

計畫編號：MOHW105-CDC-C-315-122604

衛生福利部疾病管制署 105 年署內科技研究計畫

計畫名稱：台灣無形體症與斑點熱流行病學調查

年度研究報告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：王錫杰

研究人員：舒佩芸、施函君、廖顯竣、鍾珞璿

執行期間：105 年 1 月 1 日至 105 年 12 月 31 日

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	18
(三)、結果	30
(四)、討論	41
(五)、結論與建議	46
(六)、計畫重要研究成果及具體建議	48
(七)、參考文獻	49
(八)、圖	53
表	56

圖次

- 圖一、台灣地區 *Anaplasma phagocytophilum* 菌株 16S rRNA gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Kimura 2+G，使用 Maximum Likelihood method。 53
- 圖二、台灣地區 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 菌株 16S rRNA gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Kimura 2+G，使用 Maximum Likelihood method。 54
- 圖三、台灣地區 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 菌株 groESL gene 全長序列親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Hasegawa-Kishino-Yano+G，使用 Maximum Likelihood method。 55

表次	
表一、105 年金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類捕捉結果	56
表二、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類脾臟 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體檢測結果	57
表三、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類脾臟感染 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體種類及比率	58
表四、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類脾臟 <i>Anaplasma</i> & <i>Ehrlichia</i> 立克次體檢測結果	59
表五、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類脾臟 <i>Anaplasma</i> & <i>Ehrlichia</i> 立克次體檢測陽性率	60
表六、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類脾臟感染 <i>Anaplasma</i> spp. 及 <i>Ehrlichia</i> spp. 種類及比率	61
表七、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類脾臟感染 <i>Anaplasma</i> spp. 及 <i>Ehrlichia</i> spp. 種類及數量	61
表八、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類 Buffy coat <i>Anaplasma</i> & <i>Ehrlichia</i> 立克次體檢測結果	62
表九、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類 Buffy coat <i>Anaplasma</i> & <i>Ehrlichia</i> 立克次體檢測陽性率	63
表十、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類 Buffy coat 感染 <i>Anaplasma</i> spp. 及 <i>Ehrlichia</i> spp. 種類及比率	63
表十一、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類 Buffy coat 感染 <i>Anaplasma</i> spp. 及 <i>Ehrlichia</i> spp. 種類及數量	64
表十二、 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體細胞培養結果	64
表十三、金門縣 ticks flagging 定期採集結果	65
表十四、103 年金門 flagging tick 蜱媒檢測	67

摘要

關鍵詞：蜱，蜱媒立克次體，無形體症，斑點熱，台灣

為分離培養台灣地區無形體症(*Anaplasmosis*)及斑點熱(*Spotted fever*)立克次體菌株，以 *ompB* & *gltA* nested PCR 檢測105年採集自金門縣、連江縣及澎湖縣共500隻鼠類脾臟 *Rickettsia* 屬立克次體，結果有18隻陽性，分別是金門縣3隻小黃腹鼠(*Rattus losea*)及1隻錢鼠(*Suncus murinus*) 檢出序列近似 *Rickettsia rickettsii* 382/382(100%)、*Rickettsia typhi* 298/299(99%)及 *Rickettsia felis* 299/299(100%)；連江縣3隻小黃腹鼠檢出序列近似 *Rickettsia typhi* 299/299(100%)及 *Rickettsia felis* 299/299(100%)；澎湖縣5隻小黃腹鼠、4隻錢鼠及2隻家鼯鼠(*Mus musculus*) 檢出序列近似 *Rickettsia felis* 382/382(100%)、*Rickettsia rickettsii* 382/382(100%)及 *Rickettsia typhi* 299/299(100%)。相同檢體以 *Anaplasma* & *Ehrlichia* real time PCR 檢測，有253隻鼠類陽性，平均陽性率為50.60%，以小黃腹鼠陽性率最高(58.22%)，其次為錢鼠(26.17%)。鼠類感染立克次體菌株最多為 *Anaplasma phagocytophilum*，佔全部之49.01%，其次為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (37.15%) 及 *Uncultured Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 (9.09%)。3種被檢測出感染 *Anaplasma* & *Ehrlichia* 的鼠種中，小黃腹鼠感染4種立克次體菌株最多，而溝鼠(*Rattus norvegicus*)只有1種。金門縣與連江縣檢測出數量較多為 *Anaplasma phagocytophilum*，其次為

Candidatus Neoehrlichia mikurensis，兩者依目前16S rRNA gene及groESL gene全長序列分析尚無法確認其病原性。

Abstract

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

In order to isolate rickettsiae of anaplasmosis and spotted fever from Taiwan, a total of 500 rodent spleen samples from Kinmen, Lienching and Penghu Counties were detected by *ompB* and *gltA* nested PCR and Anaplasma & Ehrlichia real time PCR. Fifteen *Rickettsia* strains were found including sequence similar to *Rickettsia rickettsii* 382/382(100%), *Rickettsia typhi* 298/299(99%) and *Rickettsia felis* 299/299(100%) from 3 *Rattus losea* and 1 *Suncus murinus* in Kinmen County; *Rickettsia typhi* 299/299(100%) and *Rickettsia felis* 299/299(100%) from 3 *R. losea* in Lienching County; *Rickettsia felis* 382/382(100%), *Rickettsia rickettsii* 382/382(100%) and *Rickettsia typhi* 299/299(100%) from 5 *R. Losea*, 4 *S. murinus* and 2 *Mus musculus* in Penghu County. In addition, 253 *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. were discovered, the average positive rate was 50.60%, *Rattus losea* showed the highest rate (58.22%), followed by *S. Murinus* (26.17%). *Anaplasma phagocytophilum* was the most frequent found strain (49.01%), followed by *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (37.15%) and Uncultured *Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 (9.09%). Among Anaplasma & Ehrlichia infected rodents, four *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. strains were found in *R. losea*, whereas only one strain was found in *Rattus norvegicus*. We could find *Anaplasma phagocytophilum* and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* distributed more abundant in Kinmen and Lienching Counties. According to full length 16S rRNA gene and groESL gene

of these two Taiwan strains, their pathogenicity still need to be confirmed.

前言

人類粒球無形體症(human granulocytic anaplasmosis, HGA), 人單核球艾利希氏體症(human monocytic ehrlichiosis, HME)及斑點熱(spotted fever)為臨床症狀類似, 流行病學與病因學迥異的蜱媒立克次體疾病(Tickborne rickettsial diseases, TBRD)。HGA 的病原體為 *Anaplasma phagocytophilum*, HME 的病原體為 *Ehrlichia chaffeensis* 皆屬於立克次體目(Rickettsiales)之無形體科(Anaplasmataceae), 而斑點熱的病原體則為一群立克次體(spotted fever group rickettsia, SFGR)屬於立克次體目(Rickettsiales)之立克次體科(Rickettsiaceae)。無形體科(Anaplasmataceae)除 *A. phagocytophilum*、*E. chaffeensis* 外尚包括 *E. ewingii*、*E. canis* 及 *Neorickettsia sennetsu* 等, 其攻擊人類的標的為循環系統中的白血球。*A. phagocytophilum* 引起人類粒球無形體症(human granulocytic anaplasmosis, HGA; 舊稱 human granulocytic ehrlichiosis, HGE); *E. chaffeensis* 造成人單核球艾利希氏體症(human monocytic ehrlichiosis, HME)¹⁻³; 而造成犬類粒球艾利希氏體症(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 ehrlichiosis⁴; *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^{5,6}。近年來有許多新的艾利希氏體陸續被發現，如 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 在 2000 年左右曾報告發現於中國與日本的溝鼠(*Rattus norvegicus*)，日本的卵形硬蜱(*Ixodes ovatus*)及荷蘭的篋豆硬蜱(*Ixodes ricinus*)⁷，而其對人的致病性則在 2010 年由 3 名德國、瑞典及瑞士的患者身上被發現⁸⁻¹⁰。

HGA 及 HME 在日本、韓國、中國、英國、中歐的斯洛凡尼亞(Slovenia)及美國皆有報告病例^{6,11,12}。在美國多發生於 5 至 8 月，2008 年的報告病例 HGA 有 1009 例；HME 有 957 例，其死亡率並不高 HGA 約 0.7%，HME 約 3%，且多發生在免疫不全病人或合併其他疾病如糖尿病之患者¹³。

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⁶。HME 之病媒為 *Amblyomma americanum*，犬及鹿可能為其貯主。

HGA 及 HME 的診斷可經由血液塗抹片、PCR、細胞培養及血清學檢測。其中發病小於 1 週的患者以 PCR 敏感性最高約 60-90%，發病超過 3 週的患者經由血清抗體陽轉 4 倍上升，敏感性可達 95% 以上¹³。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¹⁴⁻¹⁷。

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%¹⁸⁻²⁰。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²¹。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²²。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²³。翁等(2010)調查金門地區鼠類外寄生蜱發現於小黃腹鼠採集之鐮形扇頭蜱(*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%²⁴。並在 2012 年於金門 108 隻野鼠發現體內肝脾等內臟 *E. chaffeensis* DNA 感染率為 14.8%²⁵。

無形體症(Anaplasmosis)或稱邊蟲症，在動物界最常見為牛邊蟲症，病原體為 *Anaplasma marginale*。A. *marginale* 排列於感染紅血球之邊緣，1 個、2 個或以上呈圓或橢圓形，在電子顯微鏡下呈分葉狀，只在紅血球內發現，

故稱邊蟲。但另一種 *A. marginale* ssp. *Centrale* (*A. centrale*) 則寄生在紅血球細胞質中央，病原性較弱²⁶。*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²⁷。

本署在 2011-2013 年對台灣環境中的 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 進行調查，發現鼠蟬、狗蟬(血紅扇頭蟬 *Rhipicephalus sanguineus*) 及野生動物外寄生蟬 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 19.75%、11.94% 及 35.8%。共檢出 18 種 *Anaplasma* spp. & *Ehrlichia* spp.，其中已知有 8 種可能為人畜致病性(*A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. bovis*, *A. marginale*, *A. centrale*, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*)；另在鼠類脾臟及血液中 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 64.13% 及 47.25%。在這些檢出的 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 中人類重要的病原體 *A. phagocytophilum* 在鼠蟬、狗蟬及野生動物外寄生蟬中 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 2.62%、8.36% 及 13.89%；鼠類脾臟及血液 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 14.13% 及 4.40%。人群檢體的部份，檢驗 100-101 年金門縣恙蟲病通報病例 *A. phagocytophilum* 血清抗體陽性率為 19.7% (57/289)，而對照組血清抗體陽性率 6.38% (3/47)，具有顯著性差異($X^2=4.9$, $p=0.0268$)，同時在 87 個配對血清中發現 12 個病例兩次採血 *A. phagocytophilum* 血清抗

體效價有四倍上升，顯示金門地區發燒病人確實需要注意是否為人顆粒球無形體症。翁等(2015)調查金門地區鼠類亦發現 *A. phagocytophilum* 在鼠類肝脾盛行率為 17.2%²⁸。

斑點熱是一種世界性散發的立克次體疾病，主要是經由蜱(ticks)、蟎(mites)及跳蚤(fleas)的媒介而使人得病。引起斑點熱的病原體種類繁多且不斷的有新的種類被發現，早期發現的如發生在美國、加拿大及墨西哥等地，由 *Rickettsia rickettsii* 引起的洛磯山斑點熱(Rocky mountain spotted fever)；發生在非洲、印度及地中海沿岸，由 *R. conorii* 引起的蒲東熱(Boutonneuse fever)、肯亞蜱熱(South African tick typhus)，發生在澳洲，由 *R. australis* 引起的昆士蘭蜱熱(Queensland tick typhus)；發生在美國、韓國、烏克蘭及克羅埃西亞，由 *R. akari* 引起的立克次體痘及發生在日本，由 *R. japonica* 引起的日本斑點熱(Japanese spotted fever)等²⁹⁻³¹。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^{32,33}。台灣第一例斑點熱病例報告為 2006 年 5

月自南非旅遊回來，感染 *R. africae* 之境外移入個案^{34,35}，而第一例斑點熱之本土病例報告也已出現證實感染 *R. felis*³⁶，同時野外貓蚤族群之 *R. felis* 感染率，單隻貓蚤平均感染率為 18.8%(13/69)，亦於流浪貓中檢測出血清抗 *R. felis* IgG 抗體效價為 1:320³⁷。而人群斑點熱血清流行病學調查，在台南的盛行率調查為 3.5-4.4%³⁸，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%³⁹。本署前身疾病管制局 2005 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，11 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* (1:64), *R. rickettsii* (1:4,096), *R. australis* (1:1,024), *R. montanensis* (1:512), *R. honei* (1:1,024), *R. japonica* (1:1,024), *R. canadensis* (1:128), *R. prowazekii* (1:128), *R. massiliae* (1:2,048), *R. belli* (1:1,024) 及 *R. conorii* (1:512)；另 8 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* (1:128), *R. australis* (1:64), *R. montanensis* (1:1,024), *R. honei* (1:512), *R. prowazekii* (1:128), *R. massiliae* (1:1,024), *R. conorii* (1:4,096) 及 *R. akarii* (1:128)⁴⁰。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，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. helvetica*，同時亦於龜形花蜱 (*Amblyomma testudinarium*) 分離出新的斑點熱立克次體菌株 *R. anan*^{41,42}。在韓國亦從長角血蜱 (*Haemaphysalis longicornis*) 檢測出 *R. japonica* 及 *R. rickettsia*^{43,44}，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⁴⁵。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⁴⁶，是否有蜱種攜帶 *Rickettsia* 屬立克次體，在鼠類間造成傳播循環甚至叮

咬人成為病媒，都是值得探究的。

本署在 2006-2010 年對台灣地區低海拔鼠類進行 *Rickettsia* 屬立克次體調查，採集之 1283 隻鼠類血清以 3 種立克次體抗原玻片 (*Rickettsia rickettsii*、*R. conorii* 和 *R. typhi*) 進行血清學檢測。結果發現小黃腹鼠斑點熱立克次體抗體陽性率離島、東部、西部分別為 94.5%、94.4% 及 94.8%，非常相近；所有鼠種地方性斑疹傷寒立克次體抗體陽性率以離島最高為 3.42%，其次為西部 1.89%，東部最低為 1.53%，顯示台灣離島野外鼠類感染地方性斑疹傷寒立克次體有偏高的現象。鼠類本身及其外寄生節肢動物是否帶有 *Rickettsia* 屬立克次體，取其鼠類內臟以 120-135 kDa surface antigen (*ompB*) 及 citrate synthase (*gltA*) 為基因標的進行 *Rickettsia* 屬立克次體 nested-PCR 檢測，離島、東部、西部鼠類脾肝腎臟中平均偵測出 *Rickettsia* 屬立克次體的比例為 61.1%、70.4% 及 49%，顯示這些野外鼠類皆有成為 *Rickettsia* 屬立克次體傳染窩(reservoir)的可能性。而 *Rickettsia* 屬立克次體在採自台灣地區蜱、恙蟎、跳蚤及厲蟎的 nested-PCR 的陽性率分別為 31.9%、37.4%、26.9% 及 20.7%。於台中縣採獲之板齒鼠血蜱及嗜龜花蜱(*Amblyomma geoemydae*) 及台東採獲的粒形硬蜱分別培養出斑點熱立克次體，經由幾個重要的基因如 *ompA* 及 *ompB* 與目前已知斑點熱立克次體菌株序列不同，研判為三株新的斑點熱立克次體菌株序列。所有檢測出之 500 株 *Rickettsia* 屬立克次體菌

株序列進行親緣關係分析，結果可分成 10 群，其中以近似 *R. conorii* 的菌株最多，佔 37.43%，其次為近似 *Rickettsia* sp. MB74-1 的菌株，佔 22.91%。
R. conorii 為重要的病原株，由於檢體 DNA 含量少，無法進行基因全長定序增幅及確認。

本研究計畫為期 2 年，藉由先前調查資料進行捕鼠採檢，以分離培養 *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. 及 *Rickettsia* spp. 為主要目標，以 16S rRNA, p44/msp2, *gltA* 及 *groESL* 進行 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 特性分析；在 *Rickettsia* spp. 部分則使用 190 kDa surface antigen (*OmpA*)、120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)、citrate synthase (*gltA*)、17 kDa antigen gene (*htrA*)、16S rRNA 及 gene D，透過這幾個基因之全長序列比對可分辨出所有 *Rickettsia* 屬種類，甚至可以區分出新的 *Rickettsia* 菌株(Fournier *et al.*, 2003)。期望以此分離出更多的本土型菌株納入本署病原體基因資料庫及加入例行的血清學檢驗中以提高人類感染的檢出率。

材料與方法

一、樣本採集地點

樣本之採集分為台灣本島及離島，與「台灣蜚媒病毒監測與蜚種基因庫建立 MOHW105-CDC-C-315-133120」計畫共同使用採集檢體。103-104 年已採集桃園縣、台中市、雲林縣、台南市、屏東縣等西部縣市及宜蘭縣、花蓮縣及台東縣等東部縣市檢體採集；今年進行連江縣、金門縣及澎湖縣三離島採集。

二、採集方法及檢體處理

1. 捕鼠及血清採集：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) 80 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，心臟採血後將血液置於室溫 1 小時後，以 3000 rpm，10 分鐘離心，分離血清至預先標示好的冷凍小瓶，冷凍於-20°C 的冰箱。
2. 鼠類器官採集：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 8 mm³ 組織塊置於內含 70% 酒精之 2 ml 檢體小管中，再取 125 mm³ 組織塊置於 2 ml 檢體小管中，於乾冰之保溫箱或液態氮桶保存，帶回實驗室，準備進行蜚媒立克次體檢測及分離。

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

4. 鼠類 buffy coat 萃取：

- (1) 將捕獲鼠類抽取 1~3ml 血液置於 3ml K3-EDTA 採血管中，混合均勻，保存於 4 $^{\circ}$ C。
- (2) 每支血液檢體準備 3 支 15ml 離心管，標上編號，並分別加入 4ml PBS、5ml Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, 17-1440-03) 及 6ml PBS。
- (3) 以無菌 3ml 滴管，將血液檢體加到 4ml PBS，混合均勻。
- (4) 將步驟 3 混合液沿著管壁緩慢加到 5ml Ficoll，不可混勻，以 2500rpm 離心 25min，離心後的中間白色層為 buffy coat。
- (5) 以無菌 3ml 滴管吸取中間白色層 buffy coat，加到 6ml PBS 混合均勻，以 2000rpm 離心 10min，倒掉上清液，取得的 pellet 即為 buffy coat。
- (6) 取 0.8ml IMDM (20%FBS, 10%DMSO) 加到 pellet 管中，混合均勻。
- (7) 步驟 6 之 200 μ l 將萃取 DNA，並進行 Anaplasma & Ehrlichia real time

PCR 檢測。其餘 600µl 分裝至 2 支 2ml 冷凍小管，每支各 300µl，保存於-80°C。

三、Anaplasma & Ehrlichia PCR 檢測方法

1. Anaplasma & Ehrlichia real time PCR：參考 Parola *et al.*(2000)的方法⁴⁷，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。

2. *Anaplasma phagocytophilum* p44/msp2 nested PCR：參考 Ohashi *et al.* (2013)

的方法⁴⁸，基因標的為 p44/msp2

第一次 PCR primer

p3726F: GCTAAGGAGTTAGCTTATGA

p4257R: AGAAGATCATAACAAGCATTG

第二次 PCR primer

p3761F: CTGCTCTKGCCAARACCTC

p4183R: CAATAGTYTTAGCTAGTAACC

PCR 反應流程為：先於 94°C，預熱 3 min；再依序進行 94°C (1 min)/ 55°C (1 min)/ 72°C (2 min) 之循環，一共 40 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。

四、*Rickettsia* 屬之立克次體 nested-PCR 檢測

1. 參考 Choi *et al.*(2005)之方法⁴⁹，並略加修正。偵測 *Rickettsia* 屬之立克次體的標的基因為 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)、citrate synthase (*gltA*)。
2. 增幅 citrate synthase (*gltA*)：第一次 PCR 每一管 0.5 ml 微量離心管依序加入含有 17.5 µl 去離子水、10 µl 之 5X PCR buffer (Promega)、2 µl 之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200 µM)、3 µl 之 25 mM MgCl₂ (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、6 µl 之 3.3 µM primer RpCS.877p : 5'-GGGGGCCTGCTCACGGCGG-3' 及 primer RpCS.1258n : 5'-AATGCAAAAAGTACAGTGAACA-3' (引子之終濃度為 400 nM)、3 µl 之 DNA 模板及 0.5 µl 酵素 Taq (Promega) (5 U/µl) (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 µl 之 3.3 µM primer RpCS.896：5'-GGCTAATGAAGCAGTGATAA-3' 及 primer RpCS.1233n：5'-GCGACGGTATACCCATAGC-3' (引子終濃度為 200 nM)，其餘反應液如同第一次。PCR 的反應流程中之溫度循環條件與第一次相同，一共進行 35 循環。

3. 增幅 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*): 第一次 PCR 每一管 0.5 ml 微量離心管依序加入含有 17.5 µl 去離子水、10 µl 之 5X PCR buffer (Promega)、2 µl 之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200 µM)、3 µl 之 25 mM MgCl₂ (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、6 µl 之 3.3 µM primer rompB OF：5'-GTAACCGGAAGTAATCGTTTCGTAA-3' 及 primer rompB OR：5'-GCTTTATAACCAGCTAAACCACC-3' (引子之終濃度為 400 nM)、3 µl 之 DNA 模板及 0.5 µl 酵素 Taq (Promega) (5 U/µl) (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 µl 之 3.3 µM primer rompB SFG IF：5'-GTTTAATACGTGCTGCTAACCAA-3'，primer rompB SFG/TG IR：

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

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

五、 *Rickettsia* 屬之立克次體選殖與定序

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⁵⁰⁻⁵³。

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

(一) TOPO cloning reaction

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

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

1. 取 1.5cc 之 eppendorf，加入約 15µl 之 One shot chemically Competent *E.coli* (invitrogen, USA)，再加入 2µl 作用後之混合物，以 tip 尖輕攪混合之，插於冰上使其作用約 5-30 分鐘(通常 15 分鐘即可)。
2. 將作用後產物置於 42°C 水浴槽中進行 heat shock，40 秒後馬上取出置於冰上使其急冷約五分鐘，目的在使 plasmid 進入 Competent cell 中。
3. 每管加入 250 µl 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 µl 滴於預熱後之 plate 上，加入玻璃珠輕搖，

使其均勻塗布於 plate 上。建議每個 sample 可塗布兩個 plate，滴上不同液量如 50、100 μ l，較有機會得到生長良好的 colony。塗布後將玻璃珠倒入 70 % 酒精中回收。

6. plate 置於 37°C 中培養 overnight。

(三)檢查 transformation 結果

1. 檢查前一天之 plate 生長情形，挑選生長良好之 plate。
2. 以 loop 輕挑單一 colony，塗布於新的 medium 上使其生長。
3. 塗布過之 loop 加入 PCR reagent 中輕搖，以 M13F 及 M13R 為 primer，可作為 template 進行 PCR 反應，測試轉型是否成功，PCR 產物進行定序與分析。

六、老鼠組織 *Rickettsia* 屬之立克次體分離培養

(一) L929 細胞繼代培養

1. 以 37°C 水浴 preheat MEM 培養液及 0.25% Trypsin-EDTA。MEM 培養液的組成為(Minimum Essential Medium 1X+ Earle's salts+ L-Glutamine) 外加 4%FBS(Fetal Bovine Serum) 及 1% Antibiotic(Penicillin 10,000units/ml, Streptomycin 10mg/ml, Amphotericin 0.025mg/ml)
2. 原 75T flask 中細胞培養至八分滿以上，倒乾或吸乾 flask 中的培養液。
3. 加入 2~3cc 之 Trypsin-EDTA，緩緩搖晃 flask 使 Trypsin-EDTA 均勻分

布，待 Trypsin-EDTA 顏色開始變黃後，吸去 Trypsin-EDTA 至餘 0.2~0.3cc，蓋上瓶蓋置入 37°C 培養箱 2~3 分鐘。

4. 取出 flask，可先以些許 MEM 輕輕沖洗 L929 細胞再吸起，視細胞生長情形及實驗需求決定稀釋比例，以 1:6 為例，取 12cc MEM 由 flask 底部開始沖洗，反覆吸放，可分四至五個區域將整個 flask 沖洗一次，至底部 L929 細胞均勻分布在 MEM 中為止。

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

(二) Shell vial 細胞培養

1. 以 37°C 水浴 preheat MEM 培養液及 Trypsin-EDTA，shell vial 空瓶先置於架上以 UV 燈殺菌半小時以上。

2. 75T flask 中細胞培養至八分滿以上，倒乾或吸乾 flask 中的培養液。

3. 加入 2~3cc 之 Trypsin-EDTA，緩緩搖晃 flask 使 Trypsin-EDTA 均勻分布，待 Trypsin-EDTA 顏色開始變黃後，吸去 Trypsin-EDTA 至餘 0.2~0.3cc，蓋上瓶蓋置入 37°C 培養箱 2~3 分鐘。

4. 取出 flask，可先以些許 MEM 輕輕沖洗 L929 細胞再吸起，視細胞生長情形及實驗需求決定稀釋比例，一般八成以上細胞可先以約 10cc MEM 由 flask 底部開始沖洗，反覆吸放，分四至五個區域將整個 flask 沖洗

一次，至底部 L929 細胞均勻分布在 MEM 中為止。

5. 計數細胞：取 0.1cc 細胞懸浮液加入 0.9cc MEM，吸取 0.5cc，加入 0.5cc 之 Trypan blue，即得稀釋 20 倍之細胞稀釋液，取一滴輕滴在血球計數器上，蓋上蓋玻片後在顯微鏡下進行細胞計數。
6. 培養所需濃度約為每 cc 中含 5×10^8 個細胞，依此比例以 MEM 稀釋。每個 shell vial 需要 1cc 細胞液。
7. 將細胞液加入 shell vial 中，並略側瓶身輕搖，去除玻片底部氣泡以免玻片傾斜影響細胞的貼附。
8. 蓋上瓶蓋，但瓶蓋懸開，置入 37°C , 5% CO_2 培養箱中培養一日以上。

(三) 老鼠組織接種 shell vial

1. 1 g 老鼠肝、脾、腎組織置入微量離心管，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。
2. 取前一日培養之 shell vial，每個 shell vial 加入 400 μl 研磨液進行接種，以剩餘研磨液萃取 DNA 進行 PCR。
3. 將 shell vial 於 32°C ，700xg 離心一小時，使立克次體進入 L929 細胞。
4. 丟棄 shell vial 離心後的上清液，加入 1cc MEM 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。

七、鼠類 buffy coat 接種 HL-60 細胞進行 *Anaplasma phagocytophilum* 分離培養

1. 事先準備好培養於 T25 flask 的 HL-60 細胞 (5×10^5 cells/ml, 4ml)，使用 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, GlutaMAX™ Supplement; gibco) 或 Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 Medium, HEPES; gibco) 做為培養液，內含 10% Fetal Bovine Serum (Fetal Bovine Serum, qualified, US origin; gibco) 及 1% Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (Antibiotic-Antimycotic, 100X; gibco)，培養於 37°C、5% CO₂ 培養箱。
2. 將保存於 -80°C 之 300µl 鼠類 buffy coat，直接置於室溫水浴 1 min 進行解凍，接種於 HL-60 細胞盤，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱進行培養數天。
3. 每 3~4 天於顯微鏡下觀察細胞狀態，補充新鮮培養液或更換為新鮮培養液，將細胞密度控制在 $5 \times 10^5 \sim 10^6$ cells/ml；並取 1ml 進行 DNA 萃取及 *Anaplasma* & *Ehrlichia* real time PCR 檢測，確認 *Anaplasma phagocytophilum* 是否順利生長。
4. 每 7 天進行 IFA 檢測，確認 *Anaplasma phagocytophilum* 感染 HL-60 細

胞之比率。待感染比率大於 50%，再加入新鮮未感染之 HL-60 細胞進行放大培養。

結果

一、樣本採集

捕鼠採集：與主持人另一項計畫(台灣蜚媒病毒監測與蜚種基因庫建立 MOHW104-CDC-C-315-133120)共同使用採集檢體。105 年 1 月及 7 月金門縣 4 鄉鎮捕鼠，捕獲鼠類 255 隻；105 年 3 月及 9 月至連江縣 2 鄉鎮捕鼠，捕獲鼠類 188 隻；105 年 5 月澎湖縣 4 鄉鎮捕鼠，捕獲鼠類 75 隻，合計 518 隻(表一)。

二、鼠類宿主動物蜚媒立克次體檢測

(一) *Rickettsia* 屬立克次體檢測：105 年金門縣 239 隻鼠類脾臟 *Rickettsia* *OmpB* 及 *gltA* nested PCR，有 2 隻小黃腹鼠(*Rattus losea*)的 *OmpB* nested PCR 為陽性，定序後 Blast 結果皆為 *Rickettsia rickettsii*, 382/382(100%)；有 1 隻小黃腹鼠及 1 隻錢鼠(*Suncus murinus*)的 *gltA* nested PCR 為陽性，定序後 Blast 結果分別為 *Rickettsia typhi*, 298/299(99%)及 *Rickettsia felis*, 299/299(100%)。連江縣 133 隻鼠類脾臟 *Rickettsia OmpB* 及 *gltA* nested PCR，有 3 隻小黃腹鼠的 *gltA* nested PCR 為陽性，定序後 Blast 結果有 2 隻為 *Rickettsia typhi*, 299/299(100%)，有 1 隻為 *Rickettsia felis*, 299/299(100%)。澎湖縣 73

隻鼠類脾臟 *Rickettsia OmpB* 及 *gltA* nested PCR，有 3 隻小黃腹鼠、3 隻錢鼠及 2 隻家鼯鼠(*Mus musculus*)的 *OmpB* nested PCR 為陽性，定序後 Blast 結果分別為 *Rickettsia felis* 382/382(100%)(3 隻小黃腹鼠、2 隻錢鼠、2 隻家鼯鼠)，*Rickettsia rickettsii* 382/382(100%)(1 隻錢鼠)；有 2 隻小黃腹鼠及 1 隻錢鼠的 *gltA* nested PCR 為陽性，定序後 Blast 結果皆為 *Rickettsia typhi* 299/299(100%) (表二)。共 18 支陽性檢體有 11 隻來自小黃腹鼠，5 隻來自錢鼠，2 隻來自家鼯鼠。檢出 3 種 *Rickettsia* 屬立克次體，以 *Rickettsia felis* 數量最多佔 50%，其次為 *Rickettsia typhi* (33.33%)，*Rickettsia rickettsii* 佔 16.67% (表三)。

(二) Anaplasma & Ehrlichia 檢測：

1. 鼠類脾臟 Anaplasma & Ehrlichia 檢測：105 年金門縣 239 隻鼠類脾臟 Anaplasma & Ehrlichia real time PCR，有 130 個陽性，分別為 124 隻小黃腹鼠、2 隻溝鼠(*Rattus norvegicus*)及 4 隻錢鼠。定序後 Blast 結果小黃腹鼠有 57 個為 *Anaplasma phagocytophilum* strain rod-D3006 16S rRNA gene 305/305(100%)，44 個 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* gene for 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)，22 個 Uncultured *Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 16S rRNA gene 303/305(99%)，1 個 *Ehrlichia* sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)；

溝鼠有 2 個 *Anaplasma phagocytophilum* strain rod-D3006 16S rRNA gene 305/305(100%)；錢鼠有 3 個 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)，1 個 *Ehrlichia* sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)。連江縣 188 隻鼠類脾臟 *Anaplasma* & *Ehrlichia* real time PCR，有 111 個陽性，分別為 87 隻小黃腹鼠及 24 隻錢鼠。定序後 Blast 結果小黃腹鼠有 64 個為 *Anaplasma phagocytophilum* strain rod-D3006 16S rRNA gene 305/305(100%)，23 個為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)，而在錢鼠檢出 14 個 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)，6 個 *Ehrlichia* sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)，4 個 *Neorickettsia* sp. 2960 16S rRNA gene 305/305(100%)。澎湖縣 73 隻鼠類脾臟 *Anaplasma* & *Ehrlichia* real time PCR，有 12 個陽性，皆為小黃腹鼠。定序後 Blast 結果為 10 個 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)，1 個 *Anaplasma phagocytophilum* strain rod-D3006 16S rRNA gene partial sequence, 305/305(100%)，1 個 Uncultured *Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 16S rRNA gene 303/305(99%) (表四)。共檢出 252 個陽性檢體，其中絕大多數來自小黃腹鼠(223 個，陽性率 58.22%，佔陽性總數 88.14%)，

少數來自錢鼠(28 個，陽性率 26.17%，佔陽性總數 11.07%)及溝鼠(2 個，陽性率 100%，佔陽性總數 0.79%)，家鼯鼠(*Mus musculus*)未檢出，平均鼠類陽性率為 50.60% (表五)，其中金門縣、連江縣及澎湖縣分別為 54.39%(130/239)、59.04%(111/188)及 16.44%(12/73)。檢出 5 種 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp.，其中以 *Anaplasma phagocytophilum* 數量最多(124 個)，佔陽性檢體 49.01%，其次為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (94 個)，佔陽性檢體 37.15%；*Anaplasma* sp. ZJ05/2009 有 23 個，佔陽性檢體 9.09%；*Ehrlichia* sp. 360 有 8 個，佔陽性檢體 9.09%；*Neorickettsia* sp. 2960 有 4 個，佔陽性檢體 1.58%。小黃腹鼠感染以 *Anaplasma phagocytophilum* 居多 54.71%，而錢鼠則多為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (60.71%) (表六)。金門縣、連江縣及澎湖縣菌株的分布不同，金門縣及連江縣以 *Anaplasma phagocytophilum* 佔多數，*Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 其次，澎湖縣則以 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 佔多數，金門縣同時有為數不少的 *Anaplasma* sp. ZJ05/2009，而 *Neorickettsia* sp. 2960 僅發現在連江縣(表七)。

2. 鼠類 Buffy coat *Anaplasma* & *Ehrlichia* 檢測：完成 105 年金門縣 223 隻鼠類 Buffy coat *Anaplasma* & *Ehrlichia* real time PCR，有 132 個陽

性，分別為 128 隻小黃腹鼠、2 隻溝鼠及 2 隻錢鼠。定序後 Blast 結果小黃腹鼠有 65 個為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)，25 個 Uncultured *Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 16S rRNA gene 303/305(99%)，32 個 *Anaplasma phagocytophilum* strain rod-D3006 16S rRNA gene 305/305(100%)，6 個 *Ehrlichia* sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)；溝鼠有 2 個 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)；錢鼠有 1 個 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)，1 個 *Ehrlichia* sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)。連江縣 140 隻鼠類 Buffy coat *Anaplasma* & *Ehrlichia* real time PCR，有 99 個陽性，分別為 87 隻小黃腹鼠及 12 隻錢鼠。定序後 Blast 結果小黃腹鼠有 62 個為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)，23 個為 *Anaplasma phagocytophilum* strain rod-D3006 16S rRNA gene 305/305(100%)，2 個 *Ehrlichia* sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)；而在錢鼠檢出 10 個為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)，1 個為 *Ehrlichia* sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)，1 個為 *Neorickettsia* sp. 2960 16S rRNA gene 305/305(100%)。澎湖縣 33 隻鼠類 Buffy coat *Anaplasma* & *Ehrlichia*

real time PCR，有 10 個陽性，皆為小黃腹鼠。定序後 Blast 結果皆為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%) (表八)。鼠類 Buffy coat 檢出結果與脾臟不同，檢出 241 個陽性檢體中，小黃腹鼠的陽性率，Buffy coat (61.44%)與脾臟 (58.22%)相似，而錢鼠陽性率 Buffy coat (53.85%)較脾臟(26.17%)高出許多，平均鼠類陽性率為 60.86%亦較脾臟 (50.60%)高(表九)，其中金門縣、連江縣及澎湖縣分別為 59.19%(132/223)、70.71%(99/140)及 30.30%(10/33)。檢出 5 種 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp.，其中以 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 數量最多(150 個)，佔陽性檢體 62.2%，其次為 *Anaplasma phagocytophilum* (55 個)，佔陽性檢體 22.82%，*Anaplasma* sp. ZJ05/2009 有 25 個，佔陽性檢體 10.37%，*Ehrlichia* sp. 360 有 10 個，佔陽性檢體 4.15%，此種情形亦與脾臟結果不同，可能是血液的環境較適合 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 生長 (表十)。鼠類 Buffy coat 金門縣、連江縣及澎湖縣菌株的分布相似，以 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 佔多數 (表十一)。

三、鼠類宿主動物蜱媒立克次體培養

(一) *Rickettsia*屬立克次體培養：接種台灣本土菌株 *Orientia*

tsutsugamushi TW-1 進行細胞培養練習，確認細胞培養方法建立，隨

後接種5支鼠類組織*OmpB* nested PCR陽性及10支鼠類組織*gltA* nested PCR陽性之研磨液，皆未順利培養成功，可能因檢體病原菌量本就很低。由於近來採集之老鼠組織，其*Rickettsia*屬之立克次體檢測陽性率低，且陽性老鼠組織內之病原菌量本就不高，增加分離培養的困難度；因此，優先將過去從病媒蜱蟎初步分離培養之*Rickettsia*屬立克次體菌液解凍，接種於L929細胞進行shell vial培養，期能增加菌量進而進行全長定序分析。今年，解凍47支過去初步分離培養之*Rickettsia*屬立克次體菌液(79N1C、80-2、976-9、8637m、8727m、8897t、8897tv、8902mv、9072F2t、9072t、9073Ft、9073t、9543、9543N3V、9690-3V、9690-4V、9697、9697-1、9697-3V、9698、9698-1、9698-3V、9699、9700-2V、9701-1、9701-2、9701-4V、9711V、9712V、9716-1、9716-2、9716V-1、9776-6、10584F4V、10584F6V、10584N3V、10584N4V、10584R1、10584F3、C008NV、E012-14V、Freet、JP、JPL929、JPV、JPV1及JPV2)進行接種培養。其中JP菌液(原液Ct值19.65)在培養兩個月後進行17kDa QPCR檢測，其Ct值有下降至17.78；C008NV菌液(原液Ct值30.99)第一次解凍培養兩個多月後，其Ct值上升至36.5，再次解凍培養後，其Ct值降到31.58；JPL929菌液(原液Ct值20.98)培養兩個禮拜後，其Ct值降到17.57，仍在培養中；9073t菌

液(原液Ct值29)培養一個月後未見Ct值下降，但仍測得Ct值，持續培養中(表十二)。

(二) *Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp.培養：

104年經病媒病毒及立克次體實驗室的協助建立培養技術，以IMDM (20%FBS)為培養液，將鼠類buffy coat接種於HL-60 (10^6 cells/T25，共4ml)以培養 *Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp.，有10株初步培養成功先行冷凍保存；105年挑選幾支菌液解凍培養，卻未能順利培養較多菌量。104-105年有17支鼠脾臟研磨液及73支鼠buffy coat接種於HL-60細胞進行培養，培養過程中，也以IFA檢測 *Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp.感染與否，結果皆未順利培養成功。培養過程遇到汙染、細胞太滿不健康等問題，大部分在培養至兩星期左右進行EHR16S QPCR檢測時便無Ct值，其中除了以Antibiotic-Antimycotic (Streptomycin, Penicillin, Amphotericin B)解決汙染問題，亦更換培養液及降低FBS濃度，期能藉由降低HL-60細胞生長速度，使 *Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp.較易感染及生長；以IMDM (10%FBS)、IMDM (5%FBS)、RPMI (10%FBS)及RPMI (5%FBS)培養，仍見HL-60細胞生長速度遠大於 *Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp.；以IMDM (2%FBS)進行培養，雖能降低HL-60細胞生長速度，但細胞狀況較

不健康容易死亡。此外，亦嘗試使用 EasySep™ Human Pan-Granulocyte Isolation Kit (STEMCELL, Catalog #19259)於鼠全血直接進行 granulocyte 萃取，期能藉由得到較多 *Anaplasma phagocytophilum* 以增加培養成功率，目前仍在進行中。

四、*Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp. 16S rRNA gene 及 groESL 全長序列增幅、定序及親緣樹譜分析

來自花蓮、台東鬼鼠、小黃腹鼠及金門、連江、澎湖小黃腹鼠的 Buffy coat，目前已完成 10 支之 *Anaplasma phagocytophilum* 16S rRNA gene 1420bp 序列定序，19 支之 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene 1425~1427bp 序列定序，及 20 支之 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* GroESL 1232bp 序列定序。由親緣樹譜分析，*Anaplasma phagocytophilum* 16S rRNA gene 大致分成 4 個 cluster，來自連江、金門小黃腹鼠 Buffy coat 及粒形硬蜱(*I. granulatus*)、台灣卵形硬蜱(*Ixodes ovatus*)及其他國家的 *Anaplasma phagocytophilum* 16S rRNA gene 在一個 cluster；來自花蓮、台東鬼鼠、小黃腹鼠 Buffy coat 的 *Anaplasma phagocytophilum* 16S rRNA gene 與來自金門、連江小黃腹鼠脾臟的 *Anaplasma phagocytophilum* 16S rRNA gene 在另同一個

cluster，而微小扇頭蜱(*Rhipicephalus microplus*)在單獨一個 cluster (圖一)。*Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene 則相對保守，花蓮、台東鬼鼠、小黃腹鼠及金門、連江、澎湖小黃腹鼠 Buffy coat 的 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene 與來自台灣其他地區小黃腹鼠血液、粒形硬蜱、板齒鼠血蜱(*H. bandicota*)的 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene 與來自日本的溝鼠(*Rattus norvegicus*)、中國大陸的溝鼠、小黃腹鼠在同一個 cluster，歐洲德國、瑞士的菌株在同一個 cluster，日本的野鼠(*Apodemus speciosus*)與俄國遠東的菌株在另一個 cluster (圖二)。20 支來自花蓮、台東鬼鼠、小黃腹鼠及金門、連江、澎湖小黃腹鼠 Buffy coat 的 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* GroESL 與來自日本溝鼠的 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* GroESL 在同一個 cluster，歐洲的菌株在在在同一個 cluster，而中國大陸及俄國遠東的菌株在另一個 cluster (圖三)。

五、103 年金門 flagging tick 蜱媒病原檢測

委請本署台北區管制中心金門辦事處自 103 年 1 月至 12 月在金湖鎮新頭里及金城鎮和平里每月 1-2 次進行草地 flagging 採集，兩地分別採獲 266 隻及 25 隻鐮形扇頭蜱(*Rhipicephalus haemaphysaloides*)(表十

三), 合計 291 隻。進行 *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp. 及 *Borrelia* spp. 等蜱媒病原檢測, 蜱成蟲及若蟲單隻為一池(pool), 幼蟲則同時間同地點 6 隻以下為一池, 共有 71 池。結果 *Anaplasma* & *Ehrlichia* 有 2 個陽性, *Anaplasma platys* 305/305(100%) 及 Uncultured *Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 303/305(99%); *OmpB* 有 4 池陽性, 皆為 *Rickettsia felis* 382/382(100%); *gltA* 有 1 池陽性, *Rickettsia typhi* 299/299(100%); *Borrelia* spp. 有 1 個陽性, *Borrelia valaisiana* strain KM30 171/181(94%), *Babesia* spp. 未檢出陽性。各種蜱媒病原體僅時間、地點零星分佈, 且無共同感染現象(表十四)。

討論

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 Spotted fever Group Rickettsia 等蜱媒疾病，如何增加檢測的敏感度，是本研究想要解決的問題。

在本署 97-99 年研究計畫中，發現取鼠類內臟以 120-135 kDa surface antigen (*ompB*)及 citrate synthase (*gltA*)為基因標的進行 *Rickettsia* 屬立克次體 nested-PCR 檢測，離島、東部、西部鼠類脾肝腎臟中平均偵測出 *Rickettsia* 屬立克次體的比例為 61.1%、70.4%及 49%⁵⁴，而 *Rickettsia* 屬立克次體在採自台灣地區蜱、恙蟎、跳蚤及厲蟎的 nested-PCR 的陽性率分別為 31.9%、37.4%、26.9%及 20.7%⁵⁵。惟當時由鼠類內臟或外寄生蟲所獲得的 *Rickettsia* 屬立克次體 DNA 濃度太低，不足以進行多種基因標的的序列分析，且雖嘗試由蜱研磨培養 *Rickettsia* 屬立克次體，但可能由於蜱體內有許多其他細菌，使細胞培養污染情形嚴重，導致培養結果不理想。為取得大量 *Rickettsia* 屬立克次體，進行多種基因標的的序列分析並研判是否為新菌株，本計畫希冀藉由無菌取得鼠類全血及內臟，以減少細胞培養污染情形。然而經三年台灣東西部及離島捕鼠採集，在 968 隻鼠類中脾臟檢測卻只有 21 隻陽性，

陽性率 2.17%，遠低於預期。經檢討檢測方法前後並無改變，將 97-99 年採集保存鼠類內臟檢體仍可檢測出 *Rickettsia* 屬立克次體，為何幾年內環境中 *Rickettsia* 屬立克次體急遽減少原因尚不清楚。

Rickettsia 屬立克次體培養常使用 L929 細胞，尤其以 shell vial 培養技術之培養成功率較高。本研究於 105 年解凍過去初步分離培養之 *Rickettsia* 屬立克次體菌液，及接種日本斑點熱立克次體(*Rickettsia japonica*)菌液成功培養較多 *Rickettsia japonica*，未來可利用 PacBio 定序平台進行全長定序分析；此外，C008NV 菌液培養一輪後再次解凍培養，亦能成功培養出較多 *Rickettsia* sp. TwKM01 菌量，顯示若長期培養下去，或許能得到較多菌量以進行後續實驗，未來再進行鼠類內臟檢體 *Rickettsia* 屬立克次體培養。

本署在 100-102 年對台灣環境中的 *Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp.進行調查，發現鼠蟬、狗蟬(血紅扇頭蟬 *Rhipicephalus sanguineus*)及野生動物外寄生蟬 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 19.75%、11.94%及 35.8%。共檢出 18 種 *Anaplasma* spp.& *Ehrlichia* spp.，其中已知有 8 種可能為人畜致病性(*A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. bovis*, *A. marginale*, *A. central*, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensi*)；另在鼠類脾臟及血液中 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 64.13% 及 47.25%。今年在離島三縣鼠類脾臟及血液中 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 50.60%

及 60.86%，較去年東西部鼠類脾臟檢出 11.75% 為高，惟以蜱指數分析，離島三縣蜱指數為 0.38，台灣西部為 0.97，東部為 0.07，100-102 年所選取的鼠隻為有蜱寄生的鼠類，顯示其所處環境有較多蜱存在，由於 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 在蜱與動物之間循環，使所選取的鼠類有較高感染機會，而離島三縣除了蜱為傳播媒介外，恙蟲可能也是傳播媒介。

在這些檢出的 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 中人類重要的病原體 *A. phagocytophilum* 在鼠蜱、狗蜱及野生動物外寄生蜱中 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 2.62%、8.36% 及 13.89%；鼠類脾臟及血液 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 14.13% 及 4.40%。人群檢體的部份，檢驗 100-101 年金門縣恙蟲病通報病例 *A. phagocytophilum* 血清抗體陽性率為 19.7% (57/289)，而對照組血清抗體陽性率 6.38% (3/47)，具有顯著性差異 ($X^2=4.9$, $p=0.0268$)，同時在 87 個配對血清中發現 12 個病例兩次採血 *A. phagocytophilum* 血清抗體效價有四倍上升，顯示金門地區發燒病人確實需要注意是否為 Anaplasmosis。基於過去的研究，確認台灣是否有致病性的 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 格外重要，也必需藉由細胞培養得到大量菌株得以確認。就離島三縣鼠類脾臟檢測結果，金門縣與連江縣菌株最多的是 *Anaplasma phagocytophilum* (51.03%)，其次為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (34.85%)，澎湖縣菌株最多的是 *Candidatus Neoehrlichia*

mikurensis (83.33%)，相較於台灣本島西部主要是 *Uncultured Anaplasma sp.* clone ZJ05/2009 (71.43%)，東部則是 *Anaplasma phagocytophilum* 與 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 相同數量(29.63%)，顯示離島三縣更需確認 *Anaplasma phagocytophilum* 的致病性與病媒。

就目前完成的全長序列分析，來自連江、金門小黃腹鼠 Buffy coat 及粒形硬蜱(*I. granulatus*)、台灣卵形硬蜱(*Ixodes ovatus*)及其他國家的 *Anaplasma phagocytophilum* 16S rRNA gene 如病人株(AF 093789 patient USA)在一個 cluster，台灣菌株其致病性更需其他基因標的加以證實。來自金門、連江小黃腹鼠脾臟的 *Anaplasma phagocytophilum* 16S rRNA gene 與來自花蓮、台東鬼鼠及小黃腹鼠 Buffy coat 的 *Anaplasma phagocytophilum* 16S rRNA gene 在另一個 cluster。 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 16S rRNA gene 及 GroESL gene 情況也相同，台灣來自老鼠或蜱的序列都在同一個 cluster，而病人株在另一個 cluster，因此 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 台灣菌株的病原性還需進一步證實。

Anaplasma spp. 及 *Ehrlichia spp.* 培養常使用 HL-60 細胞，亦有文獻顯示可使用 tick cell line ISE6 及 IDE8 進行 *Anaplasma phagocytophilum* 培養^{56,57}。未來，*Anaplasma spp.* 及 *Ehrlichia spp.* 培養的部分，會以 IMDM (3%FBS) 進行培養，目前已確認可改善 IMDM (2%FBS) 時 HL-60 細胞狀況不良的問題，

但要進一步確認是否能增加 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 感染及生長，同時也會將 104-105 年培養 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 過程中有冷凍保存的菌液解凍繼續進行培養。此外，鼠全血未來皆會以 EasySep™ Human Pan-Granulocyte Isolation Kit 進行 granulocyte 萃取，確認在接種較多新鮮 *Anaplasma phagocytophilum* 狀況下，是否能較順利進行培養。

結論與建議

1. 檢測採集金門縣、連江縣及澎湖縣 500 隻鼠類脾臟 *Rickettsia* 屬立克次體，結果有 18 隻陽性，分別是金門縣 3 隻小黃腹鼠檢出 *Rickettsia rickettsii* 382/382(100%)(2) 及 *Rickettsia typhi* 298/299(99%)，1 隻錢鼠檢出 *Rickettsia felis* 299/299(100%)；連江縣 3 隻小黃腹鼠檢出 *Rickettsia typhi* 299/299(100%)(2) 及 *Rickettsia felis* 299/299(100%)，澎湖縣 5 隻小黃腹鼠檢出 *Rickettsia felis* 382/382(100%)(3) 及 *Rickettsia typhi* 299/299(100%)(2)，4 隻錢鼠檢出 *Rickettsia rickettsii* 382/382(100%)，*Rickettsia typhi* 299/299(100%) 及 *Rickettsia felis* 382/382(100%)(2)，2 隻家鼯鼠檢出 *Rickettsia felis* 382/382(100%)(2)。
2. 台灣離島三縣檢測 500 隻鼠類脾臟 *Anaplasma* & *Ehrlichia*，平均陽性率為 50.60%，以溝鼠陽性率最高 100%，其次為小黃腹鼠(58.22%)及錢鼠(26.17%)。
3. 離島三縣鼠類脾臟 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 感染菌株最多為 *Anaplasma phagocytophilum* 佔全部 49.01%，其次為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (37.15%) 及 *Uncultured Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009(9.09%)。其中金門縣與連江縣菌株最多的是 *Anaplasma*

phagocytophilum (51.03%)，其次為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (34.85%)，澎湖縣菌株最多的是 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (83.33%)。

4. 3種被檢測出感染的鼠種中，小黃腹鼠感染4種菌株最多，錢鼠3種，溝鼠只有1種。小黃腹鼠脾臟感染以 *Anaplasma phagocytophilum* 居多為54.71%，而錢鼠則多為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (60.71%)。
5. 台灣離島三縣檢測396隻鼠類 Buffy coat *Anaplasma* & *Ehrlichia*，平均陽性率為60.86%，以溝鼠陽性率最高100%，其次為小黃腹鼠(61.14%)及錢鼠(53.85%)。
6. 離島三縣鼠類 Buffy coat *Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp.感染菌株最多為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 佔全部62.24%，其次為 *Anaplasma phagocytophilum* (22.82%)及 *Uncultured Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 (10.37%)。三縣皆以 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 檢出最多，三種鼠類亦同。
7. 離島三縣就鼠類種類而言，蜚感染率與蜚指數以錢鼠最高，分別為17.43%及0.42，其次為小黃腹鼠，分別為11.78%及0.36，因此對於蜚蟲的調查防治，錢鼠在離島三縣應為重點。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 經由 100-102 年及 103-105 年二次調查，台灣鼠類體內有可能的病原株 *Anaplasma phagocytophilum* 及 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 存在，應積極確認這些菌株病原的特性，以建立防治策略。

參考文獻

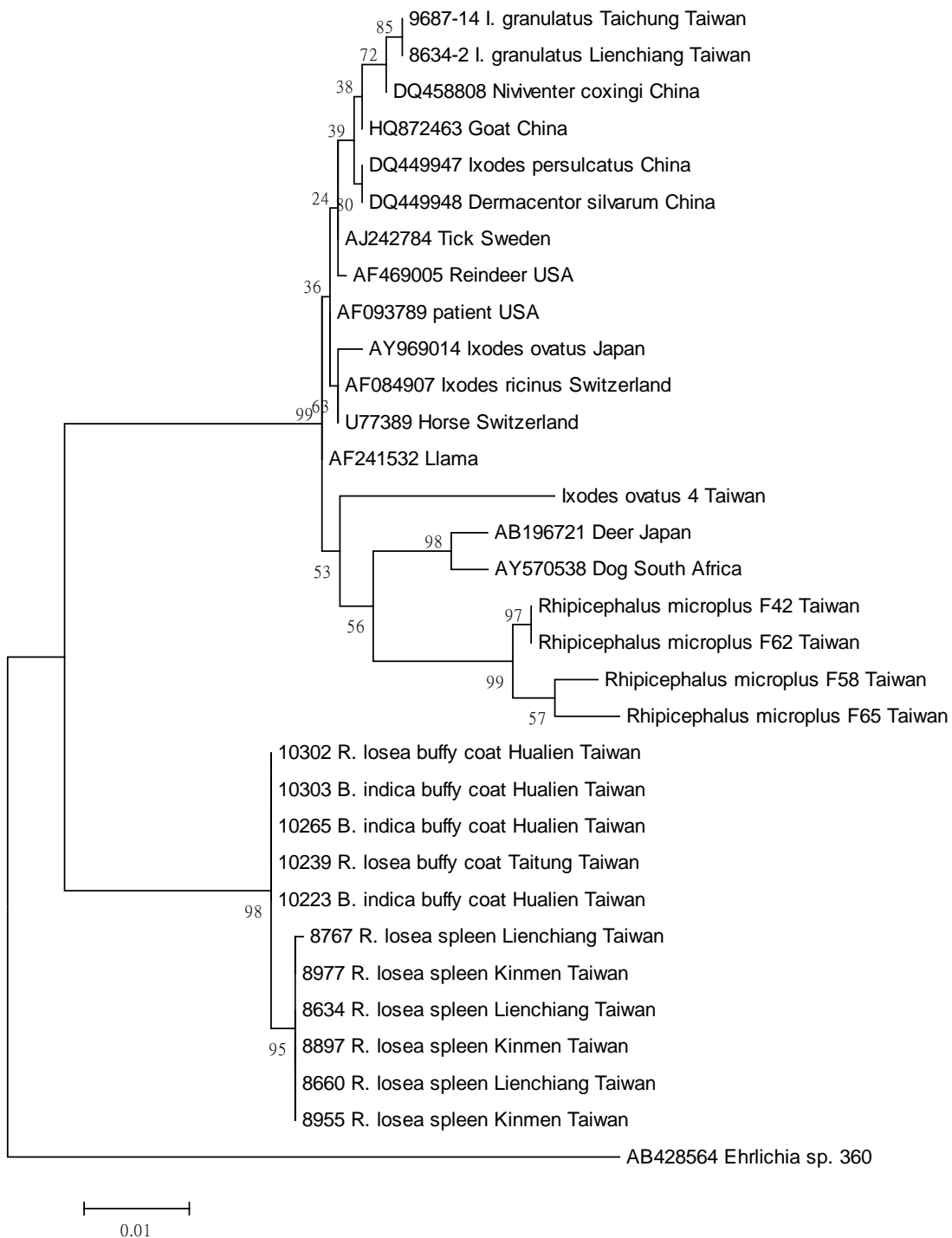
1. Dumler JS. Anaplasma and Ehrlichia infection. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1063:361-73.
2. Bakken JS, Dumler JS. Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 2000;31:554-60.
3. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:2145-65.
4. Buller RS, Arens M, Hmiel SP, et al. Ehrlichia ewingii, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N Engl J Med* 1999;341:148-55.
5. Stone JH, Dierberg K, Aram G, Dumler JS. Human monocytic ehrlichiosis. *JAMA* 2004;292:2263-70.
6. Bakken JS, S. DJ. *Antimicrobial therapy and vaccines*. 2 ed. New York: Apple Trees Productions; 2002.
7. Kawahara M, Rikihisa Y, Isogai E, et al. Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in Ixodes ovatus ticks. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1837-43.
8. von Loewenich FD, Geissdorfer W, Disque C, et al. Detection of "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. *J Clin Microbiol* 2010;48:2630-5.
9. Fehr JS, Bloemberg GV, Ritter C, et al. Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen Candidatus Neoehrlichia mikurensis. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1127-9.
10. Welinder-Olsson C, Kjellin E, Vaht K, Jacobsson S, Wenneras C. First case of human "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Microbiol* 2010;48:1956-9.
11. Lotric-Furlan S, Petrovec M, Avsic-Zupanc T, et al. Human ehrlichiosis in central Europe. *Wien Klin Wochenschr* 1998;110:894-7.
12. Sumption KJ, Wright DJ, Cutler SJ, Dale BA. Human ehrlichiosis in the UK. *Lancet* 1995;346:1487-8.
13. Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 2007;45 Suppl 1:S45-51.
14. Zhi N, Ohashi N, Rikihisa Y. Multiple p44 genes encoding major outer membrane proteins are expressed in the human granulocytic ehrlichiosis agent. *J Biol Chem* 1999;274:17828-36.

15. Massung RF, Owens JH, Ross D, et al. Sequence analysis of the ank gene of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol* 2000;38:2917-22.
16. Inokuma H, Oyamada M, Kelly PJ, et al. Molecular detection of a new Anaplasma species closely related to Anaplasma phagocytophilum in canine blood from South Africa. *J Clin Microbiol* 2005;43:2934-7.
17. Alberti A, Zobba R, Chessa B, et al. Equine and canine Anaplasma phagocytophilum strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:6418-22.
18. Chang AC, Chang WL, Lin CT, Pan MJ, Lee SC. Canine infectious cyclic thrombocytopenia found in Taiwan. *J Vet Med Sci* 1996;58:473-6.
19. 張祖駿. 利用巢式聚合酶連鎖反應調查台北市犬艾利希氏體病 [碩士論文]: 國立台灣大學; 2003.
20. 黃嘉嘉. 以巢式聚合酶連鎖反應偵測犬隻狗型、血小板型艾利希體症及犬心絲蟲感染症 [碩士論文]: 國立嘉義大學; 2003.
21. 陳昱憲. 以巢式聚合酶連鎖反應調查台灣家貓血液寄生蟲之感染疫情 [碩士論文]: 國立中興大學; 2007.
22. Hsieh YC, Lee CC, Tsang CL, Chung YT. Detection and characterization of four novel genotypes of Ehrlichia canis from dogs. *Vet Microbiol* 2010;146:70-5.
23. Suto Y, Suto A, Inokuma H, Obayashi H, Hayashi T. First confirmed canine case of Ehrlichia canis infection in Japan. *Vet Rec* 2001;148:809-11.
24. 翁明輝, 連日清, 蔡惠坪, 林佩如, 郭明德, 劉文燦. 2009 年金門地區鼠類寄生蜱感染查菲艾利希氏體之調查. *疫情報導* 2010;26:134-9.
25. 翁明輝, 蔡惠坪, 林佩如, 陳國卿, 郭明德, 劉文燦. 2012 年金門地區鼠類感染查菲艾利希氏體之調查. *疫情報導* 2014;30:134-41.
26. 潘明正. 牛邊緣無形體症 (Bovine anaplasmosis). In: (編著) 潘劉張, ed. 媒介重要人畜傳染疾病的有害生物—節肢動物篇. 台北市: 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局; 2007:138-9 頁.
27. 林怡孜. 以 PCR 技術調查台灣乳牛焦蟲症及邊蟲症之流行病學 [碩士論文]: 國立中興大學; 2007.
28. 翁明輝, 蔡惠坪, 林佩如, 陳國卿, 郭明德, 林昌棋. 2014 年金門地區鼠形動物感染嗜吞噬細胞無形體之調查. *疫情報導* 2015;31:347-55.
29. Lennette EH, Halonen P, Murphy FA. Laboratory diagnosis of infectious diseases. Principles and Practice Vol. II. . Springer-Verlag New York Inc.; 1988:865-90.
30. Marmion BP. Rickettsial diseases of man and animals. London: Edward Arnold; 1990:674-89.
31. Takada N, Fujita H, Yano Y, Tsuboi Y, Mahara F. First isolation of a rickettsia closely related to Japanese spotted fever pathogen from a tick in Japan. *J Med Entomol*

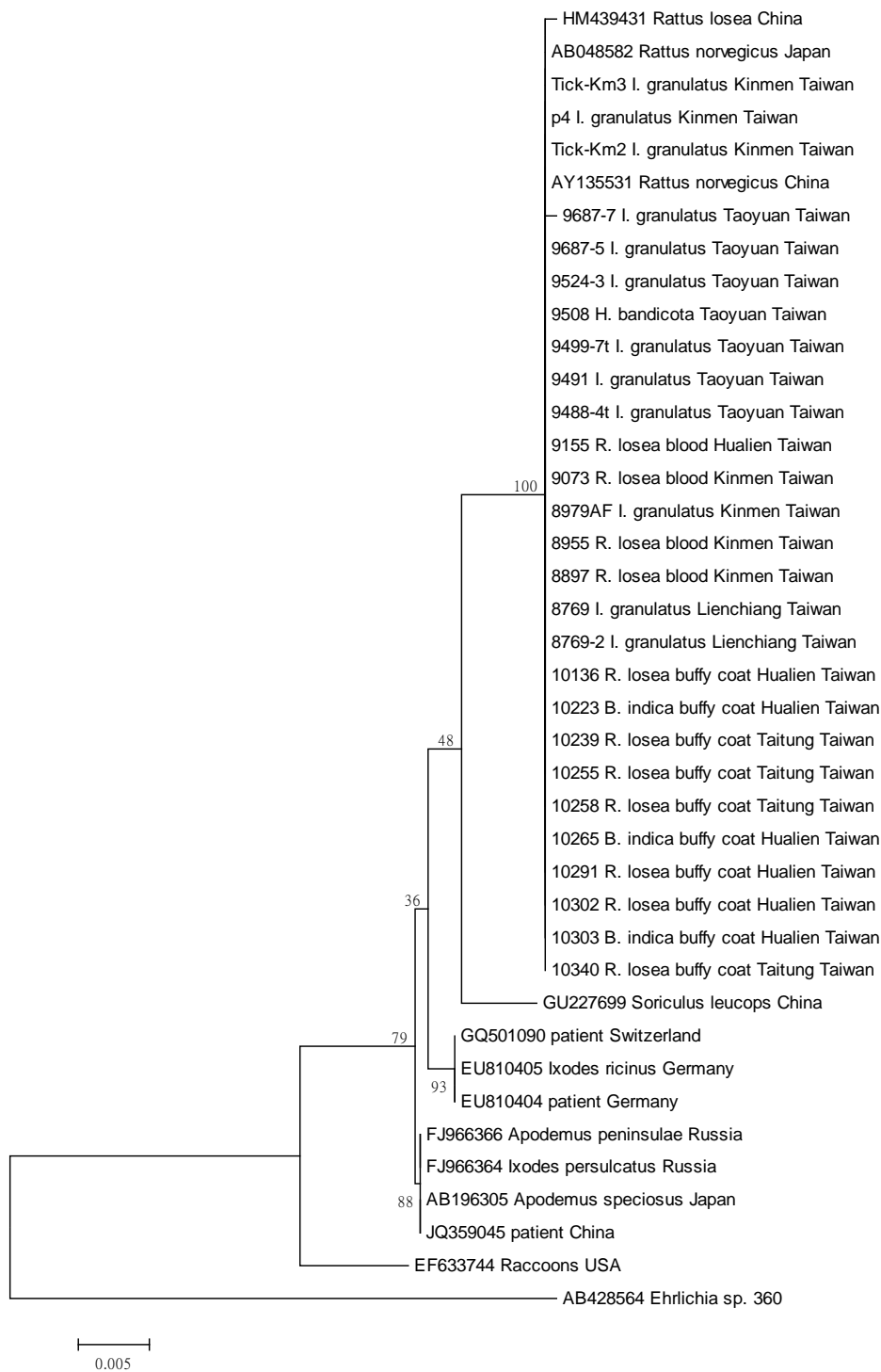
1994;31:183-5.

32. Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res* 2005;36:469-92.
33. Brouqui P, Parola P, Fournier PE, Raoult D. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;49:2-12.
34. Tsai YS, Wu YH, Kao PT, Lin YC. African tick bite fever. *J Formos Med Assoc* 2008;107:73-6.
35. Tsai KH, Lu HY, Huang JH, et al. African tick bite Fever in a Taiwanese traveler returning from South Africa: molecular and serologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81:735-9.
36. Tsai KH, Lu HY, Tsai JJ, Yu SK, Huang JH, Shu PY. Human case of *Rickettsia felis* infection, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1970-2.
37. Tsai KH, Lu HY, Huang JH, et al. *Rickettsia felis* in cat fleas in Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:561-3.
38. Takada N, Fujita H, Yano Y, Huang WH, Khamboonruang C. Serosurveys of spotted fever and murine typhus in local residents of Taiwan and Thailand compared with Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993;24:354-6.
39. Chen HL, Chen HY, Chung CL, Lin TH, Wang GR, Horng CB. [Primary surveillance of spotted fever group antibodies on rats in the Kinmen area]. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 1997;30:115-21.
40. Fang R, Raoult D. Antigenic classification of *Rickettsia felis* by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:221-8.
41. Ishikura M, Fujita H, Ando S, Matsuura K, Watanabe M. Phylogenetic analysis of spotted fever group *Rickettsiae* isolated from ticks in Japan. *Microbiol Immunol* 2002;46:241-7.
42. Fournier PE, Fujita H, Takada N, Raoult D. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. *J Clin Microbiol* 2002;40:2176-81.
43. Lee JH, Park HS, Jung KD, et al. Identification of the spotted fever group rickettsiae detected from *Haemaphysalis longicornis* in Korea. *Microbiol Immunol* 2003;47:301-4.
44. Kim CM, Yi YH, Yu DH, et al. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:5766-76.
45. Choi YJ, Lee EM, Park JM, et al. Molecular detection of various rickettsiae in mites (*Acari: Trombiculidae*) in Southern Jeolla Province Korea. *Microbiol Immunol* 2007;51:307-12.
46. Robbins RG. THE TICKS (ACARI" IXODIDA: ARGASIDAE, IXODIDAE) OF TAIWAN" A SYNONYMIC CHECKLIST. *PROC ENTOMOL SOC WASH* 2005;107:245-53.
47. Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D. Detection of ehrlichiae in

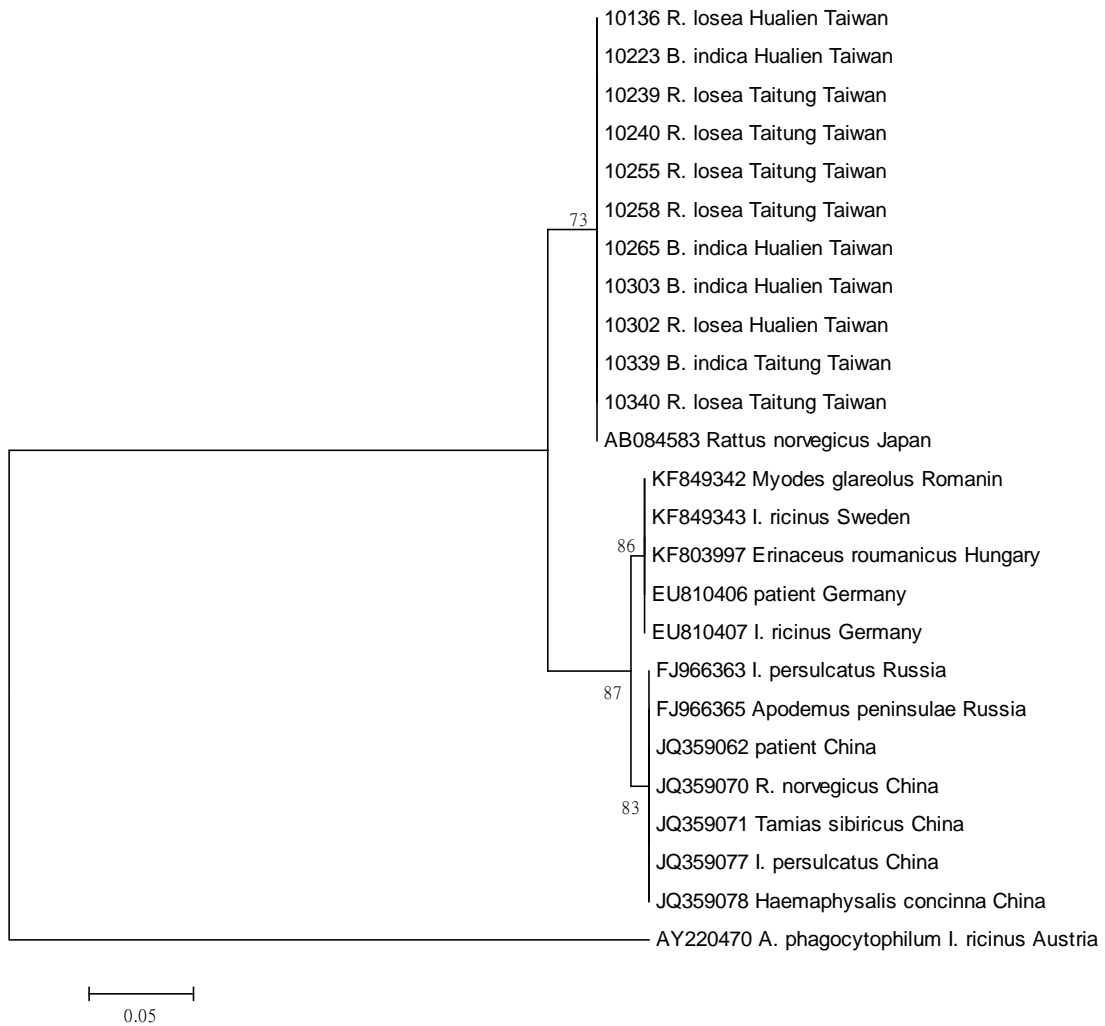
- African ticks by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94:707-8.
48. Ohashi N, Gaowa, Wuritu, et al. Human granulocytic Anaplasmosis, Japan. *Emerg Infect Dis* 2013;19:289-92.
 49. Choi YJ, Jang WJ, Ryu JS, et al. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2005;11:237-44.
 50. Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48 Pt 3:839-49.
 51. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Res Microbiol* 1995;146:385-96.
 52. Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:252-61.
 53. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50 Pt 4:1449-55.
 54. Kuo CC, Shu PY, Mu JJ, Wang HC. High prevalence of *Rickettsia* spp. infections in small mammals in Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2015;15:13-20.
 55. Kuo CC, Shu PY, Mu JJ, et al. Widespread *Rickettsia* spp. Infections in Ticks (Acari: Ixodoidea) in Taiwan. *J Med Entomol* 2015;52:1096-102.
 56. Massung RF, Levin ML, Munderloh UG, et al. Isolation and propagation of the Ap-Variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. *J Clin Microbiol* 2007;45:2138-43.
 57. Silaghi C, Kauffmann M, Passos LM, Pfister K, Zweygarth E. Isolation, propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8. *Ticks Tick Borne Dis* 2011;2:204-8.



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



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



圖三、台灣地區 *Candidatus Neohrlichia mikurensis* 菌株 groESL gene 全長序列

親緣關係，以 Muscle 軟體進行 Alignment，選擇最適 model 為 Hasegawa

表一、105 年金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類捕捉結果

金門縣	鼠種	連江縣	鼠種	澎湖縣	鼠種
金沙鎮	<i>Rattus losea</i> 57 <i>Suncus murinus</i> 2	北竿鄉	<i>Rattus losea</i> 26 <i>Suncus murinus</i> 11	馬公市	<i>Rattus losea</i> 10 <i>Suncus murinus</i> 16
金城鎮	<i>Rattus losea</i> 59 <i>Suncus murinus</i> 9	南竿鄉	<i>Rattus losea</i> 101 <i>Suncus murinus</i> 49 <i>Mus musculus</i> 1	湖西鄉	<i>Rattus losea</i> 14 <i>Suncus murinus</i> 10 <i>Mus musculus</i> 3
金湖鎮	<i>Rattus losea</i> 60			西嶼鄉	<i>Rattus losea</i> 5 <i>Suncus murinus</i> 4 <i>Mus musculus</i> 2
金寧鎮	<i>Rattus losea</i> 66 <i>Rattus norvegicus</i> 2			白沙鄉	<i>Rattus losea</i> 1 <i>Suncus murinus</i> 8 <i>Mus musculus</i> 2
合計	<i>Rattus losea</i> 242 <i>Rattus norvegicus</i> 2 <i>Suncus murinus</i> 11		<i>Rattus losea</i> 127 <i>Suncus murinus</i> 60 <i>Mus musculus</i> 1		<i>Rattus losea</i> 30 <i>Suncus murinus</i> 38 <i>Mus musculus</i> 7

表二、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類脾臟 *Rickettsia* 屬立克次體檢測結果

地區	鼠種	數量	<i>OmpB</i> 陽性數	<i>gltA</i> 陽性數	陽性率(%)*	Blast 結果
金門縣	<i>Rattus losea</i>	226	2	1	1.33	<i>Rickettsia rickettsii</i> , 382/382(100%)(2), <i>Rickettsia typhi</i> , 298/299(99%)
	<i>Rattus norvegicus</i>	2	0	0	0	
	<i>Suncus murinus</i>	11	0	1	9.09	<i>Rickettsia felis</i> , 299/299(100%)
連江縣	<i>Mus musculus</i>	1	0	0	0	
	<i>Rattus losea</i>	127	0	3	2.36	<i>Rickettsia typhi</i> , 299/299(100%)(2), <i>Rickettsia felis</i> , 299/299(100%)
	<i>Suncus murinus</i>	60	0	0	0	
澎湖縣	<i>Mus musculus</i>	7	2	0	28.57	<i>Rickettsia felis</i> , 382/382(100%)(2)
	<i>Rattus losea</i>	30	3	2	16.67	<i>Rickettsia felis</i> , 382/382(100%)(3), <i>Rickettsia typhi</i> , 299/299(100%)(2)
	<i>Suncus murinus</i>	36	3	1	11.11	<i>Rickettsia rickettsii</i> , 382/382(100%), <i>Rickettsia typhi</i> , 299/299(100%), <i>Rickettsia felis</i> , 382/382(100%)(2)
合計	<i>Mus musculus</i>	8	2	0	25.00	
	<i>Rattus losea</i>	383	5	6	2.87	
	<i>Rattus norvegicus</i>	2	0	0	0	
	<i>Suncus murinus</i>	107	3	2	4.67	

* *OmpB* 或 *gltA* 陽性合計

表三、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類脾臟感染 *Rickettsia* 屬立克次體種類及比率

	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus losea</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Suncus murinus</i>	合計	%
<i>Rickettsia felis</i>	2	4	0	3	9	50
<i>Rickettsia rickettsii</i>	0	2	0	1	3	16.67
<i>Rickettsia typhi</i>	0	5	0	1	6	33.33
合計	2	11	0	5	18	

表四、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類脾臟 Anaplasma & Ehrlichia 立克次體檢測結果

地區	鼠種	檢測數量	Anaplasma & Ehrlichia 陽性數	Blast 結果
金門縣	<i>Rattus losea</i>	226	124	Anaplasma phagocytophilum strain rod-D3006 16S rRNA gene 305/305(100%) (57), Candidatus Neoehrlichia mikurensis 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)(44), Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ05/2009 16S rRNA gene 303/305(99%)(22), Ehrlichia sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)(1)
	<i>Rattus norvegicus</i>	2	2	Anaplasma phagocytophilum strain rod-D3006 16S rRNA gene 305/305(100%)(2)
	<i>Suncus murinus</i>	11	4	Candidatus Neoehrlichia mikurensis 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)(3), Ehrlichia sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)(1)
連江縣	<i>Rattus losea</i>	127	87	Anaplasma phagocytophilum strain rod-D3006 16S rRNA gene 305/305(100%)(64), Candidatus Neoehrlichia mikurensis 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)(23)
	<i>Suncus murinus</i>	60	24	Candidatus Neoehrlichia mikurensis 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)(14), Ehrlichia sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)(6), Neorickettsia sp. 2960 16S rRNA gene 305/305(100%)(4)
	<i>Mus musculus</i>	1	0	
澎湖縣	<i>Rattus losea</i>	30	12	Candidatus Neoehrlichia mikurensis 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)(10), Anaplasma phagocytophilum strain rod-D3006 16S rRNA gene 305/305(100%)(1), Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ05/2009 16S rRNA gene 305/305(100%)(1)

<i>Suncus murinus</i>	36	0
<i>Mus musculus</i>	7	0

表五、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類脾臟 Anaplasma & Ehrlichia 立克次體檢測陽性率

鼠種	檢測數	陽性數	陽性率(%)	佔陽性總數(%)
<i>Mus musculus</i>	8	0	0	0
<i>Rattus losea</i>	383	223	58.22	88.14
<i>Rattus norvegicus</i>	2	2	100	0.79
<i>Suncus murinus</i>	107	28	26.17	11.07
合計	500	253	50.60	

表六、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類脾臟感染 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 種類及比率

	<i>Rattus losea</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Suncus murinus</i>	合計	%
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	122	2	0	124	49.01
<i>Anaplasma</i> sp. ZJ05/2009	23	0	0	23	9.09
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	77	0	17	94	37.15
<i>Ehrlichia</i> sp. 360	1	0	7	8	3.16
<i>Neorickettsia</i> sp. 2960	0	0	4	4	1.58
合計	223	2	28	253	

表七、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類脾臟感染 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 種類及數量

	金門縣	連江縣	澎湖縣	合計
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	59	64	1	124
<i>Anaplasma</i> sp. ZJ05/2009	22	0	1	23
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	47	37	10	94
<i>Ehrlichia</i> sp. 360	2	6	0	8
<i>Neorickettsia</i> sp. 2960	0	4	0	4
合計	130	111	12	253

表八、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類 Buffy coat Anaplasma & Ehrlichia 立克次體檢測結果

地區	鼠種	檢測數量	Anaplasma & Ehrlichia 陽性數	Blast 結果
金門縣	<i>Rattus losea</i>	218	128	Candidatus Neoehrlichia mikurensis 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)(65), Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ05/2009 16S rRNA gene 303/305(99%)(25), Anaplasma phagocytophilum strain rod-D3006 16S rRNA gene, 305/305(100%)(32), Ehrlichia sp. 360 gene 16S rRNA gene 305/305(100%)(6)
	<i>Rattus norvegicus</i>	2	2	Candidatus Neoehrlichia mikurensis 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)(2)
	<i>Suncus murinus</i>	3	2	Candidatus Neoehrlichia mikurensis 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)(1), Ehrlichia sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)(1)
連江縣	<i>Rattus losea</i>	120	87	Candidatus Neoehrlichia mikurensis 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)(62), Anaplasma phagocytophilum strain rod-D3006 16S rRNA gene 305/305(100%)(23), Ehrlichia sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)(2)
	<i>Suncus murinus</i>	20	12	Candidatus Neoehrlichia mikurensis 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)(10), Ehrlichia sp. 360 16S rRNA gene 305/305(100%)(1), Neorickettsia sp. 2960 16S rRNA gene 305/305(100%)(1)
澎湖縣	<i>Rattus losea</i>	30	10	Candidatus Neoehrlichia mikurensis 16S rRNA gene strain:TK4456 306/306(100%)(10)
	<i>Suncus murinus</i>	3	0	

表九、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類 Buffy coat Anaplasma & Ehrlichia 立克次體檢測陽性率

鼠種	檢測數	陽性數	陽性率(%)	佔陽性總數(%)
<i>Rattus losea</i>	368	225	61.14	93.36
<i>Rattus norvegicus</i>	2	2	100	0.83
<i>Suncus murinus</i>	26	14	53.85	5.81
合計	396	241	60.86	

表十、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類 Buffy coat 感染 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 種類及比率

	<i>Rattus losea</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Suncus murinus</i>	合計	%
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	55	0	0	55	22.82
<i>Anaplasma</i> sp. ZJ05/2009	25	0	0	25	10.37
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	137	2	11	150	62.24
<i>Ehrlichia</i> sp. 360	8	0	2	10	4.15
<i>Neorickettsia</i> sp. 2960	0	0	1	1	0.41
合計	225	2	14	241	

表十一、金門縣、連江縣及澎湖縣鼠類 Buffy coat 感染 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 種類及數量

	金門縣	連江縣	澎湖縣	合計
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	32	23	0	55
<i>Anaplasma</i> sp. ZJ05/2009	25	0	0	25
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	68	72	10	150
<i>Ehrlichia</i> sp. 360	7	3	0	10
<i>Neorickettsia</i> sp. 2960	0	1	0	1
合計	132	99	10	241

表十二、*Rickettsia* 屬立克次體細胞培養結果

編號	來源	sequence close to	接種原液 Ct 值	培養後凍起來 Ct 值	培養中目前 Ct 值	備註
9073t	從缺	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01	29	-	37.02	
C008NV	金門縣 <i>R. haemaphysaloides</i>	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01	30.99	33.52	-	
C008NV-2	金門縣 <i>R. haemaphysaloides</i>	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM01	36.5	31.52	-	C008NV 培養一輪後 再次解凍培養
JP		<i>Rickettsia japonica</i>	19.65	17.78	-	
JPL929		<i>Rickettsia japonica</i>	20.98	-	17.57	

表十三、金門縣 ticks flagging 定期採集結果

日期	金湖鎮新頭里				金城鎮和平里			
	人員	溫度 (°C)	濕度 (%)	蜱數	人員	溫度 (°C)	濕度 (%)	蜱數
103/01/21	1	11.7	34	<i>R. haemaphysaloides</i> 1 larva	1	9.9	41	0
103/01/26	1	18	42	0	1	17	49	0
103/02/23	1	18.7	56	<i>R. haemaphysaloides</i> 21 larvae	1	21.3	47	0
103/03/20	1	19.2	79	<i>R. haemaphysaloides</i> 3 larvae	1	17.3	71	<i>R. haemaphysaloides</i> 1 ♂, 1 nymph
103/03/25	1	22.3	63	<i>R. haemaphysaloides</i> 1 nymph, 12 larvae	1	26.7	51	<i>R. haemaphysaloides</i> 1 ♂, 4 larvae
103/04/23	1	22.2	48	<i>R. haemaphysaloides</i> 1 ♀, 11 larvae	1	20.3	63	<i>R. haemaphysaloides</i> 3 ♀, 3 larvae
103/04/29	1	26.2	51	<i>R. haemaphysaloides</i> 53 larvae	1	27.8	49	<i>R. haemaphysaloides</i> 2 ♀
103/05/08	1	22.3	75	<i>R. haemaphysaloides</i> 1 nymph, 12 larvae	1	28.7	58	<i>R. haemaphysaloides</i> 1 ♀
103/05/26	1	28.7	74	<i>R. haemaphysaloides</i> 1 larva	ND			
103/06/17	2	31.6	67	<i>R. haemaphysaloides</i> 16 larvae	ND			
103/06/25	2	33.2	66	<i>R. haemaphysaloides</i> 14 larvae	1	30.7	70	<i>R. haemaphysaloides</i> 3 larvae
103/07/15	1	34.4	65	<i>R. haemaphysaloides</i> 40 larvae	1	33.3	57	<i>R. haemaphysaloides</i> 5 larvae
103/08/19	1	30.1	69	0	1	28.9	76	0
103/09/03	1	33.1	60	<i>R. haemaphysaloides</i> 30 larvae	1	34.5	49	0
103/09/11	2	37.3	45	<i>R. haemaphysaloides</i> 20 larvae	2	35.1	51	0
103/10/13	1	29	40	<i>R. haemaphysaloides</i> 17 larvae	1	29	38	<i>R. haemaphysaloides</i> 1 larva
103/10/20	1	29	73	<i>R. haemaphysaloides</i> 2 larvae	1	26	71	0

103/11/03	2	21	60	<i>R. haemaphysaloides</i> 9 larvae	2	23	46	0
103/12/09	1	15	60	<i>R. haemaphysaloides</i> 1 larva	1	15	60	0

ND: no done

表十四、103 年金門 flagging tick 蜱媒檢測

檢體編號	採檢日期	採檢地點	齡期(數量)	Anaplasma & Ehrlichia	Rickettsia spp.		Borrelia spp.
					ompB	gltA	
ST0223-1L	103.02.23	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0223-2L	103.02.23	新頭	Larva(5)	-	+	-	-
ST0223-3L	103.02.23	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0223-4L	103.02.23	新頭	Larva(6)	-	-	-	-
HP0320-N	103.03.20	和平	Nymph (1)	-	-	-	-
HP0320-M	103.03.20	和平	Male (1)	+	-	-	-
ST0320-L	103.03.20	新頭	Larva(3)	-	-	-	-
HP0325-L	103.03.25	和平	Larva(4)	-	-	-	-
HP0325-M	103.03.25	和平	Male (1)	-	-	-	+
ST0325-N	103.03.25	新頭	Nymph (1)	-	+	-	-
ST0325-1L	103.03.25	新頭	Larva(6)	-	-	-	-
ST0325-2L	103.03.25	新頭	Larva(6)	-	-	-	-
ST0423-1F	103.04.23	新頭	Female	-	-	-	-
ST0423-1L	103.04.23	新頭	Larva(5)	-	+	-	-
ST0423-2L	103.04.23	新頭	Larva(6)	-	-	-	-

HP0423-1F	103.04.23	和平	Female	-	-	-	-
HP0423-2F	103.04.23	和平	Female	-	-	-	-
HP0423-3F	103.04.23	和平	Female	-	-	-	-
HP0423-L	103.04.23	和平	Larva(3)	-	-	-	-
HP0429-1F	103.04.29	和平	Female	-	-	-	-
HP0429-2F	103.04.29	和平	Female	-	-	-	-
ST0429-1L	103.04.29	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0429-2L	103.04.29	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0429-3L	103.04.29	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0429-4L	103.04.29	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0429-5L	103.04.29	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0429-6L	103.04.29	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0429-7L	103.04.29	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0429-8L	103.04.29	新頭	Larva(6)	-	-	-	-
ST0429-9L	103.04.29	新頭	Larva(6)	-	-	-	-
ST0429-10L	103.04.29	新頭	Larva(6)	-	-	-	-
HP0508-F	103.05.08	和平	Female	-	-	-	-
ST0508-1L	103.05.08	新頭	Larva (6)	-	-	-	-
ST0508-2L	103.05.08	新頭	Larva (6)	-	-	-	-
ST0508-N	103.05.08	新頭	Nymph	-	-	-	-
HP0526-L	103.05.26	和平	Larva (1)	-	-	-	-
ST0618-1L	103.06.17	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0618-2L	103.06.17	新頭	Larva(5)	-	+	-	-

ST0618-3L	103.06.17	新頭	Larva(6)	-	-	-	-
HP0625-L	103.06.25	和平	Larva(3)	-	-	-	-
ST0625-1L	103.06.25	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0625-2L	103.06.25	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0625-3L	103.06.25	新頭	Larva(4)	-	-	-	-
HP0716-L	103.07.15	和平	Larva(5)	-	-	-	-
ST0716-1L	103.07.15	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0716-2L	103.07.15	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0716-3L	103.07.15	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0716-4L	103.07.15	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0716-5L	103.07.15	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0716-6L	103.07.15	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0716-7L	103.07.15	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0716-8L	103.07.15	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0903-1L	103.09.03	新頭	Larva(5)	-	-	+	-
ST0903-2L	103.09.03	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0903-3L	103.09.03	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0903-4L	103.09.03	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0903-5L	103.09.03	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0903-6L	103.09.03	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0911-1L	103.09.11	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0911-2L	103.09.11	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST0911-3L	103.09.11	新頭	Larva(5)	-	-	-	-

ST0911-4L	103.09.11	新頭	Larva(5)	+	-	-	-
HP1013-1L	103.10.13	和平	Larva(1)	-	-	-	-
ST1013-1L	103.10.13	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST1013-2L	103.10.13	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST1013-3L	103.10.13	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST1013-4L	103.10.13	新頭	Larva(2)	-	-	-	-
ST1020-L	103.10.20	新頭	Larva(1)	-	-	-	-
ST1103-1L	103.11.03	新頭	Larva(5)	-	-	-	-
ST1103-2L	103.11.03	新頭	Larva(4)	-	-	-	-
ST1209-L	103.12.09	新頭	Larva(1)	-	-	-	-