

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-000604

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫

計畫名稱：氣候變遷對新興蜚媒疾病病媒及病原體傳播的影響

年度研究報告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：王錫杰

研究人員：舒佩芸、施函君、鍾珞璿、廖顯竣

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

目 錄

一、圖次	3
表次	5
二、摘要：中文摘要	6
英文摘要	8
三、本文	
(一)、前言	10
(二)、材料與方法	20
(三)、結果	38
(四)、討論	48
(五)、結論與建議	55
(六)、計畫重要研究成果及具體建議	57
(七)、參考文獻	58
(八)、圖	63
表	76

圖次

- 圖一、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 16S rRNA gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Kimura 2+G，使用 Neighbor-Joining method。 63
- 圖二、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 16S rRNA gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Kimura 2+G，使用 Maximum Likelihood method。 64
- 圖三、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 groESL 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura-Nei+G，使用 Neighbor-Joining method。 65
- 圖四、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 groESL 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura-Nei+G，使用 Maximum Likelihood method。 66
- 圖五、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 gltA gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura 3-parameter+G，使用 Neighbor-Joining method。 67
- 圖六、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 gltA gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura 3-parameter+G，使用 Maximum Likelihood method。 68
- 圖七、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 p44/msp2 gene 部分序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura-Ni+G，使用 Neighbor-Joining method。 69
- 圖八、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 p44/msp2 gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Hasegawa-Kishino-Yano+G，使用 Maximum Likelihood method。 70
- 圖九、台灣地區 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 菌株 16S rRNA gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Kimura 2+G，使用 Neighbor-Joining method。 71
- 圖十、台灣地區 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 菌株 16S rRNA gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Kimura 2+G，使用 Maximum Likelihood method。 72
- 圖十一、台灣地區 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 菌株 groESL gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura-Nei+G，使用 Neighbor-Joining method。 73
- 圖十二、台灣地區 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 菌株 groESL gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model

為 Tamura-Nei+G，使用 Maximum Likelihood method。	74
圖十三、105 年 7 月至 106 年 7 月金門縣鼠類及恙蟲感染 Anaplasma & Ehrlichia 季節性分佈。	75

表次	
表一、 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體培養結果	76
表二、 <i>Rickettsia</i> 屬之立克次體 <i>gltA</i> 全長序列分析	77
表三、 <i>Rickettsia</i> 屬之立克次體 16S rRNA gene (<i>rrs</i>)全長序列分析	78
表四、 <i>Rickettsia</i> 屬之立克次體 gene D (<i>sca4</i>)全長序列分析	79
表五、 <i>Rickettsia</i> 屬之立克次體 <i>OmpA</i> 全長序列分析	80
表六、 <i>Rickettsia</i> 屬之立克次體 <i>OmpB</i> 全長序列分析	81
表七、105 年 7 月至 106 年 7 月金門縣鼠類及恙蟲 <i>Anaplasma</i> & <i>Ehrlichia</i> 感染率與氣象因子相關性分析(correlation coefficient, r)	82
表八、花蓮縣烏蜚形態鑑定、分子鑑定與蜚媒病原體檢測	83
表九、特生中心烏蜚形態鑑定、分子鑑定與蜚媒病原體檢測	90
表十、9699 菌株重要基因序列與 GeneBank 最接近序列比較及新種 <i>Rickettsia</i> spp. 基因序列判定標準	95
表十一、9543N2 菌株重要基因序列與 GeneBank 最接近序列比較及新種 <i>Rickettsia</i> spp. 基因序列判定標準	97

摘要

關鍵詞：蜱，蜱媒立克次體，無形體症，斑點熱，台灣

延續104-105年計畫分離培養台灣地區無形體症(Anaplasmosis)及斑點熱(Spotted fever)立克次體菌株，並比較台灣菌株與世界各國其他菌株的親緣關係。由*Anaplasma phagocytophilum*重要基因序列親緣關係分析中無論是23支16S rRNA gene序列、12支*groESL* gene序列、20支*gltA* gene序列及58支p44/msp2 gene 都顯示台灣的菌株與世界其他國家病人株在不同cluster，顯示似乎尚未發現具有致病性的*A. phagocytophilum*菌株。*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*也是相同的情形。依據Fournier *et al.* (2003)對於新種斑點熱立克次體(spotted fever rickettsia)的界定，分離自板齒鼠血蜱(*Haemaphysalis bandicota*)的立克次體，以9699株為代表，*rrs*, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* 這5個全長基因在Gene bank Blast相似度最高分別為99.7%, 99.5%, 95.4%, 98.2%及98.2%，相似度均低於同種的判定數值，表示為一新種。而分離自鑷形扇頭蜱(*Rhipicephalus haemaphysaloides*)的立克次體，以9543N2株為代表，*rrs*, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* 這5個全長基因在Gene bank Blast相似度最高分別為99.9%, 99.5%, 98.5%, 98.4%及98.0%，只有*rrs* (99.9%)符合 $\geq 99.8\%$ ，表示也為一新種。分析金門縣5鄉鎮鼠類*Anaplasma* & *Ehrlichia*每月感染率及恙蟲*Anaplasma* & *Ehrlichia*每月感染率的相關性及與

氣象因子的相關性，結果鼠類感染率與恙蟲感染率 $r = 0.6052$ ，相關性不高，而與氣象因子相關性較高為恙蟲感染率與月平均溫度 $r = -0.8649$ ，恙蟲感染率與月平均相對溼度 $r = -0.7474$ ，呈現負相關，顯示在冬季需注意金門縣民眾感染 Anaplasmosis 的情況。檢測由東華大學自然資源與環境學系及特有生物保育中心提供78隻烏蜱，蜱種鑑定包括4屬11種，其中有3種為台灣新記錄種(*Haemaphysalis wellingtoni*, *Ixodes columnae*, *Ixodes turdus*)，共有8種蜱媒病原體被檢測出，其中有5種為首次在台灣檢出(*Borrelia turdi*, *Anaplasma* sp. clone BJ01, *Ehrlichia* sp. BL157-9, *Rickettsia helvetica* 及 *Rickettsia monacensis*)。顯示確實台灣可能由候鳥傳播新的蜱種與新的蜱媒病原體，值得進一步長期的監測調查。

Abstract

Keywords: ticks, tick-borne virus, severe fever with thrombocytopenia syndrome, gene bank, Taiwan

This study followed up project from 2015 to isolate rickettsiae of anaplasmosis and spotted fever from Taiwan, and analyzed the phylogenetic relationships of Taiwan strains and other strains from the entire world. Analysis of phylogenetic relationships of important gene sequences of *Anaplasma phagocytophilum* revealed that Taiwan sequences located on different clusters with those from other countries, indicating that it seems no pathogenic *A. phagocytophilum* strain has been found, as well as Taiwan *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* strains. The *Rickettsia* species identification followed the criteria proposed by Fournier *et al.* (2003); sequences of *rrs*, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* were sequences and BLAST. The identities with *Rickettsia* sp. (9699) isolated from *Haemaphysalis bandicota* were 99.7% for *rrs* gene, 99.5% for *gltA* gene, 95.4% for *ompA* gene, 98.2% for *ompB* gene and 98.2% for *sca4* gene. All the identities were not higher than the cut-off value for identification. Based on the criteria, *Rickettsia* sp. (9699) should belong to a novel *Rickettsia* species. Furthermore, the identities with *Rickettsia* sp. (9543N2) isolated from *Rhipicephalus haemaphysaloides* were 99.9% for *rrs* gene, 99.5% for *gltA* gene, 98.5% for *ompA* gene, 98.4% for *ompB* gene and 98.0% for *sca4* gene. Only *rrs* (99.9%) is higher than 99.8%, *Rickettsia* sp. (9543N2) also should belong to a novel *Rickettsia* species. The correlation of monthly infection rate of *Anaplasma* & *Ehrlichia* between rodent and chigger in Kinmen County was not high ($r =$

0.6052), whereas the correlation between monthly chigger infection rate and monthly mean temperature was -0.8649, and between the monthly mean relative humidity was $r = -0.7474$, showed negatively correlation, indicating that the infection of anaplasmosis in Kinmen County should pay attention in winter. A total of 78 bird ticks collected from Department of Natural Resources and Environmental Studies Dong Hwa University and Endemic Species Research Institute were detected. Eleven species of four genera were identified, including three newly recorded species (*Haemaphysalis wellingtoni*, *Ixodes columnae*, *Ixodes turdus*). In addition, eight tick-borne pathogens were found, with five species (*Borrelia turdi*, *Anaplasma* sp. clone BJ01, *Ehrlichia* sp. BL157-9, *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia monacensis*) not previously isolated in Taiwan. Our study showed the transmission of newly tick species and tick-borne pathogens to Taiwan by migratory birds were possible, demonstrating the necessary of further surveillance on these highly mobile species.

前言

國際間相關研究顯示，氣候變遷所引起之溫度、雨量等氣象條件變化影響自然環境與動植物生態。昆蟲對其生理溫度沒有內控機制，會隨環境變化，因此其生殖速率、取食行為及分佈會隨全球暖化而擴張，同時濕度及降雨而成孳生源的水域，也成為昆蟲得以繁殖擴張的重要因素。世界衛生組織西太平洋區指出，在此區域氣候變遷可能影響的重要蟲媒疾病包括瘧疾、登革熱、日本腦炎、屈公病等蚊媒疾病，還有蜱媒腦炎、萊姆病、立克次體病等蜱媒疾病¹。研究亦指出蜱或宿主動物都很容易受到氣候變遷環境的影響，而導致物種數量的增加或減少，進而影響疾病的傳播，故須就相關疫情風險進行監測，落實防疫以降低病原體的擴散及本土流行，及建立我國完整的基因資料庫，分析不同基因型病原株的地理分佈與基因序列，瞭解不同病原株在台灣各地區之演化及引進情形。

台灣的蜱種，根據 Robbin (2005)報告有 9 屬 32 種，其中包括非常重要的病媒種類 *Ixodes persulcatus* 全溝硬蜱²，全溝硬蜱分佈於東歐、中亞、北亞、中國及日本，是萊姆病 (Lyme disease)、巴貝斯原蟲病 (Babesiosis)、蜱媒腦炎(tick-borne encephalitis)及人類粒球無形體症等的病媒。但此篇報告是根據 1955-1978 年台灣的採集記錄所整理，至今約 40-60 年。台灣近 10 年經多次採集並未再發現全溝硬蜱，顯見也許是氣候變遷或環境變遷造成宿主動物的減少以致全溝硬蜱無法完成其生活史。

中國大陸及日本、韓國有許多蜱媒疾病，除上述萊姆病、巴貝斯原蟲病、蜱媒腦炎及人類無形體症(human granulocytic anaplasmosis, HGA)，還有

發熱伴血小板減少綜合症(sever fever with thrombocytopenia syndrome)、人單核球艾利希氏體症(human monocytic ehrlichiosis, HME)及斑點熱(spotted fever)等。人顆粒球無形體症，人單核球艾利希氏體症及斑點熱為臨床症狀類似，流行病學與病因學迥異的蜱媒立克次體疾病(Tickborne rickettsial diseases, TBRD)。HGA 的病原體為 *Anaplasma phagocytophilum*，HME 的病原體為 *Ehrlichia chaffeensis* 皆屬於立克次體目(Rickettsiales)之無形體科(Anaplasmataceae)，而斑點熱的病原體則為一群立克次體(spotted fever group rickettsia, SFGR)屬於立克次體目(Rickettsiales)之立克次體科(Rickettsiaceae)。無形體科(Anaplasmataceae)除 *A. phagocytophilum*、*E. chaffeensis* 外尚包括 *E. ewingii*、*E. canis* 及 *Neorickettsia sennetsu* 等，其攻擊人類的標的為循環系統中的白血球。*A. phagocytophilum* 引起人顆粒球無形體症(human granulocytic anaplasmosis, HGA；舊稱 human granulocytic ehrlichiosis, HGE)；*E. chaffeensis* 造成人單核球艾利希氏體症(human monocytic ehrlichiosis, HME)³⁻⁵；而造成犬顆粒球艾利希氏體症(canine granulocytic ehrlichiosis, CGE)之病原體 *E. ewingii* 於 1998 年發現亦會感染人類，稱為 human ewingii ehrlichiosis⁶；*Neorickettsia sennetsu* 則造成人腺熱(sennetsu fever)。這些不同病原體所造成的共同病徵包括發燒、白血球減少、血小板減少及血清轉胺酶(transaminase)活性增加等，在臨床上不易區分

各個疾病，惟其皆對 doxycycline 敏感^{7,8}。近年來有許多新的艾利希氏體陸續被發現，如 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 在 2000 年左右曾報告發現於中國與日本的溝鼠(*Rattus norvegicus*)，日本的卵形硬蜱(*Ixodes ovatus*)及荷蘭的篋豆硬蜱(*Ixodes ricinus*)⁹，而其對人的致病性則在 2010 年由 3 名德國、瑞典及瑞士的患者身上被發現¹⁰⁻¹²。

HGA 及 HME 在日本、韓國、中國、英國、中歐的斯洛凡尼亞(Slovenia)及美國皆有報告病例^{8,13,14}。在美國多發生於 5 至 8 月，2008 年的報告病例 HGA 有 1009 例；HME 有 957 例，其死亡率並不高 HGA 約 0.7%，HME 約 3%，且多發生在免疫不全病人或合併其他疾病如糖尿病之患者¹⁵。

HGA 之病媒在美東為 *Ixodes scapularis*，美西為 *I. pacificus*，歐洲及亞洲分別為 *I. ricinus* 及 *I. persulcatus*。一些小型哺乳動物如白足鼠(*Peromyscus leucopus*)、灰足林鼠(*Neotoma fuscipes*)及 *Apodemus*、*Microtus*、*Clethrionomys* 種類鼠種可能為其貯主(reservoir)，而鹿科動物亦有此可能⁸。HME 之病媒為 *Amblyomma americanum*，犬及鹿可能為其貯主。

HGA 及 HME 的診斷可經由血液塗抹片、PCR、細胞培養及血清學檢測。其中發病小於 1 週的患者以 PCR 敏感性最高約 60-90%，發病超過 3 週的患者經由血清抗體陽轉 4 倍上升，敏感性可達 95% 以上¹⁵。PCR 的標

的基因以 16S rRNA gene 為主，其他還有 *gltA* gene、*p44* gene、*ank* gene 及 *groE* gene 等¹⁶⁻¹⁹。

台灣有關艾利希氏體之研究在動物界較多，尚無人類感染之病例報告。其中犬隻會感染 *E. canis*、*E. platys* 及 *E. euqi*，台灣北部犬隻 *E. platys* 感染率在都市犬中盛行率為 8.9%，來自嚴重蜱感染的狗窩為 97.1%；臺灣南部地區犬隻 *E. canis* 感染率為 14.4%²⁰⁻²²。陳(2007)以 *gp36* 基因做為檢測 *E. canis* 之標的，*gltA* 基因做為檢測 *Anaplasma platys*(舊稱 *Ehrlichia platys*) 之標的，發現台灣地區家貓血液檢體中，分別有 5.5% 及 2.0% 陽性率²³。Hsieh *et. al.*(2010)發現經由 16S rRNA、*gp19* 及 *gp36* 三段基因序列分析，台灣的 *E. canis* 至少有 4 種不同株(strain)，在親緣關係上屬同一群，而與其他不同地理群有區別²⁴。不同艾利希氏體屬病原體雖有其主要病媒蜱種及侵犯宿主，但仍有報告在其他蜱種發現及感染其他宿主，如日本有 *E. canis* 感染人類之報告²⁵。翁等(2010)調查金門地區鼠類外寄生蜱發現於小黃腹鼠採集之鑷形扇頭蜱(*Rhipicephalus haemaphysaloides*)與粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*) 檢測出 *Ehrlichia chaffeensis*，所有蜱之最小感染率為 1.8%²⁶。並在 2012 年於金門 108 隻野鼠發現體內肝脾等內臟 *E. chaffeensis* DNA 感染率為 14.8%²⁷。

無形體症(Anaplasmosis)或稱邊蟲症，在動物界最常見為牛邊蟲症，病原體為 *Anaplasma marginale*。*A. marginale* 排列於感染紅血球之邊緣，1 個、2 個或以上呈圓或橢圓形，在電子顯微鏡下呈分葉狀，只在紅血球內發現，故稱邊蟲。但另一種 *A. marginale* ssp. *Centrale* (*A. centrale*)則寄生在紅血球細胞質中央，病原性較弱²⁸。*A. marginale* 會破壞紅血球而導致漸進性貧血及黃膽。林(2007)調查台灣 12 個牧場，發現乳牛邊蟲症盛行率為 53.3%，以南部地區較高²⁹。

本署在 2011-2013 年對台灣環境中的 *Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp.進行調查，發現鼠蜱、狗蜱(血紅扇頭蜱 *Rhipicephalus sanguineus*)及野生動物外寄生蜱 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 19.75%、11.94%及 35.8%。共檢出 18 種 *Anaplasma* spp.& *Ehrlichia* spp.，其中已知有 8 種可能為人畜致病性(*A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. bovis*, *A. marginale*, *A. centrale*, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensi*)；另在鼠類脾臟及血液中 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 64.13% 及 47.25%。在這些檢出的 *Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp.中人類重要的病原體 *A. phagocytophilum* 在鼠蜱、狗蜱及野生動物外寄生蜱中 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 2.62%、8.36%及 13.89%；鼠類脾臟及血液 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 14.13% 及 4.40%。人群檢體的部份，檢驗

100-101 年金門縣恙蟲病通報病例 *A. phagocytophilum* 血清抗體陽性率為 19.7% (57/289)，而對照組血清抗體陽性率 6.38% (3/47)，具有顯著性差異 ($X^2=4.9$, $p=0.0268$)，同時在 87 個配對血清中發現 12 個病例兩次採血 *A. phagocytophilum* 血清抗體效價有四倍上升，顯示金門地區發燒病人確實需要注意是否為人顆粒球無形體症。翁等(2015)調查金門地區鼠類亦發現 *A. phagocytophilum* 在鼠類肝脾盛行率為 17.2%³⁰。本計畫將針對金門縣野鼠及外寄生恙蟲 *Anaplasma & Ehrlichia* 進行每月監測，以瞭解 *Anaplasma & Ehrlichia* 在宿主動物及病媒之感染率與溫度、溼度、雨量等氣候因子的關係。

斑點熱是一種世界性散發的立克次體疾病，主要是經由蜱(ticks)、蟎(mites)及跳蚤(fleas)的媒介而使人得病。引起斑點熱的病原體種類繁多且不斷的有新的種類被發現，早期發現的如發生在美國、加拿大及墨西哥等地，由 *Rickettsia rickettsii* 引起的洛磯山斑點熱(Rocky mountain spotted fever)；發生在非洲、印度及地中海沿岸，由 *R. conorii* 引起的蒲東熱(Boutonneuse fever)、肯亞蜱熱(South African tick typhus)，發生在澳洲，由 *R. australis* 引起的昆士蘭蜱熱(Queensland tick typhus)；發生在美國、韓國、烏克蘭及克羅埃西亞，由 *R. akari* 引起的立克次體痘及發生在日本，由 *R. japonica* 引起的日本斑點熱(Japanese spotted fever)等³¹⁻³³。後來發現的種類如發生在俄

國、中國、蒙古及巴基斯坦等地由 *R. sibirica* 引起的北亞蜱熱(North Asian tick typhus)，發生在澳洲南部及泰國由 *R. honei* 引起的澳洲斑點熱(Flinders Island spotted fever)，發生在非洲撒哈拉沙漠以南及加勒比海，由 *R. africae* 引起的非洲蜱咬熱(African tick bite fever)及全世界分佈經由跳蚤媒介，由 *R. felis* 引起的蚤媒斑點熱(Flea-borne spotted fever)等，如今斑點熱病原體已至少有 18 種以上且陸續的被發現中^{34,35}。台灣第一例斑點熱病例報告為 2006 年 5 月自南非旅遊回來，感染 *R. africae* 之境外移入個案^{36,37}，而第一例斑點熱之本土病例報告也已出現證實感染 *R. felis*³⁸，同時野外貓蚤族群之 *R. felis* 感染率，單隻貓蚤平均感染率為 18.8%(13/69)，亦於流浪貓中檢測出血清抗 *R. felis* IgG 抗體效價為 1:320³⁹。而人群斑點熱血清流行病學調查，在台南的盛行率調查為 3.5-4.4%⁴⁰，同時陳等(1997)報告金門地區的鼠類血清檢體斑點熱的抗體陽性率為 66.4%；採自台北市南港區、松山區，台北縣中和市，永和市及宜蘭縣福山植物園的 21 隻鼠類，斑點熱的抗體陽性率為 42.9%⁴¹。

Rickettsia 屬之立克次體除可經由鼠類血清抗體監測外，亦可由鼠類外寄生節肢動物發現。在日本於台灣革蜱(*Dermacentor taiwanensis*)及褐黃血蜱(*Haemaphysalis flava*)分離出 *R. japonica*，於單刺硬蜱(*Ixodes monospinosus*)、卵形硬蜱(*I. ovatus*)及全溝硬蜱(*I. persulcatus*)分離出 *R. helvetica*，同時亦於龜形花蜱(*Amblyomma testudinarium*)分離出新的斑點熱

立克次體菌株 *R. anan*^{42,43}。在韓國亦從長角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*) 檢測出 *R. japonica* 及 *R. rickettsia*^{44,45}，甚至從恙蟲體內檢測出近似 *R. australis*, *R. akari*, *R. japonica*, *R. conorii* 及 *R. felis* 之立克次體種類⁴⁶。台灣地區依文獻記載有 32 種蜱，包括硬蜱科有 7 屬 29 種，軟蜱科有 2 屬 3 種²，是否有蜱種攜帶 *Rickettsia* 屬立克次體，在鼠類間造成傳播循環甚至叮咬人成為病媒，都是值得探究的。

本署在 2006-2010 年對台灣地區低海拔鼠類進行 *Rickettsia* 屬立克次體調查，採集之 1283 隻鼠類血清以 3 種立克次體抗原玻片(*Rickettsia rickettsii*、*R. conorii* 和 *R. typhi*)進行血清學檢測。結果發現小黃腹鼠斑點熱立克次體抗體陽性率離島、東部、西部分別為 94.5%、94.4%及 94.8%，非常相近；所有鼠種地方性斑疹傷寒立克次體抗體陽性率以離島最高為 3.42%，其次為西部 1.89%，東部最低為 1.53%，顯示台灣離島野外鼠類感染地方性斑疹傷寒立克次體有偏高的現象。鼠類本身及其外寄生節肢動物是否帶有 *Rickettsia* 屬立克次體，取其鼠類內臟以 120-135 kDa surface antigen (*ompB*)及 citrate synthase (*gltA*)為基因標的進行 *Rickettsia* 屬立克次體 nested-PCR 檢測，離島、東部、西部鼠類脾肝腎臟中平均偵測出 *Rickettsia* 屬立克次體的比例為 61.1%、70.4%及 49%，顯示這些野外鼠類皆有成為 *Rickettsia* 屬立克次體傳染窩(reservoir)的可能性。而 *Rickettsia* 屬立克次體在

採自台灣地區蜱、恙蟎、跳蚤及厲蟎的 nested-PCR 的陽性率分別為 31.9%、37.4%、26.9% 及 20.7%。於台中縣採獲之板齒鼠血蜱及嗜龜花蜱(*Amblyomma geoemydae*)及台東採獲的粒形硬蜱分別培養出斑點熱立克次體，經由幾個重要的基因如 *ompA* 及 *ompB* 與目前已知斑點熱立克次體菌株序列不同，研判為三株新的斑點熱立克次體菌株序列。所有檢測出之 500 株 *Rickettsia* 屬立克次體菌株序列進行親緣關係分析，結果可分成 10 群，其中以近似 *R. conorii* 的菌株最多，佔 37.43%，其次為近似 *Rickettsia* sp. MB74-1 的菌株，佔 22.91%。^{47,48}

本研究延續 2015-2016 年透過對台灣本島及金馬澎湖進行捕鼠採集，瞭解鼠類宿主動物感染及攜帶蜱媒立克次體之生態分布，並由蜱媒立克次體分離培養且進行基因序列親緣關係分析，2017 年將持續進行分離培養 *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. 及 *Rickettsia* spp.，以 16S rRNA, p44/msp2, *gltA* 及 *groESL* 進行 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 特性分析；在 *Rickettsia* spp. 部分則使用 190 kDa surface antigen (*OmpA*)、120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)、citrate synthase (*gltA*)、17 kDa antigen gene (*htrA*)、16S rRNA 及 gene D，透過這幾個基因之全長序列比對可分辨出所有 *Rickettsia* 屬種類，甚至可以區分出新的 *Rickettsia* 菌株⁴⁹。期望以此分離出更多的本土型菌株納入本署病原體基因資料庫及加入例行的血清

學檢驗中以提高人類感染的檢出率，並透過菌株分析，研判與周圍國家菌株的關係，評估氣候變遷對新興蜚媒疾病病媒及病原體傳播的影響，同時將監測候鳥身上蜚種及蜚媒病原體，以評估台灣在氣候變遷下經由候鳥傳播蜚媒疾病的潛在風險。

材料與方法

本研究計畫藉由先前調查所得鼠類檢體，以分離培養 *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp.及 *Rickettsia* spp.為主要目標，以 16S rRNA, p44/msp2, *gltA* 及 *groESL* 進行 *Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp.特性分析；在 *Rickettsia* spp.部分則使用 190 kDa surface antigen (*OmpA*)、120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)、citrate synthase (*gltA*)、17 kDa antigen gene (*htrA*)、16S rRNA 及 gene D，透過這幾個基因之全長序列比對可分辨出所有 *Rickettsia* 屬種類，甚至可以區分出新的 *Rickettsia* 菌株。期望以此分離出更多的本土型菌株納入本署病原體基因資料庫及加入例行的血清學檢驗中以提高人類感染的檢出率。

一、樣本

已採得樣本包括 2014 年採集桃園市、台中市、雲林縣、台南市及屏東縣等西部縣市，2015 年採集宜蘭縣、花蓮縣及台東縣等東部縣市，2016 年採集金門縣、連江縣及澎湖縣等離島縣市鼠類肝臟、脾臟、腎臟、心臟及肺臟存放於-80°C 的冰箱；另 2015 年採集花蓮縣、台東縣及 2016 年採集金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類全血分離 buffy coat 存放於-80°C 的冰箱。

二、檢體處理

1. 鼠類器官 DNA 萃取：將 25 mg 鼠類肝、腎或 10 mg 脾放入 2ml 之圓底 eppendorf tube，加入 1 ml 的無菌二次水靜置 30 分鐘，離心並去除無菌二次水，重複三次後，加入 80 μ l 的 PBS 緩衝液，再加入 3 mm 鋼珠用 TissueLyser 以每秒 30 下共 2.5 分鐘將組織打散，離心後再依 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) 萃取 DNA，以 60 μ l 無菌二次水 elute，將 DNA 置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2. 鼠類 buffy coat 萃取：

- (1) 將捕獲鼠類抽取 1~3ml 血液置於 3ml K3-EDTA 採血管中，混合均勻，保存於 4 $^{\circ}$ C。
- (2) 每支血液檢體準備 3 支 15ml 離心管，標上編號，並分別加入 4ml PBS、5ml Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, 17-1440-03) 及 6ml PBS。
- (3) 以無菌 3ml 滴管，將血液檢體加到 4ml PBS，混合均勻。
- (4) 將步驟 3 混合液沿著管壁緩慢加到 5ml Ficoll，不可混勻，以 2500rpm 離心 25min，離心後的中間白色層為 buffy coat。

- (5) 以無菌 3ml 滴管吸取中間白色層 buffy coat，加到 6ml PBS 混合均勻，以 2000rpm 離心 10min，倒掉上清液，取得的 pellet 即為 buffy coat。
- (6) 取 0.8ml IMDM (20%FBS, 10%DMSO) 加到 pellet 管中，混合均勻。
- (7) 步驟 6 之 200 μ l 將萃取 DNA，並進行 *Anaplasma* & *Ehrlichia* real time PCR 檢測。其餘 600 μ l 分裝至 2 支 2ml 冷凍小管，每支各 300 μ l，保存於-80 $^{\circ}$ C。

三、Anaplasma & Ehrlichia PCR 檢測方法

1. Anaplasma & Ehrlichia real time PCR：參考 Parola *et al.*(2000)的方法⁵⁰，使用 Ehrlichia genus-specific primer

EHR 16SD 5'- GGT ACC (C/T) AC AGA AGA AGT CC-3'

EHR 16SR 5'-TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC-3'

SYBR Green real-time PCR 反應流程為：先於 95 $^{\circ}$ C，預熱 15 min；再依序進行 94 $^{\circ}$ C (30 sec)/ 55 $^{\circ}$ C (30 sec)/ 72 $^{\circ}$ C (90 sec) 之循環，一共 45 循環，於 95 $^{\circ}$ C 1 min 後進行 Melting 65 $^{\circ}$ C 30 sec, 0.5 $^{\circ}$ C/ cycle，一共 45 循環。

將陽性 PCR 產物直接進行定序，再以 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 進行 DNA 序列之 BLAST 比對。

2. *Anaplasma phagocytophilum* p44/msp2 nested PCR：參考 Ohashi *et al.* (2013) 及 Wang *et al.* (2013)的方法^{51,52}，基因標的為 p44/msp2

第一次 PCR primer

msp2-F: ACTTATGGTGTTCGGGAGTCTTC

msp2-R: AATAATAGGAACGGTCACGGAG

第二次 PCR primer

p3726F: GCTAAGGAGTTAGCTTATGA

p4257R: AGAAGATCATAACAAGCATTG

PCR 反應流程為：先於 95°C，預熱 5 min；再依序進行 95°C (45 sec)/ 55°C (45 sec)/ 72°C (2 min 30 sec) 之循環，一共 40 循環，於 72°C 10 min 中止反應。第二次則先於 95°C，預熱 5 min；再依序進行 95°C (30 sec)/ 52°C (30 sec)/ 72°C (1 min 30 sec) 之循環，一共 40 循環，於 72°C 10 min 中止反應。

將陽性 PCR 產物直接進行定序，再以 NCBI 網站

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 進行 DNA 序列之 BLAST 比對。

四、*Rickettsia* 屬之立克次體 nested-PCR 檢測

1. 參考 Choi *et al.*(2005)之方法⁵³，並略加修正。偵測 *Rickettsia* 屬之立克次體的標的基因為 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)、citrate synthase (*gltA*)。
2. 增幅 citrate synthase (*gltA*)：第一次 PCR 每一管 0.5 ml 微量離心管依序加入含有 17.5 μ l 去離子水、10 μ l 之 5X PCR buffer (Promega)、2 μ l 之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200 μ M)、3 μ l 之 25 mM MgCl₂ (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、6 μ l 之 3.3 μ M primer RpCS.877p : 5'-GGGGGCCTGCTCACGGCGG-3' 及 primer RpCS.1258n:5'-AATGCAAAAAGTACAGTGAACA-3' (引子之終濃度為 400 nM)、3 μ l 之 DNA 模板及 0.5 μ l 酵素 Taq (Promega) (5 U/ μ l) (終濃度為 2.5 U) 等之 PCR 反應液。PCR 反應流程為：先於 95°C，預熱 5 min；再依序進行 95°C (15 s)/ 54°C (15 s)/ 74°C (30 s) 之循環，一共 35 循環；最後，於 74°C 3 min 中止反應。第二次 PCR 反應液中引子更改為 3 μ l 之 3.3 μ M primer RpCS.896 : 5'-GGCTAATGAAGCAGTGATAA-3' 及 primer RpCS.1233n :

5'-GCGACGGTATACCCATAGC-3' (引子終濃度為 200 nM)，其餘反應液如同第一次。PCR 的反應流程中之溫度循環條件與第一次相同，一共進行 35 循環。

3. 增幅 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*): 第一次 PCR 每一管 0.5 ml 微量離心管依序加入含有 17.5 μ l 去離子水、10 μ l 之 5X PCR buffer (Promega)、2 μ l 之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200 μ M)、3 μ l 之 25 mM MgCl₂ (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、6 μ l 之 3.3 μ M primer rompB OF : 5'-GTAACCGGAAGTAATCGTTTCGTAA-3' 及 primer rompB OR : 5'-GCTTTATAACCAGCTAAACCACC-3' (引子之終濃度為 400 nM)、3 μ l 之 DNA 模板及 0.5 μ l 酵素 Taq (Promega) (5 U/ μ l) (終濃度為 2.5 U) 等之 PCR 反應液。PCR 反應流程為：先於 95°C，預熱 5 min；再依序進行 95°C (15 s)/ 54°C (15 s)/ 74°C (30 s) 之循環，一共 35 循環；最後，於 74°C 3 min 中止反應。第二次 PCR 反應液中引子更改為 3 μ l 之 3.3 μ M primer rompB SFG IF : 5'-GTTTAATACGTGCTGCTAACCAA-3'，primer rompB SFG/TG IR : 5'-GGTTTGGCCCATATACCATAAG-3' 及 primer rompB TG IF : 5'-AAGATCCTTCTGATGTTGCAACA-3' ((引子終濃度為 200 nM)，其餘反應液如同第一次。PCR 的反應流程中之溫度循環條件與第一次相

同，一共進行 35 循環。

4. 取 10 μ l 第二次 PCR 增幅的產物，於 1.5% agarose gel (Promega, USA) 之 1X TBE buffer (Sigma) 的膠片中進行電泳分析。在 agarose gel 凝固前，用 4 μ l 核酸染劑 (Nucleic acid Stain) 進行染色，以紫外光照射觀察並照相，並將其二次 PCR 增幅的產物進行 DNA 序列定序，再以 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 進行 DNA 序列之 BLAST 比對。

五、*Rickettsia* 屬之立克次體及 *Anaplasma* & *Ehrlichia* 選殖與定序

1. 界定新菌種的 *Rickettsia* 屬之立克次體需經由下列標的基因全長基因的選殖與定序：190 kDa surface antigen (*OmpA*)、120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)、citrate synthase (*gltA*)、17 kDa antigen gene (*htrA*)、16S rRNA 及 gene D。標的基因的 PCR 增幅依 Fournier *et al.*(1998)、Roux and Raoult(1995)、Roux and Raoult(2000)、Roux *et al.*(1997)及 Sekeyova *et al.*(2001)報告所述⁵⁴⁻⁵⁷。
2. 界定新菌種的 *Anaplasma* & *Ehrlichia* 需經由下列標的基因全長基因的選殖與定序：16S rRNA、p44/msp2、*gltA* 及 *groESL*。標的基因的 PCR

增幅依 Ohashi *et al.* (2013)、Wang *et al.* (2013)、Kawahara *et al.* (2006)、Loewenich *et al.* (2010)、Blaňarová *et al.* (2014)、Yang *et al.* (2016)報告所述^{10,51,52,58-60}。

3. 選殖之準備工作：取出冷藏之添加 kanamycin 之 plate，使回復至室溫並去除水滴。取出放置於-80°C之 competent cell 解凍，放冰塊上備用，並打開 42°C 水浴槽。

(一)TOPO cloning reaction

1. 將預備進行 cloning 之 PCR 產物置於 0.2 cc 之 eppendorf 中，加入 1µl Salt solution (invitrogen, USA)，1µl TOPO vector (invitrogen, USA)，稍混合後靜置於室溫中約五分鐘，若產物大於 1kb 時可視情況增加時間。
2. 將作用後之混合物至於冰上。

(二)Transforming 至 DH5 α -T1 Competent cell 中

1. 取 1.5cc 之 eppendorf，加入約 15µl 之 One shot chemically Competent *E.coli* (invitrogen, USA)，再加入 2µl 作用後之混合物，以 tip 尖輕攪混合之，插於冰上使其作用約 5-30 分鐘(通常 15 分鐘即可)。

2. 將作用後產物置於 42°C 水浴槽中進行 heat shock，40 秒後馬上取出置於冰上使其急冷約五分鐘，目的在使 plasmid 進入 Competent cell 中。
3. 每管加入 250 μ l 的 S.O.C medium (invitrogen, USA)。
4. 將 eppendorf 倒放固定於架上，置於 37°C 恆溫箱中，以 200 rpm 水平震盪培養一小時，同時將去除水滴之 plate 也放入 37°C 中預熱。
5. 取出混合物，吸取 50-100 μ l 滴於預熱後之 plate 上，加入玻璃珠輕搖，使其均勻塗布於 plate 上。建議每個 sample 可塗布兩個 plate，滴上不同液量如 50、100 μ l，較有機會得到生長良好的 colony。塗布後將玻璃珠倒入 70 % 酒精中回收。
6. plate 置於 37°C 中培養 overnight。

(三)檢查 transformation 結果

1. 檢查前一天之 plate 生長情形，挑選生長良好之 plate。
2. 以 loop 輕挑單一 colony，塗布於新的 medium 上使其生長。
3. 塗布過之 loop 加入 PCR reagent 中輕搖，以 M13F 及 M13R 為 primer，

可作為 template 進行 PCR 反應，測試轉型是否成功，PCR 產物進行定序與分析。

六、老鼠組織 *Rickettsia* 屬之立克次體分離培養

(一) L929 細胞繼代培養

1. 以 37°C 水浴 preheat MEM 培養液及 0.25% Trypsin-EDTA。MEM 培養液的組成為(Minimum Essential Medium 1X+ Earle's salts+ L-Glutamine) 外加 4%FBS(Fetal Bovine Serum) 及 1% Antibiotic(Penicillin 10,000units/ml, Streptomycin 10mg/ml, Amphotericin 0.025mg/ml)
2. 原 75T flask 中細胞培養至八分滿以上，倒乾或吸乾 flask 中的培養液。
3. 加入 2~3cc 之 Trypsin-EDTA，緩緩搖晃 flask 使 Trypsin-EDTA 均勻分布，待 Trypsin-EDTA 顏色開始變黃後，吸去 Trypsin-EDTA 至餘 0.2~0.3cc，蓋上瓶蓋置入 37°C 培養箱 2~3 分鐘。
4. 取出 flask，可先以些許 MEM 輕輕沖洗 L929 細胞再吸起，視細胞生長情形及實驗需求決定稀釋比例，以 1:6 為例，取 12cc MEM 由 flask 底部開始沖洗，反覆吸放，可分四至五個區域將整個 flask 沖洗一次，至底部 L929 細胞均勻分布在 MEM 中為止。

5. 取 2cc 細胞懸浮液置入新 75T flask 中，再加入 13cc MEM，蓋上瓶蓋，但將瓶蓋懸開，置入 37°C, 5% CO₂ 培養箱中培養。

(二) Shell vial 細胞培養

1. 以 37°C 水浴 preheat MEM 培養液及 Trypsin-EDTA，shell vial 空瓶先置於架上以 UV 燈殺菌半小時以上。
2. 75T flask 中細胞培養至八分滿以上，倒乾或吸乾 flask 中的培養液。
3. 加入 2~3cc 之 Trypsin-EDTA，緩緩搖晃 flask 使 Trypsin-EDTA 均勻分布，待 Trypsin-EDTA 顏色開始變黃後，吸去 Trypsin-EDTA 至餘 0.2~0.3cc，蓋上瓶蓋置入 37°C 培養箱 2~3 分鐘。
4. 取出 flask，可先以些許 MEM 輕輕沖洗 L929 細胞再吸起，視細胞生長情形及實驗需求決定稀釋比例，一般八成以上細胞可先以約 10cc MEM 由 flask 底部開始沖洗，反覆吸放，分四至五個區域將整個 flask 沖洗一次，至底部 L929 細胞均勻分布在 MEM 中為止。
5. 計數細胞：取 0.1cc 細胞懸浮液加入 0.9cc MEM，吸取 0.5cc，加入 0.5cc 之 Trypan blue，即得稀釋 20 倍之細胞稀釋液，取一滴輕滴在血球計數

器上，蓋上蓋玻片後在顯微鏡下進行細胞計數。

6. 培養所需濃度約為每 cc 中含 5×10^8 個細胞，依此比例以 MEM 稀釋。
每個 shell vial 需要 1cc 細胞液。
7. 將細胞液加入 shell vial 中，並略側瓶身輕搖，去除玻片底部氣泡以免玻片傾斜影響細胞的貼附。
8. 蓋上瓶蓋，但瓶蓋懸開，置入 37°C , 5% CO_2 培養箱中培養一日以上。

(三) 老鼠組織研磨液接種 shell vial

1. 將 30mg 老鼠肝、脾、腎組織置入微量離心管，每個微量離心管加入 200 μl MEM 培養液，以組織研磨機頻率 30/s 振盪 3 分鐘，磨碎後加入 MEM 補至 1cc。
2. 取前一日培養之 shell vial，每個 shell vial 加入 400 μl 研磨液進行接種，以剩餘研磨液萃取 DNA 進行 PCR。
3. 將 shell vial 於 22°C ，700xg 離心 70 分鐘，使立克次體進入 L929 細胞。
4. 丟棄 shell vial 離心後的上清液，加入 1cc MEM (4%FBS)輕搖瓶身，

洗去雜質後丟棄上清液，如此清洗三次，最後加入 1cc MEM，旋緊瓶蓋防止污染，置入 5% CO₂ 及 32°C 培養箱中進行培養。

七、老鼠組織及蜱 *Anaplasma phagocytophilum* 的分離與鑑定

(一) 鼠類 buffy coat 接種 HL-60 細胞進行 *Anaplasma phagocytophilum* 分離培養

1. 事先準備好培養於 T25 flask 的 HL-60 細胞 (5 x 10⁵ cells/ml, 4ml)，使用 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, GlutaMAX™ Supplement; gibco) 或 Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 Medium, HEPES; gibco) 做為培養液，內含 10% Fetal Bovine Serum (Fetal Bovine Serum, qualified, US origin; gibco) 及 1% Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (Antibiotic-Antimycotic, 100X; gibco)，培養於 37°C、5% CO₂ 培養箱。
2. 將保存於 -80°C 之 300µl 鼠類 buffy coat，直接置於室溫水浴 1min 進行解凍，接種於 HL-60 細胞盤，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱進行培養數天。
3. 每 3~4 天於顯微鏡下觀察細胞狀態，補充新鮮培養液或更換為新鮮培

養液，將細胞密度控制在 $5 \times 10^5 \sim 10^6$ cells/ml；並取 1ml 進行 DNA 萃取及 *Anaplasma* & *Ehrlichia* real time PCR 檢測，確認 *Anaplasma phagocytophilum* 是否順利生長。

4. 每 7 天進行 IFA 檢測，確認 *Anaplasma phagocytophilum* 感染 HL-60 細胞之比率。待感染比率大於 50%，再加入新鮮未感染之 HL-60 細胞進行放大培養。

(二) 鼠類 buffy coat 接種 Tick cell line 進行 *Anaplasma phagocytophilum* 分離培養

鼠類 buffy coat 之 *Anaplasma phagocytophilum* 分離培養，除了 HL-60 細胞外，亦有研究指出使用 Tick cell line 進行 *Anaplasma phagocytophilum* 分離培養，如 ISE6 細胞及 IDE8 細胞。

ISE6 細胞，使用 L15B300 培養液，內含 5% FBS、5% tryptose phosphate broth (Difco, Detroit, MI)、0.1% lipoprotein concentrate (MP Biomedical, Irvine, CA)、0.25% NaHCO_3 及 25 mM HEPES (pH 7.5)，於 34°C 培養箱進行培養。

IDE8 細胞，使用 L-15B 培養液，內含 5% FBS、10% tryptose phosphate

broth、0.1% bovine lipoprotein concentrate (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)、100 IU/ml penicillin 及 100 µg/ml streptomycin，於 32°C 培養箱進行培養。若能順利感染 IDE8，需再補充 0.1% NaHCO₃ 及 10 mM HEPES，且培養液為 pH 7.5，於 34°C 培養箱進行培養。

八、Rickettsia 屬之立克次體大量純化

(一) 以超音波高速振盪機及離心進行粗純化

1. 準備數十盤 T75，移除培養液，輕輕刮取細胞，以 5~10ml 的 MEM (4%FBS) resuspend 細胞。
2. 將細胞懸浮液每 5ml 置入 50ml 離心管，放在冰上，利用 sonication 將 L929 lyse，條件用強度 6.5，10sec 四次，每次中間休息 10sec。
3. 離心 1000 xg, 5min, 4°C，將 L929 host cells 及 heavy cellular debris 去除，吸取上清液。(此步驟若使用非懸掛式，需小心吸取上清液)
4. 將上清液利用 10ml 針筒通過 0.45µm 小飛碟 (騰達行 PVDF)，並移到 15ml 離心管。
5. 離心 25,000 xg, 10min, 4°C，小心去除上清液。
6. 將 pellet 以 1 ml SPG 回溶，並移到 1.5ml tube。
7. 離心 25,000 xg, 10min, 4°C，小心去除上清液。

8.將 pellet 置於冰上，再以 1 ml SPG 回溶（為濃縮用 200ul 即可）。

(二) 以 30% Percoll 密度梯度超高速離心進行分層純化

1. Percoll 以 SPG buffer 稀釋為 30%，將 Rickettsia suspension 小心加在上方

（總體積用 13.2ml,344059），離心 25,000 xg, 60min。

2. (1) 吸取我們要的那層，以 SPG buffer 稀釋，再離心 25,000 xg, 60min，

取 pellets。

(2) 量多時，吸取要的那層收集成一管（體積不夠用 Percoll 補），離心

77,000 xg, 30min；吸取要的那層，以 SPG buffer 稀釋，再離心 6,000 xg,

20min，取 pellets，再用 SPG buffer 回沖並離心重複 1~2 次。

九、金門縣鼠類及外寄生恙蟲 Anaplasma & Ehrlichia 感染率調查

此部分捕鼠及採檢委請金門縣衛生局執行，在其每月 5 鄉鎮捕鼠

時，將捕獲鼠隻麻醉解剖，取 0.5 cm 脾臟置於 75%酒精的 2ml 檢體管中，

並將鼠耳中有恙蟲寄生的皮膚剪下，置於 2 ml 檢體管中，再加入 1ml 75%

酒精。送回林森實驗室進行 Anaplasma & Ehrlichia real time PCR 檢測。

鼠類脾臟單隻檢測，恙蟲則每隻老鼠取 50 隻恙蟲萃取 DNA 檢測。

十、鳥類外寄生蜚蟬媒病原體檢測

1. 由臺灣師範大學生命科學系、東華大學自然資源與環境學系、行政院農業委員會台灣特有生物保育中心等合作單位將所收集鳥類外寄生蜚送到林森實驗室。
2. 形態鑑定參考鄭和姜(1991)⁶¹、Yamaguti *et al.*(1971)⁶² 及 Baker(1999)⁶³，蜚種分子鑑定參考 Beati and Keirans (2001)⁶⁴，以 12S rRNA gene 及 16S rRNA gene 為基因標的。
3. 蜚放入 2ml 之圓底 eppendorf tube，加入 160 μ l 的 Buffer PBS，再加入 3mm 鋼珠用 TissueLyser 以每秒 30 下共 2.5 分鐘將組織打散，加入 40 μ l proteinase K 與 200 μ l 的 Buffer ATL，vortex 約 15sec 後，置於 56°C 隔夜。
4. 加入 400 μ l 的 Buffer AL 置於 70°C 10 分鐘後加入 400 μ l 的酒精。
5. 真空抽氣機上先行處理，預備位置先放入藍色環 tube，再置入 QIAamp spin column。
6. 將處理好的檢體個別置入 QIAamp spin column，啟動抽氣機；抽取完

畢後加入 700 μ l Buffer AW1，再啟動抽氣機；抽取完畢後接著加入 700 μ l Buffer AW2，將抽氣完之檢體 QIAamp spin column 取出置於 2 ml collection tube 中，以 14000rpm 離心 10 分鐘。

7. 將 QIAamp spin column 放入標示好之 1.5 ml 離心管中，小心打開蓋子，加入 70°C 預熱 100 μ l 滅菌二次水，70°C 下浸潤 2min 後，以 8000rpm 離心 1min。此為 DNA 模板。

8. *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. 及 *Rickettsia* spp. 檢測如上述，*Borrelia* spp. 檢測參考 Chao *et al.*, (2011)⁶⁵, *Babesia* spp. 檢測參考 Simpson *et al.* (2005) 的方法使用 Apicomplexa-specific PCR，基因標的為 18S rRNA gene⁶⁶。

結果

一、 以 HL-60 細胞株分離培養鼠類組織 *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp.

104-105 年有 17 支鼠類脾臟研磨液及 73 支鼠類 buffy coat 接種於 HL-60 細胞進行培養，培養過程中，也以 IFA 檢測 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 感染與否，結果皆未順利培養成功。今年購買新一批 HL-60 細胞株(ATCC, CCL-240)，並將培養液換成含一般 L-glutamine 的 IMDM (Invitrogen, 12440053；原為 GlutaMAX, 31980030)，IMDM 培養液中含 5% 或 10% FBS，起始細胞數為 6×10^5 (細胞密度為 $2 \times 10^5/\text{ml}$)，在初期感染將 T25 培養盒改為直立培養 (原為橫躺培養)，每週置換一至二次培養液，期能降低 HL-60 細胞生長速度，以提高 *Anaplasma phagocytophilum* 的感染。以上述條件將 19 支鼠類 buffy coat 接種於 HL-60 細胞進行培養，仍未順利培養成功。

二、 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 重要標的基因全長序列增幅、定序及親緣樹譜分析

Anaplasma phagocytophilum 16S rRNA gene：新增完成 2 支金門及 3 支連江小黃腹鼠 buffy coat 之 *A. phagocytophilum* 16S rRNA gene 1420 bp

序列定序。23 支台灣各地不同來源的菌株序列，由親緣樹譜分析，*A. phagocytophilum* 16S rRNA gene 大致分成 2 個 cluster，多數來自連江、金門、花蓮、台東鼠類 buffy coat 及脾臟的 *A. phagocytophilum* 16S rRNA gene 在同一個 cluster，而少數來自連江、金門小黃腹鼠 buffy coat、粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)、台灣卵形硬蜱(*I. ovatus*)、微小扇頭蜱(*Rhipicephalus microplus*)及其他國家的 *A. phagocytophilum* 16S rRNA gene 在另一個 cluster (圖一、二)。

Anaplasma phagocytophilum groESL gene：新增完成 12 支來自連江、金門、花蓮、台東鼠類 buffy coat 及 1 支來自澎湖脾臟的 *A. phagocytophilum groESL* gene 1224 bp 序列定序。由親緣樹譜分析，這 12 支在同一個 cluster，最接近的是來自瑞士鼠類的菌株，來自世界其他國家人類、動物或蜱的菌株在另一個 cluster (圖三、四)。

Anaplasma phagocytophilum gltA gene：新增完成 20 支來自連江、金門、花蓮、台東鼠類 buffy coat、granulocyte 及脾臟的 *A. phagocytophilum gltA* gene 1041 bp 序列定序。由親緣樹譜分析，這 20 支在同一個 cluster，來自日本全溝硬蜱(*I. persulcatus*)、西班牙綿羊及美國人、馬、狗的菌株在另一個 cluster (圖五、六)。

Anaplasma phagocytophilum p44/msp2 gene：新增完成 58 支來自連江、金門、澎湖、花蓮、台東鼠類 buffy coat 及脾臟的 *A. phagocytophilum* p44/msp2 gene 510 bp 序列定序。由親緣樹譜分析，這 58 支分別在兩個 cluster，來自美國及中國病人的菌株在其他的 cluster 中（圖七、八）。

Candidatus Neoehrlichia mikurensis 16S rRNA gene：新增完成 9 支來自連江、金門、澎湖鼠類 buffy coat 及 3 支來自桃園脾臟的 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene 1232 bp 序列定序。由親緣樹譜分析，所有 39 支來自台灣東西部及離島、硬蜱及鼠類組織菌株皆在同一個 cluster，與來自日本的溝鼠(*Rattus norvegicus*)、中國大陸的溝鼠、小黃腹鼠在同一個 cluster，歐洲德國、瑞士的菌株在同一個 cluster，日本的野鼠(*Apodemus speciosus*)與俄國遠東的菌株在另一個 cluster（圖九、十）。

Candidatus Neoehrlichia mikurensis groESL gene：新增完成 9 支來自連江、金門、澎湖鼠類 buffy coat 及 2 支來自桃園脾臟的 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* groESL gene 1214 bp 序列定序。由親緣樹譜分析，所有 22 支來自桃園、花蓮、台東鬼鼠、小黃腹鼠及金門、連江、澎湖小黃腹鼠 buffy coat 的 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* groESL gene 與來自日本溝鼠的菌株在同一個 cluster，歐洲的菌株在同一個 cluster，

而中國大陸及俄國遠東的菌株在另一個 cluster (圖十一、十二)。

三、 以 Shell vial 細胞培養技術分離培養鼠類組織 *Rickettsia* 屬之立克次體

104-105 年接種 5 支鼠類組織 *OmpB* nested PCR 陽性及 10 支鼠類組織 *gltA* nested PCR 陽性之研磨液，皆未培養成功；亦將 47 支過去從蜱蟎初步分離培養之 *Rickettsia* 屬立克次體菌液解凍進行培養，只有 2 支檢體 (C008NV 及 9073t) 初步培養成功先行冷凍保存。今年接種 8 支鼠類脾臟 *OmpB* nested PCR 陽性及 6 支鼠類脾臟 *gltA* nested PCR 陽性之研磨液，皆未培養成功；但將 37 支過去從蜱蟎初步分離培養之 *Rickettsia* 屬立克次體菌液解凍進行培養，調整培養方法將 FBS 濃度降低至 0.5~2%，以降低 L929 細胞生長速度而提升立克次體的感染，亦進行 IFA 確認感染率，有 9 支檢體培養成功先行冷凍保存 (如表一)。其中，C008NV、9073Ft、9543N2 及 Freet 的序列與 *Rickettsia* sp. TwKM01 最相近，9699、9697-1、9716-2、9701-1 及 9698-1 的序列與 *Rickettsia* sp. HIR/D91 最相近，分別各挑一支培養菌量最多的檢體 9543N2 及 9701-1 接種於 L929 細胞；繼代時，從已被立克次體感染 70% 以上的 T75 培養盒中刮取 1/5 的細胞，分別種至 4 盒含有新鮮 L929 細胞的 T75 培養盒中，效果最佳，

並依細胞狀況調整新鮮細胞數及 FBS 濃度，以數盒 T75 培養盒大量培養；目前已順利利用超音波高速震盪機及離心方式，將立克次體及部分 L929 細胞碎片收集於 SPG 緩衝液並先保存於-80°C 冰箱，亦已確認可利用 30% Percoll 密度梯度超高速離心的方式，將立克次體和 L929 細胞碎片分離，藉以去掉 L929 細胞碎片並能得到較純的大量立克次體，以提高後續 Pacbio 全長定序的成功率。檢體 9543N2 及 9701-1 已分別收集 20 及 16 盒 T75 數量之立克次體並保存於 SPG 緩衝液及-80°C 冰箱，目前仍有數十盒 T75 培養盒正在培養中。

四、 進行 *Rickettsia* 屬之立克次體重要標的基因全長序列增幅及定序

目前針對 citrate synthase (*gltA*) 進行全長序列增幅及定序，已完成 8 株來自桃園、台中及金門鑷形扇頭蜱 (*R. haemaphysaloides*) 及板齒鼠血蜱 (*Haemaphysalis bandicota*) 菌株，結果 4 株來自板齒鼠血蜱的菌株序列完全相同，在 NCBI blast 結果最接近來自日本的長角血蜱 (*H. longicornis*) *Rickettsia* sp. Mie180 isolate Tick-180-Mie-Hlon 1151/1153(99%) (JQ697958)。4 株來自鑷形扇頭蜱的菌株序列亦完全相同 (C008NV-2 序列稍短)，在 NCBI blast 結果為 *Rickettsia* sp. TwKM01 (來自台灣鑷形扇頭蜱，EF219463) (表二)。

針對 16S rRNA gene (*rrs*) 進行全長序列增幅及定序，已完成 8 株來自桃園、台中及金門鏟形扇頭蟬及板齒鼠血蟬菌株，結果 4 株來自板齒鼠血蟬的菌株序列完全相同，在 NCBI blast 結果最接近來自中國的西藏血蟬(*H. tibetensis*) Uncultured *Rickettsia* sp. clone HtM69 1420/1421(99%) (KU758904)。4 株來自鏟形扇頭蟬的菌株序列亦完全相同，在 NCBI blast 結果為 *Rickettsia* sp. TwKM01 (EF589609)(表三)。

針對 gene D (*sca4*) 進行全長序列增幅及定序，已完成 9 株來自桃園、台中及金門鏟形扇頭蟬及板齒鼠血蟬菌株，結果 5 株來自板齒鼠血蟬的菌株序列相似度 95.56-100%，在 NCBI blast 結果最接近 *Rickettsia japonica* protein PS 120 (D) gene, 2783/2832(98%) (AF155055)。4 株來自鏟形扇頭蟬的菌株分為 2 群，在 NCBI blast 結果為 *Rickettsia* sp. TwKM01 (EF219465) (表四)。

針對 outer membrane protein A (*ompA*) gene 進行全長序列增幅及定序，已完成 9 株來自桃園、台中及金門鏟形扇頭蟬及板齒鼠血蟬菌株，結果 5 株來自板齒鼠血蟬的菌株序列完全相同(9697-1 序列稍短)，在 NCBI blast 結果最接近 *Rickettsia heilongjiangensis* outer membrane protein A (*ompA*) gene, 3147/3182(99%) (AH012829)。4 株來自

鐮形扇頭蜱的菌株序列亦完全相同，在 NCBI blast 結果為 *Rickettsia* sp. TwKM01 (EF219467) (表五)。

針對 outer membrane protein B (*ompB*) gene 進行全長序列增幅及定序，已完成 9 株來自桃園、台中及金門鐮形扇頭蜱及板齒鼠血蜱菌株，結果 5 株來自板齒鼠血蜱的菌株序列完全相同，在 NCBI blast 結果最接近 *Rickettsia hulinensis* outer membrane protein B (*ompB*) gene, 4789/4878(98%) (AY260452)。4 株來自鐮形扇頭蜱的菌株序列分為 2 群只差 1 個 base，在 NCBI blast 結果為 *Rickettsia* sp. TwKM01 (EF364046) (表六)。顯示不同種 *Rickettsia* 屬之立克次體可能有寄主專一性。

五、金門縣野鼠及外寄生恙蟲 *Anaplasma* & *Ehrlichia* 每月監測

105 年 7 月至 106 年 7 月每月於金門縣 5 鄉鎮捕鼠，採檢鼠類脾臟及外寄生恙蟲進行 *Anaplasma* & *Ehrlichia* real time PCR 檢測，結果如圖十三，鼠類脾臟平均感染率為 50.31%，以 105 年 12 月最高(90.9%)，其次為 106 年 2 月(87.5%)，最低為 105 年 10 月(13.33%)。恙蟲平均感染率為 24.32%，以 105 年 12 月最高(66.67%)，其次為 105 年 11 月、106 年 1 月及 2 月(50%)，最低為 105 年 7 月及 10 月(0%)。分析鼠類 *Anaplasma*

& Ehrlichia 每月感染率及恙蟲 Anaplasma & Ehrlichia 每月感染率的相關性及與氣象因子的相關性，結果鼠類感染率與恙蟲感染率 $r = 0.6052$ ，相關性不高，而與氣象因子相關性較高為恙蟲感染率與月平均溫度 $r = -0.8649$ ，恙蟲感染率與月平均相對溼度 $r = -0.7474$ ，呈現負相關(表七)。

六、 收集鳥外寄生蜱，檢測蜱媒病原體

檢測由東華大學自然資源與環境學系於 2009-2015 年採自花蓮縣 14 種 26 隻鳥身上 48 隻鳥蜱，進行鳥蜱形態鑑定、12S rDNA, 16S rDNA 分子鑑定及蜱媒病原體 *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Borrelia* spp., *Babesia* spp., 檢測，結果如表八。共計有 8 種蜱：豪豬血蜱 (*Haemaphysalis hystricis*)、*Ixodes columnae*、粒形硬蜱 (*Ixodes granulatus*)、鑷形扇頭蜱 (*Rhipicephalus haemaphysaloides*)、*Ixodes turdus*、嗜鳥血蜱 (*Haemaphysalis ornithophila*)、褐黃血蜱 (*Haemaphysalis flava*)、鈍刺血蜱 (*Haemaphysalis doenitzi*)，其中 *Ixodes columnae* 及 *Ixodes turdus* 為台灣新記錄種。13 隻蜱檢測出可能蜱媒病原體，包括 7 隻 *Ixodes columnae* 攜帶似 *Rickettsia helvetica*，3 隻粒形硬蜱攜帶似 *Borrelia valaisiana*，其中有 1 隻雙重感染似 *Babesia microti*，另分別有 1 隻 *Ixodes columnae* 及 *Ixodes turdus* 攜帶 *Borrelia* sp.，1 隻褐黃血蜱攜帶 *Ehrlichia* sp.

BL 157-9, 其中 *Borrelia turdi*, *Ehrlichia* sp. BL157-9 及 *Rickettsia helvetica* 為首次在台灣檢出。

檢測由特有生物保育中心於 2001-2010 年採自台中、南投、屏東、花蓮、台東及金門 8 種 18 隻鳥身上 30 隻鳥蜱，進行鳥蜱形態鑑定、12S rDNA, 16S rDNA 分子鑑定及蜱媒病原體 *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Borrelia* spp., *Babesia* spp., 檢測，結果如表九。共計有 7 種蜱：嗜鳥血蜱、台灣血蜱(*Haemaphysalis formosensis*)、鈍刺血蜱、豪豬血蜱、*Ixodes columnae*、日本硬蜱(*Ixodes nipponensis*)及微形血蜱(*Haemaphysalis wellingtoni*)，其中微形血蜱為金門新記錄種。6 隻蜱檢測出可能蜱媒病原體，包括 1 隻 *Ixodes columnae* 攜帶似 *Rickettsia helvetica*，1 隻日本硬蜱攜帶似 *Rickettsia monacensis*，1 隻嗜鳥血蜱攜帶似 *Anaplasma* sp.，1 隻鈍刺血蜱攜帶似 Uncultured bacterium clone ncd992e08c1 305/305(100%)，2 隻微形血蜱攜帶似 Uncultured bacterium clone Hw124 305/305(100%)，其中 *Anaplasma* sp. clone BJ01 及 *Rickettsia monacensis* 為首次在台灣檢出。

有趣的是 2 隻金門所採集微形血蜱檢測出的菌株在 Genbank 中 blast 最接近 Uncultured bacterium clone Hw124 305/305(100%)，而此菌株來自

泰國雞身上的微形血蟬，顯示可能有寄主專一性。

討論

蜱媒傳播的病原體中有一大部分是屬於立克次體，如人類顆粒球無形體症、人類單核球艾利希氏體症、斑點熱及 Q 熱(Q fever)等蜱媒疾病。立克次體的分布主要受到病媒種類、病媒宿主的分布和環境(氣候、地形...)等因子影響，且這些因素通常又互相影響。如 *Rickettsia honei* 目前在亞洲、歐洲及澳洲都被發現，而在澳洲東南部引起當地的 Flinders Island spotted fever，惟目前僅侷限於澳洲東南部，與此立克次體的病媒蜱 *Bothriocroton hydrosauri* 的分布位置相似^{67,68}。另外 *Rickettsia australis* 在澳洲引起的 Queensland tick typhus，病例主要在澳洲本島，北至昆士蘭州沿岸，南至維多利亞州東部；但其病媒蜱—*Ixodes holocyclus*、*I. tasmani*、*I. cornuatus* 除了分布於澳洲本島沿岸外，也有向南延伸至南部小島 Tasmania，但 Queensland tick typhus 仍侷限於本島，代表 *Rickettsia australis* 可能不適應南部小島的溫帶氣候⁶⁷。

在巴西，*Amblyomma sculptum* 為 *Rickettsia rickettsii* 的重要病媒，研究發現 *A. sculptum* 主要分布於熱帶氣候區(tropical climate)，卻無法在南邊的亞熱帶氣候區發現 *A. sculptum*，故推測亞熱帶氣候區的秋冬季溫度較低，可能不適合 *A. sculptum* 生活；若以生物圈(biome)的角度觀察，在雨林區(Amazon biome)和熱帶旱生灌叢林區(Caatinga biome)，也很少觀察到 *A.*

sculptum，推測此病媒蜱應無法適應雨林區極度潮濕的氣候以及熱帶旱生灌叢林區的半乾燥氣候。然而，這篇研究僅觀察病媒蜱的分布與氣候和生物圈之關係，無法看到立克次體菌株的分布是否也受到不同氣候和生物圈所影響⁶⁹。

Anaplasma phagocytophilum 為人類顆粒球無形體症病原體，台灣在許多地區鼠類及蜱檢測出 *A. phagocytophilum*，其是否具有病原性是值得關注的問題。在台灣 *A. phagocytophilum* 尚未能培養出之前，透過與世界其他國家病原株重要基因相比較可先獲得一些訊息，尤其是 p44/msp2 gene 片段被認為是 *A. phagocytophilum* 致病性的毒力因子⁵²。由圖一至圖八親緣關係分析中無論是 23 支 16S rRNA gene 序列、12 支 *groESL* gene 序列、20 支 *gltA* gene 序列及 58 支 p44/msp2 gene 都顯示台灣的菌株與世界其他國家病人株在不同 cluster，顯示似乎尚未發現具有致病性的 *A. phagocytophilum* 菌株。

Candidatus Neoehrlichia mikurensis 的情況也相同，由圖九至圖十二，9 支 16S rRNA gene 及 9 支 *groESL* gene，台灣來自老鼠或蜱的序列都在同一個 cluster，而病人株在另一個 cluster，因此 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 台灣菌株的病原性還需進一步證實。

血紅扇頭蜱(*Rhipicephalus sanguineus*)為許多立克次體菌株的已知病媒，且廣布於世界各地，研究者分析採集自世界各地的血紅扇頭蜱之粒線

體 12S 及 16S rDNA，發現做出的 NJ tree 可明顯看出兩個系群：熱帶系群 (tropical cluster) 和溫帶系群 (temperate cluster)，前者的血紅扇頭蜱主要來自亞洲、非洲、大洋洲、美洲熱帶區，而後者主要來自歐洲、北美(美國)、南美(阿根廷)⁷⁰。此外，研究者進一步分析這兩個系群之間血紅扇頭蜱採集地點的氣象因子資料是否有統計上差異，結果共有 14 個氣象因子在兩個系群之間有統計上顯著差異，其中有 10 個因子是與氣溫有關，代表氣溫在不同系群血紅扇頭蜱的分布上應為一重要因素。比較熱帶系群和溫帶系群的血紅扇頭蜱分布區域，可看到熱帶系群分布在年均溫 20-30°C 的地區，而溫帶系群則分布在年均溫 10-20°C 的地區⁷⁰。以上研究認為不同的氣候會造成蜱的不同，進一步也可能影響到蜱身上帶的病原；另一篇研究比較位於四個不同地區族群的血紅扇頭蜱是否帶有 *Ehrlichia canis*，並且是否有能力讓被蜱叮咬的狗得到 canine monocytic ehrlichiosis (CME)，結果顯示採自巴西聖保羅地區的血紅扇頭蜱(屬於 tropical species)，為 *Ehrlichia canis* 的 competent vector，被該地的蜱叮咬的狗才會得到 CME 並有臨床症狀，其他三個屬於 temperate species 地區的蜱，都沒有檢測到 *Ehrlichia canis*，且被叮咬的狗也沒有發展出 CME 的臨床症狀，代表此三地區的血紅扇頭蜱都不是 *Ehrlichia canis* 的 competent vector。因此研究者推測不同系群的血紅扇頭蜱，可能會負責散播不同種特定的病原株⁷¹。之前研究提到以年均溫 20°C 為界線區分

熱帶和溫帶系群的血紅扇頭蜱，而另一篇研究的部分結果也支持此結論：研究者分析墨西哥的 Mexicali (位於美墨邊界，靠近加州)的血紅扇頭蜱 12S rDNA，結果發現此區的血紅扇頭蜱與巴西的血紅扇頭蜱分在一群，反而與地理位置相近的加州 Arizona 所採的血紅扇頭蜱分到不同的 cluster；再進一步偵測血紅扇頭蜱體內 *R. rickettsii* ompA 片段，進行親緣關係分析，亦發現 Mexicali 與 Arizona 被歸在不同的 cluster。研究者最後認為 Mexicali 和 Arizona 的血紅扇頭蜱和 *R. rickettsii* 應該是屬於不同的 strain，而呼應先前的研究，Mexicali 和 Arizona 兩個地區，前者年均溫大於 20°C，後者小於 20°C，故即使兩地非常接近，但氣候的不同的確可能造成兩地血紅扇頭蜱和所攜帶的立克次體有所差異⁷²。台灣有為數眾多的血紅扇頭蜱(俗稱狗蜱)，卻無任何地中海斑點熱病例，符合上述台灣血紅扇頭蜱屬於熱帶系群之說法。

有關 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 培養，在分別與日本 NIID 的 Dr. Ando 及美國 NIH 的 Dr. Dumler、Dr. Scorpio 及 Dr. Neal 討論後，認為 *Anaplasma phagocytophilum* 培養較不容易，通常需以無形體症病人，尤其急性期病原菌量多的病人全血，立即取 200~500μl 全血以 HL-60 細胞進行培養。通常較常用 HL-60 細胞株進行例行性的培養，且其培養過程亦較 THP-1 及 ISE6 細胞株容易，培養液亦可用 RPMI-1640(內含小於 5% FBS)，

細胞密度維持在 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ ，每週置換二至三次培養液，應就能使 *Anaplasma phagocytophilum* 順利感染 HL-60 細胞。未來若有蟬、鼠類或其他檢體有檢測到 *Anaplasma phagocytophilum*，仍可持續嘗試以上述方法進行培養；此外，亦可收集疑似 *Anaplasma phagocytophilum* 感染之病人全血，若立即檢測確定有 *Anaplasma phagocytophilum* 感染，則可馬上以 HL-60 細胞進行培養，期能增加培養出台灣本土 *Anaplasma phagocytophilum* 的機率。

在分離培養鼠類組織 *Rickettsia* 屬之立克次體方面，目前已培養成功，將朝向次世代基因定序(Next generation sequencing, NGS)努力。目前進行 Pacbio 全長定序的 DNA 檢體，濃度至少要 $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ，總量至少要 $28 \mu\text{g}$ ，因此每個檢體至少需培養 20~24 盒以上的 T75 培養盒；因此未來會持續收集 9543N2 及 9701-1 菌株的粗純化立克次體保存於 SPG 緩衝液及 -80°C 冰箱，再利用 30 % Percoll 密度梯度超高速離心得到較純的大量立克次體，並進行 Pacbio 全長定序分析，期能建立本土立克次體株的全長序列基因庫，亦能將其與立克次體病原株進行親緣分析，釐清本土立克次體屬之立克次體與病原株的關係。

依 Fournier *et al.* (2003) 對於新種斑點熱立克次體(spotted fever rickettsia)的界定，只要在 *rrs*, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* 這5個全長基因，序列相似度不超過一個符合 $\geq 99.8\%$, $\geq 99.9\%$, $\geq 98.8\%$, $\geq 99.2\%$, $\geq 99.3\%$ ，即

為一新種⁴⁹。依此標準，分離自板齒鼠血蜱的立克次體，以9699株為代表，*rrs*, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* 這5個全長基因在Gene bank Blast相似度最高分別為99.7%, 99.5%, 95.4%, 98.2%及98.2%，相似度均低於同種的判定數值，表示為一新種(表十)。而分離自鑷形扇頭蜱的立克次體，以9543N2株為代表，*rrs*, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* 這5個全長基因在Gene bank Blast相似度最高分別為99.9%, 99.5%, 98.5%, 98.4%及98.0%，只有*rrs* (99.9%)符合 $\geq 99.8\%$ ，表示也為一新種(表十一)。到目前為止加上已發表採自台東蘭嶼的*Candidatus Rickettsia lanyuensis*⁷³，台灣有3個立克次體新種。

由於醫學知識和分子診斷技術不斷的進步，不同的立克次體菌株漸漸被發現，其所分布的地區也不斷的新增擴大，如：*Rickettsia massiliae*，在歐洲、非洲和美洲都有被發現，且在2011年也在以色列的tick中被偵測到⁷⁴；立克次體的種類和分布不斷的擴增，除了知識和偵測技術的進步外，也可能受到氣候變遷的影響：全球氣候暖化可能造成病媒分布地區的擴大以及病原散播效率的增加；另一個可能影響因子為候鳥移動並攜帶帶有立克次體菌的蜱媒，造成病原的擴增⁷⁴。由東華大學自然資源與環境學系及特有生物保育中心所提供的鳥蜱檢體可看出 *Haemaphysalis wellingtoni*, *Ixodes columnae*, *Ixodes turdus* 為台灣新記錄種，*Borrelia turdi*, *Anaplasma* sp. clone BJ01, *Ehrlichia* sp. BL157-9, *Rickettsia helvetica* 及 *Rickettsia monacensis* 亦

為第一次在台灣發現的疑似蜚媒病原體，顯示確實台灣可能由候鳥傳播新的蜚種與新的蜚媒病原體，值得進一步長期的監測調查。

結論與建議

1. 由 *Anaplasma phagocytophilum* 重要基因親緣關係分析中無論是 23 支 16S rRNA gene 序列、12 支 *groESL* gene 序列、20 支 *gltA* gene 序列及 58 支 *p44/msp2* gene 都顯示台灣的菌株與世界其他國家病人株在不同 cluster，顯示似乎尚未發現具有致病性的 *A. phagocytophilum* 菌株。
2. 由 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 重要基因親緣關係分析中 9 支 16S rRNA gene 及 9 支 *groESL* gene，台灣來自老鼠或蜱的序列都在同一個 cluster，而病人株在另一個 cluster，因此 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 台灣菌株的病原性還需進一步證實。
3. 分離自板齒鼠血蜱的立克次體，以 9699 株為代表，*rrs*, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* 這 5 個全長基因在 Gene bank Blast 相似度最高分別為 99.7%, 99.5%, 95.4%, 98.2% 及 98.2%，相似度均低於同種的判定數值，表示為一新種。
4. 分離自鑷形扇頭蜱的立克次體，以 9543N2 株為代表，*rrs*, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* 這 5 個全長基因在 Gene bank Blast 相似度最高分別為 99.9%, 99.5%, 98.5%, 98.4% 及 98.0%，只有 *rrs* (99.9%) 符合 $\geq 99.8\%$ ，表示也為一新種。

5. 分析金門縣 5 鄉鎮鼠類 *Anaplasma* & *Ehrlichia* 每月感染率及恙蟲 *Anaplasma* & *Ehrlichia* 每月感染率的相關性及與氣象因子的相關性，結果鼠類感染率與恙蟲感染率 $r = 0.6052$ ，相關性不高，而與氣象因子相關性較高為恙蟲感染率與月平均溫度 $r = -0.8649$ ，恙蟲感染率與月平均相對溼度 $r = -0.7474$ ，呈現負相關。顯示在冬季需注意金門縣民眾感染 *Anaplasmosis* 的情況。
6. 檢測由東華大學自然資源與環境學系及特有生物保育中心提供 78 隻鳥蜱，蜱種鑑定包括 4 屬 11 種(*Amblyomma* spp., *H. doenitzi*, *H. flava*, *H. formosensis*, *H. hystricis*, *H. ornithophila*, *H. wellingtoni*, *I. columnae*, *I. granulatus*, *I. nipponensis*, *I. turdus* 及 *Rhipicephalus haemaphysaloides*)，其中有 3 種為台灣新記錄種(*Haemaphysalis wellingtoni*, *Ixodes columnae*, *Ixodes turdus*)，共有 8 種蜱媒病原體被檢測出，包括 1 種 *Anaplasma* species (*Anaplasma* sp. clone BJ01)，1 種 *Babesia* species (*Ba. microti*)，2 種 *Borrelia* species (*Bo. valaisiana* 及 *Bo. turdi*)，1 種 *Ehrlichia* species (*Ehrlichia* sp. BL157-9) 及 3 種 *Rickettsia* species (*R. conorii*, *R. helvetica* 及 *R. monacensis*)，其中有 5 種為首次在台灣檢出(*Borrelia turdi*, *Anaplasma* sp. clone BJ01, *Ehrlichia* sp. BL157-9, *Rickettsia helvetica* 及 *Rickettsia monacensis*)。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 分別由板齒鼠血蜱及鐮形扇頭蜱培養出台灣新種的立克次體，將朝向次世代基因定序(Next generation sequencing, NGS)努力，期能建立本土立克次體株的全長序列基因庫。
2. 由東華大學自然資源與環境學系及特有生物保育中心所提供的鳥蜱檢體可看出 *Haemaphysalis wellingtoni*, *Ixodes columnae*, *Ixodes turdus* 為台灣新記錄種。*Borrelia turdi*, *Anaplasma* sp. clone BJ01, *Ehrlichia* sp. BL157-9, *Rickettsia helvetica* 及 *Rickettsia monacensis* 亦為第一次在台灣發現的疑似蜱媒病原體，顯示確實台灣可能由候鳥傳播新的蜱種與新的蜱媒病原體，值得進一步長期的監測調查。

參考文獻

1. Malaria, other vectorborne and parasitic diseases programme. at [http://www.wpro.who.int/mvp/climate_change/about/en/.](http://www.wpro.who.int/mvp/climate_change/about/en/))
2. Robbins RG. THE TICKS (ACARI" IXODIDA: ARGASIDAE, IXODIDAE)OF TAIWAN" A SYNONYMIC CHECKLIST. PROC ENTOMOL SOC WASH 2005;107:245-53.
3. Dumler JS. Anaplasma and Ehrlichia infection. Ann N Y Acad Sci 2005;1063:361-73.
4. Bakken JS, Dumler JS. Human granulocytic ehrlichiosis. Clin Infect Dis 2000;31:554-60.
5. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, 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.
6. Buller RS, Arens M, Hmiel SP, et al. Ehrlichia ewingii, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. N Engl J Med 1999;341:148-55.
7. Stone JH, Dierberg K, Aram G, Dumler JS. Human monocytic ehrlichiosis. JAMA 2004;292:2263-70.
8. Bakken JS, S. DJ. Antimicrobial therapy and vaccines. 2 ed. New York: Apple Trees Productions; 2002.
9. Kawahara M, Rikihisa Y, Isogai E, et al. Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in Ixodes ovatus ticks. Int J Syst Evol Microbiol 2004;54:1837-43.
10. von Loewenich FD, Geissdorfer W, Disque C, et al. Detection of "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. J Clin Microbiol 2010;48:2630-5.
11. Fehr JS, Bloemberg GV, Ritter C, et al. Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen Candidatus Neoehrlichia mikurensis. Emerg Infect Dis 2010;16:1127-9.
12. Welinder-Olsson C, Kjellin E, Vaht K, Jacobsson S, Wenneras C. First case of human "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. J Clin Microbiol 2010;48:1956-9.
13. Lotric-Furlan S, Petrovec M, Avsic-Zupanc T, et al. Human ehrlichiosis in central Europe. Wien Klin Wochenschr 1998;110:894-7.
14. Sumption KJ, Wright DJ, Cutler SJ, Dale BA. Human ehrlichiosis in the UK. Lancet 1995;346:1487-8.
15. Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichioses in humans: epidemiology,

- clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 2007;45 Suppl 1:S45-51.
16. Zhi N, Ohashi N, Rikihisa Y. Multiple p44 genes encoding major outer membrane proteins are expressed in the human granulocytic ehrlichiosis agent. *J Biol Chem* 1999;274:17828-36.
 17. Massung RF, Owens JH, Ross D, et al. Sequence analysis of the ank gene of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol* 2000;38:2917-22.
 18. Inokuma H, Oyamada M, Kelly PJ, et al. Molecular detection of a new *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in canine blood from South Africa. *J Clin Microbiol* 2005;43:2934-7.
 19. Alberti A, Zobba R, Chessa B, et al. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:6418-22.
 20. Chang AC, Chang WL, Lin CT, Pan MJ, Lee SC. Canine infectious cyclic thrombocytopenia found in Taiwan. *J Vet Med Sci* 1996;58:473-6.
 21. 張祖駿. 利用巢式聚合酶連鎖反應調查台北市犬艾利希氏體病 [碩士論文]: 國立台灣大學; 2003.
 22. 黃嘉嘉. 以巢式聚合酶連鎖反應偵測犬隻狗型、血小板型艾利希體症及犬心絲蟲感染症 [碩士論文]: 國立嘉義大學; 2003.
 23. 陳昱憲. 以巢式聚合酶連鎖反應調查台灣家貓血液寄生蟲之感染疫情 [碩士論文]: 國立中興大學; 2007.
 24. Hsieh YC, Lee CC, Tsang CL, Chung YT. Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. *Vet Microbiol* 2010;146:70-5.
 25. Suto Y, Suto A, Inokuma H, Obayashi H, Hayashi T. First confirmed canine case of *Ehrlichia canis* infection in Japan. *Vet Rec* 2001;148:809-11.
 26. 翁明輝, 連日清, 蔡惠坪, 林佩如, 郭明德, 劉文燦. 2009 年金門地區鼠類寄生蟬敢染查菲艾利希氏體之調查. *疫情報導* 2010;26:134-9.
 27. 翁明輝, 蔡惠坪, 林佩如, 陳國卿, 郭明德, 劉文燦. 2012 年金門地區鼠類感染查菲艾利希氏體之調查. *疫情報導* 2014;30:134-41.
 28. 潘明正. 牛邊緣無形體症 (Bovine anaplasmosis). In: (編著) 潘劉張, ed. 媒介重要人畜傳染疾病的有害生物—節肢動物篇. 台北市: 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局; 2007:138-9 頁.
 29. 林怡孜. 以 PCR 技術調查台灣乳牛焦蟲症及邊蟲症之流行病學 [碩士論文]: 國立中興大學; 2007.
 30. 翁明輝, 蔡惠坪, 林佩如, 陳國卿, 郭明德, 林昌棋. 2014 年金門地區鼠形動物感染嗜吞噬細胞無形體之調查. *疫情報導* 2015;31:347-55.
 31. Lennette EH, Halonen P, Murphy FA. Laboratory diagnosis of infectious diseases. *Principles and Practice Vol. II.* . Springer-Verlag New York Inc.; 1988:865-90.

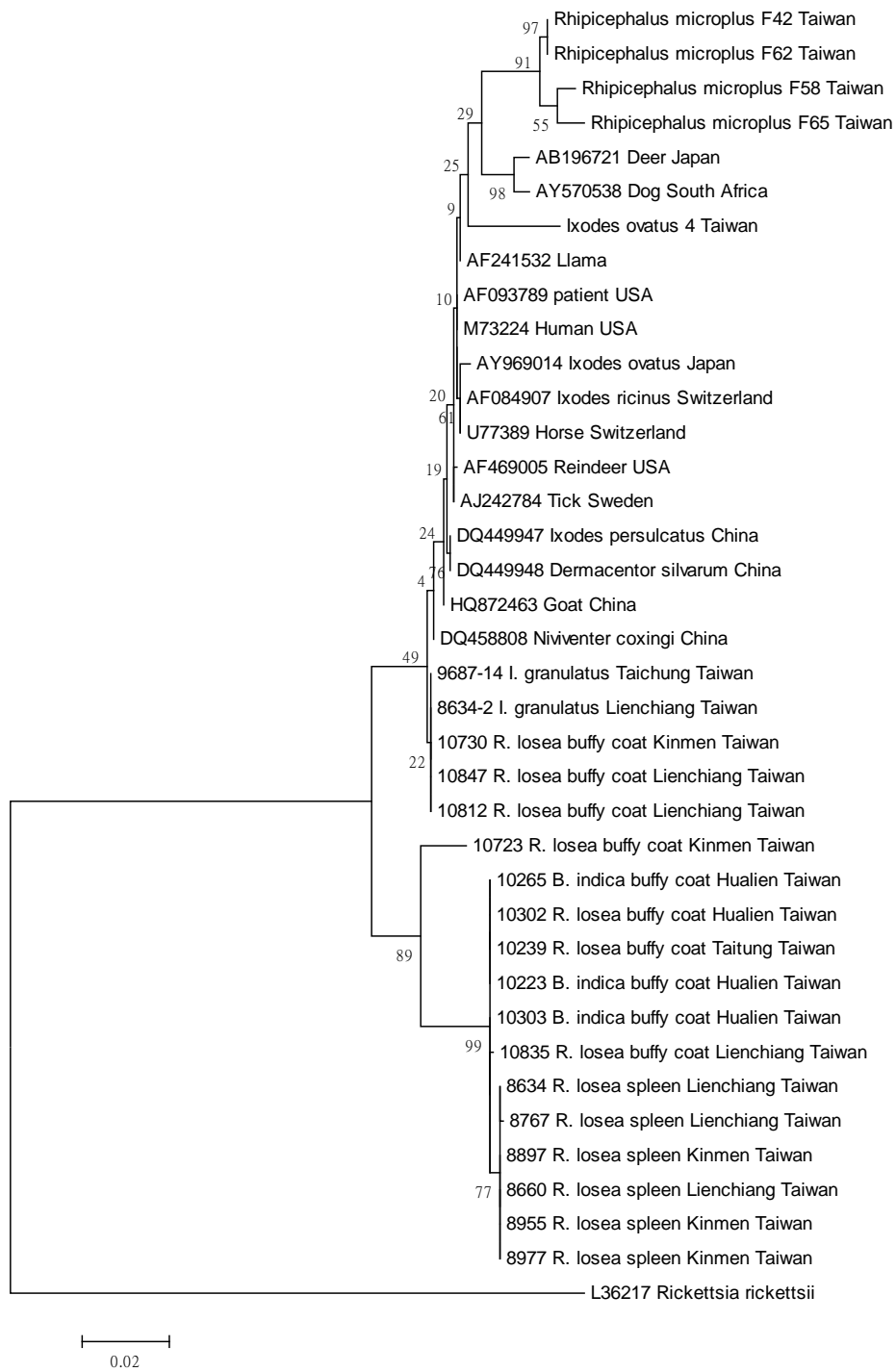
32. Marmion BP. Rickettsial diseases of man and animals. London: Edward Arnold; 1990:674-89.
33. Takada N, Fujita H, Yano Y, Tsuboi Y, Mahara F. First isolation of a rickettsia closely related to Japanese spotted fever pathogen from a tick in Japan. *J Med Entomol* 1994;31:183-5.
34. Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res* 2005;36:469-92.
35. Brouqui P, Parola P, Fournier PE, Raoult D. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;49:2-12.
36. Tsai YS, Wu YH, Kao PT, Lin YC. African tick bite fever. *J Formos Med Assoc* 2008;107:73-6.
37. Tsai KH, Lu HY, Huang JH, et al. African tick bite Fever in a Taiwanese traveler returning from South Africa: molecular and serologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81:735-9.
38. Tsai KH, Lu HY, Tsai JJ, Yu SK, Huang JH, Shu PY. Human case of *Rickettsia felis* infection, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1970-2.
39. Tsai KH, Lu HY, Huang JH, et al. *Rickettsia felis* in cat fleas in Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:561-3.
40. Takada N, Fujita H, Yano Y, Huang WH, Khamboonruang C. Serosurveys of spotted fever and murine typhus in local residents of Taiwan and Thailand compared with Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993;24:354-6.
41. Chen HL, Chen HY, Chung CL, Lin TH, Wang GR, Horng CB. [Primary surveillance of spotted fever group antibodies on rats in the Kinmen area]. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 1997;30:115-21.
42. Ishikura M, Fujita H, Ando S, Matsuura K, Watanabe M. Phylogenetic analysis of spotted fever group Rickettsiae isolated from ticks in Japan. *Microbiol Immunol* 2002;46:241-7.
43. Fournier PE, Fujita H, Takada N, Raoult D. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. *J Clin Microbiol* 2002;40:2176-81.
44. Lee JH, Park HS, Jung KD, et al. Identification of the spotted fever group rickettsiae detected from *Haemaphysalis longicornis* in Korea. *Microbiol Immunol* 2003;47:301-4.
45. Kim CM, Yi YH, Yu DH, et al. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:5766-76.
46. Choi YJ, Lee EM, Park JM, et al. Molecular detection of various rickettsiae in mites (Acari: Trombiculidae) in Southern Jeolla Province Korea. *Microbiol Immunol* 2007;51:307-12.
47. Kuo CC, Shu PY, Mu JJ, Wang HC. High prevalence of *Rickettsia* spp. infections in

- small mammals in Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2015;15:13-20.
48. Kuo CC, Shu PY, Mu JJ, et al. Widespread *Rickettsia* spp. Infections in Ticks (Acari: Ixodoidea) in Taiwan. *J Med Entomol* 2015;52:1096-102.
 49. Fournier PE, Dumler JS, Greub G, Zhang J, Wu Y, Raoult D. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J Clin Microbiol* 2003;41:5456-65.
 50. Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D. Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94:707-8.
 51. Ohashi N, Gaowa, Wuritu, et al. Human granulocytic Anaplasmosis, Japan. *Emerg Infect Dis* 2013;19:289-92.
 52. Wang Y, Chen C, Zhang L. Molecular characterization of Msp2/P44 of *Anaplasma phagocytophilum* isolated from infected patients and *Haemaphysalis longicornis* in Laizhou Bay, Shandong Province, China. *PLoS One* 2013;8:e78189.
 53. Choi YJ, Jang WJ, Ryu JS, et al. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2005;11:237-44.
 54. Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48 Pt 3:839-49.
 55. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Res Microbiol* 1995;146:385-96.
 56. Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:252-61.
 57. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50 Pt 4:1449-55.
 58. Kawahara M, Rikihisa Y, Lin Q, et al. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1102-9.
 59. Blanarova L, Stanko M, Carpi G, et al. Distinct *Anaplasma phagocytophilum* genotypes associated with *Ixodes trianguliceps* ticks and rodents in Central Europe. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5:928-38.
 60. Yang J, Liu Z, Niu Q, et al. Evaluation of different nested PCRs for detection of *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants and ticks. *BMC Vet Res* 2016;12:35.
 61. 鄭國藩, 姜在階. 中國經濟昆蟲志第三十九冊蜱蟎亞綱硬蜱科. 北京: 科學出版社; 1991.
 62. Yamaguti N, V. , Tipton J, Keegan HL, Toshiaoka S. Ticks of Japan, Korea, and the Ryukyu islands.: Brigham Young Univ.; 1971.

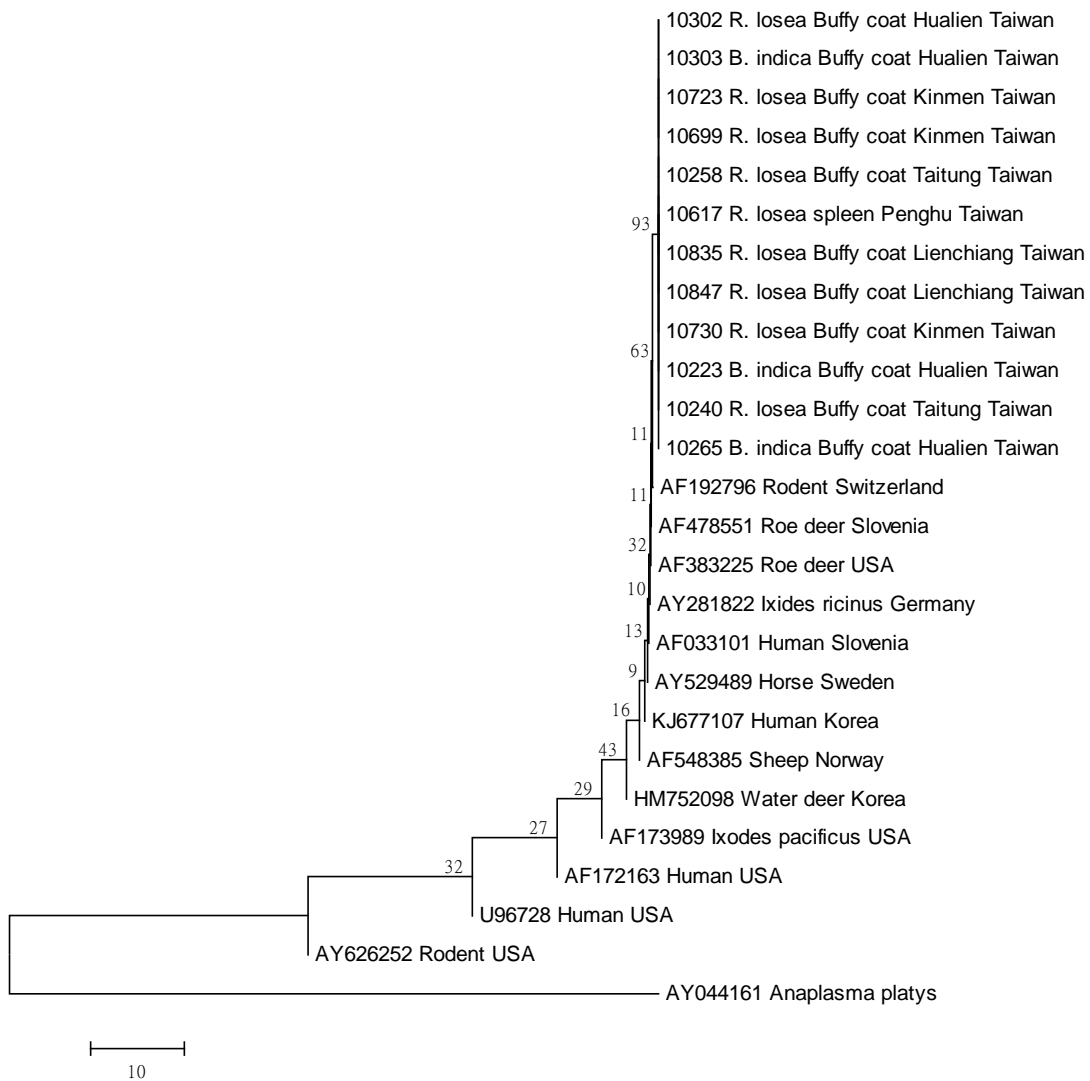
63. Baker AS. Mites and ticks of domestic animals. London: The Stationery Office; 1999.
64. Beati L, Keirans JE. Analysis of the systemic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol* 2001;87:32-48.
65. Chao LL, Chen YJ, Shih CM. First isolation and molecular identification of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* from skin biopsies of patients in Taiwan. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 2011;15:e182-7.
66. Simpson VR, Panciera RJ, Hargreaves J, et al. Myocarditis and myositis due to infection with Hepatozoon species in pine martens (*Martes martes*) in Scotland. *Vet Rec* 2005;156:442-6.
67. Derne B, Weinstein P, Musso D, Lau C. Distribution of rickettsioses in Oceania: past patterns and implications for the future. *Acta Trop* 2015;143:121-33.
68. Stenos J, Graves S, Popov VL, Walker DH. *Aponomma hydrosauri*, the reptile-associated tick reservoir of *Rickettsia honei* on Flinders Island, Australia. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69:314-7.
69. Martins TF, Barbieri AR, Costa FB, et al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasit Vectors* 2016;9:186.
70. Zemtsova GE, Apanaskevich DA, Reeves WK, Hahn M, Snellgrove A, Levin ML. Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and its relationships with climatic factors. *Exp Appl Acarol* 2016;69:191-203.
71. Moraes-Filho J, Krawczak FS, Costa FB, Soares JF, Labruna MB. Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the Bacterium *Ehrlichia canis*, the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *PLoS One* 2015;10:e0139386.
72. Ereemeeva ME, Zambrano ML, Anaya L, et al. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* ticks, Mexicali, Mexico. *J Med Entomol* 2011;48:418-21.
73. Tsai KH, Wang HC, Chen CH, et al. Isolation and identification of a novel spotted fever group rickettsia, strain IG-1, from *Ixodes granulatus* ticks collected on Orchid Island (Lanyu), Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 2008;79:256-61.
74. Harrus S, Perlman-Avrahami A, Mumcuoglu KY, Morick D, Eyal O, Baneth G. Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Midichloria mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:459-63.



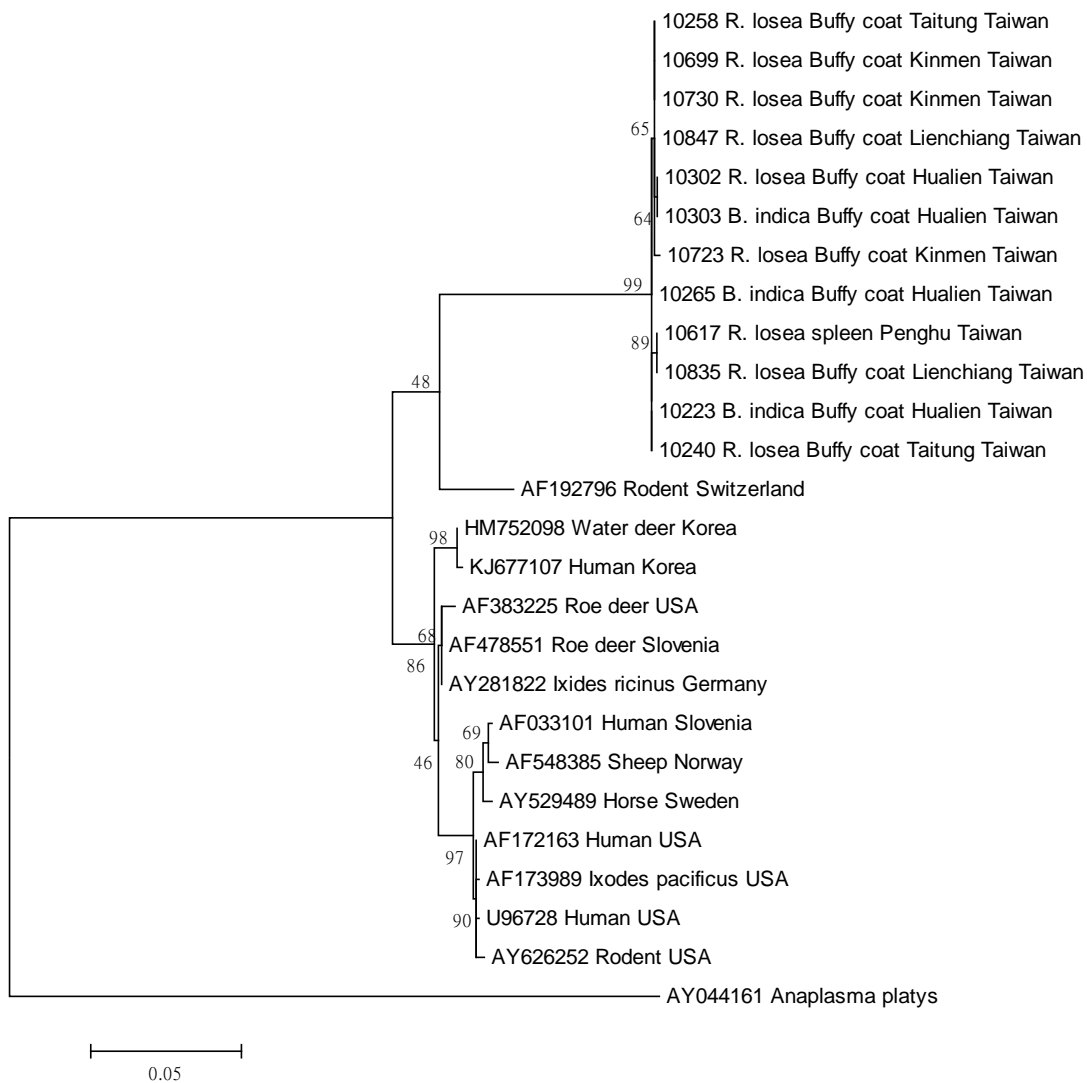
圖一、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 16S rRNA gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Kimura 2+G，使用 Neighbor-Joining method。



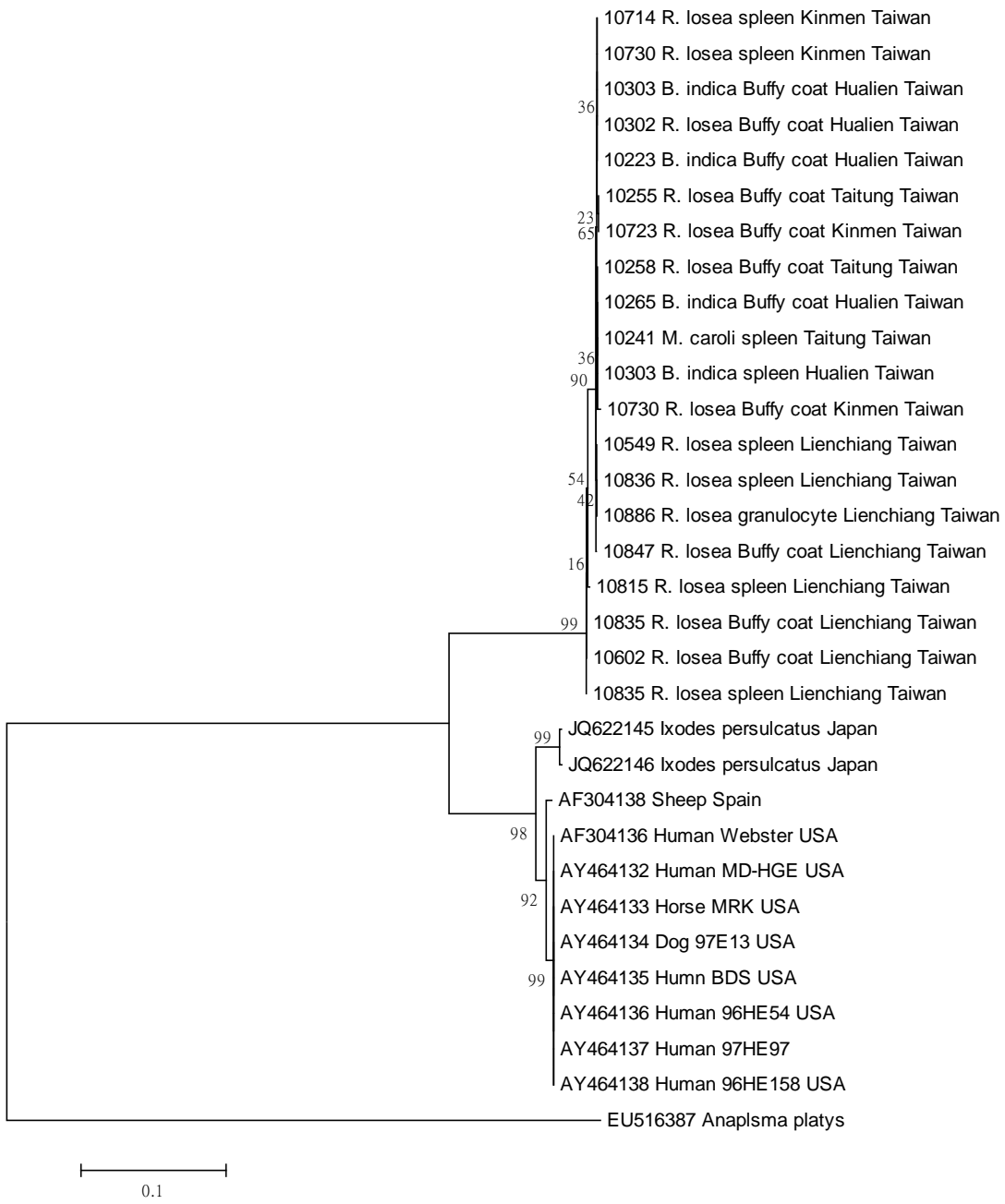
圖二、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 16S rRNA gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Kimura 2+G，使用 Maximum Likelihood method。



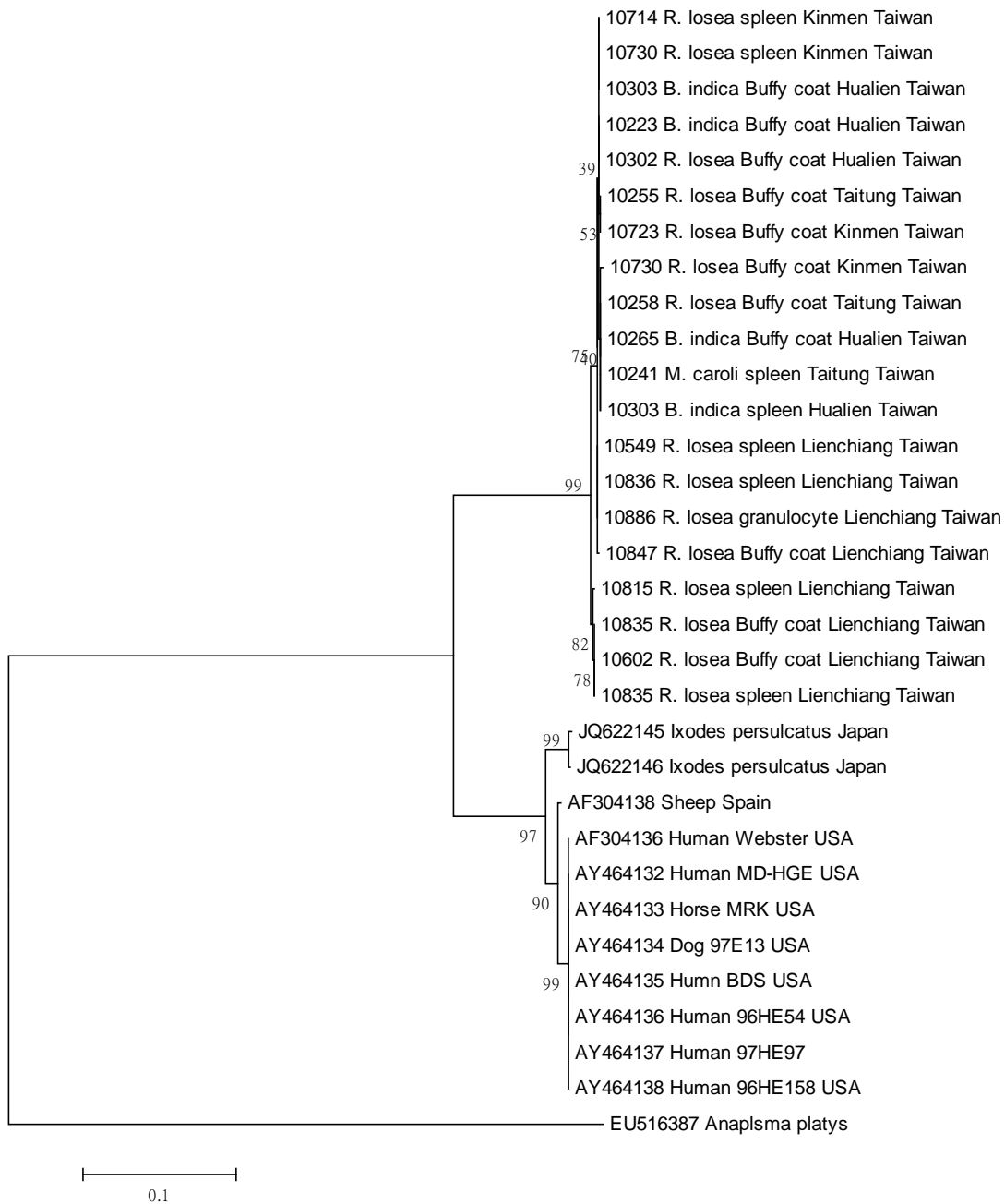
圖三、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 groESL 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura-Nei+G，使用 Neighbor-Joining method。



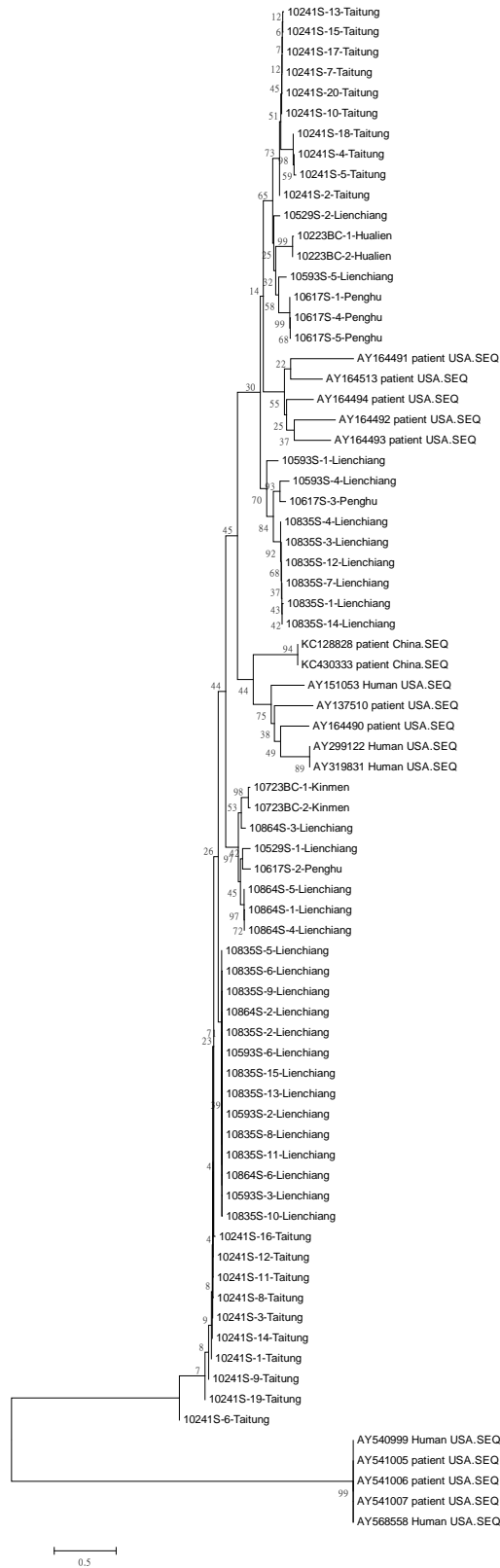
圖四、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 groESL 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura-Nei+G，使用 Maximum Likelihood method。



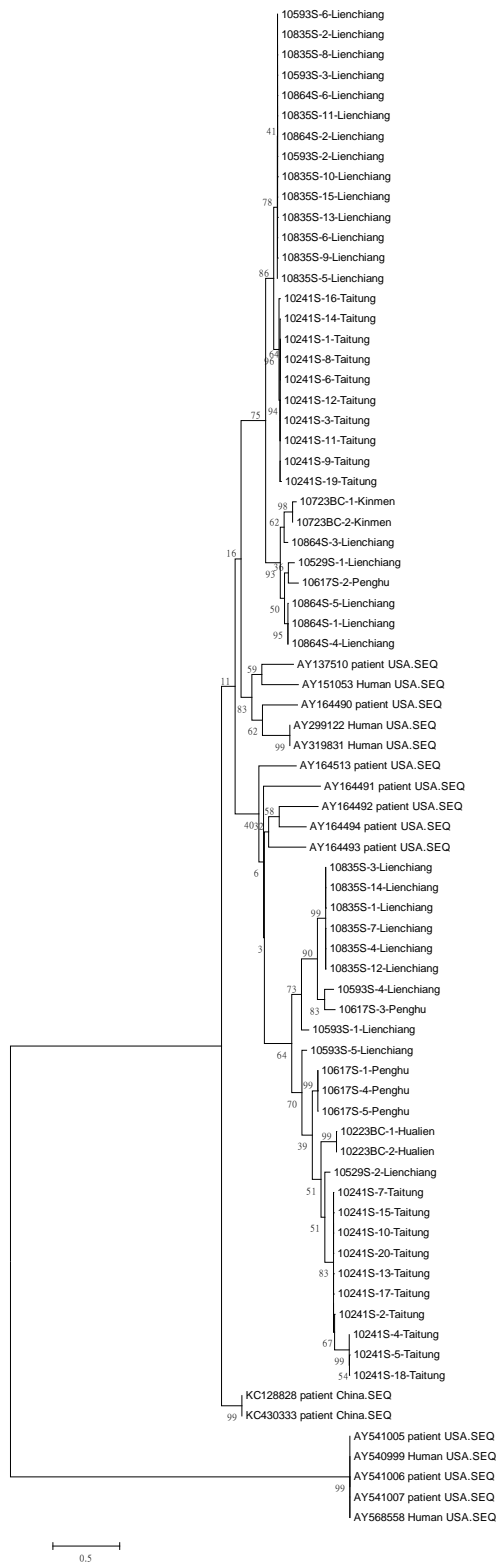
圖五、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 *gltA* gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura 3+G，使用 Neighbor-Joining method。



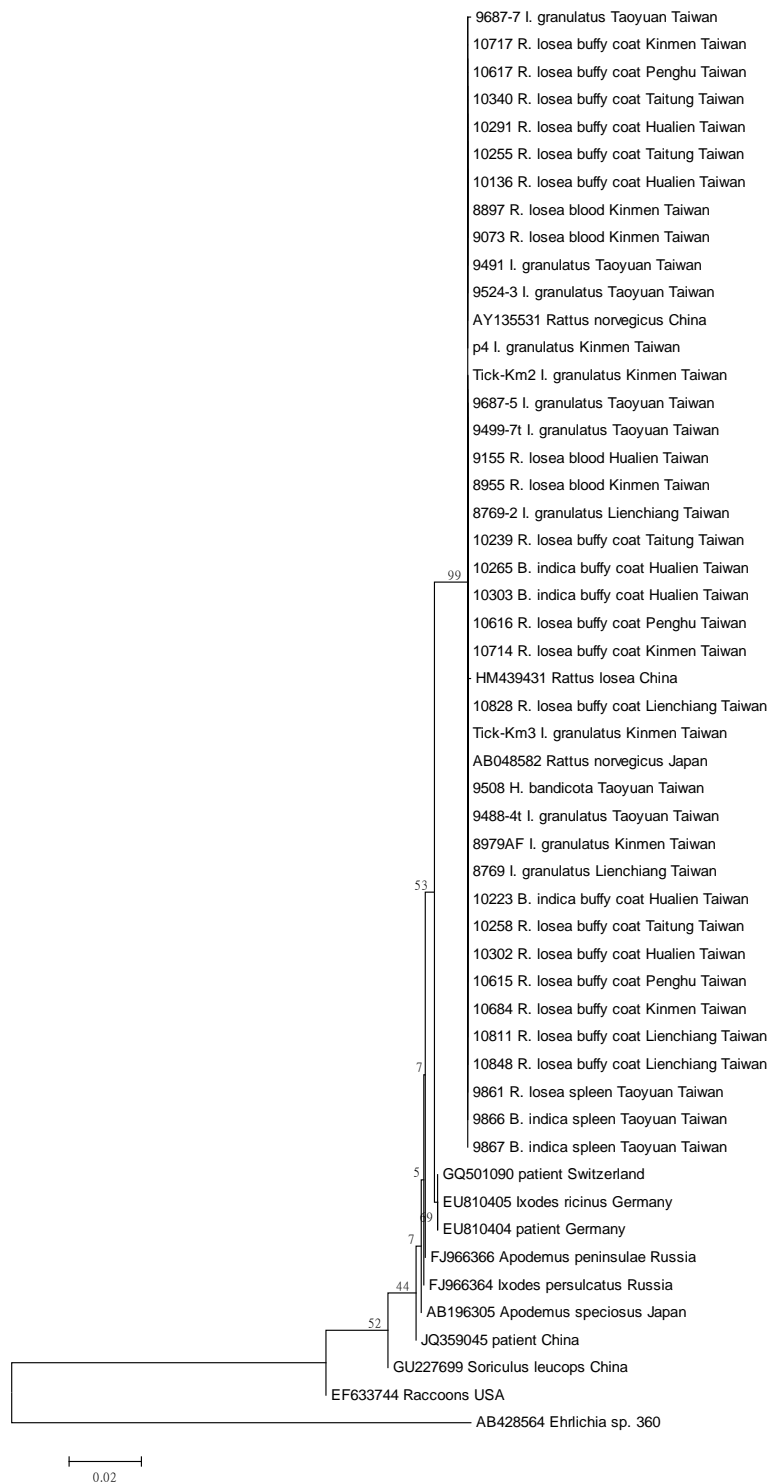
圖六、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 *gltA* gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura 3+G，使用 Maximum Likelihood method。



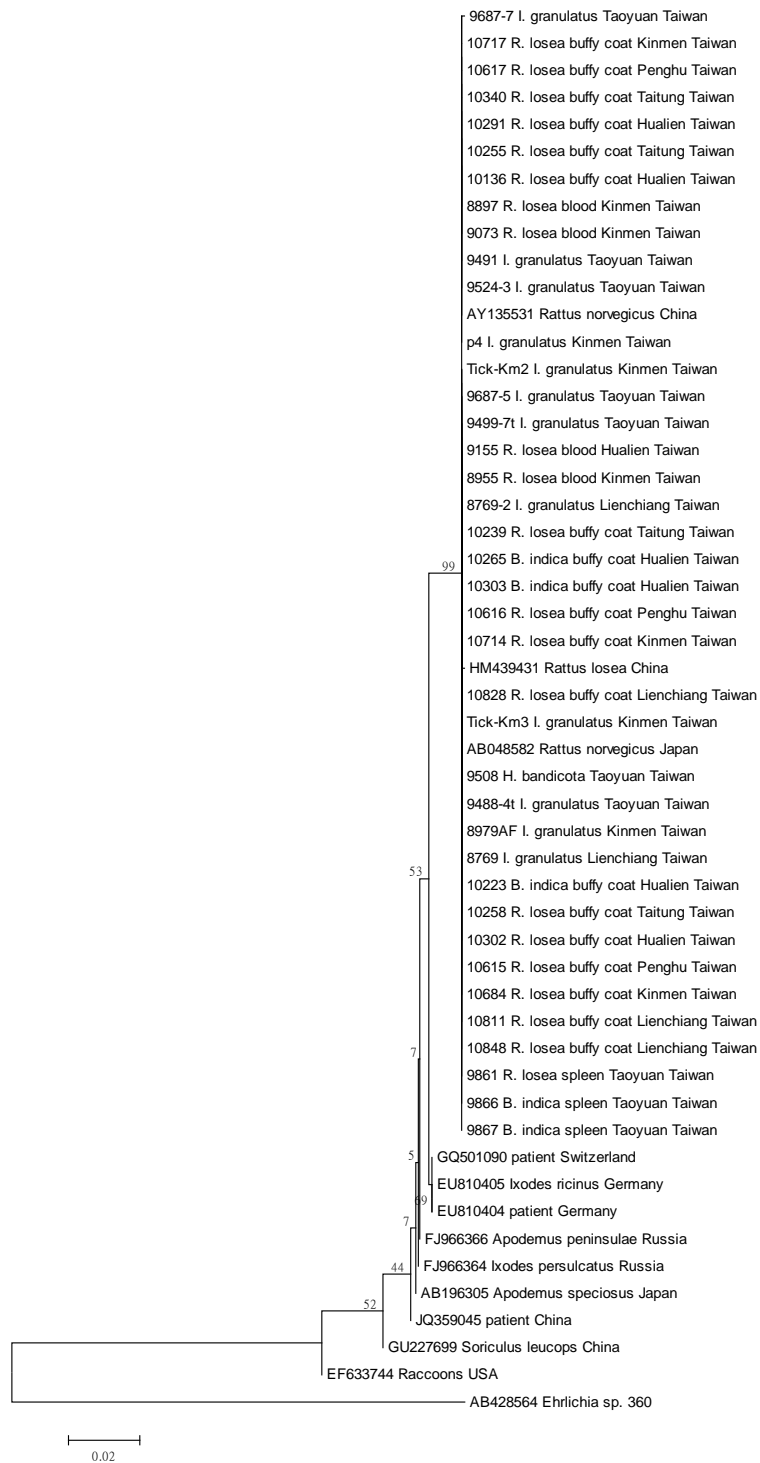
圖七、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 p44/msp2 gene 部分序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura-Ni+G，使用 Neighbor-Joining method。



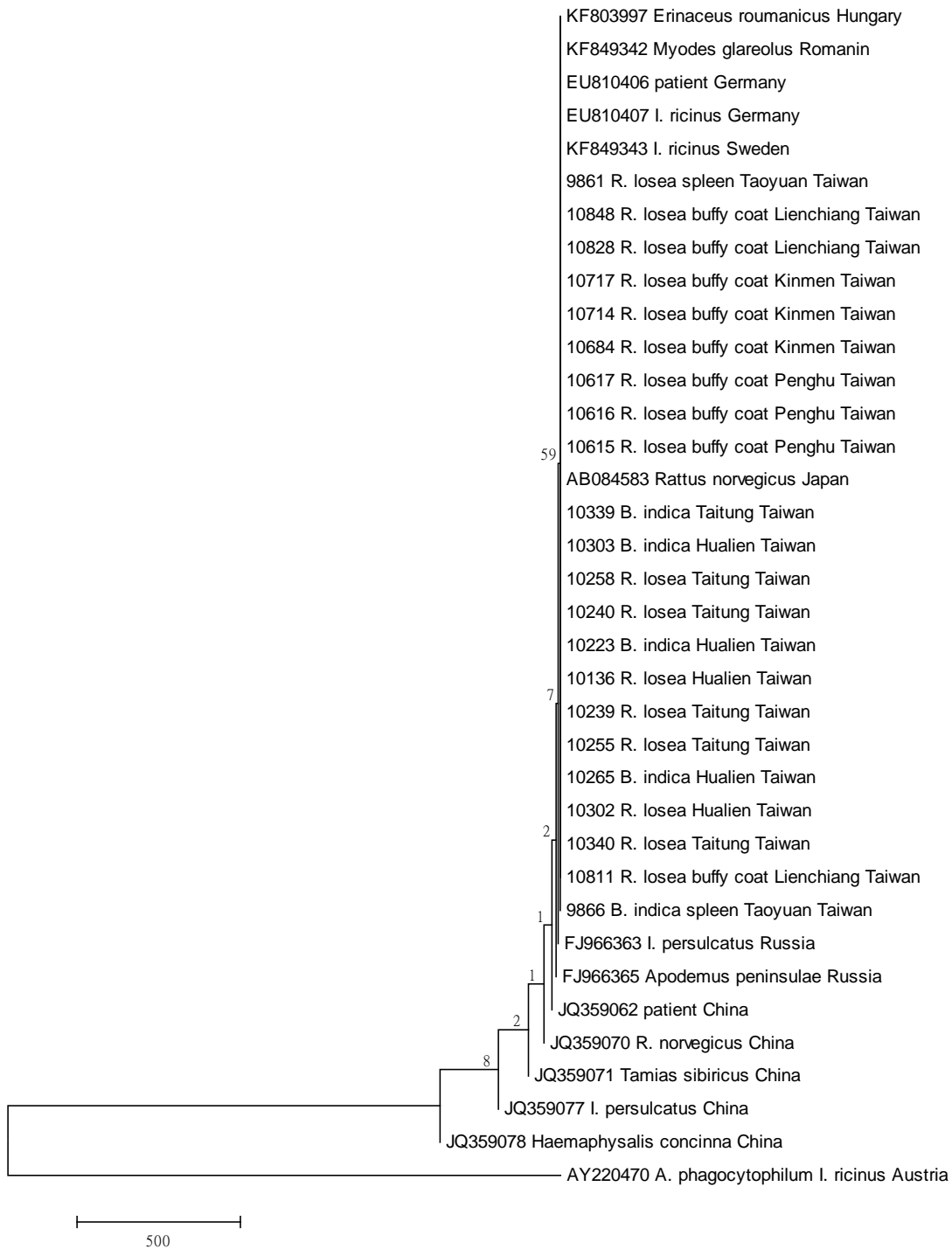
圖八、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 p44/msp2 gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Hasegawa-Kishino-Yano+G，使用 Maximum Likelihood method。



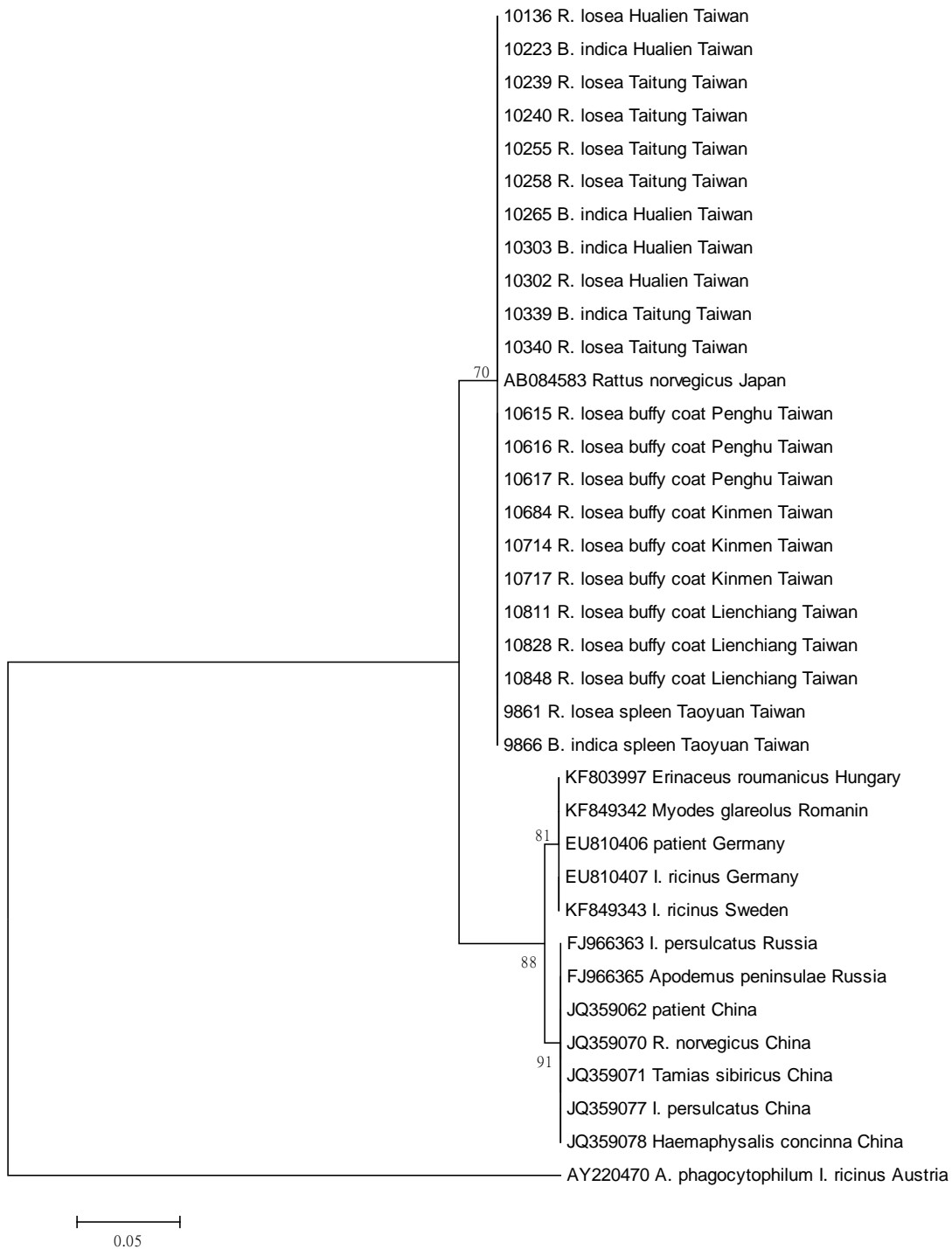
圖九、台灣地區 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 菌株 16S rRNA gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Kimura 2+G，使用 Neighbor-Joining method。



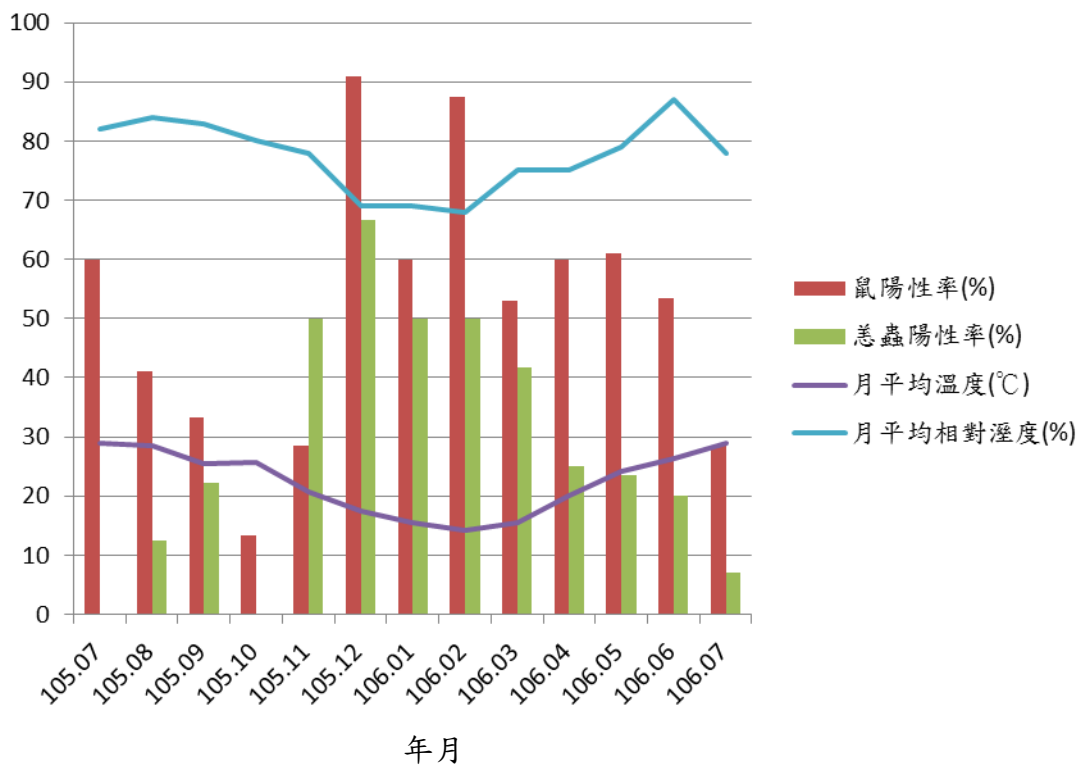
圖十、台灣地區 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 菌株 16S rRNA gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Kimura 2+G，使用 Maximum Likelihood method。



圖十一、台灣地區 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 菌株 groESL gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura-Nei+G，使用 Neighbor-Joining method。



圖十二、台灣地區 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 菌株 groESL gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Tamura-Nei+G，使用 Maximum Likelihood method。



圖十三、105年7月至106年7月金門縣鼠類及恙蟲感染 Anaplasma & Ehrlichia 季節性分佈

表一、*Rickettsia* 屬立克次體培養結果

編號	來源	sequence close to	接種原液Ct 值	培養後冷凍保存Ct值
C008NV	金門縣 <i>R. haemaphysaloides</i>	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01	32.49	23.82 (Day49)
9073Ft	金門縣 <i>R. haemaphysaloides</i>	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01	27.23	20.57 (Day49)
9543N2	金門縣 <i>R. haemaphysaloides</i>	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01	21.99	18.95 (Day28)
9699	臺中縣 <i>H. bandicota</i>	<i>Rickettsia</i> sp. HIR/D91	31.24	24.54 (Day56)
9697-1	臺中縣 <i>H. bandicota</i>	<i>Rickettsia</i> sp. HIR/D91	33.81	24.61 (Day56)
Freet	金門縣 <i>R. haemaphysaloides</i>	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01	28.14	22.41 (Day49)
9716-2	臺中縣 <i>H. bandicota</i>	<i>Rickettsia</i> sp. HIR/D91	32.17	21.78 (Day56)
9701-1	臺中縣 <i>H. bandicota</i>	<i>Rickettsia</i> sp. HIR/D91	34.48	21.34 (Day56)
9698-1	臺中縣 <i>H. bandicota</i>	<i>Rickettsia</i> sp. HIR/D91	36.47	21.6 (Day56)

表二、*Rickettsia* 屬之立克次體 *gltA* 全長序列分析

地區	來源	<i>Rickettsia</i> 陽性編號	sequence close to
桃園縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	9543N2	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, 1234/1234(100%) 1234bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	C008NV-2	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, 1153/1153(100%) 1153bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	9073Ft	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, 1234/1234(100%) 1234bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	Freet	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, 1234/1234(100%) 1234bp
桃園縣	<i>H. bandicota</i>	9776-6	<i>Rickettsia</i> sp. Mie180 isolate Tick-180-Mie-Hlon citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, 1151/1153(99%) 1153bp
桃園縣	<i>H. bandicota</i>	9776-7	<i>Rickettsia</i> sp. Mie180 isolate Tick-180-Mie-Hlon citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, 1151/1153(99%) 1153bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9716-1	<i>Rickettsia</i> sp. Mie180 isolate Tick-180-Mie-Hlon citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, 1151/1153(99%) 1153bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9699	<i>Rickettsia</i> sp. Mie180 isolate Tick-180-Mie-Hlon citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, 1151/1153(99%) 1153bp

表三、*Rickettsia* 屬之立克次體 16S rRNA gene (*rrs*)全長序列分析

地區	來源	<i>Rickettsia</i> 陽性編號	sequence close to
桃園縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	9543N2	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 16S ribosomal RNA gene, 1419/1421(99%) 1421bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	C008NV-2	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 16S ribosomal RNA gene, 1419/1421(99%) 1421bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	9073Ft	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 16S ribosomal RNA gene, 1419/1421(99%) 1421bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	Freet	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 16S ribosomal RNA gene, 1419/1421(99%) 1421bp
桃園縣	<i>H. bandicota</i>	9776-6	Uncultured <i>Rickettsia</i> sp. clone HtM69 16S ribosomal RNA gene, 1420/1421(99%) 1421bp
桃園縣	<i>H. bandicota</i>	9776-7	Uncultured <i>Rickettsia</i> sp. clone HtM69 16S ribosomal RNA gene, 1420/1421(99%) 1421bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9716-1	Uncultured <i>Rickettsia</i> sp. clone HtM69 16S ribosomal RNA gene, 1420/1421(99%) 1421bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9699	Uncultured <i>Rickettsia</i> sp. clone HtM69 16S ribosomal RNA gene, 1420/1421(99%) 1421bp

表四、*Rickettsia* 屬之立克次體 gene D (*sca4*)全長序列分析

地區	來源	<i>Rickettsia</i> 陽性編號	sequence close to
桃園縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	9543N2	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 PS120 (D) gene, 3004/3004(100%) 3005bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	C008NV-2	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 PS120 (D) gene, 3003/3004(99%) 3005bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	9073Ft	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 PS120 (D) gene, 3003/3004(99%) 3005bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	Freet	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 PS120 (D) gene, 3003/3004(99%) 3005bp
桃園縣	<i>H. bandicota</i>	9776-6	<i>Rickettsia japonica</i> protein PS 120 (D) gene, 2783/2832(98%) 2871bp
桃園縣	<i>H. bandicota</i>	9776-7	<i>Rickettsia japonica</i> protein PS 120 (D) gene, 2783/2832(98%) 2865bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9716-1	<i>Rickettsia japonica</i> protein PS 120 (D) gene, 2783/2832(98%) 2871bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9699	<i>Rickettsia japonica</i> protein PS 120 (D) gene, 2900/2954(98%) 2996bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9697-1	<i>Rickettsia japonica</i> protein PS 120 (D) gene, 2901/2954(98%) 2997bp

表五、*Rickettsia* 屬之立克次體 *OmpA* 全長序列分析

地區	來源	<i>Rickettsia</i> 陽性編號	sequence close to
桃園縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	9543N2	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 outer membrane protein A (ompA) gene, 3188/3188(100%) 3778bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	C008NV-2	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 outer membrane protein A (ompA) gene, 3188/3188(100%) 3778bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	9073Ft	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 outer membrane protein A (ompA) gene, 3188/3188(100%) 3778bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	Freet	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 outer membrane protein A (ompA) gene, 3188/3188(100%) 3778bp
桃園縣	<i>H. bandicota</i>	9776-6	<i>Rickettsia heilongjiangensis</i> outer membrane protein A (ompA) gene, 3147/3182(99%) 3769bp
桃園縣	<i>H. bandicota</i>	9776-7	<i>Rickettsia heilongjiangensis</i> outer membrane protein A (ompA) gene, 3147/3182(99%) 3769bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9716-1	<i>Rickettsia heilongjiangensis</i> outer membrane protein A (ompA) gene, 3147/3182(99%) 3769bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9699	<i>Rickettsia heilongjiangensis</i> outer membrane protein A (ompA) gene, 3147/3182(99%) 3769bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9697-1	<i>Rickettsia heilongjiangensis</i> outer membrane protein A (ompA) gene, 3134/3170(99%) 3756bp

表六、*Rickettsia* 屬之立克次體 *OmpB* 全長序列分析

地區	來源	<i>Rickettsia</i> 陽性編號	sequence close to
桃園縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	9543N2	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 <i>OmpB</i> (<i>ompB</i>) gene, 4833/4834(99%) 4875bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	C008NV-2	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 <i>OmpB</i> (<i>ompB</i>) gene, 4832/4834(99%) 4875bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	9073Ft	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 <i>OmpB</i> (<i>ompB</i>) gene, 4833/4834(99%) 4875bp
金門縣	<i>R. haemaphysaloides</i>	Freet	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01 <i>OmpB</i> (<i>ompB</i>) gene, 4832/4834(99%) 4875bp
桃園縣	<i>H. bandicota</i>	9776-6	<i>Rickettsia hulinensis</i> outer membrane protein B (<i>ompB</i>) gene, 4789/4878(98%) 4878bp
桃園縣	<i>H. bandicota</i>	9776-7	<i>Rickettsia hulinensis</i> outer membrane protein B (<i>ompB</i>) gene, 4789/4878(98%) 4878bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9716-1	<i>Rickettsia hulinensis</i> outer membrane protein B (<i>ompB</i>) gene, 4789/4878(98%) 4878bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9699	<i>Rickettsia hulinensis</i> outer membrane protein B (<i>ompB</i>) gene, 4789/4878(98%) 4878bp
台中市	<i>H. bandicota</i>	9697-1	<i>Rickettsia hulinensis</i> outer membrane protein B (<i>ompB</i>) gene, 4789/4878(98%) 4878bp

表七、105 年 7 月至 106 年 7 月金門縣鼠類及恙蟲 Anaplasma & Ehrlichia 感染率與氣象因子相關性分析(correlation coefficient, r)

	鼠類Anaplasma & Ehrlichia感染率	恙蟲Anaplasma & Ehrlichia感染率	月平均溫度(°C)	月累積雨量(毫米)	月平均相對溼度(%)	日照時數(小時)
鼠類Anaplasma & Ehrlichia感染率	-	0.6052	-0.5851	-0.4117	-0.6040	-0.1404
恙蟲Anaplasma & Ehrlichia感染率	0.6052	-	-0.8649	-0.5190	-0.7474	-0.5611

表八、花蓮縣烏蟬形態鑑定、分子鑑定與蟬媒病原體檢測

Tick 編號	採集 宿主	採集地點	形態鑑定	12S rDNA	16S rDNA	分子鑑定	<i>Rickettsia</i> spp.	<i>Anaplasma</i> & <i>Ehrlichia</i>	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.
#117-1N	小彎	花蓮縣秀林	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. longicornis</i> isolate	<i>H. hystricis</i> isolate:	<i>Haemaphysalis</i>	-	-	-	-
	嘴	鄉蓮花池	nymph	BJ165 316/339(93%)	HH-C 400/401(99%)	<i>hystricis</i>				
#117-2N	小彎	花蓮縣秀林	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. longicornis</i> isolate	<i>H. hystricis</i> isolate:	<i>Haemaphysalis</i>	-	-	-	-
	嘴	鄉蓮花池	nymph	BJ165 316/339(93%)	HH-C 400/401(99%)	<i>hystricis</i>				
#117-3N	小彎	花蓮縣秀林	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. longicornis</i> isolate	<i>H. hystricis</i> isolate:	<i>Haemaphysalis</i>	-	-	-	-
	嘴	鄉蓮花池	nymph	BJ165 316/339(93%)	HH-C 399/401(99%)	<i>hystricis</i>				
#117-4N	小彎	花蓮縣秀林	<i>Haemaphysalis</i> sp.	-	<i>H. hystricis</i> isolate:	<i>Haemaphysalis</i>	-	-	-	-
	嘴	鄉蓮花池	nymph		HH-B 400/401(99%)	<i>hystricis</i>				
#117-5N	小彎	花蓮縣秀林	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. longicornis</i> isolate	<i>H. hystricis</i> isolate:	<i>Haemaphysalis</i>	-	-	-	-
	嘴	鄉蓮花池	nymph	BJ165 316/340(93%)	HH-B 400/401(99%)	<i>hystricis</i>				
#117-6N	小彎	花蓮縣秀林	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. longicornis</i> isolate	<i>H. hystricis</i> isolate:	<i>Haemaphysalis</i>	-	-	-	-
	嘴	鄉蓮花池	nymph	BJ165 316/340(93%)	HH-B 401/401(100%)	<i>hystricis</i>				
#117-7N	小彎	花蓮縣秀林	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. longicornis</i> isolate	<i>H. hystricis</i> isolate:	<i>Haemaphysalis</i>	-	-	-	-
	嘴	鄉蓮花池	nymph	BJ165 316/340(93%)	HH-B 401/401(100%)	<i>hystricis</i>				
A15362-1	繡眼	花蓮縣秀林	<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. hexagonus</i>	<i>I. columnae</i> isolate:	<i>Ixodes</i>	<i>Rickettsia</i> <i>helvetica</i>	-	-	-
L	畫眉	鄉西寶		305/347(88%)	IC-A 406/407(99%)	<i>columnae</i>	380/382 (99%)			

A15362-2	繡眼	花蓮縣秀林	<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. hexagonus</i>	<i>I. columnae</i> isolate:	<i>Ixodes</i>	-	-	-	-
L	畫眉	鄉西寶		305/346(88%)	IC-A 406/408(99%)	<i>columnae</i>				
										<i>Rickettsia</i>
A15375-1	白眉	花蓮縣秀林	<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. hexagonus</i>	<i>I. columnae</i> isolate:	<i>Ixodes</i>				
L	林鴿	鄉碧綠神木		305/347(88%)	IC-A 407/407(100%)	<i>columnae</i>	380/382	-	-	-
							(99%)			
A15375-2	白眉	花蓮縣秀林	<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. hexagonus</i>	<i>I. columnae</i> isolate:	<i>Ixodes</i>	-	-	-	-
L	林鴿	鄉碧綠神木		305/347(88%)	IC-A 407/407(100%)	<i>columnae</i>				
A45631T-	黑臉	花蓮縣秀林	<i>Ixodes</i> sp. nymph	<i>I. granulatus</i> isolate	<i>I. granulatus</i> isolate:	<i>Ixodes</i>	-	-	-	-
N	鴟	鄉西寶		3674 338/340(99%)	IG-A 408/409(99%)	<i>granulatus</i>				
K30223-1	粉紅	花蓮縣秀林	<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. hexagonus</i>	<i>I. columnae</i> isolate:	<i>Ixodes</i>	-	-	-	-
L	鸚嘴	鄉蓮花池		305/347(88%)	IC-A 407/407(100%)	<i>columnae</i>				
A59030-1	冠羽	花蓮縣秀林	<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. hexagonus</i>	<i>I. columnae</i> isolate:	<i>Ixodes</i>	-	-	-	-
L	畫眉	鄉慈恩山莊		305/346(88%)	IC-A 407/407(100%)	<i>columnae</i>				
										<i>Rickettsia</i>
K31236-1	黃胸	花蓮縣秀林	<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. hexagonus</i>	<i>I. columnae</i> isolate:	<i>Ixodes</i>				
L	青鵪	鄉蓮花池		305/347(88%)	IC-A 407/407(100%)	<i>columnae</i>	380/382	-	-	-
							(99%)			

							<i>Rickettsia</i>			
C46379T- L	白腹 鵝	花蓮縣秀林 鄉西寶	<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. hexagonus</i> 306/347(88%)	<i>I. columnae</i> isolate: IC-A 407/407(100%)	<i>Ixodes</i> <i>columnae</i>	<i>helvetica</i> 382/382 (100%)	-	-	-
C46697-1 F	赤腹 鵝	花蓮縣壽豐 鄉東華大學 大門前田地	<i>Rhipicephalus</i> <i>haemaphysaloides</i> ♀	<i>R. haemaphysaloides</i> strain 30 338/339(99%)	<i>R. haemaphysaloides</i> strain 30 398/400(99%)	<i>Rhipicephalus</i> <i>haemaphysaloi</i> <i>des</i>	-	-	-	-
A59410T- L	黑臉 鵝	花蓮縣秀林 鄉西寶	<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. granulatus</i> isolate 3674 338/341(99%)	<i>I. granulatus</i> isolate: IG-A 408/409(99%)	<i>Ixodes</i> <i>granulatus</i>	-	-	<i>Borrelia</i> <i>valaisiana</i> 180/181 (99%)	<i>Babesia</i> <i>microti</i> 625/625 (100%)
A45632-1 N	黑臉 鵝	花蓮縣秀林 鄉西寶	<i>Ixodes</i> sp. nymph (mouth part damage)	<i>I. granulatus</i> isolate 42 339/340(99%)	<i>I. granulatus</i> strain LY-IG8560 409/410(99%)	<i>Ixodes</i> <i>granulatus</i>	-	-	<i>Borrelia</i> <i>valaisiana</i> 207/214 (97%)	-
A32598-1 N	黑臉 鵝	花蓮縣秀林 鄉西寶	<i>Ixodes</i> sp. nymph	<i>I. granulatus</i> isolate 42 336/340(99%)	<i>I. granulatus</i> isolate LY-IG8560 403/409(99%)	<i>Ixodes</i> <i>granulatus</i>	-	-	<i>Borrelia</i> <i>valaisiana</i> 212/215 (99%)	-
K32434T	深山 鶯	花蓮縣秀林 鄉蓮花池	tick 1 (damage)	<i>I. hexagonus</i> 305/347(88%)	<i>I. columnae</i> isolate: IC-A 407/408(99%)	<i>Ixodes</i> <i>columnae</i>	-	-	-	-
C43167-1 F	白腹 鵝	花蓮縣秀林 鄉西寶	<i>Ixodes</i> sp. ♀	<i>I. brunneus</i> isolate 98 296/308(96%)	<i>I. turdus</i> 407/411(99%)	-	-	<i>Borrelia</i> sp.	-	

										212/212	
										(100%)	
A30311-1 F	樹鵲	花蓮縣秀林 鄉西寶	<i>Ixodes</i> sp. ♀ (mouth part damage)	<i>I. brunneus</i> isolate 98 296/308(96%) JQ319374	<i>I. turdus</i> 410/410(100%) AB819259	<i>Ixodes turdus</i>	-	-	-	-	
1011130- 1F	白腹 鵲	花蓮縣壽豐 鄉水璉村水 連尾山	<i>Ixodes</i> sp. ♀	<i>I. brunneus</i> isolate 87 293/305(96%)	<i>I. turdus</i> 407/410(99%)	<i>Ixodes turdus</i>	-	-	-	-	
C46397-1 N	赤腹 鵲	花蓮縣壽豐 鄉東華大學	<i>Ixodes</i> sp. nymph	<i>I. brunneus</i> isolate 98 296/308(96%)	<i>I. turdus</i> 405/410(99%)	<i>Ixodes turdus</i>	-	-	-	-	<i>Borrelia</i> sp. 212/212 (100%)
D26875-1 M	虎鵲	花蓮縣秀林 鄉蓮花池	<i>Haemaphysalis</i> <i>ornithophila</i> ♂	<i>H. longicornis</i> isolate BJ165 305/323(94%)	<i>H. obesa</i> 373/404(92%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>ornithophila</i>	-	-	-	-	
D26875-2 M	虎鵲	花蓮縣秀林 鄉蓮花池	<i>Haemaphysalis</i> <i>ornithophila</i> ♂	<i>H. longicornis</i> isolate BJ165 305/323(94%)	<i>H. obesa</i> 376/404(93%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>ornithophila</i>	-	-	-	-	
C46427T- N	白腹 鵲	花蓮縣秀林 鄉洛韶	<i>Haemaphysalis</i> sp. nymph	<i>H. flava</i> 337/337(100%)	<i>H. flava</i> isolate: Hfl-B 401/402(99%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>flava</i>	-	-	-	-	<i>Ehrlichia</i> sp. BL157-9 305/305(100 %)
K31324-1 N	灰頭 鷓鴣	花蓮縣新城 鄉崇德	<i>Haemaphysalis</i> sp. nymph	<i>H. doenitzi</i> 328/336(98%)	<i>H. doenitzi</i> 391/402(97%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>doenitzi</i>	-	-	-	-	

K40252T_粉紅	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. doenitzi</i>	<i>H. doenitzi</i>	<i>Haemaphysalis</i>
1L	鸚嘴	larva	328/336(98%)	389/403(97%)	<i>doenitzi</i>
K40252T_粉紅	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. doenitzi</i>	<i>H. doenitzi</i>	<i>Haemaphysalis</i>
2L	鸚嘴	larva	328/336(98%)	391/402(97%)	<i>doenitzi</i>
K40252T_粉紅	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. doenitzi</i>	<i>H. doenitzi</i>	<i>Haemaphysalis</i>
3L	鸚嘴	larva	329/336(98%)	391/402(97%)	<i>doenitzi</i>
K40252T_粉紅	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. doenitzi</i>	<i>H. doenitzi</i>	<i>Haemaphysalis</i>
4L	鸚嘴	larva	328/336(98%)	391/402(97%)	<i>doenitzi</i>
K40252T_粉紅	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. doenitzi</i>	<i>H. doenitzi</i>	<i>Haemaphysalis</i>
5L	鸚嘴	larva	329/336(98%)	391/402(97%)	<i>doenitzi</i>
K40252T_粉紅	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. doenitzi</i>	<i>H. doenitzi</i>	<i>Haemaphysalis</i>
6L	鸚嘴	larva	328/336(98%)	391/402(97%)	<i>doenitzi</i>
K40252T_粉紅	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. doenitzi</i>	<i>H. doenitzi</i>	<i>Haemaphysalis</i>
7L	鸚嘴	larva	328/336(98%)	391/402(97%)	<i>doenitzi</i>
K40252T_粉紅	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. doenitzi</i>	<i>H. doenitzi</i>	<i>Haemaphysalis</i>
8L	鸚嘴	larva	328/336(98%)	391/402(97%)	<i>doenitzi</i>
K40252T_粉紅	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. doenitzi</i>	<i>H. doenitzi</i>	<i>Haemaphysalis</i>
9L	鸚嘴	larva	328/336(98%)	391/402(97%)	<i>doenitzi</i>
K40252T_粉紅	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp.	<i>H. doenitzi</i>	<i>H. doenitzi</i>	<i>Haemaphysalis</i>
10L	鸚嘴	larva	328/336(98%)	391/402(97%)	<i>doenitzi</i>

K40252T_粉紅 11L 鸚嘴	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp. larva	<i>H. doenitzi</i> 328/336(98%)	<i>H. doenitzi</i> 391/402(97%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>doenitzi</i>
K40252T_粉紅 12L 鸚嘴	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp. larva	<i>H. doenitzi</i> 328/336(98%)	<i>H. doenitzi</i> 391/402(97%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>doenitzi</i>
K40252T_粉紅 13L 鸚嘴	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp. larva	<i>H. doenitzi</i> 328/336(98%)	<i>H. doenitzi</i> 391/402(97%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>doenitzi</i>
K40252T_粉紅 14L 鸚嘴	花蓮.壽豐	<i>Haemaphysalis</i> sp. larva	<i>H. doenitzi</i> 329/336(98%)	<i>H. doenitzi</i> 391/402(97%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>doenitzi</i>
A34281T- L 黑臉 鸚	花蓮.秀林.太 魯閣.洛韶	<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. ariadnae</i> 305/346(88%)	<i>I. columnae</i> 407/407(100%)	<i>Ixodes</i> <i>columnae</i>
K399995T -L 粉紅 鸚嘴		<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. ariadnae</i> 306/346(88%)	<i>I. columnae</i> 407/407(100%)	<i>Ixodes</i> <i>columnae</i>
D17044T- 1L 白腹 鵝		<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. ariadnae</i> 306/346(88%)	<i>I. columnae</i> 407/407(100%) AB819233	<i>Rickettsia</i> <i>helvetica</i> 381/382 (99%)
D17044T- 2L 白腹 鵝		<i>Ixodes</i> sp. larva	<i>I. ariadnae</i> 306/346(88%)	<i>I. columnae</i> 407/408(99%)	<i>Rickettsia</i> <i>helvetica</i> 381/382 (99%)

	<i>Ixodes</i> sp. larva				<i>Rickettsia</i>
D17044T- 白腹		<i>I. ariadnae</i>	<i>I. columnae</i>	<i>Ixodes</i>	<i>helvetica</i>
3L 鶉		306/346(88%)	407/408(99%)	<i>columnae</i>	381/382 (99%)

表九、特生中心鳥蜱形態鑑定、分子鑑定與蜱媒病原體檢測

Tick 編號	採集 宿主	採集地點	形態鑑定	12S rDNA	16S rDNA	分子鑑定	<i>Rickettsia</i> spp.	<i>Anaplasma</i> & <i>Ehrlichia</i>	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.
194T-M	虎鶉	台東	<i>Haemaphysalis</i> <i>ornithophila</i>	<i>Haemaphysalis</i> <i>longicornis</i> 303/324(94%)	<i>Haemaphysalis obesa</i> 376/404(93%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>ornithophila</i>	-	-	-	-
387T-N	虎鶉	台東	<i>Haemaphysalis</i> sp. nymph	<i>Haemaphysalis</i> <i>formosensis</i> 336/338(99%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>formosensis</i> 404/404(100%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>formosensis</i>	-	-	-	-
411T-N	番鶉	花蓮長濱	<i>Haemaphysalis</i> sp. nymph	<i>Haemaphysalis</i> <i>doenitzi</i> 329/336(98%)	-	<i>Haemaphysalis</i> <i>doenitzi</i>	-	-	-	-
684T-2N	番鶉	墾丁關山	<i>Haemaphysalis</i> sp. nymph	<i>Haemaphysalis</i> <i>doenitzi</i> 329/336(98%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>doenitzi</i> 391/402(97%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>doenitzi</i>	-	-	-	-
1042T-1N	虎鶉	花蓮兆豐	<i>Haemaphysalis</i> sp. nymph	<i>Haemaphysalis</i> <i>longicornis</i> isolate 316/339(93%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>hystricis</i> 401/401(100%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>hystricis</i>	-	-	-	-
1100T-N	灰背 鶉	金門北山	<i>Haemaphysalis</i> sp. nymph	<i>Haemaphysalis</i> <i>formosensis</i> 338/338(100%)	-	<i>Haemaphysalis</i> <i>formosensis</i>	-	-	-	-
1125T-1N	虎鶉	霧社	<i>Haemaphysalis</i> sp. nymph	<i>Haemaphysalis</i> <i>longicornis</i> 316/339(93%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>hystricis</i> 400/401(99%)	<i>Haemaphysalis</i> <i>hystricis</i>	-	-	-	-

162T-3M	番鵝	台東	<i>H. doenotzi</i>	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 327/336(97%)	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 391/402(97%)	<i>Haemaphysalis doenitzi</i>	-	-	-	-
								Uncultured bacterium clone		
408T-2M	番鵝	台東	<i>H. doenotzi</i>	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 329/336(98%)	-	<i>Haemaphysalis doenitzi</i>	-	ncd992e08c 1 305/305(100%)	-	-
433T-2M	虎鵝	中海拔	<i>H. ornithophila</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i> 305/323(94%)	<i>Haemaphysalis obesa</i> 376/404(93%)	<i>Haemaphysalis ornithophila</i>	-	-	-	-
749T-1M	番鵝	知本農場	<i>H. doenotzi</i>	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 328/336(98%)	-	<i>Haemaphysalis doenitzi</i>	-	-	-	-
749T-2M	番鵝	知本農場	<i>H. doenotzi</i>	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 328/336(98%)	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 391/402(97%)	<i>Haemaphysalis doenitzi</i>	-	-	-	-
297T-L	藍腹鵝	南投	<i>Haemaphysalis</i> sp. larva	<i>Ixodes ariadnae</i> 306/346 (88%)	<i>Ixodes columnae</i> 407/407(100%)	<i>Ixodes columnae</i>		Rickettsia helvetica 381/382(99%)	-	-
308T-L	環頸雉	清泉崗	<i>Haemaphysalis</i> sp. larva	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 324/337(96%)	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 386/402(96%)	<i>Haemaphysalis doenitzi</i>	-	-	-	-

1075T-1L	褐翅 鴉鵂	金門	<i>Haemaphysalis</i> sp. larva	<i>Haemaphysalis flava</i> 295/323(91%)	-	<i>Haemaphysalis wellingtoni</i>	-	-	-	-
1075T-2L	褐翅 鴉鵂	金門	<i>Haemaphysalis</i> sp. larva	<i>Haemaphysalis flava</i> 295/323(91%)	-	<i>Haemaphysalis wellingtoni</i>	-	-	-	-
297T-1N	藍腹 鵂	南投	<i>Haemaphysalis</i> sp. nymph	<i>Haemaphysalis longicornis</i> 305/323(94%)	<i>Haemaphysalis obesa</i> 376/404(93%)	<i>Haemaphysalis ornithophila</i>	-	-	-	-
297T-2N	藍腹 鵂	南投	<i>Haemaphysalis</i> sp. nymph	<i>Haemaphysalis longicornis</i> 305/323(94%)	<i>Haemaphysalis obesa</i> 376/404(93%)	<i>Haemaphysalis ornithophila</i>	-	Uncultured <i>Anaplasma</i> sp. clone BJ01 305/305(100%)	-	-
308T-1F	環頸 雉	清泉崗	<i>H. doenitzi</i>	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 324/337(96%)	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 386/402(96%)	<i>Haemaphysalis doenitzi</i>	-	-	-	-
308T-2M	環頸 雉	清泉崗	<i>H. doenitzi.</i>	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 336/336(100%)	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 398/402(99%)	<i>Haemaphysalis doenitzi</i>	-	-	-	-
308T-4M	環頸 雉	清泉崗	<i>H. doenitzi.</i>	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 336/336(100%)	<i>Haemaphysalis doenitzi</i> 391/402(97%)	<i>Haemaphysalis doenitzi</i>	-	-	-	-

							<i>Rickettsia</i>				
402T-N	褐色 柳鶯	花蓮	<i>Ixodes</i> sp. nymph	<i>Ixodes pavlovskyi</i> 321/352(91%)	<i>Ixodes nipponensis</i> 402/402(100%)	<i>Ixodes nipponensis</i>	<i>Rickettsia monacensis</i> 382/382(100%)				
1075T-1N	褐色 鴉鵂	金門	<i>Haemaphysalis</i> sp. nymph	<i>Haemaphysalis flava</i> 296/327(91%)	<i>Haemaphysalis wellingtoni</i> 398/402(99%)	<i>Haemaphysalis wellingtoni</i>	-	-	-	-	
1075T-2N	褐色 鴉鵂	金門	<i>Haemaphysalis</i> sp. nymph	<i>Haemaphysalis flava</i> 296/327(91%)	-	<i>Haemaphysalis wellingtoni</i>	-	-	-	-	
1075T-4M	褐色 鴉鵂	金門	<i>H. wellingtoni</i>	<i>Haemaphysalis flava</i> 296/326(91%)	<i>Haemaphysalis wellingtoni</i> 401/402(99%)	<i>Haemaphysalis wellingtoni</i>	-	Uncultured bacterium clone Hw124 305/305(100%)	-	-	
1075T-6M	褐色 鴉鵂	金門	<i>H. wellingtoni</i>	<i>Haemaphysalis flava</i> 296/325(91%)	-	<i>Haemaphysalis wellingtoni</i>	-	Uncultured bacterium clone Hw124 305/305(100%)	-	-	
1075T-7M	褐色 鴉鵂	金門	<i>H. wellingtoni</i>	<i>Haemaphysalis flava</i> 296/325(91%)	<i>Haemaphysalis wellingtoni</i> 401/402(99%)	<i>Haemaphysalis wellingtoni</i>	-	-	-	-	

1075T-8M	褐翅 鴉鵂	金門	<i>H. wellingtoni</i>	<i>Haemaphysalis flava</i> 296/326(91%)	<i>Haemaphysalis wellingtoni</i> 402/402(100%)	<i>Haemaphysalis wellingtoni</i>	-	-	-	-
1267	虎鶉	南投	<i>Haemaphysalis</i> sp.nymph	<i>Haemaphysalis longicornis</i> 316/339(93%)	<i>Haemaphysalis hystericis</i> 401/401(100%)	<i>Haemaphysalis hystericis</i>	-	-	-	-
1268	虎鶉	南投	<i>Haemaphysalis ornithophila</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i> 305/323(94%)	<i>Haemaphysalis obesa</i> 376/404(93%)	<i>Haemaphysalis ornithophila</i>	-	-	-	-

表十、9699 菌株重要基因序列與 GeneBank 最接近序列比較及新種 *Rickettsia* spp. 基因序列判定標準

Gene	Length of sequence(bp)	Length compare to ORF of <i>R. japonica</i>	Results (% pairwise nucleotide sequence similarity with phylogenetically closest <i>Rickettsia</i> species from NCBI)	Cut-off values of Fournier and others
<i>rrs</i>	1421	37-1457	99.7% (1417/1421) to <i>R. japonica</i> (AP017602); 99.6% (1416/1421) to <i>R. heilongjiangensis</i> (NR074469); 99.5% (1414/1421) to <i>R. raoultii</i> (CP010969); 99.5% (1414/1421) to <i>R. slovacica</i> (CP003375); 99.4% (1413/1421) to <i>R. rickettsii</i> (CP001227).	99.8%
<i>gltA</i>	1153	68-1220	99.5% (1147/1153) to <i>R. heilongjiangensis</i> (AB473812); 99.3% (1145/1153) to <i>R. japonica</i> (AP017602); 99.2% (1144/1153) to <i>R. slovacica</i> (CO002428); 99.1% (1143/1153) to <i>R. sibirica</i> (KU310587); 99.0% (1142/1153) to <i>R. parkeri</i> (CP003341)	99.9%
5' end of <i>ompA</i>	590	22-611	95.4% (563/590) to <i>R. heilongjiangensis</i> (AH012829); 94.7% (559/590) to <i>R. slovacica</i> (KX506733); 94.6% (558/590) to <i>R. japonica</i> (AP017602); 94.6% (558/590) to <i>R. parkeri</i> (MF034495); 94.2% (556/590) to <i>R. africae</i> (KT633262).	98.8%
3' end of <i>ompA</i>	3179	1192849-1189671	98.9% (3147/3182) to <i>R. heilongjiangensis</i> (AH012829); 98.7% (3138/3179) to <i>R. japonica</i> (AP017602); 97.8% (3111/3180) to <i>R. slovacica</i> (CP003375); 97.6% (3113/3188) to <i>R. peacockii</i> (AH013413); 97.6% (3105/3182) to <i>R. philipii</i> (CP003308).	-
<i>ompB</i>	4893	1-4893	98.2% (4789/4878) to <i>R. hulinensis</i> (AY260452); 98.0% (4781/4878) to <i>R. japonica</i> (AP017588); 97.8% (4774/4881) to <i>R. heilongjiangensis</i> (CP002919); 96.5% (4716/4888) to <i>R. slovacica</i> (CP003375); 96.4% (4712/4890) to <i>R. peacockii</i> (CP001227).	99.2%

<i>sca4</i>	2954	63-3016	98.2% (2900/2954) to <i>R. japonica</i> (AF155055); 98.0% (2899/2958) to <i>R. heilongjiangensis</i> (CP002912); 97.3% (2896/2976) to <i>R. slovacica</i> (CP003375); 96.8% (2919/3015) to <i>R. sibirica</i> (HM050295); 96.8% (2922/3019) to <i>R. mongolotimonae</i> (DQ097084).	99.3%
-------------	------	---------	--	-------

表十一、9543N2 菌株重要基因序列與 GeneBank 最接近序列比較及新種 *Rickettsia* spp. 基因序列判定標準.

Gene	Length of sequence(bp)	Length compare to ORF of <i>R. massiliae</i>	Results (% pairwise nucleotide sequence similarity with phylogenetically closest <i>Rickettsia</i> species from NCBI)	Cut-off values of Fournier and others
<i>rrs</i>	1421	11-1431	99.9% (1419/1421) to <i>R. raoultii</i> (DQ365809); 99.8% (1418/1421) to <i>R. massiliae</i> (CP003319); 99.7% (1417/1421) to <i>R. rhipicephali</i> (CP013133); 99.7% (1417/1421) to <i>R. slovacae</i> (CP003375); 99.6% (1416/1421) to <i>R. rickettsii</i> (AP017602).	99.8%
<i>gltA</i>	1234	1-1234	99.5% (1228/1234) to <i>R. massiliae</i> (CP003319); 99.4% (1227/1234) to <i>R. rhipicephali</i> (CP003342); 97.6% (570/584)to <i>R. aeschlimannii</i> (HQ335157); 99.1% (1223/1234) to <i>R. raoultii</i> (CP019435); 98.5% (1222/1234) to <i>R. sibirica</i> (KU310587)	99.9%
5' end of <i>ompA</i>	590	33-622	98.5% (581/590) to <i>R. massiliae</i> (CP003319); 98.3% (580/590) to <i>R. rhipicephali</i> (CP003342); 97.6% (570/584) to <i>R. aeschlimanni</i> (HQ335157); 96.6% (567/587) to <i>R. amblyommatis</i> (MF034496); 97.3% (568/590) to <i>R. raoultii</i> (KX506738)	98.8%
3' end of <i>ompA</i>	3188	1265228-126841 5	99.2% (3162/3188) to <i>R. massiliae</i> (U83444); 99.2% (3161/3188) to <i>R. rhipicephali</i> (CP003342); 98.0% (3124/3188) to <i>R. raoultii</i> (AH015609); 97.4% (3015/3188) to <i>R. amblyommatis</i> (CP015012); 97.3% (3104/3188) to <i>R. aeschlimanni</i> (U83446)	-
<i>ompB</i>	4840	97-4938	98.4% (4814/4893) to <i>R. rhipicephali</i> (AF123719); 98.3% to <i>R. massiliae</i> (CP000683); 97.7% to <i>R. raoultii</i> (CP010969); 97.7% to <i>R. aeschlimanni</i> (HM050278); 96.9% to <i>R. amblyommatis</i> (CP0150121)	99.2%

<i>sca4</i>	3005	66-3025	98.0% (2963/3022) to <i>R. massiliae</i> (CP003319); 98.5% (2932/2978) to <i>R. rhipicephali</i> (CP003342); 98.0% (2930/3023) to <i>R. raoultii</i> (DQ365807); 97.3% (2878/2959) to <i>R. japonica</i> (AF155055) ; 96.9% (2926/3020) to <i>R. aeschlimanni</i> (HM050275)	99.3%
-------------	------	---------	---	-------