

計畫編號：DOH97-DC-2004

行政院衛生署疾病管制局 97 年度科技研究發展計畫

鼠類及其外寄生節肢動物病原體監測整合型計畫

(子計畫一) 鼠類及其外寄生節肢動物鈎端螺旋體及疏螺旋體監測計畫 (慕蓉蓉)

(子計畫二) 鼠類及其外寄生節肢動物立克次體監測計畫 (王錫杰)

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：慕蓉蓉

研究人員：王錫杰、舒佩芸、邱詩惠、王秀貞、李沛龍、高英訓、  
林穎君

執行期間： 97 年 1 月 1 日至 97 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	16
(三)、結果	30
(四)、討論	40
(五)、結論與建議	47
(六)、計畫重要研究成果及具體建議	49
(七)、參考文獻	50
(八)、圖	59
表	70

## 圖次

圖一、建立偵測鈎端螺旋體之 real-time PCR(數字代表每個反應所帶菌數)	59
圖二、16S real-time PCR 特異性之測試。	60
圖三、建立偵測萊姆疏螺旋體之 real-time PCR(A:數字代表每個反應所帶菌數) (B: 特異性之測試)	61
圖四、鈎端螺旋體菌 16S 序列親緣關係圖。	62
圖五、萊姆疏螺旋體菌 5S-23S 序列親緣關係圖。	63
圖六、連江縣斑點熱立克次體 <i>OmpB</i> 部分序列親緣關係圖，●為連江縣菌株。	64
圖七、連江縣斑點熱立克次體 <i>gltA</i> 部分序列親緣關係圖，●為連江縣菌株。	65
圖八、金門縣斑點熱立克次體 <i>OmpB</i> 部分序列親緣關係圖，●為金門縣菌株。	66
圖九、金門縣斑點熱立克次體 <i>gltA</i> 部分序列親緣關係圖，●為金門縣菌株。	67
圖十、澎湖縣斑點熱立克次體 <i>OmpB</i> 部分序列親緣關係圖，●為澎湖縣菌株。	68
圖十一、澎湖縣斑點熱立克次體 <i>gltA</i> 部分序列親緣關係圖，●為澎湖縣菌株。	69

## 表次

表一、連江縣老鼠鉤端螺旋體血清抗體陽性率	70
表二、金門縣老鼠鉤端螺旋體血清抗體陽性率	70
表三、澎湖縣老鼠鉤端螺旋體血清抗體陽性率	70
表四、連江縣調查老鼠斑點熱血清抗體陽性率	71
表五、金門縣調查老鼠斑點熱血清抗體陽性率	71
表六、澎湖縣調查老鼠斑點熱血清抗體陽性率	71
表七、連江縣老鼠腎臟鉤端螺旋體檢測	73
表八、金門縣老鼠腎臟鉤端螺旋體檢測	73
表九、澎湖縣老鼠腎臟鉤端螺旋體檢測	73
表十、9603 連江縣老鼠內臟斑點熱檢測	74
表十一、9506 金門縣老鼠內臟斑點熱檢測	74
表十二、9605 澎湖縣老鼠內臟斑點熱檢測	74
表十三、連江縣老鼠體外節肢動物萊姆疏螺旋體檢測	75
表十四、金門縣老鼠體外節肢動物萊姆疏螺旋體檢測	75
表十五、澎湖縣老鼠體外節肢動物萊姆疏螺旋體檢測	75
表十六、9603 及 9607 連江縣調查蟬斑點熱 PCR 檢測	75
表十七、9506、9703 及 9708 金門縣調查蟬斑點熱 PCR 檢測	76
表十八、澎湖縣調查蟬斑點熱 PCR 檢測	76
表十九、9603 及 9607 連江縣調查恙蟲斑點熱 PCR 檢測	76
表二十、9506 及 9601 金門縣調查恙蟲斑點熱 PCR 檢測	76
表二十一、9605 及 9609 澎湖縣調查恙蟲斑點熱 PCR 檢測	77
表二十二、9603 連江縣老鼠跳蚤斑點熱 PCR 檢測	77
表二十三、9601 金門縣老鼠跳蚤斑點熱 PCR 檢測	77
表二十四、9605 澎湖縣老鼠跳蚤斑點熱 PCR 檢測	78
表二十五、9603 連江縣老鼠厲蟎斑點熱 PCR 檢測	78
表二十六、9506 金門縣老鼠厲蟎斑點熱 PCR 檢測	78
表二十七、9605 澎湖縣老鼠厲蟎斑點熱 PCR 檢測	79
表二十八、外寄生節肢動物及鼠類脾肝腎臟斑點熱立克次體分佈情形	79

## 摘要

關鍵詞：鼠類、鉤端螺旋體病、萊姆病、*Rickettsia* 屬立克次體、即時定量聚合酶連鎖反應、親緣樹狀圖演化分析

95 年 6 月至 97 年 8 月於連江縣、金門縣和澎湖縣進行 8 次野鼠捕捉及野鼠體外節肢動物採集，共計捕獲野鼠 525 隻。鉤端螺旋體與萊姆疏螺旋體的調查取 96 年 5 月至 97 年 8 月 5 次之野鼠 347 隻進行檢測。老鼠血清分別以 12 種鉤端螺旋體菌進行 MAT 血清學檢測，三縣中以金門縣平均感染率 65.3% (109/167) 最高，連江縣 21.4% (9/42) 次之，澎湖縣 2.2% (3/138) 最低。顯示不同地區野鼠鉤端螺旋體感染率不同，金門縣野鼠感染鉤端螺旋體情形最為嚴重。採集之 525 隻野鼠血清以 3 種立克次體抗原玻片(*Rickettsia rickettsii*、*R. conorii* 和 *R. typhi*)進行血清學檢測。結果發現小黃腹鼠為連江縣、金門縣及澎湖縣斑點熱抗體陽性率最高的鼠種，抗 *R. rickettsii* 抗體陽性率在 8 次的調查皆高於 80%，沒有季節性的差異，三縣中以澎湖縣最高 98.2%，連江縣最低 81.8%，顯示連江縣、金門縣及澎湖縣野外主要鼠種小黃腹鼠感染斑點熱立克次體情形非常嚴重。為探究野鼠本身是否帶有鉤端螺旋體菌、萊姆疏螺旋體菌及斑點熱立克次體，取其內臟及耳朵檢體，分別以 16S、*hbb* 及 surface antigen (*ompB*) 與 citrate synthase (*gltA*) 為基因標的進行檢測。金門縣野鼠平均鉤端螺旋體帶菌率 45.5%，為三縣最高，其次為澎湖縣的 5.4%，最低為連江縣 2.4%。顯示金門縣之野鼠成為鉤端螺旋體菌傳染窩(reservoir)的可能性遠高於連江縣及澎湖縣。60 個檢體成功定序，經親緣樹狀圖分析近似 *Leptospira interrogans* 與 *Leptospira borgpetersenii*，均隸屬致病性鉤端螺旋體。萊姆疏螺旋體菌並未在所有捕獲之鼠耳檢體中偵測出。而以 120-135 kDa surface antigen (*ompB*)及

citrate synthase (*gltA*)為基因標的進行斑點熱立克次體 nested-PCR 檢測，三縣老鼠脾肝腎臟中平均偵測出斑點熱立克次體的比例為 70%、70%及 43%，顯示小黃腹鼠、田鼯鼠及錢鼠皆有成為斑點熱立克次體傳染窩(reservoir)的可能性。

為瞭解野鼠是透過何種管道感染萊姆疏螺旋體菌及斑點熱立克次體，由其體外節肢動物分別以 *hbb*、*ompB* 及 *gltA* 為基因標的進行萊姆疏螺旋體菌及斑點熱立克次體檢測，結果發現萊姆疏螺旋體菌只存在於粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)，平均陽性率高達 37.5%。所有檢出之序列經親緣樹狀圖分析均近似 *Borrelia valaisiana*，這是第一次從台灣硬蜱檢體偵測出萊姆疏螺旋體菌。而斑點熱立克次體採自三縣中鑷形扇頭蜱(*Rhipicephalus haemaphysaloides*)、粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)、地里恙蟎(*Leptotrombidium deliense*)、小板恙蟎(*L. scutellare*)、蒼白恙蟎(*L. pallidum*)、優勝病蚤(*Nosopsyllus nicanus*) 及厲蟎(*Laelaps* spp.)的陽性率分別為 41.7%、14.9%、15.2%、15.0%、70.0%、37.0% 及 40.0%，經由蜱及恙蟎分離培養出 17 株斑點熱立克次體。所有檢測出之 201 株斑點熱立克次體菌株序列進行親緣關係分析，結果可分成 8 群，以近似 *R. rickettsii* 及近似 *R. conorii* 出現的機率最高。顯示萊姆疏螺旋體菌及斑點熱立克次體可透過這些野鼠體外節肢動物在鼠類間循環，甚至可能傳給人類。

## Abstract

Keywords: rodent, leptospirosis, lyme disease, *Rickettsia*, real-time PCR, phylogenetic analysis

Rodent trapping and ectoparasite collection were conducted eight times from June 2006 to August 2008 in Lienchiang, Kinmen and Penghu. A total of 525 rodents were collected. We detected 347 rodents collected from May 2007 to August 2008 for surveillance of leptospirosis and lyme disease. Rodent sera were tested for leptospira infection by MAT (microagglutination test). The seropositive rate in Kinmen, Lienchiang and Penghu were 65.3%, 21.4% and 2.2%, respectively. The rodent sera were challenged to detect IgG against *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii* and *R. typhi* antigens with immunofluorescent antibody test (IFA). The seropositive rates of *Rattus losea* against *R. rickettsii* were higher than 80% during each survey in these three areas, did not vary among seasons. This revealed that *R. losea*, the locally dominant wild rodent species in these areas, was severely infected with spotted fever rickettsia. Among three areas, Penghu had the highest (98.2%) and Lienchiang the lowest (81.8%) seropositive rates. To be aware of pathogen infections in rodents, organ tissues were detected by real-time PCR or nested PCR. 16S real-time PCR was used for leptospira detection in kidney and showed 45.5%, 5.4% and 2.4% in Kinmen, Penghu and Lienchiang, respectively, suggesting rodents in Kinmen might have the higher possibility to be the reservoirs of leptospirosis. The phylogenetic analysis of real-time PCR positive samples showed all the sequences belong to pathogenic leptospira, either *Leptospira interrogans* or *Leptospira borgpetersenii*. To detect the rickettsia infection, spleens, livers, kidneys were examined by nested-PCR with 120-135 kDa surface antigens (*ompB*) and citrate synthase (*gltA*) as gene targets. Average PCR positive rates for spleens,

livers and kidneys were 70%, 70% and 43%, suggesting *R. losea*, *Mus caroli* and *Suncus murinus* might be the reservoirs of spotted fever rickettsia in these three areas. To realize possible transmission routes among rodents, ectoparasites of rodents were tested by detecting lyme borrelia *hbb* gene using real-time PCR and detecting *ompB* and *gltA* gene by nested-PCR. The lyme borrelia only can be detected in *Ixodes granulatus*, and positive rate is 37.5%. The phylogenetic analysis showed the sequences are close to *Borrelia valaisiana*. This is the first time which the borrelia can be detected in ectoparasites in Taiwan. The PCR positive rates for rickettsia *ompB* and *gltA* were 41.7%, 14.9%, 15.2%, 15.0%, 70.0%, 37.0% and 40.0% in *Rhipicephalus haemaphysaloides*, *Ixodes granulatus*, *Leptotrombidium deliense*, *L. scutellare*, *L. palladium*, *Nosopsyllus nicanus*, and *Laelaps* spp.. Spotted fever rickettsia might therefore be transmitted among rodents by ectoparasites, and humans could also be infected. Seventeen strains of spotted fever Rickettsia were isolated from ticks and chigger mites using cell culture. All 201 PCR positive samples were also sequenced and could be divided into 8 phylogenetic groups. Most sequences are closely related to *R. rickettsii* and *R. conorii*.



## 前言

在人類所豢養的動物如狗、貓、雞、鴨等以外，鼠類是與人類生活最接近的小型哺乳動物，其生活的適應性強，取食廣，且具機敏性，極適合人類的居住環境，所以不論是居家、辦公廳舍、倉庫或廠房都可見到他們的蹤影。有些鼠類習慣棲息於屋內外四週如溝鼠(*Rattus norvegicus*)、屋頂鼠(*R. rattus*)、家鼯鼠(*Mus musculus*)及錢鼠(*Suncus murinus*)，或棲息於居家附近的農耕地及草地如小黃腹鼠(*R. losea*)、鬼鼠(*Bandicota indica*)、赤背條鼠(*Apodemus agrarius*)、田鼯鼠(*Mus caroli*)，而有些則已登堂入室成為寵物如楓葉鼠(*Phodopus sungorus*)、黃金鼠(*Mesocricetus auratus*)、花栗鼠(*Tamias sibiricus*)及天竺鼠(*Cavia porcellus*)等。鼠類的繁殖能力很強，根據估算亞熱帶地區鼠口約為人口之四倍，以台灣二千三百萬人口計算，鼠口即超過九千萬，因此其每年所消耗的糧食損失實在難以估計(王正雄，1999)。鼠類所帶來的危害還不僅於此，更重要的是疾病的傳播。鼠類為許多人畜共通傳染病的儲主(reservoir)，這些病原可經由鼠糞或鼠尿直接傳染給人類，如沙門氏菌病(Samonellosis)、鉤端螺旋體病(Leptospirosis)、漢他病毒出血熱(Hanta virus)、原蟲病、條蟲病；或直接經由鼠咬傳染，如鼠咬熱(Rat-bite fever)；另可經由老鼠身上的外寄生節肢動物來傳播，如鼠蚤傳播鼠疫(Plaque)、地方性斑疹傷寒(Murine typhus)；鼠蝨傳播恙蟲病(Scrub typhus)、立克次體痘(Rickettsial-pox)；鼠蟬傳播 Q 熱(Q fever)、萊姆病(Lyme disease)、巴比西亞原蟲症(Babesiosis)等(王和林，1995)。台灣地區近幾年與鼠類相關的傳染病都具有相當的病例數，94、95、96 年恙蟲病確定病例數分別為 462、384、510 例；Q 熱為 112、153、157 例；地方性斑疹傷寒為 13、25、47 例；漢他病毒出血熱在 93 及 95 年各有 3 例，96 年 1 例。中國大陸為國人經常往來旅遊、探親及商務的地點，自從兩岸開放小三通，往來更是頻繁。根據行政院大陸委員會統計，國人於 95

年前往大陸探親旅遊商務的人數高達 400 萬人次，而大陸各地衛生情況不一，經鼠傳播的疾病相當嚴重，如 96 年漢他病毒出血熱 11,251 例、鉤端螺旋體病 887 例、斑疹傷寒 2,750 例(未具名，2008)，去年(96 年)6 月洞庭湖地區甚至發生十年來最嚴重的鼠患。

鼠類同時會直接傳播許多新興之人畜共通傳染病，如拉薩熱(Lassa fever)、淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎 Lymphocytic choriomeningitis(LCM)、南美沙狀病毒(South American Arenaviruses)及兔熱病(Tularemia)。淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎雖主要由家鼯鼠傳播，但美國有多次的疫情爆發是經由寵物鼠(CDC, 2005; Amman, 2007)。另外由鼠類可間接傳播的新興人畜共通傳染病如科羅拉多壁蝨熱(Colorado tick fever)、人粒細胞無形體病(Human granulocytic anaplasmosis)、波瓦桑病毒腦炎(Powassan virus encephalitis)及斑點熱立克次體病(Spotted fever rickettsiosis)等。

鉤端螺旋體病是由鉤端螺旋體 (*Leptospira* spp.) 感染引起的重要的人畜共通傳染病(Levett, 2001)。人類感染重症描述最早見於 1886 年德國醫師 Adolf Weil 在急性腎衰竭的病人身上觀察到的脾腫大、黃疸及腎臟炎等臨床表現(Faine, 1994; Weil, 1886)。近年來，在尼加拉瓜(Brandling-Bennett, 1996)、阿根廷(Seijo *et al.*, 2002)、秘魯(Johnson *et al.*, 2004)、巴西、印度(Chaudhry *et al.*, 2002)、東南亞(Laras *et al.*, 2002)、美國(CDC.1998, 1998)與馬來西亞(Sejvar *et al.*, 2003)等地爆發鉤端螺旋體病之重大疫情，令此病成為受到矚目的再現傳染病(re-emerging infectious disease)。

鉤端螺旋體為細桿狀螺旋型、兩端呈鉤狀具內鞭毛的高運動性螺旋體，其最佳生長溫度為 28 °C 到 30 °C，可以在潮溼的環境中存活很長的時間(Trueba *et al.*, 2004)。目前，全球已知的鉤端螺旋體約有兩百多種(Morey *et al.*, 2006)：

可應用基因分型方法將其分為 16 種基因型 (genomospecies)，依照致病性分為 3 大群：致病型 (pathogens)、中間型 (intermediate)、腐生型 (saprophytes)；血清型的分類則常用交叉凝集吸收測試 (cross agglutination absorption test)；另外，亦可利用 16S ribosomal RNA gene 進行序列比對及親緣樹狀圖演化分析 (phylogenetic tree analysis)，以確定分離菌株的親緣關係 (Matthias *et al.*, 2005)。

鉤端螺旋體可經由傷口或黏膜組織感染幾乎所有哺乳類。鼠類、狗、牛、豬等為保菌宿主 (reservoir hosts)，造成腎臟慢性感染，並且由尿液長時間持續地大量排菌，污染水或環境。人類或其他動物為意外感染宿主 (incidental hosts)，經由接觸受鉤端螺旋體污染的水或環境而感染，但病情較嚴重，排菌期卻較短 (行政院衛生署疾病管制局, 2002)。

鼠類被認為是鉤端螺旋體病的重要保菌宿主，也扮演重要的傳播角色 (Faine, 1994)。如 Saravanan *et al.* 研究顯示，病患住所周圍的鼠隻分離鉤端螺旋體，其血清型常和病患血清抗體吻合 (Saravanan *et al.*, 2000)。Vinetz *et al.* 研究也顯示，鉤端螺旋體病患可能因暴露於住家附近遭鼠尿污染的環境而罹病，調查發現病患住家附近捕獲的 21 隻溝鼠中，以 PCR 檢測，19 隻的腎臟組織呈陽性，故推論都市區鼠類族群鉤端螺旋體帶原率與居民罹病的機率有極大的相關性 (Vinetz *et al.*, 1996)。

台灣地區野鼠帶有鉤端螺旋體是在 1966 年 Yeh 和 Young 從台北市近郊捕捉野鼠，由腎臟組織中分離出 Javanica 與 Autumnalis 血清型的菌株而被證實 (Yeh and Young, 1966)。但由於鉤端螺旋體培養耗時 (Levett, 2001)，常以其血清盛行率調查代替，但歷年血清陽性盛行率、血清型及鼠種之分佈之結果不盡相同，如 1968 年 Fresh *et al.* 調查顯示 586 隻野鼠中有 4.81% 呈陽性反應 (Fresh

*et al.*, 1968)；2000 年邱對台灣地區港埠鼠隻調查，則發現鼠類總陽性率高達 53%、抗體陽性率最高者為錢鼠（75%）及 Shermani 血清型陽性率最高(邱, 2000)；2006 年吳於台中地區進行調查，結果顯示鼠類血清陽性率為 23%、溝鼠抗體陽性率最高、以 Pomona 血清型為主(吳, 2007)。加上，保菌宿主如鼠類除了本身攜帶的特有的鈎端螺旋體，亦可感染其他血清型造成急性感染，故血清抗體調查是否能確實反應其帶原情形仍有待商榷，故鼠類實際帶原情形仍有賴於菌株的分離培養與鑑定。

疾病管制局自 89 年起展開台灣鈎端螺旋體病監測，依據近六年來的監測結果，90-95 年度通報病例數分別為 553 例、804 例、683 例、1687 例、3253 例、2180 例，確定病例數分別為 51 例、25 例、31 例、109 例、96 例、58 例，確定病例數約佔通報病例數的 2.66-9.22%，比例不及 10%。是否現行顯微凝集試驗（microscopic agglutination test, MAT）所用的鈎端螺旋體血清群代表菌株，無法偵測由本土型菌株所產生之抗體，或尚有其他未被確認的鈎端螺旋體存在於鼠類或環境中，應作深入瞭解。

萊姆病是經蜱傳染之人畜共通疾病(tick-borne zoonotic disease)，萊姆病病原體為疏螺旋體，存在保菌宿主(如齧齒動物，鳥類)與媒介(vector)蜱或蚤身上(Stanek and Strle, 2003)。人類被帶有疏螺旋體的蜱叮咬後，於皮膚上產生游走性紅斑(Erythema migrans)，進而侵犯心血管及神經系統(Steere, 1989; Steere *et al.*, 1983)。歐洲、北美甚至日本及俄羅斯均為萊姆病盛行區。疏螺旋體菌須在病患感染之初，取游走性紅斑周圍之皮膚病灶培養，常由於病患延誤或臨床醫師疏忽而無法在第一時間取得。因此，臨床上多倚賴血清學診斷。台灣萊姆病確定個案非常稀少，本局自 94 年將萊姆病收回自行檢驗以來，尚無確定個案。是台灣無萊姆病發生？抑或台灣流行之本土型菌株與一般檢驗用的代表菌株

差異性大而無法偵測，一直以來頗具爭議。文獻顯示，台灣地區有從野鼠分離出疏螺旋體，但其型別與歐、美相同，因此是否尚有其他未被確認的疏螺旋體存在於鼠類或蜱中，應作深入瞭解。

斑點熱立克次體病是一種世界性散發的立克次體疾病，主要是經由蜱(ticks)及蟎(mites)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(Lennette *et al.*, 1988; Marmion 1990; Takada *et al.*, 1994)。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(Parola *et al.*, 2005; Brouqui *et al.*, 2007)。雖然台灣地區至目前為止尚未有斑點熱之本土病例報告，僅在 95 年 5 月有一自南非旅遊回來，感染 *Rickettsia africae* 之境外移入個案(Tsai *et al.*, 2008)，但斑點熱在台南的盛行率調查為 3.5-4.4%(Takada *et al.*, 1993)，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%。本局 94 年研究報告指出捕獲自台灣地區 13 個空海港的 810 隻鼠類，其 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 血清抗體陽性率分別為 50.3%及 26.8%，兩者重複感染比率為 23.7%；另自南部 11 個地方性斑疹傷寒確定病例病媒調查、屏東市市場及台北市北投區捕獲 113 隻鼠類，其 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 血清抗體陽性率分別為 36.3%及 30.1%。斑點熱立克次體的菌株雖然很多，但目前商品化的斑點熱立克次體 IFA 抗原玻片之菌株僅有 *R. rickettsii* 及 *R. conorii*，依 Fang and Raoult (2003)報告顯示 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 抗原玻片易與其他 *Rickettsia* 屬立克次體產生之抗體發生交互作用，故台灣地區港口、都市及野地鼠類可能存在 *R. rickettsii* 或 *R. conorii* 或其他 *Rickettsia* 屬立克次體菌株，其在鼠類產生之抗體可與 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 產生交互作用，應以分子生物技術或菌株分離培養來進一步分析台灣地區 *Rickettsia* 屬立克次體之菌株種類。

*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. asiatica*，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. tamurae* (Fujita *et al.*, 2006; Fournier *et al.*, 2006)。在韓國亦從長角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)檢測出 *R. japonica* 及 *R. rickettsia* (Lee *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006)，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(Choi *et al.*, 2007)。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(Robbin, 2005)，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。

本整合型研究計畫子計畫一將利用鈎端螺旋體的基因序列 16S ribosomal RNA(Ganoza *et al.*, 2006)、LigA/B(Palaniappan *et al.*, 2005)及 LipL32；以及萊姆疏螺旋體的基因序列 OspA 及 OspC 建立即時定量聚合酶連鎖反應(real-time PCR) (Ivacic *et al.*, 2007; Wilske *et al.*, 2007)，測試其特異性及敏感度，以評估何者為最適用的快速篩檢診斷方法；同時進行台灣地區離島及本島各地的鼠類捕捉及其外寄生節肢動物採集，並將建立好的快速篩檢方法應用至鼠類及其外寄生節肢動物之帶原檢測上。子計畫二將檢測 *Rickettsia* 屬之立克次體的標的基因最常用者為 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，包括流行性斑疹傷寒的病原體普氏立克次體(*Rickettsia prowazekii*)及地方性斑疹傷寒病原體傷寒立克次體(*Rickettsia typhi*)，甚至可以區分出新的 *Rickettsia* 菌株(Fournier *et al.*, 2003)。由 Parola(2005)的報告可發現，全世界有關 *Rickettsia* 屬之立克次體的研究在歐洲、北美洲及非洲有較多的發現，而東南亞除泰國之外幾乎是一片空白，亟待深入研究。

採集蟬、恙蟲、鼠類腎臟及耳部檢體進行鈎端螺旋體、萊姆疏螺旋體及 *Rickettsia* 屬立克次體培養，先以快速篩檢法確定是否帶原，再進行組織培養以分離出菌株，並進行基因序列比對及親緣樹狀圖演化分析 (phylogenetic tree analysis) 確定其種別及親緣關係。期望藉此鼠類監測計畫釐清台灣地區鼠類鈎端螺旋體、萊姆疏螺旋體及 *Rickettsia* 屬立克次體帶原情形及其可能的傳播途徑，並分離出更多的本土型菌株納入本局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。

## 材料與方法

本整合型研究計畫擬以 3 年為期，進行台灣地區鼠類及其外寄生節肢動物鉤端螺旋體、萊姆疏螺旋體及 *Rickettsia* 屬立克次體帶原之調查，以 PCR 進行鼠類及其外寄生節肢動物帶原的快速診斷，並利用基因序列比對及親緣樹狀圖演化分析 (phylogenetic tree analysis)，確定分離菌株的種別及親緣關係。第一年將針對鉤端螺旋體的基因序列 16S ribosomal RNA，第二年將針對數種不同萊姆疏螺旋體的基因序列 hbb，進行即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR)，測試其特異性及敏感度，評估何者為最適用的快速篩檢診斷方法。同時進行台灣地區離島及本島各地的鼠類捕捉及其外寄生節肢動物採集，以蟬、恙蟲、鼠類腎臟及耳部檢體進行鉤端螺旋體、萊姆疏螺旋體及 *Rickettsia* 屬立克次體培養，並由基因序列比對及親緣樹狀圖演化分析 (phylogenetic tree analysis) 確定其種別，期望釐清本地鼠類鉤端螺旋體、萊姆疏螺旋體及 *Rickettsia* 屬立克次體帶原的實際情形、本土型菌株的基因型與血清型及臨床病例的關係。

### 一、樣本採集地點

樣本之採集分為離島及台灣本島，第一年進行連江縣、澎湖縣及金門縣三離島採集；第二年進行宜蘭縣、花蓮縣及台東縣等東部縣市採集；第三年進行桃園縣、雲林縣及高雄縣等西部縣市採集。

### 二、採集方法：

1. 捕鼠：在選定地點佈鏤空鼠籠(27×16×13 cm) 40 個，Sherman 鼠籠(26.5×10×8.5 cm) 20 個以地瓜加花生醬為誘餌，下午置放隔日早上收籠。捕獲鼠類後，依體



型大小以 0.1~0.4 ml Zoletil 50 進行腹腔注射迷昏，心臟採血後將鼠體外節肢動物如跳蚤、蝨子、蟎類以毛刷刷下置於 70%酒精中，蜚類則置於直徑 3.7 cm，高 5.8 cm 有蓋塑膠瓶中，內鋪 1 cm 石膏碳粉(熟石膏粉：活性碳粉=9：1)保持濕度，置於 4°C 冰箱。如有恙蟎寄生，將恙蟎寄生之外耳殼及其他部位如生殖器附近、尾端、後腿基部之皮膚剪下置於石膏碳粉瓶中，靜置 1 天讓恙蟎脫離鼠體，置於 4°C 冰箱。準備進行鑑定及立克次體分離檢測。

2. Dragging and flagging: 以 2m × 1m 棉布製成之拖曳帶及 1m × 1m 棉布製成之旗竿在適當的草地或灌木叢進行拖曳，將沾附上之蜚以鑷子移入石膏碳粉瓶中，置於 4°C 冰箱，準備進行鑑定及立克次體分離檢測。
3. 鼠類解剖：將鼠體腹面朝上固定後，由表皮層及肌肉層逐層剪開固定，避免體表的污染，取脾臟、肝臟及腎臟約 0.5 cm 置於 70%酒精之小管中，準備進行立克次體 PCR 檢測。

### 三、鼠體外節肢動物鑑定方法

1. 蜚：部份蜚浸泡於 70%酒精殺死後，置於 Leica MZ12 解剖顯微鏡下鑑定，蜚之分類方法參考鄭和姜(1991)、Yamaguti *et al.*(1971)及 Baker(1999)。
2. 跳蚤：將保存於 70 %酒精的蟲體置入水中 30 分鐘後，轉換成 5 % KOH 置於 45°C 烤箱 16-24 小時，冷卻後置於水中 30 分鐘，再以 10 % acetic acid 作用 5-10 分鐘，然後脫水 40 % 酒精 15 分鐘，70 % 酒精 2 小時，100% 酒精置換 2 次 2 小時後轉換成丁香油(clove oil)隔夜，再以加拿大膠(Canada balsam)封片，置於 45°C 烤箱 2 週。以 Olympus BX50 顯微鏡鏡檢。跳蚤之分類方法參考柳(1986)及 Hopkins and Rothschild(1953-1971)。
3. 蝨：當標本尚在酒精中時，以細針由腹面刺穿腹部，將標本置於 10 % KOH 於

室溫下處理 24 小時或直到所需的透明度。用扁針輕壓腹部移除體內雜物，將標本換到水中 10 分鐘，去除任何雜物，同時要將 KOH 完全去除。進行脫水步驟，50 % 酒精、70 % 酒精、80 % 酒精、95 % 酒精、100 % 酒精各處理 10 分鐘；木鱈油(cresote)處理 4 小時，最後以 Canada balsam 封片。以 Olympus BX50 顯微鏡鏡檢。蟲之分類方法參考 Kim *et al.*(1986)及金(1999)。

4. 厲蟎及恙蟎：厲蟎由 70%酒精中取出，或將部份恙蟎浸泡於 70%酒精殺死，再置於去水 3~4 次每次 30 min。再將蟎類以 Berlese fluid 封片液(ASCO Lab. UK)封片。以 Olympus BX50 顯微鏡鏡檢。厲蟎之分類方法參考 Jameson(1965)，恙蟲之分類方法則參考 Nadchatram and Dohany (1974)、Vercammen-Grandjean and Langston (1976)、Wang and Yu (1992)及黎等 (1997) 之報告。鑑定完成之標本以數位影像系統照相存檔。

四、鈎端螺旋體培養：將鼠檢體樣本以無菌針筒擠入含 5.0 ml EMJH 培養基 (Bacto Leptospira Medium Base EMJH, No.0794, Difco, Michigan, USA 及 Enrichment)並添加 5-fluorouracil (100-300 g/mL) 以抑制雜菌生長，將接種後之培養基置於 28-30°C 之培養箱中。每週 1 次以暗視野顯微鏡檢查，至少觀察 8 周，觀察是否分離出鈎端螺旋體。

五、鈎端螺旋體菌株：本計畫將採用 20 株鈎端螺旋體菌株：由潘銘正教授分讓之參考菌株 17 株及 89 年與 90 年間分離之人類臨床分離株 2 株 (CCF 及 CSY)；再加上本局 95 年度分離之人類臨床分離株 1 株。

六、細菌、鼠腎、鼠耳及蟬組織 DNA 之萃取

1. 鈎端螺旋體菌株：鈎端螺旋體菌株次培養於 EMJH 液體培養基以 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) 進行。取 1 ml 的液體培養基以 1,2000 g 離心 15 分鐘，去除上清，沈澱物加入 180 µl ATL 及 20 µl proteinase K，55°C 震盪作用 1 小時，染色體 DNA 萃取依照套組操作說明進行。
2. 非鈎端螺旋體之菌株：以 QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) 萃取染色體 DNA 並依照套組操作說明進行。
3. 鼠腎及鼠耳組織：以 DNeasy Tissue kit (QIAGEN) 進行。鼠腎及鼠耳樣本約 25 mg 加入 180 µl ATL 磨碎，再加入 20 µl proteinase K，55°C 震盪至少 3 小時，後依照套組操作說明進行。

#### 七、鈎端螺旋體及萊姆疏螺旋體即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR)

1. 即時 PCR 引子、探針、試劑與反應條件：

鈎端螺旋體 16S r-RNA 引子與探針序列與反應條件則是參考文獻(Ganoza *et al.*, 2006)。

LeptoF 5'-CCCGCGTCCGATTAG-3'

LeptoR 5'-TCCATTGTGGCCGRACAC-3'

Lepto probe 5'(FAM)CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC3'(BHQ)

萊姆疏螺旋體 hbb 引子與探針序列與反應條件則是參考文獻(Portnoi *et al.*, 2006)：

Probe:

hbb640: 5'-GTAAGGAAATTAGTTTATGTCTTT\*(red640)T-3'

hbbFluo2: 5'-CAATGTCTGACTTAGTAACCTTTGGTCTTCTTGA-3'(fluo)

Primer:

hbbBw: 5'-TAAGCTCTTCAAAAAAAGCATCTA-3'

本計畫將使用 Roche LightCycler 2.0 之儀器並配合 Roche LightCycler

FastStart DNA MasterHybPROBE 之 DNA 定量 PCR 試劑進行。

2. Real-time PCR 之靈敏度 (sensitivity) 測試：

將鉤端螺旋體參考菌株 *Leptospira interrogans* Icterohaemorrhagiae (CF1) 及萊姆疏螺旋體參考菌株 *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* 以 Petroff-Hausser Counting Chamber 計算原始菌量，重複計數取其平均值，之後以正常人的血漿做 10 倍序列之稀釋至  $10^2$  bacteria/ml。10 倍序列稀釋後的菌液利用 QIAamp DNA mini kit 萃取 DNA，之後進行一系列即時 PCR 分析。利用電腦計算出該 DNA 各稀釋倍數所得之 Cp 值與其所代表之粗估細菌數的相關曲線，作為日後各 Cp 值定性與定量之參考標準。

3. Real-time PCR 之特異性 (specificity) 測試：利用非鉤端螺旋體、非萊姆疏螺旋體之菌株萃取之 DNA 進行。

## 八、鼠類體外節肢動物 *Rickettsia* 屬之立克次體分離培養及檢測

### (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 (Minimum Essential Medium 1X+ Earle's salts+ L-Glutamine) 外加 4% FBS (Fetal Bovine Serum) 及 1% Antibiotic (Penicillin 10,000 units/ml, Streptomycin 10 mg/ml, Amphotericin 0.025 mg/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% CO<sub>2</sub> 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  $5 \times 10^8$  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<sub>2</sub> 培養箱中培養一日以上。

### (三) 蟬研磨液接種 shell vial

1. 選取相同種類相同生活階段的蟬一或數隻為一個 pool，置於微量離心管中，微量離心管應保持低溫，以免蟬活動。將微量離心管 spin down，加入數滴優碘溶液(10% Povidone Iodine)消毒蟬體表，輕搖微量離心管，使蟬與優碘能均勻接觸。
2. 加入約 1cc PBS(Phosphate Buffer Solution)稀釋優碘，以 spin down 將蟬離心下來，吸取 PBS(注意不可將蟬吸起)，再加入 PBS 清洗，如此反覆數次，至洗過之 PBS 不帶顏色為止。
3. 每個微量離心管加入 50~100 μl MEM 培養液，以拋棄式研磨棒均勻研磨，磨碎後加入 MEM 補至 1.5cc。
4. 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。
5. 將 shell vial 於 32°C，700xg 離心一小時，使立克次體進入 L929 細胞。
6. 丟棄 shell vial 離心後的上清液，加入 1cc MEM 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 32°C 培養箱中進行培養。

### (四) 恙蟲研磨液接種 shell vial

1. 挑恙蟲：以針尖將鼠耳及石膏碳粉瓶內之恙蟲挑入裝有 1cc PBS 之微量離心管中，100 隻為一個 pool，微量離心管應保持低溫，以免恙蟲活動。

2. 將微量離心管以 13,500 轉離心離下恙蟲，去除 PBS 後，加入數滴優碘溶液消毒恙蟲體表，輕搖微量離心管，使恙蟲與優碘能均勻接觸。
3. 加入約 1cc PBS 稀釋優碘，以 13,500 轉將恙蟲離心下來，吸取 PBS(注意不可將恙蟲吸起)，再加入 PBS 清洗，如是反覆數次，至洗過之 PBS 不帶顏色為止。
4. 其餘步驟與四、(三)相同。

#### (五) *Rickettsia* 屬之立克次體 IFA test

1. 接種後之 L929 細胞株，於 32°C 培養箱中進行培養 8 日後，即可進行 IFA test。
2. 輕搖瓶身並略傾斜，以尖頭鑷取出玻片，細胞著生面朝上，置入甲醛中 10 分鐘進行固定。
3. 取出玻片，細胞著生面朝上置於濾紙或乾淨擦手紙上風乾。
4. 將 anti *Rickettsia* spp. 之 antibody 滴在 6 孔培養盤上，將風乾後的玻片反蓋在培養盤上，使 antibody 能均勻接觸到細胞著生面，注意各玻片保持距離避免污染。放入濕潤盒中，置於 37°C 處理 30 分鐘。
5. 以尖頭鑷小心取出玻片，細胞著生面朝上，置入 PBS+0.1%Tween 1st wash 七分鐘。
6. 以尖頭鑷小心取出玻片，細胞著生面朝上，置入 PBS+0.1%Tween 2nd wash 七分鐘。
7. 以尖頭鑷小心取出玻片，細胞著生面朝上，置入無菌水 wash 三分鐘。
8. 取出玻片，細胞著生面朝上置於濾紙或乾淨擦手紙上風乾。
9. 將標幟有螢光物質 (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) 的山羊抗鼠 IgG+A+M 血清 (FITC-goat anti-mouse IgG+A+M (H+L), Zymed Laboratories

Inc., USA)滴在培養盤上，將風乾後的玻片反蓋在容器上，使二抗能均勻接觸到細胞著生面，注意各玻片保持距離避免污染。放入濕潤盒中，置於 37 °C 處理 30 分鐘

10. 重複 5~8 步驟，盡量在陰暗場所操作。

11. 載玻片上滴少許甘油+PBS，細胞著生面朝下蓋在載玻片上，以 Leica DM2500 螢光顯微鏡檢視。

#### (六) *Rickettsia* 屬之立克次體 Gimenez stain

1. 接種後之 L929 細胞株，於 32°C 培養箱中進行培養 8 日後，即可進行 Gimenez stain。
2. 輕搖瓶身並略傾斜，以尖頭鑷取出玻片，細胞著生面朝上，置入甲醛中 10 分鐘進行固定。
3. 取出玻片，細胞著生面朝上置於濾紙或乾淨擦手紙上風乾。
4. 置入新鮮配置的 working solution (2 ml basic fuschin stock solution+5ml buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>))兩分鐘，取出後以無菌水清洗。
5. 以尖頭鑷夾取玻片置入 malachite green 九秒，立刻取出以無菌水清洗。
6. 重複步驟 5。
7. 取出玻片，細胞著生面朝上置於濾紙或乾淨擦手紙上風乾。
8. 載玻片上滴少許甘油+PBS，細胞著生面朝下蓋在載玻片上，以 Olympus BX50 亮視野顯微鏡檢視。

#### (七) *Rickettsia* 屬之立克次體 nested-PCR 檢測

1. 參考 Choi *et al.*(2005)之方法，並略加修正。以 QIAamp DNA Mini



Kit(QIAGEN)純化 DNA，不同檢體有不同前處理方式。

2. 前述蟬或恙蟲之研磨液 200  $\mu$ l 放入 1.5 ml 之 eppendorf tube，加入 200 $\mu$ l 的 Buffer AL，再加入 20  $\mu$ l proteinaseK，vortex 約 15 sec 後，置於 56°C 10 分鐘。稍微離心後，將附著於管壁上的 sample 集中，加入 200  $\mu$ l 的酒精(濃度 96-100%)。vortex 約 15 sec 後，稍微離心集中液體。
3. 其他鼠類體外節肢動物(厲蟎、跳蚤、蝨)以水脫去酒精後，單隻或數隻為一 pool 分別管置於 1.5 ml 微量離心管中，加入 180  $\mu$ l SPG buffer (3.0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Merck)，7.2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (Merck)，40 mM L-glutamic acid (Sigma) 及 218 mM sucrose (Sigma)，pH 7.0)，再加入 20  $\mu$ l proteinase K，以拋棄式研磨棒研磨，vortex 後置於 56°C 下，隔夜處理。稍微離心後，加入 200 $\mu$ l 的 Buffer AL，置於 70°C 10 分鐘，稍微離心後，將附著於管壁上的 sample 集中，加入 200  $\mu$ l 的酒精(濃度 96-100%)。vortex 約 15 sec 後，稍微離心集中液體。
4. 切下鼠類肝臟、腎臟組織約 25mg，脾臟組織約 10mg，加入 20  $\mu$ l proteinase K，再加入 180 $\mu$ l 的 Buffer ATL，置於 70°C 10 分鐘，稍微離心後，將附著於管壁上的 sample 集中，加入 200  $\mu$ l 的酒精(濃度 96-100%)。vortex 約 15 sec 後，稍微離心集中液體。
5. 所有前處理好的檢體個別置入 QIAamp spin coloum(in a 2 ml collection tube)，蓋上蓋子後以 8000 rpm 離心 1min，取下 QIAamp spin coloum，套入另一 collection tube 中，丟棄原 2 ml collection tube 及其中液體。
6. 小心打開蓋子，加入 500  $\mu$ l buffer AW1，蓋上蓋子後以 8000 rpm 離心 1min，取下 QIAamp spin coloum，套入另一 collection tube 中，丟棄原 2 ml

collection tube 及其中液體。

7. 小心打開蓋子，加入 500  $\mu\text{l}$  buffer AW2，蓋上蓋子後以 14000 rpm 離心 3 min，取下 QIAamp spin column，套入一 1.5 ml eppendorf tube 中，丟棄原 2 ml collection tube 及其中液體。
8. 小心打開蓋子，加入 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ，於  $70^\circ\text{C}$  中浸潤 5min，以 8000 rpm 離心 1min。此為 DNA 模板。
9. 偵測 *Rickettsia* 屬之立克次體的標的基因為 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)、citrate synthase (*gltA*)。
10. 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  $\mu\text{l}$  去離子水、10  $\mu\text{l}$  之 5X PCR buffer (Promega)、2  $\mu\text{l}$  之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200  $\mu\text{M}$ )、3  $\mu\text{l}$  之 25 mM  $\text{MgCl}_2$  (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、6  $\mu\text{l}$  之 3.3  $\mu\text{M}$  primer RpCS.877p：5'-GGGGGCCTGCTCACGGCGG-3' (購自 Mission Biotech) 及 primer RpCS.1258n：5'-AATGCAAAAAGTACAGTGAACA-3' (引子之終濃度為 400 nM)、3  $\mu\text{l}$  之 DNA 模板及 0.5  $\mu\text{l}$  酵素 Taq (Promega) (5 U/ $\mu\text{l}$ ) (終濃度為 2.5 U) 等之 PCR 反應液。PCR 反應流程為：先於  $95^\circ\text{C}$ ，預熱 5 min；再依序進行  $95^\circ\text{C}$  (15 s)/  $54^\circ\text{C}$  (15 s)/  $74^\circ\text{C}$  (30 s) 之循環，一共 35 循環；最後，於  $74^\circ\text{C}$  3 min 中止反應。第二次 PCR 反應液中引子更改為 3  $\mu\text{l}$  之 3.3  $\mu\text{M}$  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。

11. 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  $\mu$ l 去離子水、10  $\mu$ l 之 5X PCR buffer (Promega)、2  $\mu$ l 之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200  $\mu$ M)、3  $\mu$ l 之 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、6  $\mu$ l 之 3.3  $\mu$ M primer rompB OF : 5'-GTAACCGGAAGTAATCGTTTCGTAA-3' (購自 Mission Biotech) 及 primer rompB OR : 5'-GCTTTATAACCAGCTAAACCACC-3' (引子之終濃度為 400 nM)、3  $\mu$ l 之 DNA 模板及 0.5  $\mu$ l 酵素 Taq (Promega) (5 U/ $\mu$ 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  $\mu$ l 之 3.3  $\mu$ 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。
12. 取 10  $\mu$ 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。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。

## 九、*Rickettsia* 屬之立克次體選殖與定序

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。
2. 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。
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 1 $\mu$ l Salt solution (invitrogen, USA)，1 $\mu$ l 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 $\alpha$ -T1 Competent cell 中

1. 取 1.5cc 之 eppendorf，加入約 15 $\mu$ l 之 One shot chemically Competent *E.coli* (invitrogen, USA)，再加入 2 $\mu$ l 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

## 十、親緣樹狀圖演化分析

鈎端螺旋體將依 Ganoza *et al.* 發表之論文進行 nested-PCR 反應(Ganoza *et al.*, 2006; Palaniappan *et al.*, 2005)，以取得近乎全長的 16S-rRNA 基因片段。萊姆疏螺旋體依 Rijpkema *et al.* 發表之論文進行 nested-PCR 反應(Rijpkema *et al.*, 1995)，以取得的 5S-23S RNA 基因片段。*Rickettsia* 屬之立克次體以 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)及 citrate synthase(*gltA*)為基因標的。進行定序後不同的鈎端螺旋體序列、萊姆疏螺旋體序列及 *Rickettsia* 屬之立克次體序列、以 Bioedit Ver 7.0 進行編輯，再以 MEGA 4 執行親緣樹狀圖分析。

## 結果

### 一、連江縣、金門縣及澎湖縣老鼠感染鉤端螺旋體及斑點熱血清學調查

#### 1. 鉤端螺旋體調查部分：

本次完成 96 年 5 月至 97 年 8 月共計 5 次連江縣、金門縣及澎湖縣野鼠的調查，共計 347 隻老鼠。其中小黃腹鼠(*Rattus losea*) 220 隻，佔 63.4%，其次為錢鼠(*Suncus murinus*) 68 隻，佔 19.6%。老鼠血清分別以 12 種鉤端螺旋體菌進行 MAT 血清學檢測，其中小黃腹鼠 49.1% (108/220) 的鉤端螺旋體菌感染率最高，尤其在兩次金門縣調查小黃腹鼠的感染率平均高達 68.9% (102/148) (表二)。家鼯鼠雖有 50% (1/2) 感染率，但因只有兩隻，不具代表性。總體而言，連江縣捕獲老鼠鉤端螺旋體感染率 21.4% (9/42) (表一)，金門縣兩次感染率平均最高，65.3% (109/167) (表二)，澎湖縣最低，2.2% (3/138) (表三)。顯示不同地區野鼠鉤端螺旋體感染率不同，金門縣野鼠感染鉤端螺旋體情形最為嚴重。

#### 2. 斑點熱調查部分：

在 95 年至 97 年 8 次的調查中，連江縣、金門縣及澎湖縣捕獲鼠類 5 種共 525 隻，其中以小黃腹鼠(*Rattus losea*) 354 隻數量最多佔 67%，其次為錢鼠(*Suncus murinus*) 111 隻佔 21%。老鼠血清以 3 種立克次體抗原玻片(*Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia typhi*) 進行檢測，結果如表四、表五及表六。5 種鼠類中除錢鼠外皆對斑點熱立克次體(*R. rickettsii*, *R. conorii*) 有抗體反

應，同時抗 *R. rickettsii* 抗體陽性率皆大於或等於抗 *R. conorii* 抗體陽性率。除去捕獲數僅有一隻的溝鼠(*Rattus norvegicus*)外，小黃腹鼠為外島三縣中斑點熱抗體陽性率最高的鼠種，抗 *R. rickettsii* 抗體陽性率在 8 次的調查皆高於 80%，沒有季節性的差異，三縣中以澎湖縣最高 98.2%(55/56)，連江縣最低 81.8%(45/55)，顯示連江縣、金門縣及澎湖縣野外主要鼠種小黃腹鼠感染斑點熱立克次體情形非常嚴重。野外老鼠亦有感染地方性斑疹傷寒立克次體(*R. typhi*)的情形，其中亦以澎湖縣感染率最高，感染的鼠種也最多，除溝鼠感染率 100%(1/1)外，田鼯鼠(*Mus caroli*)為 19.23%(5/26)，連江縣、金門縣及澎湖縣鼠類平均血清地方性斑疹傷寒立克次體抗體陽性率分別為 1.83%(1/55)、2.53%(6/237)及 7.25%(10/138)。

## 二、連江縣、金門縣及澎湖縣老鼠內臟感染鈎端螺旋體、萊姆疏螺旋體及斑點熱立克次體檢測

### 1. 鈎端螺旋體部分：

- I. 建立 real-time PCR 偵測腎臟中是否帶有鈎端螺旋體菌。我們利用鈎端螺旋體 16S gene 及致病鈎端螺旋體菌 LipL32 gene 之核酸序列選出較適合偵測鈎端螺旋體菌之引子。將參考菌株以  $10^6 \sim 10^0$  reaction 作系列稀釋，16S gene 之 real-time PCR 測試範圍在 Ct 14~34，LipL32 在 Ct 18~37 (圖一、A 及 B)，顯示以 16S 為標的之敏感度較 LipL32 為高。

為模擬偵測腎臟中之鈎端螺旋體菌，將系列稀釋之參考菌株與未感

染之小白鼠腎臟組織混和，進行上述之 real-time PCR (圖一、C)，與只用參考菌株之結果一致(圖一、A 及 C)，因此以 16S 基因作為偵測鈎端螺旋體菌之標的。

- II. 以不同的菌株 *Bartonella henselae*、*Borrelia garinii*、*E. Coli 0157*、*Salmonella typhi*、*Staphylococcus aureus* 及 *Vibrio Cholera* 測試 16S real-time PCR 之特異性，如圖二，顯示 16S real-time PCR 具高度特異性。

偵測 96 年連江縣捕捉之野鼠，其腎臟中鈎端螺旋體帶菌率為 2.4%(表七)，為三縣最低；97 年 3 月及 8 月金門縣野鼠鈎端螺旋體帶菌率分別為 53.8% 及 35.1%，平均金門縣野鼠鈎端螺旋體帶菌率 45.5%，為三縣最高(表八)。96 年 3 月及 9 月澎湖縣野鼠鈎端螺旋體帶菌率分別為 5.2% 及 5.6%，平均 5.4%(表九)。顯示金門縣之野鼠成為鈎端螺旋體菌傳染窩(reservoir)的可能性遠高於連江縣及澎湖縣。

## 2. 萊姆疏螺旋體部份：

- I. 建立 real-time PCR 偵測耳朵中是否帶有萊姆疏螺旋體菌。我們參考 Portnoi et al.之文獻以萊姆疏螺旋體菌 hbb gene 核酸序列為偵測萊姆疏螺旋體菌之引子。將參考菌株以  $10^6 \sim 10^1$ / reaction 作系列稀釋，hbb gene 之 real-time PCR 測試範圍在 Ct 22~44 (圖三、A)。
- II. 以不同的菌株 *Bartonella henselae*、*Borrelia garinii*、*E. Coli 0157*、*Salmonella typhi*、*Staphylococcus aureus* 及 *Vibrio Cholera* 測試 hbb



real-time PCR 之特異性，如圖三、B，顯示 hbb real-time PCR 具高度特異性。

所有捕捉之野鼠耳朵檢體，均無偵測出萊姆疏螺旋體菌。

### 3. 斑點熱部分：

為探究老鼠本身是否帶有斑點熱立克次體，在各採集地點選取不同鼠種及對 *R. rickettsii* 有或無抗體反應的 30 隻鼠類取其脾臟、肝臟及腎臟，以 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*) 及 citrate synthase(*glcA*) 為基因標的，進行 nested-PCR 檢測。結果如表十至表十二，連江縣、金門縣及澎湖縣所選取的老鼠平均抗 *R. rickettsii* 之抗體陽性率分別為 80%、90% 及 63%，而三縣老鼠脾肝腎臟中平均偵測出斑點熱立克次體的比例為 70%、70% 及 43%。連江縣鼠類腎臟的感染率較高，金門縣鼠類脾臟的感染率較高，澎湖縣則較無差異。值得注意的是錢鼠雖未檢測出抗體，但脾肝腎臟卻有 33-40% 感染率。顯示小黃腹鼠、田鼯鼠及錢鼠皆有成為斑點熱立克次體傳染窩(reservoir)的可能性。

### 三、連江縣、金門縣及澎湖縣老鼠體外節肢動物萊姆疏螺旋體菌檢測

萊姆疏螺旋體菌大多於節肢動物硬蜱 (*Ixodes*) 之 mid-gut 中存活。本實驗利用 hbb gene 為標的之 real-time PCR 偵測連江縣、金門縣及澎湖縣老鼠體外捕捉之蜱類是否帶有萊姆疏螺旋體菌。96 年 3 月及 7 月連江縣 24 隻粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)，分別有 45.5% 及 7.7% 帶

菌率(表十三)；95年6月、97年3月及8月金門縣41隻粒形硬蜱，分別有50%、55%及0%(0/1)帶菌率(表十四)。96年5月澎湖縣2隻粒形硬蜱，帶菌率為0%(表十五)。95年6月金門縣41隻鑷形扇頭蜱(*Rhipicephalus haemaphysaloides*)、及2隻台灣血蜱(*Haemaphysalis formosensis*)，帶菌率均為0%。97年8月金門縣尚捕獲36隻鑷形扇頭蜱，帶菌率亦為0%。在連江縣及金門縣粒形硬蜱中偵測到萊姆疏螺旋體菌，顯示粒形硬蜱可能在台灣為萊姆疏螺旋體菌之媒介，而澎湖縣粒形硬蜱是否帶有萊姆疏螺旋體菌，因樣本數目不足(只有2隻)，無法判斷。

#### 四、連江縣、金門縣及澎湖縣老鼠體外節肢動物斑點熱立克次體檢測

老鼠是透過何種管道感染斑點熱立克次體，由其體外節肢動物以 *OmpB* 及 *gltA* 為基因標的，進行 nested-PCR 檢測來瞭解。連江縣檢測 32 隻粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)，有 21.9% PCR 陽性(表十六)；金門縣檢測 108 隻鑷形扇頭蜱 (*Rhipicephalus haemaphysaloides*)、40 隻粒形硬蜱及 2 隻台灣血蜱(*Haemaphysalis formosensis*)，PCR 陽性率分別為 50%、10%及 0(表十七)；澎湖縣檢測 2 隻粒形硬蜱，有 50% PCR 陽性(表十八)，顯示粒形硬蜱及鑷形扇頭蜱可能為病媒。

恙蟲亦帶有斑點熱立克次體，以 100 隻恙蟲為 1 池(pool)，96 年 3 月及 96 年 7 月於連江縣採獲之蒼白恙蟎(*Leptotrombidium pallidum*)及地里恙蟎(*Leptotrombidium deliense*) PCR 陽性率分別

為 70%及 20%;95 年 6 月及 96 年 1 月於金門縣採獲之地里恙蟎及小板恙蟎(*Leptotrombidium scutellare*) PCR 陽性率分別為 13%及 15%;96 年 5 月及 96 年 9 月於澎湖縣採獲之地里恙蟎 PCR 陽性率分別為 34%及 3%(表十九至表二十一)。

優勝病蚤(*Nosopsyllus nicanus*)為連江縣、金門縣及澎湖縣野鼠常見跳蚤,分別檢測 10 隻、10 隻及 7 隻 PCR 陽性率分別為 80%、10% 及 14%(表二十二至表二十四)。

厲蟎(*Laelaps spp.*)為台灣地區常見鼠類寄生蟎類,連江縣、金門縣及澎湖縣分別選取 50 隻檢測,陽性率分別為 70%、40%及 10%(表二十五至表二十七)。

合計外島三縣鼠類外寄生節肢動物斑點熱立克次體感染情形,鐮形扇頭蜱、粒形硬蜱、地里恙蟎、小板恙蟎、蒼白恙蟎、優勝病蚤及厲蟎 PCR 的陽性率分別為 41.7%、14.9%、15.2%、15.0%、70.0%、37.0%及 40.0%,顯示斑點熱立克次體透過這些野鼠體外節肢動物在鼠類間循環,甚至可能傳給人類。

##### 五、 鈎端螺旋體菌、萊姆疏螺旋體菌及斑點熱立克次體分離培養

為瞭解台灣地區鈎端螺旋體菌、萊姆疏螺旋體菌、斑點熱立克次體菌種及不同地理菌株,將捕捉野鼠之鼠腎及鼠耳分別進行鈎端螺旋體菌及萊姆疏螺旋體菌之分離培養。外寄生節肢動物方面,部分採獲

之蟬進行萊姆疏螺旋體菌之分離培養；部份採獲之蟬及恙蟲進行斑點熱立克次體 Shell vial 細胞分離培養。蟬為單隻研磨接種，恙蟲則為 100 隻為一池(pool)研磨接種。

1. 鈎端螺旋體菌部分：共計連江縣 42 個鼠腎檢體、金門縣 167 個、澎湖縣 130 個。經 12 週培養後，只有金門縣鼠腎檢體培養出鈎端螺旋體菌 10 株。經序列分析顯示均為致病性鈎端螺旋體菌 (pathogenic *Leptospira*)，大致隸屬 *Leptospira interrogans* 與 *Leptospira borgpetersenii* 兩群；3 株近似於 *Leptospira interrogans*，7 株與 *Leptospira borgpetersenii* 相近。

2. 萊姆疏螺旋體菌部分：所有鼠耳檢體，經 4 週培養後，並無培養出萊姆疏螺旋體菌。

3. 斑點熱立克次體部分：共計連江縣接種蟬 10 隻、恙蟲 50 池；金門縣接種蟬 47 隻、恙蟲 56 池；澎湖縣接種蟬 3 隻、恙蟲 62 池，經約 2 週培養後以 nested PCR 檢測，連江縣計培養出 9 株，序列分析 6 株接近於 *R. australis*，2 株接近於 *R. conorii*，1 株接近於 *R. japonica*；金門縣計培養出 4 株，序列分析 2 株接近於 *R. rickettsii*，1 株接近於 *R. conorii*，1 株接近於 *R. felis*；澎湖縣計培養出 4 株，序列分析 3 株接近於 *Rickettsia* sp. TwKM01，1 株接近於 *R. conorii*。

#### 六、連江縣、金門縣及澎湖縣鈎端螺旋體菌、斑點熱立克次體菌株親緣關係分析

### 1. 鈎端螺旋體菌株親緣關係分析:

以 nested PCR 增幅 84 個 real-time PCR 陽性鼠腎檢體之 16S 基因片段，進行菌株親緣關係分析。共有 60 個檢體成功定序，均隸屬致病性 *Leptospira*，大致分成兩群：*Leptospira interrogans* 與 *Leptospira borgpetersenii*。30 株近似 *Leptospira interrogans* 均來自金門縣；連江縣 1 株(MK91)、澎湖縣 6 株(96MK7、96MK8、96MK15、MK145、MK149 及 MK150)及金門縣 23 株近似 *Leptospira borgpetersenii*(圖四)。

### 2. 萊姆疏螺旋體菌株親緣關係分析:

以 nested PCR 增幅 27 個 real-time PCR 陽性硬蜱檢體之 5S-23S 基因片段，進行菌株親緣關係分析。共有 23 個檢體成功定序，17 個為金門縣硬蜱，7 個為連江縣硬蜱，均隸屬 *Borrelia valaisiana* (圖五)。

### 3. 斑點熱立克次體菌株親緣關係分析:

老鼠內臟組織、外寄生節肢動物及細胞分離培養液以 *OmpB* 及 *gltA* 為基因標的，進行 nested-PCR 檢測。PCR 產物定序後，以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 4.0 操作，採用 Neighbor-joining 方法，重覆計算(Bootstrap) 1,000 次，與重要的立克次體參考菌株一起進行親緣關係分析。連江縣計有 47 個菌株進行 *OmpB* 基因片段序列分析，結果可分為 5 群，分別為近似 *R. conorii*、近似 *Rickettsia* sp. IG-1、近似 *R. rickettsii*、近似 *R. australis* 及近似 *R. felis*，其中以近似 *R. conorii* 最多(圖六)。連江縣有 56 個菌株進行 *gltA*

基因片段序列分析，結果亦分為5群，除近似 *R. rickettsii*、近似 *R. conorii* 及近似 *R. australis* 與 *OmpB* 相同外，另有近似 *R. japonica* 及近似 *R. felis*，其中以近似 *R. rickettsii* 數量較多(圖七)。

金門縣計有 22 個菌株進行 *OmpB* 基因片段序列分析，結果可分為 5 群，分別為近似 *R. rickettsii*、近似 *R. conorii*、近似 *Rickettsia* sp.TwKM01、近似 *R. felis* 及近似 *R. australis*，其中以近似 *Rickettsia* sp.TwKM01 最多(圖八)。金門縣有 36 個菌株進行 *gltA* 基因片段序列分析，結果可分為 6 群除近似 *R. conorii*、近似 *R. rickettsii*、近似 *Rickettsia* sp.TwKM01、近似 *R. australis* 及近似 *R. felis* 4 群與 *OmpB* 相同外，另尚有近似 *R. typhi*，其中以近似 *R. rickettsii* 最多(圖九)。

澎湖縣計有 14 個菌株進行 *OmpB* 基因片段序列分析，結果可分為 6 群，分別為近似 *R. rickettsii*、近似 *Rickettsia* sp. IG-1、近似 *R. conorii*、近似 *Rickettsia* sp.TwKM01、近似 *R. felis* 及近似 *R. australis*，其中以近似 *Rickettsia* sp.TwKM01 最多(圖十)。澎湖縣有 26 個菌株進行 *gltA* 基因片段序列分析，結果可分為 6 群除近似 *R. conorii*、近似 *Rickettsia* sp. IG-1、近似 *R. rickettsii* 及近似 *R. felis* 4 群與 *OmpB* 相同外，另尚有近似 *R. japonica* 及近似 *R. typhi*，其中以近似 *R. rickettsii* 最多(圖十一)。

#### 六、 台北市環南市場鼠類感染鉤端螺旋體菌、疏螺旋體菌及斑點熱立克次體調查

96 年 8 月至 97 年 10 月捕獲自台北市環南市場鼠類，計 22 隻錢鼠，

8 隻溝鼠。

1. 鈎端螺旋體菌偵測:

環南市場錢鼠與溝鼠鈎端螺旋體感染率分別為 72.7% (16/22)及 50% (4/8)。錢鼠與溝鼠鈎端螺旋體帶菌率分別為 0% 及 37.5% (3/8)，其中 3 個陽性檢體中有 2 個成功定序 (97Lepm107, 97Lepm117)。另外從 96 年 8 月之溝鼠腎臟分離培養出一株致病性鈎端螺旋體菌。此 3 筆定序資料，經親緣數狀圖分析後均隸屬致病性 *Leptospira*，2 個近似 *Leptospira interrogans*，1 個近似 *Leptospira borgpetersenii* (圖四)。

2. 斑點熱立克次體調查：

檢測 96 年 8 月至 97 年 11 月捕獲自台北市環南市場鼠類感染斑點熱情形，計 22 隻錢鼠，8 隻溝鼠，結果斑點熱立克次體抗體陽性率錢鼠與溝鼠分別為 4.54%(1/22)及 75%(6/8)，平均斑點熱立克次體抗體陽性率為 23.33% (7/30)。相較於連江縣及金門縣野鼠，抗體陽性率較低，同時並未發現地方性斑疹傷寒立克次體(*R. typhi*)感染。

## 討論

本次實驗分離出 10 株鉤端螺旋體菌，基因型別隸屬 *Leptospira interrogans* 與 *Leptospira borgpetersenii* 兩群系，未來將送至澳洲 WHO 參考實驗室作進一步血清型別分析，將其加入臨床 MAT 檢驗之菌株 pannel 中，以期能更正確進行台灣鉤端螺旋體之血清流行病學分析。

本年度監測萊姆疏螺旋體結果顯示台灣地區的確有粒形硬蜱可作為萊姆疏螺旋體菌之媒介，此為第一次在台灣粒形硬蜱發現萊姆疏螺旋體菌蹤跡。但是目前對於 *Borrelia valaisiana* 是否具致病性而導致萊姆病的發生仍不清楚。因此台灣是否有萊姆病傳播仍需持續觀察與監測。

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原檢測，卻仍無法診斷出病原體，這些病例中有沒有可能是斑點熱患者，是本研究想要探討的問題。斑點熱立克次體病為全球性分布之節肢動物所媒介的重要傳染病，目前已報告該病發生的國家及地區高達 50 餘個，包括洛磯山斑點熱、蒲東熱、肯亞蜱熱、昆士蘭蜱熱、立克次體痘、日本斑點熱、北亞蜱熱、澳洲斑點熱、非洲蜱咬熱及蚤媒斑點熱等(Parola *et al.*, 2005)。斑點熱立克次體病的宿主動物主要以野生小型哺乳動物為主，包括齧齒目、食蟲目、兔形目及部份鳥類。另外，部份家畜如牛、羊、兔、駱駝等也可能做為宿主動物，本研究首先即檢測野鼠之斑點熱立克次體抗體陽性率。由表四至表六的結果顯示連江縣、金門縣及澎湖縣野外主要鼠種小黃腹鼠抗 *R. rickettsii*



之抗體陽性率在 8 次調查中皆超過 80%，96 年 1 月在金門及 96 年 5 月在澎湖甚至為 100%，此項結果與陳(1997)在金門地區調查小黃腹鼠抗 *R. rickettsii* 之抗體陽性率為 85.2%(46/54)比較，顯示小黃腹鼠感染斑點熱立克次體情形更形嚴重。外島三縣鼠類平均抗 *R. rickettsii* 之抗體陽性率為 72.16%(350/485)，相較於亞洲其他國家日本鼠類平均抗 *R. japonica* 之抗體陽性率為 75%(539/716)，泰國鼠類平均抗 *R. sibirica* TT-118 之抗體陽性率為 62.2%(Ishikura *et al.*, 1992, Okabayashi *et al.*, 1996)，此兩國家皆有斑點熱病例，因此台灣極有可能也存在。

斑點熱立克次體為一群經節肢動物叮咬傳播的絕對細胞內寄生菌，在野生動物與節肢動物間循環，有著疫源性的特徵，因此必需以當地流行的菌株為抗原進行免疫螢光染色，才能得到正確的感染情形，如日本的 *R. japonica* 及泰國的 *R. sibirica* TT-118。但台灣目前並無斑點熱確定病例，唯一一篇人群盛行率調查報告為 Takada *et al.*(1994)在台南的調查為 3.5-4.4%，是以 *R. japonica* 及 *R. sibirica* 為抗原。斑點熱立克次體的菌株雖然很多，但目前商品化的斑點熱立克次體 IFA 抗原玻片之菌株僅有 *R. rickettsii* 及 *R. conorii*，依 Fang and Raoult (2003)報告，12 株 *Rickettsia* 屬立克次體經由 BALB/c 老鼠產生之多株抗體，可對 *R. rickettsii* 抗原玻片產生螢光反應，其效價分別為 *R. felis* (1:512), *R. rickettsii* (1:4,096), *R. australis* (1:512), *R. montanensis* (1:256), *R. honei* (1:1,024), *R. japonica* (1:256), *R. typhi* (1:64), *R. canadensis* (1:64), *R. massiliae* (1:128), *R. belli* (1:64), *R. conorii* (1:128)及 *R. akari* (1:1,028)；另 5 株 *Rickettsia* 屬立克次體經由 BALB/c 老鼠產生之多株抗體，可對 *R. conorii* 抗原玻片產生螢光

反應，其效價分別為 *R. rickettsii* (1:512), *R. honei* (1:512), *R. japonica* (1:64), *R. massiliae* (1:256) 及 *R. conorii* (1:4,096)。此報告顯示 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 抗原玻片易與其他 *Rickettsia* 屬立克次體產生之抗體發生交互作用，同時 *R. rickettsii* 與其他 *Rickettsia* 屬立克次體產生之抗體發生交互作用的比率較 *R. conorii* 高，從本研究中也得到相同結果。不過在全部檢測的鼠類血清檢體中，*R. rickettsii* 及 *R. conorii* 重覆感染的比率為 58.14%(282/485)，*R. rickettsii* 及 *R. conorii* 單獨感染的比率分別為 15.67%(76/485) 及 1.24%(6/485)，顯示雖然此二抗原對其他 *Rickettsia* 屬立克次體產生之抗體有很高的比率發生交互作用，但其對於台灣地區 *Rickettsia* 屬立克次體的涵蓋率仍有待分離出台灣地區之斑點熱立克次體才得以驗證。

鼠類能否成為斑點熱立克次體的宿主端視其體內能否保存、增殖此病原體，本研究由檢測鼠類主要器官脾、肝及腎臟著手。結果發現所檢測的鼠種小黃腹鼠、田鼯鼠及錢鼠其內臟皆檢測出斑點熱立克次體，且老鼠抗 *R. rickettsii* 之抗體陽性率與其內臟以 PCR 檢測出斑點熱立克次體有某種程度的相關性。另在連江縣及金門縣若老鼠血清抗 *R. rickettsii* 陽性，則有 67% 肝、脾、腎臟可檢測出斑點熱立克次體，而澎湖縣則只有 40%，此是否因不同地區斑點熱立克次體之特性，則尚待進一步研究。中國大陸在黑龍江、內蒙古、新疆、浙江及貴州檢測 20 種 473 隻鼠類，結果有 12 種 69 隻鼠類在脾臟檢測出斑點熱立克次體，陽性率為 14.6%，5 個地區陽性率分別為 3.1%、21.6%、30.0%、10.8% 及 21.4%(黃等，2006)，外島三縣的鼠類內臟檢出率相較下較高可能與使用 nested-PCR 檢測較靈

敏有關。

錢鼠雖未檢測出斑點熱立克次體抗體，但脾肝腎臟卻有 33-40% 感染率，顯示錢鼠抗體陽性率有低估的可能。錢鼠為食蟲目(Insectivora)動物，其他老鼠為齧齒目(Rodentia)動物，目前市售標幟有螢光物質 FITC 的抗血清並沒有抗食蟲目動物，以抗大鼠(rat)或小鼠(mouse)取代往往會質疑其偽陰性，雖然王等(2004)在檢測鼠類恙蟲病抗體陽性率時，以山羊抗小鼠 FITC 為二次抗體，可檢測出錢鼠血清陽性反應，本研究在檢測台北市環南市場錢鼠亦檢測出血清陽性反應，但仍需更可靠的方法解決此問題。

斑點熱立克次體是由節肢動物所傳播，外島三縣鼠類有如此高的斑點熱立克次體抗體陽性率應與其體外寄生之節肢動物(蝨、蟬、蚤、蟲)有關，由表十九至表二十七的結果也證實此點。連江縣、金門縣及澎湖縣除檢測數量較少的台灣血蟬(*H. formosensis*)及塞氏厲蝨(*Laelaps sedlaceki*)外，其他外寄生節肢動物如粒形硬蟬(*I. granulatus*)、鐮形扇頭蟬(*R. haemaphysaloides*)、蒼白恙蝨(*L. pallidum*)、地里恙蝨(*L. deliense*)、小板恙蝨(*L. scutellare*)、優勝病蚤(*N. nicanus*)、納氏厲蝨(*Laelaps nuttalli*)及毒厲蝨(*Laelaps echidninus*)皆檢測出斑點熱立克次體。目前文獻中檢測出攜帶斑點熱立克次體的節肢動物種類為數眾多且具有地域性，其中多數為蟬，如日本已知有 9 種蟬檢測出斑點熱立克次體，包括褐黃血蟬(*Haemophysalis flava*)、豪豬血蟬(*H. hystericis*)、龜形花蟬(*Amblyomma testudinarium*)、長角血蟬(*H. longicornis*)、卵形硬蟬(*I. ovatus*)、具角血蟬(*H. cornigera*)、台灣革蟬(*Dermacentor taiwanensis*)、全溝硬蟬(*I. persulcatus*)及單刺硬蟬 *I. monospinosus*(Mahara, 2006)。而中國大陸已知

至少有 14 種蜱檢測出斑點熱立克次體，包括草原革蜱(*D. nuttallii*)、邊緣革蜱(*D. marginatus*)、森林革蜱(*D. silvarum*)、銀盾革蜱(*D. niveus*)、中華革蜱(*D. sinicus*)、金澤革蜱(*D. auratus*)、嗜群血蜱(*H. concinna*)、日本血蜱(*H. japonica*)、長角血蜱(*H. longicornis*)、越原血蜱(*H. yeni*)、徽上血蜱(*H. wellingtoni*)、亞東璃眼蜱(*Haylomma asiaticum*)、粒形硬蜱(*I. granulatus*)及微小牛蜱(*Boophilus microplus*)(張，1999)。台灣在文獻記載有 32 種蜱，除本研究發現粒形硬蜱及鐮形扇頭蜱外應有可能在其他蜱種帶有斑點熱立克次體。

恙蟎為恙蟲病之媒介，雖然 Choi *et al.*(2007)已發現在韓國恙蟎攜帶有斑點熱立克次體但未區分恙蟲種類，本研究發現在連江縣、金門縣及澎湖縣 3 種恙蟎蒼白恙蟎、地里恙蟎及小板恙蟎皆帶有斑點熱立克次體，由於恙蟎在外島三縣數量多、且發生時間長，可能為斑點熱立克次體在鼠類間傳播的最主要媒介。而優勝病蚤、納氏厲蟎及毒厲蟎，這些在台灣野鼠常見的跳蚤與厲蟎皆為首次發現斑點熱立克次體的存在。上述這些老鼠體外節肢動物在鼠與鼠間傳播斑點熱立克次體扮有重要角色，至於能否傳給人成為病媒，尚待進一步研究。

全世界目前發現的斑點熱立克次體菌株已超過 50 種，其中已知的致病株有 15 種，如 *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. australis*, *R. akari*, *R. japonica*, *R. sibirica*, *R. honei*, *R. africae*, *R. slovac*, *R. heilongjiangensis*, *R. aeschlimannii*, *R. parkeri*, *R. massiliae*, *R. marmionii* 及 *felis*，除此之外更有為數眾多的菌株尚未發現其致病性且數量持續在增加中(Parola *et al.*, 2005)。由 Parola *et al.*(2005)報告中可發現，斑點熱立克次體的研究多偏

限在歐洲、非洲、北美洲、美亞及東亞，因此發現的菌株也以這些地區較多，如日本有 3 個菌株 *Rickettsia japonica*, *R. tamurae* 及 *R. asiatica*(Uchida *et al.*, 1992 ; Fournier *et al.*, 2006 ; Fujita *et al.*, 2006) ; 中國大陸有 4 個菌株 *R. sibirica*, *R. heilongjiangii*, *R. mongolotimonae* 及 *R. hulunii*(Zhang *et al.*, 2000) , 而東南亞及澳洲近年來則於泰國及澳洲發現 *R. honei* ; 於澳洲發現 *R. australis*(Kollars, Tippayachai and Bodhidatta, 2001 ; Stenos *et al.*, 1998 ; Stewart, 1991) 。台灣在這方面的研究尚在起步，Tsui *et al.*(2007)報告於鐮形扇頭蜱發現 *Rickettsia* sp. TwKM01 ; 於地里恙蟎發現 *Rickettsia* sp. TwKM02 ; 於地里恙蟎、粒形硬蜱及中氣門亞目節肢動物發現 *Rickettsia* sp. TwKM03，此 3 株斑點熱立克次體的致病性尚不清楚。

連江縣、金門縣及澎湖縣老鼠內臟組織、外寄生節肢動物及細胞分離培養液以 *OmpB* 及 *gltA* 部份序列為基因標的，與重要的立克次體參考菌株一起進行親緣關係分析。結果由親緣關係樹的分枝，與重要的立克次體參考菌株的相似度可將外島三縣所檢測到的 201 個菌株可分為 8 群 (group) : 近似 *R. rickettsii*(相似度 98.2-100%)、近似 *R. conorii*(相似度 98.1-100%)、近似 *R. felis*(相似度 98.9-100%)、近似 *R. australis*(相似度 82.7-98.6%)、近似 *Rickettsia* sp. IG-1(相似度 98.9-100%)、近似 *R. typhi*(相似度 70.3-100%)、近似 *Rickettsia* sp. TwKM01(相似度 98.4-100%)及近似 *R. japonica*(相似度 98.6-98.9%)。其中近似 *R. rickettsii* 及近似 *R. conorii* group 出現的機率最高，在 6 個親緣關係分析中皆出現，其次為近似 *R. felis* 及近似 *R. australis* group 出現於 5 個親緣關係分析中。而所有 201 個菌株

中有 57 個菌株為近似 *R. conorii*(28.35%)；54 個菌株為近似 *R. rickettsii* (26.87%)，其他如 *R. felis*、*R. australis*、*R. typhi* 及 *R. japonica* 都是 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 抗原玻片可以產生交互作用的菌株，此或許可以解釋為何連江縣、金門縣及澎湖縣鼠類血清抗 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 的陽性率如此的高。不過近似不代表相同，尤其是近似 *R. australis*，有些菌株相似度較低，很可能為新的菌株。另外 *R. rickettsii*、*R. conorii* 及 *R. felis* 都是致病株，有些菌株在 *OmpB* 及 *gltA* 部份序列的比對為與 *R. rickettsii*、*R. conorii* 及 *R. felis*100%相同，是否確實有這些致病株在鼠類及其外寄生節肢動物散佈，都值得進一步研究。

由斑點熱立克次體在不同外寄生節肢動物及內臟組織之分佈亦有一些新的發現，如表二十八顯示恙蟎、粒形硬蜱、鐮形扇頭蜱、優勝病蚤、厲蟎及鼠類脾肝腎臟皆可檢測出近似 *R. rickettsii* 及近似 *R. conorii* 菌株，而近似 *R. felis*、近似 *Rickettsia* sp. IG-1 及近似 *R. typhi* 的菌株也在鼠類脾肝腎臟發現，但近似 *R. australis* 及近似 *Rickettsia* sp. TwKM01 並未在鼠類脾肝腎臟發現，尤其 33 個(97%)近似 *R. australis* 菌株只出現在恙蟎，似乎顯示此類菌株較不具致病性。Choi *et al.*(2007)在韓國恙蟎發現的斑點熱立克次體多數也近似 *R. australis*，顯示恙蟎中有一群共生的斑點熱立克次體。

## 結論與建議

1. 以 MAT 檢測離島野鼠血清之鈎端螺旋體抗體，總抗體陽性率為( )，其中金門縣野鼠高於連江及澎湖二縣。野鼠腎臟檢體之核酸偵測金門縣野鼠平均 45% 鈎端螺旋體帶菌率遠高於連江縣及澎湖縣之 2% 及 5%。基因序列分析 60 個成功定序之檢體，顯示均隸屬致病性 *Leptospira*，因此鈎端螺旋體在金門縣野鼠之高盛行率造成金門縣野鼠成為鈎端螺旋體菌傳染窩 (reservoir) 的可能性遠高於連江縣及澎湖縣。
2. 粒形硬蜱為萊姆疏螺旋體菌之媒介，偵測連江及金門縣捕捉之粒形硬蜱中有 25% 及 50% 的萊姆疏螺旋體菌帶菌率，經基因序列分析顯示與 *Borrelia valaisiana* 屬同一群系，此結果亦與 Dr. Mazusawa 從台灣野鼠分離出之萊姆疏螺旋體菌十分相近。
3. 小黃腹鼠為連江縣、金門縣及澎湖縣斑點熱抗體陽性率最高的鼠種，抗 *R. rickettsii* 抗體陽性率在 8 次的調查皆高於 80%，沒有季節性的差異，三縣中以澎湖縣最高 98.2%，連江縣最低 81.8%，顯示連江縣、金門縣及澎湖縣野外主要鼠種小黃腹鼠感染斑點熱立克次體情形非常嚴重。
4. 外島三縣野外老鼠亦有感染地方性斑疹傷寒立克次體(*R. typhi*)的情形，其中亦以澎湖縣感染率最高，感染的鼠種也最多，除溝鼠感染率 100%外，田鼯鼠為 19.23%，連江縣、金門縣及澎湖縣鼠類平均血清地方性斑疹傷寒立克次體抗體陽性率分別為 1.83%、2.53%及 7.25%。
5. 連江縣、金門縣及澎湖縣所選取的老鼠平均抗 *R. rickettsii* 之抗體陽性率分

別為 80%、90%及 63%，而三縣老鼠脾肝腎臟中平均偵測出斑點熱立克次體的比例為 70%、70%及 43%。連江縣鼠類腎臟的感染率較高，金門縣鼠類脾臟的感染率較高，澎湖縣則較無差異。顯示小黃腹鼠、田鼯鼠及錢鼠皆有成為斑點熱立克次體傳染窩(reservoir)的可能性。

6. 連江縣、金門縣及澎湖縣除檢測數量較少的台灣血蜱及塞氏厲蝨外，其他外寄生節肢動物如粒形硬蜱、鐮形扇頭蜱、蒼白恙蝨、地里恙蝨、小板恙蝨、優勝病蚤、納氏厲蝨及毒厲蝨皆檢測出斑點熱立克次體，雖能否傳播給人尚待研究，但應在鼠類間傳播斑點熱立克次體扮演重要角色。
7. 已培養出斑點熱立克次體 17 菌株，序列分析 6 株接近於 *R. australis*，4 株接近於 *R. conorii*，3 株接近於 *Rickettsia* sp. TwKM01，1 株接近於 *R. japonica*，2 株接近於 *R. rickettsii*，1 株接近於 *R. felis*。
8. 連江縣、金門縣及澎湖縣老鼠內臟組織、外寄生節肢動物及細胞分離培養液以 *OmpB* 及 *gltA* 部份序列為基因標的，與重要的立克次體參考菌株一起進行親緣關係分析。結果由所檢測到的 201 個菌株可分為 8 群(group)，其中以近似 *R. rickettsii* 及近似 *R. conorii* group 出現的機率最高。所有 201 個菌株中有 57 個菌株為近似 *R. conorii*(28.35%); 54 個菌株為近似 *R. rickettsii* (26.87%)。
9. 台北市環南市場鼠類感染斑點熱情形，結果斑點熱立克次體抗體陽性率錢鼠與溝鼠分別為 4.54%(1/22)及 75%(6/8)，平均斑點熱立克次體抗體陽性率為 23.33% (7/30)。



### 計畫重要研究成果及具體建議

1. 本年度在金門縣捕捉之野鼠分離出鉤端螺旋體菌，可將其運用至臨床檢驗，增加檢出率。
2. 連江縣、金門縣及澎湖縣野鼠身上檢測出抗 *R. rickettsii* 抗體陽性率非常高，平均達 72.16%，同時鼠體外寄生之節肢動物如恙蟎、蜱、跳蚤及厲蟎皆檢測出斑點熱立克次體，而老鼠脾肝腎臟亦檢出斑點熱立克次體，顯示斑點熱立克次體確實存在於外島三縣的鼠類及其體外寄生之節肢動物，因此應提醒醫師注意患者是否有斑點熱的相關症狀如發熱、畏寒、丘疹及焦痂等，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。
3. 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，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。
4. 本研究在台灣硬蜱偵測到萊姆疏螺旋體菌，此為第一次發現。顯示萊姆疏螺旋體菌可透過這些野鼠體外節肢動物在鼠類間循環，甚至可能傳給人類。
5. 文獻中尚未發現優勝病蚤、納氏厲蟎及毒厲蟎帶有斑點熱立克次體，本研究為首次發現。
6. 斑點熱必需以當地流行的菌株為抗原進行免疫螢光染色，才能得到正確的感染情形，本研究從 60 隻硬蜱及 168 池恙蟎中培養出 17 個菌株，未來仍需努力釐清這些菌株的特性，以便在例行的檢驗中做出貢獻。

## 參考文獻

- Amman B. R., 2007. Pet rodents and fatal lymphocytic choriomeningitis in transplant patients. *Emerg Infect Dis.* 13(5):719-25.
- Baker, A. S. 1999. Mites and ticks of domestic animals. The Stationery Office, London. pp. 240.
- Brandling-Bennett, A.D., and F. Pinheiro (1996). diseases in Latin America and the Caribbean: are they really emerging and increasing? *Emerg Infect Dis* 2, 59-61.
- CDC.1998 (1998). Update: leptospirosis and unexplained acute febrile illness among athletes participating in triathlons--Illinois and Wisconsin, 1998. *Mmwr* 47, 673-676.
- Brouqui, P., P. Parola, P. E. Fournier and D. Raoult. 2007. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49: 2-12.
- CDC, 2005. Interim guidance for minimizing risk for human lymphocytic choriomeningitis virus infection associated with rodents. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 5;54(30):747-9.
- Chaudhry, R., Premlatha, M.M., Mohanty, S., Dhawan, B., Singh, K.K., and Dey, A.B. (2002). Emerging leptospirosis, North India. *Emerging infectious diseases* 8, 1526-1527.
- Choi, Y. J., W. J. Jang, J. H. Kim, J. S. Ryu, S. H. Lee, K. H. Yark, H. S. Paik, Y. S. Koh, M. S. Choi, and I. S. Kim. 2005. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 11(2): 237-244.
- Choi, Y. J., E. M. Lee, J. M. Park, K. M. Lee, S. H. Han, J. K. Kim, S. H. Lee, H. J. Song, M. S. Choi, I. S. Kim, K. H. Park and W. J. Jang. 2007. Molecular detection of various rickettsiae in mites (Acari: Trombiculidae) in Southern Jeolla Province Korea. *Microbiol. Immunol.* 51(3): 307-312.

- Faine, S. (1994). *Leptospira and leptospirosis*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Fang, R. and Raoult D. 2003. Antigenic classification of *Rickettsia felis* by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:221-228.
- Fresh, J.W., Tsai, C.C., Lai, C.H., and Chang, C.T. (1968). Leptospirosis in man and rodents on Taiwan. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 17, 760-768.
- Fournier, P. E., V. Roux, and D. Raoult. 1998. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 839-848.
- Fournier, P. E., H. Fujita, N. Takada and D. Raoult. 2002. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2176-2181.
- Fournier, P-E., J. S. Dumler, G. Greub, J. Zhang, Y. Wu, and D. Raoult. 2003. Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 41:5456-5465.
- Ganoza, C.A., Matthias, M.A., Collins-Richards, D., Brouwer, K.C., Cunningham, C.B., Segura, E.R., Gilman, R.H., Gotuzzo, E., and Vinetz, J.M. (2006). Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS medicine* 3, e308.
- Hopkins, G.H.E., and M. Rothschild. 1953-1971. All Illustrated Catalogus of the Rothschild Collection of Flea (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History). Vol. I-V. British Museum (Natural History), London. Vol. I. (1953). Tungidae and Pulicidae. xv+361 pp; Vol. II. (1956). Coptosyllidae, Vermipsyllidae, Macropsyllidae, Ischnopsyllidae, Chimaeropsyllidae and Xiphiopsyllidae. xi+445 pp; Vol. III (1962). Hystricopsyllidae (Anomiopsyllinae, Hystricopsyllinae, Rhadinopsyllinae and Stenoponiinae). ix+560 pp; Vol. IV (1966). Hystricopsyllidae (Ctenophthalmimae, Dinopsyllinae, Doratopsyllinae and

- Listropsyllinae). vii+549 pp; Vol V. (1971) Leptopsyllidae and Ancistropsyllidae. viii+530 pp.
- Ishikura, M., W. Mamoru, N. Takashi, M. Kumiko, M. Osayuki, and U. Takahiro. 1992. Seroepidemiology of spotted fever group rickettsiae in small field rodents in Japan. *Microbiol. Immunol.* 36(6):649-653.
- Ishikura, M., H. Fujita, K. Matsuura and M. Watanabe. 2002. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae isolated from ticks in Japan. *Microbiol. Immunol.* 46(4):241-247.
- Ivacic, L., Reed, K.D., Mitchell, P.D., and Ghebranious, N. (2007). A LightCycler TaqMan assay for detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in clinical samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 57, 137-143.
- Jameson, E. W. Jr. 1965. The genus *Laelaps* (Acarica: Laelapidae) in Taiwan. *J. Med. Ent.* 2(1): 41-53.
- Johnson, M.A., Smith, H., Joeph, P., Gilman, R.H., Bautista, C.T., Campos, K.J., Cespedes, M., Klatsky, P., Vidal, C., Terry, H., *et al.* (2004). Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerging infectious diseases* 10, 1016-1022.
- Kim, K. C., H. D. Pratt and C. J. Stojanovich. 1986. The sucking lice of North America: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London. 241 pp.
- Kim, C. M., Y. H. Yi, D. H. Yu, M. J. Lee, M. R. Cho, A. R. Desai, S. Shring, T. A. Klein, H. C. Kim, J. W. Song, L. J. Back, S. T. Chong, M. L. O'Guinn, J. S. Lee, I. Y. Lee, J. H. Park, J. Foley and J. S. Chae. 2006. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9): 5766-5776.
- Kollars T. M. Jr, B. Tippayachai, and D. Bodhidatta. 2001. Short report: Thai tick typhus, *Rickettsia honei*, and a unique rickettsia detected in *Ixodes granulatus* (Ixodidae :

- Acari) from Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 65 : 535-537.
- Laras, K., Cao, B.V., Bounlu, K., Nguyen, T.K., Olson, J.G., Thongchanh, S., Tran, N.V., Hoang, K.L., Punjabi, N., Ha, B.K., *et al.* (2002). The importance of leptospirosis in Southeast Asia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 67, 278-286.
- Lee, J. H., H. S. Park, K. D. Jung, W. J. Jane, S. E. Koh, S. S. Kang, I. Y. Lee, W. J. Lee, B. J. Kim, Y. H. Kook, K. H. Park and S. H. Lee. 2003. Identification of the spotted fever group rickettsiae detected from *Haemaphysalis longicornis* in Korea. *Microbiol. Immunol.* 47(4): 301-304.
- Lennette, E. H, Halonen, P. and Murphy, F. A. 1988. Laboratory diagnosis of infectious diseases. Principles and Practice Vol. II. pp 865-890. Springer-Verlag New York Inc.
- Levett, P.N. (2001). Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews* 14, 296-326.
- Marmion, B.P. 1990. Rickettsial diseases of man and animals. Pp 674-689. Edward Arnold, London.
- Matthias, M.A., Diaz, M.M., Campos, K.J., Calderon, M., Willig, M.R., Pacheco, V., Gotuzzo, E., Gilman, R.H., and Vinetz, J.M. (2005). Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 73, 964-974.
- Morey, R.E., Galloway, R.L., Bragg, S.L., Steigerwalt, A.G., Mayer, L.W., and Levett, P.N. (2006). Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of clinical microbiology* 44, 3510-3516.
- Nadchatram, M., and A. L. Dohany. 1974. A pictorial key to the subfamilies, genera and subgenera of Southeast Asian chiggers (Acari: Prostigmata, Trombiculidae). *Bull.*

- Inst. Med. Res. Malaysia 16: 1-67.
- Okabayashi, T., K. Tsutiya, Y. Muramatsu, H. Ueno, and C. Morita. 1996. Serological survey of spotted fever group rickettsia in wild rats in Thailand in the 1970s. *Mircobiol Immunol.* 40 (12) : 895-8.
- Palaniappan, R.U., Chang, Y.F., Chang, C.F., Pan, M.J., Yang, C.W., Harpending, P., McDonough, S.P., Dubovi, E., Divers, T., Qu, J., *et al.* (2005). Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Molecular and cellular probes* 19, 111-117.
- Parola, P., C. D. Paddock and D. Raoult. 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbio. Rev.* 18(4): 719-756.
- Portnoi, D., Sertour N., Ferquel E., Garnier M., Baranton G and Postic D. 2006. A single-run, real-time PCR for detection and identification of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species, based on the hbb gene sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 259:35-40.
- Robbin, R G. 2005. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Taiwan: a synonymic checklist. *Proceedings of the Entomological Society of Washington;* 107: 245–253.
- Rijpkema S.G.T., Molkenboer M.J.C.H., Schouls L.M., Jongejan F. and Schellekens J.F.P. 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA Genes. *J. Clinic. Microbiol.* 33(12):3091-3095.
- Roux, V., and D. Raoult. 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). *Int.*

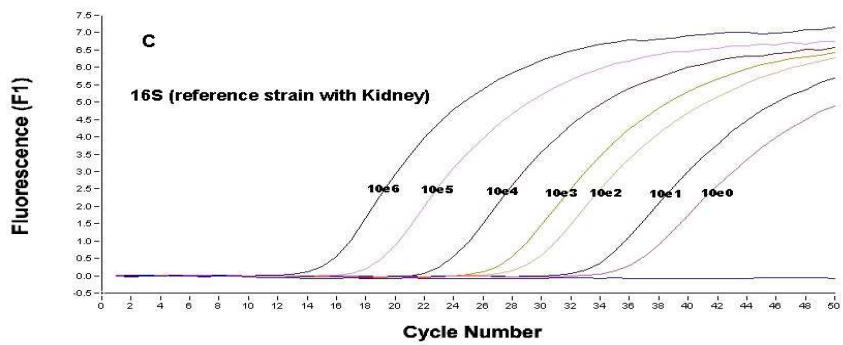
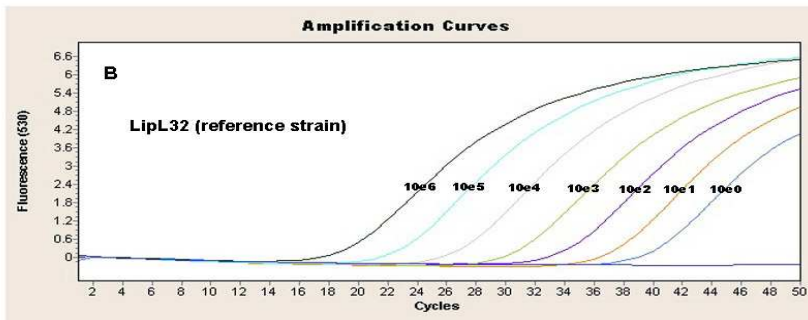
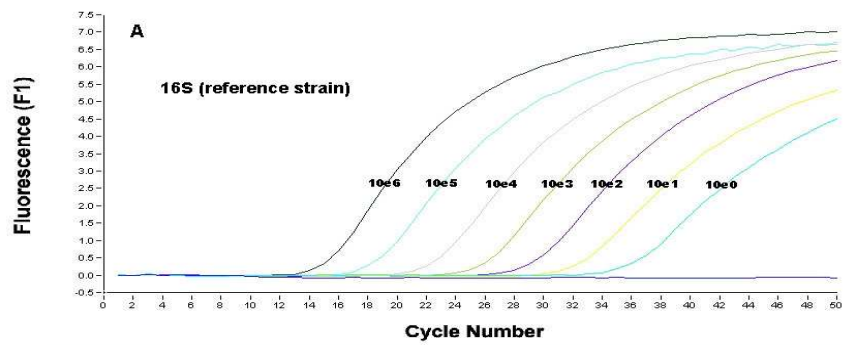
- J. Syst. Evol. Microbiol. 50:1449-1455.
- Roux, V., and D. Raoult. 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. Res. Microbiol. 146: 385-396.
- Roux, V., E. Rydkina, M. Ereemeeva, and D. Raoult. 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 252-261.
- Saravanan, R., Rajendran, P., Thyagarajan, S.P., Smythe, L.D., Norris, M.A., Symonds, M.L., and Dohnt, M.F. (2000). *Leptospira autumnalis* isolated from a human case from Avadi, India, and the serovar's predominance in local rat and bandicoot populations. Annals of tropical medicine and parasitology 94, 503-506.
- Seijo, A., Coto, H., San Juan, J., Videla, J., Deodato, B., Cernigoi, B., Messina, O.G., Collia, O., de Bassadoni, D., Schtirbu, R., *et al.* (2002). Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. Emerging infectious diseases 8, 1004-1005.
- Sejvar, J., Bancroft, E., Winthrop, K., Bettinger, J., Bajani, M., Bragg, S., Shutt, K., Kaiser, R., Marano, N., Popovic, T., *et al.* (2003). Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. Emerging infectious diseases 9, 702-707.
- Sekeyova, Z., V. Roux, and D. Raoult. 2001. Phylogeny of *Rickettsia* spp. Inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1353-1360.
- Stanek, G., and Strle, F. (2003). Lyme borreliosis. Lancet 362, 1639-1647.
- Steere, A.C. (1989). Lyme disease. The New England journal of medicine 321, 586-596.
- Steere, A.C., Bartenhagen, N.H., Craft, J.E., Hutchinson, G.J., Newman, J.H., Rahn, D.W., Sigal, L.H., Spieler, P.N., Stenn, K.S., and Malawista, S.E. (1983). The early clinical manifestations of Lyme disease. Annals of internal medicine 99, 76-82.
- Stenos J., V. Roux, D. H. Walker, and D. Raoult. 1998. *Rickettsia honei* sp. Nov., the

- aetiological agent of Flinders Island spotted fever in Australia. *Int J Syst Bacteriol.* 48 : 1399-1404.
- Stewart R. S. 1991. Flinders Island spotted fever : a newly recognized endemic focus of tick typhus in Bass Strait. Part 1. Clinical and epidemiological features. *Med J Aust.* 154 : 94-99.
- Takada, N., Fujita, H., Yano, Y., Tsuboi, Y. and Mahara, F. 1994. First isolation of a rickettsia closely related to Japanese spotted fever pathogen from a tick in Japan. *Entomol. Sci. America* 31:183-185.
- Takada, N., Fujita, H., Yano, Y., Huang W. H. Khamboonruang C. 1993. Serosurveys of spotted fever and murine typhus in local residents of Taiwan and Thailand compared with Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 24(2):354-6.
- Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P., and Haake, D. (2004). Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol* 7, 35-40.
- Tsai, Y. S., Y. H. Wu, P. T. Kao., and Y. C. Lin. 2008. African tick bite fever. *J. Formos. Med. Assoc.* 107:73-76.
- Tsui, P. Y., K. H. Tsai, M. H. Weng, Y. W. Hung, Y. T. Liu, K. Y. Hu, J. C. Lien, P. R. Lin, M. F. Shaio, H. C. Wang, and D. D. Ji. (2007) Molecular detection and characterization of spotted fever group rickettsiae in Taiwan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77 (5): 883-890.
- Uchida T., T. Uchiyama, K. Kumano, and D. H. Walker. 1992. *Rickettsia japonica* sp. Nov., the etiological agent of spotted fever group rickettsiosis in Japan. *Int J Syst Bacteriol.* 42 : 303-305.
- Vercammen-Grandjean, P. H., and R. Langston. 1976. *The Chigger Mites of the World.* Vol. III. *Leptotrombidium* complex. Sect. A-C. George Williams Hooper

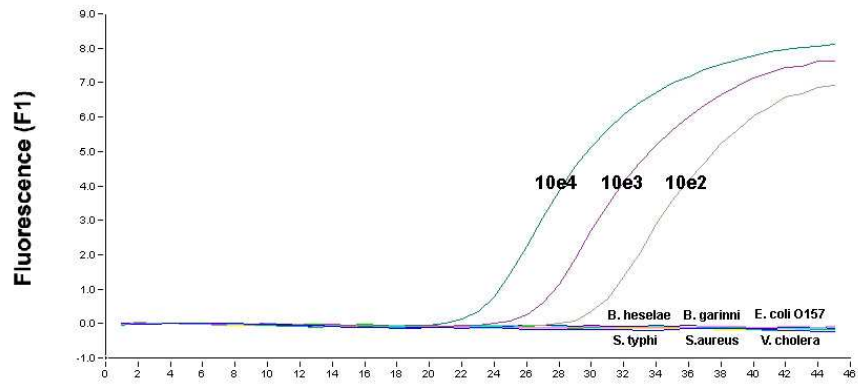


- Foundation, University of California, San Francisco, CA. 1-1061 pp.+ 298 pl.
- Vinetz, J.M., Glass, G.E., Flexner, C.E., Mueller, P., and Kaslow, D.C. (1996). Sporadic urban leptospirosis. *Annals of internal medicine* 125, 794-798.
- Wang, D. Q., and Z. Z. Yu. 1992. Chigger mites of the genus *Leptotrombidium*: key to species and their distribution in China. *Med. Vet. Entomol.* 6: 389-395.
- Weil, A. (1886). Ueber eine eigentumliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende acute Infektionskrankheit. *Dtsche Arch Klin Med* 39, 209-232.
- Wilske, B., Fingerle, V., and Schulte-Spechtel, U. (2007). Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS immunology and medical microbiology* 49, 13-21.
- Yamaguti, N., V. J. Tipton, H. L. Keegan, and S. Toshioka. 1971. Ticks of Japan, Korea, and the Ryukyu islands. *Brigham Young Univ. Sci. Bull. Biol. Ser.* 15: 1-225.
- Yeh, Y., and Young, S. (1966). Isolation of *Leptospira* from wild rats in Taiwan. *Memoir of College of Agriculture, National Taiwan University*, 184-195.
- Zhang J. Z., M. T. Fan, Y. M. Wu, P. E. Fournier, V. Roux, and D. Raoult. 2000. Genetic classification of "*Rickettsia heilongjiangii*" and "*Rickettsia hulini*" two Chinese spotted fever group rickettsiae. *J. clin. Microbiol.* 38 : 3498-3501.
- 王正雄。1999。家鼠防治學。中華環境有害生物防治協會。台北。240 頁
- 王錫杰，林鼎翔。1995。台灣地區鼠種與鼠類傳播之疾病。疫情報導 11(10)；266-272。
- 未具名。2008。2007 年 12 月份全國甲乙類傳染病疫情動態簡介。疾病監測 23(1)：4。
- 行政院衛生署疾病管制局 (2002)。鉤端螺旋體病臨床症狀、診斷及治療指引。
- 邱鴻英。2000 台灣地區國際港埠鼠隻鉤端螺旋體血清流行病學調查。應用流行病

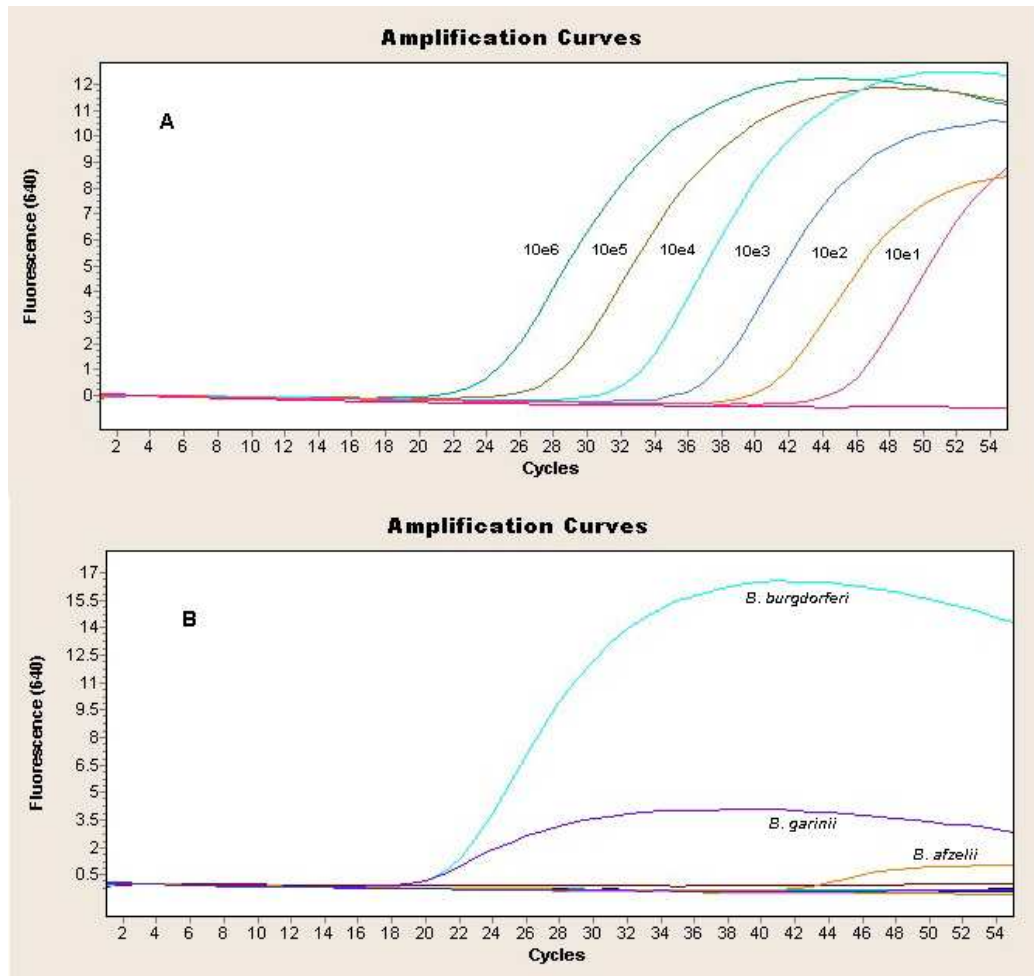
- 學人才訓練及養成計劃第十三期學員研究報告。行政院衛生署疾病管制局。
- 吳尚瀚。2007 台中地區小型哺乳動鈎端螺旋體感染調查暨應用恆溫式圈環型核酸增幅法進行鈎端螺旋體 *lipL* 32 基因偵測。國立中興大學獸醫學公共衛生學研究所碩士論文。
- 金大雄。1999。中國吸蟲的分類和檢索。科學出版社，北京。132 頁。
- 柳支英。1986。中國動物誌 昆蟲綱 蚤目。科學出版社，北京。1334 頁。
- 陳慧玲、陳豪勇、鍾兆麟、林鼎翔、王躬仁、洪其璧。1997。金門地區鼠體內斑點熱抗體之初步篩檢。中華微免雜誌 30: 55-61。
- 黃海楠、丁壯、何靜、吳曉明、蔣寶貴、高燕、趙秋敏、曹務春。2006。部分省齧齒動物中斑點熱立克次體的檢測。中國媒介生物學及控制雜誌。17: 83-85。
- 張健之。1999。中國斑點熱立克次體媒介何宿主的初步研究。中國人獸共患病雜誌。15: 29。
- 鄭國藩、姜在階。1991。中國經濟昆蟲志第三十九冊蜉蝣亞綱硬蜱科。科學出版社，北京。359 頁。
- 黎家燦、王敦清、陳興保。1997。中國恙蟲：恙蟲病媒介和病原體。廣東科技出版社，廣州。570 頁。



圖一、建立偵測鈎端螺旋體之 real-time PCR(數字代表每個反應所帶菌數)

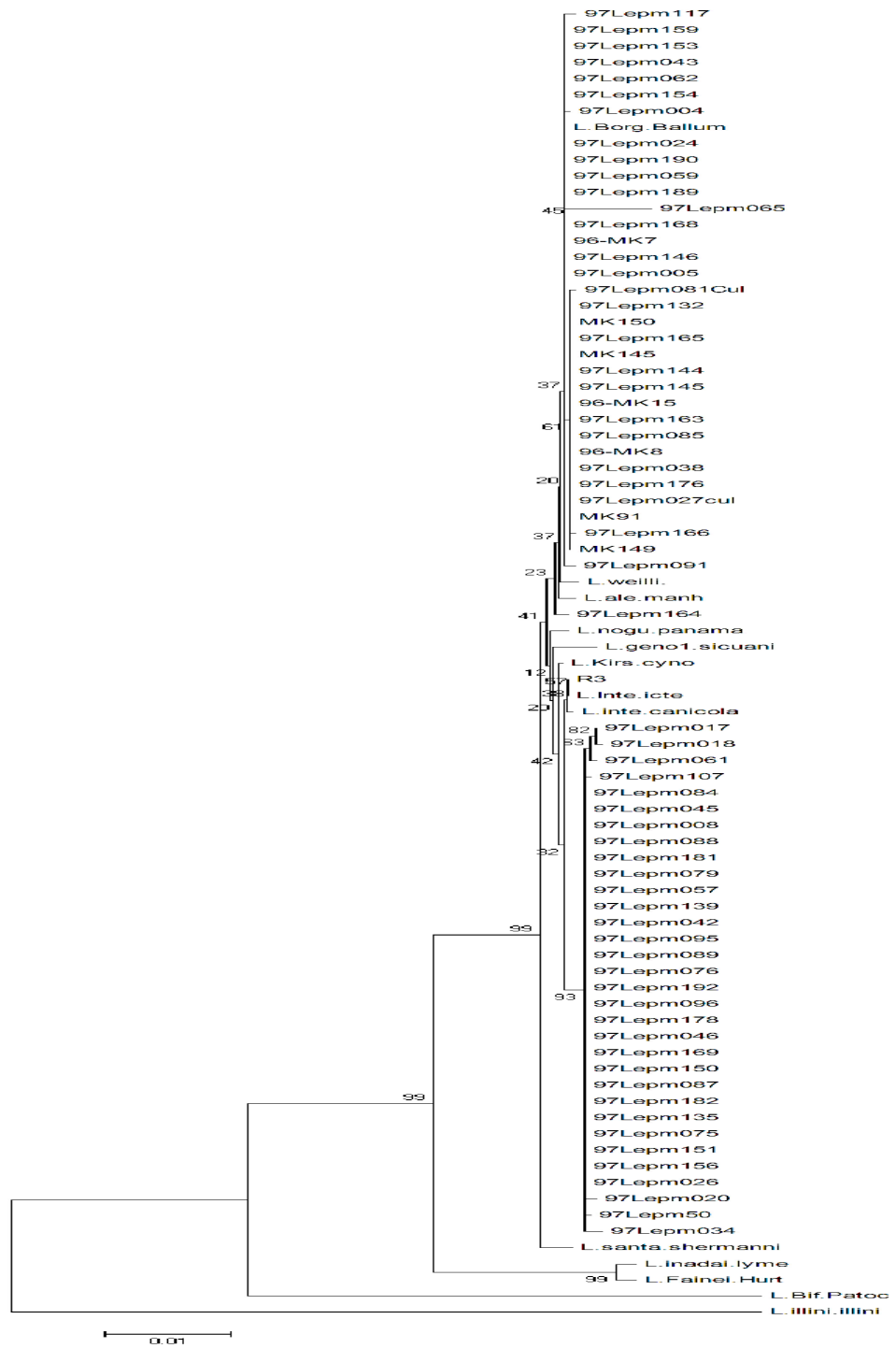


圖二、16S real-time PCR 特異性之測試。

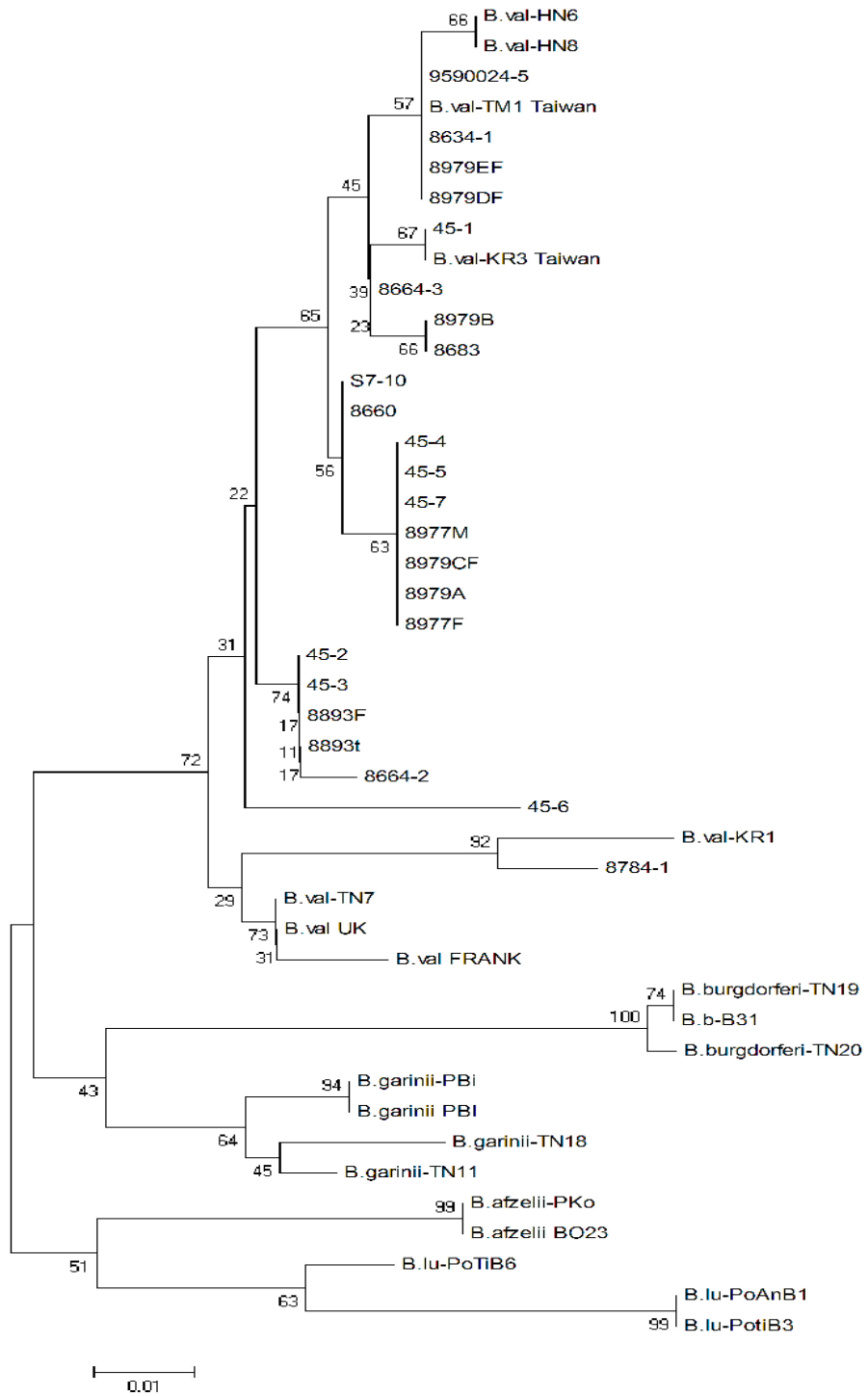


圖三、建立偵測萊姆疏螺旋體之 real-time PCR(A:數字代表每個反應所帶菌數)

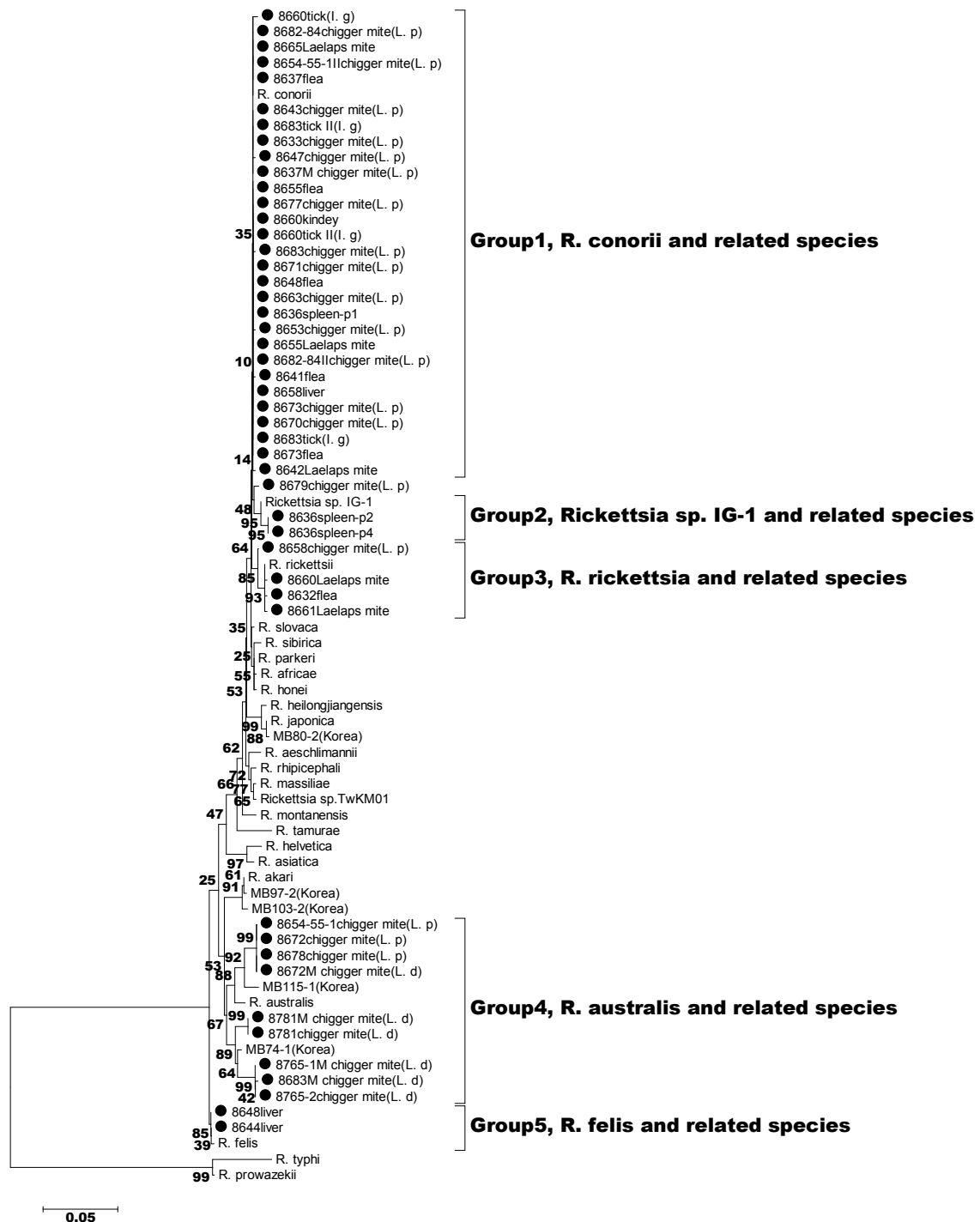
(B: 特異性之測試)



圖四、鉤端螺旋體菌 16S 序列親緣關係圖。

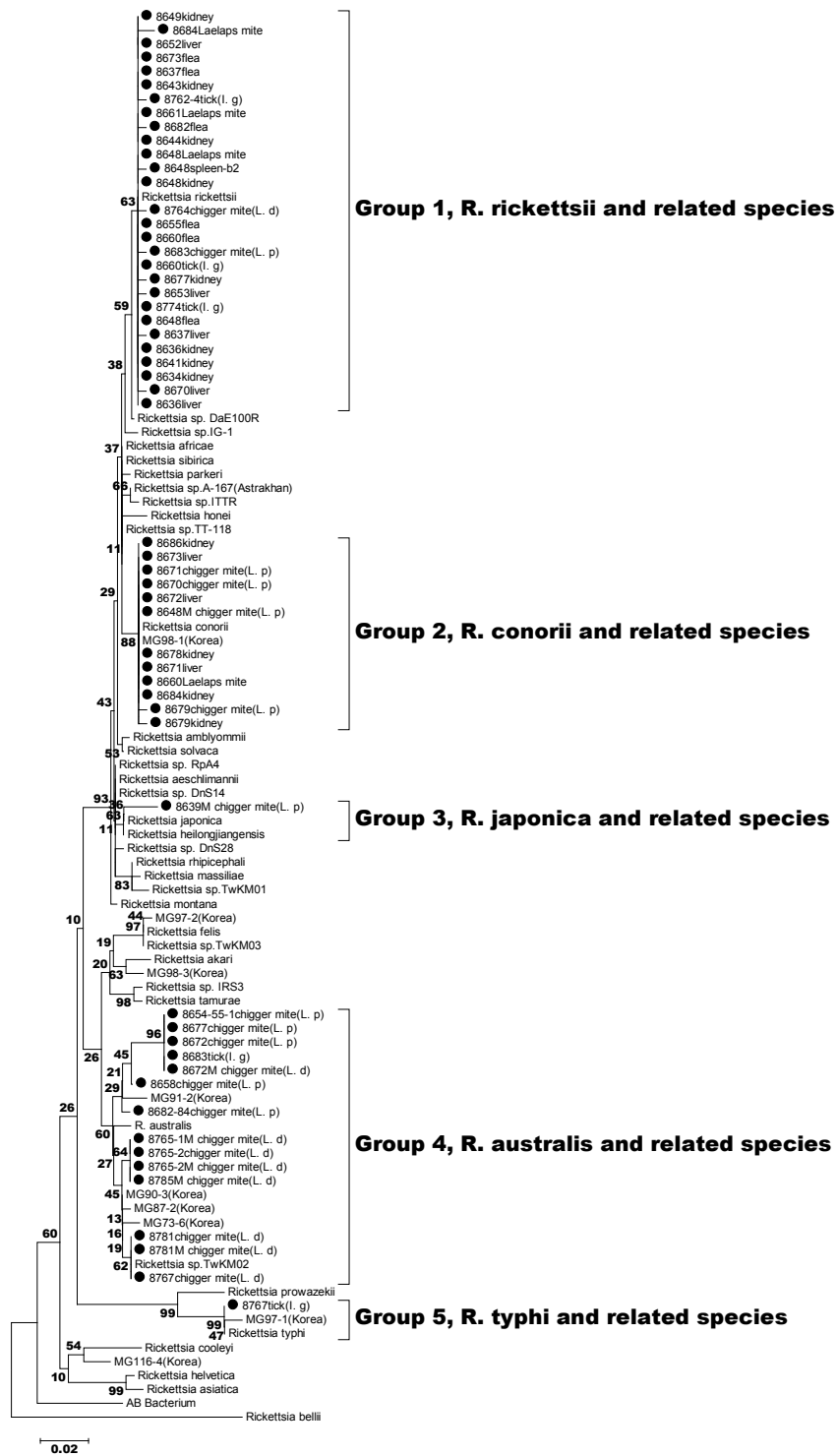


圖五、萊姆疏螺旋體菌 5S-23S 序列親緣關係圖。

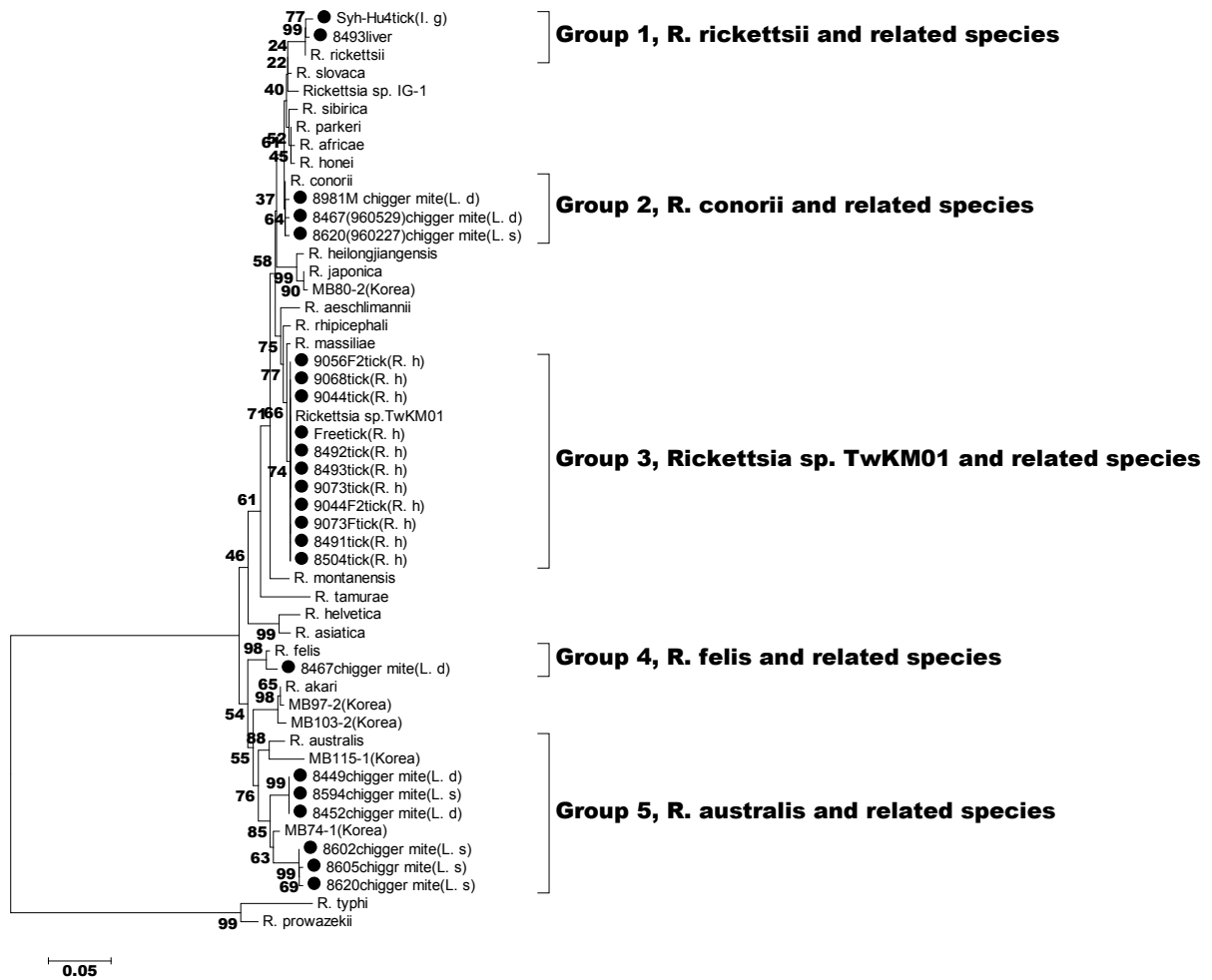


圖六、連江縣斑點熱立克次體 *OmpB* 部分序列親緣關係圖，●為連江縣菌株。

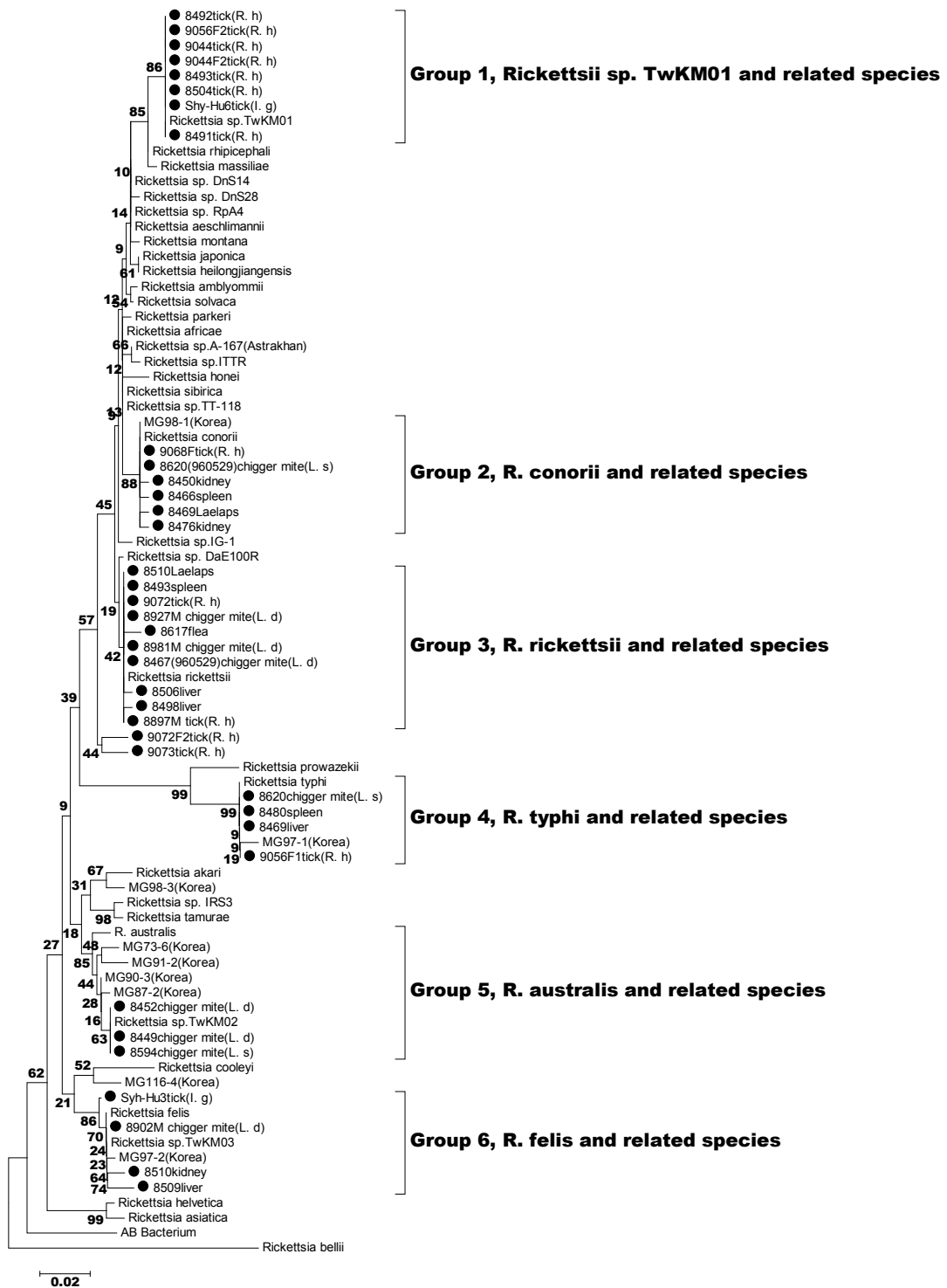




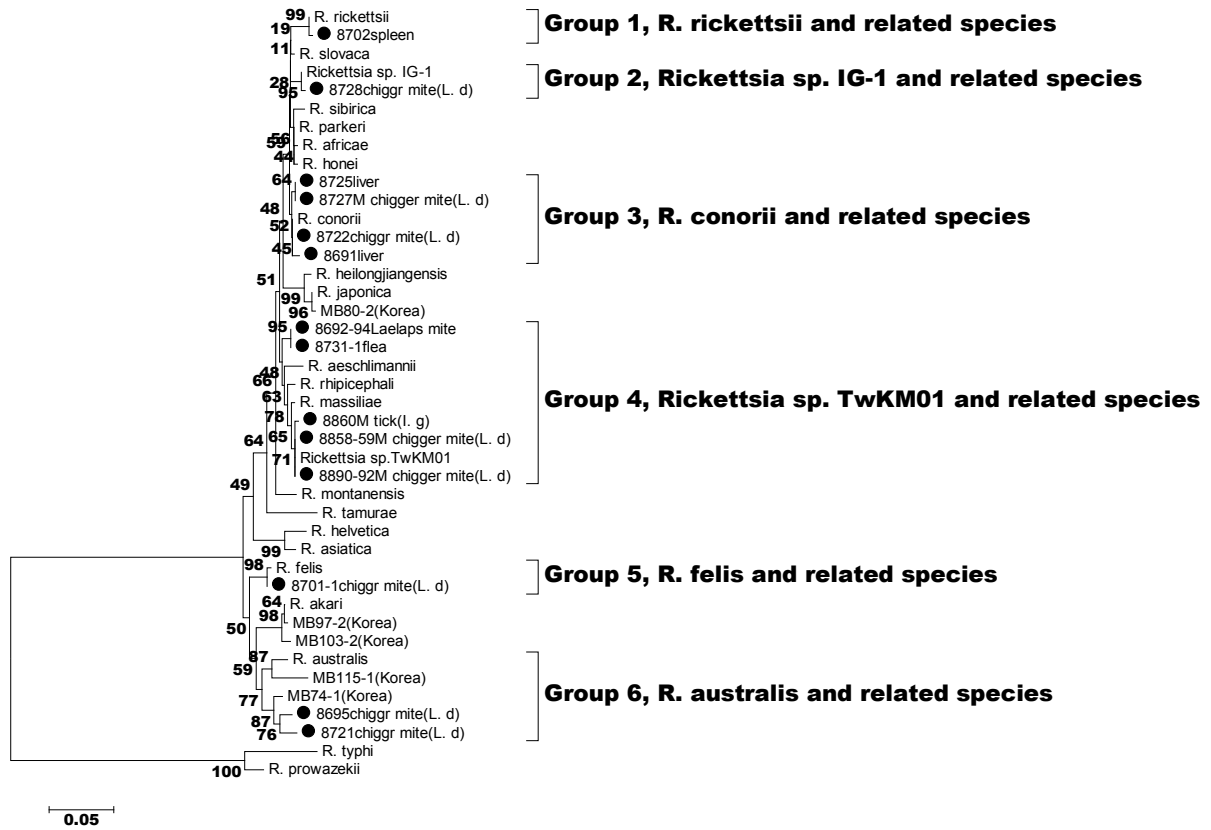
圖七、連江縣斑點熱立克次體 *gltA* 部分序列親緣關係圖，●為連江縣菌株。



圖八、金門縣斑點熱立克次體 *OmpB* 部分序列親緣關係圖，●為金門縣菌株。

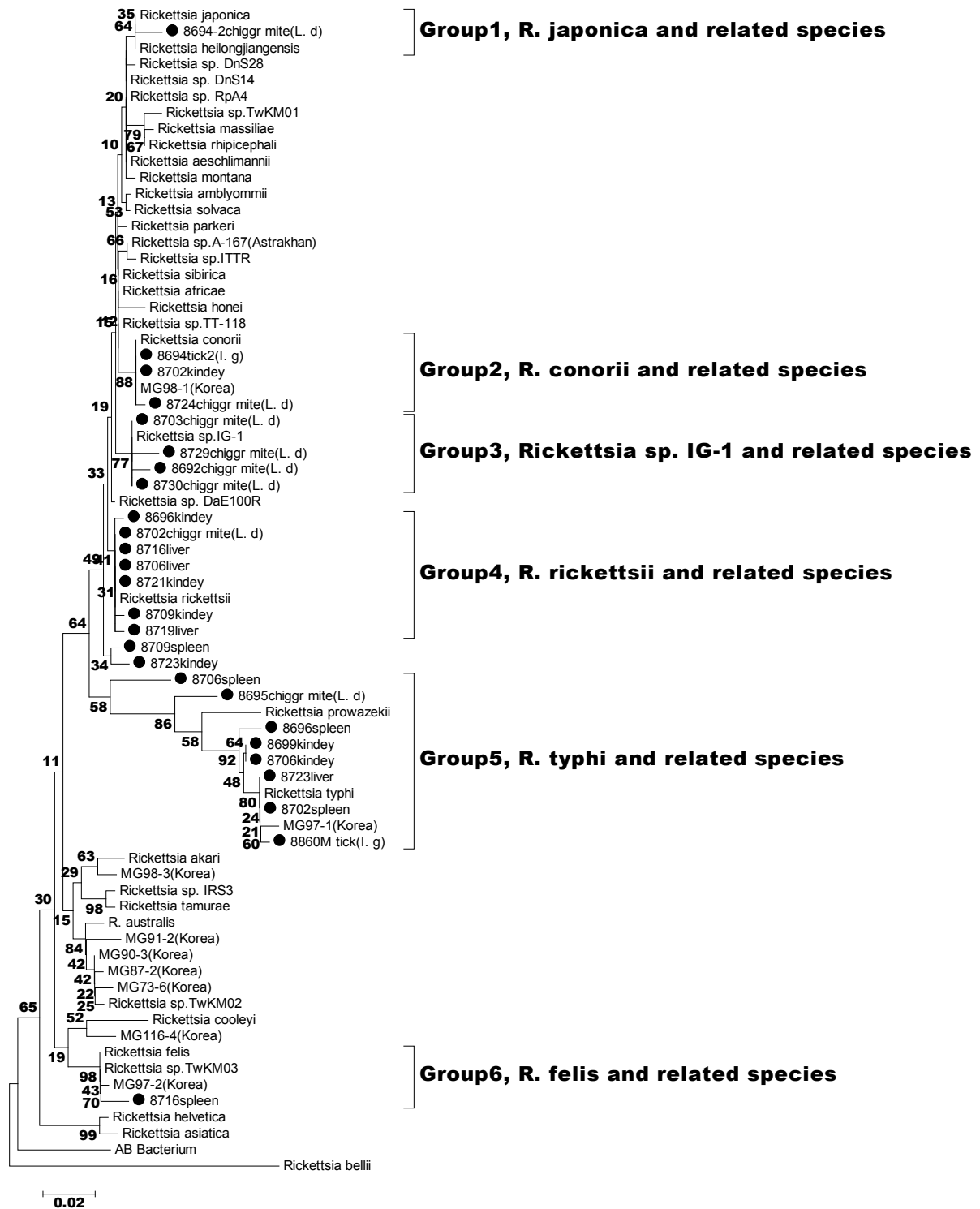


圖九、金門縣斑點熱立克次體 *gltA* 部分序列親緣關係圖，●為金門縣菌株。



圖十、澎湖縣斑點熱立克次體 *OmpB* 部分序列親緣關係圖，●為澎湖縣菌株。





圖十一、澎湖縣斑點熱立克次體 *gltA* 部分序列親緣關係圖，●為澎湖縣菌株。

表一、連江縣老鼠鉤端螺旋體血清抗體陽性率

時間	鼠種	捕獲數目	Ab titer >100X	陽性率
9607	<i>R. losea</i>	16	4	25%
	<i>S. murinus</i>	25	5	20%
	<i>M. musculus</i>	1	0	0%
總數		42	9	21.4%

表二、金門縣老鼠鉤端螺旋體血清抗體陽性率

時間	鼠種	捕獲數目	Ab titer >100X	陽性率
9703	<i>R. losea</i>	80	64	80%
	<i>S. murinus</i>	11	2	18.2%
	<i>M. musculus</i>	2	1	50%
小計		93	67	72%
9708	<i>R. losea</i>	68	38	55.9%
	<i>S. murinus</i>	6	4	66.7%
	<i>M. musculus</i>	0	0	0%
小計		74	42	56.8%
總數		167	109	65.3%

表三、澎湖縣老鼠鉤端螺旋體血清抗體陽性率

時間	鼠種	捕獲數目	Ab titer >100X	陽性率
9605	<i>R. losea</i>	21	1	4.8%
	<i>S. murinus</i>	11	1	9.1%
	<i>M. musculus</i>	25	0	0%
小計		57	2	3.5%
9609	<i>R. losea</i>	35	1	2.9%
	<i>S. murinus</i>	15	0	0%
	<i>M. musculus</i>	29	0	0%
	<i>M. caroli</i>	1	0	0%
	<i>R. norvegicus</i>	1	0	0%

小計	81	1	1.2%
總數	138	3	2.2%

表四、連江縣調查老鼠斑點熱血清抗體陽性率

時間	鼠種	數目	<i>R. rickettsii</i> (+)	<i>R. conorii</i> (+)	<i>R. typhi</i> (+)
9603	<i>R. losea</i>	40	82.50%	80.00%	0.00%
	<i>S. murinus</i>	2	0.00%	0.00%	0.00%
	total	42	78.57%	76.19%	0.00%
9607	<i>R. losea</i>	15	80.00%	33.33%	6.67%
	<i>S. murinus</i>	24	0.00%	0.00%	0.00%
	<i>M. musculus</i>	1	100.00%	100.00%	0.00%
	total	40	32.50%	15.00%	2.50%

表五、金門縣調查老鼠斑點熱血清抗體陽性率

時間	鼠種	數目	<i>R. rickettsii</i> (+)	<i>R. conorii</i> (+)	<i>R. typhi</i> (+)
9506	<i>R. losea</i>	58	93.10%	72.41%	6.90%
	<i>S. murinus</i>	3	0.00%	0.00%	0.00%
	total	61	90.16%	70.49%	6.56%
9601	<i>R. losea</i>	30	100.00%	76.67%	0.00%
	<i>Mus caroli</i>	1	0.00%	0.00%	0.00%
	total	31	93.55%	74.19%	0.00%
9703	<i>R. losea</i>	80	87.50%	71.25%	1.25%
	<i>Mus musculus</i>	2	100.00%	100.00%	50.00%
	<i>S. murinus</i>	19	0.00%	0.00%	0.00%
	total	101	71.29%	58.42%	1.98%
9708	<i>R. losea</i>	68	97.06%	67.65%	0.00%
	<i>S. murinus</i>	4	0.00%	0.00%	0.00%
	total	72	91.67%	63.89%	0.00%

表六、澎湖縣調查老鼠斑點熱血清抗體陽性率

時間	鼠種	數目	<i>R. rickettsii</i> (+)	<i>R. conorii</i> (+)	<i>R. typhi</i> (+)
9605	<i>Mus caroli</i>	25	24.00%	12.00%	16.00%
	<i>R. losea</i>	21	100.00%	85.71%	14.29%
	<i>S. murinus</i>	11	0.00%	0.00%	0.00%



	total	57	47.37%	36.84%	12.28%
9609	<i>R. losea</i>	35	97.14%	97.14%	0.00%
	<i>Mus musculus</i>	29	65.52%	55.17%	3.45%
	<i>S. murinus</i>	15	0.00%	0.00%	0.00%
	<i>R. norvegicus</i>	1	100.00%	100.00%	100.00%
	<i>Mus caroli</i>	1	100.00%	100.00%	100.00%
	total	81	67.90%	64.20%	3.70%

表七、連江縣老鼠腎臟鉤端螺旋體檢測

時間	鼠種	捕獲數目	Kidney real-time PCR(+)	陽性率
9607	<i>R. losea</i>	16	1	6.25%
	<i>S. murinus</i>	25	0	0%
	<i>M. musculus</i>	1	0	0%
總數		42	1	2.38%

表八、金門縣老鼠腎臟鉤端螺旋體檢測

時間	鼠種	捕獲數目	Kidney real-time PCR(+)	陽性率
9703	<i>R. losea</i>	80	49	61.25%
	<i>S. murinus</i>	11	1	9.09%
	<i>M. musculus</i>	2	0	0%
小計		93	50	53.76%
9708	<i>R. losea</i>	68	24	35.3%
	<i>S. murinus</i>	6	2	33.33%
	<i>M. musculus</i>	0	0	0%
小計		74	26	35.14%
總數		167	76	45.51%

表九、澎湖縣老鼠腎臟鉤端螺旋體檢測

時間	鼠種	捕獲數目	Kidney real-time PCR(+)	陽性率
9605	<i>R. losea</i>	21	3	14.3%
	<i>S. murinus</i>	11	0	0%
	<i>M. musculus</i>	25	0	0%
小計		57	3	5.3%
9609	<i>R. losea</i>	35	4	11.4%
	<i>S. murinus</i>	15	0	0%
	<i>M. musculus</i>	29	0	0%

	<i>M. caroli</i>	1	0	0%
	<i>R. norvegicus</i>	1	0	0%
小計		81	4	4.9%
總數		138	7	5.1%

表十、9603 連江縣老鼠內臟斑點熱檢測

鼠種	數目	Rat Ab(+) to R. rickettsii	Spleen PCR(+)*	Liver PCR(+)	Kidney PCR(+)	Total
<i>R. losea</i>	27	24(89%)	2(7%)	9(33%)	13(48%)	20(74%)
<i>S. murinus</i>	3	0(0%)	0(0%)	1(33%)	0(0%)	1(33%)
Total	30	24(80%)	2(6.6%)	10(33%)	13(43%)	21(70%)

\*陽性數(陽性率)

表十一、9506 金門縣老鼠內臟斑點熱檢測

鼠種	數目	Rat Ab(+) to R. rickettsii	Spleen PCR(+)	Liver PCR(+)	Kidney PCR(+)	Total
<i>R. losea</i>	30	90%	17(57%)	8(27%)	4(13%)	21(70%)

表十二、9605 澎湖縣老鼠內臟斑點熱檢測

鼠種	數目	Rat Ab(+) to R. rickettsii	Spleen PCR(+)	Liver PCR(+)	Kidney PCR(+)	Total
<i>R. losea</i>	14	14(100%)	3(21%)	2(14%)	4(29%)	6(43%)
<i>M. caroli</i>	11	5(46%)	2(18%)	2(18%)	2(18%)	5(45%)
<i>S. murinus</i>	5	0(0%)	1(20%)	2(40%)	2(40%)	2(40%)
Total	30	19(63%)	6(20%)	6(20%)	8(27%)	13(43%)

表十三、連江縣老鼠體外節肢動物萊姆疏螺旋體檢測

時間	蜱種	捕獲數目	real-time PCR(+)	陽性率
9603	<i>Ixodes granulatus</i>	11	5	45.5%
9607	<i>Ixodes granulatus</i>	13	1	7.7%
總數		24	6	25%

表十四、金門縣老鼠體外節肢動物萊姆疏螺旋體檢測

時間	蜱種	捕獲數目	real-time PCR(+)	陽性率
9506	<i>Ixodes granulatus</i>	20	10	50%
	<i>R. haemaphysaloides</i>	41	0	0%
	<i>H. formosensis</i>	2	0	0%
9703	<i>Ixodes granulatus</i>	20	11	55%
9708	<i>Ixodes granulatus</i>	1	0	0%
	<i>R. haemaphysaloides</i>	67	0	0%
小計	<i>Ixodes granulatus</i>	41	21	51.2%
總數		150	21	14%

表十五、澎湖縣老鼠體外節肢動物萊姆疏螺旋體檢測

時間	蜱種	捕獲數目	real-time PCR(+)	陽性率
9605	<i>Ixodes granulatus</i>	2	0	0%
總數		2	0	0%

表十六、9603 及 9607 連江縣調查蜱斑點熱 PCR 檢測

時間地區	種類	數目	<i>OmpB</i> PCR(+)*	<i>gltA</i> PCR(+)
9603 北竿鄉	<i>I. granulatus</i>	3	0	0
9603 南竿鄉	<i>I. granulatus</i>	8	2(25%)	2(25%)
9607 南竿鄉	<i>I. granulatus</i>	21	0	5(23.8%)
Total	<i>I. granulatus</i>	32	2(6.3%)	7(21.9%)

\*陽性數(陽性率)

表十七、9506、9703 及 9708 金門縣調查蜚斑點熱 PCR 檢測

時間地區	種類	數目	<i>OmpB</i> PCR(+)	<i>gltA</i> PCR(+)
9506 金城鎮泗湖	<i>I. granulatus</i>	9	1(11%)	2(22%)
9506 金湖鎮小徑	<i>I. granulatus</i>	11	0	1(9%)
9506 金湖鎮小徑	<i>R. haemaphysaloides</i>	41	20(49%)	20(49%)
9506 金湖鎮小徑	<i>H. formosensis</i>	2	0	0
9703 烈嶼鄉湖井頭	<i>I. granulatus</i>	4	0	0
9703 金寧鄉湖浦	<i>I. granulatus</i>	1	0	0
9703 金寧鄉沙崗	<i>I. granulatus</i>	1	0	0
9703 金湖鎮新頭	<i>I. granulatus</i>	14	0	0
9708 金寧鄉沙崗	<i>R. haemaphysaloides</i>	5	0	0
9708 金寧鄉湖埔	<i>R. haemaphysaloides</i>	22	0	0
9708 金湖鎮新頭	<i>R. haemaphysaloides</i>	9	7(78%)	7(78%)
9708 金湖鎮后壠	<i>R. haemaphysaloides</i>	6	2(33%)	4(67%)
9708 金沙鎮山西	<i>R. haemaphysaloides</i>	25	14(56%)	14(56%)
Total		150	44(29%)	48(32%)

表十八、澎湖縣調查蜚斑點熱 PCR 檢測

時間地區	種類	數目	<i>OmpB</i> PCR(+)	<i>gltA</i> PCR(+)
9605 湖西鄉湖西村	<i>I. granulatus</i>	2	0	1(50%)

表十九、9603 及 9607 連江縣調查恙蟲斑點熱 PCR 檢測

採集日期	種類	檢測池數*	<i>OmpB</i> PCR(+)	<i>gltA</i> PCR(+)
9603	<i>L. pallidum</i>	30	21(70%)	9(30%)
9607	<i>L. deliense</i>	20	2(10%)	4(20%)

\*1 池為 100 隻恙蟲

表二十、9506 及 9601 金門縣調查恙蟲斑點熱 PCR 檢測

採集日期	種類	檢測池數*	<i>OmpB</i> PCR(+)	<i>gltA</i> PCR(+)
9506	<i>L. deliense</i>	24	3(13%)	3(13%)
9601	<i>L. scutellare</i>	20	3(15%)	2(10%)

\*1 池為 100 隻恙蟲

表二十一、9605 及 9609 澎湖縣調查恙蟲斑點熱 PCR 檢測

採集日期	種類	檢測池數*	<i>OmpB</i> PCR(+)	<i>gltA</i> PCR(+)
9605	<i>L. deliense</i>	35	5(14%)	12(34%)
9609	<i>L. deliense</i>	33	1(3%)	0

\*1 池為 100 隻恙蟲

表二十二、9603 連江縣老鼠跳蚤斑點熱 PCR 檢測

檢體編號	鼠種	採集地點	<i>N. nicanus</i> * PCR( <i>OmpB</i> )	<i>N. nicanus</i> * PCR( <i>gltA</i> )
8632	<i>R. losea</i>	北竿鄉塘岐	+	+
8637	<i>R. losea</i>	北竿鄉塘岐	+	+
8641	<i>R. losea</i>	北竿鄉坂里	+	+
8642	<i>R. losea</i>	北竿鄉坂里	-	-
8648	<i>R. losea</i>	北竿鄉坂里	+	+
8655	<i>R. losea</i>	南竿鄉四維	+	+
8660	<i>R. losea</i>	南竿鄉珠螺	-	+
8673	<i>R. losea</i>	南竿鄉仁愛	+	+
8682	<i>R. losea</i>	南竿鄉津沙	+	+
8684	<i>R. losea</i>	南竿鄉津沙	-	-
total	10		8(80%)	

\* *N. nicanus* 為單隻

表二十三、9601 金門縣老鼠跳蚤斑點熱 PCR 檢測

檢體編號	鼠種	採集地點	<i>N. nicanus</i> * PCR( <i>OmpB</i> )	<i>N. nicanus</i> * PCR( <i>gltA</i> )
8605-1	<i>R. losea</i>	金湖鎮小徑	-	-
8605-2	<i>R. losea</i>	金湖鎮小徑	-	-
8605-3	<i>R. losea</i>	金湖鎮小徑	-	-
8614	<i>R. losea</i>	金寧鄉西山	-	-
8615	<i>R. losea</i>	金寧鄉西山	-	-
8616	<i>R. losea</i>	金寧鄉西山	-	-
8617	<i>R. losea</i>	金城鎮泗湖	-	+
8618	<i>R. losea</i>	金城鎮泗湖	-	-
8619	<i>R. losea</i>	金城鎮泗湖	-	-
8620	<i>R. losea</i>	金城鎮泗湖	-	-

Total 10 1(10%)

\* *N. nicanus* 為單隻

**表二十四、9605 澎湖縣老鼠跳蚤斑點熱 PCR 檢測**

檢體編號	鼠種	採集地點	<i>N. nicanus</i> * PCR( <i>OmpB</i> )	<i>N. nicanus</i> * PCR( <i>gltA</i> )
8721	<i>R. losea</i>	馬公市石泉里	-	-
8726	<i>R. losea</i>	西嶼鄉池東村	-	-
8729-1	<i>R. losea</i>	西嶼鄉大池村	-	-
8729-2	<i>R. losea</i>	西嶼鄉大池村	-	-
8729-3	<i>R. losea</i>	西嶼鄉大池村	-	-
8731-1	<i>R. losea</i>	西嶼鄉大池村	+	-
8731-2	<i>R. losea</i>	西嶼鄉大池村	-	-
Total	7			1(14%)

\* *N. nicanus* 為單隻

**表二十五、9603 連江縣老鼠厲蝟斑點熱 PCR 檢測**

檢體編號	鼠種	採集地點	<i>Laelaps</i> sp.#	<i>Laelaps</i> sp.# PCR( <i>OmpB</i> )	<i>Laelaps</i> sp.# PCR( <i>gltA</i> )
8641	<i>R. losea</i>	北竿鄉坂里	<i>L. echidninus</i>	-	-
8642	<i>R. losea</i>	北竿鄉坂里	<i>L. nuttalli</i>	+	-
8648	<i>R. losea</i>	北竿鄉坂里	<i>L. echidninus</i>	-	+
8655	<i>R. losea</i>	南竿鄉四維	<i>L. echidninus</i>	+	-
8660	<i>R. losea</i>	南竿鄉珠螺	<i>L. echidninus</i>	+	+
8661	<i>R. losea</i>	南竿鄉珠螺	<i>L. echidninus</i>	+	+
8662	<i>R. losea</i>	南竿鄉珠螺	<i>L. echidninus</i>	-	-
8665	<i>R. losea</i>	南竿鄉珠螺	<i>L. echidninus</i>	+	-
8682	<i>R. losea</i>	南竿鄉津沙	<i>L. echidninus</i>	-	-
8684	<i>R. losea</i>	南竿鄉津沙	<i>L. echidninus</i>	-	+
total	10			7(70%)	

# *Laelaps* spp. 為 5 隻

**表二十六、9506 金門縣老鼠厲蝟斑點熱 PCR 檢測**

檢體編號	鼠種	採集地點	<i>Laelaps</i> sp.#	<i>Laelaps</i> sp. PCR ( <i>OmpB</i> )	<i>Laelaps</i> sp. PCR ( <i>gltA</i> )
------	----	------	---------------------	--	--

8449	<i>R. losea</i>	金城鎮泗湖	<i>L. nuttalli</i>	-	-
8454	<i>R. losea</i>	金城鎮泗湖	<i>L. echidninus</i>	-	+
8463	<i>R. losea</i>	金城鎮泗湖	<i>L. nuttalli</i>	-	-
8468	<i>R. losea</i>	金沙鎮英坑	<i>L. echidninus</i>	-	+
8469	<i>R. losea</i>	金沙鎮英坑	<i>L. nuttalli</i>	-	+
8473	<i>R. losea</i>	金寧鄉西山	<i>L. nuttalli</i>	-	-
8488	<i>R. losea</i>	金沙鎮英坑	<i>L. sedlaceki</i>	-	-
8489	<i>R. losea</i>	金沙鎮英坑	<i>L. nuttalli</i>	-	-
8509	<i>R. losea</i>	金湖鎮小徑	<i>L. echidninus</i>	-	-
8510	<i>R. losea</i>	金湖鎮小徑	<i>L. nuttalli</i>	-	+
Total	10				4(40%)

# *Laelaps* spp. 為 5 隻

表二十七、9605 澎湖縣老鼠屬蝨斑點熱 PCR 檢測

檢體編號	鼠種	採集地點	<i>Laelaps</i> sp.#	<i>Laelaps</i> sp. PCR (OmpB)	<i>Laelaps</i> sp. PCR (gltA)
8692-94	<i>R. losea</i>	湖西鄉湖西	<i>L. echidninus</i>	+	-
8725	<i>R. losea</i>	西嶼鄉池東	<i>L. nuttalli</i>	-	-
8819	<i>R. losea</i>	西嶼鄉大池	<i>L. nuttalli</i>	-	-
8820	<i>R. losea</i>	西嶼鄉大池	<i>L. nuttalli</i>	-	-
8821	<i>R. losea</i>	西嶼鄉大池	<i>L. nuttalli</i>	-	-
8826-27	<i>R. losea</i>	西嶼鄉赤馬	<i>L. nuttalli</i>	-	-
8860	<i>R. losea</i>	馬公市前寮	<i>L. echidninus</i>	-	-
8868	<i>R. losea</i>	湖西鄉南寮	<i>L. echidninus</i>	-	-
8872	<i>R. losea</i>	湖西鄉南寮	<i>L. nuttalli</i>	-	-
8877	<i>R. losea</i>	湖西鄉龍門	<i>L. nuttalli</i>	-	-
Total	10				1(10%)

# *Laelaps* spp. 為 5 隻

表二十八、外寄生節肢動物及鼠類脾肝腎臟斑點熱立克次體分佈情形

	連江		金門		澎湖	
	OmpB	gltA	OmpB	gltA	OmpB	gltA
Chigger	R. con*	R. con	R. felis	R. con	IG-1	R. jap



	IG-1 R. ric R. aus	R. jap R. ric R. aus	R. aus R. con	R. aus R. felis R. ric R. typhi	R. con TwKM01 R. felis R. aus	R. con IG-1 R. ric R. typhi
<i>I. granulatus</i>	R. con	R. ric R. aus R. typhi	R. ric	TwKM01 R. felis	TwKM01	R. con R. typhi
<i>R. haemaphysaloides</i>			TwKM01	TwKM01 R. con R. ric R. typhi		
<i>N. nicanus</i>	R. con R. ric	R. ric		R. ric	TwKM01	
<i>Lealaps</i> spp.	R. con R. ric	R. ric R. con		R. ric R. con	TwKM01	
Spleen	R. con IG-1	R. ric		R. ric R. con R. typhi	R. ric	R. ric R. typhi R. felis
Liver	R. con R. felis	R. ric R. con	R. ric	R. ric R. felis R. typhi	R. con	R. ric R. typhi
Kidney	R. con	R. ric R. con		R. con R. felis		R. ric R. con R. typhi

\*R. con: *R. conorii*, R. ric: *R. rickettsii*, R. aus: *R. australis*, R. jap: *R. japonica*, TwKM01: *Rickettsia* sp. TwKM01, IG-1: *Rickettsia* sp. IG-1.