

2003 至 2015 年澎湖縣恙蟲病病媒採樣調查結果 與恙蟲病年病例數之相關性分析

金遠凡*、郭明德、翁明輝、陳國卿、
洪耀文、林珮如、蔡惠坪、林昌祺

摘要

本調查計畫於 2003 年至 2015 年在澎湖地區選擇 15 個採集地點，地點包含社區、野地與軍營，選擇範圍廣及澎湖本島並於相近時期（3 月底至 4 月初）進行樣本捕捉，抽血並採集外寄生恙蟎，以進行恙蟲病致病原盛行狀況之監測。捕獲樣本共計四種，其中兩種（錢鼠 *Suncus murinus* 與溝鼠 *Rattus norvegicus*）活動範圍與人類生活較密切，另外兩種（家鼯鼠 *Mus musculus* 與小黃腹鼠 *Rattus losea*）則否。收集參數包括：捕獲樣本總數、捕獲樣本是否有恙蟎寄生、捕獲樣本寄生恙蟎萃取 DNA 偵測恙蟲病立克次體(*Orientia tsutsugamushi*, OT)之陽性數、捕獲樣本抽血做 OT 之抗體檢測。探討上述參數與澎湖縣年發生恙蟲病病例數，兩者之間相關性，希望可以進一步作為預測病例數之參考指標。結果顯示捕獲樣本有恙蟎寄生與其百分率與澎湖縣年度恙蟲病病例數有相關且達統計上的顯著意義($r = 0.74, p = 0.022$)，根據迴歸公式計算，預測今年（2015 年）澎湖年病例數為 73，95%信賴區間為(43, 102)。

關鍵字：恙蟲病立克次體、鼠類、澎湖地區

國防醫學院預防醫學研究所

通訊作者：金遠凡*

E-mail : googling0204@gmail.com

投稿日期：2015 年 10 月 29 日

接受日期：2016 年 1 月 20 日

DOI : 10.6524/EB.20161004.32(19).001

前言

恙蟲病(tsutsugamushi disease)，又稱叢林型斑疹傷寒(scrub typhus)，由帶有病原菌恙蟲病立克次體(*Orientia tsutsugamushi*, OT)之恙蟎(trombiculid mites)幼蟲叮咬感染人，引起之急性發熱性傳染病[1]。Tsutsugamushi 是由兩個日本字組成，tsutsuga 代表小的、危險的，mushi 代表蟲或蟎，又稱為 scrub typhus。由於病媒棲息處多為矮灌木或草叢，感染者因在流行地之矮灌木或草叢的接觸而遭受叮咬致引起急性發熱性傳染病[2]。

恙蟲病為亞洲臨太平洋區域，包含韓國、中國、日本、臺灣、菲律賓等常見的地方性流行傳染病[3-4]。不僅如此恙蟲病於世界的地理分布相當廣泛，流行區域呈現三角區域，世界地圖上三個頂點分別為：日本本部、澳洲北部與巴基斯坦，三個頂點所畫出的區域內，都為恙蟲病分布的範圍[5]。恙蟲病為人畜共通、急性且伴隨發熱的傳染性流行病，其病原體為 OT 屬於立克次體科，是一種絕對細胞內寄生菌，經由帶有病原體的恙蟎幼蟲(chigger)叮咬人體而受感染[6]。臺灣主要流行區在金門、馬祖、澎湖、蘭嶼等離島及臺灣本島之郊區特別是花蓮、臺東等地。流行季節以 6 至 10 月為主，此時期正值恙蟎之幼蟲大量孵化的季節，暴露在恙蟎棲息之草叢野地為感染危險因子[7]。

恙蟲病立克次體(OT)是類似細菌的病原，必須仰賴活體細胞才能生存，當帶病原媒恙蟎幼蟲叮咬宿主，致使病原菌進入人體內而引發免疫反應，產生發高燒、頭痛、背痛、惡寒、盜汗、淋巴腺腫大等症狀，在恙蟎叮咬處出現無痛性的焦痂(eschar)是疾病特徵，潛伏期為 6 到 21 天[8-10]。野生嚙齒類小動物是恙蟎之主要自然宿主，人類是偶然宿主，恙蟎本身是恙蟲病原體之貯主動物[11]。病媒恙蟎，其整個生活史中只有恙蟎幼蟲時期才會叮咬老鼠或人，叮咬宿主飽食後，幼蟲便脫落於草地上發育為若蟲，再自由生活發育到成蟲，而恙蟎若蟲、成蟲不再叮咬脊椎動物，只靠土壤內其他小生物為生。大部份雌的恙蟎會經卵將病原菌傳給下一代[12]，因此剛孵化的恙蟎幼蟲，其體內已先天帶有來自親代的立克次體菌，於叮咬人畜時，即可感染人畜。臺灣主要之恙蟲病媒為地里恙蟎(*Leptotrombidium deliense*)[12-13]。根據疾病管制署（以下簡稱疾管署）統計資料顯示，澎湖縣為我國恙蟲病病例高發生地區，因此本文將 10 年來相同季節（3、4 月）對澎湖縣恙蟲病病媒採集調查資料做統計分析，期能獲得與澎湖縣恙蟲病病例數相關的預測因子，以利後續相關衛生單位作為防疫參考資訊。

材料與方法

一、採集地點

2003 年至 2015 年共 10 次澎湖縣採樣調查地點列表如下（表一），採集地點集中在馬公市、湖西鄉及西嶼鄉，採樣點分布示意圖（圖一）。

表一、澎湖恙蟲病媒調查地點

編號	類型	名稱	92 (2003)	93 (2004)	94 (2005)	95 (2006)	96 (2007)	97 (2008)	98 (2009)	100 (2011)	102 (2013)	104 (2015)	
1	社區地點	肉品市場	√	√	√	√	√	√		√		√	
2		農改場	√										
3		馬公漁港		√	√	√	√	√	√	√			
4		西嶼內垵國小	√		√	√	√	√	√	√	√	√	
5	野地地點	西嶼野地	√			√	√	√	√	√	√	√	
6		二崁野地	√		√	√	√	√	√	√	√	√	
7		沙港野地	√	√		√	√	√			√	√	
8		安宅豬場	√	√	√	√	√	√	√		√	√	
9		東石豬場	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
10		果葉野地	√	√		√	√	√					√
11		龍門野地	√	√		√	√	√			√	√	
12	營區地點	重光營區				√	√						
13		菜園營區				√		√	√	√	√	√	
14		井垵五德營區				√	√	√	√	√	√	√	
15		拱北營區				√	√	√	√				
16		尖山營區				√							
17		光華營區觀海樓								√	√	√	√
18		光華營區修鑑大樓								√	√	√	√
19		光華營區 508 營站								√	√	√	√
20		光華營區忠誠樓								√	√	√	√



圖一、2003–2015 年澎湖捕捉樣本地點示意圖

二、樣本捕捉

(一) 時間於午後開始佈放鼠籠，隔日上午進行回收作業，根據捕捉地點選擇適當誘餌，野外為帶殼花生，市場或是營舍周邊則會以肉乾為主或是帶殼花生與肉乾並行。

(二) 捕捉地點：

1. 地點描述：主要分為三種，社區、野地與軍營。野地包含農地、廢耕地、或是茂密草叢。社區則會選擇市場、人們居住社區周邊與房舍。軍營則是混合兩種，包含茂密草地與居住營舍、福利站周邊等。
2. 地點選擇：根據前年捕捉地點作為優先選擇地點（表一）。

(三) 鼠籠樣式：外觀為長方形約 50–60 公分長、高約 20–30 公分，以金屬網格製成，籠子內部有一個鈎環，鈎環上可以勾上誘餌，當鼠類進入籠子內部，試圖要取食誘餌時，鈎環受到擾動，會連動控制柵門的開關，而將柵門關閉，完成捕捉。

三、捕獲樣本檢體收集

(一) 麻醉

將捕捉之樣本以尼龍網捆住固定，並注射舒泰 50(Zoleti 50[®], Virbac Lab. 06516 Carros France)動物用非管制品麻醉劑，進行 10 倍稀釋後，根據樣本大小，使用麻醉劑量，家鼯鼠與錢鼠屬於小體積樣本，給予劑量在 0.05–1 ml 之間，而小黃腹鼠與溝鼠屬於大體積樣本，給予劑量在 1–3 ml 之間，並將樣本作編號，紀錄採集地點、樣本種類與性別。

(二) 檢體收集

麻醉後先進行樣本抽血，抽血完成後進行捕獲樣本外寄生蟲檢查，以梳子檢查跳蚤與硬蜱，以及樣本耳朵部位檢查是否有恙蟎幼蟲寄生，如有發現外寄生蟲，記錄數量並將外寄生蟲捕捉，以利後續實驗及種類鑑定分析。

四、恙蟲病立克次體抗體血清檢測（排除錢鼠血清）

以免疫螢光分析(immunofluorescence assay, IFA)方法分析恙蟲病立克次體的抗體效價[1]。採集到的樣本血清，先以 PBS(phosphate buffered saline)做 1:40 稀釋。再將稀釋過後的樣本血清加到含有立克次體的抗原孔盤上（恙蟲病株：Karp, Kato and Gilliam OT），並且放入 30 分鐘。反應完成後，使用 PBS 沖洗 2 次，接著使用二次混合抗體(Focus Diagnostic IF0011 Dual species Antibody, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA)經過 PBS 做 1:100 稀釋後，加入上述的抗原盤上，同樣狀態（37°C 培養箱）反應 30 分鐘後，使用 PBS 沖洗 2 次。進行鏡檢，以螢光顯微鏡觀察(Olympus IX71, Tokyo, Japan)，樣本血清中若含有恙蟲病立克次體抗體反應，將會呈現亮綠色螢光。

五、採集捕捉樣本耳內恙蟎 DNA 進行恙蟲病立克次體聚合酶連鎖反應方法(PCR) 檢測

(一) DNA 萃取

1. 恙蟎取樣：將捕獲樣本恙蟎（於耳內最常見）以毛刷刷下，於顯微鏡下進行取樣，放入裝有 PBS 之 1.5 毫升離心管，一管研磨管約略裝 50–100 隻恙蟎為一組，直到裝完所有恙蟎才停止取樣。

2. 恙蟎磨碎：取樣完成之離心管，進行離心(8000rpm)後去除上清液，加入碘酒一滴，離心(8000rpm)後去除上清液，並再重複上述步驟一次。加入 sucrose-phosphate-glutamate(SPG) buffer 至能剛好覆蓋樣品即可，後開始磨碎，磨碎使用自動磨碎機，前端置有滅菌過之研磨棒，磨碎時動作需輕巧，避免離心管內溶液濺出管口或管外，磨碎完成後，再加入 SPG buffer 至 600 μ l，並取 200 μ l 進行萃取，剩餘 400 μ l 進行凍存。依照 QIAamp® DNA mini kit(QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 說明步驟萃取捕獲樣本寄生恙蟎 DNA。

(二) 使用 nested PCR[13]偵測寄生恙蟎之 DNA

1. 引子(primers)選用[1,14]

第一層 PCR 使用 primers 為 RTS-8 與 RTS-9。第二層 nested PCR 使用 primers 為 RTS-6 與 RTS-7。第一層使用 5 μ l 之恙蟎萃取 DNA，接著第二層使用第一層完成之產物 1 μ l 作為反應模板。

RTS-6 5_-GTTGGAGGAATGATTACTGG-3_

RTS-7 5_-AGCGCTAGGTTTATTAGCAT-3_

RTS-8 5_-AGGATTAGAGTGTGGTCCTT-3_

RTS-9 5_-ACAGATGCACTATTAGGCAA-3_

2. 第一層 PCR

(1)PCR 反應溶液(10 nM 之第一層 primer pairs RTS-8 與 RTS-9, Platinum PCR SuperMix, Invitrogen11306-016)。

(2)反應體積：45 μ l 之 PCR SuperMix，5 μ l 之恙蟎萃取 DNA。

(3)反應狀態：94°C 作用 2 分鐘→「94°C 作用 30 秒→55°C 作用 40 秒→72°C 作用 1 分鐘」重複 35 次→72°C 作用 10 分鐘→反應結束。

3. 第二層 nested PCR

(1)PCR 反應溶液(10nM 之第二層 primer pairs RTS-6 與 RTS-7, Platinum PCR SuperMix, Invitrogen11306-016)。

(2)反應體積：49 μ l 之 PCR SuperMix，1 μ l 之第一層 PCR 反應產物。

(3)反應狀態：94°C 作用 2 分鐘→「94°C 作用 30 秒→55°C 作用 40 秒→72°C 作用 1 分鐘」重複 30 次→反應結束。

4. 電泳跑膠確認

欲偵測之 DNA 大小約在 0.7 kb，以聚合酶連鎖反應方式偵測，並以電泳跑膠方法以 GelRed 染色，照 UV 光做陽性結果確認。

結果

調查結果如表二。澎湖地區捕獲樣本為四種，溝鼠、小黃腹鼠、錢鼠與家鼯鼠(表三)。將上述統計資料與澎湖縣恙蟲病年度病例數做皮爾森相關係數分析(表四)，顯示恙蟎寄生數(%)與澎湖縣年病例總數有較高的相關($r = 0.72$ 、 0.74)

且達到統計上的顯著($p = 0.028$ 、 0.022)。根據兩項參數，期能對於恙蟲病病例數有預測的效果(圖四)。根據迴歸公式，對於 2015 年澎湖縣恙蟲病年病例數之點估計與 95%信賴區間，依序為恙蟎寄生數與寄生率：69 (58, 98)例，73 (43, 102)例；剔除 2008 年、2009 年資料後之年病例數點估計為 63 (52, 75)例，70 (56, 84)例。

表二、2003–2015 年澎湖野外恙蟲病病媒調查捕獲樣本統計表

年	1. 總捕獲樣本數		2. 恙蟎寄生		3. 恙蟎 DNA PCR 陽性		4. 抽取樣本血清 (排除錢鼠) 數量		5. 血清 IFA 檢測 OT 抗體陽性。 (註 1)		月均溫(°C) (註 2)		恙蟎指數	澎湖縣年病例數
	數量	%	數量	%	數量	%	數量	%	採樣日期	3月	4月			
										數量	%			
2003	51	7	13	3/31–4/4	.	.	.	14
2004	45	4	9	3/29–4/2	.	.	.	11
2005	48	6	13	3/21–3/25	.	.	.	29
2006	55	9	17	8	90	28	14	50	3/27–3/31	19.6	24.1	.	.	46
2007	53	15	28	15	100	34	15	44	3/19–3/23	20.8	22.4	.	.	77
2008	38	6	16	5	83	24	23	95	4/14–4/18	20.5	23.6	271/38	7.1	94
2009	34	0	0	0	0	20	20	100	3/16–3/20	19.4	22.1	0/34	0	32
2011	54	7	13	(註 3)		21	19	90	3/28–4/1	18.0	22.2	277/54	5.2	19
2013	61	19	31	10	57	37	29	78	3/25–3/29	20.7	22.3	3229/61	52.9	122
2015	53	12	23	8	67	36	26	72	3/23–3/27	20.4	23.5	1071/53	20.2	101

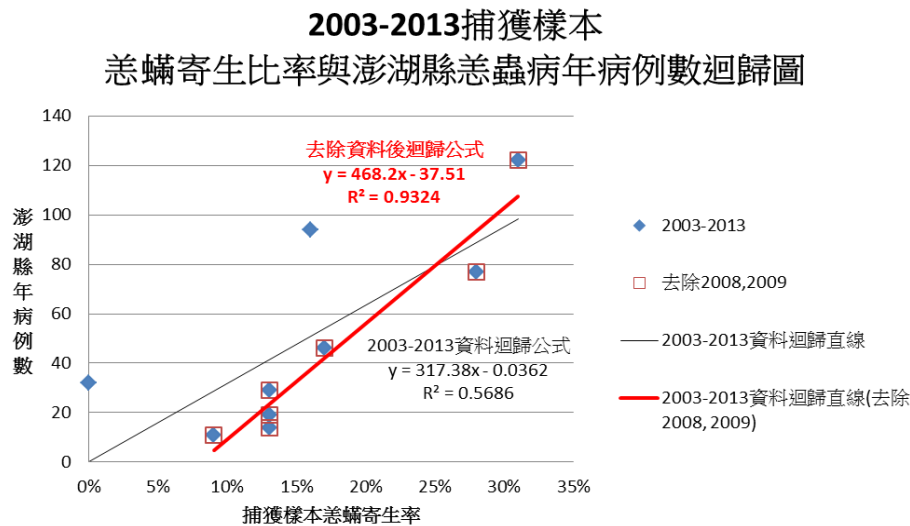
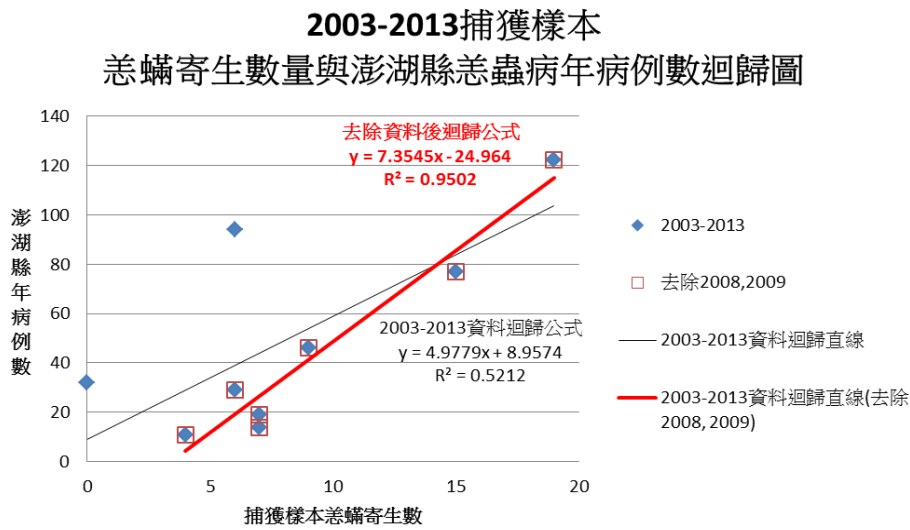
註 1：血清檢測相關參數 4 與 5 均已排除錢鼠數量。

註 2：月均溫資料來源為交通部中樣氣象局統計資料，交通部資料庫目前只保存至 2006 年。

註 3：在 2011 年由於恙蟎幼蟲檢體於運送過程中，遇到損毀，致該年度無法順利進行恙蟎幼蟲 DNA 之 PCR 分析。

表三、澎湖捕獲樣本統計 2003–2015 年

年	總捕獲數	佈籠數量	溝鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)		小黃腹鼠 (<i>Rattus losea</i>)		家鼯鼠 (<i>Mus musculus</i>)		錢鼠 (<i>Suncus murinus</i>)	
2003	51	386	5	9.8%	5	9.8%	7	13.7%	34	66.7%
2004	45	344	21	46.7%	10	22.2%	4	8.9%	10	22.2%
2005	48	350	23	47.9%	5	10.4%	3	6.3%	17	35.4%
2006	55	340	14	25.5%	13	23.6%	8	14.5%	20	36.4%
2007	53	288	18	34.0%	16	30.2%	0	0.0%	19	35.8%
2008	38	254	16	42.1%	6	15.8%	1	2.6%	15	39.5%
2009	34	179	12	35.3%	5	14.7%	3	8.8%	14	41.2%
2011	54	271	6	11.1%	12	22.2%	4	7.4%	32	59.3%
2013	61	305	10	16.4%	22	36.1%	5	8.2%	24	39.3%
2015	53	376	9	17.0%	21	39.6%	7	13.2%	16	30.2%



圖二、恙蟎寄生數(率)與澎湖縣 2003-2013 年恙蟲病病例數迴歸圖

討論

調查結果進行皮爾森相關係數統計分析後，發現恙蟎寄生數及其寄生百分率與澎湖縣恙蟲病年病例總數有很高的相關性，且分析結果達統計顯著。在圖二結果中，尚未去除極端值前之 R 平方值（檢定 F 值，*顯示檢定結果達顯著）分別為 0.5212(7.60*)與 0.5686(9.23*)，去除極端值後，R 平方值提高至 0.9182(95.49*)與 0.9324(69.00*)。根據疾管署統計資料，2015 年恙蟲病年病例數為 101 例。雖然將 2008 年與 2009 年資料剔除後，可使得資料集中程度增加，迴歸模型之 R 平方值提高，但相對估計之信賴區間縮小，無法包含 2015 年疾管署統計病例數。亞熱帶地區包括澎湖，地理恙蟎一個世代從卵孵化至成蟲約 70 多天[10,12]，尤其春夏天氣回暖後，恙蟎又會經過寄生齧齒類老鼠而繁殖更多，春天過後恙蟎經過一或更多個世代生長，約在 6-10 月帶菌恙蟎幼蟲數量倍數增加到達高峰，又逢夏季民眾野地工作或旅遊，接觸草地恙蟎幼蟲機會增加，所以流行季節多在 6-10 月，冬季變冷加上東北季風吹襲，恙蟎繁衍週期增長，民眾至野外被感染的機會也降低。

本調查研究針對齧齒類老鼠於春末季節做調查，可以反映出恙蟎尚未大量繁殖前之恙蟎幼蟲數量與帶菌狀況。未來規劃在 6–10 月間至澎湖進行相同地點之採樣調查，做相互比較。

未來希望可以更準確地預測年病例數，應該要再加入其他因子，如當年年均溫、月均溫、降雨分布等相關之環境因子加入預測，並且規畫於 6–10 月流行高峰期，再次進行採樣調查，完善預測模型，使其更加準確。由於本計畫主要日地在於野外恙蟲病病媒調查監測，在研究設計上並非完善，將會朝更嚴謹之研究設計，並將加入野外採集捕捉的標準作業流程，使得收集回來的資料能夠更臻完善。

此外，本調查研究受到時間、地點與天候等因素考量限制。時間方面在 2009 年之後只有每兩年進行一次，並且每次調查日期雖然都在 3 月底 4 月初間，但礙於許多客觀因素無法每年在固定日期進行採樣。地點選定方面也無法固定位置，由於事先選定的地點，常常會遇到施工或遭受破壞，而無法定點取樣，只好就近相同性質之地點採樣。此外，捕捉鼠類數量也受到天候相當大的影響，最主要是降雨與否，若適逢下大雨，將會大幅降低樣本離巢捕食的機會，而直接影響到捕捉數量；表二中 2009 年恙蟎寄生率為 0%，該年採樣日期為 3 月 16 至 20 日，比其他年採樣日期稍早，且捕捉期間天候狀況不佳，導致佈籠數量銳減，而直接影響到捕捉數量。

依據近期相關研究調查顯示，臺灣花東與離島地區為恙蟲病的高發生率地區 [7–9]，而上述地區也為觀光熱門區域景點，若能於年初，以此恙蟎寄生數(%)預測當年度澎湖縣恙蟲病病例數，可以給予相關單位做為恙蟲病的防疫參考，也能夠給予該地區流行之警示，避免輕忽而造成恙蟲病之流行。根據澎湖縣觀光局統計資料顯示：2014 年澎湖縣觀光人數計有 95 萬餘人，而 2015 年統計 11 月已達到 97 萬餘人，顯示澎湖縣為近年來越來越熱門之觀光旅遊區，且有逐年上升的趨勢；澎湖縣之觀光景點多為野外區域，於此地點從事郊外活動，容易遭受到恙蟎叮咬而感染恙蟲病 [8]，值得注意的是，至澎湖縣觀光之遊客若在此感染恙蟲病者，不會列入澎湖縣恙蟲病之當地統計病例，因此澎湖整年度感染恙蟲病例數是被低估的。恙蟲病之防疫不可輕忽，為維護遊客之健康，呼籲遊客在澎湖野外、草叢進行戶外活動時，儘量著長袖、長褲避免遭受恙蟲叮咬。

誌謝

本調查計畫承蒙國防部經費支持，澎湖縣各級單位駐軍的協助，國軍澎湖醫院與澎湖家畜試驗所提供場地作業，謹此致謝。

參考文獻

1. Lin PR, Tsai HP, Weng MH, et al. Field assessment of *Orientia tsutsugamushi* infection in small mammals and its association with the occurrence of human scrub typhus in Taiwan. *Acta Trop* 2014; 131: 117–23.

2. Wang YC, Chen PC, Lee KF, et al. Scrub typhus cases in a teaching hospital in Penghu, Taiwan, 2006-2010. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013; 13: 154–9.
3. Kuo CC, Huang CL and Wang HC. Identification of potential hosts and vectors of scrub typhus and tick-borne spotted fever group rickettsiae in eastern Taiwan. *Med. Vet. Entomol* 2011; 25: 169–77.
4. Wang YC, Jian TY, Tarn LJ, et al. Development of a recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay and its applications in field surveillance of rodent mice for presence of immunoglobulin G against *Orintia tsutsugamushi*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunol* 2003; 10: 451–8.
5. DJ Kelly, PA Fuerst, WM Ching, et al. Scrub typhus: the geographic distribution of phenotypic and genotypic variants of *Orientia tsutsugamushi*. *Clin Infect Dis* 2009; 48 (suppl 3): S203–30.
6. 衛生福利部疾病管制署：恙蟲病防治核心教材 2015 年 03 月。取自：
<http://www.cdc.gov.tw/professional/info.aspx?treeid=15ea1948ffc4fa7a&nowtreeid=AEC97AD890BD4826&tid=0EAAF1C6526C7EED>。
7. Kuo CC, Huang JL, Ko CY, et al. Spatial analysis of scrub typhus infection and its association with environmental and socioeconomic factors in Taiwan. *Acta Trop* 2011; 120: 52–8.
8. 劉明經、李美珠、蘇怡鳳等。台灣花東地區恙蟲病流行病學特性分析。疫情報導 2014；30(16)：316–21。
9. 黃詩淳、吳智文、劉定萍。2001 年至 2010 年台灣恙蟲病流行病學分析報告。疫情報導 2012；28(3)：45–52。
10. 周欽賢、連日清、王正雄：蟎。國立編譯館主編：醫學昆蟲學。增訂第二版。臺北：南山堂出版社，1991；323–44。
11. Lin PR, Tsai HP, Tsui PY, et al. Genetic typing, based on the 56-Kilodalton type-specific antigen gene, of *Orientia tsutsugamushi* strains isolated from chiggers collected from wild-caught rodents in Taiwan. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 3398–405.
12. 連日清：恙蟲病之感染防治及恙蟎生活。台灣醫界 1983；36：74–82。
13. 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.
14. Horinouchi H, Murai K, Okayama A, et al. Genotypic identification of *Rickettsia tsutsugamushi* by restriction fragment length polymorphism analysis of DNA amplified by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54: 647–51.