呈帶狀，形似三日瘧原蟲的成熟營養體。對照國外文獻資料，並以SSU rRNA及csp基因圍標記，進行聚合酶鏈鎖反應及基因定序後，分析其親緣關係，證明此次感染為諾氏瘧原蟲(*Plasmodium knowlesi*)所致，此為國內首次發現境外移入之人類自然感染猴子瘧疾—諾氏瘧原蟲的病例。由於亞洲許多國家亦陸續發現人類自然感染猴子諾氏瘧原蟲報告案例。諾氏瘧原蟲已被認為可能是原有四種人類瘧疾以外的第五種人類瘧疾。

關鍵字：SSU rRNA 基因、csp 基因、諾氏瘧原蟲

背景介紹

瘧疾的致病原為瘧原蟲屬(*Plasmodium*)的單細胞原生生物，多寄生於脊椎動物宿主的紅血球中。瘧原蟲種類繁多，全世界已知的瘧原

- 西元2008年9月5日受理
- 西元2008年10月9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



蟲種類超過 200 種，分佈遍及全世界各地[1]。感染人類的瘧疾(malaria)有四種，包括惡性瘧原蟲(*Plasmodium falciparum*)、三日瘧原蟲(*P. malariae*)、卵形瘧原蟲(*P. ovale*)及間日瘧原蟲(*P. vivax*)。其他種類的瘧原蟲則會感染低等爬蟲類、鳥類、嚙齒類到高等靈長類等脊椎動物[1]。

諾氏瘧原蟲(*P. knowlesi*)於 1927 年首先由 Franchini 等人自獼猴屬(macaques)的長尾猴(*Macaca fascicularis*)血液中發現，一種與豬尾猴瘧原蟲(*P. inui*)及食蟹猴瘧原蟲(*P. cynomolgi*)不同之新種瘧原蟲[2]。1932 年 Knowles 與 Das Gupta 首次描述諾氏瘧原蟲的形態且發現能感染人類[3]。1967 年 Chin 等人成功透過 *Anopheles balabacensis* 瘧蚊叮咬，將諾氏瘧原蟲由猴子感染人類[4]。直到 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諾氏瘧原蟲的病例後，再度引起醫學界的重視[5]。2008 年 Cox-Singh 等人更進一步發現相當數量的自然感染諾氏瘧原蟲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，四例死亡病例年齡介於 39-69 歲間，有腹痛、發燒症狀，有些出現高寄生蟲血症(parasitemia)、黃疸及腎臟損傷等類似惡性瘧疾重症所引起的症狀，這顯示感染諾氏瘧原蟲是有潛在致死的可能[6]。同時，其他亞洲許多國家包括泰國、新加坡、菲律賓、緬甸及中國大陸亦陸續發現人類自然感染諾氏瘧原蟲報告案例[7-11]。因此，諾氏瘧原蟲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[12]。

因諾氏瘧原蟲形態學的特徵，早期營養體有雙核環狀體與熱帶瘧特徵相似；後期營養體出現帶狀體、分裂體及配子體卻似三日瘧，形態上很難由常規鏡檢方法加以分辨，因此易發生錯誤歸類情形[5-7,10]。然三日瘧原蟲的生活週期為 72 小時，所引起的瘧疾症狀輕微，有些病患甚至無症狀，而諾氏瘧原蟲複製週期約 24 小時[6]，時間比其他瘧原蟲都短，如果未能及時診斷出來，可在血液中快速增殖

達到具致命密度的蟲量，成為威脅人類生命的潛在病原[12]。目前許多研究團隊以回溯性方式[5-6,9]，重新檢測過去保留之檢體，以瞭解諾氏瘧原蟲感染人類之真正盛行率，並且希望進一步釐清其傳播模式是否真由獼猴而來，亦或人類早已成為自然宿主。

本文就本實驗室首度發現人類自然感染猴子瘧原蟲之境外移入案例，進行形態學描述及分子鑑定。

個案報告

個案為 60 歲、男性、南投縣埔里鎮之退休教師，於 2005 年 2 月與友人組團前往東南亞，進行為期兩週之自然生態之旅及賞鳥活動，自訴全程多身著長褲及長袖上衣，途經菲律賓巴拉望島，曾因天候濕熱改穿短褲，活動中感覺被蚊蟲叮咬，返國後因發燒至 39.4°C、且出現頭痛、間歇性寒顫、發汗等症狀持續約四天，至埔里基督教醫院就診，遂被通報為疑似瘧疾感染。本實驗室人員前往醫院初步判定三日瘧原蟲感染，參考 WHO 用藥指引[13]，提供口服氯奎寧 Chloroquine 1 g(base 600mg)，6 小時後降低劑量為 500mg(base 300mg)，再 18 小時後給予 500mg(base 300mg)，24 小時後再給 500mg(base 300mg)治療二日後痊癒。

材料與方法

- 一、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。
- 二、DNA 抽取純化及聚合酶連鎖反應(Nested polymerase chain reaction)：



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核糖體小亞單位 (small subunit ribosomal RNA, SSU rRNA) 基因、環孢子蛋白 (circumsporozoite protein, csp) 基因片段序列增幅反應，藉產物之有無、大小或序列診斷瘧原蟲之存在與種別判定[14-16]。SSU rRNA 引子對及產物大小如表一。

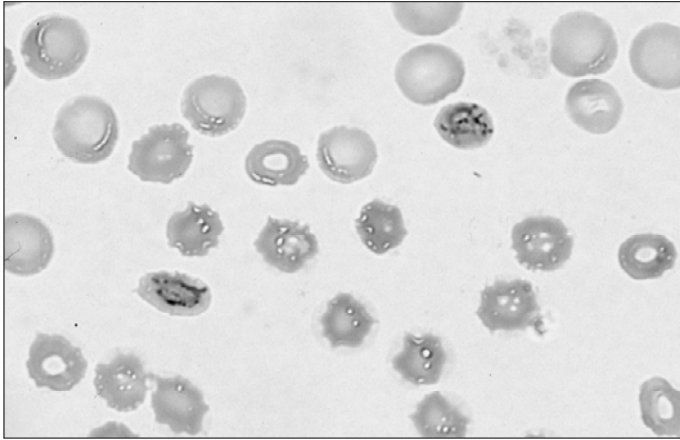
表一、SSU rRNA 引子對及產物大小

引子	序列 (5'→3')	產物
SSU rRNA Outer PCR		
genus-specific	rPLU 1 : TCA AAG AAT AAG CCA TGC AAG TGA rPLU 2 : TAC CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC	1.6 kb
SSU rRNA Inner PCR		
genus-specific	rPLU 3 : TTT TTA TAA GGA TAACTA CGG AAA AGC rPLU 4 : TAC CCG TCA TAG CCATGT TAG GCC AAT ACC	240-bp
<i>P. falciparum</i>	rFAL1 : TTA AAC TGG TTT GGGAAA ACC AAA TAT ATT rFAL2 : ACA CAA TGA ACT CAATCA TGA CTA CCC GTC	205-bp
<i>P. vivax</i>	rVIV1 : CGC TTC TAG CTT AATCCA CAT AAC TGA TAC rVIV2 : ACT TCC AAG CCG AAGCAA AGA AAG TCC TTA	117-bp
<i>P. malariae</i>	rMAL1 : ATA ACA TAG TTG TACGTT AAG AAT AAC CGC rMAL2 : AAA ATT CCC ATG CATAAAA AAA TTA TAC AAA	144-bp
<i>P. ovale</i>	rOVA1 ATC TCT TTT GCT ATTTTT TAG TAT TGG AGA rOVA2 GGA AAA GGA CAC ATTAAT TGT ATC CTA GTG	787-bp
<i>P. knowlesi</i>	Pmkr8 : GTT AGC GAG AGC CACAAA AAA GCG AAT Pmkr9 : ACT CAA AGT AAC AAAATC TTC CGT A	153-bp
<i>csp</i> PCR	PkCSP-F : TCCTCCACATACTTATATACAAGA PkCSP-R : GTACCGTGGGGGACGCCG	1.0 kb
<i>P. knowlesi</i>		

三、基因選質與序列分析：將聚合酶連鎖反應所增幅之 1669 bp SSU rRNA 及 1081 bp csp 基因片段分別接進 pCR4-TOPO(InvitrogenTM) 基因載體中，再轉形入 *Escherichia coli* DH5 α 中，選殖後進行上述二基因片段之定序。將上述二基因序列分別與 GenBank 中其他瘧原蟲的相關基因，以 Genetics Computer Group(GCG)分析軟體進行 pileup 後，使用 neighbour-joining method 方法繪製親緣關係樹，分析序列之親緣關係[17]。

結 果

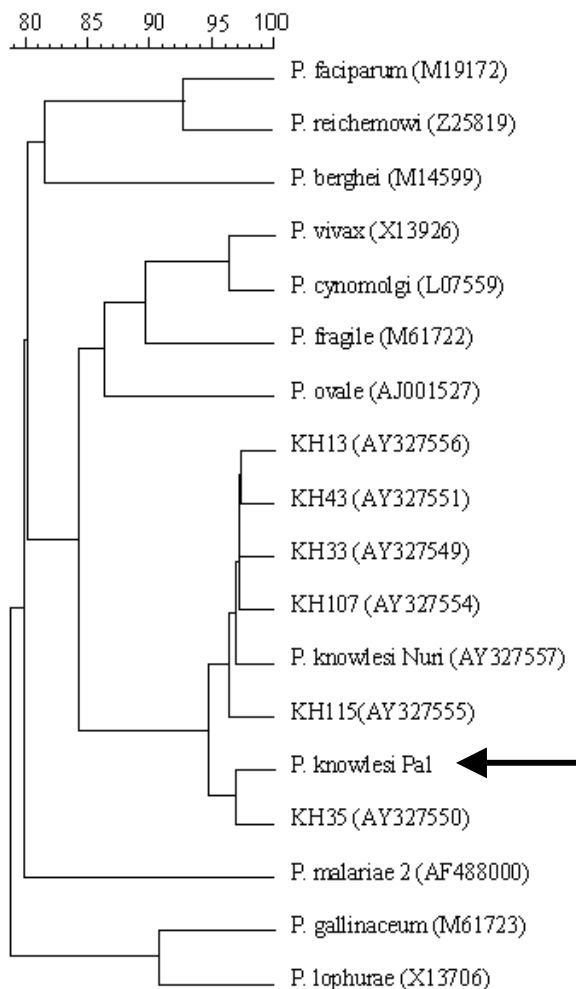
顯微鏡下觀察該例患者血片可見瘧原蟲感染的紅血球內指環體較惡性瘧原蟲稍粗大；成熟營養體呈阿米巴形態，有些成熟營養體到紅血球體積的一半以上，細胞質分布較緊密；也有部分營養體形成帶狀的趨勢，形似三日瘧原蟲的成熟營養體。瘧原蟲的成熟裂殖體中央呈現 8 至 16 不等的分裂小體；成熟營養體和裂殖體中有濃密的黑褐色色素；配子體也像三日瘧呈圓形，並佔滿整個血球，不易跟三日瘧區分(圖一)。



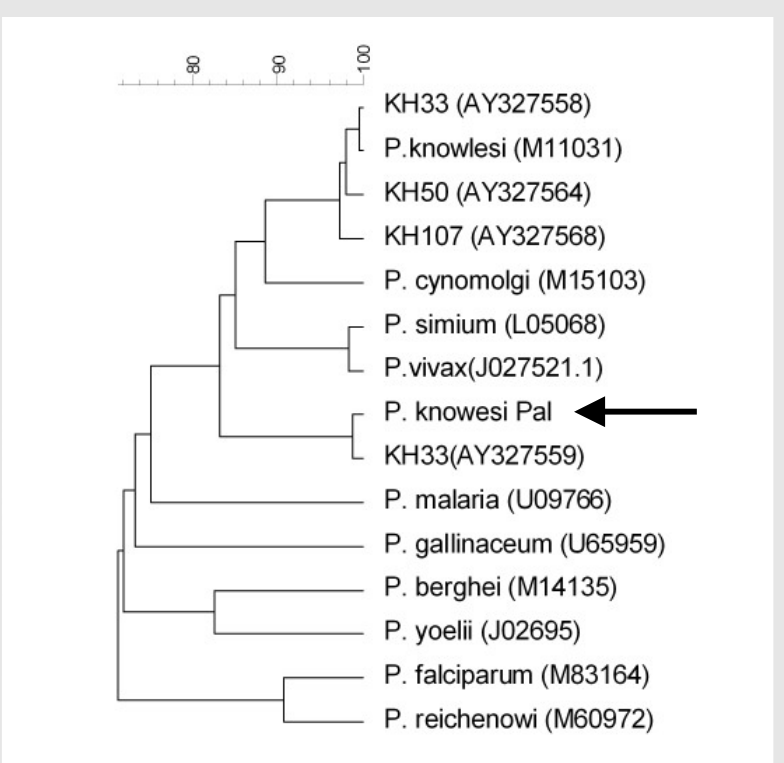
圖一、Giemsa 染色之薄層抹片諾氏瘧原蟲營養體形態

僅依據上述形態學觀察的結果並不能肯定是何種瘧原蟲感染，為了進一步確定該例患者感染瘧原蟲的種類，遂進行了分子鑑定。先用針對瘧原蟲核糖體亞單位(SSU rRNA)屬特異性引子(Plasmodium genus-specific primer)和惡性瘧原蟲、間日瘧原蟲、三日瘧原蟲、卵形瘧原蟲之種特異性引子(Plasmodium species-specific primer)進行巢式聚合酶連鎖反應擴增，顯示此次感染病原確實為瘧原蟲屬，卻非上述四種人類瘧原蟲。

再進一步以 SSU rRNA 與環孢子蛋白(csp)兩基因定序及親緣關係比對後發現：很明顯與 GenBank 基因庫中的一種猴子瘧疾 *P. knowlesi* 親緣關係較為接近，相似度分別達 99%及 91%，與人類、其他猿猴、嚙齒類及鳥類瘧原蟲明顯不同(圖二、圖三)。

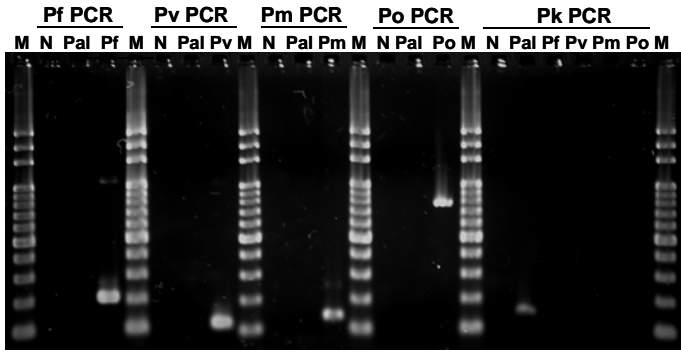


圖二、不同種類瘧原蟲之 SSU rRNA 基因親緣關係圖。(by the neighbour-joining method)。 *P. reicheimowi*：猿瘧原蟲，*P. berghei*：伯氏鼠瘧原蟲，*P. cynomolgi*：食蟹猴瘧原蟲，*P. fragile*：猴脆瘧原蟲，*P. gallinaceum*：雞瘧原蟲，*P. lophurae*：鵝瘧原蟲。箭頭指為本次個案檢體。



圖三、不同種類瘧原蟲之 CSP 基因親緣關係圖。(by the neighbour-joining method)。P. cynomolgi：食蟹猴瘧原蟲，P. simium：猴瘧原蟲，P. gallinaceum：雞瘧原蟲，P. berghei：伯氏鼠瘧原蟲，P. yoelii：約氏鼠瘧原蟲，P. reichenowi：猿瘧原蟲。箭頭指為本次個案檢體。

透過諾氏瘧原蟲 SSU rRNA 的特異性引子進行巢式聚合酶連鎖反應擴增後，產生約 153 bp 之諾氏瘧原蟲特異性片段，而其他種類瘧原蟲則無法被擴增，電泳結果如圖四，證實了該例患者感染了諾氏瘧原蟲。



圖四、諾氏瘧原蟲與四種人類瘧原蟲種的特異性引子 PCR 增幅電泳圖。M：100 bp marker，Pf：惡性瘧原蟲，Pv：間日瘧原蟲，Pm：三日瘧原蟲，Po：卵形瘧原蟲，Pal：本次個案檢體，N：陰性對照。Pf PCR：以惡性瘧原蟲引子 PCR 增幅。Pv PCR：以間日瘧原蟲引子 PCR 增幅。Pm PCR：以三日瘧原蟲引子 PCR 增幅。Po PCR：以卵形瘧原蟲引子 PCR 增幅。Pk PCR：以諾氏瘧原蟲引子 PCR 增幅。

討論

瘧原蟲感染之診斷通常根據患者的症狀、瘧原蟲形態及其寄生紅血球的變化來判定，但往往局限於已知感染人類的四種瘧原蟲形態，忽略了感染其他種瘧原蟲的可能。

此諾氏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。本實驗室雖初判病患感染三日瘧，但仍覺得其形態不是典型三日瘧原蟲，再加上檢測瘧原蟲屬之巢式聚合酶連鎖反應 (Plasmodium genus-specific nested PCR) 呈陽性，而四種人類瘧原蟲之種特異性引子卻無法增幅。因此推定病患可能感染了非人類瘧疾的他種瘧疾。將瘧原蟲屬之巢式聚合酶連鎖反應產物定序，並以諾氏瘧原蟲 (*P. knowlesi*) 特異性引子及 SSU rRNA、CSP 基因檢測及定序後，結果顯示此瘧原蟲與諾氏瘧原蟲 (*P. knowlesi*) 相似度分別達 99% 及



91%，與其他地區所報告之諾氏瘧原蟲(*P. knowlesi*)蟲株基因序列做親緣關係比較後，發現與馬來西亞分離之 KH35 株最相近，因而證實這次的感染應為猴子瘧原蟲－諾氏瘧原蟲(*P. knowlesi*)所致。

許多病原體在人類和動物宿主之間能夠交叉感染，而野生的靈長類動物往往是人類感染病原的潛在來源，由於人類道路開發、開採礦物、伐木及森林旅遊等活動，與靈長類或其他動物有更多的接觸，也提高了一些人畜共通傳染的機會。Anopheles balabacensis 在東南亞的森林地區是傳播人類瘧疾的重要媒介，而此地區亦是諾氏瘧原蟲自然宿主長尾猴及豬尾猴(*Macaca nemestrina*)的棲所[18]，因此諾氏瘧原蟲在自然界是很有可能經由 Anopheles balabacensis 在獼猴與人類之間傳播。過去由於諾氏瘧原蟲自然感染人類的病例稀少並分布零散，其可能造成人畜共通疾病的重要性並未受到重視，直到2004年 Balbir Singh 等人在馬來西亞研究發表後才開始獲得學界關注[5]，並認為人類感染猴子瘧疾的病例，可能較原本想像來得更多，分佈更為廣泛。早年的研究指出諾氏瘧原蟲主要分佈自馬來西亞延伸到菲律賓[19]，日據時代文獻曾經報導諾氏瘧原蟲 *P. knowlesi* 在台灣獼猴(*Macaca cyclops*)體內發現過[18]，雖然台灣尚未發現此蟲自然感染人類的情形，但仍需注意致病性諾氏瘧原蟲引入台灣猴群，再傳染到人類族群，造成新興猴子瘧疾傳播之可能途徑。

跨物種之間的病原傳染，使得臨床鑑別診斷變成目前很重要的課題，諾氏瘧原蟲複製週期約 24 小時，因此快速診斷與用藥是必要的，根據不同種瘧原蟲基因組內較保守的序列，設計特異性引子序列進行鑑定並確定診斷，可以即時啟動相關防治作為。所幸諾氏瘧原蟲目前看起來在人類死亡率並不高，大部分的抗瘧疾藥物也都能夠有效治療。但若三日瘧病患若是出現不正常的高寄生蟲血症，則應考慮是否為諾氏瘧原蟲感染，並應小心治療避免死亡發生[12]。Balbir Singh 等

人也呼籲在東南亞居住或旅行的人，若是被鏡檢診斷為高寄生蟲血症的三日瘧疾，應仿照惡性瘧疾治療，以免延誤病情[6]。

本篇研究除建立本實驗室分子生物學方法診斷諾氏瘧原蟲感染外，亦是國內首次於臨床發現猴子諾氏瘧原蟲自然感染人體的報告。

參考文獻

1. Rich SM, Ayala FJ. Progress in malaria research: the case for phylogenetics. *Adv Parasitol* 2003; 54: 255-80.
2. Franchini G. Plasmodio pigmentatodi unascimmia. *Arch Ital Sci Med Colon Parasitol* 1927; 8:187-90.
3. Knowles R, Das Gupta BM. A study of monkey-malaria and its experimental transmission to man. *Ind Med Gaz* 1932; 67: 301-21.
4. Chin W, Contacos PG, Collins WE, et al . Experimental mosquito-transmission of *Plasmodium knowlesi* to man and monkey. *Am J Trop Med Hyg* 1968; 17: 355-8.
5. 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.
6. 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.
7. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, et al . Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2211-3.
8. Ng OT, Ooi EE, Lee CC, et al . Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. *Emerg Infect Dis* 2008 ; 14: 814-6.
9. Luchavez J, Espino F, Curameng P, et al . Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. *Emerg Infect Dis* 2008 ; 14: 811-3.
10. Zhu HM, Li J, Zheng H. Human natural infection of *Plasmodium knowlesi* *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2006; 24:70-1.
11. Kawamoto F, Win TT, Mizuno S, et al . Unusual plasmodium malariae-like parasites in southeast Asia. *J Parasitol* 2002; 88: 350-7
12. White NJ. *Plasmodium knowlesi* : the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis* 2008 Jan 15; 46: 172-3.



13. World Health Organization. WHO Guidelines for the Treatment of Malaria. Geneva, Switzerland: WHO; 2006. Technical document WHO/ HTM/ MAL/ 2006.1108.
14. 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: 687-92.
15. 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: 315-20.
16. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, et al . 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* 2004; 42: 5636-43.
17. McCutchan TF, Kissinger JC, Touray MG, et al. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malaras: biological and phylogenetic implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11889-94.
18. Coatney GR, Collins WE, Warren M, et al . The primate malaras [CD-ROM; original book published 1971]. Version 1.0. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2003.
19. Lambrecht FL, Dunn FL, Eyles DE. Isolation of *Plasmodium knowlesi* from Philippine macaques. *Nature* 1961; 191: 1117-8.