

國立臺灣大學公共衛生學院流行病學與預防醫學研究所



碩士論文

Institute of Epidemiology and Preventive Medicine

College of Public Health

National Taiwan University

Master Thesis

聖多美普林西比民主共和國瘧疾分子流行病學研究
Molecular epidemiological study of malaria in the
Democratic Republic of Sao Tome and Principe

學生：許岑竹

Student: Tsen-Ju Shiu

指導教授：蔡坤憲 博士

方啓泰 博士

Advisor: Kun- Hsien Tsai, Ph.D.

Chi-Tai Fang, MD, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July 2014



致 謝

經歷過實驗汙染、失敗等挑戰和無數焦慮失望的時刻，終於在 700 多個日子後略有小成。研究的完成首先要歸功於蔡坤憲老師的指導，感謝老師四年來以從不間斷的耐心幫助我度過在課業、研究和生命中面臨的所有困難，並以熱誠教導我研究與處事的道理。感謝台灣駐聖多美瘧疾防治顧問團多年耕耘，提供當地檢體與資料使得研究得以順利進行。

在忙亂徬徨的研究生階段，感謝擔任共同指導教授方啟泰老師時常關心我研究和生活的近況；感謝擔任口試委員的嵇達德博士在口試前後給予提點和指導，讓我了解研究未來前進的方向。此外，感謝流預所老師們這兩年來的指導，其中郭柏秀老師、施惟量老師和林先和老師在學業、生涯規劃與生活上持續的關心和建議給予我極大的幫助。

進入蟲媒傳染病實驗室四年間，從一無所知到能完成這份研究，感謝慧汝、婉甄、令欣、雲露、棋羣、思佑、若庭、騫幼、國志、順彥、承晏、婉秀、瑩潔等眾多學長姐在我困惑和焦慮時救援支持，還有 partner 蔡佳宏、學妹伊芸、林達和又瑄在這些日子一起面對困境。特別感謝采瑩學姐和卉盈學姐，隨時解決我製造的大小麻煩、生活中的毛躁碎念，更用耐心陪伴我度過生命中難過低潮的時刻。

感謝這些有哭有笑的時刻有著流預所 R01 同學們一起努力；還有好像沒有分離的 PH97 是玩樂笑鬧的最佳夥伴。彙文、宜芳、巧蓁、盈甄、欣蔚、彥莉、Karen、902 室友們和公衛系羽，感謝你們陪我走過所有喜怒哀樂亦或子夜無光的時分。

最後謹將我所有的感謝與愛獻給我的家人，是你們造就今日我所有的美好。再次謝謝出現在我生命裡的所有人，但願我也能成為你們生命裡的一絲祝福。

許岑竹

於台大公衛蟲媒傳染病實驗室 2014.07

中文摘要



瘧疾過去在聖多美普林西比民主共和國（以下簡稱聖多美）造成極大的威脅，在各種防治措施介入後，疾病發生率和盛行率都有顯著的下降。本研究藉由分析聖多美流行病學資料，驗證當地是否進入瘧疾清除前期。透過定量即時聚合酶鏈鎖反應和巢式聚合酶鏈鎖反應，比較分生檢驗與鏡檢結果差異。此外，將聚合酶鏈鎖反應陽性檢體進行瘧原蟲裂殖體表面蛋白第一型 (MSP1) 和瘧原蟲裂殖體表面蛋白第二型 (MSP2) 基因定序，分析聖多美不同年代、地區、寄生蟲等級檢體中所帶惡性瘧原蟲流行株趨勢。研究蒐集西元 2000 年起聖多美 13 年發燒與瘧疾確診人數，以及 2010 年瘧疾陽性病人 (n=28)、2011 年至 2013 年間低寄生蟲血症病人 (n=377)、不明發燒病人 (n=605) 與普林西比島全島篩檢 (n=6855) 之資料與血片，結果顯示僅有 Lemba 省和 Principe 自治區達到世界衛生組織訂立瘧疾清除前期標準。在鏡檢為瘧疾陰性的 461 位門診發燒病人中，有 15 人 (3.3%) 經 PCR 判定為感染瘧原蟲；普林西比島篩檢則分生檢驗與鏡檢結果一致。分析 PCR 陽性檢體之親緣關係發現，聖多美惡性瘧原蟲流行株大致可分為三大群，是否源自不同國家傳入其他型別則需進一步分析。藉由分子流行病學資料顯示，聖多美目前已逐漸進入瘧疾清除階段，本研究結果將提供聖多美瘧疾治療與疫苗發展的相關資訊，對未來瘧疾防治能做更適宜的政策規劃與準備。

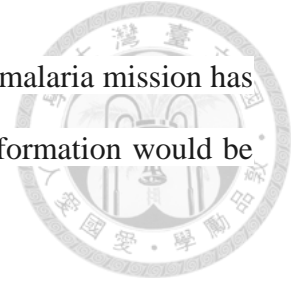
關鍵詞：聖多美普林西比民主共和國、瘧疾、惡性瘧原蟲、定量即時聚合酶鏈鎖反應、巢式聚合酶鏈鎖反應、親緣關係

Abstract



Malaria incidence in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe (DRSTP) is decreasing after multiple intervention strategies. In the study, data of malaria infections were collected and analyzed to clarify whether the DRSTP meets the criteria of pre-elimination phase. Human samples were examined by nested polymerase chain reaction (nested PCR), and the results were compared with traditional light microscopy. Moreover, quantitative real-time PCR (Q-PCR) was developed and applied as an alternative molecular tool for diagnosis of malaria. To further elucidate the epidemiology of malaria infection in the DRSTP, the sequences of Merozoite surface protein-1 (MSP1) and Merozoite surface protein-2 (MSP2) genes of the positive samples were selected for phylogenetic analysis. From 2010 to 2013, dry blood spot papers were collected from patients with confirmed malaria infection (n=28), low-density parasitemia (n=377), fever of unknown origin (FUO, n=605) on the island of Sao Tome. Additional samples (n=6,855) were obtained during the malaria mass screening on whole island of Principe in 2013. Results showed that only province of Lemba and Principe have met the World Health Organization (WHO) criteria of pre-elimination in the DRSTP. Molecular diagnosis employing PCR detected parasite DNA in about 3.3% (15/461) of patients with FUO but microscopic negative. Further application of nested PCR in Principe, the province which satisfied the pre-elimination qualification, revealed an identical positive rate of malaria infection to light microscopy. The phylogenetic study of *Plasmodium falciparum* in the DRSTP suggested that the isolates may distribute into 3 groups based on both MSP1 and MSP2 sequences. However, the molecular information of these endemic strains is limited, and their relationship with neighboring countries are of interest. In conclusion, this study showed

the molecular epidemiology of malaria in the DRSTP when the anti-malaria mission has moved from control stage to pre-elimination stage. The advance information would be helpful for treatment strategies and vaccine development.

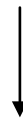


Key Words: Democratic Republic of Sao Tome and Principe, Malaria, *Plasmodium falciparum*, Quantitative real-time PCR, Nested PCR, Phylogeny.



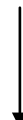
一、聖多美流行病學基本資料分析

2000~2013 年



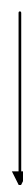
- 1. 是否進入瘧疾清除前期？
- 2. 傳統鏡檢是否遇到限制？

二、分子生物學檢驗工具

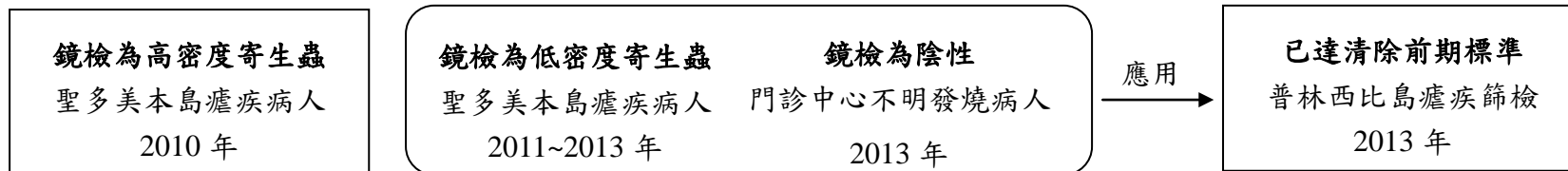


- 3. 應用 Nested PCR、Q-PCR 檢測結果有助於鏡檢工具？

三、瘧原蟲親緣關係分析



- 4. 不同寄生蟲密度和盛行階段中，流行瘧原蟲之品系為何？
- 5. 不同年份之寄生蟲品系變化



『聖多美普林西比民主共和國瘧疾分子流行病學研究』之研究流程圖

目 錄



口試委員會審定書.....	i
致謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
研究流程圖.....	vi
目錄.....	vii
圖目錄.....	viii
表目錄.....	ix
第一章 前言.....	1
第一節 聖多美普林西比背景介紹.....	1
第二節 瘧疾概述.....	2
第三節 檢驗策略.....	6
第四節 瘧原蟲親緣關係比較.....	8
第五節 研究目的.....	9
第二章 材料與方法.....	10
第一節 聖多美基礎流行病學分析.....	10
第二節 聖多美分生檢驗.....	11
第三節 瘧原蟲親緣關係比較.....	16
第三章 結果.....	19
第一節 聖多美基礎流行病學分析.....	19
第二節 聖多美分生檢驗.....	20
第三節 瘧原蟲親緣關係比較.....	23
第四章 討論.....	25
參考文獻.....	28

圖目錄



圖 A 聖多美地理位置與行政區地圖.....	1
圖 B 瘧疾防治四階段及其標準.....	4
圖一 西元 2000~2013 年間聖多美普林西比民主共和國全國發燒人數、瘧疾確診個案人數與玻片陽性率.....	35
圖二 西元 2000~2013 年間聖多美普林西比民主共和國各區發燒人數、瘧疾確診個案人數與玻片陽性率.....	36
圖三 以巢式聚合酶鏈鎖反應檢驗普林西比全島鏡檢陽性及快篩陽性檢體惡性瘧原蟲 18S rRNA 基因.....	39
圖四 以聚合酶鏈鎖反應增幅聖多美普林西比民主共和國瘧疾陽性檢體之瘧原蟲裂殖體表面蛋白第一型基因.....	40
圖五 以聚合酶鏈鎖反應增幅聖多美普林西比民主共和國瘧疾陽性檢體之瘧原蟲裂殖體表面蛋白第二型基因.....	41
圖六 聖多美惡性瘧瘧原蟲裂殖體表面蛋白第一型基因之親緣關係樹型圖.....	42
圖七 聖多美惡性瘧瘧原蟲裂殖體表面蛋白第二型基因之親緣關係樹型圖.....	43

表目錄



表 A 瘧疾陽性血液檢體等級對照表.....	6
表 B 聖多美研究蒐集之檢體數量.....	11
表 C 巢式聚合酶鏈鎖反應與定量即時聚合酶鏈鎖反應之引子序列.....	15
表 D 聖多美親緣關係分析蒐集之檢體數量.....	16
表 E 瘧原蟲裂殖體表面蛋白第一、二型親緣關係比較所使用聚合酶鏈鎖反應之引子序列.....	17
表一 聖多美普林西比民主共和國各行政區於西元 2000 年到 2013 年間達到世界衛生組織清除前期標準 (SPR 值小於 5%) 情形.....	44
表二 比較西元 2011 年到 2013 年間聖多美普林西比民主共和國低寄生蟲血症病人分生檢驗與鏡檢結果.....	45
表三 比較西元 2011 年到 2013 年間聖多美普林西比民主共和國門診中心發燒病人分生檢驗與鏡檢結果.....	46
表四 普林西比島全島篩檢之基礎人口學資料.....	47
表五 普林西比島全島篩檢陽性檢體基礎人口學資料.....	48

第一章 前言

第一節 聖多美普林西比背景介紹

聖多美普林西比民主共和國，簡稱：聖多美 (Democratic Republic of Sao Tome and Principe; DRSTP) 位於非洲大陸西方幾內亞灣，境內被經度 0 度與赤道線貫穿，被喻為世界的中心。國家由聖多美島、普林西比島和鄰近島嶼組成，分成 Agua Grande、Me-Zochi、Cantagalo、Caue、Lemba、Lobata 六個省份和 Principe 行政自治區 (見圖 A) [1]，總面積為 1001 平方公里。根據中華民國外交部資料顯示，西元 2012 年聖多美當地人口約為 187,000 人，約 90% 以上人民居住於聖多美本島，其中又以省份 Agua Grande 居民最多。聖多美屬於熱帶雨林氣候，終年平均溫度為 25°C，相對溼度約為 80%，主要雨季集中於九月到十一月之間，隨著不同地形與地理位置各地年雨量略有差異。

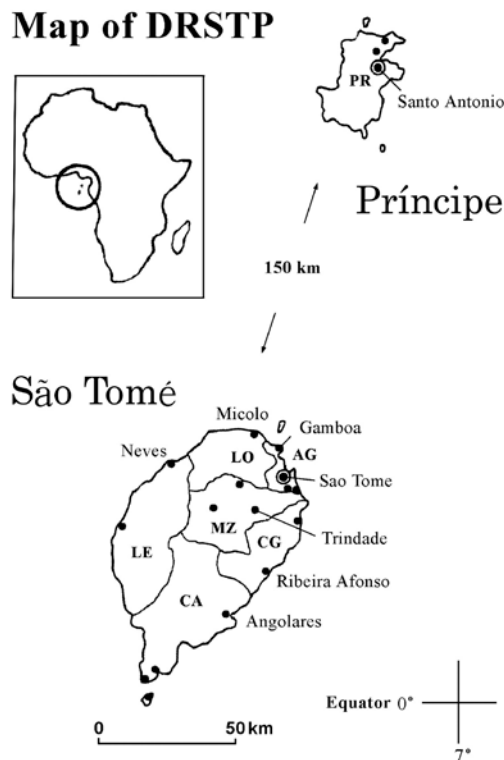


圖 A 聖多美地理位置與行政區地圖

Fig. A Districts and major localities in the DRSTP. (from Tseng et al. 2008)



第二節 瘧疾概述

1.病原體簡介

瘧疾 (Malaria) 的威脅在人類生活中存在已久，其名稱源自於拉丁文中「壞的空氣」之意 [2]，隨著 17 世紀細菌的發現、1870 年代微生物致病觀念逐漸被證實，西元 1880 年法國醫生 Laveran 首次於瘧疾病人血清中觀察到寄生蟲的存在 [3]，進而證明瘧原蟲 (*Plasmodium spp.*) 為瘧疾的病原體。

根據研究指出，最常造成人類感染瘧疾的瘧原蟲有五種，分別為：惡性瘧原蟲 (*P. falciparum*)、間日瘧原蟲 (*P. vivax*)、三日瘧原蟲 (*P. malariae*)、卵型瘧原蟲 (*P. ovale*) 以及諾氏瘧原蟲 (*P. knowlesi*)，上述五種瘧原蟲在型態、生活史以及全球地理分布上皆略有差異，感染後症狀也有所不同。其中惡性瘧原蟲為最常見的瘧疾感染源，引發的症狀也最為嚴重 [4]，包含中樞神經系統併發症、造成腦性瘧 (Cerebral malaria) [5] 甚至死亡。西元1965年首次發現感染諾氏瘧原蟲病人 [6]，而後續研究透過分生檢驗證明人類已可能由自然傳播方式感染。之後，自西元2004年起已陸續在泰國 [7] 及馬來西亞 [8] 等南亞地區發現人類感染諾氏瘧原蟲的案例。隨著生活型態的改變與檢驗技術的進步，各種新興病原體持續被發現，近年在馬來西亞亦檢測到一名39歲女性在自然情形下感染瘧原蟲*P. cynomolgi* [9]，這些病例都再再顯示瘧疾仍舊是當今重要傳染病議題。

2.病媒與傳播方式

瘧疾是目前世界上重要的蟲媒傳染病之一，西元 1987 年由英國軍醫 Ronald Ross 在瘧蚊身上分離出瘧原蟲，證實瘧疾病原體主要是透過瘧蚊吸取發病病人血液進行傳播 [3]。根據過去調查顯示，聖多美地區最主要傳播瘧疾的病媒蚊為岡比亞瘧蚊 (*Anopheles gambiae*) [10]。

帶有瘧原蟲的病媒蚊在叮咬人時，將瘧原蟲送入人體血液之中，瘧原蟲隨著血管抵達人類肝臟並在此形成裂殖體 (Schizont) 分裂繁殖，被稱為紅血球外期 (Exo-erythrocytic cycle)。裂殖體持續分裂至肝細胞破裂後，釋出的裂殖子侵入紅血球後進入紅血球內期 (Erythrocytic cycle)，一部分的裂殖子形成滋養體 (Trophozoite) 持續進行分裂生殖，另一部分則發育成雌雄配子體 (Gametocyte)。

在吸血的過程中瘧蚊同時吸入瘧原蟲配子體，雌雄配子體在蚊子腸胃道結合形成卵囊，之後釋放成熟孢子到瘧蚊唾腺中，讓瘧原蟲在下一次的叮咬中促成疾病傳播 [11]。研究發現除了瘧蚊叮咬，輸血、器官移植 [12] 及母子垂直傳播都有可能造成瘧疾感染。

3. 症狀與治療

人類感染瘧疾後容易出現發燒、貧血、脾臟腫大以及發冷發汗等症狀。在 20 世紀初即知以注射奎寧治療瘧疾 [13]，奎寧衍生藥物如：氯奎寧 (Chloroquine; CQ)、美爾奎寧 (Mefloquine) 或是 Sulfadoxine pyrimethamine 都是治療瘧疾的常用藥物 [14]。每種藥物主要作用在人體位置與瘧原蟲生長時期也有所差異，針對感染瘧原蟲種類、生活史差異與用藥目的也不同 [15]。

隨著氯奎寧抗藥性在 1970 年代出現且迅速由亞洲蔓延到非洲各國，過去主要用於瘧疾重症的奎寧也面臨使用上的限制，中國大陸於西元 1972 年發現從植物青蒿中可萃取出有效的抗瘧疾藥物 [16]，成為瘧疾用藥發展上重要的里程碑。在西元 2005 及 2010 年，分別針對成人與孩童進行大型隨機臨床試驗中證明，在瘧疾重症病患治療之時，使用青蒿素衍生物比起傳統用藥奎寧更能成功降低死亡率 [17] [18]。

一般抗瘧藥物在推出 10 到 15 年後，便開始有抗此藥物的案例出現，而藥物合併使用治療法，是目前認為最實際、有效且可行的解決方法 [19]。隨著瘧疾抗藥性的問題日益嚴重，青蒿素結合療法 (Artemisinin combination therapy; ACT) 即是透過結合青蒿素衍生物與其他種類藥物使用，減少抗藥性病原體的出現的可能 [20]。過去研究中，聖多美也曾將僅使用氯奎寧，與合併青蒿素 (Artesunate; AS) 兩種瘧疾治療成果進行比較，發現兩組病人在瘧疾治療成功率達統計上顯著，顯示合併 Artesunate 治療的病人效果較好 [21]。目前聖多美也依循世界衛生組織 (WHO) 建議將青蒿素結合療法訂為當地瘧疾輕症的第一線用藥。

4. 流行病學現況

瘧疾的嚴重性使其與愛滋病、肺結核合稱為三大傳染病，根據世界衛生組織 World Malaria Report 2013 公布資訊顯示，瘧疾分布於全球 106 個國家，主要侵襲

非洲大陸地區。隨著大批資源與人力投入瘧疾防治，自西元 2000 年起瘧疾發生率和死亡率都呈現顯著下降的趨勢，但目前仍有 207,000,000 人感染瘧疾，約 627,000 人因此死亡 [22]。根據每個地區流行情形將瘧疾防治劃分為四個階段，包含：控制 (Control) 係指在疾病高盛行率地區，透過防治策略的介入有效降低當地疾病發生率和盛行率；清除前期 (Pre-elimination) 是由控制進入清除的過渡時期；若當地疾病發生率成功降為 0 時，則被稱為進入清除時期 (Elimination)，而直到全球疾病發生率為 0 之時，瘧疾才能真正進入根除時期 (Eradication)，世界衛生組織也明確訂立進入四個階段的評斷標準 [23]，詳情如圖 B 所示 [24, 25]。

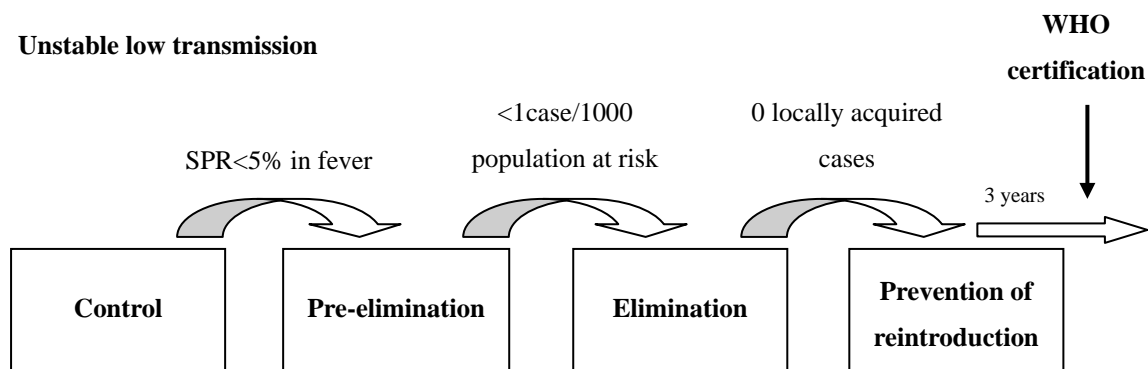



圖 B 瘧疾防治四階段及其標準

Fig. B The malaria - control to elimination continuum.

瘧疾同樣威脅聖多美已久，是當地重要傳染疾病之一，從西元 1997 年一篇橫斷性研究中發現，經由聚合酶鏈式反應 (Polymerase chain reaction; PCR) 檢測當時感染瘧疾比例在聖多美本島和普林西比島分別為 53% 與 35% [26]。而後續研究指出，隨著多方防治措施的介入後，自西元 2003 年起聖多美地區瘧疾發生率、盛行率和死亡率上已逐漸減少 [27, 28]，根據世界衛生組織資料統計，西元 2012 年聖多美有 12,550 人經診斷為瘧疾感染，其盛行率約為 6.7% [22]，但目前仍卻乏實際數據證實當地已順利成為清除前期國家。

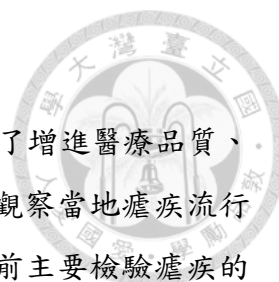
5. 現行防治策略

防治瘧疾可從瘧原蟲存在於蚊子或病人這兩個時期介入，目前針對病媒蚊最常見的防治方法為利用室內殘效噴灑 (Indoor residual spraying; IRS) 和使用浸有殺蟲劑的蚊帳 (Long-lasting insecticidal; LINS 或稱為 Insecticide-treated mosquito



nets; ITNs) 阻斷傳播，而蚊蟲帶原感染指數 (Entomological inoculation rate; EIR) 被認定為目前評估病媒防治成效是否能達到瘧疾根除的重要指標 [29]。秉持治療即是預防的概念，及早進行治療是瘧疾防治的不二法門，除了透過主動與被動監測系統找出潛在病人，在瘧疾盛行率高的地區則針對有類似症狀病人 (Presumptive Treatment) 或孕婦 (Intermittent preventive treatment; IPT) 進行預防性投藥。

自西元 2003 年開始聖多美在台灣的幫助下持續透過室內殘效噴灑進行瘧疾防治 [1]，同時有研究指出，當地居民有使用浸有殺蟲劑的蚊帳的習慣雖然實際比例不如覆蓋率 [28]，而病媒蚊幼蟲時期，則可利用蘇利菌 (*Bacillus thuringiensis israelensis*; *Bti*) 進行生物防治。在瘧疾病例的妥善管理部分，包含主動與被動監測、孕婦預防性投藥及採取青蒿素結合療法等，都是聖多美地區現行的介入措施。



第三節 檢驗策略

有效的檢驗可正確區分瘧疾病人與其他發燒病人的差異，除了增進醫療品質、減少不正確投藥更是降低抗藥性發生的關鍵，檢驗結果在呈現觀察當地瘧疾流行趨勢外，也能提早偵測出低寄生蟲或無症狀的帶原者 [30]。目前主要檢驗瘧疾的方式包含：以光學顯微鏡檢驗 (Light microscopy，以下簡稱鏡檢) 直接觀察瘧原蟲型態與數量、使用快速篩檢 (Rapid Diagnosis Tool; RDT，簡稱快篩) 偵測疑似感染者的血液中是否帶有瘧原蟲抗原蛋白，另外分子生物學檢驗 (簡稱分生檢驗) 則是透過如聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction; PCR) 等實驗室檢驗工具判定是否感染 [31]。

鏡檢至今仍被認定為瘧疾檢驗之準則 (Gold standard)，檢驗人員利用肉眼觀察判定檢體中寄生蟲種類，並依照血液中寄生蟲含量由低到高劃分為 F1 到 F10 共 10 個等級，其標準如表 A 所示。但根據過去多篇研究顯示，鏡檢無法有效的檢驗出低寄生蟲密度或瘧原蟲混合感染的病人 [32]，而分生檢驗雖然較為昂貴，卻可以彌補鏡檢的限制 [33]。隨著一個地區防治逐漸走向清除時期，當地瘧原蟲密度也同時在下降，使用的傳統檢驗方式如：鏡檢可能無法成功偵測到此階段內所有感染病人，這時即需要輔以分生檢驗方式進行檢驗，才能有效正確的瞭解當地流行情形 [34]。

表 A 瘧疾陽性血液檢體等級對照表

Table A Grades for blood specimens with positive malaria results

Grade	Parasitemia	Grade	Parasitemia
F1	1-100/ μ l	F6	1601-3200/ μ l
F2	101-200/ μ l	F7	3201-6400/ μ l
F3	201-400/ μ l	F8	6401-12800/ μ l
F4	401-800/ μ l	F9	12801-25600/ μ l
F5	801-1600/ μ l	F10	>25601/ μ l

聖多美雖然在西元 1997 年即有以 PCR 檢驗的研究評估 [26]，當地仍以鏡檢

做為判定感染瘧疾的依據。隨著瘧疾通報個案數字逐年下降，鏡檢在檢驗敏感度上的限制也同時浮現，利用分生檢驗方式輔佐傳統鏡檢進行瘧疾診斷是否有其需求，是目前聖多美應該正視的議題之一。



第四節 瘧原蟲親緣關係比較

聖多美和臺灣地理環境相似都屬於島嶼型國家，在當地，反覆傳播與境外移入逐漸塑造出聖多美地區瘧原蟲流行株，但只要透過 PCR 檢驗即可分辨不同種類瘧原蟲之差異 [35]。以葉門的研究為例，應用分生實驗結果進行序列分析，在提供瘧疾在當地傳播的相關流行病學資訊外，也能及早瞭解當地基因多樣性幫助監測外來種的侵襲，更可做為偵測抗藥性基因在當地威脅性的指標 [36]。

利用分生檢驗結果與定序進行病原株判定被應用於眾多傳染病之中，經由基因序列分析能對瘧原蟲種別鑑定以及進一步的親緣關係比較，除了增進對當地瘧原蟲種類的瞭解，也能提供推斷病人感染源頭更實質的證據。如英國機場也曾利用此方法，證實當時自東非回國旅客感染瘧疾的 6 名旅客並非群聚感染 [37]。

過去研究中，PCR 多以瘧原蟲裂殖體表面蛋白第一型 (Merozoite surface protein 1; MSP1) 及瘧原蟲裂殖體表面蛋白第二型 (Merozoite surface protein 2; MSP2) 為目標，透過觀察產物大小即可快速判定是否有所差異 [38]，而近年來隨著科技的發展，利用基因序列進行相關分析已成為目前研究的主流方式。

第五節 研究目的

從全球趨勢即可發現瘧疾在流行病學上逐年改變，聖多美在長期防治執行之下也處在邁入瘧疾清除行列之中，但目前仍無研究與完整數據證明當地瘧疾流行情況已得到控制，並符合世界衛生組織之規定。

因此本實驗首先透過蒐集聖多美瘧疾相關資訊分析，再針對鏡檢結果為：瘧疾陽性病人、低寄生蟲血症病人及門診發燒病人等族群進行分生檢驗，比較兩種檢驗工具的結果差異。除了瞭解聖多美瘧疾流行病學現況外，更測試分生檢驗在鏡檢判定不同寄生蟲密度的病人中是否都能找出陽性個案。之後以普林西比島全島篩檢之檢體做為疾病低盛行率區域之代表，選取部分檢體進行實驗室檢驗並與鏡檢結果比較，藉此評估分生檢驗在此條件下成為輔佐檢驗工具的必要性。

聖多美屬於海島型國家，境外移入將會是當地瘧疾防治重大威脅。利用蒐集自聖多美本島、低寄生蟲血症病人與普林西比島全島篩檢之陽性檢體進行分析，利用基因定序的方式進行親緣關係分析，除了瞭解當地主要感染惡性瘧原蟲流行株情形，同時與其他國家瘧原蟲序列比較評估境外移入的可能性。本研究透過分生檢驗增進篩檢靈敏度找出潛在病人、提供流行株資訊外，也希望能為聖多美地區之後即將進入瘧疾清除前期做更適宜的政策規劃與準備。

第二章 材料與方法

第一節 聖多美基礎流行病學分析

1. 資料蒐集

研究整理自西元 2000 年至西元 2013 年共 13 年內聖多美全國與其中各省流行病學資料，其中資料涵蓋每年發燒人數、診斷為感染瘧疾人數，以及診斷與臨床症狀皆符合感染瘧疾的人數。

2. 資料分析

利用 Excel 整理資料並畫出 13 年的人數變化與整體起伏趨勢，根據 WHO 訂立進入根除前期條件，以玻片陽性率 (Slide positive rate; SPR) 計算發燒人口中感染瘧疾之比例。





第二節 聖多美分生檢驗

1. 檢體來源

檢體源自聖多美本島與普林西比島當地居民，包含：西元 2010 年聖多美瘧疾鏡檢陽性病人 (Malaria cases) 28 人；西元 2011 年到 2013 年間，經鏡檢判定為低寄生蟲血症 (Low-density parasitemia patients)，本文定義血液中寄生蟲數量對應等級為 F1 和 F2 之病人，共計 377 人，與西元 2013 年因不明發燒 (Unknown febrile patients) 到醫院門診中心檢查的病人 605 人。此外在西元 2013 年普林西比島當地居民全島篩檢 (Mass screening in Principe) 共 6,855 人中，選取所有鏡檢或快篩陽性檢體與 100 支陰性檢體做為代表 (表 B)。

表 B 聖多美研究蒐集之檢體數量

Table B Numbers of samples which were collected from the DRSTP in this study

	2010	2011	2012	2013	Total
Malaria case					
High-density parasitemia*	24	0	0	0	28
Low-density parasitemia**	4	0	0	0	
Low-density parasitemia patient**	0	71	250	56	377
Unknown febrile patient	0	0	0	605	605
Mass screening in Principe	0	0	0	6,855	6,855
Total	28	71	250	7,516	7,865

*High-density parasitemia (F3~F10)

** Low-density parasitemia (F1~F2)

2. 血片檢體收集與保存

被採檢者在進行傳統採血供鏡檢檢驗外，同時請採檢對象將手指血液滴於扇形濾紙片 (Whatman® #903®) 上所畫圓圈之中，在蒐集好的血片外袋上標示被採檢者的詳細資料與採檢日期，並將相關資料進行電子建檔。而血片以郵寄方式運至臺灣後，暫時儲存於實驗室 4°C 冰箱等待之後血片 DNA 萃取。本研究已通過聖多

美相關衛生部門與臺大醫院倫理委員會審查。



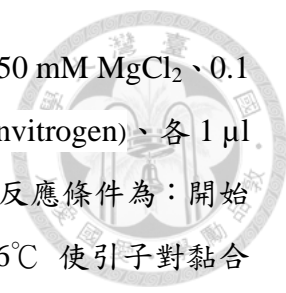
3.血片 DNA 萃取

抽取血片 DNA 時依照採檢登記名單進行編號，利用 Genomic DNA Mini Kit (Geneaid) 進行血片 DNA 萃取。過程依循產品所附實驗流程，首先沿著血片周圍去除多餘濾紙，將裁剪後的血片放入 1.5ml 微量離心管中，加入 500 μ l 的 GT buffer 和 20 μ l 的 Proteinase K，以乾浴槽維持在 60°C 到 70°C 之間加熱約 10 分鐘後進行離心。之後加入 500 μ l 的 GBT buffer 以乾浴槽於 60°C 到 70°C 之間加熱約 15 分鐘後離心，再加入 500 μ l 乙醇 (99%)。組合產品所附 GD Column 與 2 ml 的 Collection Tube，抽取 700 μ l 混合液置入 GD Column 以轉速 11,000 xg 離心 1 分鐘後去除 Collection Tube 中的廢液，重複上述步驟直到混合液離心完畢。在 GD Column 上注入 400 μ l 的 W1 Buffer 以轉速 11,000 xg 離心 1 分鐘後去除 Collection Tube 中的廢液，之後在 GD Column 中加入 600 μ l 的 Wash Buffer 以轉速 11,000 xg 離心 1 分鐘後去除下方 Collection Tube 廢液，再以 11,000 xg 離心 3 分鐘。最後將 GD Column 置於乾淨且標籤完成的 1.5 ml 微量離心管上，加入 80 μ l 已在 60°C 預熱的 Elution Buffer 後靜置 5 分鐘，再以轉速 11,000 xg 離心 3 分鐘，將萃取出 DNA 放入 -20°C 冰箱中等待進一步的實驗分析。

4.巢式聚合酶鏈鎖反應 (Nested polymerase chain reaction; Nested PCR)

萃取出 DNA 檢體將透過 Nested PCR 進行初步檢驗，Nested PCR 可減少過程中非專一的結合進而提高實驗結果的可信度，使用引子對 (Primers Pairs) rPLU5 和 rPLU6 進行第一階段反應增幅，之後依據檢驗目標瘧原蟲種類，如：檢測惡性瘧原蟲感染即會在第二階段利用 rFAL1 和 rFAL2 做為檢驗的引子對，針對間日瘧原蟲、三日瘧原蟲與卵型瘧原蟲則分別使用 rVIV1/2、rMAL1/2、rOVA1/2 三組引子對進行檢驗，詳細序列如表 C 所示 [39]。本研究對四年間所蒐集的檢體均進行惡性瘧原蟲檢測，而普林西比篩檢中，鏡檢或快篩之陽性檢體與 100 支陰性代表檢體，則同時檢驗目前四種最常見的瘧原蟲。

在兩階段的 PCR 中，每管檢體的反應液由 16.9 μ l 的 DEPC 水、0.5 μ l 的 10 mM



dNTP Mix (dNTP Mix, Qiagen)、2.5 μl 的 10 倍 PCR Buffer、1 μl 50 mM MgCl_2 、0.1 μl Taq DNA polymerase (5 U/ μl) (Platinum[®] Taq DNA Polymerase, Invitrogen)、各 1 μl 的 10 mM 引子對，以及 2 μl 的待測檢體組成，總體積為 25 μl 。反應條件為：開始步驟以 95 $^{\circ}\text{C}$ 預熱 5 分鐘，接續以 95 $^{\circ}\text{C}$ 使 DNA 變性 30 秒、56 $^{\circ}\text{C}$ 使引子對黏合 30 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ 持續 60 秒使 DNA 進行延展，上述三步驟重複 35 個循環，最後維持 72 $^{\circ}\text{C}$ 作用 10 分鐘，使反應產物延伸完全，其中引子對 rFAL1/2 在 DNA 變性後以 60 $^{\circ}\text{C}$ 使引子對黏合 30 秒，而反應完成後產物將收藏在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中進行保存。Nested PCR 產物應以洋菜凝膠電泳 (Agarose Gel Electrophoresis; AGE) 觀察其結果，首先以 0.5 倍的 TBE Buffer 配置出 2% 洋菜凝膠，取 5 μl 的反應產物與 1 μl 的 6 倍 Loading Dye (EZ-Vision[®] Three, Amresco) 混合均勻注入凝膠的孔洞 (Well) 中，以 100V 電壓進行跑膠約 40 分鐘，結束後將凝膠片置於紫外燈下觀察與拍照記錄。

5. 定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real time polymerase chain reaction; Q-PCR/real-time PCR)

在 Q-PCR 是利用反應過程中透過螢光染劑偵測與定量檢體內含產物總量。實驗先檢測檢體中 Human β -globin DNA 含量作為內部對照組 (Internal control) 以確保萃取 DNA 濃度與之後目標產物濃度調整依據。使用引子對為 hbg F 和 hbg R，其序列呈現於表 C [40]，每管反應液體積共 20 μl ，內含 6 μl 的 DEPC 水 (Diethylpyrocarbonate treated water)、10 μl qPCR Master Mix (2X) Bio-red icycler[™] (KAPA SYBR[®] FAST qPCR Kit, KAPABIOSYSTEM)、10 mM 引子對各 1 μl 以及 2 μl 的待測檢體。Q-PCR 第一循環以 95 $^{\circ}\text{C}$ 預熱 15 分鐘，第二循環開始以 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒使 DNA 變性、56 $^{\circ}\text{C}$ 使引子對黏合 20 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ 持續 15 秒使 DNA 進行延展，此循環共重複 40 次，第三循環為 95 $^{\circ}\text{C}$ 持續 2 分鐘，第四循環降至 68 $^{\circ}\text{C}$ 2 分鐘後，再以每秒 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 的速度上升至 90 $^{\circ}\text{C}$ 偵測其螢光值推測出熔化趨勢 (Melting curve)，最後將反應完成後產物存放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。根據儀器 MyiQ2 (Bio-rad) 偵測的 CT 值判定是否有成功由檢體萃取出 DNA。

由前置引子 PL1473F18 與反置引子 PL1679R18 檢測檢體，可推斷檢體是否感染瘧原蟲，引子序列呈現於表 C。實驗中反應液體積共 20 μl ，內含 6 μl 的 DEPC

水、10 μ l qPCR Master Mix (2X) Bio-red icycler™ (KAPA SYBR® FAST qPCR Kit, KAPABIOSYSTEM)、10 mM 前置引子、反置引子各 1 μ l 以及 2 μ l 待測檢體。反應第一循環以 95°C 預熱 10 分鐘，第二循環開始以 95°C 10 秒使 DNA 變性、50°C 使引子對黏合 5 秒、72°C 持續 20 秒使 DNA 進行延展，此循環共重複 40 次，第三循環為 95°C 持續 2 分鐘，第四循環降至 68°C 2 分鐘後，再以每秒 0.2°C 的速度上升至 90°C 偵測其螢光值推測出融化趨勢，最後將反應完成的產物存放在 4°C 冰箱中保存。除了由 MyiQ2 (Bio-rad) 儀器顯示之 CT 值推測檢體是否感染瘧原蟲外，結果呈現之 Tm Peak 的位置對應溫度可用以判別檢體感染的瘧原蟲種類 [41]。

表 C 巢式聚合酶鏈鎖反應與定量即時聚合酶鏈鎖反應之引子序列

Table C Primers for nested PCR and Q-PCR

Primer	Sequence(5'→3')	Size (bp)	Ref
Nested PCR			
rPLU5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC	1,200	
rPLU6	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG		
rFAL1	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	205	
rFAL2	ACACAATGCACTCAATCATGACTACCCGTC		
rVIV1	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	120	[39]
rVIV2	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA		
rMAL1	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	144	
rMAL2	AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA		
rOVA1	ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTATTGGAGA	800	
rOVA2	GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG		
Q-PCR			
Hbg F	ACACA ACTGTGTTCACTAGC	110	[40]
Hbg R	CAACTTCATCCACGTTCAACC		
PL1473F18	TAACGAACGAGATCTTAA	206	[41]
PL1679R18	GTCCTCTAAGAAGCTTT		

第三節 瘧原蟲親緣關係比較



1. 檢體來源

從不同鏡檢寄生蟲密度族群中，選取分生實驗結果為惡性瘧陽性之檢體共 81 支，包含：2010 年聖多美本島瘧疾陽性檢體 14 支，其中 10 支為高寄生蟲血症、4 支為低寄生蟲血症病人；自西元 2011 年起蒐集 3 年低寄生蟲血症病人共 45 支；而 2013 年所採檢不名發燒熱病人中，取鏡檢為高寄生蟲血症檢體、鏡檢為陰性但分生檢驗仍偵測到瘧原蟲之檢體各 10 支，以及普林西比全島篩檢中鏡檢陽性檢體 2 支，檢體數量見表 D。研究同時蒐集所分析檢體的性別、年齡及居住地區等相關人口學資訊，供最後結果討論使用。

表 D 聖多美親緣關係分析蒐集之檢體數量

Table D Numbers of samples which were collected from the DRSTP for phylogenetic analysis

	2010	2011	2012	2013	Total
Malaria case					
High-density parasitemia*	10	0	0	0	14
Low-density parasitemia**	4	0	0	0	
Unknown febrile patients					
High-density parasitemia*	0	0	0	10	20
Microscopy negative sample	0	0	0	10	
Low-density parasitemia patient**	0	10	25	10	45
Mass screening in Principe	0	0	0	2	2
Total	14	10	25	32	81

*High-density parasitemia (F3~F10)

** Low-density parasitemia (F1~F2)

2. 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction; PCR)

將保存於-20°C 冰箱的檢體 DNA，利用 PCR 方式檢測惡性瘧原蟲 MSP1 與

MSP2 基因，所使用的引子對序列如表 E 所示 [35]。每管反應液由 16.9 μl 的 DEPC 水、0.5 μl 的 10 mM dNTP Mix (dNTP Mix, Qiagen)、2.5 μl 的 10 倍 PCR Buffer、1 μl 50 mM MgCl_2 、0.1 μl Taq DNA polymerase (5U/ μl) (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen)、各 1 μl 的 10 mM 引子對，以及 2 μl 的待測檢體組成，總體積為 25 μl 。開始步驟以 95°C 預熱 5 分鐘進行反應，接續以 95°C 使 DNA 變性 30 秒、52°C 使引子對黏合 30 秒、72°C 持續 60 秒使 DNA 進行延展，上述三步驟重複 35 個循環，最後維持 72°C 作用 10 分鐘，使反應產物延伸完全，而反應完成後產物將收藏在 4°C 冰箱中進行保存。產物以洋菜凝膠電泳觀察其結果，取 5 μl 的反應產物與 1 μl 的 6 倍 Loading Dye (EZ-Vision® Three, Amresco) 混合均勻注入由 0.5 倍的 TBE Buffer 配置的 2% 洋菜凝膠孔洞中，以 100V 電壓進行跑膠約 40 分鐘，結束後將置於紫外燈下觀察與拍照記錄。

表 E 瘧原蟲裂殖體表面蛋白第一、二型親緣係比較所使用聚合酶鏈鎖反應之引子序列

Table E Primers for PCR of phylogenetic relationship in malaria parasites strain

Primer	Sequence(5'→3')	Size (bp)	Ref
MSP1 5'	GAAGATGCAGTATTGACAGG	200-300	[35]
MSP1 3'	GAGTTCTTTAATAGTGAACAAG		
MSP2 5'	GAGTATAAGGAGAAGTATGG	400-500	
MSP2 3'	CCTGTACCTTTATTCTCTGG		

3. 基因定序

取 10 μl 檢測出為陽性 PCR 產物，與反應中所使用的引子對各 5 μl 委託明欣生物科技有限公司 (MISSION BIOTECH) 進行基因定序。

4. 序列分析

基因定序所得之序列利用軟體 Lasergene (DNASTAR®) 與 BioEdit® 整理後去除引子對，透過 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 中 BLAST

(Basic Local Alignment Search Tool) 功能 [42] 進行物種比對，確定 PCR 產物是否符合預期目標，並從 Gene bank 中搜尋過去研究曾分離出最為相近的物種，下載做為之後親緣分析參考序列。

將所有序列進行對齊整理藉由 BioEdit 中 Clustalw 功能進行 Alignment 序列對齊，接著使用 MEGA 6.0 軟體 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0)，以 Neighbor-joining 統計方式 Bootstrap 運算 1,000 次，建立親緣關係樹 (Phylogenetic tree) 分析聖多美當地惡性瘧原蟲流行株在不同居住地區、性別、年代和鏡檢等級的分布資訊。

第三章 結果

第一節 聖多美基礎流行病學分析

根據台灣駐聖多美瘧疾防治顧問團整理和提供的數據顯示，聖多美發燒病人人數與瘧疾確診個案數在西元 2000 到 2010 年間均有顯著下降的趨勢，但發燒病人個數在 2010 年之後有明顯上升趨勢，瘧疾確診病人數則有些微成長。圖一呈現聖多美全國在 13 年間每年發燒人數、瘧疾確診病人人數與 SPR 值，結果顯示瘧疾疫情在聖多美確實有所減緩，但只有在西元 2007、2008 與 2010 年這三年有達到世界衛生組織 (WHO) 訂立進入瘧疾根除前期標準，即 SPR 值小於 5%，就研究分析所示，目前聖多美全國仍處於準備進入瘧疾清除前期的防治階段。

圖二中呈現聖多美六省份與一自治區，個別發燒、瘧疾確診人數與 SPR 值等資料，結果與聖多美全國趨勢相似。西元 2000 年到 2004 年瘧疾疫情看似微幅上升，但在 2004 年後發燒人數與 SPR 值皆開始下降，大部分省份在 2007 年與 2008 年時 SPR 值都曾將至 5% 以下，但近年來僅有 Lemba 省和 Principe 自治區持續保持。Lemba 省於西元 2007 年時 SPR 值為 4.3%，雖然發燒人數在 2010 年也有略微增加的趨勢，但到 2013 年止 SPR 值仍在穩定下降中。Principe 自治區則是在西元 2006 年時 SPR 值即快速降至 3.9%，雖然在 2009 年略有起伏，但整體而言 SPR 值也是持續下降，在 2013 年其值已小於 1%。表一總結上述資料所示，聖多美當地僅有 Lemba 省和 Principe 自治區目前已達到瘧疾清除前期的標準。



第二節 聖多美分生檢驗

1. 瘧疾陽性病人

西元 2010 年針對聖多美當地鏡檢判定為瘧疾陽性的 28 位病人進行血片濾紙採檢，其中血液中寄生蟲含量包含等級 F2 到 F10，病人主要集中在 F7 到 F10 之間為較高寄生蟲等級，蒐集的檢體僅有 4 人屬於低寄生蟲血症 (F2)。利用 Nested PCR 和 Q-PCR 進行分生檢驗後，不論在高、低寄生蟲血症病人，所有檢體均呈現陽性反應，顯示 Nested PCR 和 Q-PCR 可成功在鏡檢為陽性的檢體之中偵測到瘧原蟲的存在。

2. 低寄生蟲血症病人

本研究自西元 2011 年到 2013 年起蒐集聖多美地區低寄生蟲血症病人血片共 377 片，其中扣除無血片 (n=29)、缺乏性別、年齡、鏡檢結果資訊 (n=2) 或檢體保存不良 (n=3) 等檢體後，最後實際檢驗人數為 343 人。整體低寄生蟲密度為 F2 的檢體隻數 (n=185) 略多於 F1 的檢體 (n=158)。

低寄生蟲血症病人為鏡檢結果為陽性之檢體，與分生檢驗結果比較後，其中有約 24% (83/343) 經 PCR 偵測後呈現陰性反應 (表二)。以年份進行區分，在西元 2011 到 2013 年起，分生檢驗呈陽性的低寄生蟲血症病人在比例上有些微下降趨勢，其值分別為 83.6% (56/67)、73.6% (167/227) 和 75.5% (37/49)，若訂立分生檢驗結果為檢驗標準，則三年平均值後鏡檢的陽性預測值 (Positive predictive value; PPV) 為 75.8% (260/343)。

若以寄生蟲密度等級進行區分，在血液中寄生蟲最低的 F1 等級病人的組別中，分生檢測結果為陽性的比例為 68.3% (108/158)，相較之下鏡檢寄生蟲為 F2 等級的病人 PCR 呈現陽性的人數較多，若訂立分生檢驗結果為檢驗標準，F2 等級的病人在鏡檢陽性預測值則為 87.6% (162/185)。其中，F1 等級病人在西元 2011 年到 2013 年間檢體呈現 PCR 陽性的比例分別為 73.1% (19/26)、60.4% (67/111)、57.1% (12/21)；F2 等級病人則為：90.2% (37/41)、86.2% (100/116) 和 89.3% (25/28)，顯示在血液內寄生蟲密度為 F2 等級這組病人中，顯微鏡判定和分子生物學檢驗結果較為一致。



3. 門診中心發燒病人

分析自西元 2013 年 1 月 29 日至 2 月 06 日間到門診中心就醫的聖多美發燒病人血片，扣除 1 月 29 日當日無性別、年齡、鏡檢結果等資訊之 85 支病人檢體，與 7 位無血片檢體或檢體保存不良的病人檢體，最後實際分析人數為 513 人，結果見表三。經過瘧疾相關檢驗後，判定有 31 人為鏡檢陽性，21 人為快篩陽性，其餘 461 人則被認定沒有受到瘧原蟲感染。而實驗室經由分生檢驗發現，513 名門診中心發燒病人中，有 55 位病人偵測到感染瘧疾，其他 458 人則呈現陰性。

比較 PCR 檢測與過去判定結果，在鏡檢、快篩中呈瘧疾陰性的 461 位病人中仍有 15 人 (3.4%) 可偵測到瘧原蟲基因存在，這 15 位發燒病人代表著瘧原蟲密度極低的族群，實驗印證在分生檢驗在盛行率低的情形下，可更靈敏的偵測到瘧疾潛在病人。而鏡檢陽性組別中有 1 人 (3.2%) 經 PCR 檢測後呈現陰性，而快篩陽性檢體中有只有 10 支 (47.6%) 為 PCR 陽性，其他 11 支檢體則無法偵測到帶有瘧原蟲基因。

此外，單就鏡檢與分生檢驗結果進行比較。當認定分生檢驗結果為檢驗標準，在瘧原蟲感染率極低的情況下鏡檢的敏感度 (Sensitivity) 為 66.6% (30/45)，而特異度約為 99.7% (446/447)；鏡檢陽性預測值、陰性預測值 (Negative predictive value; NPV) 則分別為 96.8% (30/31) 與 96.7% (446/461)。

4. 普林西比自治省全島篩檢

普林西比自治區自西元 2013 年 3 月 6 日起進行 13 天的全島瘧疾篩檢，預計採檢當地共 6,855 位居民血液濾紙片，其中 65 人因作業疏失，尚未採集到血片檢體。普林西比島所搜集檢體的基本人口學資料見表四，當地男女人口數相近，人口中有 17.1% 為 5 歲以下孩童 (N=1116) 和懷孕婦女 (N=56) 屬於瘧疾重點防治族群，在瘧疾防治成效上，普林西比全島居民接受室內殘效噴灑 (IRS) 和擁有浸有殺蟲劑蚊帳 (ITN) 比例分別為 96.6% 及 73.2%，而僅有 76 人 (1.1%) 在前一年曾感染瘧疾。

瘧疾篩檢的檢體中有 7 支經快篩判定為感染瘧疾，其中 2 支透過鏡檢後發現感染惡性瘧原蟲。這 7 人之中，過去 15 天內有旅行史或過去一年曾感染瘧疾各 1

人，每個人都有利用室內殘效噴灑進行疾病防治，其他詳細基本人口學資料如表五所示。


分生檢驗能成功在鏡檢陽性的 2 支檢體中偵測到惡性瘧原蟲的基因，但另外 5 支快篩判定為感染的檢體則呈現陰性反應，圖三為經過 Nested PCR 增幅後產物跑膠結果，同時利用 Nested PCR 檢測其他三種常見瘧原蟲：間日瘧、三日瘧與卵型瘧，在 7 支檢體中結果皆為陰性。此外，本研究也選取出 100 支鏡檢與快篩判定為陰性檢體，同樣經過 Nested PCR 偵測是否有瘧原蟲感染的情形，結果與過去檢驗相同，對於四種瘧原蟲感染檢驗結果均為陰性。

第三節 瘧原蟲親緣關係比較

研究選取西元 2010 至 2013 年間聖多美惡性瘧陽性檢體，依照鏡檢結果可分為：高寄生蟲血症病人 (H)、低寄生蟲血症病人 (L)、鏡檢判定為瘧疾陰性 (N) 三種等級 (Class)。去除 PCR 產物帶有雜訊或濃度太低的檢體後，各成功得到 43 條 MSP1 與 34 條 MSP2 完整清晰的序列。其中在 MSP1 基因在 2010 到 2013 年間分別整理出 12、3、14、14 條序列，而 MSP2 基因在這 4 年間則有 11、2、12、9 條序列。將 PCR 產物跑膠後置於紫外光下可觀察到 MSP1 與 MSP2 兩段基因產物分別在 300-400bp 以及 500-600bp 之間，並非固定大小。圖四與圖五分別呈現待測檢體與陽性、陰性控制組 PCR 產物大小，透過膠圖結果即可看出不同檢體在產物大小上略有差異。

由 NCBI 網頁 Blast 後選取與 PCR 產物最相近序列，以及聖多美鄰近國家惡性瘧原蟲 MSP1、MSP2 序列各 10 條，加入軟體 Mega 與定序所得結果一起繪製親緣關係樹。以 MSP1 基因繪製的親緣關係樹如圖六所示，進一步與他國瘧原蟲序列比較大致分為三大群，主要集中於第三大群 (Group 3) 占聖多美檢體約 44.2% (19/43)，此群可再分為與迦納、坦桑尼亞或馬拉威、印度瘧原蟲序列相近的兩小群；第二群 (Group 2) 中序列數量次之占全部分析檢體的 32.6%，其中包含普林西比鏡檢陽性檢體，主要與宏都拉斯和坦桑尼亞的瘧原蟲 MSP1 基因序列較為接近；而僅 10 條序列屬於第一群 (Group 1) 與印度、坦桑尼亞分離出的瘧原蟲序列相似。

透過親緣關係樹分析比較，發現病人的性別和居住地區並非造成分群的直接原因，但在各群中檢體年份與鏡檢等級分布情形卻有所差異。圖六利用綠色、紫色、藍色與咖啡色區分西元 2010 到 2013 年間檢體採集年分，其他國家參考序列則以粗體標示。第一群中檢體分離自 2012 到 2013 年，同年份採檢之檢體序列又更為相似；第二群則涵蓋研究四年中收得之檢體，但其中 2010 年檢體在序列上較為接近可再細分成小群，普林西比檢體序列則是和 2011、2012 年低寄生蟲血症病人的瘧原蟲序列較為接近。第三大群可再分成兩小群，一群屬於 2012、2013 年間鏡檢為低寄生蟲量和陰性的檢體，另一群則包含大部分 2010 年所得鏡檢為高寄生蟲的檢體。



MSP2 序列分析呈現於圖七，其趨勢與 MSP1 結果相似可大致分為三大群。第一群 (Group 1) 內含 11 條序列與剛果、泰國及印度分離出的瘧原蟲 MSP2 基因序列相近。屬於第二群 (Group 2) 序列占有所有檢體的 41.2% (14/34) 其中包含 1 支普林西比鏡檢陽性檢體，最相近序列分離自與岡比亞、新幾內亞以及奈及利亞。剩餘 8 支檢體屬於第三群 (Group 3) 發現相似序列的國家為泰國、印度和岡比亞。


由親緣關係樹發現，三群中序列在採檢年份和鏡檢等級上略有不同，在性別和居住地區則沒有明顯的趨勢。第一群可分成兩小群討論，一群為 2010、2012 和 2013 年低寄生蟲檢體，對應於 MSP1 基因的第一群，另一群則是以 2010 年陽性檢體為主對應於與 MSP1 第二群。第二群同樣對應到 MSP1 基因的第二群，主要為 2012、2013 年低寄生蟲檢體亦包含普林西比檢體序列；第三群主要由 2010 年聖多美本島瘧疾病人檢體組成，鏡檢等級為屬於高寄生蟲血症，與 MSP1 親緣分析樹第三群相對應，就親緣分析結果而言 MSP1 和 MSP2 基因在分群上趨勢相同。

第四章 討論

藉由深入的病原研究與各式新型藥物防治的開發，人類與瘧疾綿延多年的戰爭在近年來終於看到勝利的可能，從瘧原蟲、瘧蚊、病人多方進行介入，疾病盛行率、死亡率等指標呈現顯著下降的趨勢，從各地區瘧疾清除到最後全世界根除疾病現今看似成為可行的目標。隨著一個地區瘧疾盛行率日益降低即將進入清除前期之時，為達到最後瘧疾清除的標準並保持，不能只依靠過去寄生蟲高密度時期傳統的介入措施。在這個過渡時期，瘧疾流行病學上的改變已形成新的挑戰，其中包含：主要感染的瘧原蟲種類、感染瘧疾的主要族群、移民與境外移入患者所造成的威脅，及無症狀帶原者比例的增加等 [43] 都成為現下最迫切因應的議題，而聖多美處於即將邁入瘧疾清除前期的行列之中，現下全球疾病流行病學上的趨勢，也極有可能會成為當地在未來瘧疾防治的隱憂。

聖多美屬於島國型國家，其地理環境使得瘧疾流行病學面臨的困境和其他大陸型國家略有差異如：印度、緬甸等國家，在與他國相鄰邊界處最容易出現抗藥性或無法正確診斷出帶有瘧原蟲，成為疾病再次傳播的隱憂 [44, 45]。從聖多美蒐集的瘧疾病人分布情形可看見，首都 Agua Grande 不論在發燒病人或瘧疾確診的人數上都較其他省分為高，除了歸因於聖多美大部分國民皆居住於該省份外，Agua Grande 擁有全國唯一的國際機場，自然成為瘧疾境外移入的最佳據點。雖然就全國趨勢看來聖多美近年來尚未達成 $SPR < 5\%$ 的標準，但仍有 Lemba 省和 Principe 自治區已連續七年以上達成目標，Lemba 區位於聖多美本島西南處，省內由山地及森林組成且人口數目少、接觸頻率低，其地理特色使得疾病不易傳播。而 Principe 自治區獨立於本島屬於普林西比島，人口不如大都市繁多，再加上良好的防治策略及資深鏡檢人員，被認為是聖多美地區最有機會進入瘧疾清除時期的地區 [46]。


鏡檢至今仍為檢驗瘧疾的準則，聖多美在過去即有以 PCR 偵測瘧疾在當地疾病流行情況的研究，除了瞭解當時瘧疾盛行率，也證實鏡檢無法有效找出檢驗當地混合瘧原蟲感染的病人 [10]。根據資料顯示，聖多美在西元 1990 年代瘧疾盛行率仍在 50~60% 之間高居不下，且同時觀察到四種常見瘧原蟲的存在 [47]。本研究則利用 Q-PCR 和 Nested PCR 作為疾病診斷依據，藉由 Q-PCR 偵測瘧疾被視為



全球檢驗工具的趨勢。在緬泰邊界、迦納等地都有相關研究證實 Q-PCR 能快速且精準的找出潛在無症狀帶原者的存在 [48, 49]。除了判定是否為瘧疾確診個案，研究指出，Q-PCR 的 Melting curve 可做為判定感染何種瘧原蟲的依據，2013 年 Reller 發表研究中更可同時檢測目前五種可感染人類的瘧原蟲 [50]。此外，Q-PCR 可檢測到 0.1 隻寄生蟲的存在，且同時適用於四種寄生蟲的檢驗中 [51]。

研究中以低寄生蟲血症、門診中心發燒病人分別代表寄生蟲密度低以及瘧疾盛行率低的兩族群進行測試，以分生檢驗結果為檢驗標準時，低寄生蟲血症組中出現分生檢驗無法偵測到的瘧原蟲基因的情形，推測在寄生蟲數量極少之時可能有人為誤判的情形出現。而門診中心就醫的發燒病人組別中，鏡檢敏感度、特異度分別為 66.6% 和 99.7%；陽性、陰性預測值皆約 96%，與 Lee 等人在相同假設下所得實驗結果相似，其鏡檢敏感度 72%、特異度為 98%；陽性、陰性預測值則分別為約 98% 與 78% [52]。以上資料均顯示出對盛行率極低的地區如：聖多美的瘧疾檢驗而言，鏡檢可能無法成功偵測到所有感染瘧疾病人，仍需要輔以分生實驗針對疑似病人進行檢測。而檢測 2013 年普林西比島自治區篩檢之檢體，代表在已知分生檢驗靈敏度與特異度較高的情況下，將分生檢驗的技術實際應用於符合瘧疾清除前期標準的地區。結果發現普林西比島的分生檢驗初步結果與鏡檢一致，但同時看到快篩判定結果不論在門診中心病人或普林西島篩檢中，都與分生檢驗有著顯著差異，可能源於快篩檢測主要偵測血液中抗原-瘧原蟲蛋白質，部分快篩陽性檢體結合體內尚未完全清除的蛋白質碎片，因此推斷在聖多美當地快篩是無法做為良好的診斷依據。

觀察到分生檢驗結果在不同族群中的差異，本研究試圖瞭解瘧原蟲流行株與瘧原蟲的密度、盛行率是否相關。利用 PCR 偵測瘧原蟲表面蛋白基因，即可從產物大小粗略觀察到聖多美非單一株惡性瘧原蟲流行，研究結果與發表於 2014 年針對泰國瘧原蟲裂殖體表面蛋白第一、二型基因進行演化上所得分析結果類似 [53]，但由於本研究目前所蒐集時間僅包含聖多美當地 4 年檢體，無法看出表面蛋白在時間上的明顯變化。透過親緣關係分析發現，流行於聖多美的惡性瘧原蟲大致可分為三大群，瘧原蟲流行株源自於不同三種地區可能是最主要的分群原因。而目前針對 MSP1 和 MSP2 基因研究多集中於不同 Allelic type 討論，在 MSP1 最常見有 Mad20、K1 和 Ro33；而在 MSP2 基因則為 FC27 與 3D7 兩種，研究顯示不同的




Allelic type 組合下造成其結果產物的大小差異，且影響當地整體惡性瘧原蟲的基因多樣性 [54, 55]。且根據 Hamid 等人在蘇丹的研究更指出，感染寄生蟲密度與 MSP 的 Allelic 數量呈現顯著相關 [56]，這也是本研究未來可深入討論的重要方向。

透過資料的蒐集以及分生檢驗的幫助，研究成功對於聖多美分子流行病學有進一步的了解，隨著當地即將進入瘧疾清除前期，在寄生蟲盛行率極低的時期，無症狀病人成為此階段疾病傳播的最大的威脅 [57]。研究證實分生檢驗能彌補鏡檢的限制，檢測出更多可能的帶原者或誤診的可能。此外透過 PCR 與基因定序，可了解當地瘧原蟲流行株趨勢，提早監測到瘧疾境外移入的出現。過去亦有多篇利用分生方式檢驗聖多美瘧原蟲抗藥性的研究 [58, 59]，而針對當地第一線治療藥物 ACT 的相關研究只限於 2007 年時實驗室中模擬 [60]，這都是未來聖多美當地分子流行病學研究的方向，藉由相關資訊增進對當地現況的瞭解，才能更快速有效的幫助聖多美邁入瘧疾清除時期。

參考文獻




1. Tseng LF, Chang WC, Ferreira MC, Wu CH, Rampao HS, Lien JC: **Rapid control of malaria by means of indoor residual spraying of alphacypermethrin in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**:248-250.
2. Hempelmann E, Krafts K: **Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria.** *Malar J* 2013, **12**:232.
3. Cox FE: **History of the discovery of the malaria parasites and their vectors.** *Parasit Vectors* 2010, **3**:5.
4. Garcia LS: **Malaria.** *Clin Lab Med* 2010, **30**:93-129.
5. Aikawa M, Iseki M, Barnwell JW, Taylor D, Oo MM, Howard RJ: **The pathology of human cerebral malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 1990, **43**:30-37.
6. Martinez-Salazar E, Tobon-Castano A, Blair S: **Natural *Plasmodium knowlesi* malaria infections in humans.** *Biomedica* 2012, **32 Suppl 1**:121-130.
7. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H: **Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand.** *Emerg Infect Dis* 2004, **10**:2211-2213.
8. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ: **A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings.** *Lancet* 2004, **363**:1017-1024.
9. Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM: **First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*.** *Malar J* 2014, **13**:68.
10. Pinto J, Sousa CA, Gil V, Goncalves L, Lopes D, do Rosario VE, Charlwood JD: **Mixed-species malaria infections in the human population of Sao Tome island, west Africa.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, **94**:256-257.

- 
11. CDC: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>.
12. Cruz I, Mody V, Callender C, Hosten A: **Malaria infection in transplant recipient.** *J Natl Med Assoc* 1978, **70**:105-107.
13. Richet, Griffin WB: **The treatment of malaria and malaria coma by intravenous injection of quinine urethane.** *Br Med J* 1917, **1**:190-191.
14. Baird JK: **Effectiveness of antimalarial drugs.** *N Engl J Med* 2005, **352**:1565-1577.
15. Delves M, Plouffe D, Scheurer C, Meister S, Wittlin S, Winzeler EA, Sinden RE, Leroy D: **The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites.** *PLoS Med* 2012, **9**:e1001169.
16. Qinghaosu Antimalaria Coordinating Research group: **Antimalaria studies on Qinghaosu.** *Chin Med J (Engl)* 1979, **92**:811-816.
17. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N: **Artesunate versus quinine for treatment of severe *falciparum* malaria: a randomised trial.** *Lancet* 2005, **366**:717-725.
18. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, Bojang K, Olaosebikan R, Anunobi N, Maitland K, et al: **Artesunate versus quinine in the treatment of severe *falciparum* malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial.** *Lancet* 2010, **376**:1647-1657.
19. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR: **Epidemiology of drug-resistant malaria.** *Lancet Infect Dis* 2002, **2**:209-218.
20. White N: **Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999, **354**:739-749.
21. Gil VS, Ferreira MC, d'Alva FS, d'Abreu JA, Will IM, Gomes ML, Castelli F, Taylor WR, Olliaro P, D'Alessandro U: **Efficacy of artesunate plus chloroquine for uncomplicated malaria in children in Sao Tome and**



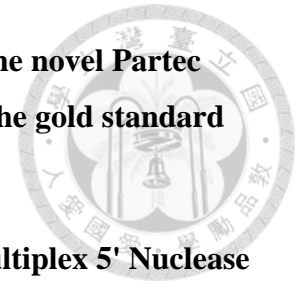
- Principe: a double-blind, randomized, controlled trial.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003, **97**:703-706.
22. WHO: **World Malaria Report.** 2013.
 23. Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, Collins F, Doumbo OK, Greenwood B, Hall BF, Levine MM, et al: **A research agenda to underpin malaria eradication.** *PLoS Med* 2011, **8**:e1000406.
 24. Mendis K, Rietveld A, Warsame M, Bosman A, Greenwood B, Wernsdorfer WH: **From malaria control to eradication: The WHO perspective.** *Trop Med Int Health* 2009, **14**:802-809.
 25. Breeveld FJ, Vreden SG, Grobusch MP: **History of malaria research and its contribution to the malaria control success in Suriname: a review.** *Malar J* 2012, **11**:95.
 26. Pinto J, Sousa CA, Gil V, Ferreira C, Goncalves L, Lopes D, Petrarca V, Charlwood JD, do Rosario VE: **Malaria in Sao Tome and Principe: parasite prevalences and vector densities.** *Acta Trop* 2000, **76**:185-193.
 27. Lee PW, Liu CT, do Rosario VE, de Sousa B, Rampao HS, Shaio MF: **Potential threat of malaria epidemics in a low transmission area, as exemplified by Sao Tome and Principe.** *Malar J* 2010, **9**:264.
 28. Lee PW, Liu CT, Rampao HS, do Rosario VE, Shaio MF: **Pre-elimination of malaria on the island of Principe.** *Malar J* 2010, **9**:26.
 29. Ulrich JN, Naranjo DP, Alimi TO, Muller GC, Beier JC: **How much vector control is needed to achieve malaria elimination?** *Trends Parasitol* 2013, **29**:104-109.
 30. Aidoo M: **Factoring quality laboratory diagnosis into the malaria control agenda for sub-saharan Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2013, **89**:403-406.
 31. Moody A: **Rapid diagnostic tests for malaria parasites.** *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**:66-78.

- 
32. Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK: **Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by conventional microscopy.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992, **86**:609-612.
33. Gunasekera WMdAW, Abeyasinghe RR, Premawansa S, Fernando SD: **Usefulness of polymerase chain reaction to supplement field microscopy in a pre-selected population with a high probability of malaria infections.** *Am J Trop Med Hyg* 2011, **85**:6-11.
34. The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics: **A research agenda for malaria eradication: diagnoses and diagnostics.** *PLoS Med* 2011, **8**:e1000396.
35. Wooden J, Kyes S, Sibley CH: **PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*.** *Parasitol Today* 1993, **9**:303-305.
36. Al-Hamidhi S, Mahdy MA, Al-Hashami Z, Al-Farsi H, Al-Mekhlafi AM, Idris MA, Beja-Pereira A, Babiker HA: **Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and distribution of drug resistance haplotypes in Yemen.** *Malar J* 2013, **12**:244.
37. Rodger AJ, Cooke GS, Ord R, Sutherland CJ, Pasvol G: **Cluster of *falciparum* malaria cases in UK airport.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:1284-1286.
38. Zhong D, Afrane Y, Githeko A, Yang Z, Cui L, Menge DM, Temu EA, Yan G: ***Plasmodium falciparum* genetic diversity in western Kenya highlands.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **77**:1043-1050.
39. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN: **High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction.** *Mol Biochem Parasitol* 1993, **61**:315-320.
40. Israelsson E, Vafa M, Maiga B, Lysen A, Iriemenam NC, Dolo A, Doumbo OK, Troye-Blomberg M, Berzins K: **Differences in Fcγ receptor IIa**

genotypes and IgG subclass pattern of anti-malarial antibodies between sympatric ethnic groups in Mali. *Malar J* 2008, 7:175.


41. Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB, Jr., Peterson LR, Kaul KL: **Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:2435-2440.
42. NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
43. Cotter C, Sturrock HJ, Hsiang MS, Liu J, Phillips AA, Hwang J, Gueye CS, Fullman N, Gosling RD, Feachem RG: **The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges.** *Lancet* 2013, **382**:900-911.
44. Mohapatra PK, Prakash A, Taison K, Negmu K, Gohain AC, Namchom NS, Wange D, Bhattacharyya DR, Goswami BK, Borgohain BK, Mahanta J: **Evaluation of chloroquine (CQ) and sulphadoxine/pyrimethamine (SP) therapy in uncomplicated *falciparum* malaria in Indo-Myanmar border areas.** *Trop Med Int Health* 2005, **10**:478-483.
45. Zhou X, Huang JL, Njuabe MT, Li SG, Chen JH, Zhou XN: **A molecular survey of febrile cases in malaria-endemic areas along China-Myanmar border in Yunnan province, People's Republic of China.** *Parasite* 2014, **21**:27.
46. Hagmann R, Charlwood JD, Gil V, Ferreira C, do Rosario V, Smith TA: **Malaria and its possible control on the island of Principe.** *Malar J* 2003, **2**:15.
47. Snounou G, Pinheiro L, Antunes AM, Ferreira C, do Rosario VE: **Non-immune patients in the Democratic Republic of Sao Tome e Principe reveal a high level of transmission of *P. ovale* and *P. vivax* despite low frequency in immune patients.** *Acta Trop* 1998, **70**:197-203.
48. McKenzie FE, Sirichaisinthop J, Miller RS, Gasser RA, Jr., Wongsrichanalai C: **Dependence of malaria detection and species diagnosis by microscopy on parasite density.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **69**:372-376.
49. Nkrumah B, Agyekum A, Acquah SE, May J, Tannich E, Brattig N, Nguah SB,

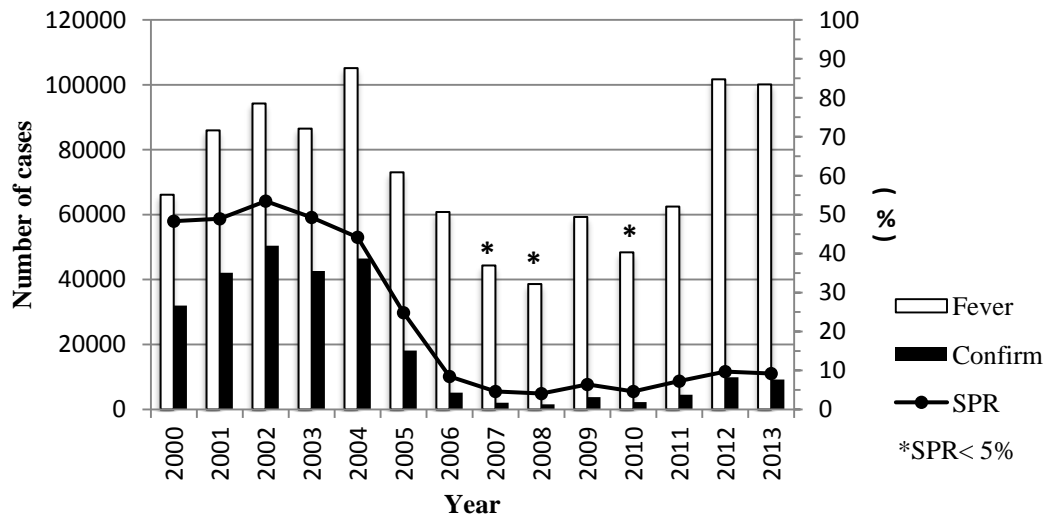
von Thien H, Adu-Sarkodie Y, Huenger F: **Comparison of the novel Partec rapid malaria test to the conventional Giemsa stain and the gold standard real-time PCR.** *J Clin Microbiol* 2010, **48**:2925-2928.



50. Reller ME, Chen WH, Dalton J, Lichay MA, Dumler JS: **Multiplex 5' Nuclease Quantitative Real-Time PCR for Clinical Diagnosis of Malaria and Species-Level Identification and Epidemiologic Evaluation of Malaria-Causing Parasites, Including *Plasmodium knowlesi*.** *J Clin Microbiol* 2013, **51**:2931-2938.
51. Lee MA, Tan CH, Aw LT, Tang CS, Singh M, Lee SH, Chia HP, Yap EP: **Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:4343-4345.
52. Lee PW, Ji DD, Liu CT, Rampao HS, do Rosario VE, Lin IF, Shaio MF: **Application of loop-mediated isothermal amplification for malaria diagnosis during a follow-up study in Sao Tome.** *Malar J* 2012, **11**:408.
53. Kuesap J, Chaijaroenkul W, Ketprathum K, Tattiyapong P, Na-Bangchang K: **Evolution of genetic polymorphisms of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein (PfMSP) in Thailand.** *Korean J Parasitol* 2014, **52**:105-109.
54. Ogouyemi-Hounto A, Gazard DK, Ndam N, Topanou E, Garba O, Elegbe P, Hountohotegbe T, Massougbdji A: **Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* isolates from children in South of Benin.** *Parasite* 2013, **20**:37.
55. Atroosh WM, Al-Mekhlafi HM, Mahdy MA, Saif-Ali R, Al-Mekhlafi AM, Surin J: **Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates from Pahang, Malaysia based on MSP-1 and MSP-2 genes.** *Parasit Vectors* 2011, **4**:233.
56. Hamid MM, Mohammed SB, El Hassan IM: **Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* field isolates in central Sudan inferred by PCR genotyping of merozoite surface protein 1 and 2.** *N Am J Med Sci* 2013, **5**:95-101.
57. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L: **The silent**

threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013, **11**:623-639.

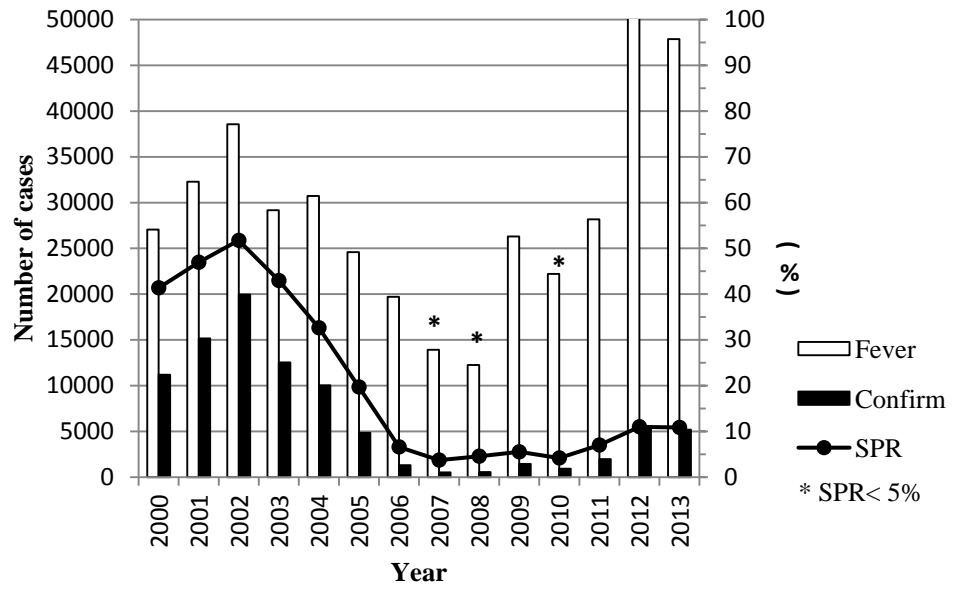
- 
58. Cravo P, Figueiredo S, Nogueira F, Lopes D, Ferreira ID, Ferreira C, Gil JP, do Rosario VE: **High frequency of the genetic polymorphisms associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance, among *Plasmodium falciparum* isolates from Sao Tome and Principe, West Africa.** *Ann Trop Med Parasitol* 2004, **98**:293-296.
59. Lopes D, Nogueira F, Gil JP, Ferreira C, do Rosario VE, Cravo P: **pfprt and pfmdr1 mutations and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from Sao Tome and Principe, West Africa.** *Ann Trop Med Parasitol* 2002, **96**:831-834.
60. Ferreira ID, Lopes D, Martinelli A, Ferreira C, do Rosario VE, Cravo P: **In vitro assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from Sao Tome and Principe.** *Trop Med Int Health* 2007, **12**:353-362.



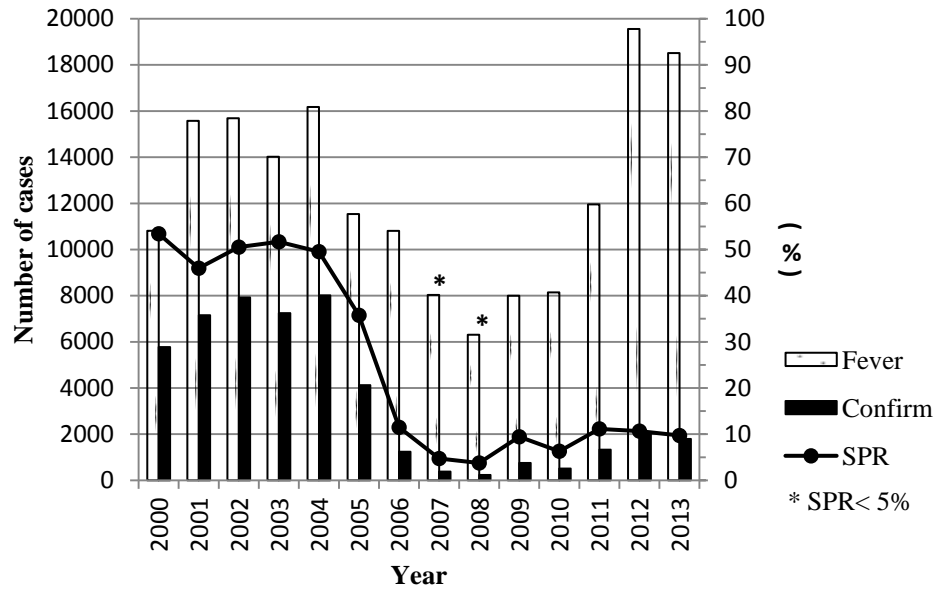
圖一 西元 2000~2013 年間聖多美普林西比民主共和國全國發燒人數、瘧疾確診個案人數與玻片陽性率。

Fig. 1 Malaria epidemiology in the DRSTP during 2000 to 2013. The figure presents the number of fever cases, malaria confirmed patients, and slide positive rate (SPR) in the DRSTP during the period between 2000 and 2013.

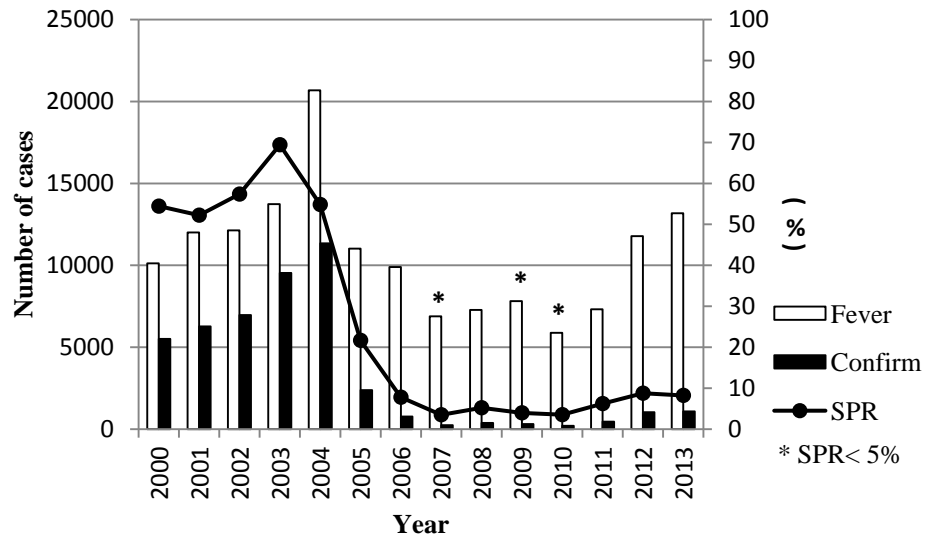
Agua Grande



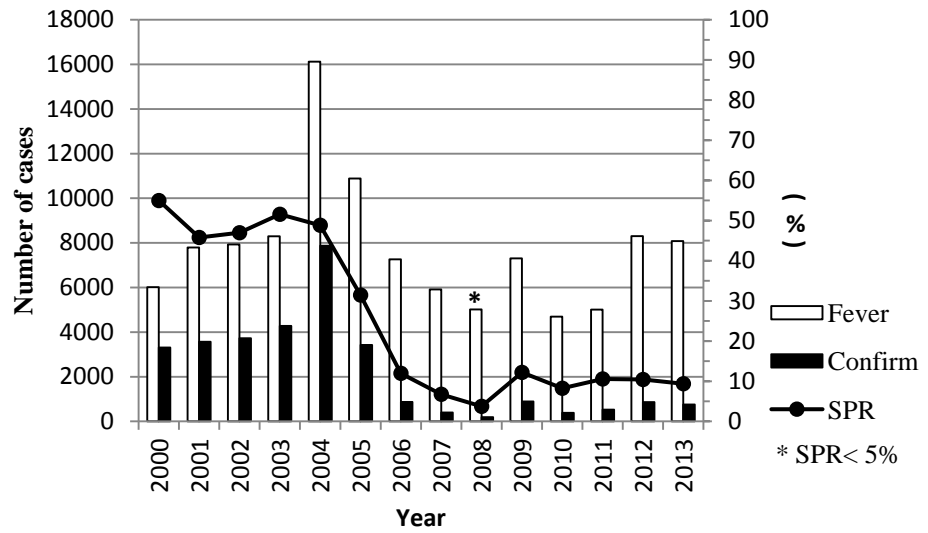
Me-Zochi



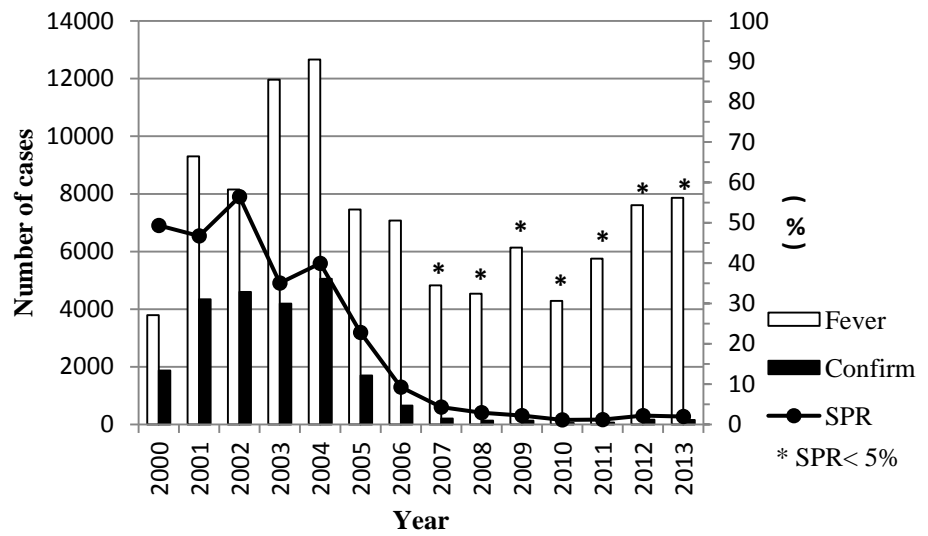
Lobata



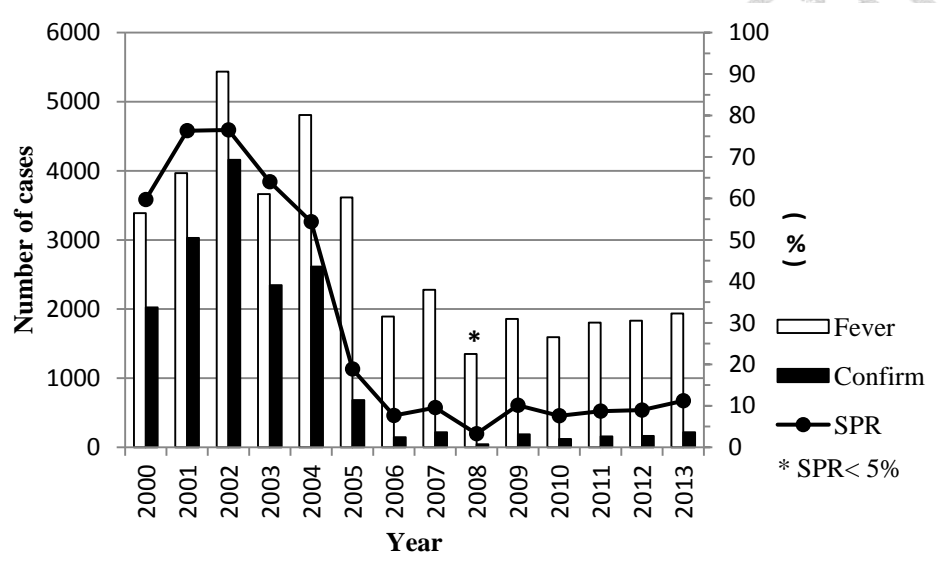
Cantagalo



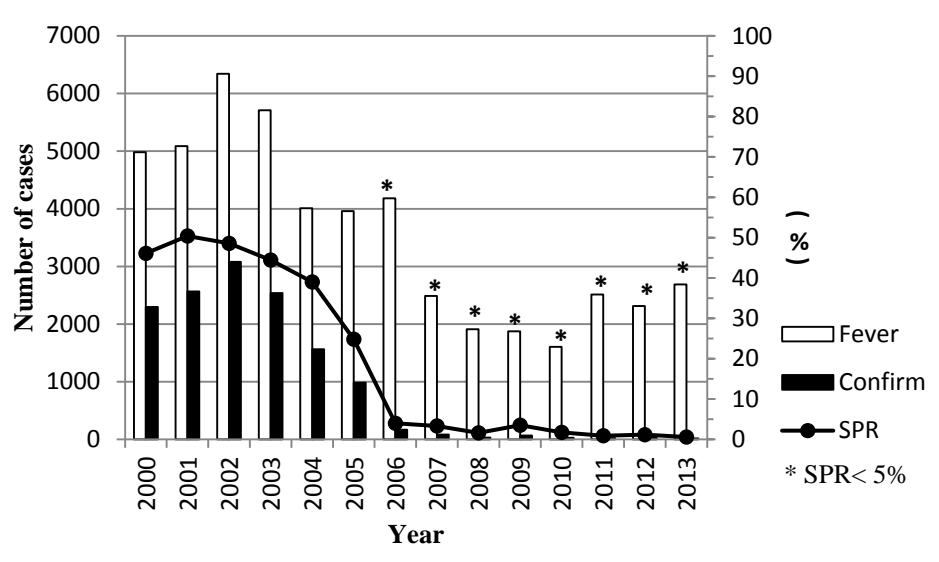
Lemba



Caue

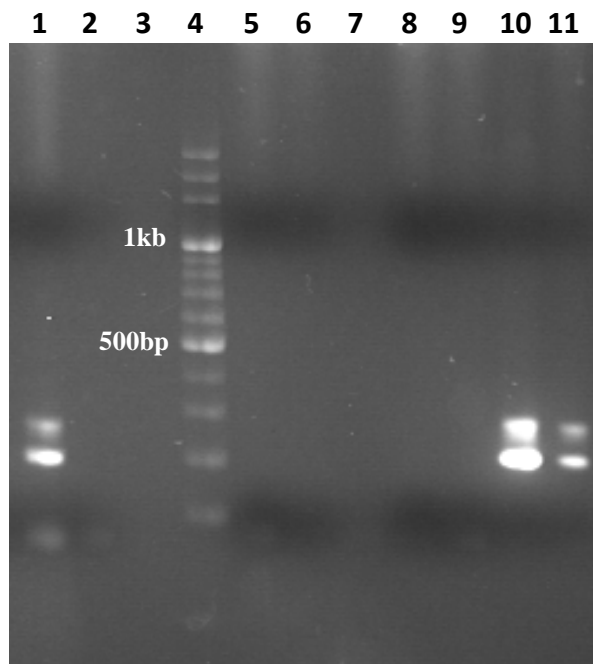


Principe



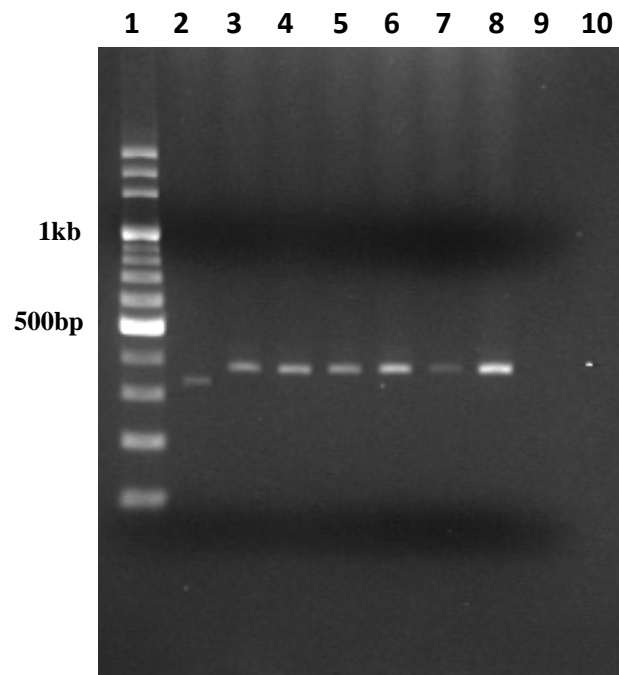
圖二 西元 2000~2013 年間聖多美普林西比民主共和國各區發燒人數、瘧疾確診個案人數與玻片陽性率。

Fig. 2 Malaria epidemiology in the 7 districts of the DRSTP during 2000 to 2013.
 The figure presents the number of fever cases, malaria confirmed patients, and slide positive rate (SPR) in the 7 districts of the DRSTP during the period between 2000 and 2013.



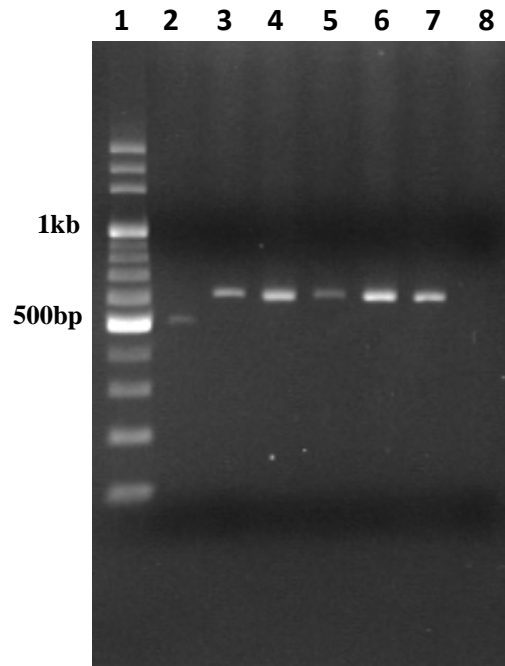
圖三 以巢式聚合酶鏈鎖反應檢驗普林西比全島鏡檢陽性及快篩陽性檢體惡性瘧原蟲 18S rRNA 基因。

Fig. 3 Detection of 18S rRNA gene of *P. falciparum* by nested PCR in malaria positive patients in the mass screening in Principe. Samples diagnosed as positive of malaria infection by RDT (lane 5-9) and light microscopy (lane 10-11) were analyzed by nested PCR with primers targeting 18S rRNA of *P. falciparum*. Lane 1: positive control; lane 2: negative control; lane 4: 100bp DNA ladder and lane 3: blank.



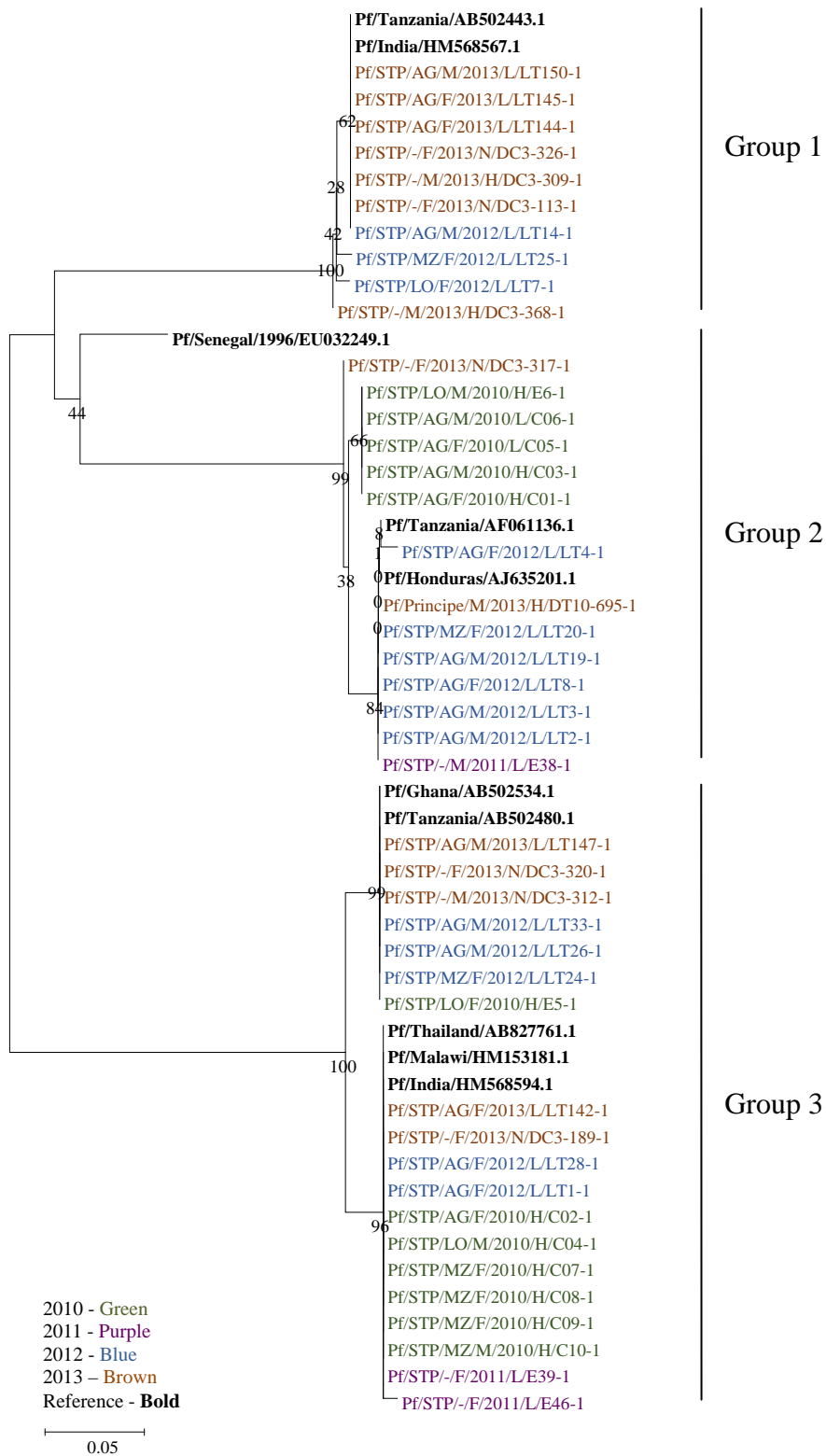
圖四 以聚合酶鏈鎖反應增幅聖多美普林西比民主共和國瘧疾陽性檢體之瘧原蟲裂殖體表面蛋白第一型基因。

Fig. 4 Amplification of MSP1 gene of *P. falciparum* from malaria-confirmed samples in the DRSTP by PCR. Lane1: 100bp DNA ladder; Lane 2-7: malaria-confirmed samples in the DRSTP; lane 8: positive control; lane 9: negative control and lane 10: blank.



圖五 以聚合酶鏈鎖反應增幅聖多美普林西比民主共和國瘧疾陽性檢體之瘧原蟲裂殖體表面蛋白第二型基因。

Fig. 5 Amplification of MSP2 gene of *P. falciparum* from malaria-confirmed samples in the DRSTP by PCR. Lane1: 100bp DNA ladder; Lane 2-6: malaria-confirmed samples in the DRSTP; lane 7: positive control and lane 8: negative control.



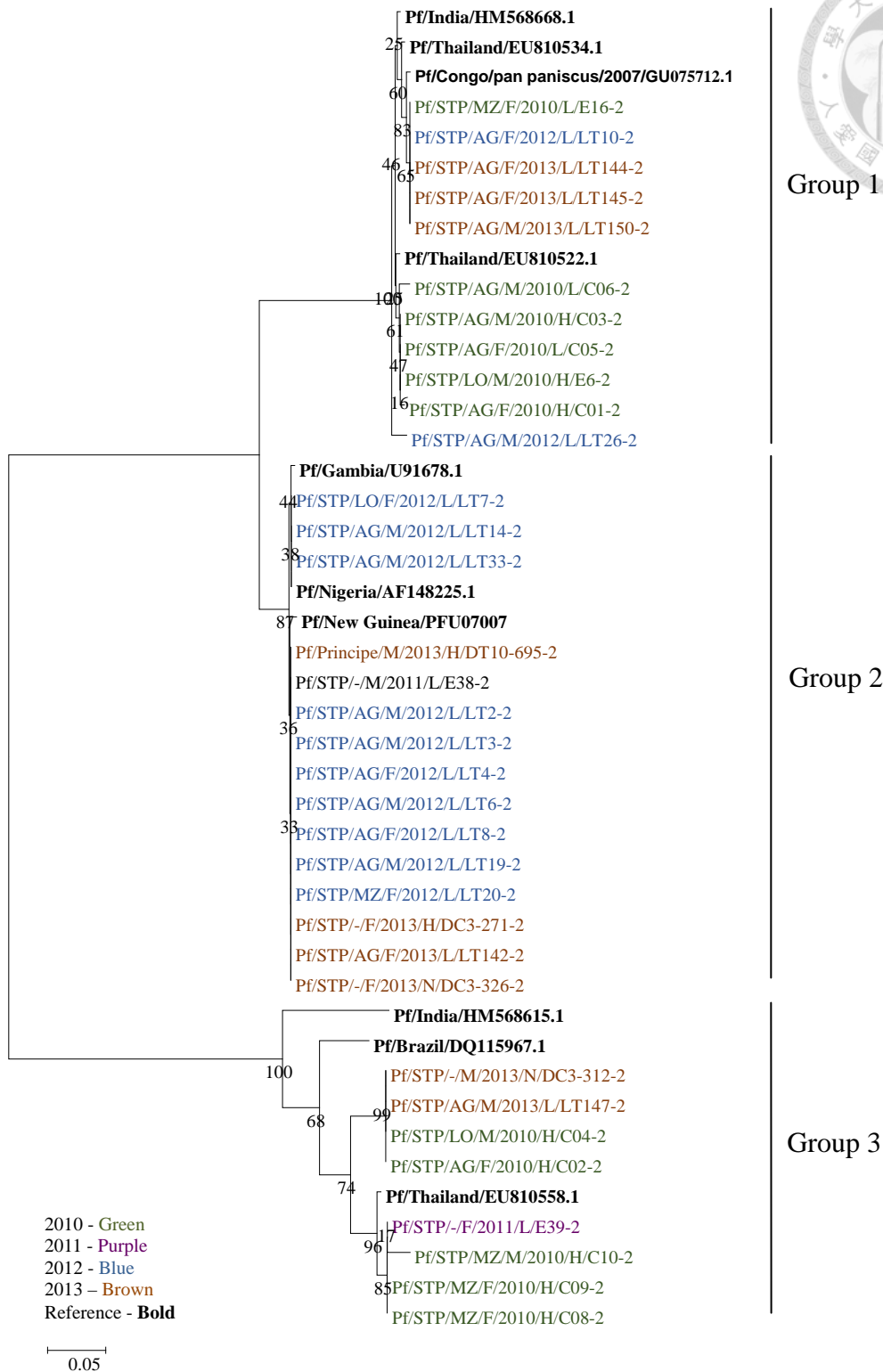
Group 1

Group 2

Group 3

圖六 聖多美惡性瘧瘧原蟲裂殖體表面蛋白第一型基因之親緣關係樹型圖。

Fig. 6 Phylogenetic tree of MSP1 gene of *P. falciparum* circulating in the DRSTP. The phylogenetic tree was constructed using Neighbor-joining method. Sequences are denoted by *P. falciparum* /Country/Districts/Sex/ Year of sample collection /Class/Code.



圖七 聖多美惡性瘧瘧原蟲裂殖體表面蛋白第二型基因之親緣關係樹型圖。

Fig. 7 Phylogenetic tree of MSP2 gene of *P. falciparum* circulating in the DRSTP.

The phylogenetic tree was constructed using Neighbor-joining method. Sequences are denoted by *P. falciparum* /Country/Districts/Sex/Year of sample collection/Class/Code.



表一 聖多美普林西比民主共和國各行政區於西元 2000 年到 2013 年間達到世界衛生組織清除前期標準(SPR 值小於 5%)之情形

Table 1 The areas met WHO criteria of pre-elimination stage (SPR <5%) in the DRSTP Since 2000 to 2013

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Agua Grande								*	*		*			
Me-Zochi								*	*					
Cantagalo									*					
Caue									*					
Lemba								*	*	*	*	*	*	*
Lobata								*		*	*			
Principe							*	*	*	*	*	*	*	*
DRSTP								*	*		*			

*SPR<0.05

表二 比較西元 2011 年到 2013 年間聖多美普林西比民主共和國低寄生蟲血症病人分生檢驗與鏡檢結果

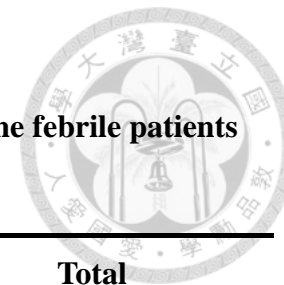
Table 2 Malaria infection detected by molecular diagnosis and light microscopy in the patients with low-density parasitemia (F1 and F2) in the DRSTP during 2011 to 2013



	2011			2012			2013			Total (%)
	F1	F2	Total (%)	F1	F2	Total (%)	F1	F2	Total (%)	
PCR (+)	19	37	56 (83.6)	67	100	167(73.6)	12	25	37 (75.5)	260 (75.8)
PCR (-)	7	4	11 (16.4)	44	16	60 (26.4)	9	3	12 (24.5)	83 (24.2)
Total	26	41	67	111	116	227	21	28	49	343

表三 比較西元 2011 年到 2013 年間聖多美普林西比民主共和國門診中心發燒病人分生檢驗與鏡檢結果

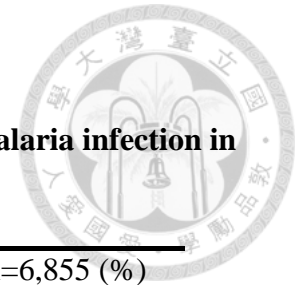
Table 3 Comparison of the results of malaria infection detected by molecular diagnosis and light microscopy in the febrile patients in the DRSTP during 2011 to 2013



	Microscopy (+)	RDT(+)	Negative	Total
PCR (+)	30	10	15	55
PCR (-)	1	11	446	458
Total	31	21	461	513

表四 普林西比島全島篩檢之基礎人口學資料

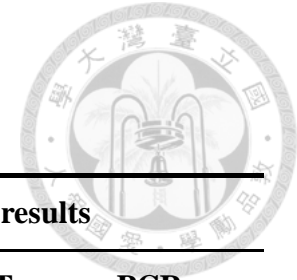
Table 4 Demographic description of mass active screening for malaria infection in Principe from March 6 to 21 in 2013



Total n=6,855 (%)	
National Population Census	
Total	7,542 (100.0)
Female	3,650 (48.4)
Male	3,892 (51.6)
Mass active screening	
Total	6,855 (100.0)
Female	3,491 (50.9)
Male	3,364 (49.1)
Age (years)	
<5	1,116(16.3)
≥5	5,674(82.8)
pregnancy	56 (0.8)
Missing	9 (0.1)
Indoor residual spraying (IRS)	
Yes	6624 (96.6)
No	221 (3.2)
Missing	10 (0.1)
Own an Insecticide treated net (ITN)	
Yes	5,020 (73.2)
No	1,825 (26.6)
Missing	10 (0.1)
Travel to Sao Tome	
Yes	233 (3.4)
No	6612 (96.5)
Missing	10 (0.1)
Infected by malaria in 2012	
Yes	76 (1.1)
No	6769 (98.7)
Missing	10 (0.1)

表五 普林西比全島篩檢陽性檢體基礎人口學資料

Table 5 Demographic information of malaria-positive patients identified in the mass screening in Principe



Code	Sex	Age	Travel history ¹	Malaria history ²	INT	IRS	Treatment ³	Diagnose results		
								Slide	RDT	PCR
DT1-078	M	9	No	No	No	Yes	Ar+Am	-	+	-
DT1-155	F	13	No	No	No	Yes	Ar+Am	-	+	-
DT7-774	F	54	Yes	No	Yes	Yes	Ar+Am	-	+	-
DT8-556	F	30	No	No	Yes	Yes	Ar+Am	-	+	-
DT8-599	F	58	No	No	Yes	Yes	Ar+Am	-	+	-
DT10-695	M	15	No	Yes	No	Yes	Ar+Am	<i>P. falciparum</i>	+	<i>P. falciparum</i>
DT12-004	M	21	No	No	No	Yes	Ar+Am	<i>P. falciparum</i>	+	<i>P. falciparum</i>

¹ With travel history in past 15 day

² With malaria history in past year

³ Ar+Am = Amodiaquine- artesuna