

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 10030—2025

疟原虫检测 虫种核酸鉴定法

Detection of *Plasmodium* spp.—Nucleic Acid Identification of the Species

2025-10-31 发布

2026-03-01 实施

国家疾病预防控制局 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由国家疾病预防控制标准委员会寄生虫病标准专业委员会提出，国家疾病预防控制局归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所（国家热带病研究中心）、江苏省寄生虫病防治研究所、安徽省疾病预防控制中心、首都医科大学附属北京友谊医院、解放军总医院第五医学中心。

本文件主要起草人：肖宁、夏志贵、李美、曹俊、李卫东、邹洋、黄磊、燕贺、张滔、郑彬。

疟原虫检测 虫种核酸鉴定法

1 范围

本文件规定了检测 5 种感染人体疟原虫的虫种核酸鉴定法。
本文件适用于各级疾病预防控制机构和医疗机构。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

WS/T 569 疟原虫检测 血涂片镜检法

WS/T 661 静脉血液标本采集指南

WS/T 400 血液运输要求

GB/T 35342 松材线虫分子检测鉴定技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人体疟原虫 *Plasmodium spp.*

寄生在人体并可人群间传播流行的疟原虫，共有 4 种：恶性疟原虫（*P. falciparum*）、间日疟原虫（*P. vivax*）、三日疟原虫（*P. malariae*）及卵形疟原虫（*P. ovale*）。具体可参见 WS/T 569。

3.2

诺氏疟原虫 *Plasmodium knowlesi*

能引起人感染疟疾的第五种病原体，可以灵长类动物猴与人为宿主（见附录 A）。

3.3

核酸检测技术相关术语和定义

包括但不限于引物（Primer）、聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction; PCR）、反应体系（Reaction volumes）、反应程序（Reaction procedure）、特征条带（Characterized band）、阳性对照（Positive control）、阴性对照（Negative control）、结果判读（Results judgement）参见 GB/T 35342。

3.4

实时荧光定量 PCR (Quantitative real time PCR; qPCR)

在 DNA 扩增反应中，以荧光染料检测每次 PCR 循环后产物总量的技术。

3.5

循环数阈值 cycle threshold; Ct

每个荧光定量聚合酶链式反应（定量 PCR）管内荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。

注：PCR 反应体系中目标脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid; DNA）起始拷贝数的对数与其 Ct 值存在线性关系，起始拷贝数越大，Ct 值越小，反之亦然。

3.6

溶解温度 melting temperature; Tm

总的DNA双螺旋结构降解一半时的温度。

注：染料法实时荧光 PCR 扩增完成后，需通过逐渐增加温度，监测每一步的荧光信号产生熔解曲线(Melting curve)，熔解曲线分析可用来确定不同的反应产物，不同序列的 DNA， T_m 值不同。

4 仪器设备

4.1 离心机

最大相对离心力 12 000g。

4.2 漩涡仪

无级调速范围为 200 r/min~3 000 r/min。

4.3 PCR 扩增仪

4.3.1 常规 PCR 扩增仪

温度范围 4℃~99℃，温度精确为 0.1℃，热盖为 105℃。

4.3.2 荧光定量 PCR 仪

温度范围 4℃~99℃，温度精确为 0.1℃，热盖为 105℃，具有核酸荧光染料的荧光滤光片。

4.4 核酸电泳仪

电压 5 V~5 000 V，电流 1 mA~500 mA。

4.5 凝胶成像系统（镜头分辨率(H×V)为 1 360×1 024，光源为透射 UV）。

5 试剂或材料

5.1 分子生物学试剂

DNA 聚合酶、核酸提取试剂、PCR 扩增试剂、实时荧光 PCR 扩增试剂、DNA 分子质量指示物(DNA Marker)。

5.2 化学试剂

Tris-乙酸电泳缓冲液(TAE)、琼脂糖、6×加样缓冲液、核酸染料、分子生物学级阳离子螯合树脂。

5.3 引物

5.3.1 巢式 PCR 法引物

6 对，分别为属、种引物（见附录 A，附录 B）。

5.3.2 实时荧光 PCR 法引物

6 对，分别为属、种引物（见附录 A，附录 B）。

5.3.3 测序法引物

2 对，均为属引物（见附录 B）。

5.4 参照材料

阳性对照分别为 5 种感染人体疟原虫的基因组 DNA 或 5 种疟原虫 18S rDNA 序列的质粒 DNA，所含目标 DNA 片段浓度 10^4 拷贝/ μ L~ 10^5 拷贝/ μ L。空白对照为去离子无菌水。

5.5 材料

定量滤纸，5mL EDTA 抗凝管。

6 样本

6.1 样本采集

以下两种方法任选一种。

6.1.1 抗凝全血样本采集

使用含 EDTA 抗凝剂的真空采血管，采集 2mL~5mL 全血，采血步骤及注意事项按照 WS/T 661。于管壁上标记患者姓名、年龄、采集日期、采集单位等信息。

6.1.2 滤纸血样本制备

6.2 样本运输

采集好的样本按照 WS/T 400 要求冷链运输。

6.3 样本保存

6.3.1 抗凝全血保存

全血样本分装于冻存管，3 天内检测的样本存放于 4℃；3 天以上、3 个月以内检测样本存放于 -20℃ 以下；3 个月以上检测样本存放于 -80℃ 以下。

6.3.2 滤纸干血滴保存

一周内检测的滤纸干血滴常温保存，一周以上检测的置于 -20℃ 以下保存。长期保存置于 -80℃ 以下保存。

6.4 基因组 DNA 提取

手工提取基因组 DNA 采用血液 DNA 提取试剂盒或分子生物学级阳离子螯合树脂提取（见附录 C）。

自动化提取基因组 DNA 参照核酸提取仪操作指南和使用配套试剂。

以健康人 EDTA 抗凝全血、或空白滤纸、或去离子无菌水为阴性对照，与样本同时进行 DNA 提取处理。

7 检测步骤

7.1 引物储存液和工作液配制

取含引物 DNA 干粉的 1.5mL 离心管，以 12 000g 离心 15s。

读取每支离心管上标注的引物纳摩尔数 N。

向离心管中加入 $10 \times N \mu\text{L}$ DNA 储存缓冲液，配制浓度为 $100 \mu\text{M}$ 引物储存液；根据需要以去离子无菌水：引物储存液=9:1 的比例配制相应体积的 $10 \mu\text{M}$ 引物工作液。

7.2 巢式 PCR

应用属引物进行第一轮扩增，应用种引物进行第二轮扩增。

7.2.1 第一轮扩增

每对引物设置阳性对照、阴性对照和空白对照各 1 个，每个反应设置 2 个重复。

7.2.1.1 反应体系配制

采用混合加样法配制多倍反应体系。单倍反应体系中各成分体积见表 1。

表 1 巢式 PCR 第一轮扩增单倍反应体系各成分体积

体系成分	20 μL 反应体系 (μL)
10 倍 反应缓冲溶液	2
dNTP (各 2.5mM/)	1.6
Taq 酶 (5U/ μL)	0.1
去离子无菌水	13.3

上游引物(10 μ M)	1
下游引物(10 μ M)	1
DNA 模板	1
合计	20

将多倍反应体系充分混匀，并以 12 000g 离心 15s；
 取新的 PCR 管或联排 PCR 管，根据样品数量和编号对 PCR 管进行预排序；
 按 19 μ L/PCR 管分装多倍反应体系；
 根据排序，将 1 μ L 模板 DNA 加入到相应的 PCR 管中，使每管反应液终体积 20 μ L；
 盖好 PCR 反应管盖并标记编号，12 000g 离心 15s；
 将含 PCR 反应液的 PCR 管放置到 PCR 仪上进行扩增。

7.2.1.2 反应程序

94℃ 3min； 94℃ 30s，58℃ 30s，72℃ 60s，共 35 个循环；72℃ 5min；12℃ ∞。

7.2.2 第二轮扩增

以第一轮 PCR 产物为模板，应用 5 对种引物分别在不同的反应管中扩增，每个反应设置 1 个重复。

7.2.2.1 反应体系

采用混合加样法配制多倍反应体系，单倍反应体系中第一轮 PCR 产物 2 μ L，去离子无菌 12.3 μ L，其余成分体积与第一轮扩增相同。

7.2.2.2 反应程序

94℃ 3min； 94℃ 30s，59℃ 30s，72℃ 40s，共 35 个循环；72℃ 5min；12℃ ∞。

7.2.3 电泳

扩增结束后，取出 PCR 产物，轻弹 PCR 反应管几次，12 000 g 离心 15s；

取 10 μ L 产物，与 2 μ L 6× 上样缓冲液充分混匀（若反应体系中已经加入了电泳用发光试剂，可省略此步），加入到 1.5%~2.5%的琼脂糖（含核酸染料）凝胶上样孔中。剩余样品放至 4℃ 冰箱中 24h 内备用。

将 6 μ L DNA Marker（以 50bp Ladder 为宜）加入到凝胶的上样孔中，每隔几个上样孔加入一个 DNA Marker，最大间隔不超过 10 个孔。

将电压设定为 80V~100V 开始电泳，当蓝色指示剂泳动至凝胶后侧 1/3 处时停止电泳，并取出进行成像观察，拍照并记录结果；

将琼脂糖凝胶放置于专门的容器中以备安全化处理。

7.2.4 结果判读

有效性判定：第二轮扩增产物电泳后，阳性对照出现特征条带（见附录 B），空白对照和阴性对照未出现特征条带，DNA 提取、PCR 扩增和电泳均有效；DNA Marker 无条带或条带不清晰、变形等，电泳无效；阳性对照和空白对照均出现特征条带，或均未出现特征条带，PCR 扩增无效；阳性对照和阴性对照出现特征条带，空白对照无特征条带，DNA 提取无效。

样品第二轮扩增产物电泳后出现特征条带，检测结果阳性，样品所含虫种为扩增引物对应的原虫种类。

样品第二轮扩增产物未出现特征条带，检测结果阴性。

7.3 实时荧光 PCR

共一轮扩增，引物序列见附录 B。每对引物设置阳性对照、阴性对照和空白对照各 1 个，每个反应设置 2 个重复。6 对种引物分别在不同的反应管中扩增。

7.3.1 反应体系

单倍反应体系中各反应成分体积见表 2。

表 2 实时荧光 PCR 法单倍反应体系各成分体积

体系成分	20 μ L 单倍反应体系 (μ L)
2 倍反应缓冲溶液	10
无 RNase 去离子无菌水	7.8
上游引物 (10 μ M)	0.6
下游引物 (10 μ M)	0.6
DNA 模板	1
合计	20

7.3.2 反应程序

95℃ 30s; 95℃ 5s, 59℃ 30s, 40 个循环; 95℃ 10s; 65℃~95℃, 0.5℃/次, 每次 0.5s。

采用仪器自动设定的基线阈值, 反应结束后查看每个 PCR 反应的扩增曲线和熔解曲线, 收集 Ct 值和 Tm 值。

7.3.3 结果判读

有效性判定: 阳性对照有特异扩增, 即扩增曲线 S 型, 熔解曲线单峰, Tm 值与预期大小一致 (相差未超出 $\pm 0.5^\circ\text{C}$) (各对引物 Tm 参考值见附录 B), 阴性对照和空白对照无特异扩增, 即无 S 型扩增曲线, 或扩增曲线 Ct 值 >35 , 或 Tm 值与阳性对照相差超出 $\pm 0.5^\circ\text{C}$, PCR 扩增有效; 阳性对照和空白对照均有特异扩增, 或均无特异扩增, PCR 扩增无效; 阳性对照和阴性对照出现特异扩增, 空白对照无特异扩增, DNA 提取无效。

样品有特异扩增且 Ct 值 ≤ 32 , PCR 结果阳性。

样品无特异扩增, PCR 结果阴性。

样品有特异扩增, 但 $32 < \text{Ct 值} \leq 35$, 重新提取样品基因组 DNA 后再测。若检测结果不变, PCR 结果阳性, 否则为阴性。

属引物和至少 1 对种引物 PCR 结果均阳性时, 判定样品检测结果疟原虫阳性, 样品所含虫种为引物对应的原虫种类; 否则判定检测结果阴性。

当有 2 种及以上种引物有特异扩增时, 高密度原虫 Ct 值需 ≥ 20 , 若 < 20 , 将样品 DNA 稀释后再测, 根据再测结果判定样品中所含疟原虫种类。

7.4 测序法

共 2 轮 PCR 扩增, 均为属引物, 引物序列见附录 B。每对引物设置阳性对照、阴性对照和空白对照各 1 个, 每个反应设置 2 个重复。

7.4.1 PCR 反应

两轮扩增中定量浓度引物和体系配制同 7.1 和 7.2.1。两轮扩增的反应程序相同, 均为 94℃ 3min; 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 120s, 35 次循环; 72℃ 5min; 12℃ ∞ 。电泳同 7.2.3, 以电泳结果中有无 1 000~1 200bp 特征条带判定 PCR 反应的阴阳性。

7.4.2 测序分析

7.4.2.1 直接测序

应用第二轮扩增的引物, 对阳性的第二轮 PCR 产物进行直接双向测序。

7.4.2.2 克隆测序

若 7.4.2.1 不成功, 可将 PCR 产物克隆到质粒载体上, 至少挑取 2 个阳性克隆进行测序分析。

7.4.3 结果判读

序列同源性分析利用美国国家生物信息中心网站数据库

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), 以相似度最高者判定样品的疟原虫种类; 或应用生物学软件, 将克隆测序结果与 5 种感染人体疟原虫的 18S rDNA 参考序列进行比对, 以相似度最高且不低于相似度阈值者判定样品的疟原虫种

WS/T 10030—2025

类（见附录 B）。

附录 A (资料性) 病原生物学

A.1 疟原虫生活史

疟原虫是疟疾的病原体。疟原虫为单细胞真核生物，属原生动物亚界，顶端复合物门，孢子纲，真球虫目，疟原虫科，疟原虫属。人体疟原虫有四种：恶性疟原虫(*P. falciparum*)、间日疟原虫(*P. vivax*)、三日疟原虫(*P. malariae*)及卵形疟原虫(*P. ovale*)，依次引起恶性疟、间日疟、三日疟和卵形疟。疟原虫的发育和繁殖须通过脊椎动物与昆虫媒介两个宿主，人体疟原虫的宿主是人和按蚊。疟原虫在人体分别寄生于肝实质细胞和血液中的红细胞内，在按蚊体内则寄生于蚊胃，最后积聚于唾液腺。四种人体疟原虫的生活史基本相同，包括在人体内的红细胞外期和红细胞内期，以及在蚊体内的配子生殖和孢子增殖两个阶段。

间日疟原虫的红外期裂体增殖较为复杂。目前认为间日疟原虫的子孢子在遗传学上具有两种不同的类型，即速发型和迟发型。速发型子孢子侵入肝细胞后，遂开始红外期裂体增殖，释放出肝期裂殖子侵入红细胞，经裂体增殖引起临床发作。而迟发型子孢子侵入肝细胞后暂不继续发育，处于休眠状态(休眠体)，经过一段休眠期再发育为成熟红外期裂殖体，释放出肝期裂殖子侵入红细胞从而引起复发。卵形疟亦有迟发性子孢子，有复发现象。恶性疟和三日疟无迟发型子孢子，因而无复发现象。

诺氏疟原虫(*P. knowlesi*)是一种可感染人的猴疟原虫，通常经按蚊在猴群中传播。1965年首次报道诺氏疟原虫感染人类。2009年世界卫生组织推荐使用氯喹治疗诺氏疟，2011年起世界卫生组织在其每年发布的世界疟疾报告中将诺氏疟原虫列为第5种能感染人的疟原虫。诺氏疟主要流行于东南亚地区，以马来西亚病例最多，印度尼西亚、菲律宾、缅甸、泰国、柬埔寨和越南亦有病例报道，近年来诺氏疟疫情有上升趋势。

诺氏疟原虫各虫期在患者外周血中均可查见，仅通过显微镜下的形态学特征进行虫种鉴别有一定的难度，亦尚无成熟的免疫学检测方法。诺氏疟原虫感染的潜伏期通常8天~12天，最短3天，最长27天，无迟发型子孢子。一个红细胞内发育周期约24h，配子体出现的时间早于恶性疟原虫，在患者体内通常能观察到配子体。临床上大多数诺氏疟病例为低原虫血症，但若不及时诊断和治疗，有发展成重症甚至死亡的风险，在流行区也存在无症状感染者。

A.2 人体疟原虫 18S rDNA 的基因特征和检测原理

真核生物的核糖体小亚基 RNA (Ribosomal small subunit RNA, SSU rRNA)，即 18S rRNA，其编码序列 18S rDNA 是生物种群内最为保守的基因之一，在属内具有保守区和变异区交替散布的特点。

感染人的 5 种疟原虫均具有在子孢子期和红细胞内期特异转录的 S 型和 A 型 18S rDNA，此外，间日疟原虫还有卵囊期特异表达的 O 型 18S rDNA，卵形疟原虫 *curtisi* 亚种和 *wallikeri* 亚种的 18S rDNA 之间存在明显差异，诺氏疟原虫亦有 2 种 A 期 18S rDNA 被报道。因此本标准中共分析了 5 种人体疟原虫的 13 条不同的 18S rDNA 序列(见图 A.1)，除间日疟原虫卵囊期特异表达的 O 型 18S rDNA 和三日疟原虫子孢子期特异表达的 S 型 18S rDNA 外，其他 11 条序列可划分为 9 个保守区(编号 1~9)和 8 个变异区(编号 V1~V8)，保守区和变异区间隔排列。11 条序列的保守区长度均相同，同源性≥92%。

在 5 种原虫 18S rDNA 序列保守区设计属间特异、属内通用引物，在变异区设计种间特异引物，通过 PCR 扩增样品中各疟原虫属和种的特异 DNA 片段，根据扩增结果中特异 DNA 片段的有无和大小或 Ct 值和 Tm 值，判定样品中是否含有疟原虫 DNA 片段，及对应原虫种类。

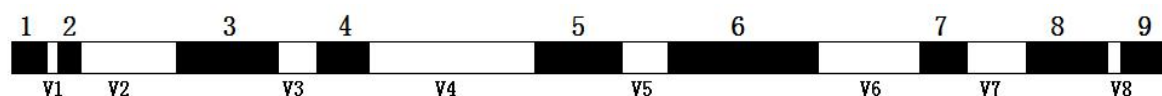


图 A.1 人体疟原虫 11 条 18S rDNA 保守区和变异区示意图

附 录 B
(资料性)
引物及结果参考

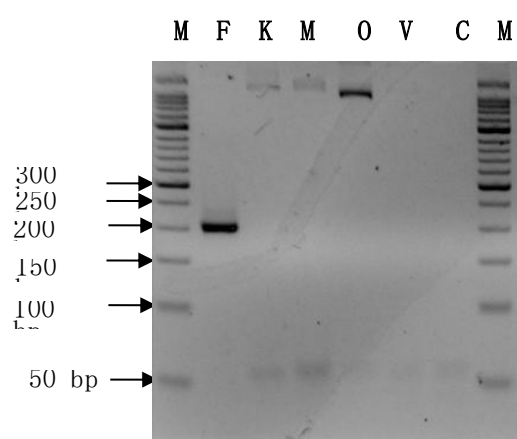
B.1 巢式 PCR

B.1.1 巢式 PCR 引物（见表 B.1）

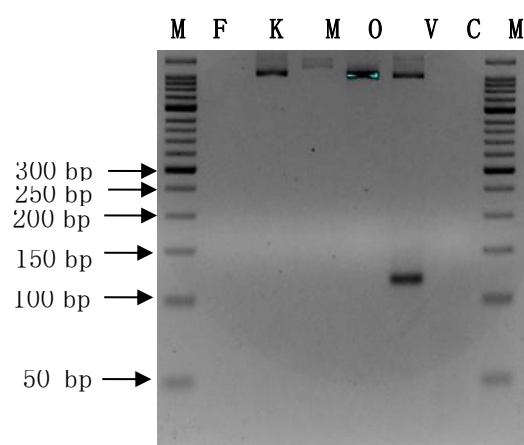
表 B.1 应用于巢式 PCR 检测的引物序列、位置及扩增产物长度

反应 轮次	目标虫种	引物 名称	引物序列	引物位置	产物长度 (bp)
第一轮 (属引物)		rPLU5	5'-CCTGTTGTGCTTAAACTTC-3'	保守区 7	1,200
		rPLU6	5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'	保守区 3	
第二轮	恶性疟原虫	FALF	5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAATATATT-3'	S 期变异区 3	205
		FALR	5'-ACACAATGAAGTCAATCATGACTACCCGTC-3'	S 期变异区 3	
	间日疟原虫	VIVF	5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3'	A 期变异区 3	120
		VIVR	5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3'	A 期变异区 3	
	三日疟原虫	MALF	5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC-3'	A 期变异区 3	141
		MALR	5'-AAAATTCCTATGCATAAAAAATTATACAAA-3'	A 期变异区 3	
	卵形疟原虫	OFAF	5'-TATAAGATGCTTAGGCAATACAAC-3'	A 期变异区 3	177
		OVAR	5'-TCAAACGCAGTAAATGCTTTAACT-3'	A 期变异区 3	
	诺氏疟原虫	KNOF	5'-GAAGAAAATATTGGAATTACGTTAAAT-3'	A 期变异区 5	90
		KNOR	5'-CATTCATACGCAAAAAAGAAATAGAT-3'	A 期变异区 5	
注：FALF/FALR，VIVF/VIVR，MALF/MALR，OFAF/OVAR 和 KNOF/KNOR 分别是恶性疟原虫、间日疟原虫、三日疟原虫、卵形疟原虫和诺氏疟原虫上、下游虫种特异性引物。					

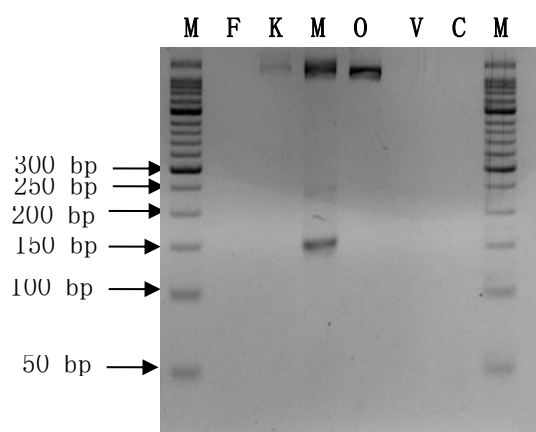
B.1.2 巢式 PCR 5 种引物特征条带示意图（见图 B.1a-e）



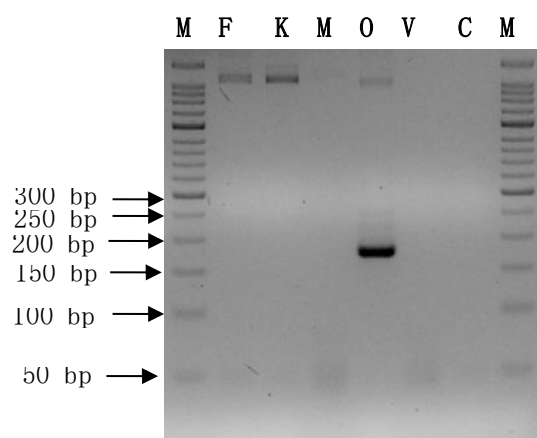
a) 恶性疟原虫特征条带示意图



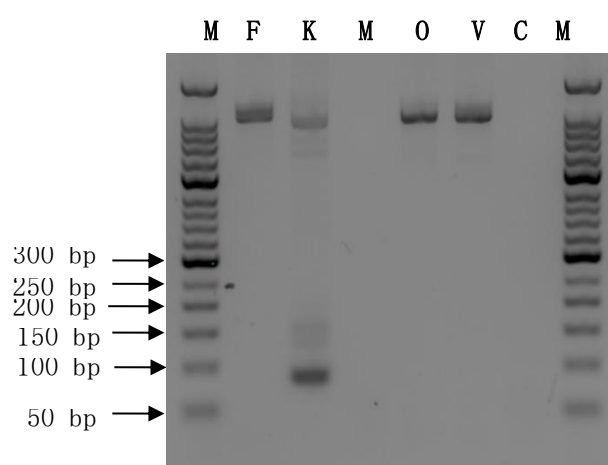
b) 间日疟原虫特征条带示意图



c) 三日疟原虫特征条带示意图



d) 卵形疟原虫特征条带示意图



e) 诺氏疟原虫特征条带示意图

注：图片中 F、K、M、O 和 V 表示 PCR 反应模板分别为用恶性疟、诺氏疟、三日疟、卵形疟和间日疟患者的抗凝全血样本提取的 DNA，C 为未加 DNA 模板的空白对照。

图 B.1 5 种人体疟原虫特征条带示意图

B.2 实时荧光 PCR 引物（见表 B.2）

表 B.2 应用于实时荧光 PCR 检测法的引物序列、位置及扩增产物 T_m 值^a

引物名称		引物序列	引物位置	产物 Tm 值
人体疟原虫属	PG-F	5'-GCGCAAGCGAGAAAAGTTAAAAG-3'	保守区 6	82.0
	PG-R	5'-CCGCTAATTAGCAGGTTAAGAT-3'	保守区 6	
恶性疟原虫	PF-F	5'-TTATTATCCTTTGATTTTATCTTTGG-3'	A 期变异区 2	72.0
	PF-R	5'-ATAAAATTATTACGTGTTACTTCTTTG-3'	A 期变异区 2	
间日疟原虫	PV-F	5'-TTTTAAGGACTTCTTTGCTTCGG-3'	A 期变异区 3	79.5-80.0
	PV-R	5'-CGACGGTATCTGATCGTCTTC-3'	A 期保守区 4	
三日疟原虫	PM-F	5'-CAAGCGTTATATTTTTCTGTTACAT-3'	A 期变异区 3	73.5-74.5
	PM-R	5'-GAAACTGTTTTAACTGTTTGCTTTG-3'	A 期变异区 3	
卵形疟原虫	PO-F	5'-TATAAGATGCTTAGGCAATACAAC-3'	A 期变异区 3	76-77.5
	PO-R	5'-TCAAACGCAGTAAATGCTTTAACT-3'	A 期变异区 3	
诺氏疟原虫	PK-F	5'-GAAGAAAATATTGGAATTACGTTAAAT-3'	A 期变异区 5	73.5-74.0
	PK-R	5'-CATTCATACGCAAAAAAGAAATAGAT-3'	A 期变异区 5	
a Tm 值可能会因所用荧光试剂和仪器设备不同而有所差异，以阳性对照为准，相差±0.5 以内计为一致。				

B.3 测序法

B.3.1 测序法引物（见表 B.3）

表 B.3 应用于扩增、测序的引物序列及扩增产物长度

反应轮次	引物名称	引物序列	引物位置	产物长度(bp)
第一轮	rPLU1	5'-TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA-3'	保守区 1	2,000
	rPLU2	5'-CTAGGCATTCCTCGTTCAAGATT-3'	保守区 8	
第二轮	rPLU5	5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3'	保守区 7	1,200
	rPLU6	5'-TTAAAAATTGTTGCAGTTAAACG-3'	保守区 3	

B. 3.2 5 种感染人体疟原虫的 13 种 18S rDNA 参考序列（见表 B. 4）

表 B. 4 5 种感染人体疟原虫的 13 种 18S rDNA 参考序列

疟原虫 18S rDNA 类型	基因数据库中登录号	基因位置	相似度阈值
Pf-A	AL844504	1289601..1291692	99%
PoC-A*	KF696372	全序列	99%
PoW-A	LT594514	25377..27468	99%
Pv-A	CM000443	146154..148217	99%
Pk10	NC_011911	63610..65723	99%
Pk-10-HN*	MG570077	全序列	99%
Pm-A	LT594624	1103562..1105718	99%
pk13	NC_011914	1062874..1065030	97%
Pv-S	CM000446	106549..108696	99%
Pf-S	AL844501	473739..475887	99%
PoW-S	LT594509	104975..107533	97%
Pv-O	CM000447	441611..443829	99%
Pm-S	LT594632	401816..403550	99%

*S 期序列尚未见报道。

附 录 C
(资料性)
手工提取样本基因组 DNA 步骤

C.1 试剂盒提取 DNA

可采用商品化试剂手工提取样本基因组 DNA，提取步骤参考试剂盒说明书。

C.2 螯合树脂提取 DNA

可应用分子生物学级阳离子螯合树脂手工提取样本基因组 DNA，步骤如下：

C.2.1 全血样本

C.2.1.1 样本前处理：取 100 μ L 全血置于 1.5mL 离心管内，加入 1mL 磷酸盐缓冲液 (PBS)，混匀，室温静置 10min，然后以 12 000g 离心此混合物 2 min，弃上清。

C.2.1.2 重复 C.2.1.1 洗涤操作。

C.2.1.3 裂解细胞、游离 DNA 和螯合杂质：加入 150 μ L 去离子无菌水和 50 μ L 20% 分子生物学级阳离子螯合树脂，99℃温浴 10 min；

C.2.1.4. 去杂质；12 000g 离心 1 min，取上清至干净的 0.5mL 离心管中，-20℃保存。

C.2.2 滤纸血样本

用 3mm~5mm 打孔器取或用剪刀剪 3mm~5mm 滤纸干血滴至少 3 个，放入 1.5mL 离心管内。

其余同上述操作步骤。

参 考 文 献

- [1] Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, et al. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol*, 1993, 58(2):283~292.
- [2] 李美, 王真瑜, 张淘, 等. 一步反转录PCR技术在检测4种人疟原虫中的初步应用[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2016, 34(6):500~505.
- [3] 卫生部疾病预防控制局. 疟疾防治手册. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [4] WHO. Basic malaria microscopy Part I. Learner's guide. Geneva, 2010.
- [5] Sharp PM, Plenderleith LJ, Hahn BH. Ape origins of human malaria. *Annu Rev Microbiol*. 2020, 74:39~63.
- [6] WHO. Malaria case management: operations manual. Geneva, 2009.
- [7] WHO. World malaria report. Geneva, 2011.
- [8] WHO. World malaria report. Geneva, 2022.
- [9] Anstey N, Grigg M, Rajahram G, et al. Knowlesi malaria: Human risk factors, clinical spectrum, and pathophysiology. *Advances in parasitology*, 2021, 113:1-43.
- [10] Lee K S, Cox-Singh J, Singh B. Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. *BioMed Central*, 2009, 8:73.
-