

2014年金門地區鼠形動物感染嗜吞噬細胞無形體之調查

翁明輝*、蔡惠坪、林珮如、陳國卿、郭明德、林昌棋

摘要

本次調查於2014年5月19日至21日在金門本島6個野地採集點進行，分別由58隻鼠形動物包括錢鼠(*Suncus murinus*)19隻以及小黃腹鼠金門亞種(*Rattus losea exiguus*, 以下簡稱小黃腹鼠)39隻，取得肝脾等內臟檢體，萃取DNA，經巢式聚合酶鏈反應(nested PCR)檢測後結果發現58隻鼠中有10隻檢出嗜吞噬細胞無形體DNA，在鼠形動物間的盛行率為17.2%，肝臟及脾臟呈現陽性反應鼠分別為6和7隻，其中3隻鼠之肝臟及脾臟同時呈陽性反應。流行地理分布顯示，6個採集點中有5個地點捕獲鼠測得此菌之DNA，由此結果推測嗜吞噬細胞無形體已分佈於金門地區，此菌為人類顆粒球無形體症之蜱媒病原菌，因此當發現蜱叮咬之不明熱時，本調查結果可以提供該地區蜱媒不明熱流行病診斷之參考。

關鍵字：嗜吞噬細胞無形體；人類顆粒球無形體症；小黃腹鼠金門亞種；巢式聚合酶鏈反應；肝臟；脾臟

前言

嗜吞噬細胞無形體(*Anaplasma phagocytophilum*)為革蘭陰性胞內絕對寄生菌，此菌最初於美國威斯康辛州的一名被蜱咬傷2週後發生熱病死亡患者身上發現。1994年該病被命名為人類顆粒球艾利希氏體症(human granulocytic ehrlichiosis, HGE) [1]，2001年Dumler氏將先前的嗜吞噬細胞艾利希氏體(*Ehrlichia phagocytophila*)、感染馬的艾利希氏體(*Ehrlichia equi*)以及感染人類顆粒球的艾利希氏體依其親緣關係

國防醫學院預防醫學研究所

通訊作者：翁明輝*

E-mail：mhuiweng@yahoo.com.tw

投稿日期：2014年12月01日

接受日期：2015年01月29日

DOI：10.6524/EB.20150728.31(14).001

合併為嗜吞噬細胞無形體[2]。主要病媒為蜚，蜚叮咬攜帶病原體的宿主動物後再叮咬人，病原體可隨之進入人體[2-4]。此菌進入人體短時間內會有發燒症狀，常伴隨著白血球減少、血小板減少以及輕度到中度肝酵素指數升高現象，還有其他影響因素如年齡、有中性白血球增多、淋巴細胞不足、貧血以及免疫抑制者會增加此病的嚴重性，甚至死亡的危險[5-6]。此菌在中國東北[7]、連江縣馬祖南竿的嚙齒類[8]以及臺灣的犬類[9]均有調查報告，在金門地區目前仍無此菌相關的調查報告。由於兩岸開放交流，增加病原流通的可能性，加以金門野地多，經本單位多年鼠類調查結果，鼠形動物密度高，野外主要有小黃腹鼠及食蟲目的錢鼠，居家或豬舍則以溝鼠為主。本調查擬以PCR等分生檢測方法，鑑定採集之鼠類肝脾臟檢體DNA，初步了解該菌在鼠形動物的盛行率及島內分佈狀況，可作為今後進一步病原採集分離培養、野外流行病學調查以及提供該地區蜚媒不明熱流行病診斷之參考。

材料與方法[10]

一、採集地點：2014年5月19日至21日在金門本島捕鼠3天，捕鼠採集地點為山后、陽翟、瓊林、泗湖、古崗、水頭6個地點野地（圖一）。



1-水頭野地（北緯 24.414, 東經 118.288），2-古崗野地（北緯 24.395, 東經 118.316），3-泗湖野地（北緯 24.411, 東經 118.337），4-山后野地（北緯 24.503, 東經 118.441），5-陽翟野地（北緯 24.476, 東經 118.431），6-瓊林野地（北緯 24.460, 東經 118.371）

圖一、2014年金門地區嗜吞噬細胞無形體帶菌鼠調查地點示意圖。

二、鼠類誘捕：於午後實施，放置鼠籠，隔天一早即回收，誘捕活鼠以帶殼花生為誘餌。

三、鼠內臟檢體之採集：將鼠以尼龍網固定，以舒泰 50(Zoleti 50®, Virbac Lab. 06516Carros France)動物用非管制品麻醉劑，10 倍稀釋後，依鼠體大小及種類，每隻經由腹腔注射 0.05 - 0.7 ml 麻醉，並編號記錄採集地點、鼠種及性別。然後進行抽血以及解剖，採集鼠臟器包括肝及脾臟。檢體取下後置入 NUNC(Cat.No.375418) 2 ml 冷凍小管，瓶蓋密閉後，先浸泡於乾冰酒精中 1 min，然後急速存於乾冰箱內，以乾冰冷凍保存，快遞送回實驗室，保存於 -70°C 冰櫃中，以備後續病原菌之檢測。

四、嗜吞噬細胞無形體之檢測[8]：

(一)DNA 之萃取：取約 10 mg 鼠肝或脾臟，依照 QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 說明所敘述步驟抽取 DNA。

(二)引子(primer)：引用已發表期刊之艾利希氏體序列稍作修改，分別為 ECCAPF·GE2r [11]·ECH16S-17APF·ECH16S-9APR[12]以及 GE9F·GE2r[13] 用以篩選人類顆粒球無形體之 16S rRNA 基因，由基龍米克斯生物科技公司合成。ECH16S-3APPRO 為即時定量聚合酶鏈反應探針(real time PCR probe)，由 ABI 公司合成(表一)。

表一、金門地區鼠檢體之嗜吞噬細胞無形體檢測用引子

Primer	Sequence (5'-3')	Target	Gene	Size(bp)
ECCAPF	5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCT-3'	<i>Anaplasma</i> spp.	16S	585
GE2r	5-GGCAGTATTTAAAAGCAGCTCCAGG-3'			
GE2r	5-GGCAGTATTTAAAAGCAGCTCCAGG-3'	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	16S	546
GE9F	5-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT -3'			
ECH16S-17APF	5'-GCGGCAAGCTTAACACATG-3'	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	16S	81
ECH16S-9APR	5'-TCACCCGTCTGCCACTAACTATT -3	(real-time PCR)		
ECH16S-3APPRO	FAM-AGTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT -TAMARA			

(三)巢式聚合酶鏈反應：首先篩檢 16S rRNA，以馬祖MZ10SP-2GE株[8] DNA 為陽性對照組，首先配製引子及聚合酶混合液 23 μ l，即 Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen) 22.5 μ l、引子ECCAPF及GE2r各0.25 μ l充分混合，加入上述待測DNA 2 μ l。然後置入PCR反應器中(MJ Research, PTC 200, Bio-Rad, U.S.A.)，反應程序設定94°C反應2 min使DNA變性成單股。接著以40個循

環數增幅，每個循環分別是94°C、1 min先使DNA變性(denaturation)，接著以52°C、1 min使DNA與引子鏈合(annealing)，再以72°C使DNA增幅(extension) 1 min，循環結束後，以72°C使DNA繼續增幅10 min，然後置於4°C保存。接著real time PCR快速篩檢，先配製引子及聚合酶混合液9.5 µl，即無菌Q水4.0 µl、TaqMan® Universal PCR Master Mix 5.0 µl (Roche, USA)，10 µM primer ECH16S-17APF0.2 µl、10 µM Primer ECH16S-9APR 0.2 µl、Probe ECH16S-3APRO 0.1 µl，充分混合後，加入上述PCR16SrRNA產物0.5 µl。然後置入ABI Fast 7500Real-Time PCR System 反應器(Applied Biosystems, Foster City, California, USA)中，反應程序設定 95°C反應 10 min 使DNA變性成單股。接著以40個循環數增幅，每個循環分別是 95°C、15 sec先使DNA變性，接著52°C、1 min使 DNA與引子鏈合，將有陽性反應之ECCAPF/GE2r產物再以引子GE2r及GE9F進行半巢式聚合酶鏈反應定序確認，即ECCAPF/GE2r產物1.0 µl加入49 µl 已配製之引子及聚合酶混合液，即Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen) 48 µl、引子GE2r及GE9F各0.5 µl充分混合。然後置入MJ PCR反應器中，反應程序設定 94°C反應 2 min 使DNA變性成單股。接著以30個循環數增幅，每個循環分別是94°C、30 sec先使DNA變性，接著50°C、30 sec使DNA與引子鏈合，再以72°C使DNA增幅1 min，循環結束後，以72°C使DNA繼續增幅10 min，然後置於4°C保存。GE2r/GE9F產物以TAE緩衝液進行初步電泳瓊脂凝膠分析，切取546 bp位置膠塊，以QIAquick gel extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 將其中的產物分離出，再次以凝膠電泳確定後，送往基龍米克斯生物科技公司定序。定序結果經NCBI網站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 進行序列比對。

結果

此次在6個誘捕點捕獲鼠形動物58隻，包括小黃腹鼠39隻、以及錢鼠19隻，各地點捕獲鼠形動物的種類及數量(表二)。58隻鼠形動物有10隻檢出嗜吞噬細胞無形體DNA，其中有3隻肝脾臟皆呈陽性反應，盛行率(prevalent rate)為17.2%。PCR篩檢結果，肝臟及脾臟呈現陽性反應鼠分別為6和7隻(表三)。肝臟陽性檢出率10.3%(6/58)，脾臟12.1%(7/58)。流行地理分布顯示，6個誘捕點中有5個地點捕獲之鼠形動物測出嗜吞噬細胞無形體DNA，即山后、陽翟、泗湖、古崗以及瓊林，只有水頭未檢出。比較各誘捕地點，如表二所示，嗜吞噬細胞無形體盛行率介於0% - 36%之間，其中山后民俗村附近野地誘捕點之盛行率36%高過於其他地點，但此區並未採到外寄生蟬。外寄生蟬於鼠間盛行率介於0% - 46.2%之間，其中古崗野地誘捕點之盛行率46.2%高過於其他地點。依鼠形動物感染種類分別統計結果，PCR陽性帶菌之鼠形動物均為小黃腹鼠。

表二、金門地區野外鼠形小動物嗜吞噬細胞無形體帶菌盛行率以及外寄生蜱類之調查

野外鼠類 採樣地點	野外鼠形動物捕獲種類		鼠類 捕獲率* (%)	嗜吞噬細胞無形體 盛行率** (%)	蜱 盛行率*** (%)
	小黃腹鼠	錢鼠			
陽翟	9	1	33.3	30.0	10.0
古崗	7	6	32.5	7.7	46.2
泗湖	3	5	20.0	12.5	25.0
山后	11	0	34.4	36.0	0
瓊林	7	1	26.7	12.5	25.0
水頭	2	6	26.7	0	0
平均	6.5	3.2	28.7	17.2	19.0

*鼠類捕獲率=捕獲之鼠形動物數/佈放捕鼠籠數

**嗜吞噬細胞無形體盛行率=地區捕獲鼠形動物之肝脾臟嗜吞噬細胞無形體 PCR 陽性鼠數/該區鼠形動物之捕獲數

***蜱盛行率=地區捕獲有蜱寄生之鼠形動物數/該區鼠形動物之捕獲數

表三、2014 年金門地區小黃腹鼠肝脾臟感染嗜吞噬細胞無形體之陽性檢體及其地理分佈一覽表

編號	肝臟	脾臟	採集地
1	-	+	古崗
2	+	-	泗湖
3	+	-	山后
4	-	+	山后
5	+	+	山后
6	-	+	山后
7	+	+	陽翟
8	+	+	陽翟
9	-	+	陽翟
10	+	-	瓊林

此次調查發現，13個陽性檢體核酸序列與馬祖MZ10SP2GE以及鄰近國家如中國大陸江蘇的JN990106、東北的AF486636、GQ412339和雲南的FJ968656比對結果，相似度為100%，但與韓國GU064898、俄羅斯的HM366584、奧國FJ812398和英國AY082656相似度為99%序列差異為1-3個核酸，但差異位置均不同（表四）。

討論

蜱類可能傳佈的疾病有很多，如伯氏疏螺旋體(*Borrelia burgdorferi*) [14]、斑點熱群(spotted fever group) [15] 及人類單核球艾利希氏體[16]，都是蜱媒不明熱流行病的致病原，而嗜吞噬細胞無形體也是一種新興的蜱媒病原[17]，自1946年以來，依據陸續調查報告，已知此菌體在世界各地分佈廣泛，經由蜱類傳播，可感染狗、貓、牛、羊、馬甚至鼠類，雖然一般對人感染症狀輕微，且無人傳人的現象，但

表四、2014 年金門地區鼠形動物檢出之嗜吞噬細胞無形體 16S rRNA 核酸序列差異表

分離株	序列差異位置							相似度(%)
	7	8	11	149	163	239	397	
MZ10SP-2GE	G	G	A	A	A	A	A	100
KM31LI 50AP	-	-	-	-	-	-	-	100
KM31LI 53AP	-	-	-	-	-	-	-	100
KM31LI 61AP	-	-	-	-	-	-	-	100
KM31LI 74AP	-	-	-	-	-	-	-	100
KM31LI 75AP	-	-	-	-	-	-	-	100
KM31LI 87AP	-	-	-	-	-	-	-	100
KM31SP36AP	-	-	-	-	-	-	-	100
KM31SP61AP	-	-	-	-	-	-	-	100
KM31SP63AP	-	-	-	-	-	-	-	100
KM31SP74AP	-	-	-	-	-	-	-	100
KM31SP75AP	-	-	-	-	-	-	-	100
KM31SP76AP	-	-	-	-	-	-	-	100
KM31LI 50AP	-	-	-	-	-	-	-	100
ChinaJN990106	-	-	-	-	-	-	-	100
ChinaAF486636	-	-	-	-	-	-	-	100
ChinaGQ412339	-	-	-	-	-	-	-	100
ChinaFJ968656	-	-	-	-	-	-	-	100
*KM31T 44AP	-	-	-	-	-	T	G	99
*GU111742	-	-	-	-	T	T	-	99
*HM366584	-	-	-	G	-	T	-	99
*GU064898	-	-	-	-	-	C	-	99
*AY082656	-	A	-	-	-	T	-	99
*FJ812398	A	-	G	-	-	T	-	99

*KM31T 44AP(金門)、GU111742(西班牙)、HM366584(俄羅斯)、GU064898(韓國)、AY082656(英國)、FJ812398(澳洲)

據報告也有嚴重致死病例[6]。本單位於臺澎金馬各地調查此菌在鼠形動物中感染狀況，以PCR方法檢驗，均曾測得此病原DNA陽性反應。當今金門地區地廣人稀，國軍裁軍之後，留下野地甚廣，局部為農作，大部分為牛隻放牧區或未開發草原區，這些區域鼠形動物密度偏高，主要為小黃腹鼠以及錢鼠。此次調查的13個鼠形動物肝脾臟陽性檢體核酸序列與對照組馬祖株(MZ10SP-2GE)之相似度為100%，且包含部分大陸株，由雲南、江蘇到東北，如表四。就鼠內臟感染傾向，脾臟與肝臟感染率分別為12.1%(7/58)與10.3%(6/58)，差別甚小，即無顯著特別偏好器官，其中有約半數(7/13)感染鼠為單器官感染。因此，對於此菌在鼠形動物間盛行率調查需同時採取肝脾臟檢測以減少誤差。就此菌對於鼠種感染偏好檢測結果，10隻陽性帶原鼠均為小黃腹鼠，此菌在小黃腹鼠群中的盛行率為25.6%(10/39)，而錢鼠為0，此次金門野外捕獲的鼠形動物中，小黃腹鼠與錢鼠捕獲比為39:19，而嗜吞

噬細胞無形體帶原鼠比卻為10:0，顯示金門野外地區小黃腹鼠為此菌傳播之優勢鼠種。依陽性檢體分布情況分析，在6個野外誘捕點陽翟、古崗、泗湖、山后民俗村、瓊林、水頭中，如圖一，除水頭外，陽性檢體分別分布於5個野外誘捕點，如表二，其分布率為83.3%，顯示嗜吞噬細胞無形體已遍佈金門大部分野外地區。依據本次調查結果分析發現有蜱類寄生之鼠形動物比率，小黃腹鼠與錢鼠為1:13，蜱類均為粒形硬蜱之若蜱以及幼蜱，未發現成蜱，其中在古崗由1錢鼠體採得之若蜱檢體(KM31T44AP)檢出嗜吞噬細胞無形體，其與對照組相似度為99%，有2個核酸差異，如圖四。但是，在此次調查中錢鼠肝脾臟均未檢出嗜吞噬細胞無形體，陽性內臟檢體均出自於低蜱盛行率的小黃腹鼠，因此，在自然野鼠間嗜吞噬細胞無形體之傳佈機制仍未明。在金門地區小黃腹鼠常見的外寄生有恙蟎（盛行率74.4%）與中氣門之蟎類，與此菌盛行於金門小黃腹鼠族群中是否有相關聯性目前並無依據，但是恙蟎檢體DNA以PCR檢測結果，對嗜吞噬細胞無形體反應均為陰性。根據文獻記載，嗜吞噬細胞無形體依靠蜱（壁蝨）傳佈，病原菌經由蜱親代垂直傳遞至下一代的機率甚低，若蜱需吸取帶原宿主血後才具有感染力[18 - 19]。且依據本次調查結果顯示嗜吞噬細胞無形體盛行於金門野外的小黃腹鼠中，錢鼠均未測出帶原，但是此次調查所採集到的外寄生蜱均為若蜱及幼蜱，大部分以錢鼠為宿主。此結果同樣發生於馬祖2013年的調查中[8]，27個鼠形動物脾臟檢體，包括溝鼠、小黃腹鼠、家鼯鼠及錢鼠，PCR檢測結果，1溝鼠及6小黃腹鼠為陽性，錢鼠均為陰性反應。同樣野外地區，是否食蟲目的錢鼠，其免疫系統有異於嚙齒類，目前仍未知。本檢測之巢式聚合酶鏈反應是以real time PCR方法進行快速篩檢，目的在於其省時、專一性(specificity)與靈敏度(sensitivity)高，但亦可能會受到環境無預期的微量污染影響而發生偽陽性，且real time PCR結果只重過程的呈現，而其反應結果為數據及圖形呈現，無法確認產物核酸序列，因此，本檢測再以real time PCR呈陽性反應檢體之一次PCR反應產物進行半巢式傳統熱循環PCR，取其產物，依定序比對結果確認陽性檢體，以確保檢驗結果的準確性。

誌謝

本調查承國防部經費補助，國防醫學院預防醫學研究所 2014 年金門地區鼠類相關調查團隊成員協助，謹此致謝。

參考文獻

1. Strle F. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Int J med Microbiol* 293 suppl.2004; 37:27-35.
2. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some

- species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:2145-65.
3. Holden K, Boothby JT, Anand S, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks(Akari: Ixodidae) from a coastal region of California. *J. Med. Entomol.* 2003; 40: 534-9.
 4. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, et al. Identification of a granulocytotropic ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol* 1994;32:589-95.
 5. Lovrich SD, Jobe DA, Kowalski TJ, et al. Expansion of the midwestern focus for human granulocytic anaplasmosis into the region surrounding La Crosse, Wisconsin. *J Clin Microbiol* 2011;49:3855-9.
 6. Hardalo CJ, Quagliarello V, and Dumler JS. Human granulocytic ehrlichiosis in Connecticut: report of a fatal case. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 21: 910-4.
 7. Cao WC, Zhan L, He J, et al. Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75:664-8.
 8. Weng MH, Lien JC, Tsai H P, et al. Surveillance of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Rodents on Nangan Island , Matsu, *J Med Sci* 2013;33:279-84.
 9. Liu HJ, Yin CC, Hsieh YC, et al. Identification of the causative agents of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Taiwan by nested indirect immunofluorescent- antibody assay, and sequence analysis of the 16SrRNA gene. *Taiwan Vet J* 2006;32:76-87.
 10. Weng MH, Tsai HP, Lin PR, et al. Investigation of *Ehrlichia chaffeensis* Infections in rodents in Kinmen area, 2012. *Taiwan EB* 2014: 30: 68-76.
 11. Muramatsu Y, Ikeda E, Morita C, et al. Detection of ehrlichial DNA in small rodents captured in a woodland area of Hokkaido, the northernmost island of Japan, where Lyme disease is endemic. *Jpn J Infect Dis* 2005;58:316-9.
 12. Loftis AD, Massung RF, Levin ML. Quantitative real-time PCR assay for detection of *Ehrlichia chaffeensis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:3870-2.
 13. Kramer VL, Randolph MP, Hui LT, et al. Detection of the agents of human ehrlichioses in Ixodid ticks from California. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 62-5.
 14. Chao LL, Li LL, Shih CM. Prevalence and molecular identification of *Borrelia spirochetes* in *Ixodes granulatus* ticks collected from *Rattus losea* on Kinmen island of Taiwan. *Parasit Vectors* 2012;5:167.
 15. Tsui PY, Tsai KH, Weng MH, et al. Molecular detection and characterization of spotted fever group rickettsiae in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:883-90.

16. Paddock CD, Childs JE. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. Clin Microbiol Rev 2003;16:37-64.
17. Burri C, Dupasquier Cl, Bastic V, et al. Pathogens of emerging tick-borne diseases, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., and *Babesia* spp., in Ixodes ticks collected from rodents at four sites in Switzerland (Canton of Bern). Vector-Borne Zoonotic Dis 2011; 11:939-44.
18. Stuen S, Djuve R, Bergström K. Persistence of granulocytic *ehrlichia* infection during wintertime in two Sheep flocks in Norway. Acta vet scand 2001; 42: 347-53.
19. Ogden NH, Casey ANJ, French NP, et al . Natural *Ehrlichia phagocytophila* transmission coefficients from sheep ‘carriers’ to *Ixodes ricinus* ticks vary with the numbers of feeding ticks. Parasitology 2002a; 124: 127 – 36.