

計畫編號：DOH100-DC-2016

行政院衛生署疾病管制局 100 年度科技研究發展計畫

蜚媒新興及人畜共通傳染病分子流行病學監測

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：王錫杰

研究人員：舒佩芸、嵇達德、李沛龍、簡嘉豪、姜佩芳

執行期間： 100 年 1 月 1 日至 100 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本局意見，如對外研究成果應事先徵求本局同意

目 錄

一、圖次	3
表次	4
二、摘要：中文摘要	5
英文摘要	7
三、本文	
(一)、前言	9
(二)、材料與方法	15
(三)、結果	19
(四)、討論	27
(五)、結論與建議	32
(六)、計畫重要研究成果及具體建議	34
(七)、參考文獻	35
(八)、圖	41
表	47

圖次

圖一、台灣地區 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 菌株 16S rRNA gene 序列親緣關係圖	41
圖二、台灣地區 <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i> 菌株 16S rRNA gene 序列親緣關係圖	42
圖三、台灣地區 <i>Anaplasma platys</i> 菌株 16S rRNA gene 序列親緣關係圖	43
圖四、台灣地區 <i>Anaplasma bovis</i> 菌株 16S rRNA gene 序列親緣關係圖	43
圖五、台灣地區粒形硬蜱、板齒鼠血蜱及鐮形扇頭蜱 12S rRNA gene 序列親緣關係圖	44
圖六、圖六、台灣地區粒形硬蜱、板齒鼠血蜱及鐮形扇頭蜱 16SrRNA gene 序列親緣關係圖	45
圖七、蜱叮咬照片(門諾醫院提供)	46
圖八、蜱石蠟檢體	46

表次

表一、鼠類外寄生蜱艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體分子檢測結果	47
表二、鼠類外寄生蜱艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體檢出種類及分布	48
表三、鼠類脾臟艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體分子檢測結果	49
表四、鼠類血液艾利希氏體及邊蟲分子檢測結果	50
表五、鼠類脾臟艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體檢出種類及分布	51
表六、鼠類血液艾利希氏體及邊蟲檢出種類及分布	51
表七、狗蜱艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體分子檢測結果	52
表八、狗蜱艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體檢出種類及分布	52

摘要

關鍵詞：艾利希氏體感染症、邊蟲症、巴貝氏蟲病、蜱、分子流行病學

以 SYBR Green real-time PCR 檢測 95 年至 99 年於桃園、台中、高雄、屏東、花蓮、台東、澎湖、金門及連江所採集 648 隻鼠類外寄生蜱，艾利希氏體及邊蟲(*Ehrlichia* & *Anaplasma*) PCR 陽性率為 19.75% (128/648)，檢測之蜱種有 3 種，以粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)陽性率為 33.19% (77/232) 最高，其次為板齒鼠血蜱(*Haemaphysalis bandicota*) 16.95% (40/236)，鐮形扇頭蜱(*Rhipicephalus haemaphysaloides*) 6.67% (12/180) 最低。艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體共檢出 10 種，其中已知有 4 種可能為人畜致病性，包括 3 種會感染人及動物：*Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 及 1 種會感染牛：*Anaplasma bovis*，此 4 種分別佔所有蜱檢體之 2.62% (17/648), 0.15% (1/648), 6.94% (45/648) 及 4.48% (29/648)。相同方法檢測有蜱寄生之鼠類脾臟及血液，艾利希氏體及邊蟲 PCR 陽性率分別為 64.13% (59/92) 及 47.25% (43/91)。鼠類脾臟及血液中艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體共檢出 6 種，其中 *A. phagocytophilum* 分別佔所有鼠類脾臟及血液檢體之 14.13% (13/92) 及 9.30% (4/91)。檢測今年採自台灣北中南東四所動物醫院共 562 隻狗蜱(血紅扇頭蜱 *Rhipicephalus sanguineus*)，艾利希氏體及邊蟲 PCR 陽性率為 31.67% (178/562)，共發現 6 種艾利希氏體及邊蟲，有 5 種可能為人畜致病性(*Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma bovis*)，分別佔所有狗蜱檢體之 25.44% (143/562), 2.31% (13/562), 0.90% (5/562), 0.36% (2/562)

及 0.36% (2/562)。台灣地區艾利希氏體及邊蟲菌株以 16S rRNA gene 全長定序與世界其他地區菌株比較，發現 *A. phagocytophilum* 及 *A. bovis* 為新的變異株，*Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 及 *A. platys* 則與其他地區相同。利用 12S rRNA gene 及 16S rRNA gene 對粒形硬蜱、板齒鼠血蜱及鑷形扇頭蜱進行分子檢測，經親源關係樹圖分別發現有種間極明顯的分別，雖採自不同的地點，但同一種仍自成一類。蜱分子檢測所建立的資料庫，有助於形態不明檢體的鑑定，可應用於今年花蓮婦女遭台灣革蜱 (*Dermacentor taiwanensis*) 叮咬事件。本研究發現艾利希氏體及邊蟲已存在於台灣地區鼠類、狗與其外寄生蜱之循環中，醫師與民眾應留意是否有艾利希氏體及邊蟲感染的現象。

Abstract

Keywords: Ehrlichiosis, anaplasmosis, babesiosis, ticks, molecular epidemiology

A total of 648 small mammal ectoparasiting ticks collected from 2006 to 2009 in Taoyuan, Taichung, Kaohsiung, Pingtung, Hualien, Taitung, Penghu, Kinmen and Lienchiang were detected by SYBR Green real-time polymerase chain reaction (PCR), based on 16S rRNA. The infection rate of Ehrlichia and Anaplasma was 19.75% (128/648). Three species of small mammal ectoparasiting ticks were detected. *Ixodes granulatus* ticks has the highest infection rate was 33.19% (77/232), followed by *Haemaphysalis bandicota* ticks was 16.95% (40/236), and then *Rhipicephalus haemaphysaloides* ticks was 6.67% (12/180). Ten species of Ehrlichia, Anaplasma and Rickettsia were found. Three species of them were zoonotic agents, including *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*; the other one was bovine infection: *Anaplasma bovis*. The Ehrlichia and Anaplasma infection rates of the 4 species were 2.62% (17/648), 0.15% (1/648), 6.94% (45/648) and 4.48% (29/648), respectively. To detect the Ehrlichia and Anaplasma infection in small mammals, spleen and blood of small mammal being parasited by ticks were examined using the same method, the infection rate of Ehrlichia and Anaplasma were 64.13% (59/92) and 47.25% (43/91). Six species of Ehrlichia, Anaplasma and Rickettsia were discovered, the infection rates of *A. phagocytophilum* were 14.13% (13/92) and 9.30% (4/91). A total of 562 dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) collected from 4 animal hospitals in northern, central, southern and eastern part of Taiwan were detected, the infection rate of Ehrlichia and Anaplasma was 31.67% (178/562). Six species of Ehrlichia and Anaplasma were discovered. Five species of them were

zoonotic agents, including *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma bovis*, which infection rates were 25.44% (143/562), 2.31% (13/562), 0.90% (5/562), 0.36% (2/562) and 0.36% (2/562), respectively. Pairwise nucleotide sequence analysis of 16S rRNA gene shows that *A. phagocytophilum* and *A. bovis* discovered in Taiwan were new variants, whereas *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *A. platys* were identical with strains from other areas. The phylogenetic analysis of 12S rRNA gene and 16S rRNA gene showed *Ixodes granulatus*, *Haemaphysalis bandicota* and *Rhipicephalus haemaphysaloides* could be clearly divided into 3 phylogenetic groups, even though they were collected from different areas. The molecular method applied in tick identification of a tick biting woman in Hualien this June was identified as *Dermacentor taiwanensis*. These results suggest Ehrlichia and Anaplasma might therefore be transmitted among small mammals and dogs by ectoparasite ticks, and humans could also be infected.

前言

艾利希氏體感染症(Ehrlichiosis)、邊蟲症(Anaplasmosis)及巴貝氏蟲病(Babesiosis)皆為流行於人與動物間主要經由蜱傳播之人畜共通傳染病。艾利希氏體感染症在動物發現雖已超過 50 年，但自 1987 年才有人類感染病例被發現。感染人類艾利希氏體之病原體皆屬無形體科(Anaplasmataceae)，包括 *Anaplasma phagocytophilum*、*Ehrlichia chaffeensis*、*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。*E. chaffeensis* 造成人單核球艾利希氏體症(human monocytic ehrlichiosis, HME)；*A. phagocytophilum* 引起人顆粒球艾利希氏體症(human granulocytic anaplasmosis, HGA；舊稱 human granulocytic ehrlichiosis, HGE)(Bakken & Dumler, 2000; Dumler, 2005; Dumler et al., 2001)；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 ehrlichiosis(Buller et al., 1999)；*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(Bakken & S., 2002; Stone et al., 2004)。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*)及荷蘭的籠豆硬蜱(*Ixodes ricinus*)(Kawahara et al., 2004)，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才被發現(Fehr et al., 2010; von Loewenich et al., 2010; Welinder-Olsson et al., 2010)。

人類艾利希氏體感染症在日本、韓國、中國、英國、中歐的斯洛凡尼亞

(Slovenia)及美國皆有報告病例(Bakken & S., 2002; Lotric-Furlan et al., 1998; Sumption et al., 1995)。在美國多發生於 5 至 8 月，2008 年的報告病例 HME 有 957 例；HGA 有 1009 例，其死亡率並不高 HME 約 3%，HGA 約 0.7%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(Dumler et al., 2007)。

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(Bakken & S., 2002)。HME 之病媒為 *Amblyomma americanum*，犬及鹿可能為其貯主。

HME 及 HGA 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(Dumler et al., 2007)。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(Alberti et al., 2005; Inokuma et al., 2005; Massung et al., 2000; Zhi et al., 1999)。

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%(Chang et al., 1996; 張祖駿, 2003; 黃嘉嘉, 2003)。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(陳昱憲, 2007)。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(Hsieh et al., 2010)。翁等(2010)調查金門地區鼠類寄生蜱發現於小黃腹鼠採集之鐮形扇頭蜱(*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%(翁明輝 et al., 2010)。

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(Suto et al., 2001)。台灣雖曾進行貓犬艾利希氏體症調查研究，但尚未針對病媒蜱種之感染情形進行分析。雖然目前尚無人感染艾利希氏體症之報告，但應進行此項研究藉以評估民眾感染之危險性。

邊蟲症(Anaplasmosis)或稱邊緣無形體症在人類即為 human granulocytic anaplasmosis，病原體為 *Anaplasma phagocytophilum*，在動物界最常見為牛邊蟲症，病原體為 *Anaplasma marginale*。*A. marginata* 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(潘明正, 2007)。*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(林怡孜, 2007)

巴貝氏蟲病(Babesiosis)又稱焦蟲病，在 19 世紀末首先由 Babes 於羅馬尼亞牛身上發現(Babes, 1888)，而 Smith and Kilbone(1893)證實其經由蜱所傳播(Smith & Kilborne, 1893)。巴貝氏蟲可感染多種動物，包括牛、美洲野牛、馴鹿、山羊、綿羊、馬、驢、騾、豬、狗、貓等，為重要的動物傳染病(Uilenberg, 2006)，人類感染的病例於 1957 年首先於歐洲被報告(Skrabalo & Deanovic, 1957)。目前已知能傳播巴貝氏蟲病之原蟲種類已有 100 多種，其中可感染人

為 *Babesia microti* 及 *B. divergens*；感染狗為 *B. gibsoni*、*B. canis*、*B. rossi*、*B. vogeli* 及 *B. vitali*(Babes, 1888)，但亦發現人感染 *B. canis* 之報告(Marsaudon et al., 1995)。近年來美國有一些人類巴貝氏蟲病，其病原體與已知者不同，巴貝氏蟲暫定為 WA1、MO、CA1-CA4(Herwaldt et al., 1996; Kjemtrup & Conrad, 2000; Krause & Telford III, 1999; Popovsky, 1991)，由其分子的親緣關係，這些寄生蟲可能來自狗或野生動物(Marsaudon et al., 1995)。在日本的報告則發現在齧齒類中，*B. microti* 以小次單位核糖體 RNA 基因(SSUrDNA)分析，可分為 U.S.型、Kobe 型、Otsu 型及 Otsu related 型，顯示各不相同的原蟲，尚可分為不同基因型(genotype)(Saito-Ito et al., 2007)。

人類巴貝氏蟲病多發生於溫帶地區，如美國、法國及英國等歐洲國家，其他有報告病例的國家為中國、埃及、南非、墨西哥、日本及印度(Duh et al., 2001; Telford et al., 1993)，患者多半為脾臟切除之病人，台灣則有一人感染巴貝氏蟲病之疑似病例報告(Saito-Ito et al., 2004)。

文獻中 *B. microti* 及 *B. divergens* 的病媒蜱種為硬蜱屬(*Ixodes* spp.)，在美國主要為 *I. scapularis*，歐洲為 *I. ricinus*，日本為 *I. ovatus*；*B. gibsoni* 的病媒蜱種為 *Haemaphysalis bispinosa* 及 *Rhipicephalus sanguineus*；*B. canis* 的病媒蜱種為 *R. sanguineus* 及革蜱屬(*Dermacentor* spp.) (Marathe et al., 2005; Saitoito et al., 1999; Shih et al., 1997)。

巴貝氏蟲病的診斷可經由血液薄塗片以 Giemsa 染色、動物接種法、IFA、ELISA 及 PCR。患者直接血液薄塗片可能會因寄生蟲血症太低，而產生偽陰性，因此由倉鼠(golden hamster)腹腔接種 1 ml EDTA 全血，至 2-4 週後進行塗片，始可確診(Hunfeld & Brade, 2004)。不過動物接種法耗費時間長，因此簡便的 IFA 成為例行檢驗最常使用的血清學診斷方法，其敏感性雖高，但由於不

同原蟲有交互作用的現象，使其特異性不高，ELISA 如使用專一性的重組蛋白質為抗原，則可改善此問題(Miyama et al., 2005)。PCR 及 nested-PCR 由於其高敏感性及特異性為研究上最常使用的工具，基因標的以小次單位核糖體 RNA 基因(SSUrDNA)或稱 18S rDNA 為最多人使用，其他應用的標的基因還有 β -tubulin gene(Fukumoto et al., 2001; Tsuji et al., 2006)，P18 gene(Fukumoto et al., 2001)，P29 gene(Fukumoto et al., 2003)及 Rab gene(Zhou et al., 2002)等。定序後的標的基因有相當多的報告進行親緣關係分析，發現 β -tubulin gene 的序列較 SSUrDNA 歧異度大，可獲得較好的解析度(Zamoto et al., 2004)。

台灣在文獻記錄上至少有 5 例巴貝氏蟲病例(Chung et al., 1994; Hsieh, 1994; Shaio & Lin, 1998; Shaio & Yang, 1997; Shih et al., 1997; Shih & Wang, 1998)，一項來自花蓮、台東、屏東的人體血清學調查，發現巴貝氏蟲病的盛行率為 0.4%(Hsu & Cross, 1977)。而在鼠類的調查方面，在受檢的 36 隻鼠類血液檢體中，以 PCR 發現 *B. microti* 的陽性率為 47.6%，同時其核酸定序 SSUrDNA 基因片段，台灣的 *B. microti* 和日本神戶的蟲株較相近，相似度為 99 % (Saito-Ito et al., 2008; 王美嘉, 2000)，鼠種帶有 *B. microti* 主要為刺鼠 (*Niviventer coninga*)及小黃腹鼠(*Rattus losea*)(Lien et al., 1997)。在其他動物方面，林(2007)調查台灣 12 個牧場，發現乳牛巴貝氏蟲病，病原體 *B. bovis* 及 *B. bigemina* 的盛行率為 3.1%(林怡孜, 2007)。相同的台灣尚無對巴貝氏蟲病病媒蜚種進行調查研究。

許多研究顯示，相同的蜚種同時感染不同病原體，如採自美國新紐澤西州北部的 *Ixodes scapularis*，感染 *Borrelia burgdorferi*、*Bartonella* spp.、*Babesia microti* 及 *Anaplasma phagocytophilum*，最多發現 3 種病原體同時感染(Adelson et al., 2004)，而採自波蘭西北部的 *Ixodes ricinus* 發現同時感染 *Borrelia*

burgdorferi sensu lato、human granulocytic ehrlichiosis agent 及 *Babesia microti* 2 種或 3 種(Skotarczak et al., 2003)。

台灣每年有為數眾多的不明熱患者，在例行的 60 種法定傳染病病原外，尚無法確認病原種類。對存在於動物之人畜共通傳染病，且屬於非法定傳染病之艾利希氏體感染症、邊蟲症及巴貝氏蟲病，是否經由其體外寄生蟲傳播給人類，應進行更深入瞭解。

材料與方法

本研究擬以 3 年為期，進行台灣地區犬隻、鼠類及野生動物外寄生蟬艾利希氏體、邊蟲及巴貝氏蟲帶原之檢測，並利用基因序列比對及親緣樹狀圖演化分析 (phylogenetic tree analysis)，以對艾利希氏體、邊蟲及巴貝氏蟲在動物體外寄生蟬之分子流行病學有更清楚認識。第一年將針對艾利希氏體及邊蟲的基因序列 16S rRNA gene，第二年將針對巴貝氏蟲的基因序列 18S rRNA gene 建立聚合酶連鎖反應，先檢驗屬之層次，再檢測分出種。同時進行台灣地區犬隻及野生動物外寄生蟬採集，逐年以建立之分子檢測法檢測動物身上蟬種及鼠類全血、鼠類脾臟，並由基因序列比對及親緣樹狀圖演化分析 (phylogenetic tree analysis) 確定在台灣與世界各地不同品系之關係，期望釐清本地蟬種艾利希氏體、邊蟲及巴貝氏蟲帶原的實際情形，及感染人之可能性。另為瞭解人類族群感染之情況，將針對第一年艾利希氏體、邊蟲及第二年巴貝氏蟲分子檢測結果進行台灣地區可能感染艾利希氏體邊蟲及巴貝氏蟲之人類族群進行血清學檢測。

一、 樣本採集

- (一) 犬蟬：與北、中、南、東之動物醫院或大專院校獸醫系合作，長期收集就診之犬隻或流浪狗身上的蟬樣本，以同一隻動物為單位，保存於 70% 酒精，置於 4°C 或 -20°C 運送至林森實驗室。
- (二) 野生動物外寄生蟬：與台北市立動物園、行政院農業委員會台灣特有生物保育中心、中興大學獸醫系、屏東科技大學野生動物保育研究所等國內相關野生動物保育及救傷單位合作，長期收集救傷野生動物身上的蟬，保存於 70% 酒精，置於 4°C 或 -20°C 運送至林森實驗室。
- (三) 鼠類外寄生蟬、全血及蟬臟：95-99 年已採集連江縣、金門縣、澎湖縣、

宜蘭縣、花蓮縣、台東縣、桃園縣、台中縣、高雄縣及屏東縣約 1400 隻鼠類選取有蜚寄生約 100 隻全血及脾臟，及約 600 隻外寄生蜚。

二、 蜚鑑定方法

1. 形態鑑定參考鄭和姜(1991)、Yamaguti *et al.*(1971)及 Baker(1999)(Baker, 1999; Yamaguti *et al.*, 1971; 鄭國藩 & 姜在階, 1991)。
2. 蜚種分子鑑定參考 Beati and Keirans (2001)，以 12S rRNA gene 及 16S rRNA gene 為基因標的(Beati & Keirans, 2001)。
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 LTL，vortex 約 15sec 後，置於 56°C 隔夜。
4. 加入 400 μ l 的 Buffer DLL 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 buf 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. 增幅 12S rRNA gene: PCR 每一管 0.5 ml 微量離心管依序加入含有 13.65 μ l 去離子水、5 μ l 之 5X PCR buffer (Promega)、1 μ l 之 5 mM dNTPs (Promega)、1.75 μ l 之 25 mM MgCl₂ (Promega)、0.5 μ l 之 5 μ M primer T1B:

5'-AAACTAGGATAGATACCCT-3' 及 primer T2A :

5'-AATGAGAGCGACGGGCGATGT-3'、 2.5 μ l 之 DNA 模板及 0.1 μ l 酵素 Taq (Promega) (5 U/ μ l) 等之 PCR 反應液。PCR 反應流程為：先於 94°C，預熱 5 min；再依序進行 94°C (15 s)/ 51°C (30 s)/ 68°C (30 s) 之循環，一共 5 循環；接著 94°C (15 s)/ 53°C (30 s)/ 70°C (30 s) 之循環，一共 25 循環最後，於 70°C 5 min 中止反應。

9. 增幅 16S rRNA gene : primer 16S+1 :

5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3' 及 primer 16S-1 :

5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGTA-3'(Black & Piesman, 1994)，其餘條件與增幅 12S rRNA gene 相同。

10. 取 5 μ l 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。將 agarose 取出，用溴化乙錠 (ethidium bromide, aMRESCO) 染色，以紫外光照射觀察並照相，並將 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。

三、 艾利希氏體、邊蟲及巴貝氏蟲 PCR 檢測方法

1. 鼠類血液抽 DNA 方法：使用 OIA amp DNA blood Kit (Qiagen)，200 μ l 血液，以 100 μ l Buffer AE elute，將 DNA 置於-20°C 冰箱保存。
2. 鼠類脾臟抽 DNA 方法：使用 OIA amp DNA mini Kit (Qiagen)，取 10 mg 鼠類脾臟，以 100 μ l Buffer AE elute，將 DNA 置於-20°C 冰箱保存。
3. 艾利希氏體 PCR：參考 Parola *et al.*(2000)的方法(Parola *et al.*, 2000)，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°C，預熱 15 min；再依序進行 94°C (30 sec)/ 55°C (30 sec)/ 72°C (90 sec) 之循環，一共 45 循環，於 95°C 1 min 後進行 Melting 65°C 30 sec, 0.5°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。

4. 巴貝氏蟲 PCR：參考 Simpson *et al.* (2005) 的方法(Simpson *et al.*, 2005)使用 Apicomplexa-specific nested PCR，基因標的為 18S rRNA gene。

第一次 PCR primer

BmF1: GCG ATG TAT CAT TCA AGT TTC TG

BmR1: TGT TAT TGC CTT ACA CTT CCT TGC

第二次 PCR primer

BmF2: ACG GCT ACC ACA TCT AAG GAA GGC

BmR2: TCT CTC AAG GTG CTG AAG GA

PCR 反應流程為：先於 95°C，預熱 5 min；再依序進行 96°C (20 sec)/ 55°C (20 sec)/ 72°C (50 sec) 之循環，一共 39 循環，於 72°C 10 min 中止反應。

第二次與第一次相同。

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。

結果

一、 建立艾利希氏體及邊蟲(*Ehrlichia* & *Anaplasma*)分子檢測法

參考 Parola *et al.*(2000)的方法加以修改，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'

進行 SYBR Green real-time PCR，將陽性 PCR 產物(約 305bp)直接進行定序，再以 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 進行 DNA 序列 BLAST 比對。比對結果全部檢測菌株最接近的序列除 *Ehrlichia* spp. ,*Anaplasma* spp.外，尚有 *Wolbachia* spp. , Rickettsiales bacterium 及 alpha proteobacterium。

二、 鼠類外寄生蜱艾利希氏體及邊蟲(*Ehrlichia* & *Anaplasma*)分子檢測結果

將 95-99 年於桃園、台中、高雄屏東、花蓮、台東、澎湖、金門及連江所採集鼠類外寄生蜱進行艾利希氏體及邊蟲分子檢測。採集數量較少的高雄屏東、花蓮、台東、澎湖及連江全部外寄生蜱皆進行檢測，採集數量較多的桃園、台中及金門則平均選取不同地點及不同鼠種的外寄生蜱進行檢測。

鼠類外寄生蜱共檢測 648 隻，平均艾利希氏體及邊蟲 PCR 陽性率為 19.75%(128/648)，檢測之蜱種有 3 種，包括板齒鼠血蜱(*Haemaphysalis bandicota*)、粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)及鐮形扇頭蜱(*Rhipicephalus haemaphysaloides*)其中以粒形硬蜱陽性率為 33.19%(77/232)最高，其次為板齒鼠血蜱 16.95%(40/236)，鐮形扇頭蜱 6.67%(12/180)最低。以地區別，連江縣陽

性率為 31.71%(13/41)最高，其次為金門縣 27.18%(28/103) (表一)。

艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體共檢出 10 種，其中已知有 4 種可能為人畜致病性，包括 3 種會感染人及動物：*Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 及 1 種會感染牛：*Anaplasma bovis*，此 4 種分別佔所有檢體之 2.62%(17/648), 0.15%(1/648), 6.94%(45/648) 及 4.48%(29/648)，佔陽性檢體之 13.18%(17/129), 0.78%(1/129), 34.88%(45/129) 及 22.48%(29/129) (表二)。其中以 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 檢出數量最多，分布也最廣，包括桃園、台中、花蓮、金門及連江，但僅於粒形硬蜱中檢出。檢出數量次多者為 *Anaplasma bovis*，其分布亦很廣，在桃園及台中的板齒鼠血蜱，台中及花蓮的鐮形扇頭蜱都有檢出。*Anaplasma phagocytophilum* 為非常重要的人致病株，發現在桃園的板齒鼠血蜱及台中、金門、連江的粒形硬蜱

在尚未發現致病性的種類中，*Ehrlichia* sp. 360 為一種只發現於粒形硬蜱，但在桃園、台中、台東、金門及連江皆有檢出，甚至在日本琉球的粒形硬蜱都有 *Ehrlichia* sp. 360 的檢出報告(Takano et al., 2009)。

就艾利希氏體及邊蟲與蜱種之關係而言，板齒鼠血蜱、粒形硬蜱及鐮形扇頭蜱分別檢出 6、4、3 種艾利希氏體及邊蟲。有 3 種艾利希氏體及邊蟲似乎對蜱種具有專一性，*Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 及 *Ehrlichia* sp. 360 僅發現於粒形硬蜱；*Ehrlichia* sp. EH1087 僅發現於板齒鼠血蜱(表二)。

三、 鼠類脾臟及血液艾利希氏體及邊蟲分子檢測結果

將前述有蜱寄生之鼠類脾臟及血液進行艾利希氏體及邊蟲分子檢測，檢測之鼠類有 7 種，包括赤背條鼠(*Apodemus agrarius*)、鬼鼠(*Bandicota indica*)、田鼯鼠(*Mus caroli*)、家鼯鼠(*Mus musculus*)、刺鼠(*Niviventer coxingi*)、小黃腹

鼠(*Rattus losea*)及錢鼠(*Suncus murinus*)。鼠類脾臟平均艾利希氏體及邊蟲 PCR 陽性率為 64.13%(59/92)，其中以刺鼠及赤背條鼠陽性率為 100%最高(1/1, 3/3)，其次為鬼鼠 90.91%(20/22)，家鼯鼠 0%(0/1)最低。以地區別，花蓮縣陽性率為 100%(2/2)最高，其次為金門縣 85.71%(6/7) (表三)。鼠類血液部分檢測家鼯鼠外 6 種，平均艾利希氏體及邊蟲 PCR 陽性率為 47.25%(43/91)，其中以赤背條鼠陽性率為 100%最高(1/1)，其次為鬼鼠 70%(14/20)，刺鼠 0%(0/1)最低。以地區別，花蓮縣陽性率為 100%(1/1)最高，其次為台中市 72%(18/25) (表四)。

鼠類脾臟中艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體共檢出 6 種，包括 3 種可能為人畜致病性：*Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 及 *Anaplasma bovis*，此 3 種分別佔所有檢體之 14.13%(13/92), 15.22%(14/92), 23.91%(22/92)佔陽性檢體之 22.03%(13/59), 23.73%(14/59)及 37.29%(22/59)。其中以 *Anaplasma bovis* 檢出數量最多，而重要之人致病菌 *Anaplasma phagocytophilum* 發現於鬼鼠、刺鼠及小黃腹鼠(表五)。

鼠類血液部分艾利希氏體及邊蟲共檢出 5 種，以 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 檢出數量最多 44.19%(19/43)，其次為 *Anaplasma bovis* 41.86%(18/43)。*Anaplasma phagocytophilum* 9.30%(4/43)發現於鬼鼠及小黃腹鼠血液中(表六)。

四、 犬之外寄生蜱艾利希氏體及邊蟲分子檢測結果

今年自台大動物醫院、中興大學獸醫系、高雄回生動物醫院及花蓮動物醫院分別送驗 562 隻狗蜱(血紅扇頭蜱 *Rhipicephalus sanguineus*)，其中有 285 隻狗蜱犬隻來源為至動物醫院就醫之家犬，另 277 隻狗蜱為來自收容所之流浪

犬。犬隻分布範圍包括台北市、新北市、桃園縣、新竹縣、苗栗縣、台中市、高雄市、基隆市、宜蘭縣及花蓮縣。平均狗蜱艾利希氏體及邊蟲 PCR 陽性率為 31.67%(178/562)，來自家犬陽性率為 55.08%(157/285)，來自流浪犬陽性率為 7.58%(21/277)。陽性率最高的縣市為基隆市 81.48%(22/27)，其次為新北市 66.96%(75/112) (表七)。

於狗蜱共發現 6 種艾利希氏體及邊蟲，有 5 種可能為人畜致病性 (*Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma bovis*)，分別佔所有檢體之 25.44%(143/562), 2.31%(13/562), 0.90%(5/562), 0.36%(2/562), 0.36%(2/562) 佔陽性檢體之 80.34%(143/178)、7.30%(13/178)、2.81%(5/178)、1.12% (2/178) 及 1.12%(2/178)。其中 *Anaplasma phagocytophilum* 檢出率最高，分布也最廣，在台北市、新北市、基隆市、桃園縣、花蓮縣及高雄市皆有檢出。*Ehrlichia canis* 及 *Anaplasma platys* 目前僅在狗蜱中檢出，可能較具種專一性(表八)。

五、 台灣地區艾利希氏體及邊蟲 16S rRNA gene 全長定序與世界其他地區菌株之比較

將 real-time PCR Ct 值小於 33 的陽性檢體(約 108 株)進行艾利希氏體及邊蟲 16S rRNA gene 全長定序(約 1400bp)，結果有 43 株可以定出，其中有 8 株為 *Anaplasma phagocytophilum*。其中有 2 株源自粒形硬蜱，分別採自台中沙鹿小黃腹鼠及連江北竿小黃腹鼠。此 2 株 *A. phagocytophilum* 序列相同，與 NCBI gene bank 中之 *A. phagocytophilum* 序列相似度為 98.51%-99.44%，與瑞典採自蜱之序列最接近。另 6 株則源自金門與連江小黃腹鼠脾臟，有 5 株序

列相同。將這 8 株與重要的 *A. phagocytophilum* 菌株取 1363 bp 進行親緣關係分析，以 *Ehrlichia* sp. E360 為外群，結果如圖一，源自金門與連江小黃腹鼠脾臟之 *A. phagocytophilum* 自成一群，與其他來源者不同。

有 17 株 16S rRNA gene 全長定序為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 且序列完全相同，其中 12 株源自粒形硬蜱，分別採自桃園新屋、大溪，台中沙鹿，金門金城、金湖小黃腹鼠及連江南竿錢鼠。另外 5 株源自金門金沙、烈嶼，花蓮鳳林小黃腹鼠及桃園新屋鬼鼠血液。此 17 株 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 與 NCBI gene bank 中之 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 序列相似度為 99.07%-100%，與採自中國大陸廣州與日本溝鼠的序列完全相同。將這 17 株與重要的 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 菌株取 1294 bp 進行親緣關係分析，以 *Ehrlichia* sp. E360 為外群，結果如圖二，台灣的菌株與中國大陸及日本的菌株較接近。

有 4 株 16S rRNA gene 全長定序為 *Anaplasma platys* 且序列完全相同，源自血紅扇頭蜱(狗蜱)，分別採自新北市汐止及花蓮縣花蓮市與新城鎮的狗。此 4 株與 NCBI gene bank 中之 *A. platys* 序列相似度為 99.50%-100%，與源自泰國曼谷及日本琉球的狗序列完全相同。將這 17 株與重要的 *A. platys* 菌株取 1413 bp 進行親緣關係分析，以 *Ehrlichia* sp. E360 為外群，結果如圖三，台灣的菌株與世界各地所檢測到的非常類似。

有 3 株 16S rRNA gene 全長定序為 *Anaplasma bovis*，其中有 2 株序列相同，分別是源自桃園的板齒鼠血蜱(*H. bandicota*)及台中鬼鼠血液，另一株則源自台中的鑷形扇頭蜱(*R. haemaphysaloides*)。此 3 株與 NCBI gene bank 中之

A. bovis 序列相似度為 97.46%-98.61%，與源自南非的序列最接近。將這 3 株與重要的 *A. bovis* 菌株取 1381 bp 進行親緣關係分析，以 *Ehrlichia* sp. E360 為外群，結果如圖四，世界各地菌株似有地域性區別。

有 9 株 16S rRNA gene 全長定序為 *Ehrlichia* sp. 360 且序列完全相同，源自粒形硬蜱，分別採自桃園新屋、台中沙鹿、台中龍井、金門金城、台東蘭嶼的小黃腹鼠及桃園市錢鼠。此 4 株與 NCBI gene bank 中採自日本琉球粒形硬蜱之 *Ehrlichia* sp. 360 序列相似度為 99.93%，差一個 base。

有 2 株 16S rRNA gene 全長定序為 *Ehrlichia* sp. 且序列完全相同，源自台中沙鹿板齒鼠血蜱及桃園新屋鬼鼠蜱臟。此 2 株與 NCBI gene bank 中採自中國大陸福建微小牛蜱(*Boophilus microplus*)之 *Ehrlichia* sp. Fujian 序列最接近，相似度為 97.92%。

六、 採集蜱種之分子生物學鑑定

將採自不同地點之粒形硬蜱、板齒鼠血蜱及鑷形扇頭蜱進行 12S rRNA gene 及 16S rRNA gene 親緣關係分析，以台灣革蜱(*Dermacentor taiwanensis*) 為外群(outgroup)。粒形硬蜱計採自桃園、台中、台東、花蓮、澎湖、金門及連江等 21 鄉鎮；板齒鼠血蜱採自桃園、台中、屏東及高雄等 7 鄉鎮；鑷形扇頭蜱採自桃園、台中、花蓮及金門等 8 鄉鎮。經以 neighbour-joining 法重覆 1000 次建構親緣關係樹，由圖五及圖六可見不論是 12S rRNA gene 或 16S rRNA gene，粒形硬蜱、板齒鼠血蜱及鑷形扇頭蜱分成明顯的 3 群。粒形硬蜱(*I. granulatus*)在 12S rRNA gene 中採自台東綠島的為一小群，其餘 20 鄉鎮為另一小群；16S rRNA gene 則採自金門金沙與金寧的為一小群，其餘 19 鄉

鎮為另一小群。板齒鼠血蜱(*H. bandicota*)在 12S rRNA gene 中，採自台中沙鹿的為一小群，其餘 6 鄉鎮為另一小群；16S rRNA gene，則採自 7 鄉鎮者序列皆相同。鑷形扇頭蜱(*R. haemaphysaloides*)在 12S rRNA gene 中，採自金門金寧的為一小群，其餘 7 鄉鎮為另一小群；16S rRNA gene 則採自桃園中壢的為一小群，其餘 7 鄉鎮為另一小群。由上述結果可見，相同蜱種分布於台灣本島的與離島的差異較大。

七、協助防疫，發現首例台灣革蜱叮咬人事件

2011 年 6 月 29 日由網路新聞得知花蓮門諾醫院眼科收治一名眼眶被蜱叮咬之婦人(圖七)，隨即於 6 月 30 日請花蓮第六分局協助請門諾醫院將蜱檢體送至本實驗室鑑定及檢驗。蜱檢體送達時發現醫院已切半做成石蠟塊(圖八)，雖經去除石蠟，蜱形態上已毀損無法做鑑定。經抽蜱 DNA 以 12S rDNA 及 16S rDNA 定序分析，12S 片段 99.76% similarity to sequence of *Dermacentor taiwanensis*，16S 片段則為 100% similarity；依分子鑑定，此蜱應為台灣革蜱(*Dermacentor taiwanensis*)雌蜱。

台灣革蜱生活於山區次生林，成蜱於 2 月開始出現，到 12 月於宿主動物上皆可採到。成蜱的主要寄主是野豬，也寄生於黑熊，幼蜱及若蜱主要寄生於齧齒類及其他中小型哺乳動物。尚未發現叮人記錄。

檢測該蜱相關蜱媒病原體，經以 nested-PCR 檢測此蜱是否帶有 spotted fever rickettsia group，結果 citrate synthase(glt A)及 outer membrane protein B(ompB)均為陰性，Ehrlichia, Anaplasma 及 Babesia 亦為陰性。

經電話與花蓮門諾醫院眼科主任賴泉源醫師聯絡，該名婦人居住在花蓮縣壽豐鄉水璉村，為花東濱海公路山區，生活環境與蟬之生態環境相符。該婦人經醫院拔除蟬再投予抗生素，已無任何不適症狀。本局於7月26日召開記者會公布此案例。

討論

本年度所檢測的鼠類外寄生蜱為 95-99 年採集自連江縣、金門縣、澎湖縣、宜蘭縣、花蓮縣、台東縣、桃園縣、台中縣、高雄縣及屏東縣 1375 隻鼠類中有蜱寄生的 92 隻鼠類，共 648 隻鼠外寄生蜱。蜱的種類分為 3 種，板齒鼠血蜱(*H. bandicota*)、粒形硬蜱(*I. granulatus*)及鐮形扇頭蜱(*R. haemaphysaloides*)，板齒鼠血蜱及粒形硬蜱生活史之 3 個階段(幼蜱、若蜱、成蜱)都可以在鼠類身上發現，鐮形扇頭蜱則僅幼蜱及若蜱寄生於鼠類，成蜱寄生於較大型的動物，如牛、狗、馬、豬、羊及野豬、黑熊、水鹿、野兔等野生動物(鄭國藩 & 姜在階, 1991)。

台灣地區經由節肢動物傳播的立克次體病首推恙蟲病，其次為地方性斑疹傷寒，兩者每年皆有數百及數十名確定病例，然而尚有為數眾多的不明熱患者雖經法定傳染病病原檢測，卻仍無法診斷出病原體，這些病例中有沒有可能感染 *Ehrlichia*, *Anaplasma* 或 *Babesia*，是本研究想要探討的問題。

艾利希氏體及邊蟲在自然界是在動物與蜱之間循環，由未感染的幼蜱(或若蜱)叮咬已感染的儲主動物後，蛻皮成為已感染若蜱(或成蜱)，再叮咬未感染動物，使其成為已感染的儲主動物，如此循環下去。人為偶然宿主，被已感染若蜱(或成蜱)叮咬而得病。台灣地區雖尚未有 *Ehrlichiosis* 或 *Anaplasmosis* 的確定病例，但艾利希氏體及邊蟲是否已存在於台灣的自然環境中，由表一至表四的結果答案是肯定的。有多種艾利希氏體及邊蟲在鼠類及鼠類外寄生蜱之間循環，包括 *Anaplasma*

bovis、*Anaplasma phagocytophilum*、*Candidatus Ehrlichia shimanensis*、*Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 及 *Ehrlichia E360* 等。鼠類脾臟艾利希氏體及邊蟲的感染率最高為 64.13%(59/92)，其次為鼠類血液 47.25%(43/91)，鼠類外寄生蜱最低 19.75%(129/648)，其原因可能是所選取的鼠隻為有蜱寄生者，顯示其所處環境有較多蜱存在，由於艾利希氏體及邊蟲在蜱與動物之間循環，使所選取的鼠類有較高感染機會。針對較重要的人病原體 *A. phagocytophilum*，鼠類脾臟、血液與鼠類外寄生蜱的感染率分別為 14.13%(13/92)、4.40%(4/91)及 2.62%(17/648)，美國加州 *A. phagocytophilum* 在野生動物感染率為 7.2%(9/125)，外寄生蜱感染率為 2.05%(3/146)；中國大陸吉林省在齧齒動物感染率為 8.82%(9/102)，外寄生蜱感染率為 2.82%(2/71)；韓國老鼠與鼯鼯感染率為 5%(20/403)，蜱感染率為 1.0%(16/1618)；日本全溝硬蜱(*I. persulcatus*)及卵形硬蜱(*I. ovatus*)唾液腺的感染率分別為 41.18%(7/17)及 27.27%(9/33)(Cao et al., 2006; Chae et al., 2008; Ohashi et al., 2005; Rejmanek et al., 2011)。中國大陸、日本及韓國都有 Ehrlichiosis 或 Anaplasmosis 的確定病例，其確定的病媒分別為 *I. persulcatus*、*I. ovatus*、*Haemaphysalis longicornis* 及 *I. nipponensis*，台灣地區板齒鼠血蜱與粒形硬蜱尚無叮人報告，但鐮形扇頭蜱(*R. haemaphysaloides*)有可能會侵襲人(鄭國藩 & 姜在階, 1991)，因此對艾利希氏體及邊蟲的感染應提高警覺，尤其是金門縣與連江縣，其 *A. phagocytophilum* 在鼠類及鼠類外寄生蜱的感染率皆偏高。

另一種會造成人單核球艾利希氏體症(human monocytic ehrlichiosis, HME) 的病原體 *E. chaffeensis* 僅在桃園新屋一隻板齒鼠血蜱(*H. bandicota*)

若蟲發現，翁等(2010)曾在金門地區發現於小黃腹鼠採集之鑷形扇頭蜱(*R. haemaphysaloides*)與粒形硬蜱(*I. granulatus*)檢測出 *E. chaffeensis* (翁明輝 et al., 2010)，唯本研究在金門鼠類外寄生蟲的檢測中並未發現。

Candidatus Neohrlichia mikurensis 為本研究發現在台灣地區鼠類及鼠類外寄生蜱感染率最高的 *Ehrlichia* sp.，其近幾年發現對人具有致病性，病媒多屬硬蜱屬(*Ixodes* spp.)，如荷蘭的篋豆硬蜱(*Ixodes ricinus*)；日本的卵形硬蜱(*Ixodes ovatus*)、全溝硬蜱(*Ixodes persulcatus*)及俄國的全溝硬蜱(*Ixodes persulcatus*)(Kawahara et al., 2004; Naitou et al., 2006; Rar et al., 2010; Schouls et al., 1999)。在台灣目前也僅發現於粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)，雖然粒形硬蜱尚無叮咬人的報告，但此病原菌在鼠類及硬蜱之間循環，是否有可能感染到台灣其他會叮咬人的硬蜱如卵形硬蜱及銳跗硬蜱(*Ixodes acutitarsus*)，則有待研究。

狗是與人最接近的寵物，透過狗蜱(血紅扇頭蜱 *Rhipicephalus sanguineus*)也是最容易傳遞狗與人之間的蜱媒立克次體傳染病，如 *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii* 及其他斑點熱病原體(Nicholson et al., 2010)。本研究於今年採集台灣北中南東十縣市共 562 隻狗蜱，艾利希氏體及邊蟲平均的感染率為 31.67%(178/562)，包含有 5 種艾利希氏體及邊蟲，其中以 *A. phagocytophilum* 檢出率最高，佔所有檢體之 25.44%(143/562)，更佔陽性檢體之 80.34%(143/178)，此種現象在文獻中實屬少見，僅義大利西西里島犬隻 *A. phagocytophilum* 抗體陽性率為 32.80% (n=342) (Torina & Caracappa, 2006)，而台大動物醫院的報告，台

北地區犬隻 *A. phagocytophilum* 抗體陽性率為 1.6% (n=101) (Wu et al., 2009)，因此這部分的結果仍需進一步探討與確認。

以 EHR 16SD, EHR 16SR 這組 Ehrlichia genus-specific primer 經 SYBR Green real-time PCR，所能得到的 PCR 產物只有約 305bp，若要與全世界其他國家的菌株比較，則需透過 16S rRNA gene 全長定序。本研究將 SYBR Green real-time PCR 陽性結果 Ct 值小於 33 者(原始 DNA 濃度較高)進行 16S rRNA gene 全長定序，結果在約 108 株中只有 43 株可定出，其原因一方面為原始 DNA 濃度仍是不足，另一方面是可能有多重感染，在 primer 專一性不夠的情況下，造成定序困難。

圖一顯示台灣地區所檢測出 8 株 *A. phagocytophilum* 16S rRNA gene 全長(約 1363 bp)，與全世界其他地區自蜱、儲主動物及病人之菌株比較。2 株源自粒形硬蜱，分別採自台中沙鹿小黃腹鼠及連江北竿小黃腹鼠的 *A. phagocytophilum* 序列相同，與 NCBI gene bank 中之 *A. phagocytophilum* 序列相似度為 98.51%-99.44%，為一新發現的變異株，與瑞典採自蜱之序列最接近。另 6 株則源自金門與連江小黃腹鼠蜱臟，有 5 株序列相同，與 NCBI gene bank 中之 *A. phagocytophilum* 序列相似度為 95.06-96.14%，亦為一新發現的變異株。由親源關係樹中源自金門與連江小黃腹鼠蜱臟之 *A. phagocytophilum* 自成一類，與其他來源者不同。相同情況在英國北部野鼠(Field vole)中也可看到，其 *A. phagocytophilum* 以 DOV1 序列分析自成一類，與其他來源之 *A. phagocytophilum* 不同(Bown et al., 2009)。顯示 *A. phagocytophilum* 不同的基因變異及其致病性都值得進一步研究。

Candidatus Neoehrlichia mikurensis 由圖二的結果可看出目前全世界菌株變異的情形並不大，且有地域性的區別，台灣地區所檢測出的 17 株分布於北部、中部、東部及離島，無論是源自蜱或動物體 16S rRNA gene 全長序列都相同，且與採自中國大陸廣州與日本溝鼠的序列完全相同。

其他 Ehrlichia spp. 及 Anaplasma spp. 16S rRNA gene 全長序列比較，*A. platys* 與 *Ehrlichia* sp.360 與其他地區檢測株序列較相近，而 *A. bovis* 則差異較大(圖三、圖四)。

利用分子檢測法對於蜱種的鑑定是一種很好的輔助工具，特別是形態相近的若蜱、幼蜱或殘破的成蜱。本研究對於粒形硬蜱、板齒鼠血蜱及鐮形扇頭蜱以 12S rRNA gene 及 16S rRNA gene 進行分子檢測，發現有極明顯的分別，雖採自不同的地點，但同一種仍自成一群。尤其是粒形硬蜱採自桃園、台中、台東、花蓮、澎湖、金門及連江等 21 鄉鎮仍自成一群。Chao et al., 2009 採集金門、花蓮及台東粒形硬蜱，以 16S rRNA gene 進行分子檢測，結果與本研究相同(Chao et al., 2009)，其進一步以變異性較大的 internal transcribed spacer 2 (ITS2) 序列進行分析，結果仍一致(Chao et al., 2011)。蜱分子檢測所建立的資料庫，有助於形態不明檢體的鑑定，此次處理花蓮婦女遭台灣革蜱(*D. taiwanensis*) 叮咬事件即發揮功效。

結論與建議

1. 台灣地區 3 種鼠類外寄生蜱，艾利希氏體及邊蟲 PCR 陽性率為 19.75%，以粒形硬蜱陽性率為 33.19% 最高，其次為板齒鼠血蜱 16.95%，鑷形扇頭蜱 6.67% 最低，顯示鼠類外寄生蜱感染艾利希氏體及邊蟲情形非常嚴重。
2. 鼠類外寄生蜱共檢出 10 種艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體，其中已知有 4 種可能為人畜致病性，包括 3 種會感染人及動物：*Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 及 1 種會感染牛：*Anaplasma bovis*，此 4 種分別佔所有蜱檢體之 2.62%, 0.15%, 6.94% 及 4.48%。
3. 有蜱寄生之鼠類脾臟及血液，艾利希氏體及邊蟲 PCR 陽性率分別為 64.13% 及 47.25%。鼠類脾臟及血液中艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體共檢出 6 種，其中 *A. phagocytophilum* 分別佔所有鼠類脾臟及血液檢體之 14.13% 及 9.30%。金門縣與連江縣，其 *A. phagocytophilum* 在鼠類及鼠類外寄生蜱的感染率皆偏高，特別值得關注。
4. 台灣地區狗蜱(血紅扇頭蜱 *R. sanguineus*)艾利希氏體及邊蟲 PCR 陽性率為 31.67%，共發現 6 種艾利希氏體及邊蟲，有 5 種可能為人畜致病性(*Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma bovis*)，分別佔所有狗蜱檢體之 25.44%, 2.31%, 0.90%, 0.36% 及 0.36%。
5. 台灣地區艾利希氏體及邊蟲菌株以 16S rRNA gene 全長定序與世界其他地區菌株比較，發現 *A. phagocytophilum* 及 *A. bovis* 為新的變異株，*Candidatus*

Neohrlichia mikurensis 及 *A. platys* 與其他地區相同。

6. 利用 12S rRNA gene 及 16S rRNA gene 對粒形硬蜱、板齒鼠血蜱及鑷形扇頭蜱進行分子檢測，經親源關係樹圖發現有極明顯的分別，雖採自不同的地點，但同一種仍自成一群。蜱分子檢測所建立的資料庫，有助於形態不明檢體的鑑定，可應用於今年花蓮婦女遭台灣革蜱(*D. taiwanensis*)叮咬事件。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 本研究發現艾利希氏體及邊蟲已存在於台灣地區鼠類與其外寄生蜱之循環中，醫師與民眾應留意是否有艾利希氏體及邊蟲感染的相關症狀如發熱、頭痛、肌肉疼痛、反胃、關節疼痛及不舒服感等，以便及早通報，同時實驗室也應開發更敏感的檢測方法，以期偵測此病的發生。
2. 鼠類及其外寄生節肢動物所帶的病原體多，民眾仍應防範鼠類避免與鼠類接觸，同時加強滅鼠，如被蜱、蟎或跳蚤叮咬，應注意叮咬後的反應及早就醫，尤其通常硬蜱叮咬時，會將口器插入皮膚中，應儘速用鑷子夾住硬體前端口器小心拔出，不要將其擠碎，並避免將其口器殘留在皮膚中，同時告訴醫師這些資訊，蜱、蟎或跳蚤若能同時送檢，更有助於疾病診斷。
3. 台灣地區狗蜱感染艾利希氏體及邊蟲的情形也非常嚴重，*Anaplasma phagocytophilum* 的感染率高達 25.44%，有養狗當寵物的民眾應常常注意清除狗身上的狗蜱及環境狗蜱，以避免被叮咬感染。
4. 本研究在鼠類脾臟、血液、外寄生蜱及狗蜱中共檢測出 10 種艾利希氏體及邊蟲，其中在鼠類脾臟及外寄生蜱之 *A. phagocytophilum* 為新的變異株與 NCBI gene bank 中之 *A. phagocytophilum* 相似度為 95.06-96.14% 及 98.51%-99.44%，應更進一步進行特性分析以瞭解其對人致病的可能性。
5. 請權責疾病組轉達各分局及衛生局，提醒轄區醫師與民眾注意，落實於衛教宣導及防治中，尤其是金門縣與連江縣。

參考文獻

- Adelson ME, Rao RV, Tilton RC, Cabets K, Eskow E, Fein L, Occi JL & Mordechai E (2004) Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella* spp., *Babesia microti*, and *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes scapularis* ticks collected in Northern New Jersey. *J Clin Microbiol* 42: 2799-2801. doi:10.1128/JCM.42.6.2799-2801.2004
- 42/6/2799 [pii].
- Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano O, Pinna Parpaglia ML, Cubeddu T, Pintori G & Pittau M (2005) 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* 71: 6418-6422. doi:71/10/6418 [pii]
- 10.1128/AEM.71.10.6418-6422.2005.
- Babes V (1888) Sur l'hémoglobinurie bactérienne du bœuf. *C. R. Aca. Sci.* 107: 692-694.
- Baker AS (1999) Mites and ticks of domestic animals. The Stationery Office, London.
- Bakken JS & Dumler JS (2000) Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 31: 554-560. doi:CID000287 [pii].
- Bakken JS & S. DJ (2002) Antimicrobial therapy and vaccines. 2 edn. Apple Trees Productions, New York.
- Beati L & Keirans JE (2001) 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.* 87: 32-48.
- Black WC & Piesman J (1994) Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10034-10038.
- Bown KJ, Lambin X, Ogden NH, Begon M, Telford G, Woldehiwet Z & Birtles RJ (2009) Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. *Emerg Infect Dis* 15: 1948-1954. doi:10.3201/eid1512.090178.
- Buller RS, Arens M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikhisa Y, Unver A, Gaudreault-Keener M, Manian FA, Liddell AM, Schmulewitz N & Storch GA (1999) *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N Engl J Med* 341: 148-155.
- Cao WC, Zhan L, He J, Foley JE, SJ DEV, Wu XM, Yang H, Richardus JH & Habbema JD (2006) Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. *Am J Trop Med Hyg* 75: 664-668. doi:75/4/664 [pii].
- Chae JS, Yu do H, Shringi S, Klein TA, Kim HC, Chong ST, Lee IY & Foley J (2008) Microbial pathogens in ticks, rodents and a shrew in northern Gyeonggi-do near the DMZ, Korea. *J Vet Sci* 9: 285-293. doi:200809285 [pii].
- Chang AC, Chang WL, Lin CT, Pan MJ & Lee SC (1996) Canine infectious cyclic thrombocytopenia found in Taiwan. *J Vet Med Sci* 58: 473-476.
- Chao LL, Wu WJ & Shih CM (2009) Molecular analysis of *Ixodes granulatus*, a possible vector tick for *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Taiwan. *Exp Appl Acarol* 48: 329-344. doi:10.1007/s10493-009-9244-4.
- Chao LL, Wu WJ & Shih CM (2011) Species identification of *Ixodes granulatus* (Acari: Ixodidae) based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequences. *Exp Appl Acarol* 54: 51-63. doi:10.1007/s10493-010-9419-z.

- Chung WC, Lien GS, Pan S, Lu JL, Chen SH & Lin YS (1994) The first case of human babesiosis in Taiwan preliminary report. *Chin. J. Parasitol.* 7: 22-23.
- Duh D, Petrovec M & Avsic-Zupanc T (2001) Diversity of Babesia Infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *J Clin Microbiol* 39: 3395-3397.
- Dumler JS (2005) Anaplasma and Ehrlichia infection. *Ann N Y Acad Sci* 1063: 361-373. doi:1063/1/361 [pii] 10.1196/annals.1355.069.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y & Rurangirwa FR (2001) 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* 51: 2145-2165.
- Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N & Bakken JS (2007) Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 45 Suppl 1: S45-51. doi:CID50035 [pii] 10.1086/518146.
- Fehr JS, Bloemberg GV, Ritter C, Hombach M, Luscher TF, Weber R & Keller PM (2010) Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen Candidatus Neoehrlichia mikurensis. *Emerg Infect Dis* 16: 1127-1129.
- Fukumoto S, Xuan X, Inoue N, Igarashi I, Sugimoto C, Fujisaki K, Nagasawa H, Mikami T & Suzuki H (2003) Molecular characterization of a gene encoding a 29-kDa cytoplasmic protein of Babesia gibsoni and evaluation of its diagnostic potentiality. *Mol Biochem Parasitol* 131: 129-136. doi:S0166685103001993 [pii].
- Fukumoto S, Xuan X, Shigeno S, Kimbita E, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K & Mikami T (2001) Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing Babesia gibsoni infection in dogs. *J Vet Med Sci* 63: 977-981.
- Herwaldt B, Persing DH, Precigout EA, Goff WL, Mathiesen DA, Taylor PW, Eberhard ML & Gorenflot AF (1996) A fatal case of babesiosis in Missouri: identification of another piroplasm that infects humans. *Ann Intern Med* 124: 643-650.
- Hsieh HC (1994) Human parasites in Taiwan. *Chin J. Parasitol.* 7: 1-10.
- Hsieh YC, Lee CC, Tsang CL & Chung YT (2010) Detection and characterization of four novel genotypes of Ehrlichia canis from dogs. *Vet Microbiol* 146: 70-75. doi:S0378-1135(10)00194-X [pii] 10.1016/j.vetmic.2010.04.013.
- Hsu NH & Cross JH (1977) Serologic survey for human babesiosis on Taiwan. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi* 76: 950-954.
- Hunfeld KP & Brade V (2004) Zoonotic Babesia: possibly emerging pathogens to be considered for tick-infested humans in Central Europe. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37: 93-103.
- Inokuma H, Oyamada M, Kelly PJ, Jacobson LA, Fournier PE, Itamoto K, Okuda M & Brouqui P (2005) Molecular detection of a new Anaplasma species closely related to Anaplasma phagocytophilum in canine blood from South Africa. *J Clin Microbiol* 43: 2934-2937. doi:43/6/2934 [pii] 10.1128/JCM.43.6.2934-2937.2005.
- Kawahara M, Rikihisa Y, Isogai E, Takahashi M, Misumi H, Suto C, Shibata S, Zhang C & Tsuji

- M (2004) 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* 54: 1837-1843. doi:10.1099/ijs.0.63260-0 54/5/1837 [pii].
- Kjemtrup AM & Conrad PA (2000) Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int J Parasitol* 30: 1323-1337. doi:S0020-7519(00)00137-5 [pii].
- Krause PJ & Telford III SR (1999) Babesiosis: Protozoal diseases (ed. by HM Gilles) Arnold, London, pp. 236-248.
- Lien JC, Weng MH & Lin CC (1997) Babesia infections in the rodents of northern Taiwan. *Chin. J. Parasitol.* 10: 61-67.
- Lotric-Furlan S, Petrovec M, Avsic-Zupanc T, Nicholson WL, Sumner JW, Childs JE & Strle F (1998) Human ehrlichiosis in central Europe. *Wien Klin Wochenschr* 110: 894-897.
- Marathe A, Tripathi J, Handa V & Date V (2005) Human babesiosis--a case report. *Indian J Med Microbiol* 23: 267-269.
- Marsaudon E, Camenen J, Testou D, Bourree P, Samson P & Luneau F (1995) [Babesia canis human babesiosis causing a 40-day anuria]. *Ann Med Interne (Paris)* 146: 451-452.
- Massung RF, Owens JH, Ross D, Reed KD, Petrovec M, Bjoersdorff A, Coughlin RT, Beltz GA & Murphy CI (2000) Sequence analysis of the ank gene of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol* 38: 2917-2922.
- Miyama T, Sakata Y, Shimada Y, Ogino S, Watanabe M, Itamoto K, Okuda M, Verdida RA, Xuan X, Nagasawa H & Inokuma H (2005) Epidemiological survey of Babesia gibsoni infection in dogs in eastern Japan. *J Vet Med Sci* 67: 467-471. doi:JST.JSTAGE/jvms/67.467 [pii].
- Naitou H, Kawaguchi D, Nishimura Y, Inayoshi M, Kawamori F, Masuzawa T, Hiroi M, Kurashige H, Kawabata H, Fujita H & Ohashi N (2006) Molecular identification of Ehrlichia species and 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan. *Microbiol Immunol* 50: 45-51. doi:JST.JSTAGE/mandi/50.45 [pii].
- Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB & Little SE (2010) The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends Parasitol* 26: 205-212. doi:S1471-4922(10)00019-X [pii] 10.1016/j.pt.2010.01.007.
- Ohashi N, Inayoshi M, Kitamura K, Kawamori F, Kawaguchi D, Nishimura Y, Naitou H, Hiroi M & Masuzawa T (2005) Anaplasma phagocytophilum-infected ticks, Japan. *Emerg Infect Dis* 11: 1780-1783.
- Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P & Raoult D (2000) Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 707-708.
- Popovsky MA (1991) Transfusion-transmitted babesiosis. *Transfusion* 31: 296-298.
- Rar VA, Livanova NN, Panov VV, Doroschenko EK, Pukhovskaya NM, Vysochina NP & Ivanov LI (2010) Genetic diversity of Anaplasma and Ehrlichia in the Asian part of Russia. *Ticks Tick Borne Dis* 1: 57-65. doi:S1877-959X(10)00012-9 [pii] 10.1016/j.ttbdis.2010.01.002.
- Rejmanek D, Nieto NC, Barash N & Foley JE (2011) Temporal patterns of tick-borne granulocytic anaplasmosis in California. *Ticks Tick Borne Dis* 2: 81-87. doi:S1877-959X(11)00005-7 [pii]

10.1016/j.ttbdis.2010.12.003.

Saito-Ito A, Kasahara M, Kasai M, Dantrakool A, Kawai A, Fujita H, Yano Y, Kawabata H & Takada N (2007) Survey of *Babesia microti* infection in field rodents in Japan: records of the Kobe-type in new foci and findings of a new type related to the Otsu-type. *Microbiol Immunol* 51: 15-24. doi:JST.JSTAGE/mandi/51.15 [pii].

Saito-Ito A, Takada N, Ishiguro F, Fujita H, Yano Y, Ma XH & Chen ER (2008) Detection of Kobe-type *Babesia microti* associated with Japanese human babesiosis in field rodents in central Taiwan and southeastern mainland China. *Parasitology* 135: 691-699. doi:S0031182008004356 [pii]

10.1017/S0031182008004356.

Saito-Ito A, Yano Y, Dantrakool A, Hashimoto T & Takada N (2004) Survey of rodents and ticks in human babesiosis emergence area in Japan: first detection of *Babesia microti*-like parasites in *Ixodes ovatus*. *J Clin Microbiol* 42: 2268-2270.

Saito A, Rai SK, He S, Kohsaki M, Tsuji M & Ishihara C (1999) [First demonstration of *Babesia* parasitizing in human in Japan]. *Kansenshogaku Zasshi* 73: 1163-1164.

Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SG & Schot CS (1999) Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 37: 2215-2222.

Shaio MF & Lin PR (1998) A case study of cytokine profiles in acute human babesiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58: 335-337.

Shaio MF & Yang KD (1997) Response of babesiosis to a combined regimen of quinine and azithromycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 214-215.

Shih CM, Liu LP, Chung WC, Ong SJ & Wang CC (1997) Human babesiosis in Taiwan: asymptomatic infection with a *Babesia microti*-like organism in a Taiwanese woman. *J Clin Microbiol* 35: 450-454.

Shih CM & Wang CC (1998) Ability of azithromycin in combination with quinine for the elimination of babesial infection in humans. *Am J Trop Med Hyg* 59: 509-512.

Simpson VR, Panciera RJ, Hargreaves J, McGarry JW, Scholes SFE, Bown KJ & J. BR (2005) Myocarditis and myositis due to infection with Hepatozoon species in pine martens (*Martes martes*) in Scotland. *Vet. Rec.* 156: 442-446.

Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B & Sawczuk M (2003) Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. *J Parasitol* 89: 194-196.

Skrabalo Z & Deanovic Z (1957) Piroplasmosis in man; report of a case. *Doc Med Geogr Trop* 9: 11-16.

Smith T & Kilborne FL (1893) Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever, 8th and 9th Repts: Bur. Anim. Industr., U. S. Dept. agric, pp. 177-304.

Stone JH, Dierberg K, Aram G & Dumler JS (2004) Human monocytic ehrlichiosis. *JAMA* 292: 2263-2270. doi:292/18/2263 [pii]

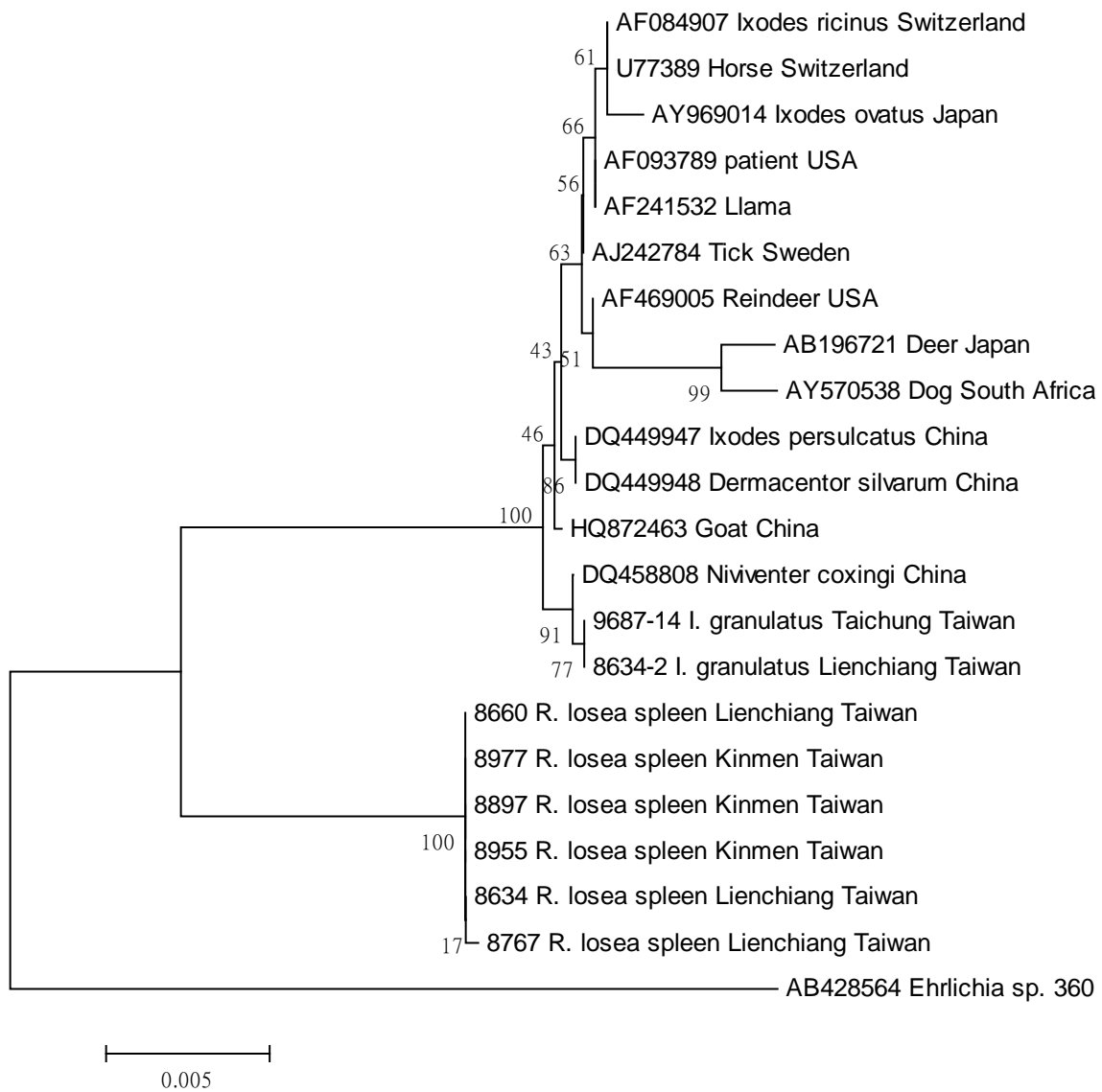
10.1001/jama.292.18.2263.

Sumption KJ, Wright DJ, Cutler SJ & Dale BA (1995) Human ehrlichiosis in the UK. *Lancet* 346: 1487-1488.

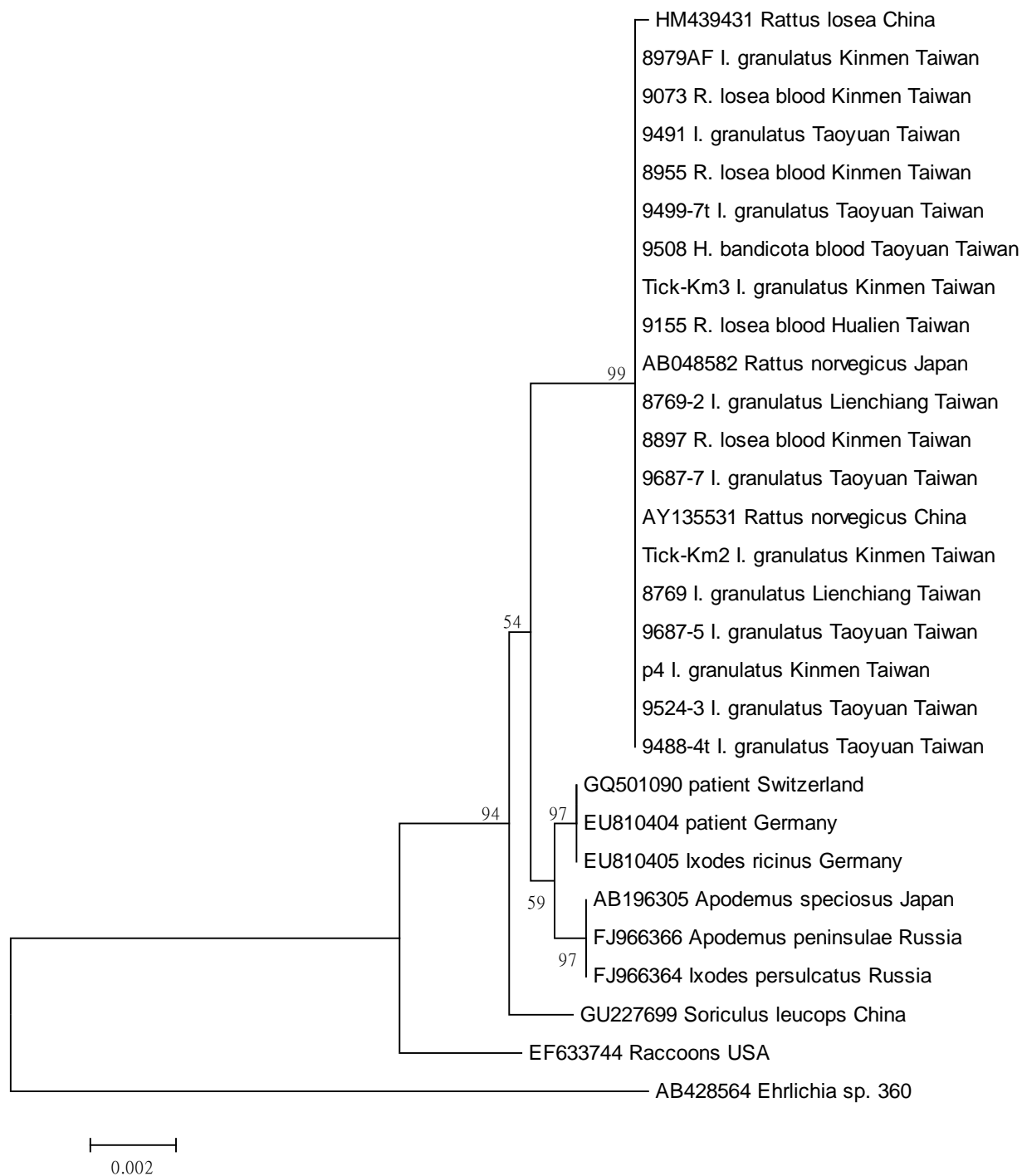
Suto Y, Suto A, Inokuma H, Obayashi H & Hayashi T (2001) First confirmed canine case of *Ehrlichia canis* infection in Japan. *Vet Rec* 148: 809-811.

- Takano A, Ando S, Kishimoto T, Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, Kawabata H & Watanabe H (2009) Presence of a novel Ehrlichia sp. in Ixodes granulatus found in Okinawa, Japan. *Microbiol Immunol* 53: 101-106. doi:MIM093 [pii]
10.1111/j.1348-0421.2008.00093.x.
- Telford SA, III, Gorenflot A, Brasseur P & Spielman A (1993) Babesial infections in humans and wildlife, Vol. 5: Parasitic protozoa (ed. by JP Kreier) Academic Press, Inc., San Diego, U.S.A., pp. 1-47.
- Torina A & Caracappa S (2006) Dog tick-borne diseases in Sicily. *Parassitologia* 48: 145-147.
- Tsuji M, Zamoto A, Kawabuchi T, Kataoka T, Nakajima R, Asakawa M & Ishihara C (2006) Babesia microti-like parasites detected in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris orientis*) in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 68: 643-646. doi:JST.JSTAGE/jvms/68.643 [pii].
- Uilenberg G (2006) Babesia--a historical overview. *Vet Parasitol* 138: 3-10. doi:S0304-4017(06)00051-3 [pii]
10.1016/j.vetpar.2006.01.035.
- von Loewenich FD, Geissdorfer W, Disque C, Matten J, Schett G, Sakka SG & Bogdan C (2010) Detection of "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. *J Clin Microbiol* 48: 2630-2635. doi:JCM.00588-10 [pii]
10.1128/JCM.00588-10.
- Welinder-Olsson C, Kjellin E, Vaht K, Jacobsson S & Wenneras C (2010) First case of human "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Microbiol* 48: 1956-1959. doi:JCM.02423-09 [pii]
10.1128/JCM.02423-09.
- Wu TJ, Sun HJ, Wu YC & Huang HP (2009) Prevalence and Risk factors of canine ticks and tick-borne diseases in Taipei, Taiwan. *Journal of Veterinary Clinical Sciences* 2: 75-78.
- Yamaguti N, V. , Tipton J, Keegan HL & Toshiaoka S (1971) Ticks of Japan, Korea, and the Ryukyu islands. Brigham Young Univ.
- Zamoto A, Tsuji M, Wei Q, Cho SH, Shin EH, Kim TS, Leonova GN, Hagiwara K, Asakawa M, Kariwa H, Takashima I & Ishihara C (2004) Epizootiologic survey for Babesia microti among small wild mammals in northeastern Eurasia and a geographic diversity in the beta-tubulin gene sequences. *J Vet Med Sci* 66: 785-792. doi:JST.JSTAGE/jvms/66.785 [pii].
- Zhi N, Ohashi N & Rikihisa Y (1999) Multiple p44 genes encoding major outer membrane proteins are expressed in the human granulocytic ehrlichiosis agent. *J Biol Chem* 274: 17828-17836.
- Zhou J, Mulenga A, Yamasaki M, Ohashi K, Maede Y & Onuma M (2002) Babesia gibsoni: molecular cloning and characterization of Rab6 and Rab11 homologues. *Exp Parasitol* 101: 210-214. doi:S0014489402001364 [pii].
- 王美嘉 (2000) 人鼠互通性寄生蟲之調查: 國立台灣大學微生物學研究所 (ed. 國立台灣大學, p. 54.
- 林怡孜 (2007) 以 PCR 技術調查台灣乳牛焦蟲症及邊蟲症之流行病學: 國立中興大學獸醫學研究所 (ed. 國立中興大學, p. 70.
- 翁明輝, 連日清, 蔡惠坪, 林佩如, 郭明德 & 劉文燦 (2010) 2009 年金門地區鼠類寄生蜱敢染查菲艾利希氏體之調查. *疫情報導* 26: 134-139.

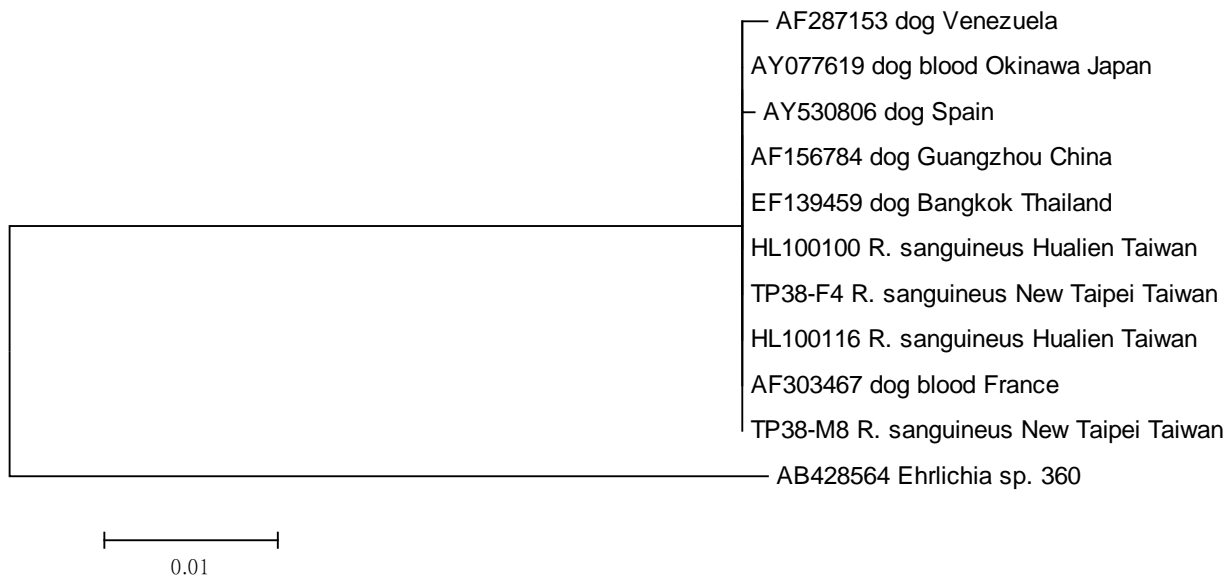
- 張祖駿 (2003) 利用巢式聚合酶連鎖反應調查台北市犬艾利希氏體病: 國立台灣大學獸醫學研究所 (ed. 國立台灣大學, p. 117).
- 陳昱憲 (2007) 以巢式聚合酶連鎖反應調查台灣家貓血液寄生蟲之感染疫情: 國立中興大學獸醫學研究所 (ed. 國立中興大學, p. 59).
- 黃嘉嘉 (2003) 以巢式聚合酶連鎖反應偵測犬隻狗型、血小板型艾利希體症及犬心絲蟲感染症: 國立嘉義大學獸醫學研究所 (ed. 國立嘉義大學, p. 94).
- 潘明正 (2007) 牛邊緣無形體症 (Bovine anaplasmosis): 媒介重要人畜傳染疾病的有害生物—節肢動物篇 (ed. by 潘劉張 (編著)) 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局, 台北市, pp. 138-139 頁.
- 鄭國藩 & 姜在階 (1991) 中國經濟昆蟲志第三十九冊蜱蟎亞綱硬蜱科. 科學出版社, 北京.



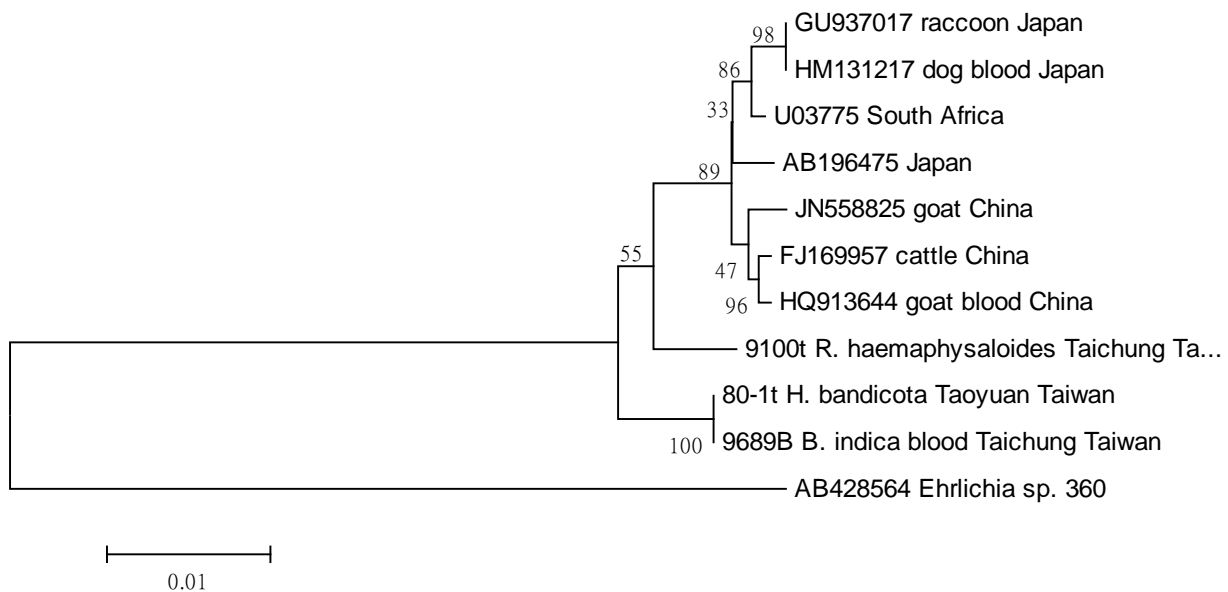
圖一、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 16S rRNA gene 序列親緣關係圖。



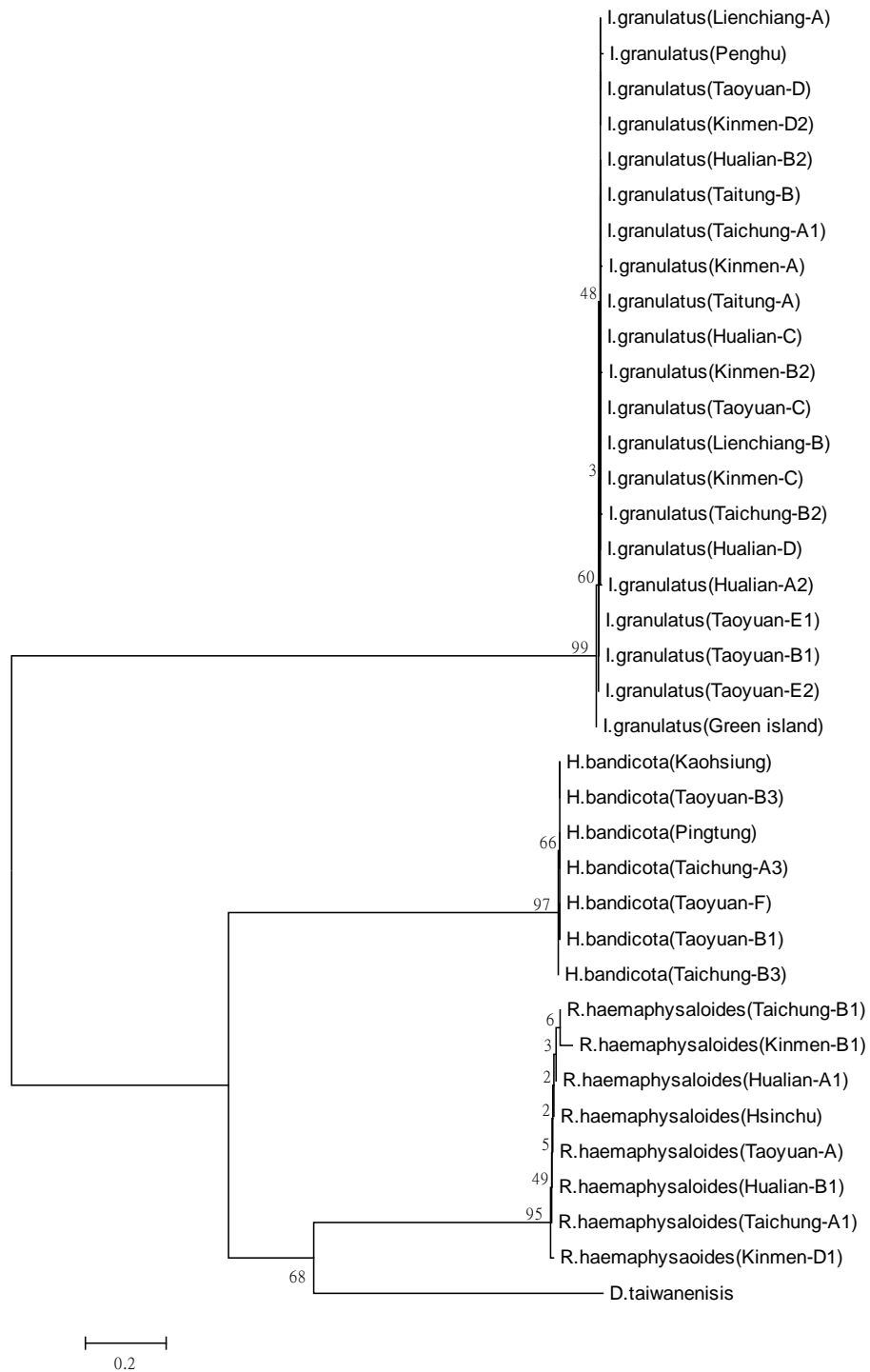
圖二、台灣地區 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 菌株 16S rRNA gene 序列親緣關係圖。



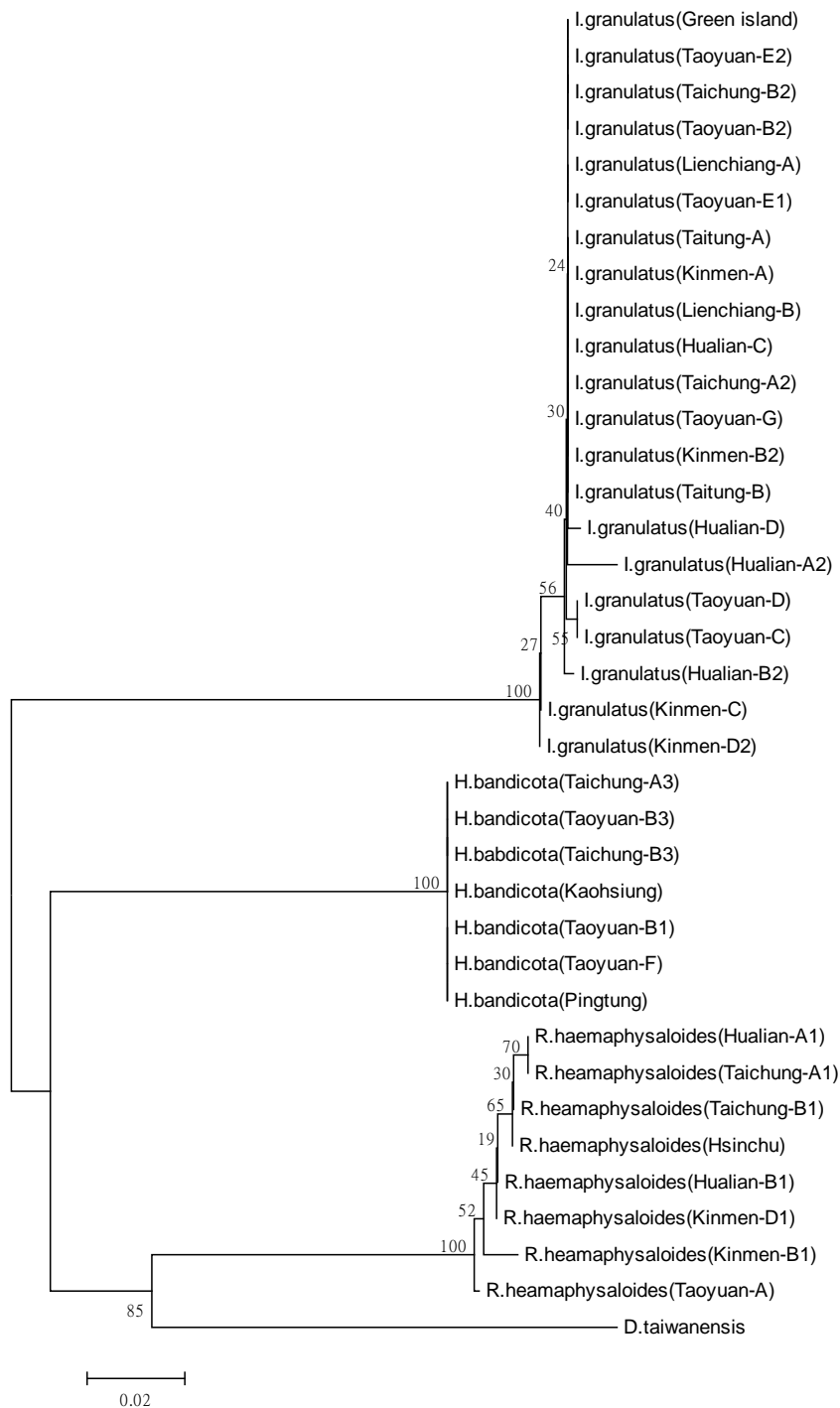
圖三、台灣地區 *Anaplasma platys* 菌株 16S rRNA gene 序列親緣關係圖。



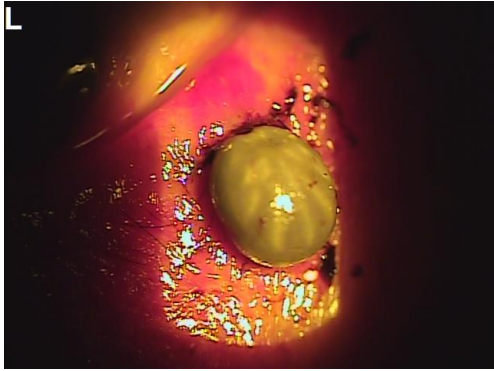
圖四、台灣地區 *Anaplasma bovis* 菌株 16S rRNA gene 序列親緣關係圖。



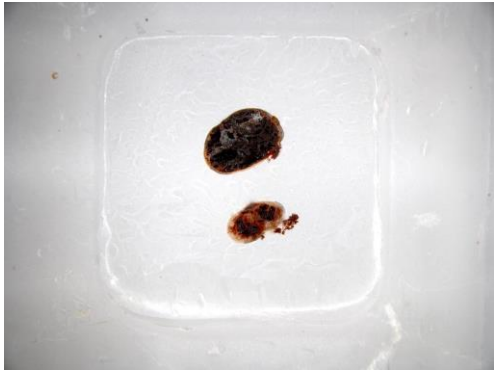
圖五、台灣地區粒形硬蜱、板齒鼠血蜱及鑷形扇頭蜱 12S rRNA gene 序列親緣關係圖。



圖六、台灣地區粒形硬蜱、板齒鼠血蜱及鑷形扇頭蜱 16SrRNA gene 序列親緣關係圖。



圖七、蟬叮咬照片(門諾醫院提供)。



圖八、蟬石蠟檢體。

表一、鼠類外寄生蟬艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體分子檢測結果

	桃園	台中	高屏	花蓮	台東	澎湖	金門	連江	Total
<i>H. bandicota</i>	15/107(14)* Ab-4(5) Ap(2) Eh-1(4) Es-1(4) Ech(1)	24/76(32) Ab-4(15) Es(1) Uap(1) Es-1(7)	0/53(0)	-	-	-	-	-	40/236(16.95) Ab-4 (20) Ap(2) Ech(1) Eh-1(4) Es(1) Es-1(11) Uap(1)
<i>I. granulatus</i>	16/42(38) Nm(11) Ri-1(2) E360(3)	10/21(48) Ap(2) Nm(2) Nm-1(1) Nm-2(1) E360(4)	-	6/24(25) Nm(5) Nm-3(1)	5/22(23) E360(2) Ri-1(3)	0/3	27/79(34) Ap(7) Nm(18) E360(2)	13/41(32) Ap(3) Nm(6) E360(1) Ap-4(3)	77/232(33.19) Ap(12) Ap-4(3) E360(12) Nm(42) Nm-1(1) Nm-2(1) Nm-3(1) Ri-1(4) Ri-2(1)
<i>R. haemaphysaloides</i>	0/42(0)	4/63(6) Ab-1(3) Es(1)	-	7/51(14) Ab-1(6) Wo-3(1)	-	-	1/24(4) Wo-2(1)	-	12/180(6.67) Ab-1 (9) Es(1) Wo-2(1) Wo-3(1)
Total	31/191(16.23)	38/160(23.75)	0/53(0)	13/75(17.33)	5/22(23.52)	0/3(0)	28/103(27.18)	13/41(31.71)	129/648(19.75)

*陽性數/檢測數(陽性率%)

表二、鼠類外寄生蜱艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體檢出種類及分布

Name: species	Number	分布(Number)	蜱種(Number)
<i>Anaplasma bovis</i>	29	桃園(5), 台中(18), 花蓮(6)	<i>H. bandicota</i> (20), <i>R. haemaphysaloides</i> (9)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	17	桃園(2), 台中(2), 金門(7), 連江(6)	<i>H. bandicota</i> (2), <i>I. granulatus</i> (15)
<i>Candidatus Ehrlichia shimanensis</i>	13	桃園(4), 台中(9)	<i>H. bandicota</i> (12), <i>R. haemaphysaloides</i> (1)
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	45	桃園(11), 台中(4), 花蓮(6), 金門(18), 連江(6)	<i>I. granulatus</i> (45)
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	1	桃園(1)	<i>H. bandicota</i> (1),
<i>Ehrlichia</i> sp. 360	12	桃園(3), 台中(4), 台東(2), 金門(2), 連江(1)	<i>I. granulatus</i> (12)
<i>Ehrlichia</i> sp. EH1087	4	桃園(4),	<i>H. bandicota</i> (4)
Rickettsiales bacterium	5	台東(3), 桃園(2)	<i>I. granulatus</i> (5)
Uncultured alpha proteobacterium	1	台中(1)	<i>H. bandicota</i> (1)
<i>Wolbachia pipientis</i>	2	金門(1), 花蓮(1)	<i>R. haemaphysaloides</i> (2)
Total	129		

表三、鼠類脾臟艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體分子檢測結果

	桃園	台中	高屏	花蓮	台東	澎湖	金門	連江	Total
<i>Apodemus agrarius</i>	-	2/2(100) Ab-1(1) Es(1)	-	1/1(100) Nm(1)	-	-	-	-	3/3(100) Ab-1(1) Es(1) Nm(1)
<i>Bandicota indica</i>	6/6(100) Ab-1(1) Ab-4(1) Es-1(2) Nm(2)	13/14(93) Ab-1(2) Ab-3(1) Ab-4(7) Ap(1) Es-1(2)	1/2(50) Ab-4(1)	-	-	-	-	-	20/22(90.91) Ab-1(3) Ab-3(1) Ab-4(9) Ap(1) Es-1(4) Nm(2)
<i>Mus caroli</i>	1/3(33) Nm(1)	4/4(100) Ab-1(2) Es(2)	-	-	-	-	-	-	5/7(71.43) Ab-1(2) Es(2) Nm(1)
<i>Mus musculus</i>	-	-	-	-	-	0/1(0)	-	-	0/1(0)
<i>Niviventer coxingi</i>	-	-	-	-	1/1(100) Ap(1)	-	-	-	1/1(100) Ap(1)
<i>Rattus losea</i>	7/18(39) Ab-1(2) Nm(3) Nm-4(2)	3/7(43) Ab-1(2) Ap(1)	0/3(0)	1/1(100) Ab-1(1)	1/1(100) Nm(1)	0/1(0)	6/7(86) Ab-1(1) Ap(4) Nm(1)	6/7(86) Ap(1) Ap-4(2) Ap-5(1) Ap-6(2)	24/45(53.33) Ab-1(6) Ap(6) Ap-4(2) Ap-5(1) Ap-6(2) Nm(5) Nm-4(2)
<i>Suncus murinus</i>	1/2(50) Ab-1(1)	0/1(0)	-	-	3/5(60) Nm(2) Wo-5(1)	-	-	2/5(40) Nm(1) Eh (1)	6/13(46.15) Ab-1(1) Nm(3)

									Eh (1) Wo-5(1)
Total	15/29(51.72)*	22/28(78.57)	1/5(20)	2/2(100)	5/7(71.29)	0/2(0)	6/7(85.71)	8/12(66.67)	59/92(64.13)

*陽性數/檢測數(陽性率%)

表四、鼠類血液艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體分子檢測結果

	桃園	台中	高屏	花蓮	台東	澎湖	金門	連江	Total
<i>Apodemus agrarius</i>	-	1/1(100) Es(1)	-	-	-		-	-	1/1(100) Es(1)
<i>Bandicota indica</i>	2/4(50) Nm(1) Nm-4(1)	11/14(79) Ab-1(3) Ab-4(7) Ap(1)	1/2(50) Ab-4(1)	-	-	-	-	-	14/20(70) Ab-1(3) Ab-4(8) Ap(1) Nm(1) Nm-4(1)
<i>Mus caroli</i>	0/2(0)	2/3(67) Ab-1(2)	-	-	-	-	-	-	2/5(40) Ab-1(2)
<i>Niviventer coxingi</i>	-	-	-	-	0/1	-	-	-	0/1
<i>Rattus losea</i>	8/18(44) Nm(8)	5/7(71) Ab-1(2) Ap(2) Nm(1)	0/4	1/1(100) Nm(1)	1/1(100) Nm(1)	-	7/24(29) Ab-1(2) Nm(4) Ap(1)	0/1	22/56(39.29) Ab-1(4) Ap(3) Nm(14) Nm-4(1)
<i>Suncus murinus</i>	1/1(100) Ab-4(1)	-	-	-	2/3(67) Nm(2)	-	-	1/4(25) E360(1)	4/8(50) Ab-4(1) E360(1) Nm(2)
Total	12/25(48)*	18/25(72)	1/6(16.66)	1/1(100)	3/5(60)	0/0(0)	7/24(29.17)	1/5(20)	43/91(47.25)

*陽性數/檢測數(陽性率%)

表五、鼠類脾臟艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體檢出種類及分布

Name: species	Number	分布(Number)	鼠種(Number)
<i>Anaplasma bovis</i>	22	桃園(5), 台中(14), 高雄(1), 花蓮(1), 金門(1)	<i>A. agrarius</i> (2), <i>B. indica</i> (11), <i>M. caroli</i> (1), <i>R. losea</i> (3)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	13	台中(2), 台東(1), 金門(4), 連江(6),	<i>B. indica</i> (1), <i>N. coxingi</i> (1), <i>R. losea</i> (11)
<i>Candidatus Ehrlichia shimanensis</i>	7	桃園(2), 台中(5)	<i>B. indica</i> (4),
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	14	桃園(8), 花蓮(1), 台東(3), 金門(1), 連江(1)	<i>B. indica</i> (2), <i>M. caroli</i> (1), <i>R. losea</i> (8), <i>S. murinus</i> (3)
<i>Ehrlichia</i> sp.	1	連江(1)	<i>A. agrarius</i> (1), <i>M. caroli</i> (2), <i>S. murinus</i> (1),
<i>Wolbachia</i> sp.	1	台東(1)	<i>S. murinus</i> (1)
Total	59		

表六、鼠類血液艾利希氏體及邊蟲檢出種類及分布

Name: species	Number	分布(Number)	鼠種(Number)
<i>Anaplasma bovis</i>	18	桃園(1), 台中(14), 高屏(1), 金門(2)	<i>B. indica</i> (11), <i>M. caroli</i> (2), <i>S. murinus</i> (1), <i>R. losea</i> (4)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	4	台中(3), 金門(1)	<i>B. indica</i> (1), <i>R. losea</i> (3)
<i>Candidatus Ehrlichia shimanensis</i>	1	台中(1)	<i>A. agrarius</i> (1)
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	19	桃園(10), 台中(1), 花蓮(1), 台東(3), 金門(4)	<i>S. murinus</i> (2)
<i>Ehrlichia</i> sp. 360	1	連江(1)	<i>S. murinus</i> (1)
Total	43		

表七、狗蜱艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體分子檢測結果

台北市	新北市	桃園縣	新竹縣	苗栗縣	台中市	高雄市	基隆市	宜蘭縣	花蓮縣	Total
8/51(15.69) Ap(3) Apl(2) Ec(1) Ap-8(2)	75/112(66.7) Ap(50) Ap-8(13) Ap-11(1) Ap-12(1) Ap-13(1) Ap-14(1) Apl(5) Apl-1(1) Ec(2)	6/17(35.29) Ap(2) Ec(1) Ech(2) Ap-7(1)	3/13(23.08) Ap(1) Ab-2(2)	0/4	15/180(8.33) Apl(1) Ec(1) Wo-1(12) Wo-4(1)	13/40(32.5) Ap(8) Ap-8(5)	22/27(81.48) Ap(15) Ap-8(5) Ap-9 (1) Ap-10(1)	1/49(2.04) Apl(1)	35/65(53.85) Ap(23) Apl(3) Ap-8(4) Ap-15(1) Ap-16(1) Ap-17(1) Ap-18(1) Ap-19(1)	178/562(31.67)

*陽性數/檢測數(陽性率%)

表八、狗蜱艾利希氏體、邊蟲及其他立克次體檢出種類及分布

Name: species	Number	分布
<i>Anaplasma bovis</i>	2	新竹縣(2)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	143	台北(5), 新北市(67), 基隆(22), 桃園(3), 花蓮(32), 高雄(13)
<i>Anaplasma platys</i>	13	台北市(2), 新北市(6), 宜蘭縣(1), 台中市(1), 花蓮縣(3)
<i>Ehrlichia canis</i>	5	台北市(1), 新北市(2), 桃園縣(1)
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	2	桃園縣(1)
<i>Wolbachia</i> sp.	12	台中市(12), 金門(1)
Total	178	

