

計畫編號：DOH95 -DC-1035

行政院衛生署疾病管制局九十六年度科技研究發展計畫

巴東體屬細菌於臺灣小型哺乳動物之流行病學研究暨
其親源樹圖分析

研究報告

執行機構：國立中興大學 獸醫公共衛生學研究所

計畫主持人：張照勤 副教授

研究人員：陳俊宇 林壬威

執行期間：95年1月1日至96年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

【目 錄】

	頁 碼
一. 中文摘要 -----	3
二. 英文摘要 -----	5
三. 前 言 -----	7
四. 材料與方法 -----	13
五. 結 果 -----	21
六. 討 論 -----	34
七. 結論與建議 -----	40
八. 重要研究成果及具體建議-----	41
九. 參考文獻 -----	42
十. 附表及圖 -----	47

中文摘要

Bartonella spp. 為新興人畜共通傳染疾病病原，其自然宿主涵蓋種類廣泛，過去研究顯示小型哺乳類動物為其重要宿主之一。本研究共計捕獲310隻小型哺乳類動物，包括六物種：溝鼠 (*Rattus norvegicus*) 169隻，錢鼠 (*Suncus murinus*) 126隻，小黃腹鼠 (*Rattus losea*) 3隻，家鼯鼠 (*Mus musculus*) 2隻，屋頂鼠 (*Rattus rattus*) 10隻。結果顯示，菌血症陽性率為41.3% (128/310)。菌種鑑定則利用16S/23S rRNA基因ITS片段以及*gltA*基因片段進行限制片段長度多型性技術組合分析，可將目前已知大部分之菌種區分。結果顯示台灣地區*Bartonella*屬菌於小型哺乳類動物中相當多樣化，並有混合感染之發現。其中*B. elizabethae*佔25.0% (32/128)、*B. grahamii*佔7.0% (9/128)、*B. phoceensis*佔2.3% (3/128)、*B. ratimassiliensis*佔1.6% (2/128) 與*B. tribocorum*佔42.2% (54/128)。研究中發現3.5% (11/310) 動物有混合感染不同*Bartonella*菌種的情形。更重要的是本研究首次於臺灣食蟲目中的錢鼠分離出*Bartonella*，菌血症陽性率為28.6%；當中有91.7%感染菌種具獨特分子型，目前將其暫命為*B. Taiwan-1* 株。血清檢體亦利用間接螢光免疫法利用台灣四種鼠類常見菌種抗原*B. elizabethae*、*B. Taiwan-1*、*B. grahamii*及*B. tribocorum*進行抗體檢測，陽性率結果分別為0.0% (0/308)、3.2% (10/308)、3.2% (10/308) 及5.6% (12/308)。演化樹分析結果顯示*gltA*基因與*ftsZ*基因的結果具有相當好的一致性，PCR/RFLP分型結果也與之符合。但若比較*rpoB*與*ribC*基因的結果，部份菌株所歸類於之最近似菌種為*B. tribocorum*，與*gltA*基因與*ftsZ*基因歸類為*B. grahamii*之結果不同。以目前資料而言，16S-23S基因與*pap31*基因目前並無所有的*Bartonella*菌種基因序列資料可供有效比對，因此不適於做鼠中*Bartonella*菌種的分析使

用。本研究結果有助瞭解*Bartonella*屬菌在台灣野生小型哺乳動物中的生態分佈，而其中為人畜共通致病原的*Bartonella*屬菌株（*B. elizabethae*與*B. grahamii*）分離結果，值得未來觀察與警戒台灣居民因意外接觸小型哺乳動物而感染*Bartonella*屬菌疾病的危險性。

關鍵字： 巴東體屬菌、小型哺乳動物、流行病學

Abstract

Most of *Bartonella* spp. have been identified as zoonotic pathogens. Previous studies showed that small mammals are important reservoirs for *Bartonella*. In this study, a total of 310 blood specimens were collected, including 169 from *Rattus norvegicus*, 126 from *Suncus murinus*, ten from *Rattus rattus*, three from *Rattus losea* and two from *Mus musculus*. It was identified that 41.3% (128/310) of the animals were *Bartonella* bacteremic. The isolates were characterized by the combination of PCR of the 16S-23S ITS gene, and PCR/RFLP analysis of the *gltA* gene with three different endonucleases. According to the PCR/RFLP analysis, various known species of *Bartonella* were identified in small mammals in Taiwan, including *B. elizabethae* (25.0%, 32/128), *B. grahamii* (7.0%, 9/128), *B. phoceensis* (2.3%, 3/128), *B. tribocorum* (42.2%, 54/128) and *B. rattimassiliensis* (1.6%, 2/128). It was also found that 3.5% (11/310) of the animals were co-infected with different *Bartonella* species. Of major importance, *Bartonella* organisms were first isolated from *Suncus murinus*, an insectivore in Taiwan, with bacteremia prevalence of 28.6%. Moreover, 91.7% of the *Bartonella* isolates from *S. murinus* were with a unique molecular pattern, separated from other *Bartonella* species. Seroprevalences were 0%, 3.2%, 3.2% and 5.6%, by IFA test using the antigens of *B. elizabethae*, *Bartonella* sp. Taiwan-1, *B. grahamii* and *B. tribocorum*, respectively. The phylogenetic analysis showed that species tree constructed by the sequences of *gltA* gene and *ftsZ* gene yielded consistent results. However, using the sequences of *rpoB* and *ribC* genes, some strains were determined to be *B. tribocorum*; these isolates were determined to be *B. grahamii* by analysis of *gltA* and *ftsZ* genes. Unfortunately, sequences of 16S-23S interspacer region and *pap31* gene were not useful for

conducting phylogenetic analysis of rodent *Bartonella* isolates, as limited to the available sequence information of *Bartonella* type strains. The results of this study provided valuable information regarding the epidemiology of *Bartonella* infections in small mammals in Taiwan.

Keywords: *Bartonellaceae*, small mammals, epidemiology

前言

Bartonella 屬菌為革藍氏陰性、oxidase 陰性,在Proteobacteria 綱內的 $\alpha 2$ 亞綱中,培養過程中比較挑剔性的菌屬[1]。*Bartonella*屬菌培養條件為35-37°C附有5%二氧化碳分壓之培養箱,生長條件挑剔,一般培養於巧克力培養基或是血液培養基,在初代*Bartonella*屬菌分離需培養12至14天,有時甚至長達45天以上,而兔血或馬血成分之培養基比綿羊血培養基更利於*Bartonella*屬菌生長[33]。生長液培養技術目前仍未完善,但有研究報告指出添加血素(hemin)於布氏桿菌生長液體培養基(*Brucella* broth)可以幫助*Bartonella*屬菌生長[43]。此外,培養時的溫度也很重要;*B. bacilliformis*生長條件最適宜為28-30°C,其他種別則為適合在35-37°C培養[1]。型態學上*B. bacilliformis*可見兩端有鞭毛並具有移動性,而*B. clarridgeiae*兩端亦有鞭毛[25]。*B. tribocorum*則具有線毛[21]。演化上依16S rRNA基因及*gltA*基因較接近於*Brucella*、*Agrobacterium*與*Rhizobium*等菌屬[7,9,18],也造成其微生物特性及致病機轉與這些細菌間有極相似之處。由於培養技術的改進及分子生物學方法的應用,在近十年來,有越來越多的*Bartonella*種已經被分離與描述,目前已有19種菌種已被命名。

Bartonella 各菌種的特性包括其傳播大部分必須藉由媒介生物與在哺乳類宿主中存活[4]。陸續的研究指出媒介生物,包括蜱[20]、蚤[26]、蝨[32,35],可以經由叮咬帶原血液後再傳播*Bartonella*屬菌。目前已被證實可以傳播*Bartonella*屬菌的媒介節肢動物包括蚤可以傳播*B. henselae*[26],人類體蝨可以傳播*B. quintana*[11],而蜱也被懷疑可以攜帶*B. henselae* [31],*B. quintana* 與*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* [13],以及最近在會吸血的蠅(biting midge)也偵測到此菌的存在。

*Bartonella*屬菌其中7種菌種確定與人類的疾病有關，被認為是新興的人類致病原。1990年時僅有兩種疾病被證實與*Bartonella*屬菌相關，其中包括流行於南美Andes山區的Carrion's症，由蛉(sanfly)媒介*Bartonella bacilliformis*所引起。*B. quintana*引起戰壕熱(trench fever)已在第一、二次世界大戰中受到重視[23]，而在最近的研究報告中指出*B. quintana*尚會造成現今都市化社會中流浪漢心內膜炎與菌血症[17,39]，甚至在1983就有報告指出AIDS族群桿菌性血管增生瘤(bacillary angiomatosis, BA)與*B. quintana*有關[27,28,37,41]。另一個會造成桿菌性血管增生瘤的致病原為*B. henselae*，也就是貓抓熱(cat scratch disease, CSD)的主要致病原，此一病原最早於1990桿菌性血管增生瘤病灶利用細菌16S rRNA基因PCR技術被增幅出來[37]，1992被正式分離且被命名[36]。依流行病學調查懷疑*B. clarridgeiae*可能為貓抓熱的另一個致病原[25]。*B. elizabethae*以及*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*顯示引起心內膜炎[16,19]，*B. vinsonii* subsp. *arupensis*從一位心臟瓣膜疾病患者分離出[42]。*B. grahamii*則為利用分子技術在視神經視網膜炎(neuroretinitis)病患之患部偵測到其DNA[24]。其他菌種，如*B. vinsonii* subsp. *vinsonii*、*B. taylorii*、*B. doshiae*、*B. talpae*、*B. peromysci*、*B. alsatica*、*B. tribocorum*、*B. koehlerae*與*B. birtlesii*目前皆自非人的哺乳動物分離出，但是還沒有被指出與人類的疾病相關[5,18,20,21]。而其中鼠類可以帶原的*Bartonella*菌種為最多，因此在流行病學上更具重要意義，包括*B. grahamii*[5]、*B. elizabethae*[10]、*B. vinsonii* subsp. *vinsonii*[28]、*B. taylorii*[5]、*B. doshiae*[5]、*B. tribocorum*[21]、*B. washoensis*以及其他陸續被命名的新菌種等。

小型哺乳類動物之*Bartonella*菌屬研究報告顯示，除高菌血症陽性率外，菌種分佈與地理區域及鼠種有關。在過去研究有關*Bartonella*感染與鼠種間的關係，許多的鼠種目前都被確定可以感染、帶原*Bartonella*屬菌。*B. talpae*是最早在1905年自鼠類中所分離的*Bartonella*屬菌種[5]，而在1995年有三種*Bartonella*屬菌種自鼠中被分離，其中*B. grahamii*自*Clethrionomys glareolus*鼠中分離，*B. taylorii*自*Apodemus*鼠種中分離，而*B. doshiae*則是自*Microtus arestis*鼠中分離[5]。1997年美國國家疾病管制局發表了美國本土鼠類之*Bartonella*屬菌流行病學報告，發現所有分離株可以依基因型區分為A、B、C、D四大叢集，並且發現特定的基因型（D型）與*Peromyscus*鼠種呈現宿主特異性[30]。而後在秘魯的流行病學調查中，*Bartonella*屬菌在*Phyllotis*鼠種中被分離出[4]，且自溝鼠分離出兩種不同的種別，其中一菌種被確定為*B. elizabethae*，另一菌種尚未命名。有學者分析了自美國與葡萄牙所捕捉的325隻溝鼠與92隻屋頂鼠的全血樣本，總盛行率約18%，但溝鼠族群在各地的菌血症盛行率從0%至60%不一。在該次研究中，所有的63株分離株中皆與*B. elizabethae*、*B. grahamii*在演化關係上相近形成一大叢集 [19]。*B. tribocorum*則在法國西部野外溝鼠中所分離[21]。2002年亞洲於中國雲南所進行的調查中發現當地之菌血症盛行率亦高達43.5%，分離株分析後發現其基因型差異大，並分離出人畜共通致病原之*B. elizabethae*[2]。而台灣與中國大陸的地緣關係，也急待瞭解此菌屬於台灣小型哺乳類動物的流行病學分布。

*Bartonella*屬內各菌種的差異，包括細菌種別和基因型別，自然宿主和媒介宿主，地理分佈和病原的特性。在*Bartonella*屬內各菌種的演化關係，目前主要以基因序列分析作為判斷親源關係分類依據。目前關於

*Bartonella*分類中，較被廣泛研究的三種基因片段，為16S rRNA、檸檬酸合成酵素基因(*gltA*)和 60 kDa 熱休克蛋白(*groEL*)編碼基因。此外，另有學者利用16S/23S中間片段基因 (intergenic spacer regions)，核黃素合成基因 (*ribC*)、細胞分裂基因 (*ftsZ*) 等基因序列比較分析各菌種間的親源演化關係。16S rRNA基因作為*Bartonella*親源關係分析依據時，雖然16S rRNA於Proteobacteria中一直被認為是種別鑑定分類的主要參考基因[5,10]，但16S rRNA因在*Bartonella*屬各菌種中的相似度非常高，達97.5%~99.9%，被認為演化探討中此基因具有較低的敏感性[18,20,21,25]，而在探討親源關係時當各序列相似度高於97%時不易區分出菌種之差異[34]。未來在研究*Bartonella*親源關係中最有趣的觀察菌株間親源演化區隔是否與哺乳類宿主、媒介昆蟲，以及地理區位上的分佈產生相關。

依據*gltA*基因的演化分析，*Bartonella*屬內與小型哺乳類相關菌種大致上可以依新世界鼠種（如*S. hispidus*、*O. palustris* 與 *Phyllotis peruviana*）和舊世界鼠種（*R. norvegicus*、*R. rattus*、*Mus musculus* 與 *Clethrionomys glareolus*）分為兩大演化叢集[19]；新舊世界地理區位的差異造成兩地菌種不同，目前認為主要受大陸飄移（continental drift）所影響，在兩地理區位分離之後，菌種分別各自演化成更近代的品系，可預見的，最後兩區位的菌種因地理的區隔，原本適合的自然宿主與媒介生物均受到相當大的限制而自然的演化出更適合新地理區位的生物條件，進而成唯一新的、獨立的菌種。*B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. doshiae*, *B. talpae* 及 *B. taylorii*之於舊世界，猶如*B. vinsonii* subsp. *vinsonii*及*B. vinsonii* subsp. *arupensis*之於新世界，可以說明因地理區隔而導致兩地菌種分別有各自適宜的哺乳類自然宿主[5,22]。至於*B. bacilliformis*，其具

有特定的地理分佈是因為此菌種僅能依靠當地特有的蛉（sandfly）作為媒介宿主，且一直都未被發現有其他動物可以感染此菌，而以人類為此菌種唯一的自然宿主[4,7,18]。

Bartonella 屬菌以目前大部分的研究資料主要侷限在歐美兩大陸區域，在非洲與亞洲的流行病學調查則十分缺乏。尤其在臺灣小型哺乳動物中的流行現況也是未知，因此人類也可能在居家附近的環境中意外與鼠類接觸染病而不自知，且此病診斷仰賴特殊血清學檢驗與特殊培養基進行細菌培養，更增加診斷上的困難。鼠類中的 *Bartonella* 菌種，依過去人類的臨床報告，又是主要引起心臟方面的疾病有可能危及感染者的性命，因此值得深入研究台灣小型哺乳動物 *Bartonella* 屬菌種的流行病學分佈，以利政府制定相關防疫措施與不明原因感染症的病原診斷。

本次研究為首次針對台灣地區小型哺乳類動物的 *Bartonella* 屬菌流行病學進行調查，全程兩年期計劃總目標包括小型哺乳類動物宿主種別、地理區位與菌血症盛行率之關係、進而以分子鑑定方法瞭解盛行菌種與其親源樹圖分析，希望藉由本研究結果可瞭解 *Bartonella* 屬菌在台灣野生小型哺乳動物中的流行病學生態分佈。有鑑於此，本研究計劃欲完成之研究工作項目為：

第一年：

1. 台灣地區不同生態環境下（包括海岸地區、內陸都市區、內陸農牧區）小型哺乳類動物種別之血液樣本收集；
2. 台灣地區不同生態環境下（包括海岸地區、內陸都市區、內陸農牧區）小型哺乳類動物 *Bartonella* 屬菌感染的菌血症盛行率比較；
3. 台灣地區小型哺乳類動物 *Bartonella* 屬菌感染的菌種分子鑑定；

第二年：

1. 持續第一年的研究調查進行；
2. 將分離菌株進行選擇性基因片段定序分析；
3. 定序結果進行台灣地區小型哺乳類動物*Bartonella*屬菌與國際間分離的*Bartonella*屬菌親源樹譜分析。

材料與方法

第一年

鼠隻樣本捕捉

本研究中樣本捕捉來源分別為於中部地區兩商業港口（台中港與麥寮港），及中部地區某乳牛畜牧場與大坑山區進行野生鼠類捕捉採樣；所捕獲之鼠隻進行血液檢體採集，捕捉後詳細紀錄鼠種、性別、預估年齡（成年或幼年）、體長尾長、捕捉日期與地點以及外寄生蟲暴露情形。

血液樣本製備與保存

所採取之血液以EDTA抗凝後於4°C下保存運送，至實驗室後以90 ×g離心5分鐘，分離出血漿，抽取適量之血漿後，血漿與剩餘血液樣本皆保存於-70°C冰箱。血漿未來用於血清學檢測，血液樣本用於細菌培養與DNA萃取後進行分子診斷。

全血DNA萃取

以血液及組織基因體DNA小量純化套組（Viogene DNA/RNA Extraction Kit）萃取血液檢體DNA。取100 μL全血與100 μL PBS混合，加入200 μL EX液及20 μL Proteinase K混合均勻，60°C水浴20分鐘後改以70°C作用20分鐘去活化Proteinase K，再加入210 μL之99%酒精。將總量約650 μL的混和液置於離心小管，下層為收集小管，以6000 ×g離心2分鐘，更換新的收集小管，再以500 μL WS液清洗兩次，倒去下層過濾液。最後再加入120 μL 70°C之TE buffer液，靜置3分鐘後以6000 ×g離心2分鐘，收集下層過濾之產物即所需之DNA，保存於-20°C備用。

*Bartonella*菌培養與分離

*Bartonella*菌之培養與分離為將待測血液樣本由-70°C冰箱取出至室溫下回溫，充分混合均勻後取100 μL直接塗抹於巧克力培養基(chocolate

agar)，培養基置於37°C，5%CO₂分壓培養箱中培養10-20天，每三至四天觀察一次並計數疑似菌落數目。鼠類分離之*Bartonella*培養於巧克力培養基上以細密銀亮的小點狀菌落與乳白色且外膜稍硬直徑大小約0.5 mm之菌落兩種型態為主。當疑似菌落經分子鑑定為*Bartonella*時挑取單一菌落進行繼代培養（subculture），並將同一片巧克力培養基上所有*Bartonella*菌落刮起混於保菌液中，以冷凍小管（Cryovial[®]，Simport, Canada）保存。

*Bartonella*菌種分子鑑定與分型

純菌DNA萃取為挑取單一菌落混於100 μL滅菌水中，以100°C加熱10-15分鐘後以18000 ×g高速離心10分鐘，抽取上清液，此即為DNA萃取物；取DNA萃取物以10倍稀釋後作為DNA模版（DNA template）進行聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）。共利用兩基因片段進行分子鑑定與分型，一為檸檬酸合成基因（citrate synthase gene, *gltA* gene）PCR增幅。*gltA*基因PCR使用之引子為BhCS.781 ((5'-GGG GAC CAG CTC ATG GTG G-3')及BhCS.1137n (5'-AAT CGA AAA AGA ACA GTA AAC A-3')。PCR反應條件如下：50 μL反應溶液中含有5 μL待測DNA模版，濃度皆為50 μM之正向引子與反向引子各1 μL，10 mM dNTP（SibEnzyme, Russia）4 μL，10× PCR Buffer（Applied Biosystems, USA）5 μL，25 mM MgCl₂（Applied Biosystems, USA）3 μL及1 unit Taq DNA polymerase（Ampli Gold Taq, Applied Biosystems, USA），剩餘30.75 μL以滅菌並經UV燈處理後之ddH₂O補足；將混合均勻的溶液放入聚合酶鏈鎖反應器中，反應過程及設定為預熱95°C 10分鐘；接續反應過程需45個循環，分別依序為95°C使DNA變性30秒，60°C進行DNA黏合作用1

分鐘，72°C 進行DNA延展作用2分鐘；最後以72°C 10分鐘進行反應終結及DNA末端的補齊，反應結束溫度設定回歸4°C。待PCR完成後取10 µL之產物以2%之agarose與1× TBE緩衝溶液進行膠體電泳分析以確定產物大小。目標所得之產物大小若為*Bartonella*屬菌產物大小約為400 bp。另一為16S/23S rRNA intergenic spacer region (ITS) 基因PCR增幅。16S/23S rRNA 基因ITS 片段PCR使用之引子為bartspA (5'-(C/T)CT TCG TTT CTC TTT CTT CA-3')及bartspB (5'-AAC CAA CTG AGC TAC AAG CC-3')。PCR反應條件如下：50 µL反應溶液中含有5 µL待測DNA模版，濃度皆為100 µM之正向引子與反向引子各0.5 µL，10 mM dNTP (SibEnzyme, Russia) 4 µL，10× PCR Buffer (Applied Biosystems, USA) 5 µL，25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, USA) 7 µL及1 unit Taq DNA polymerase (Ampli Gold Taq, Applied Biosystems, USA)，剩餘27.75 µL以滅菌照過UV燈之ddH₂O補足；將混合均勻的溶液放入聚合酶鏈鎖反應器中，反應過程及設定為預熱95°C 2分鐘；接續反應過程需45個循環，分別依序為95°C使DNA變性一分鐘，60°C進行DNA黏合作用1分鐘，72°C進行DNA延展作用30秒；最後以72°C 10分鐘進行反應終結及DNA末端的補齊，反應結束溫度設定回歸4°C。待PCR完成後取10 µL之產物以3%之agarose與1× TBE緩衝溶液進行膠體電泳分析以確定產物大小。各不同菌種間所得之產物大小*B. bacilliformis*應為211 bp、*B. clarridgeiae* 應為154 bp、*B. elizabethae*應為241 bp、*B. henselae*應為172 bp、*B. quintana*應為157 bp、*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*及*B. grahamii* 應為260 bp。

限制片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析

本實驗以*gltA* 基因產物利用Hha I、Mse I及Taq I切割酵素進行分析，

每1 μL 酵素，以2 μL 之10 \times BSA、2 μL 之10 \times 最佳緩衝溶液（依廠商建議使用）與5 μL 之滅菌 ddH₂O 配成10 μL 之 RFLP 作用小管，每管再加入10 μL 之 PCR 產物作為 DNA 原料，充分作用後，以3-4% 之高質量密度之 agarose 進行電泳分析，及進行12% polyacrylamide gel 針對100 bp 以下之切割片段觀察。

第二年

(延續第一年之材料方法)

檸檬酸合成基因 (citrate synthase gene, *gltA* gene)

gltA gene 使用之核酸引子為 BhCS.781 (5'- GGG GAC CAG CTC ATG GTG G -3') 及 BhCS.1137n (5'- AAT GCA AAA AGA ACA GTA AAC A -3') (委託明欣生物科技公司合成)。總 PCR 混合物共 50 μl ，含 5 μl 待測 DNA 樣本、濃度皆為 100 μM 之正向與反向引子各 0.5 μl 、濃度 2.5 mM dNTP 4 μl 、10 倍 PCR buffer 5 μl 、濃度 25 mM MgCl₂ 3 μl 、滅菌二次去離子水 31.75 μl 以及 DNA polymerase 0.25 μl (Ampli Gold)。PCR 反應條件如下：95 $^{\circ}\text{C}$ 作用 10 分鐘，接續反應為 95 $^{\circ}\text{C}$ 使 DNA 變性作用 30 秒、57 $^{\circ}\text{C}$ 進行 DNA 黏合作用 1 分鐘、72 $^{\circ}\text{C}$ 進行 DNA 延展作用 2 分鐘共 45 個循環，最後以 72 $^{\circ}\text{C}$ 進行反應終結及 DNA 末端的補齊作用 5 分鐘，反應結束溫度回歸 4 $^{\circ}\text{C}$ 。增幅完之產物使用瓊脂凝膠（含 2 % agarose 之 1X TBE buffer）進行膠體電泳，再以 ethidium bromide 作用後於紫外光燈下觀察，所得產物大小約為 380-400 bp。

16S/23S rRNA intergenic spacer region (ITS) for single-step PCR

使用之核酸引子為 bartspA (5'- YCT TCG TTT CTC TTT CTT CA -3') 及 bartspB (5'- AAC CAA CTG AGC TAC AAG CC -3') (委託明欣生物科技公司合成)。總 PCR 混合物共 50 μ l, 含 5 μ l 待測 DNA 樣本、濃度皆為 100 μ M 之正向與反向引子各 0.5 μ l、濃度 2.5 mM dNTP 4 μ l、10 倍 PCR buffer 5 μ l、濃度 25 mM MgCl₂ 3 μ l、滅菌二次去離子水 31.75 μ l 以及 DNA polymerase 0.25 μ l (Ampli Gold)。PCR 反應條件如下: 95°C 作用 2 分鐘, 接續反應為 95°C 使 DNA 變性作用 1 分鐘、52°C 進行 DNA 黏合作用 1 分鐘、72°C 進行 DNA 延展作用 30 秒共 45 個循環, 最後以 72°C 進行反應終結及 DNA 末端的補齊作用 10 分鐘, 反應結束溫度回歸 4°C。增幅完之產物使用瓊脂凝膠 (含 3% agarose 之 1X TBE buffer) 進行膠體電泳, 再以 ethidium bromide 作用後於紫外光燈下觀察, 各不同菌種間所得產物大小為 211 bp (*B. bacilliformis*)、154 bp (*B. clarridgeiae*)、241 bp (*B. elizabethae*)、172 bp (*B. henselae*)、157 bp (*B. quintana*)、260 bp (*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*)。

16S/23S rRNA intergenic spacer region

使用之核酸引子為 16SF (5'- AGA GGC AGG CAA CCA CGG TA -3') 及 23SI (5'- GCC AAG GCA TCC ACC -3') (委託明欣生物科技公司合成)。總 PCR 混合物共 50 μ l, 含 5 μ l 待測 DNA 樣本、濃度皆為 100 μ M 之正向與反向引子各 0.5 μ l、濃度 2.5 mM dNTP 4 μ l、10 倍 PCR buffer 5 μ l、濃度 25 mM MgCl₂ 3 μ l、滅菌二次去離子水 31.75 μ l 以及 DNA polymerase 0.25 μ l (Ampli Gold)。PCR 反應條件如下: 95°C 作用 3 分鐘, 接續反應為 95°C 使 DNA 變性作用 30 秒、52°C 進行 DNA 黏合作用 1 分鐘、72°C 進行 DNA 延展作用 90 秒共 39 個循環, 最後以 72°C 進行反應

終結及 DNA 末端的補齊作用 5 分鐘，反應結束溫度回歸 4°C。增幅完之產物使用瓊脂凝膠（含 2 % agarose 之 1X TBE buffer）進行膠體電泳，再以 ethidium bromide 作用後於紫外光燈下觀察，所得產物大小約為 1300-1600 bp。

核黃素合成基因（riboflavin synthase gene, *ribC* gene）

ribC gene 使用之核酸引子為 ribC-F（5'-ARA TGG AGG CGT AAG AYA YT -3'）及 ribC-R（5'-AAR CGY GCT TCA ACA ATC AA -3'）（委託明欣生物科技公司合成）。總 PCR 混合物共 50 μ l，含 5 μ l 待測 DNA 樣本、濃度皆為 100 μ M 之正向與反向引子各 0.5 μ l、濃度 2.5 mM dNTP 4 μ l、10 倍 PCR buffer 5 μ l、滅菌二次去離子水 34.75 μ l 以及 DNA polymerase 0.25 μ l（Ampli）。PCR 反應條件如下：94°C 作用 4 分鐘，接續反應為 94°C 使 DNA 變性作用 30 秒、49°C 進行 DNA 黏合作用 30 秒、72°C 進行 DNA 延展作用 1 分鐘共 35 個循環，最後以 72°C 進行反應終結及 DNA 末端的補齊作用 7 分鐘，反應結束溫度回歸 4°C。增幅完之產物使用瓊脂凝膠（含 2 % agarose 之 1X TBE buffer）進行膠體電泳，再以 ethidium bromide 作用後於紫外光燈下觀察，所得產物大小約 800 bp 左右。

細胞分裂蛋白 *ftsZ* 基因（cell division protein FtsZ gene, *ftsZ* gene）

ftsZ gene 使用之核酸引子為 Bfp1（5'-ATT AAT CTG CAY CGG CCA GA -3'）及 Bfp2（5'-ACV GAD ACA CGA ATA ACA CC -3'）（委託明欣生物科技公司合成）。總 PCR 混合物共 50 μ l，含 5 μ l 待測 DNA 樣本、濃度皆為 100 μ M 之正向與反向引子各 0.5 μ l、濃度 2.5 mM dNTP 4 μ l、10 倍 PCR buffer 5 μ l、滅菌二次去離子水 34.75 μ l 以及 DNA polymerase 0.25

μl (Ampli)。PCR 反應條件如下：94°C 作用 4 分鐘，接續反應為 94°C 使 DNA 變性作用 30 秒、55°C 進行 DNA 黏合作用 30 秒、68°C 進行 DNA 延展作用 1 分鐘共 44 個循環，最後以 68°C 進行反應終結及 DNA 末端的補齊作用 10 分鐘，反應結束溫度回歸 4°C。增幅完之產物使用瓊脂凝膠（含 2 % agarose 之 1X TBE buffer）進行膠體電泳，再以 ethidium bromide 作用後於紫外光燈下觀察，所得產物大小約 900 bp 左右。

血晶質結合蛋白 (hemin-binding protein Pap31 gene, *pap31* gene)

pap31 gene 使用之核酸引子為 PAPn1 (5'- TTC TAG GAG TTG AAA CCG AT -3') 及 PAPn2 (5'- GAA ACA CCA CCA GCA ACA TA -3') (委託明欣生物科技公司合成)。總 PCR 混合物共 50 μl，含 5 μl 待測 DNA 樣本、濃度皆為 100 μM 之正向與反向引子各 0.5 μl、濃度 2.5 mM dNTP 4 μl、10 倍 PCR buffer 5 μl、滅菌二次去離子水 34.75 μl 以及 DNA polymerase 0.25 μl (Ampli)。PCR 反應條件如下：95°C 作用 3 分鐘，接續反應為 95°C 使 DNA 變性作用 30 秒、50°C 進行 DNA 黏合作用 30 秒、72°C 進行 DNA 延展作用 1 分鐘共 40 個循環，最後以 68°C 進行反應終結及 DNA 末端的補齊作用 3 分鐘，反應結束溫度回歸 4°C。增幅完之產物使用瓊脂凝膠（含 2 % agarose 之 1X TBE buffer）進行膠體電泳，再以 ethidium bromide 作用後於紫外光燈下觀察，所得產物大小約為 250-300 bp。

RNA 聚合酶次單位β基因 (RNA polymerase beta subunit gene, *rpoB* gene)

rpoB gene 使用之核酸引子為 1400F (5'- CGC ATT GGC TTA CTT CGT ATG -3') 及 2300R (5'- GTA GAC TGA TTA GAA CGC TG -3') (委託明欣生物科技公司合成)。總 PCR 混合物共 50 μl，含 5 μl 待測 DNA 樣本、濃度皆為 100 μM 之正向與反向引子各 0.5 μl、濃度 2.5 mM dNTP 4 μl、10 倍

PCR buffer 5 μ l、滅菌二次去離子水34.75 μ l以及DNA polymerase 0.25 μ l (Ampli)。PCR反應條件如下：94 $^{\circ}$ C作用2分鐘，接續反應為94 $^{\circ}$ C使DNA變性作用30秒、53 $^{\circ}$ C進行DNA黏合作用30秒、72 $^{\circ}$ C進行DNA延展作用1分鐘共35個循環，最後以72 $^{\circ}$ C進行反應終結及DNA末端的補齊作用2分鐘，反應結束溫度回歸4 $^{\circ}$ C。增幅完之產物使用瓊脂凝膠（含2% agarose 之1X TBE buffer）進行膠體電泳，再以ethidium bromide作用後於紫外光燈下觀察，所得產物大小約900 bp左右。

基因產物定序分析

每產物皆須將該基因 PCR 陽性產物正向反向引子進行雙重序列分析。將所得知核酸定序結果利用 BioEdit v. 5.0.9 輸入後另存成.fas 檔，以 Clustal X v. 1.83 進行序列互相比對（alignment），其輸出結果為.aln 檔案格式，以 Genedoc v. 2.6.002 開啟該.aln 檔案後另存為.phy 檔案格式後再以 phylip v. 3.6 開啟，進行最大檢約法（maximum parsimony method）、鄰近相互關係法（neighbor-joining method）與最大相似關係法（maximum likelihood method）之樹譜分析。

結果

第一年

本次研究總共捕捉310隻動物(表 1)，包括六動物種：溝鼠 (*Rattus norvegeicus*)169隻，錢鼠(*Suncus murinus*)126隻，小黃腹鼠(*Rattus losea*)3隻，家鼯鼠 (*Mus musculus*) 2隻，屋頂鼠 (*Rattus rattus*) 10隻。本次採樣區域主要分為兩港口生活區域、都市住宅區與牧場區，在觀察採樣區域中發現，各地區的鼠類族群種別分佈不盡相同。其中台中港捕獲138隻，以錢鼠佔最大多數為65.9% (91/138)；麥寮港捕獲82隻，以溝鼠佔最大多數為57.3% (47/82)；都市住宅區捕獲17隻，以溝鼠佔最大多數為70.6% (12/17)；另外在各牧場區總共捕獲73隻，同樣以溝鼠佔最大多數為90.4% (66/73)。

本次研究中總共培養310株血液樣本，初代全血培養觀察到有疑似陽性菌落生成約需10-20日。初代全血培養之疑似*Bartonella* spp.菌落型態主要可分為兩種；第一種直徑大小約0.5-1 mm之間，外觀約略呈現白至乳白色，表面較為粗糙，具有似外膜構造包覆菌落，但可清楚辨別單一菌落型態；第二種菌落型態為外觀呈細小、光亮、分佈綿密且刮取菌落時較為黏稠。挑取上述疑似*Bartonella* spp.菌落經繼代培養觀察3-7天後，挑取單一菌落萃取DNA，以*gltA* 基因PCR增幅鑑定；其中PCR陽性反應有128株，確認為*Bartonella* spp.，菌血症陽性率為41.3%。

以不同地理區來比較菌血症陽性率(見表 2)，兩港口區鼠類菌血症陽性率為38.6% (85/220)，都市住宅區為11.8% (2/17)，而牧場區則高達56.2% (41/73)。在各鼠種間(見表 2)，以溝鼠之菌血症盛行率最高達52.7% (89/169)，錢鼠為28.6% (36/126)，其他捕獲數量較

少的鼠種中，小黃腹鼠為66.7% (2/3)，屋頂鼠為10% (1/10)，家鼯鼠為0.0% (0/2)。

觀察利用16S/23S基因ITS片段增幅產物可分為三型 (a型：241 bp, b型：260 bp, c型：約180 bp)，其中a型84株，b型41株，c型僅2株。利用RFLP技術，使用HhaI、TaqI以及MseI三種限制酵素進行消化切割gltA基因片段。HhaI酵素切割分型結果可作3種分型，a型為未消化型，大小為379 bp，b型呈現264 bp與115 bp片段，c型為呈現285 bp與94 bp片段。TaqI酵素切割結果僅呈現未消化一型 (a型)。MseI酵素切割結果亦可分為4型，a型為135 bp與60 bp片段，b型為200 bp與65 bp片段，c型為182 bp與162 bp片段，d型為199 bp與132 bp片段(圖一)。在16S/23S基因ITS片段、HhaI與MseI酵素切割結果中皆發現少數菌株出現兩種型別的表演。

將所得之16S/23S基因ITS片段分型配合依HhaI、TaqI、MseI三種酵素切割片段分型順序予以組合，共可得aaaa、aaab、aaac、abaa、acaa、baaa及caad等七種主要獨立的基因型組合碼。將上述主要基因型隨機挑選數株進行核酸序列鑑定，而後以BLAST軟體進行與NCBI網站中之基因庫資料進行比對。其中aaaa型與*B. elizabethae*相近 (96.1%~96.4%)，aaab型及aaac型與*B. grahamii*相近 (95.5%及93.7%)，abaa型與*B. tribocorum*相近 (97.9%)，caad型與*B. phoceensis*較為相近 (92.0%)，但acaa型與*B. rattimassiliensis*較為相近 (98.0%~100.0%)，而baaa因與鄰近菌種皆有相當大的差異度 (*B. grahamii*: 95.2%，*B. elizabethae*: 93.7%，*B. tribocorum*: 94.6%)，可能為台灣特有菌種，本次研究將此菌種暫命名為*B. Taiwan-1*，未來將進一步進行親源樹譜分析。

綜合上述各型分析，初步結論共計*B. grahamii*-like有9株，*B. elizabethae*-like有32株，*B. tribocorum*-like有54株，*B. phoceensis*-like有3

株，*B. Taiwan-1*則有39株，*B. rattimassiliensis-like*有2株；且在分析各基因型過程中，發現有22隻鼠類的分離株具有混合分子分型結果，因此推測有混合感染之情形；但依實際分離株的結果，共計有11隻動物有混合感染。觀察各菌種與帶原鼠種的相關性（表 3），發現多數菌種主要皆由溝鼠所帶原，其中88.9%（8/9）之*B. grahamii*菌種自溝鼠所分離、96.9%（31/32）之*B. elizabethae*菌株、94.4%（51/54）之*B. tribocorum*菌株以及100%（3/3）之*B. phoceensis* 菌株皆在溝鼠中所發現；另外，*B. Taiwan-1*菌株中則達84.6%（33/39）分離自錢鼠族群。

因部分血液檢體量過少，僅308個血漿檢體進行IFA檢測。本次研究中共測試四種抗原，在任何一種抗原於血漿檢體經1:32稀釋後仍呈現陽性反應時即判定該檢體血清抗體檢測為陽性，反之為陰性。總體陽性率為9.4%（29/308），其中*B. Taiwan-1*抗原陽性率為3.2%（10/308），*B. tribocorum*抗原陽性率5.6%（12/308），*B. grahamii*抗原陽性率3.2%（10/308）、*B. elizabethae*抗原陽性率為0.0%（0/308）（表 4）。而在抗體力價的分佈方面，*B. Taiwan-1*之抗體陽性檢體為分佈自1：32到1：1024之間，*B. tribocorum*之抗體陽性檢體為分佈自1：32到1：1024之間，*B. grahamii*之抗體陽性檢體為分佈自1：32到1：64之間。血清抗體間似乎也有交叉反應的現象。

第二年

本年度之工作主要是進行所分離到的菌株進行不同基因片段的定序分析，以比較不同基因的演化樹圖之異同與菌種鑑定。所選擇之基因包括*gltA*基因、*ftsZ*基因、*rpoB*基因、*ribC*基因、*pap31*基因及16S-23S interspace 區位基因等，結果分述如下。

1) 檸檬酸合成基因 (citrate synthase gene, *gltA* gene)

PCR 產物大小約為 380 ~ 400 bp，經序列比對後選擇 338 bp 進行分析。將所選取的樣本依分子型別的不同，以 DNASTar 軟體進行與 NCBI 網站中之基因庫資料進行相似度分析，其中分子型 aaaa 型與 *Bartonella elizabethae* 相近(相似度為 96.2% ~ 96.4%)，分子型 aaab 型及 aaaa (aaac) 型與 *Bartonella grahamii* strain V2 相近 (相似度為 94.7% ~ 96.2% 及 93.8%)，分子型 abaa 型與 *Bartonella tribocorum* 相近(相似度為 97.9%)，分子型 aaaa 型與 *Bartonella rattimassiliensis* strain 15908(相似度為 98.5% ~ 100.0%) 和 *Bartonella rattimassiliensis* strain 16115 相近 (相似度為 98.2% ~ 99.7%)，而與 *Bartonella grahamii* strain V2 有 93.8% ~ 94.7% 的相似度，分子型 caad 型與 *Bartonella phoceensis* strain 16120 相近 (相似度為 93.8%)，分子型 ccad 型則與 *Bartonella rochalimae*(相似度為 95.6%) 和 *Bartonella clarridgeiae* (相似度為 95.0%) 相近，而分子型 baaa 型與 *Bartonella tribocorum* (相似度為 94.7%)、*Bartonella grahamii* strain V2 (相似度為 95.0% ~ 95.3%)、*Bartonella elizabethae* (相似度為 93.8%)、*Bartonella rattimassiliensis* strain 15908 (相似度為 93.8% ~ 94.1%) 及 *Bartonella rattimassiliensis* strain 16115 (相似度為 93.5% ~ 93.8%) 皆有一定程度的相似，進一步將各分子型與基因庫資料經由 neighbour-joining 方法 (以 Jukes-Cantor 為核苷酸替換模式)、maximum-parsimony 方法以及 maximum-likelihood 方法進行親源樹圖分析，發現三種方法所建構的親源關係相似 (見圖 2、3、4)，皆可以分成 6 個叢集 (cluster)，第一個叢集包含分子型 abaa 型與 *Bartonella tribocorum*，第二個叢集包含分子型 aaab 型、aaaa (aaac) 型與 *Bartonella grahamii* strain V2，第三個叢集

包含分子型 acaa 型、*Bartonella rattimassiliensis* strain 15908 與 *Bartonella rattimassiliensis* strain 16115，第四個叢集包含分子型 aaaa 型與 *Bartonella elizabethae*，第五個叢集為分子型 caad 型與 *Bartonella phoceensis* strain 16120，第六個叢集包含分子型 ccad 型、*Bartonella rochalimae* 與 *Bartonella clarridgeiae*，而分子型 baaa 型則獨立於各叢集間。

2) 細胞分裂蛋白 FtsZ 基因 (cell division protein FtsZ gene, *ftsZ* gene)

PCR 產物大小約 900 bp 左右，經序列比對後選擇 786 bp 進行分析。將所選取的樣本依分子型別的不同，以 DNASTar 軟體進行與 NCBI 網站中之基因庫資料進行相似度分析，其中分子型 aaaa 型與 *Bartonella elizabethae* 相近(相似度為 98.0%~100.0%)，分子型 aaab 型及 aaaa(aaac) 型與 *Bartonella grahamii* 相近 (相似度為 96.3%~97.3%及 96.2%)，在分子型 abaa 型中，樣本編號 6-1C、8-1C、90-1C、97-1B、MLE 014、MLE 064、TCE 060 和 TCE 081 與 *Bartonella elizabethae* 相近 (相似度為 98.3%)，而樣本編號 TCE 064 與 *Bartonella tribocorum* 相近 (相似度為 99.9%)，分子型 acaa 型與 *Bartonella rattimassiliensis* strain 15908 (相似度為 99.2%~100.0%) 和 *Bartonella rattimassiliensis* strain 16115 相近 (相似度為 99.2%~99.9%)，而與 *Bartonella grahamii* 有 94.3%~94.4% 的相似度，分子型 caad 型與 *Bartonella phoceensis* strain 16120 相近 (相似度為 94.7%)，分子型 ccad 型則與 *Bartonella rochalimae* (相似度為 97.1%) 和 *Bartonella clarridgeiae* (相似度為 94.3%) 相近，而分子型 baaa 型與 *Bartonella tribocorum*(相似度為 96.3%)、*Bartonella elizabethae* (相似度為 96.1%)、*Bartonella grahamii* (相似度為 94.8%)、*Bartonella rattimassiliensis* strain 15908 (相似度為 93.9%) 及 *Bartonella*

rattimassiliensis strain 16115 (相似度為 93.9%) 皆有一定程度的相似，進一步將各分子型與基因庫資料經由 neighbour-joining 方法 (以 Jukes-Cantor 為核苷酸替換模式)、maximum-parsimony 方法以及 maximum-likelihood 方法進行親源樹圖分析，發現三種方法所建構的親源關係相似 (見圖 5、6、7)，皆可以分成數個叢集 (cluster)，第一個叢集包含分子型 caad 型、*Bartonella alsatica* 與 *Bartonella phoceensis* strain 16120，第二個叢集包含分子型 acaa 型、*Bartonella rattimassiliensis* strain 15908 與 *Bartonella rattimassiliensis* strain 16115，第三個叢集包含分子型 aaaa 型、abaa 型與 *Bartonella elizabethae*，第四個叢集為分子型 baaa 型與 *Bartonella tribocorum*，其中包含一樣本編號為 TCE 064 (abaa 型)，第五個叢集包含分子型 ccad 型、*Bartonella rochalimae* SM318006 與 *Bartonella clarridgeiae*，而分子型 aaab 型、aaae (aaac) 型自成一叢集。

3) RNA 聚合酶次單位 β 基因 (RNA polymerase beta subunit gene, *rpoB* gene)

PCR 產物大小約 900 bp 左右，經序列比對後選擇 825 bp 進行分析。將所選取的樣本依分子型別的不同，以 DNASTar 軟體進行與 NCBI 網站中之基因庫資料進行相似度分析，其中分子型 aaaa 型與 *Bartonella elizabethae* 相近 (相似度為 98.1% ~ 99.5%)，分子型 aaab 型及 aiae (aaac) 型與 *Bartonella tribocorum* 相近 (相似度為 95.6% ~ 95.9% 及 96.0%)，分子型 abaa 型與 *Bartonella tribocorum* 相近 (相似度為 96.2% ~ 97.6%)，分子型 acaa 型與 *Bartonella rattimassiliensis* strain 15908 (相似度為 98.2% ~ 100.0%) 和 *Bartonella rattimassiliensis* strain 16115 相近 (相似度為

98.5%~100.0%)，而與 *Bartonella grahamii* 有 93.0%~93.2% 的相似度，分子型 caad 型與 *Bartonella phoceensis* strain 16120 相近 (相似度為 92.8%)，分子型 ccad 型則與 *Bartonella rochalimae* (相似度為 97.1%) 和 *Bartonella clarridgeiae* (相似度為 93.2%) 相近，而分子型 baaa 型與 *Bartonella tribocorum* (相似度為 95.2%)、*Bartonella elizabethae* (相似度為 94.5%)、*Bartonella grahamii* (相似度為 93.8%)、*Bartonella rattimassiliensis* strain 15908 (相似度為 92.1%) 及 *Bartonella rattimassiliensis* strain 16115 (相似度為 92.4%) 皆有一定程度的相似，進一步將各分子型與基因庫資料經由 neighbour-joining 方法 (以 Jukes-Cantor 為核苷酸替換模式)、maximum-parsimony 方法以及 maximum-likelihood 方法進行親源樹圖分析，發現三種方法所建構的親源關係相似 (見圖 8、9、10)，皆可以分成數個叢集 (cluster)，第一個叢集包含分子型 abaa 型與 *Bartonella tribocorum*，第二個叢集包含分子型 aaaa 型與 *Bartonella elizabethae*，第三個叢集包含分子型 acaa 型、*Bartonella rattimassiliensis* strain 15908 與 *Bartonella rattimassiliensis* strain 16115，第四個叢集包含分子型 caad 型、*Bartonella alsatica* 與 *Bartonella phoceensis* strain 16120，第五個叢集包含分子型 ccad 型、*Bartonella rochalimae* isolate BMGH 與 *Bartonella clarridgeiae*，而分子型 aaab 型、aaae (aaac) 型與 baaa 型自成一叢集，其中包含一樣本編號為 TCE 064 是屬於分子型 abaa 型；但以 maximum-likelihood 方法進行分析的親源樹圖中，分子型 caad 型只與 *Bartonella phoceensis* strain 16120 形成叢集，而分子型 baaa 型自成一叢集。

4) 核黃素合成基因 (riboflavin synthase gene, *ribC* gene)

PCR 產物大小約為 800 bp，經序列比對後選擇 618 bp 進行分析。將所選取的樣本依分子型別的不同，以 DNASTar 軟體進行與 NCBI 網站中之基因庫資料進行相似度分析，其中分子型 aaaa 型與 *Bartonella elizabethae* 相近(相似度為 96.8%~99.7%)，分子型 aaab 型及 aaaa (aaac) 型與 *Bartonella tribocorum* 相近(相似度為 96.3%~96.7%及 96.7%)，分子型 abaa 型(6-1C、8-1C、90-1C、97-1B、MLE 014、MLE 033、MLE 064、TCE 060 及 TCE 081)與 *Bartonella elizabethae* 相近(相似度為 97.3%~98.1%)，而同屬於分子型 abaa 型的 TCE 064 則與 *Bartonella tribocorum* 相近(相似度為 97.1%)，分子型 aaaa 型與 *Bartonella rattimassiliensis*(相似度為 96.8%~100.0%)，分子型 caad 型與 *Bartonella phoceensis* 相近(相似度為 91.9%)，而分子型 baaa 型與 *Bartonella tribocorum* (相似度為 95.4%) 及 *Bartonella elizabethae* (相似度為 92.2%) 相近，進一步將各分子型與基因庫資料經由 neighbour-joining 方法(以 Jukes-Cantor 為核苷酸替換模式)、maximum-parsimony 方法以及 maximum-likelihood 方法進行親源樹圖分析，發現三種方法所建構的親源關係相似(見圖 11、12、13)，皆可以分成數個叢集(cluster)，分子型 aaaa 型與 *Bartonella rattimassiliensis* 形成一叢集，分子型 aaab 型、aaaa (aaac)型、abaa 型(TCE 064) 及 baaa 型與 *Bartonella tribocorum* 形成一叢集，但分子型 baaa 型之 bootstrap 值沒有達到 70%，分子型 aaaa 型(90-2B 及 MLE 063) 與 *Bartonella elizabethae* 叢集在一起，而分子型 abaa 型中之 8-1C、90-1C、MLE 014、TCE 060 及 MLE 033 菌株先叢集在一起，再與分子型 aaaa 型(90-1B、MLE 039、MLE 082、TCE 090、TCE 098 及 TCE 120) 及分子型 abaa 型(6-1C、97-1B、MLE 064 及 TCE 081) 一起和分子型 aaaa 型(90-2B 及 MLE 063) 與 *Bartonella elizabethae* 這個叢集形成一個大

叢集，而分子型 caad 型則與 *Bartonella phoceensis* 形成一叢集；但以 maximum parsimony 方法及 maximum-likelihood 方法進行分析的親源樹圖中，分子型 abaa 型先自成一叢集，再與分子型 aaaa 型（90-2B 及 MLE 063）與 *Bartonella elizabethae* 這個叢集和分子型 aaaa 型（90-1B、MLE 039、MLE 082、TCE 090、TCE 098 及 TCE 120）形成一個大叢集。

5) 血晶質結合蛋白（hemin-binding protein Pap31 gene, *pap31* gene）

PCR 產物大小約為 250 ~ 300 bp，經序列比對後選擇 198 ~ 537 bp 進行分析。將所選取的樣本依分子型別的不同，以 DNASTar 軟體進行與 NCBI 網站中之基因庫資料和標準菌株進行相似度分析，其中分子型 aaaa 型（90-2B、MLE 063、MLE 082、TCE 098 及 TCE 120）與 *Bartonella elizabethae* 相近（相似度為 99.4% ~ 100.0%），而同屬於 aaaa 型的 90-1B、MLE 039 及 TCE 090 三株菌株與 *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* 有較高的相似度（相似度為 85.5%），分子型 aaab 型（MLE 065、MLE 071、TCE 002 及 TCE 072）、aaae (aaac) 型（63-1B、63-2B、63-1C、63-2C、MLE 074）與 *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* 有較高的相似度（相似度為 85.8%），而同屬於 aaab 型的 97-2C 菌株與 *Bartonella tribocorum* 有較高的相似度（相似度為 71.3%），分子型 abaa 型（MLE 014 及 TCE 064）與 *Bartonella tribocorum* 相近（相似度為 89.3% ~ 91.7%），而同屬於 abaa 型的 6-1C、97-1B、MLE 064 及 TCE 081 四株菌株與 *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* 有較高的相似度（相似度為 85.8%），8-1C、90-1C 及 TCE 060 三株菌株則與 *Bartonella elizabethae* 有較高的相似度（相似度為 93.8%），分子型 acaa 型與 *Bartonella tribocorum* 有較高的相似度（相似度為 72.4%），分子型 caad 型與 *Bartonella tribocorum* 有較高的相似度

(相似度為 71.3%)，分子型 ccad 型則與 *Bartonella tribocorum* 有 28.5% 的相似度，而分子型 baaa 型 (10-1C、67-1B、87-1B、87-1C、104-1C、MLE 019、MLE 051、TCE 010、TCE 028、TCE 095、TCE 106、TCE 117 及 TCE 132) 與 *Bartonella grahamii* (相似度為 93.4%) 及 *Bartonella elizabethae* (相似度為 92.3%) 皆有一定程度的相似，而同屬於 baaa 型的 33-1C、67-1C、TCE 069 及 TCE 118 四株菌株與 *Bartonella quintana* (相似度為 86.9%)、*Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* (相似度為 85.1%)、*Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* (相似度為 83.3%) 及 *Bartonella elizabethae* (相似度為 82.2%) 有較高的相似度，進一步將各分子型與基因庫資料經由 neighbour-joining 方法 (以 Jukes-Cantor 為核苷酸替換模式)、maximum-parsimony 方法以及 maximum-likelihood 方法進行親源樹圖分析，發現三種方法所建構的親源關係相似 (見圖 14、15、16)，皆可以分成數個叢集 (cluster)，分子型 aaaa 型 (90-2B、MLE 063、MLE 082、TCE 098 及 TCE 120) 與 *Bartonella elizabethae* 形成一叢集，分子型 baaa 型 (10-1C、67-1B、87-1B、87-1C、104-1C、MLE 019、MLE 051、TCE 010、TCE 028、TCE 095、TCE 106、TCE 117 及 TCE 132) 與 *Bartonella grahamii* 形成一叢集，而分子型 baaa 型中樣本編號為 33-1C、67-1C、TCE 069 及 TCE 118 四菌株與 *Bartonella quintana* 形成一叢集，分子型 abaa 型 (MLE 014 及 TCE 064) 與 *Bartonella tribocorum* 形成一叢集，而分子型 abaa 型中樣本編號為 8-1C、90-1C 及 TCE 060 三菌株與分子型 aaaa 型和 *Bartonella elizabethae* 形成一叢集，分子型 aaab 型 (MLE 065、MLE 071、TCE 002 及 TCE 072)、aaae (aaac) 型 (63-1B、63-2B、63-1C、63-2C、MLE 074) 和分子型 abaa 型 (6-1C、97-1B、MLE 064 及 TCE 081)、分子型 aaaa 型 (90-1B、MLE 039 及 TCE 090)

自成一叢集，分子型 acaa 型和分子型 aaab 型 (97-2C)、分子型 caad 型 (TCE 078) 自成一叢集，分子型 ccad 型則自成一獨立分支；但以 maximum-likelihood 方法進行分析的親源樹圖中，分子型 ccad 型與分子型 aaab 型 (MLE 065、MLE 071、TCE 002 及 TCE 072)、aaae (aaac) 型 (63-1B、63-2B、63-1C、63-2C、MLE 074) 和分子型 abaa 型 (6-1C、97-1B、MLE 064 及 TCE 081)、分子型 aaaa 型 (90-1B、MLE 039 及 TCE 090) 形成一叢集，而分子型 aaaa 型 (90-2B、MLE 063) 和分子型 abaa 型 (8-1C、90-1C 及 TCE 060) 先成一叢集再與 *Bartonella elizabethae* 和分子型 aaaa 型 (MLE 082、TCE 098 及 TCE 120) 形成較大的叢集。

6) 16S/23S rRNA intergenic spacer region

PCR 產物大小約為 1,300 ~ 1,600 bp，經序列比對後選擇大約 1,165 ~ 1,525 bp 進行分析。將所選取的樣本依分子型別的不同，以 DNASTar 軟體進行與 NCBI 網站中之基因庫資料進行相似度分析，其中分子型 aaaa 型與 *Bartonella elizabethae* 相近 (相似度為 85.9% ~ 95.9%)，分子型 aaab 型及 aaaa 型與 *Bartonella grahamii* strain V2 有較高的相似度 (相似度為 77.6% ~ 80.0% 及 79.8%)，分子型 abaa 型 (6-1C、90-1C、97-1B、MLE 064、TCE 060、MLE 014、MLE 033 及 TCE 064) 與 *Bartonella elizabethae* 有較高的相似度 (相似度為 77.6% ~ 95.5%)，分子型 acaa 型及 caad 型與 *Bartonella alsatica* 有較高的相似度 (相似度為 67.6% ~ 68.7% 及 70.5%)，分子型 ccad 型與 *Bartonella clarridgeiae* 有較高的相似度 (相似度為 74.7%)，而分子型 baaa 型與 *Bartonella elizabethae* (相似度為 78.3% ~ 78.4%) 及 *Bartonella grahamii* strain V2 (相似度為 72.2% ~ 72.3%) 皆有較高的相似度，進一步將各分子型與基因庫資料經由

neighbour-joining 方法（以 Jukes-Cantor 為核苷酸替換模式）、maximum-parsimony 方法以及 maximum-likelihood 方法進行親源樹圖分析，發現三種方法所建構的親源關係相似（見圖 17、18、19），皆可以分成數個叢集（cluster），分子型 acaa 型與 baaa 型各自獨立形成一叢集，分子型 caad 型與 *Bartonella alsatica* 形成一叢集，分子型 ccad 型則與 *Bartonella clarridgeiae* 叢集在一起，分子型 aaaa 型及 abaa 型之 90-1C、97-1B、MLE 064、TCE 060 四株菌株與 *Bartonella elizabethae* 叢集在一起，分子型 aaab 型、aaae 型與 abaa 型（MLE 014）叢集在一起，而分子型 abaa 型中之 6-1C、MLE 033 及 TCE 064 三株菌株叢集在一起；但以 maximum parsimony 方法進行分析的親源樹圖中，分子型 baaa 型是與 *Bartonella elizabethae* 形成一個大叢集，而在以 maximum-likelihood 方法進行分析的親源樹圖中，分子型 caad 型為獨立的分支。

7) PCR/RFLP 分子分型結果與不同基因序列之比較

由以上研究結果可以觀察到利用不同基因序列建構之親源樹圖結果在有些菌株的菌種歸屬上有些許的差異，因此將結果整理於表 5 以利觀察比較。結果顯示 *gltA* 基因與 *ftsZ* 基因的結果具有相當好的一致性，PCR/RFLP 分型結果也與之符合。但若比較 *rpoB* 與 *ribC* 基因的結果，屬 aaab、aaae、aaac 之 PCR/RFLP 分子分型之菌株其最近似之菌種為 *B. tribocorum*，與 *gltA* 基因與 *ftsZ* 基因歸類為 *B. grahamii* 之結果不同。在 16S-23S 基因分析結果確顯示其與最近似之 *Bartonella* 菌種 DNA 相似度絕大部份皆不高在 70% 左右，且目前並無所有的 *Bartonella* 菌種 16S-23S 基因序列資料可供有效比對，因此目前研究結果顯示並不適於做鼠中 *Bartonella* 菌種的分析使用。另外，*pap31* 基因也因缺乏部份標準菌株之

序列資料而無法進行有效評估。

討論

本次研究為台灣地區首次針對小型哺乳類動物的*Bartonella*屬菌流行病學進行調查，包括菌血症盛行率、鼠類宿主種別、地理區位、多種抗原血清抗體盛行率以及基因差異鑑別等多項流行病學因子觀察；本次研究除了瞭解台灣鼠種*Bartonella*屬菌具有高盛行率與菌種相複雜外，更發現一新種，經基因比對鑑定，應屬於台灣特有*Bartonella*種別。

本次研究於台灣中部之台中國際商業港口、麥寮工業專用港，牧場區包括台中縣各鄉鎮區乳牛專業牧場以及台中市國立中興大學生活區，總共捕獲310隻鼠隻，計有5種鼠種。在觀察不同地理區位之鼠隻族群中可以發現各地的鼠種族群分佈不盡相同，而地區菌血症盛行率也隨地區內捕獲較多的鼠種不同而呈現差異。本次研究中，為現今國際*Bartonella*研究中首次發現錢鼠可感染此菌，且感染菌種也有別於已知的*Bartonella*菌種，為相當重要的發現。錢鼠於生物分類學上屬於食蟲目而非齧齒目，族群主要分佈於東南亞熱帶地區，北從日本九州，琉球、台灣、中南半島，南至印度；食物對象為昆蟲與部分無脊椎動物，活動範圍從住宅區到郊外、山區皆可發現，但本次研究中於港區捕獲之錢鼠數量遠大於牧場區與都市區，原因可能與其特殊生態環境分佈有關，或為人為捕捉差異，如誘餌種類、捕鼠器放置地點，都會影響捕捉成效。溝鼠族群內*Bartonella*菌血症盛行率亦相當高，相較於其他國家的報告，中國雲南溝鼠之菌血症盛行率為17.6%[2]，美國為0.0%~56.0%[19]，本次研究中溝鼠平均盛行率達52.7%，都市區僅16.7%，但在牧場區則高達60.6%，可能原因為在牧場與港區的溝鼠生活範圍較為廣泛，生態環境都較都市複雜，藉由媒介昆蟲彼此傳遞感染的機會增加，均可能是在非都市區菌血症盛行率較高的原因[19]。由於抗體陽性率已很低，若進

一步分季節觀察，並未有顯著發現。菌血症盛行率經進一步依季節分析有顯著差異($p < 0.05$)，春季為42%、夏季為38%、秋季為25%、冬季為49%，似乎冬末春初有較高菌血症率。

*Bartonella*屬各菌種目前多被證實傳播必須依賴媒介生物，如貓蚤與蟬可以媒介*B. henselae*[26,31]，人體蝨可以傳播*B. quintana* [11]，蛉(sanfly)可以傳播*B. bacilliformis*，因此*Bartonella*屬菌被認為屬於媒介性病原(vector-borne pathogen)，但迄今尚未有研究報告證明鼠類菌種的媒介生物。目前相關鼠類*Bartonella*屬菌的媒介生物研究僅有在60年代曾有學者指出鼠蚤與蝨會傳播當時認為是立克次體的*Bartonella*屬菌[3]，而後又有報告證明在鼠蚤體內帶有*Bartonella*屬菌的DNA [38,40]，近期有學者曾經利用『異體診斷法』(Xenodiagnosis)，間接證明鼠蚤可以造成*Bartonella*屬菌於鼠隻間傳播[8]。綜合上述研究報告可以知道，雖然目前仍無直接證據證實鼠類的外寄生蟲可以媒介*Bartonella*屬菌，但媒介生物仍對於*Bartonella*屬菌的傳播佔有不可忽略的角色。

16S/23S rRNA ITS gene目前除了應用於演化親源關係分析外，近年更發展出利用此段基因的PCR快速診斷法，利用經過設計的引子，在單一次的PCR增幅反應後依所產物大小快速鑑別各菌種別，但目前發表之種別有限，且於鼠類多樣化的基因型仍有盲點。在PCR-RFLP分析中，參考已發表*gltA*基因PCR-RFLP應用報告[12,14]，使用*HhaI*、*TaqI*以及*MseI*三種限制酵素進行消化切割*gltA*基因片段。本次研究便利用16S/23S ITS基因PCR產物大小，配合各酵素對於序列中切點的特異性，將三種酵素消化結果紀錄型別，組成之快速鑑別碼，經過*gltA*基因片段定序相互比較之後，成功且正確的將128株分離株區分為7種主要的基因型。其中*TaqI*限制酵素於本次研究所有的分離株均未能消化鼠類的*gltA*基因

PCR產物，利用生物資訊軟體pDRAW32 v.1.0 (本軟體為免費之自由軟體，載自<http://www.acaclone.com/>) 將目前已發表的鼠類來源*Bartonella*屬菌*gltA*基因序列，模擬切割，確定皆無酵素切點，另將本次研究所得之*gltA*基因序列利用此軟體模擬消化後，所得之模擬結果與本次依*gltA*基因進行PCR/RFLP的研究實際結果相符。

分析本次研究分離株的*gltA*基因片段可以觀察到台灣地區*Bartonella*屬菌生態相當豐富，包括有*B. grahamii*、*B. elizabethae*、*B. tribocorum*、*B. taylorii*、*B. rattimassiliensis*等已知的相近菌種。世界各地主要的地區於鼠類中分離到的*Bartonella*屬菌種於台灣本島皆可分離，例如美國之*B. elizabethae*、*B. tribocorum*於溝鼠與屋頂鼠[19,21,30]，歐洲之*B. grahamii*、*B. taylorii*於田鼠[8]，中國雲南之*B. elizabethae*、*B. grahamii*於溝鼠及斯氏家鼠[2]。探討台灣*Bartonella*屬菌種多樣性的原因相當複雜，必須瞭解*Bartonella*屬各菌種原演化地區與其遠史之自然宿主，才能進一步探討*Bartonella*屬散佈與演化方向。未來需進一步以分子演化研究法瞭解台灣地區與中國大陸間之*Bartonella*屬菌種是否相當類似。而在本次研究中所分離之*B. Taiwan-1* sp. nov.，其主要宿主為錢鼠，分佈於亞洲東南亞熱帶地區，於美洲及歐洲等地均未有該鼠之捕捉、分離記錄，未來於東南亞地區進行小型哺乳類動物之*Bartonella*屬相關流行病學調查時，錢鼠為一值得深入研究的對象。

在*Bartonella*屬菌於貓、人的菌種，如*B. henselae*，利用血清抗原抗體反應偵測感染情形已被廣泛使用，但於鼠類的血清抗原抗體反應卻明顯指出並不適合應用於流行病學調查與田間檢測。美國學者利用了包含該次研究所分離的菌株共八種抗原進行IFA檢測，其陽性率與各抗原之陽性抗體力價稱呈現極低的檢測結果[30]。本次研究我們製備了包含*B.*

Taiwan-1 sp. nov.等四種抗原進行檢測，發現鼠類血清抗體陽性率最高為 *B. tribocorum* 抗原，僅5.6%。其中 *B. elizabethae* 抗原抗體陽性率甚至全部皆為陰性。進一步瞭解當小型哺乳類已感染 *Bartonella* 菌時對於各抗原之血清抗體陽性率差異，其中除了已感染 *B. tribocorum* 菌種之血液檢體對於 *B. tribocorum* 抗原陽性率為14.8%外，已感染其他菌種的血清檢體以其抗原進行血清抗體檢測皆未有陽性個數。而各抗原與鼠種的相關性觀察中，溝鼠族群對於 *B. tribocorum* 抗原有較高的抗體陽性率(8.3%)，對於其他抗原皆偏低，甚至全無陽性反應。學者曾提出因母鼠可能可以垂直感染胎鼠，而在胎鼠免疫系統發育中產生了免疫耐受性 (immunotolerance)，導致鼠類族群中無法針對 *Bartonella* 屬菌產生抗體 [30]，或甚至是因 *Bartonella* 屬菌與鼠類在漫長的共同演化過程中對於此屬菌之抗原無感受性亦有可能。但接著學者以人工感染試驗測試模式監測各鼠種與各菌種間的抗體產生，結果意外發現，利用特定鼠種所分離出之菌株針對從未感染過病原的該鼠種經接種病原後可順利產生高力價的抗體反應，而其他鼠種對於非該鼠種分離的抗原則無法產生抗體 [29]。對照田間流行病學調查之血清抗體盛行率結果與實驗室動物試驗結果大相逕庭。實驗中鼠種對於其具有特異性傾向的菌種有高抗體反應，但在自然環境中，因垂直感染而使得鼠體對於 *Bartonella* 屬菌產生免疫耐受性，導致無特異性抗體生成，甚至可能因菌種與具特異之宿主因長期共同演化關係，在自然感染下，存在目前尚無法得知的影响因子，使得菌種生物體可以抑制或躲避宿主之免疫反應。*Bartonella* 屬菌在小型哺乳類動物之免疫反應部份仍須待往後學者進行更深入的研究。本研究中因錢鼠並非鼠類，以鼠的二次抗體有可能低估血清抗體陽性率，為本研究限制。

第二年的親源樹圖分析主要是進一步進行菌株之菌種鑑定與不同基因序列之樹圖結果比較。結果顯示*gltA*基因與*ftsZ*基因的結果具有相當好的一致性，PCR/RFLP分型結果也與之符合。但若比較*rpoB*與*ribC*基因的結果，屬aaab、aaae、aaac之PCR/RFLP分子分型之菌株其最近似之菌種為*B. tribocorum*，與*gltA*基因與*ftsZ*基因歸類為*B. grahamii*之結果不同。在16S-23S基因分析結果確顯示其與最近似之*Bartonella*菌種DNA相似度絕大部份皆不高在70%左右，且目前並無所有的*Bartonella*菌種16S-23S基因序列資料可供有效比對，因此目前研究結果顯示並不適於做鼠中*Bartonella*菌種的分析使用。另外，*pap31*基因也因缺乏部份標準菌株之序列資料而無法進行有效評估。而此結果中也進一步指出PCR/RFLP分型是一種可應用於田野調查快速診斷鑑定之方法，惟有分子型為aaab、aaac、aaae時才需額外小心於菌種之歸類。過去研究中雖認為16S-23S基因為相當好的基因藉以探討*Bartonella*之分子演化，然過去研究所用菌種大部份為非鼠類的*Bartonella*菌種，本研究中皆為屬於鼠類獨特*Bartonella*菌種，結果顯示16S-23S基因並不合適為藉以探討*Bartonella*之分子演化對象。

第二年的研究中也意外發現溝鼠可能為新的人類致病原的動物宿主。此病原為最近由美國加州大學舊金山醫學中心的Professor Jane Koehler所發現，命名為*B. rochalimae*。目前傳播途徑並不清楚，而本研究結果為世界上首次報告，顯示可能為以鼠為傳播媒介的一新興人畜共通傳染病。

研究中所捕捉鼠種之抽樣偏差可能會對研究中所得菌血症盛行率造成估計偏差。為求不同鼠種捕捉，本研究中所混雜使用鼠餌為沾花生醬的地瓜、烤過魷魚乾及香腸，但以烤過香腸捕獲率較高。研究者也相

信鼠餌會影響鼠種的捕獲，但要抓到各鼠種以獲得流行病學全貌實行上確有困難。但本研究中的樣本多為臺灣人民常於環境中遇見的鼠種，對人類感染的威脅評估應有相當幫助。

結論與建議

本年度研究程果最重要的發現是在台灣地區具有 *Bartonella* 屬菌中的人畜共通致病原 (*B. elizabethae* 與 *B. grahamii*)。在國外已在1993年於一嚴重的心內膜炎患者中檢測出其心臟瓣膜組織含有 *B. elizabethae* 之 DNA[16]，而在美國巴爾的摩地區針對流浪漢進行血清抗體調查發現陽性率高達33%[15]。而 *B. grahamii* 也有感染神經網膜炎的病例報告[24]。未來於疑似因與鼠類接觸而有不明原因發燒的患者，也建議應納入相關 *Bartonella* 菌診斷。而所分離出的菌株藉由分子演化分析結果顯示，*gltA* 基因與 *ftsZ* 基因相較於其他基因而言，為較佳對象進行鼠類 *Bartonella* 分子演化與菌種鑑定。

重要研究成果及具體建議

1.計畫之新發現或新發明

本次研究為台灣地區首次針對小型哺乳類動物的 *Bartonella* 屬菌流行病學進行調查，包括菌血症盛行率、鼠類宿主種別、地理區位、多種抗原血清抗體盛行率以及基因差異鑑別等多項流行病學因子觀察；本次研究除了瞭解台灣鼠種 *Bartonella* 屬菌具有高盛行率與菌種相複雜外，也是國際上首次由食蟲目的錢鼠中分離出 *Bartonella* 屬菌，且可能為一新菌種。本研究中並發現最新人類 *Bartonella* 屬致病原 *Bartonella rochalimae* 可能以溝鼠(*Rattus norvegicus*)為動物宿主，為目前國際研究的首次發現。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

避免與感染的動物接觸及進行鼠類防治，以避免意外感染人畜共通的 *Bartonella* 屬菌。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

本研究程果最重要的發現是在台灣地區具有 *Bartonella* 屬菌中的人畜共通致病原 (*B. elizabethae*、*B. grahamii* 與 *B. rochalimae*)，因此未來於疑似因與鼠類接觸而有不明原因發燒的患者，也建議應納入相關 *Bartonella* 菌診斷。

參考文獻

1. Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev 1997;10:203-19.
2. Bai Y, Kosoy MY, Maupin GO, Tsuchiya KR, Gage KL. Genetic and Ecologic Characteristics of *Bartonella* communities in rodents in southern China. Am J Trop Med Hyg 2002;66:622-7.
3. Baker JA. A rickettsial infection in Canadian voles. J Exp Med 1946;84:37-51.
4. Birtles RJ, Canales J, Ventosilla P, Alvarez E, Guerra H, Llanos-Cuenta A, Raoult D, Doshi N, Harrison TG. Survey of *Bartonella* species infecting intradomicillary animals in the Huayllacallan Valley, Ancash, Peru, a region endemic for human bartonellosis. Am J Trop Med Hyg 1999;60:799-805.
5. Birtles RJ, Harrison TG, Saunders NA, Molyneux DH. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb.nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1995;45:1-8.
6. Birtles RJ, Hazel S, Bown K, Raoult D, Begon M, Bennett M. Subtyping of uncultured Bartonellae using sequence comparison of 16S/23S rRNA intergenic spacer regions amplified directly from infected blood. Mol Cell Probab 2000;14:79-87.
7. Birtles RJ, Raoult D. Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. Int J Syst Bacteriol 1996;46:891-7.
8. Bown KJ, Bennet M, Begon M. Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. Emerg Infect Dis 2004;10:684-7.
9. Breitschwerdt EB, Kordick DL. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin Microbiol Rev 2000;13:428-38.
10. Brenner DJ, Connor SO, Winkler HH, Steigerwalt AG. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. Int J Syst Bacteriol 1993;43:777-86.
11. Brouqui P, Scola BL, Roux V, Raoult D. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. N Engl J Med 1999;340:184-9.
12. Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Heller R, Kocan KM, Ueno H, Yamamoto K, Bleich V, Pierce B, Gonzales B, Swift P, Boyce W, Jang

- S, Boulouis HJ, Piemont YP. *Bartonella* spp. isolated from wild and domestic ruminants in North America. *Emerg Infect Dis* 2000;6:306-11.
13. Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Romano V, Tietze N. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol* 2001;39:1221-6.
 14. Chang CC, Kasten RW, Chomel BB, Simpson DC, Hew CM, Kordick DL, Heller R, Piemont Y, Breitschwerdt EB. Coyotes (*Canis latrans*) as the reservoir for a human pathogenic *Bartonella* sp.: molecular epidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* infection in coyotes from central coastal California. *J Clin Microbiol*. 2000;38:4193-200.
 15. Comer JA, Flynn C, Regnery RL, Vlahov D, Childs JE. Antibodies to *Bartonella* spp. in inner-city Baltimore intravenous drug users. *Arch Intern Med* 1996;156:2491-5.
 16. Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, Moss CW, Hollis DG, Weyant RS, Steigerwalt AG, Weaver RE, Daneshvar MI, O'Connor SP. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol* 1993;31:872-81.
 17. Drancourt M, Mainardi JL, Brouqui P, Vandenesch F, Carta A, Lehnert F, Etienne J, Vigier E, Goldstein F, Acar J, Raoult D. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* endocarditis in homeless patients: report of three cases. *N Engl J Med* 1995;332:419-23.
 18. Droz S, Chi B, Horn E, Steigerwalt AG, Whitney AM, Brenner DJ. *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. *J Clin Microbiol* 1999;37:1117-22.
 19. Ellis BA, Regnery RL, Beati L, Bacellar F, Rood M, Glass GG, Marston E, Ksiazek TG, Jones D, Childs JE. Rats of the genus *Rattus* are reservoir hosts for pathogenic *Bartonella* species: an Old World origin for a new world disease? *J Infect Dis* 1999;180:220-4.
 20. Heller R, Kubina M, Mariet P, Riegel P, Delacour G, Dehio C, Lamarque F, Kasten R, Boulouis HJ, Monteil H, Chomel BB, Piemont Y. *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:283-8.
 21. Heller R, Riegel P, Hansmann Y, Delacour G, Bermond D, Dehio C, Lamarque F, Monteil H, Chomel BB, Piemont Y. *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:1333-9.
 22. Hofmeister EK, Kolbert CP, Abdulkarim AS, Magera JM, Hopkins MK, Uhl JR, Ambyaye A, Telford III SR, Cockerill III FR, Persing DH. Cosegregation of a novel *Bartonella* species with *Borrelia burgdorferi*

- and *Babesia microti* in *Peromyscus leucopus*. J Infect Dis 1998;177:409-16.
23. Karem KL, Paddock CD, Regnery RL. *Bartonella henselae*, *B. quintana*, and *B. bacilliformis*: historical pathogens of emerging significance. Microbes Infect 2000;2:1193-205.
 24. Kerkhoff FT, Bergmans AM, Van der Zee A, Rothova A. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. J Clin Microbiol 1999;37:4034-8.
 25. Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TL, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Breitschwerdt EB. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). J Clin Microbiol 1997;35:1813-8.
 26. Koehler JE, Glaser CA, Tappero JW. *Rochalimaea henselae* infection: a new zoonosis with the domestic cat as a reservoir. JAMA 1994;271:531-5.
 27. Koehler JE, Sanchez MA, Garrido CS, Whitfeld MJ, Chen FM, Berger TG, Rodriguez-Barradas MC, Leboit PE, Tappero JW. Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. N Engl J Med 1997;337:1876-83.
 28. Kordick DL, Swaminathan B, Greene CE, Wilson KH, Whitney AM, O'Connor SP, Hollis DG, Matar GM, Steigerwalt AG, Malcolm GB, Hayes PS, Hadfield TL, Breitschwerdt EB, Brenner DJ. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* subsp. nov., isolated from dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and emended description of *Bartonella vinsonii*. Int J Syst Bacteriol 1996;46:704-9.
 29. Kosoy MY, Regnery RL, Kosaya OI, Childs JE. Experimental infection of cotton rats with three naturally occurring *Bartonella* species. Wildl Dis 1999;35:275-84.
 30. Kosoy MY, Regnery RL, Tzianabos T, Marston EL, Jones DC, Green D, Maupin GO, Olson JG, Childs JE. Distribution, diversity and host specificity of *Bartonella* in rodents from the southeastern United States. Am J Trop Med Hyg 1997;57:578-88.
 31. Lucey D, Dolan MJ, Moss CW, Garcia M, Hollis DG, Weigner S. Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. Clin Infect Dis 1992;14:683-8.
 32. Maurin M, Raoult D. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. Clin Microbiol Rev 1996;9:273-92.
 33. Maurin M, Roux V, Stein A, Ferrier F, Viraben R, Raoult D. Isolation

- and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16S rRNA gene sequencing, and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a French patient with bacillary angiomatosis. J Clin Microbiol 1994;32:1166-71.
34. Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. FASEB J. 1993;7:113-23.
 35. Raoult D, Roux V. The body louse as a vector of reemerging human diseases. Clin Infect Dis 1999;29:888-911.
 36. Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE, Rodriguez-Barradas MC, Jones DC, Carr JH. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. J Clin Microbiol 1992;30:265-74.
 37. Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS. The agent of bacillary angiomatosis: an approach to the identification of uncultured pathogens. N Engl J Med. 1990;323:1573-80.
 38. Roux V, Eykyn SJ, Wyllie S, Raoult D. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. J Clin Microbiol 2000;38:1698-700.
 39. Spach DH, Kanter AS, Dougherty MJ, Larson AM, Coyle MB, Brenner DJ, Swaminathan B, Matar GM, Welch DF, Root RK, Stamm WE. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. N Engl J Med 1995;332:424-8.
 40. Stevenson HL, Bai Y, Kosoy MY, Montenieri JA, Lowell JL, Chu MC, Gage KL. Detection of novel *Bartonella* strains and *Yersinia pestis* in prairie dogs and their fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae and Pulicidae) using multiplex polymerase chain reaction. J Med Entomol 2003;40:329-37.
 41. Stoler MH, Bonfiglio TA, Steigbigel RT, Pereira M. An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. Am J Clin Pathol 1983;80:714-8.
 42. Welch DF, Carroll KC, Hofmeister EK, Persing DH, Robinson DA, Steigerwalt AG, Brenner DJ. Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, from a cattle rancher identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferii* and *Babesia microti* among naturally infected mice. J Clin Microbiol 1999;37:2598-601.
 43. Wong MT, Thornton DC, Kennedy RC, Dolan MJ. A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea (Bartonella) henselae* from blood and tissue specimens. J Clin

Microbiol 1995;33:742-4.

表1.台灣中部地區三處捕捉地點所捕捉之鼠種記錄

鼠種	地區			總計
	港口區	牧場區	城市區	
溝鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)	91	66	12	169
地區別百分比	53.8%	39.1%	7.1%	100.0%
鼠種別百分比	41.4%	90.4%	70.6%	54.5%
錢鼠 (<i>Suncus murinus</i>)	125	1	0	126
地區別百分比	99.2%	0.8%	0.0%	100.0%
鼠種別百分比	56.8%	1.4%	0.0%	40.6%
小黃腹鼠 (<i>Rattus losea</i>)	3	0	0	3
地區別百分比	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%
鼠種別百分比	1.4%	0.0%	0.0%	1.0%
家鼯鼠 (<i>Mus musculus</i>)	1	1	0	2
地區別百分比	50.0%	50.0%	0.0%	100.0%
鼠種別百分比	0.5%	1.4%	0.0%	0.3%
屋頂鼠 (<i>Rattus rattus</i>)	0	5	5	10
地區別百分比	0.0%	50.0%	50.0%	100.0%
鼠種別百分比	0.0%	6.8%	29.4%	3.2%
總計	220	73	17	310
地區別百分比	71.0%	23.5%	5.5%	100.0%

表 2. 台灣中部地區 *Bartonella* 屬菌於小型哺乳類動物之菌血症盛行率

鼠種	地區			鼠種別菌血症盛行率
	港口區	城市區	牧場區	
溝鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)	51.6%(47/91)	60.6%(40/66)	16.7%(2/12)	52.7%(89/169)
錢鼠 (<i>Suncus murinus</i>)	28.8%(36/125)	0.0%(0/1)	NS	28.6%(36/126)
小黃腹鼠 (<i>Rattus losea</i>)	66.7%(2/3)	NS	NS	66.7%(2/3)
家鼯鼠 (<i>Mus musculus</i>)	0.0%(0/1)	0.0%(0/1)	NS	0.0%(0/2)
屋頂鼠 (<i>Rattus rattus</i>)	NS	20%(1/5)	0.0%(0/5)	10%(1/10)
地區內總菌血症盛行率	38.6%(85/220)	56.2%(41/73)	11.8%(2/17)	41.3%(128/310)

NS: 無捕捉紀錄 (no samples)

表 3. 鼠種與各菌種分離株相關性分析

鼠種	<i>Bartonella</i> spp. %					
	<i>B. Taiwan-1</i>	<i>B. tribocorum</i>	<i>B. grahamii</i>	<i>B. elizabethae</i>	<i>B. phoceensis</i>	<i>B. ratimessi</i>
溝鼠	6.7(6/89)	57.3(51/89)	9.0(8/89)	34.8(31/89)	3.4(3/89)	1.1(1/89)
錢鼠	91.7(33/36)	5.6(2/36)	0.0(0/36)	0.0(0/36)	0.0(0/36)	2.8(1/36)
屋頂鼠	0.0(0/1)	100.0(1/1)	0.0(0/1)	0.0(0/1)	0.0(0/1)	0.0(0/1)
小黃腹鼠	0.0(0/2)	0.0(0/2)	50.0(1/2)	50.0(1/2)	0.0(0/2)	0.0(0/2)
總計	30.5(39/128)	42.2(54/128)	7.0(9/128)	25.0(32/128)	2.3(3/128)	1.6(2/128)

註：家鼯鼠無菌血症之個案; *B. ratimessi* 全名為 *B. ratimessiliensis*。

表4. 利用四種抗原所進行之*Bartonella* spp.血清抗體盛行率分析結果

感染之 <i>Bartonella</i> spp	檢測所用抗原			
	<i>B. Taiwan-1</i>	<i>B. tribocorum</i>	<i>B. grahamii</i>	<i>B. elizabethae</i>
<i>B. Taiwan-1</i>	0.0(0/39)	2.6(1/39)	2.6(1/39)	0.0(0/39)
<i>B. tribocorum</i>	7.4(4/54)	14.8(8/54)	9.3(5/54)	0.0(0/54)
<i>B. grahamii</i>	11.1(1/9)	11.1(1/9)	0.0(0/9)	0.0(0/9)
<i>B. elizabethae</i>	0.0(0/32)	9.4(3/32)	6.3(2/32)	0.0(0/32)
<i>B.phoceensis</i>	0.0(0/3)	0.0(0/3)	0.0(0/3)	0.0(0/3)
鼠種				
溝鼠	6.0(10/168)	8.3(14/168)	4.8(8/168)	0.0(0/168)
錢鼠	0.0(0/126)	1.6(2/126)	1.6(2/126)	0.0(0/126)
屋頂鼠	0.0(0/10)	0.0(0/10)	0.0(0/10)	0.0(0/10)
小黃腹鼠	0.0(0/3)	0.0(0/3)	0.0(0/3)	0.0(0/3)
家鼯鼠	0.0(0/2)	0.0(0/2)	0.0(0/2)	0.0(0/2)

NA: not available

表 5. PCR/RFLP 分子型與不同基因序列片段之結果異同比較

	基 因				
	<i>gltA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>rpoB</i>	<i>ribC</i>	<i>16S-23S</i>
分 子 型	aaab, aaae 及 aaac	aaab, aaae 及 aaac	aaab, aaae 及 aaac	aaab, aaae 及 aaac	aaab 及 aaae
最相近菌種	<i>B. grahamii</i>	<i>B. grahamii</i>	<i>B. tribocorum</i>	<i>B. tribocorum</i>	<i>B. grahamii</i>
相 似 度	94% ~ 96%	96% ~ 97%	96%	96% ~ 97%	78% ~ 80%
分 子 型	abaa	abaa	abaa	abaa	abaa
最相近菌種	<i>B. tribocorum</i>	<i>B. tribocorum</i> <i>B. elizabethae</i>	<i>B. tribocorum</i>	<i>B. tribocorum</i>	<i>B. elizabethae</i>
相 似 度	98%	99.9% 98%	96% ~ 98%	97%	78% ~ 96%
分 子 型	acaa	acaa	acaa	acaa	acaa
最相近菌種	<i>B. rattimassiliensis</i>	<i>B. rattimassiliensis</i>	<i>B. rattimassiliensis</i>	<i>B. rattimassiliensis</i>	<i>B. alsatica</i>
相 似 度	98% ~ 100%	99% ~ 100%	98% ~ 100%	97% ~ 100%	68% ~ 69%
分 子 型	caad	caad	caad	caad	caad
最相近菌種	<i>B. phoceensis</i>	<i>B. phoceensis</i>	<i>B. phoceensis</i>	<i>B. phoceensis</i>	<i>B. alsatica</i>
相 似 度	94%	95%	93%	92%	71%
分 子 型	ccad	ccad	ccad	ccad	ccad
最相近菌種	<i>B. rochalimae</i>	<i>B. rochalimae</i>	<i>B. rochalimae</i>		<i>B. clarridgeiae</i>
相 似 度	96%	97%	97%		75%
分 子 型	baaa*	baaa	baaa*	baaa	baaa
最相近菌種	<i>B. tribocorum</i>	<i>B. tribocorum</i>	<i>B. tribocorum</i>	<i>B. tribocorum</i>	<i>B. elizabethae</i>
相 似 度	95%	96%	95%	95%	78%
分 子 型	aaaa	aaaa	aaaa	aaaa	aaaa
最相近菌種	<i>B. elizabethae</i>	<i>B. elizabethae</i>	<i>B. elizabethae</i>	<i>B. elizabethae</i>	<i>B. elizabethae</i>
相 似 度	96%	98% ~ 100%	98% ~ 100%	97% ~ 100%	86% ~ 96%

*演化樹中為獨立分支

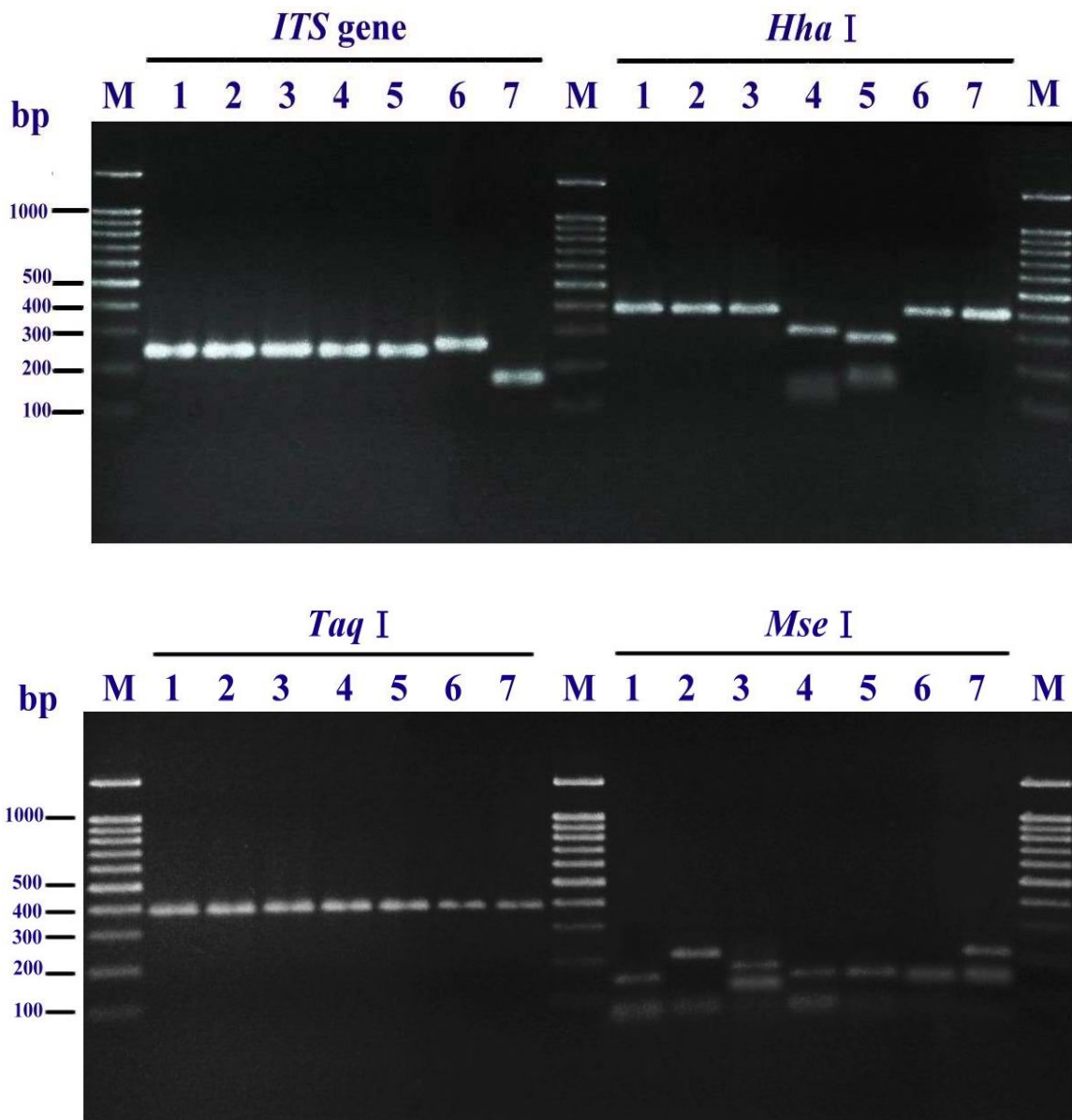


圖1. 結合16S/23S *ITS*基因與*gltA*基因PCR/RFLP(藉由 *Hha*I, *Taq*I 與 *Mse*I限制酵素切割)分析所得之分型結果(共7型)。M：100-1000 bp DNA ladder；lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 分別為 MLE063, MLE065, MLE074, MLE031, TCE121, MLE051, TCE078；16S/23S 基因*ITS*片段與*gltA*基因PCR/RFLP分析型別依序為 aaaa, aaab, aaac, acaa, abaa, baaa, caad.

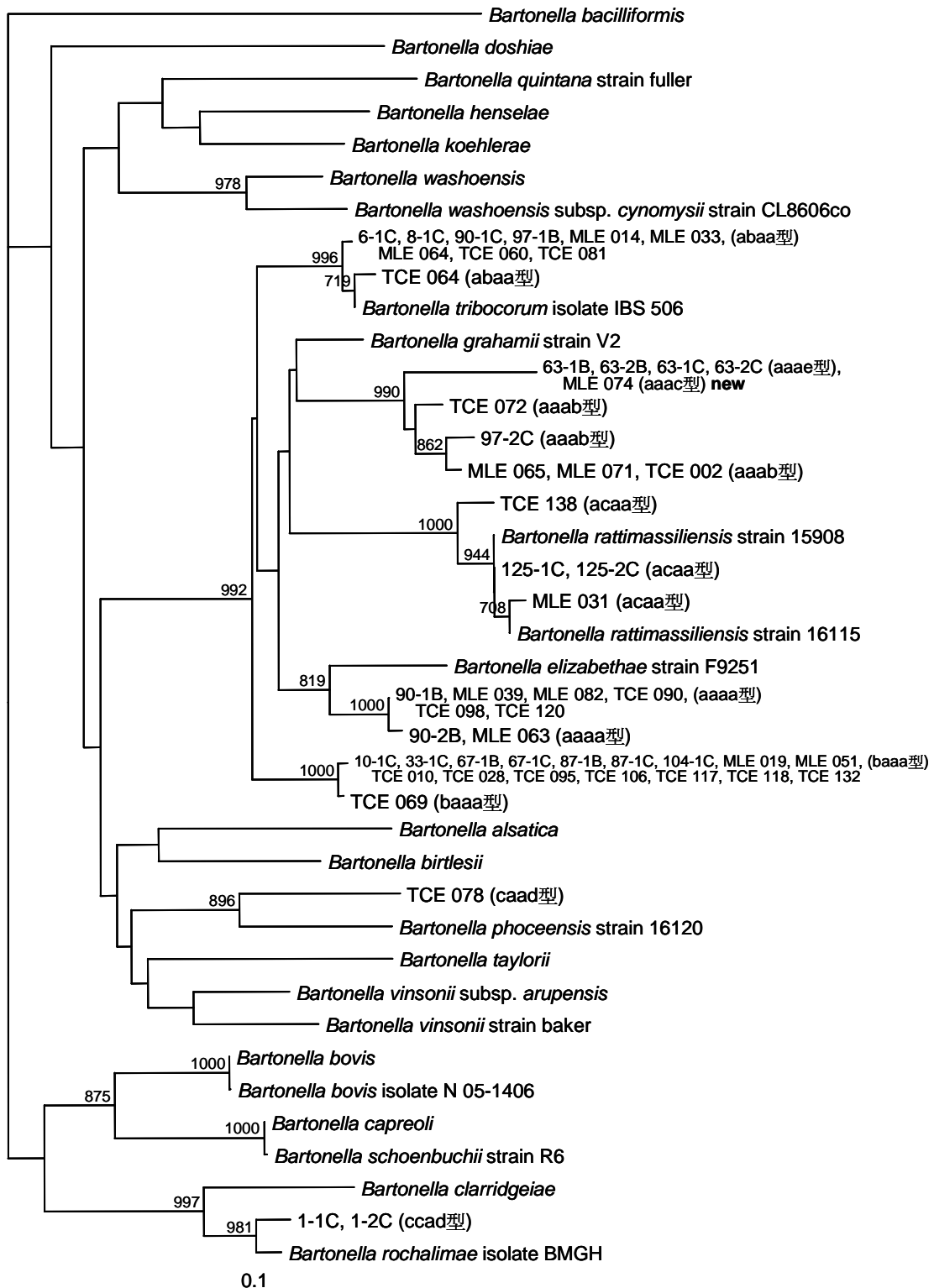


圖 2. 利用 *gltA* 基因以鄰近相互關係法 (neighbor-joining method) 進行 bootstrap 1000 次親源樹狀圖分析結果。(bootstrap 值低於 70 % 則不顯示)

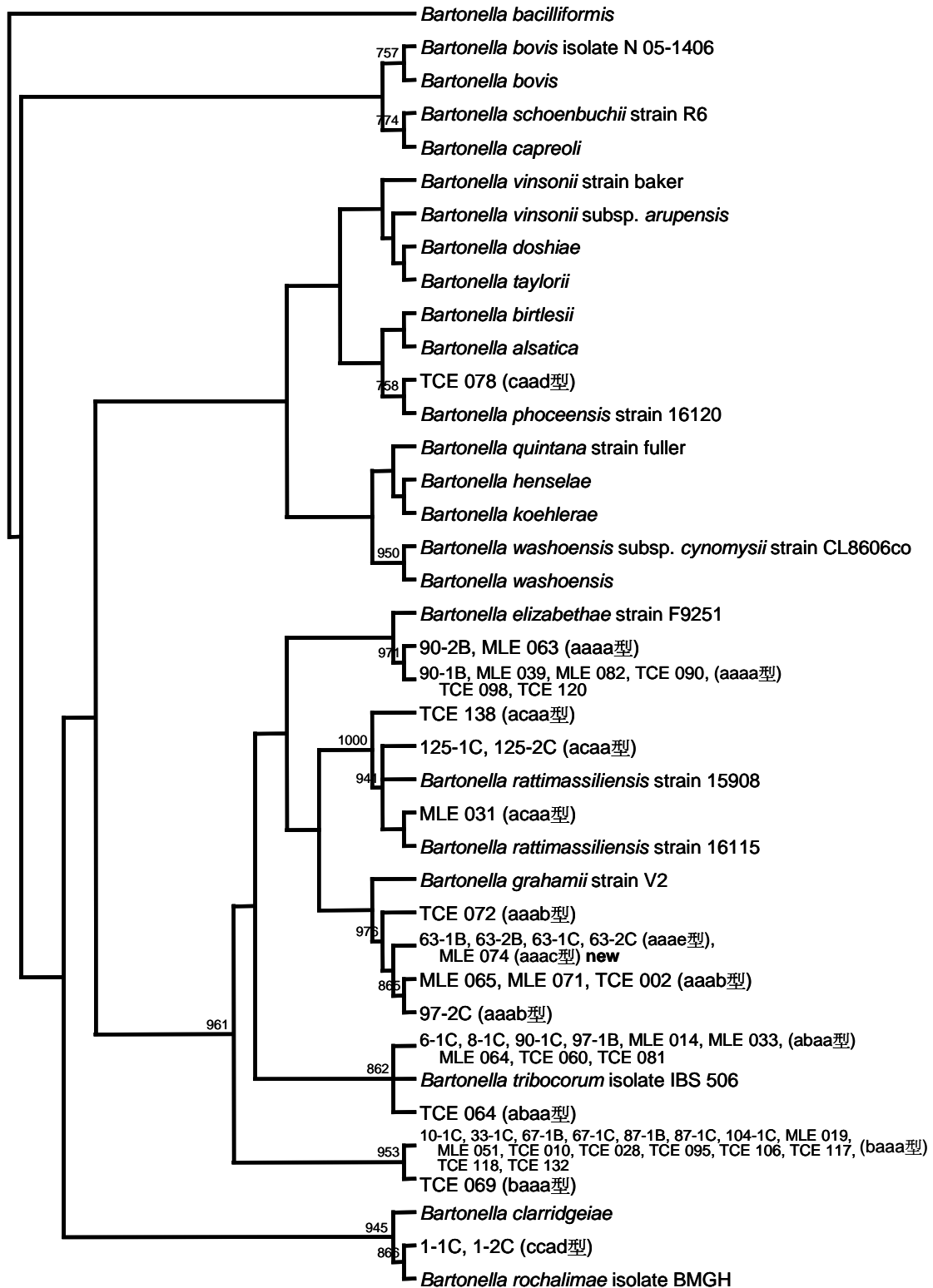


圖 3. 利用 *gltA* 基因以最大簡約法(maximum parsimony method)進行 bootstrap 1000 次親源樹狀圖分析結果。(bootstrap 值低於 70 %則不顯示)

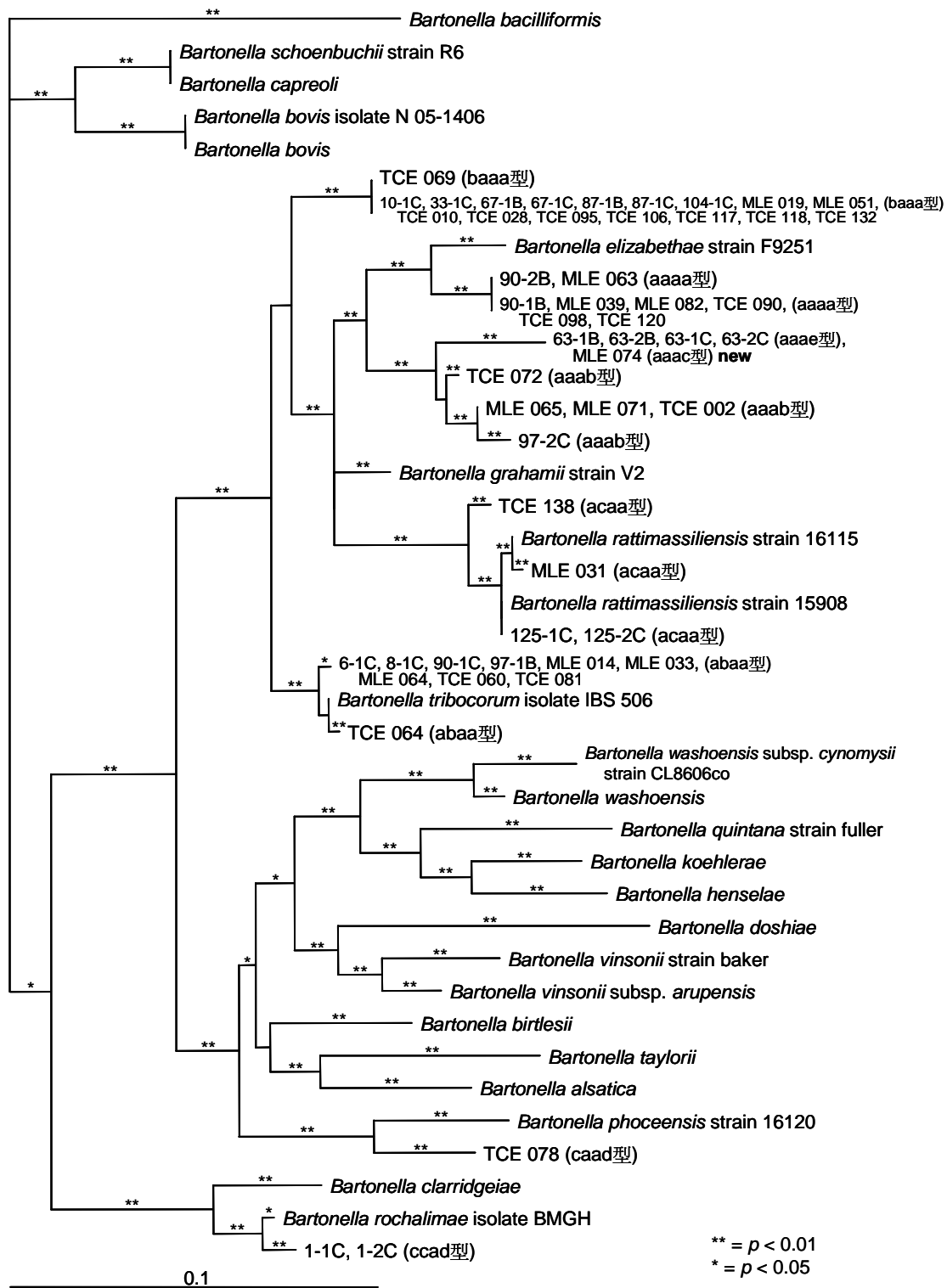


圖 4. 利用 *gltA* 基因以最大相似關係法 (maximum likelihood method) 進行親源樹狀圖分析。

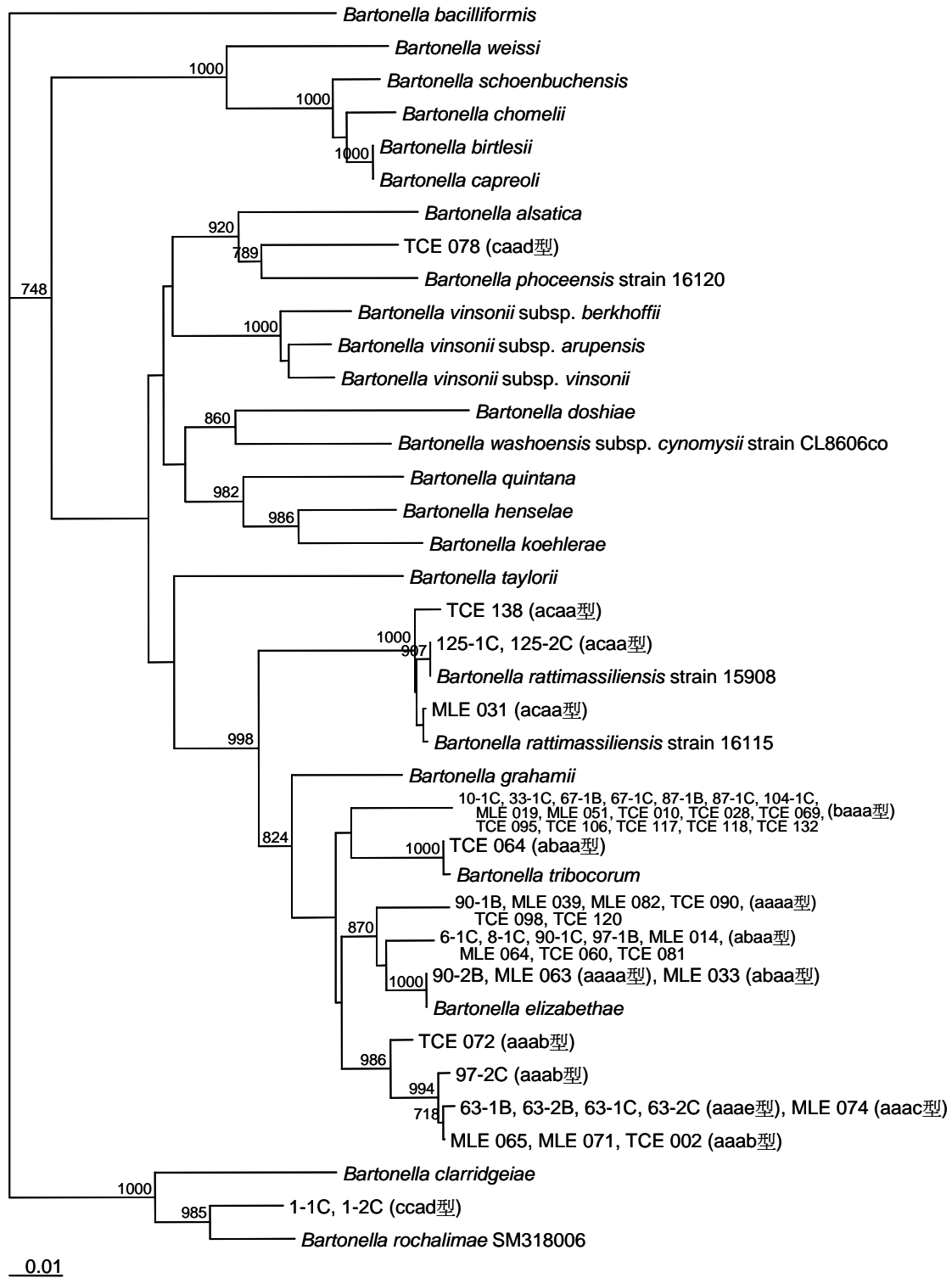


圖 5. 利用 *ftsZ* 基因以鄰近相互關係法(neighbor-joining method)進行 bootstrap 1000 次親源樹狀圖分析結果。(bootstrap 值低於 70 %則不顯示)

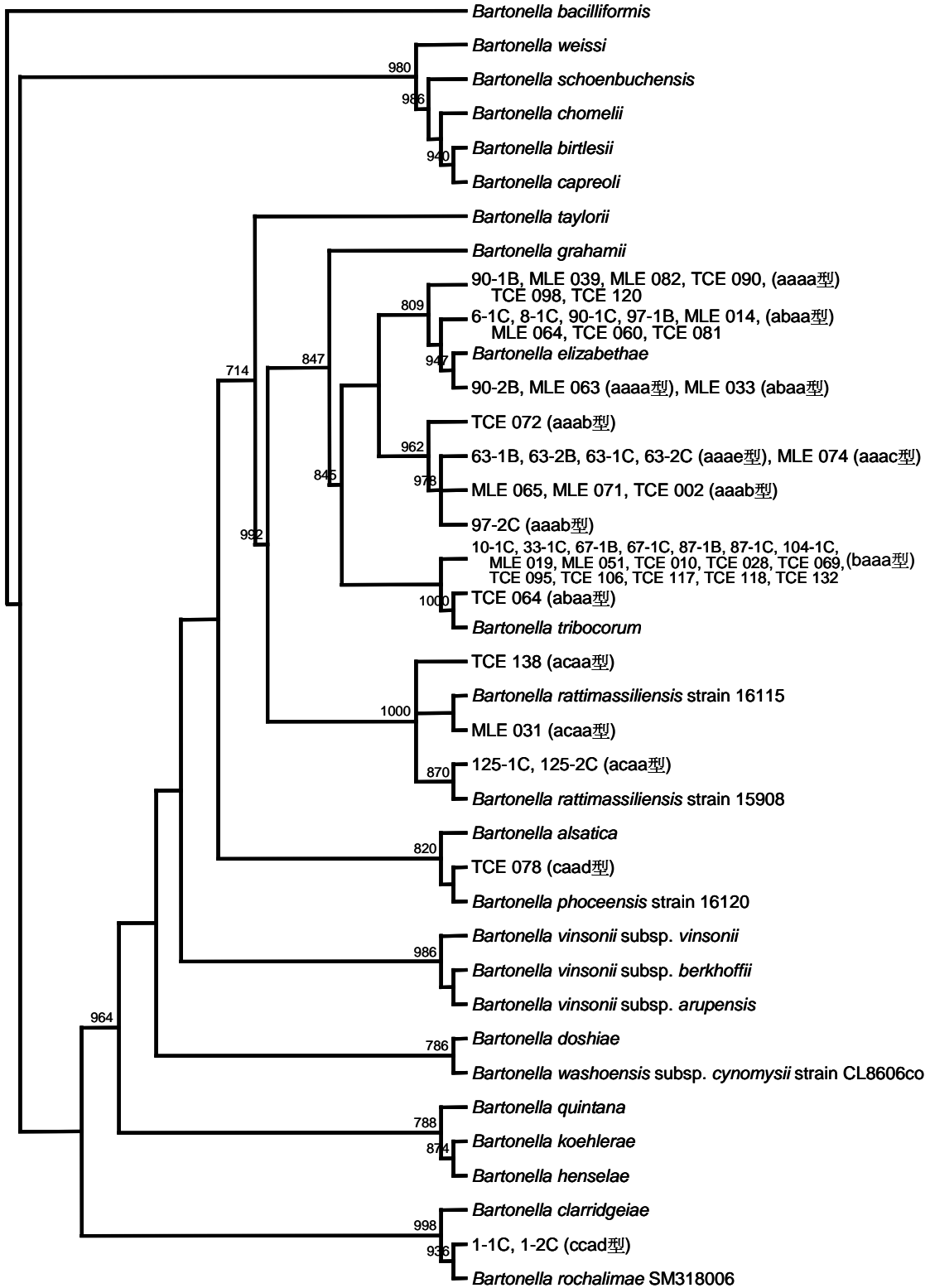


圖 6. 利用 *ftsZ* 基因以最大簡約法(maximum parsimony method)進行 bootstrap 1000 次親源樹狀圖分析結果。(bootstrap 值低於 70 %則不顯示)

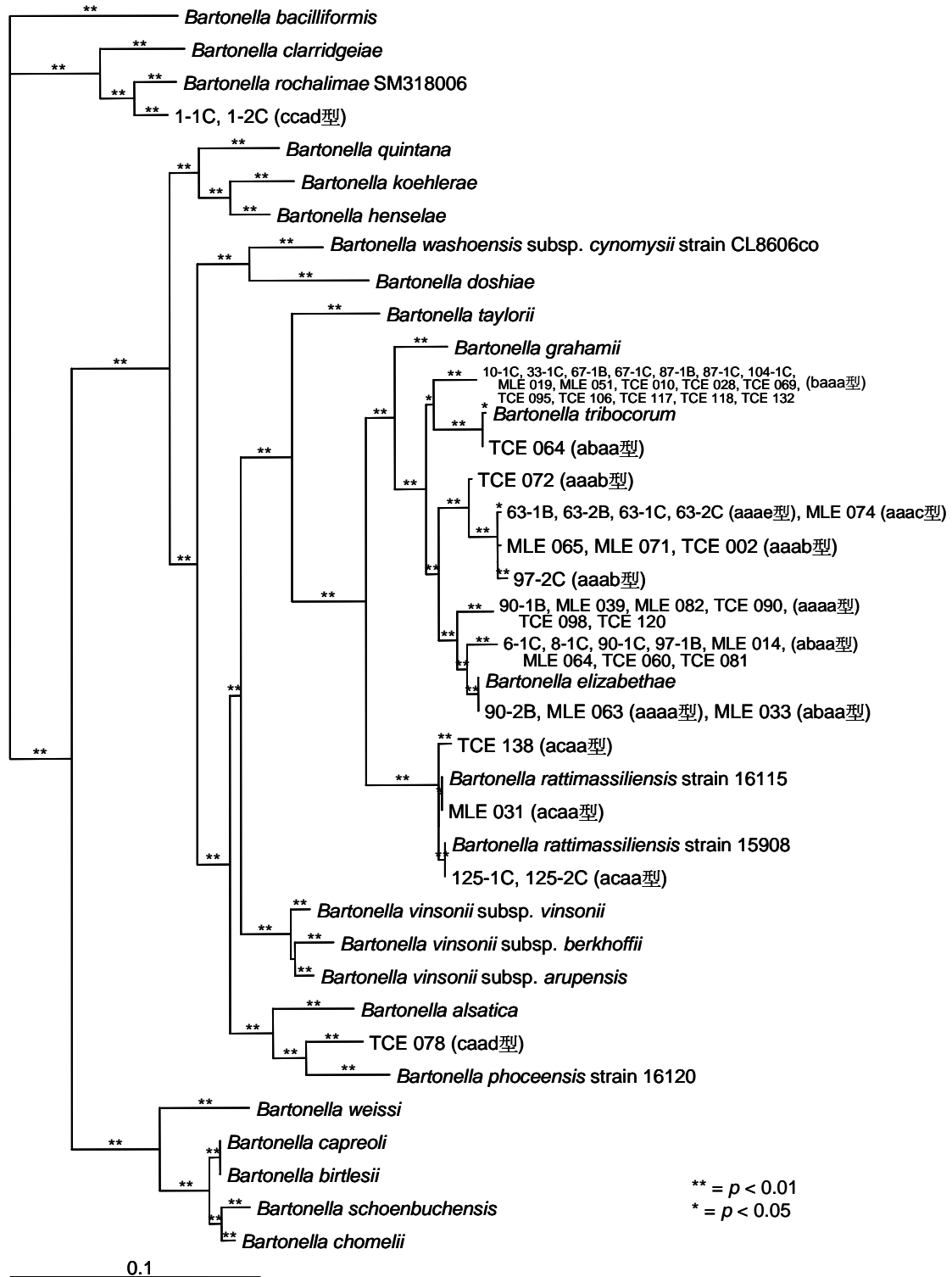


圖 7. 利用 *ftsZ* 基因以最大相似關係法 (maximum likelihood method) 進行親源樹狀圖分析。

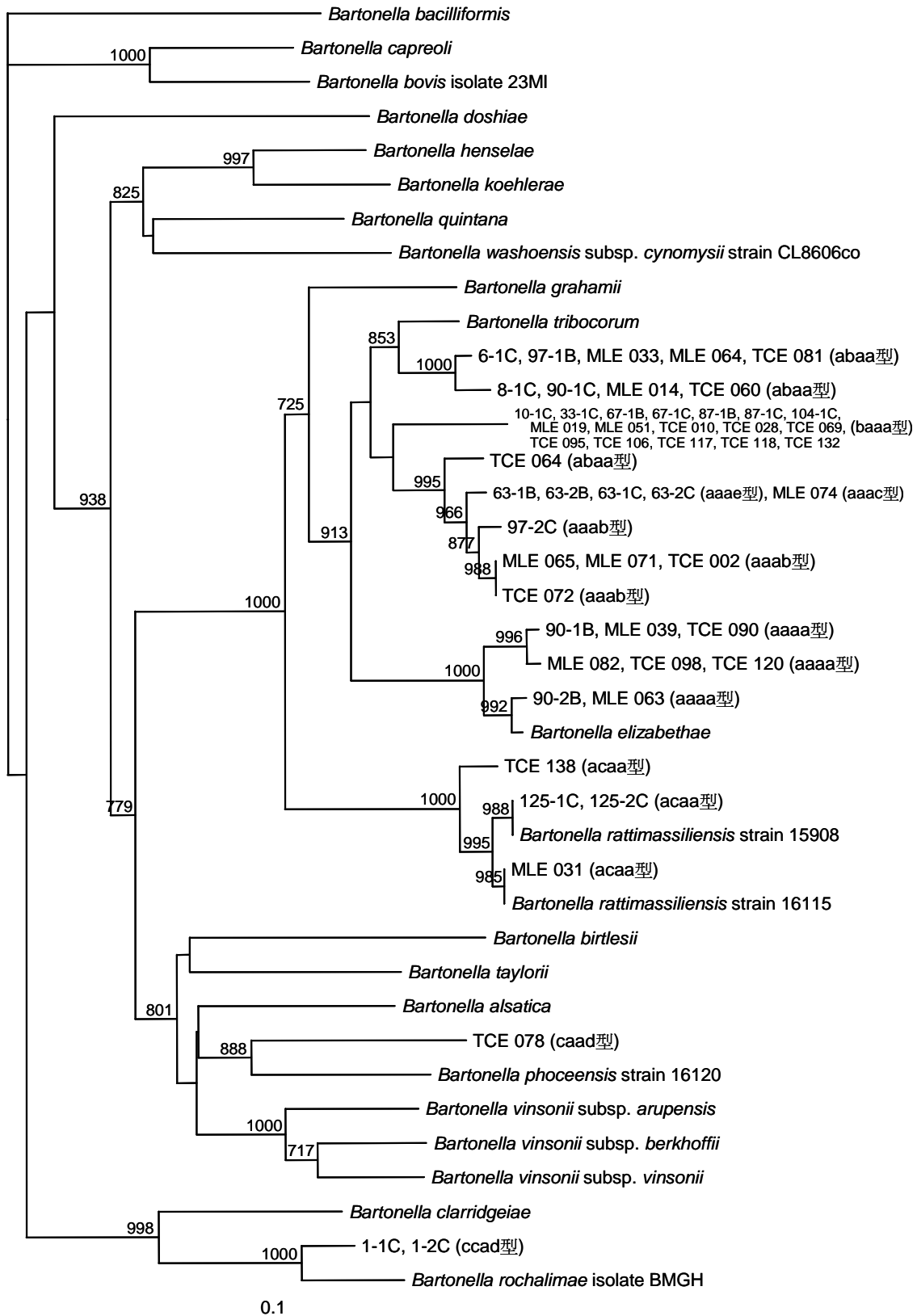


圖 8. 利用 *rpoB* 基因以鄰近相互關係法 (neighbor-joining method) 進行 bootstrap 1000 次親源樹狀圖分析結果。(bootstrap 值低於 70 % 則不顯示)

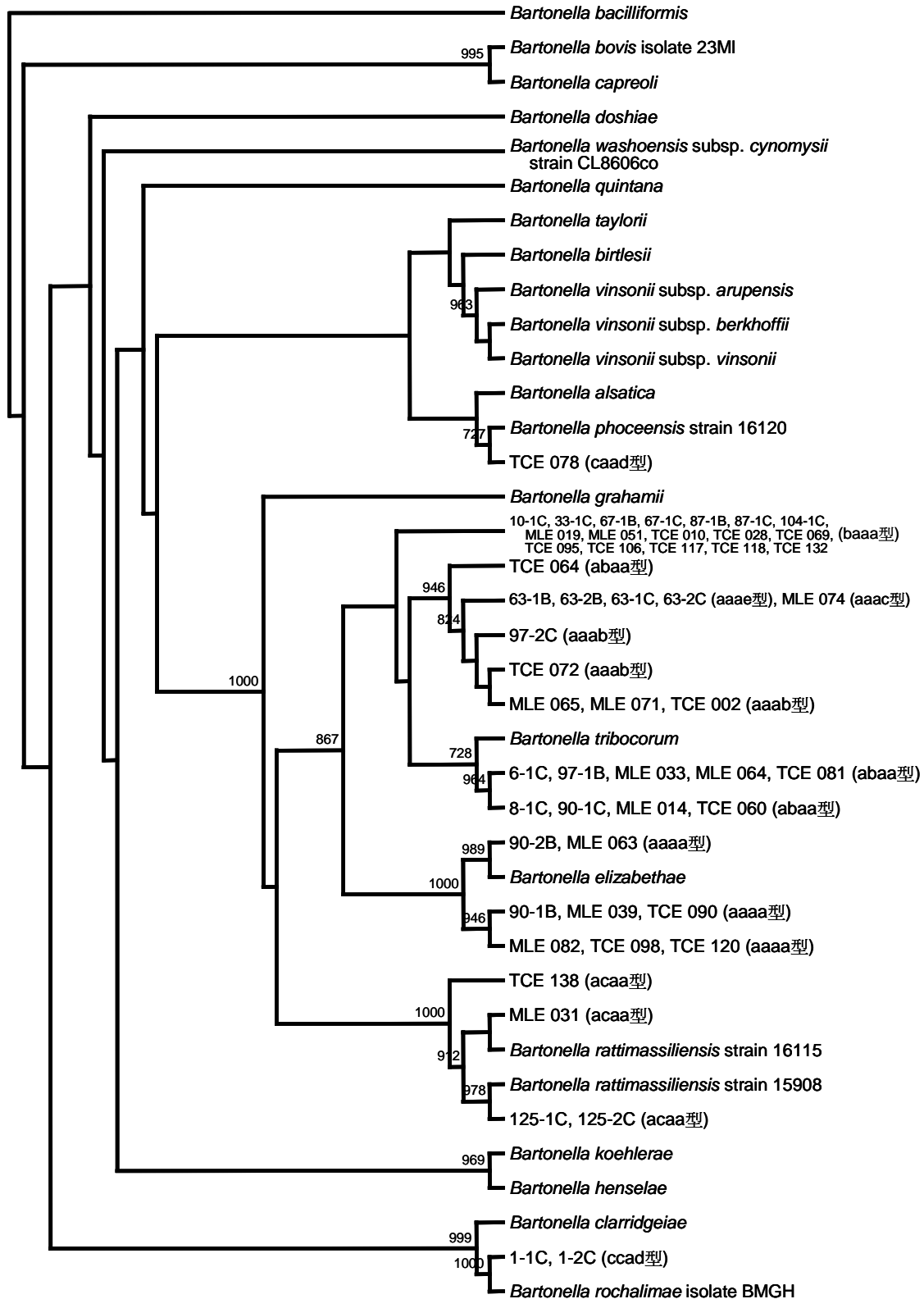


圖 9. 利用 *rpoB* 基因以最大簡約法 (maximum parsimony method) 進行 bootstrap 1000 次親源樹狀圖分析結果。(bootstrap 值低於 70 % 則不顯示)

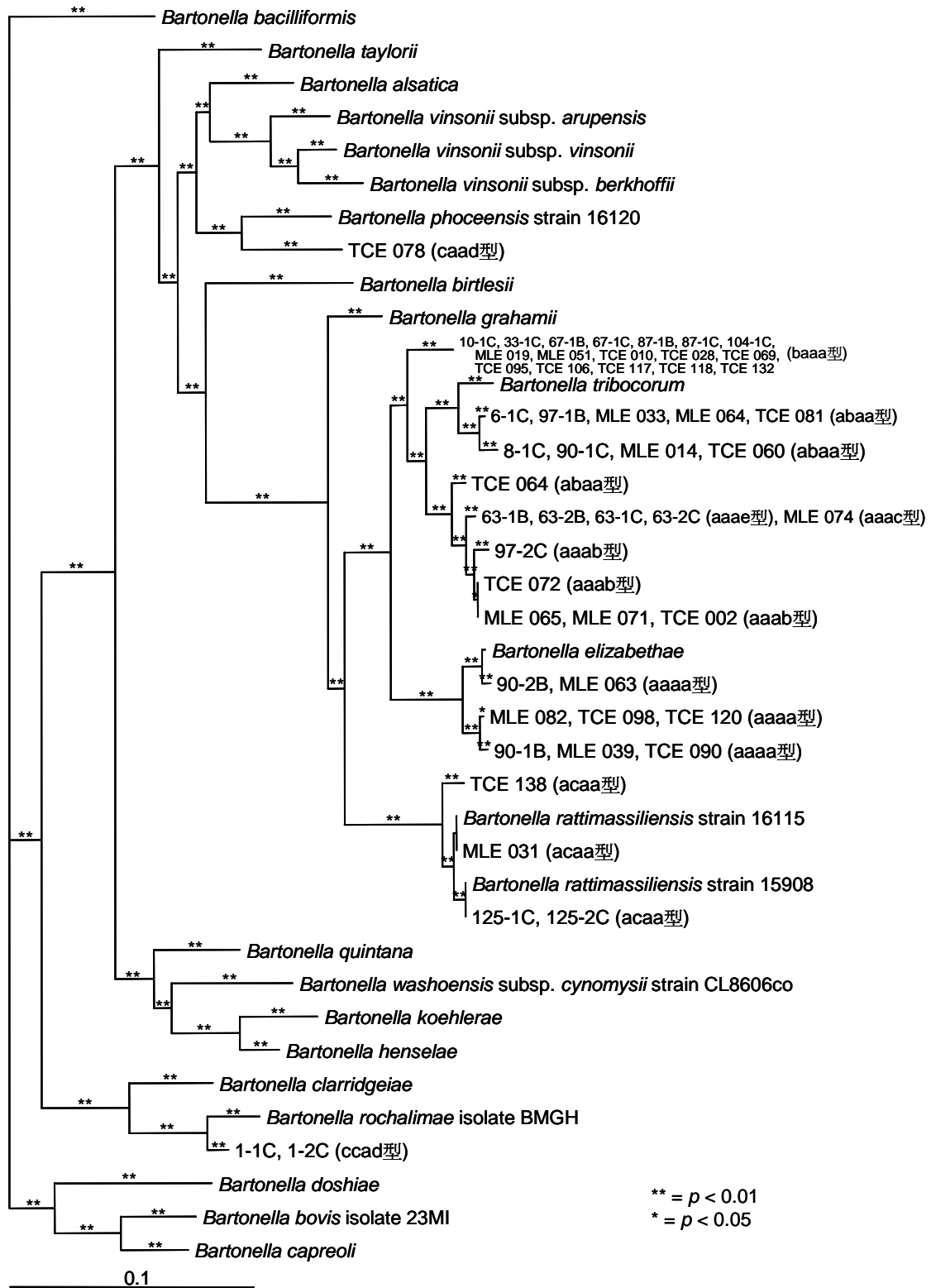


圖 10. 利用 *rpoB* 基因以最大相似關係法 (maximum likelihood method) 進行親源樹狀圖分析。

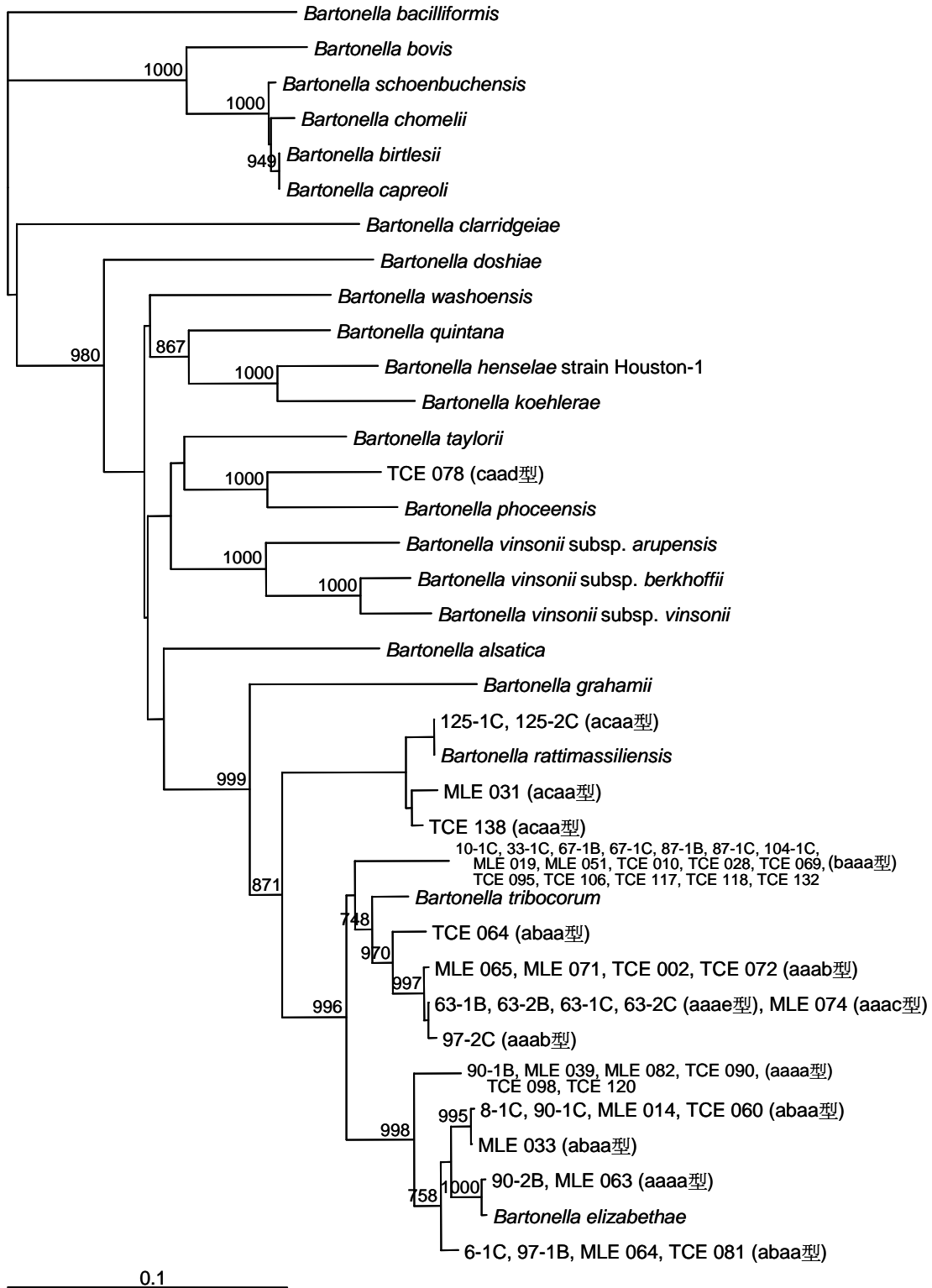


圖 11. 利用 *ribC* 基因以鄰近相互關係法 (neighbor-joining method) 進行 bootstrap 1000 次親源樹狀圖分析結果。(bootstrap 值低於 70 % 則不顯示)

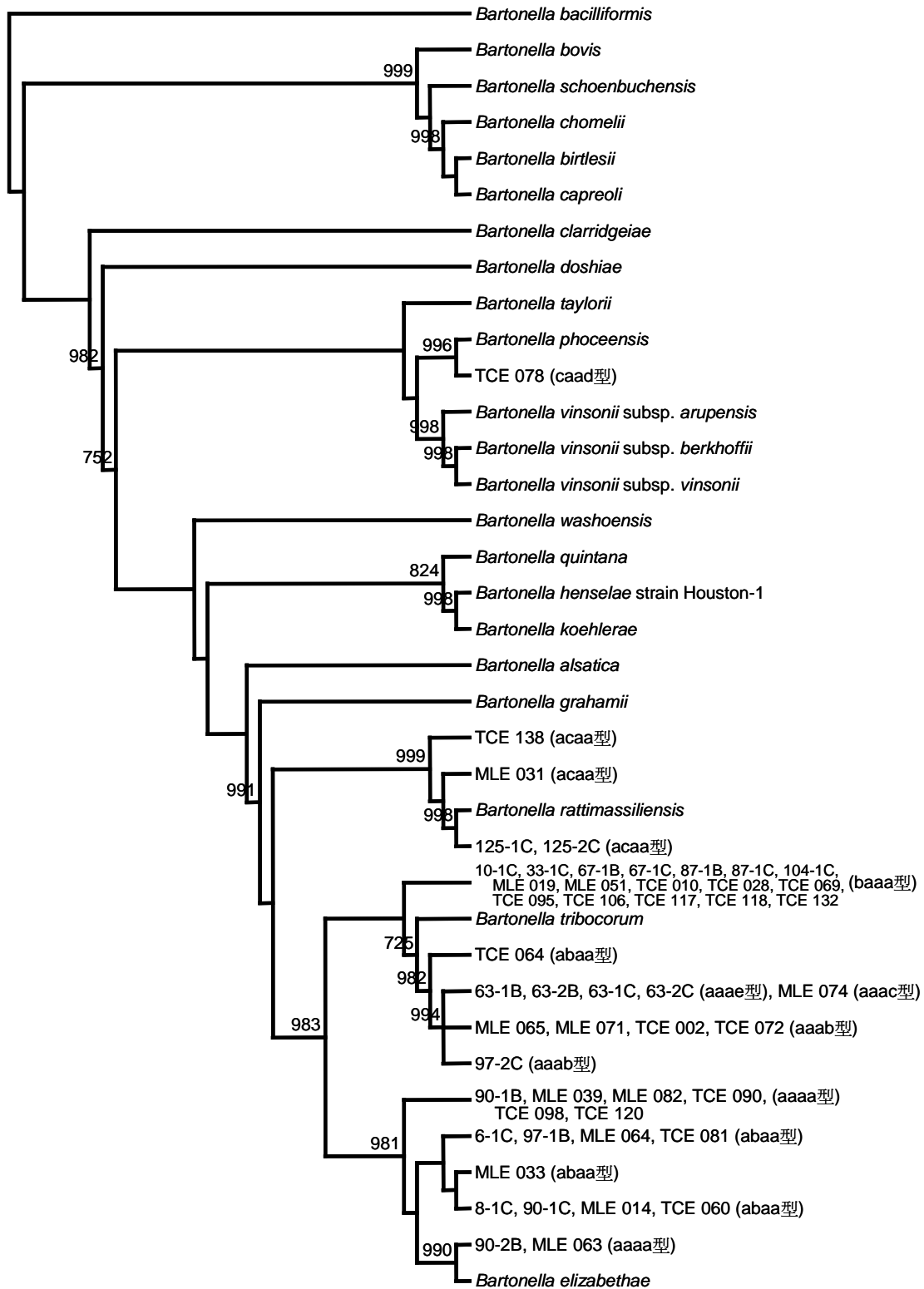


圖 12. 利用 *ribC* 基因以最大簡約法 (maximum parsimony method) 進行 bootstrap 1000 次親源樹狀圖分析結果。(bootstrap 值低於 70 % 則不顯示)

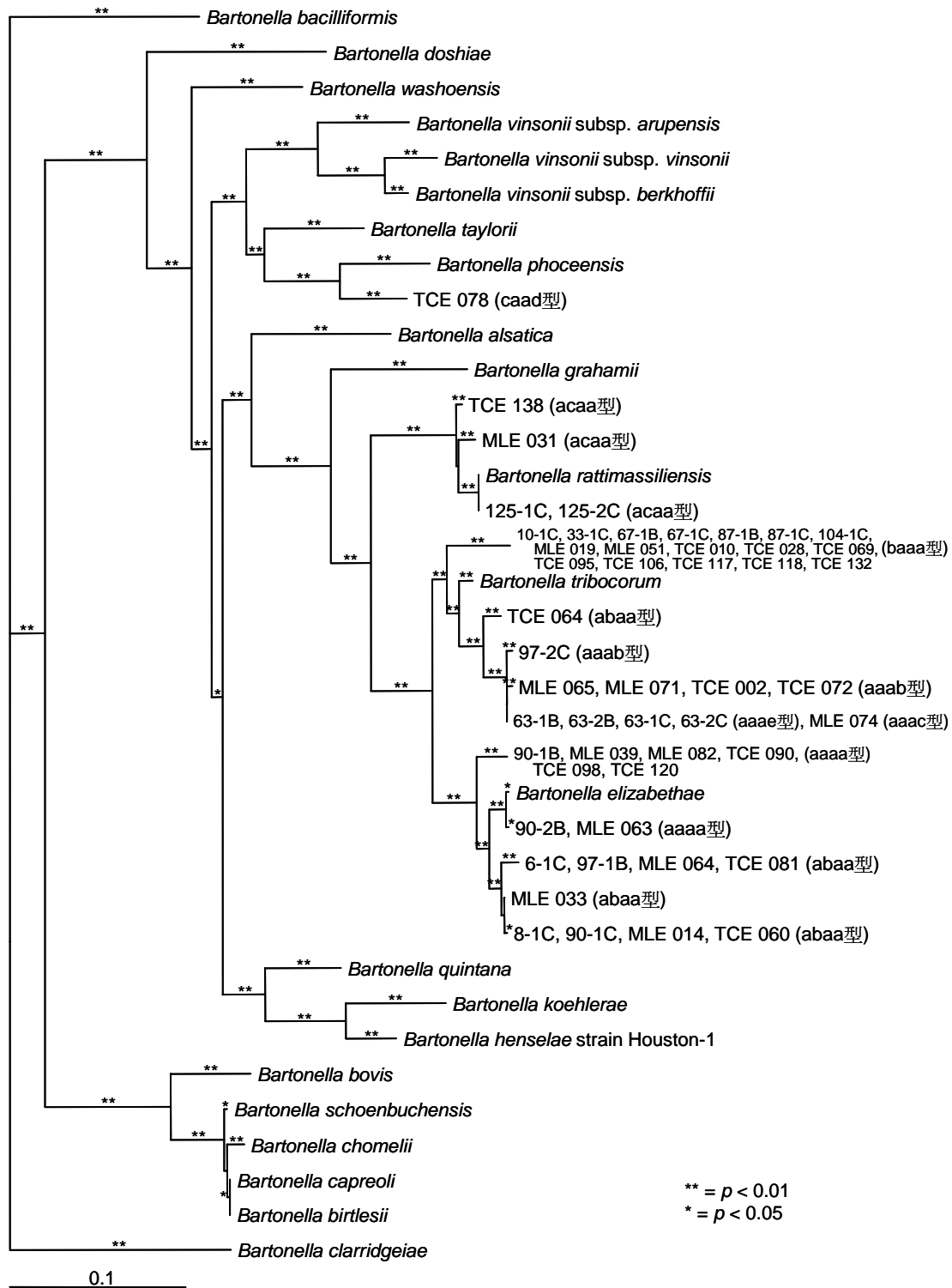


圖 13. 利用 *ribC* 基因以最大相似關係法 (maximum likelihood method) 進行親源樹狀圖分析。

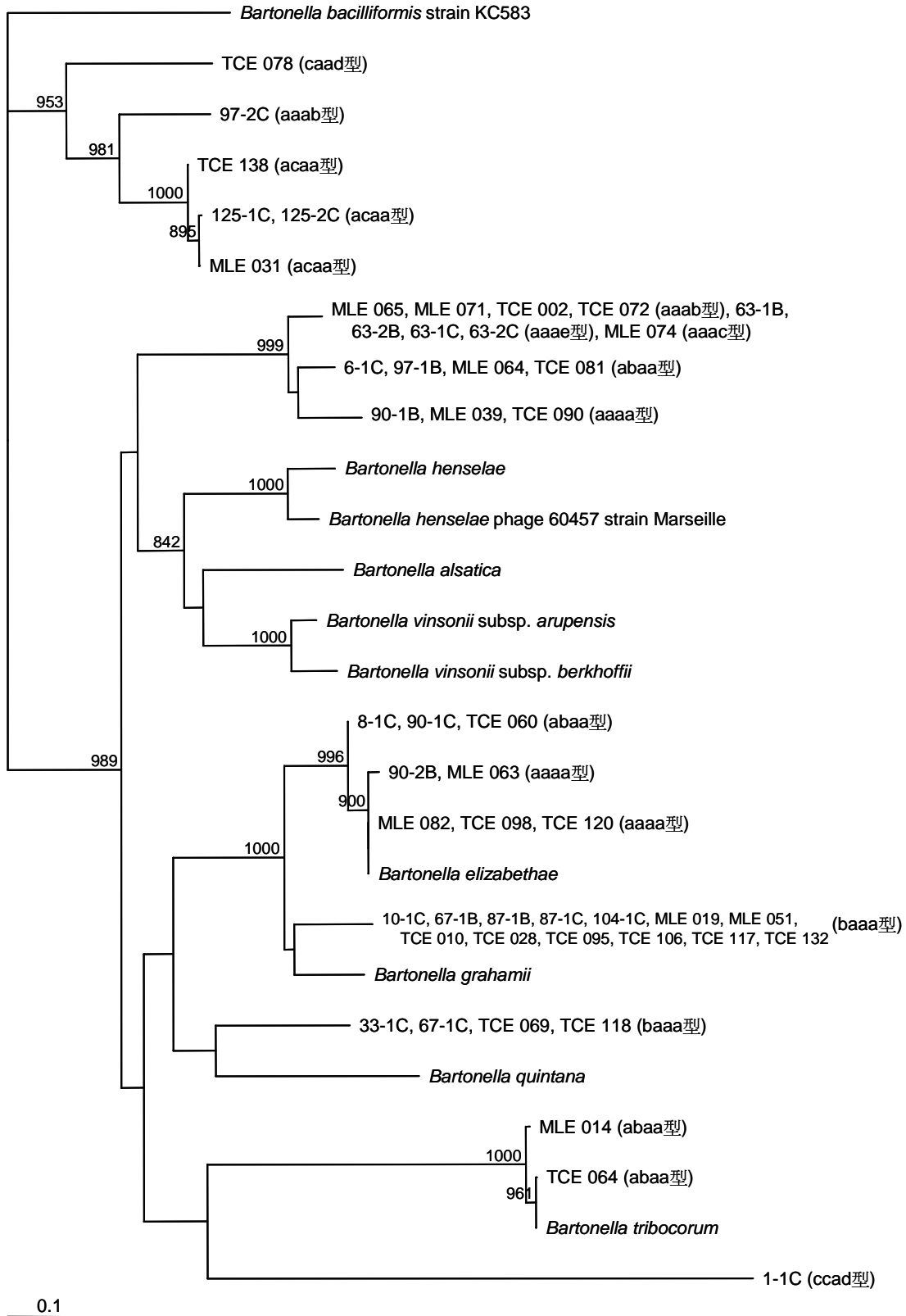


圖 14. 利用 *pap31* 基因以鄰近相互關係法 (neighbor-joining method) 進行 bootstrap 1000 次親源樹狀圖分析結果。(bootstrap 值低於 70 % 則不顯示)

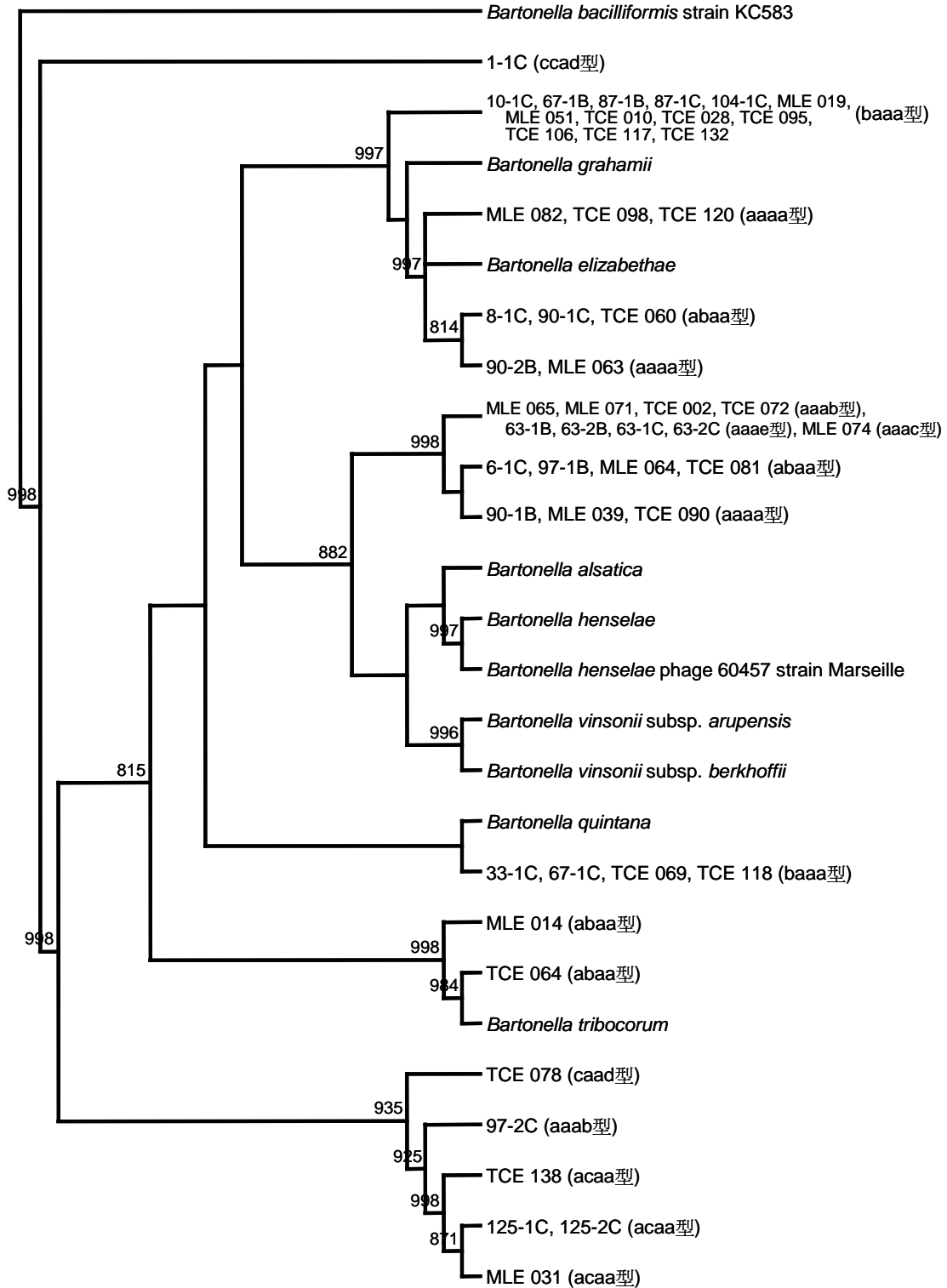
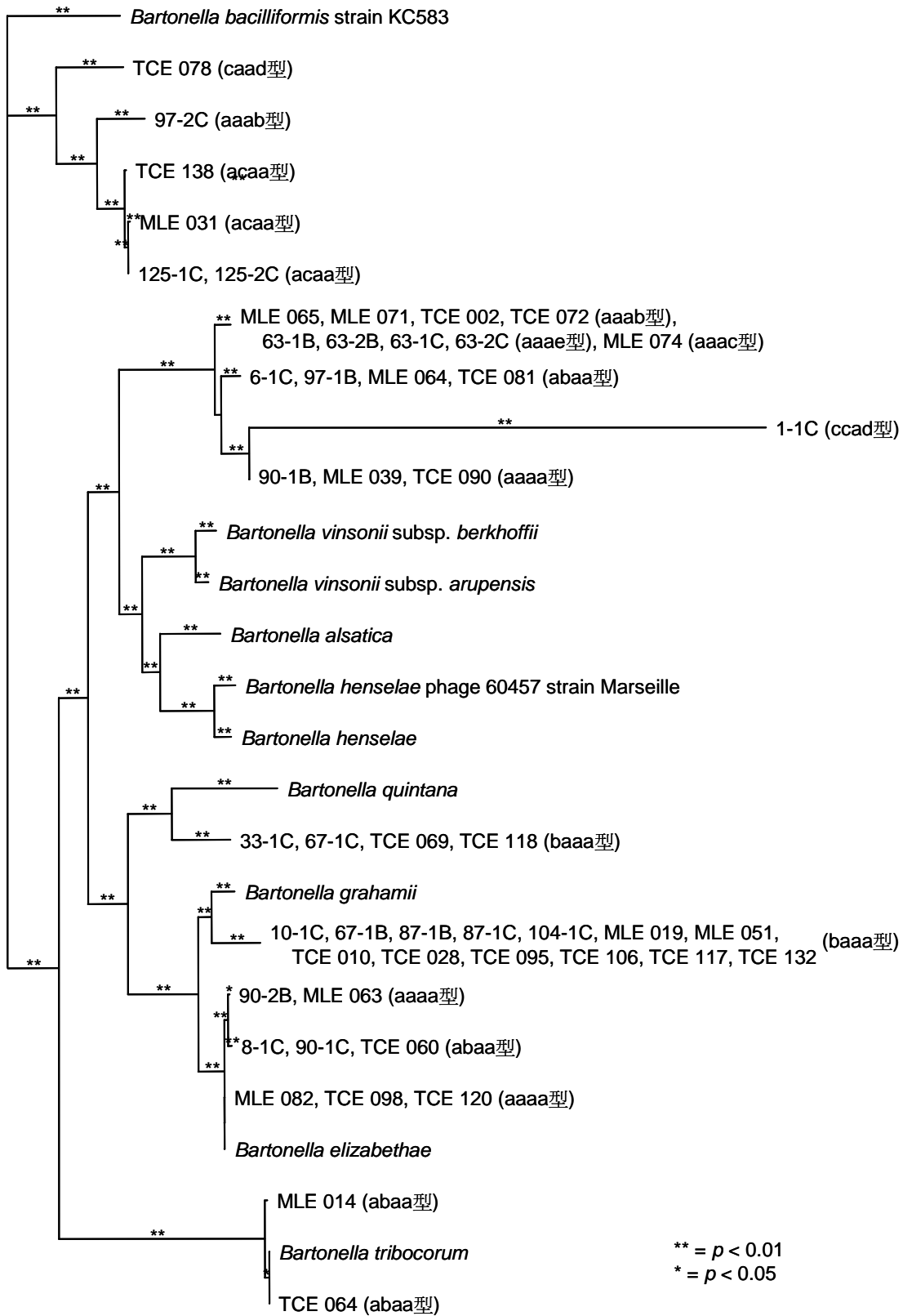


圖 15. 利用 *pap31* 基因以最大簡約法 (maximum parsimony method) 進行 bootstrap 1000 次親源樹狀圖分析結果。(bootstrap 值低於 70 % 則不顯示)



0.1

圖 16. 利用 *pap31* 基因以最大相似關係法 (maximum likelihood method) 進行親源樹狀圖分析。

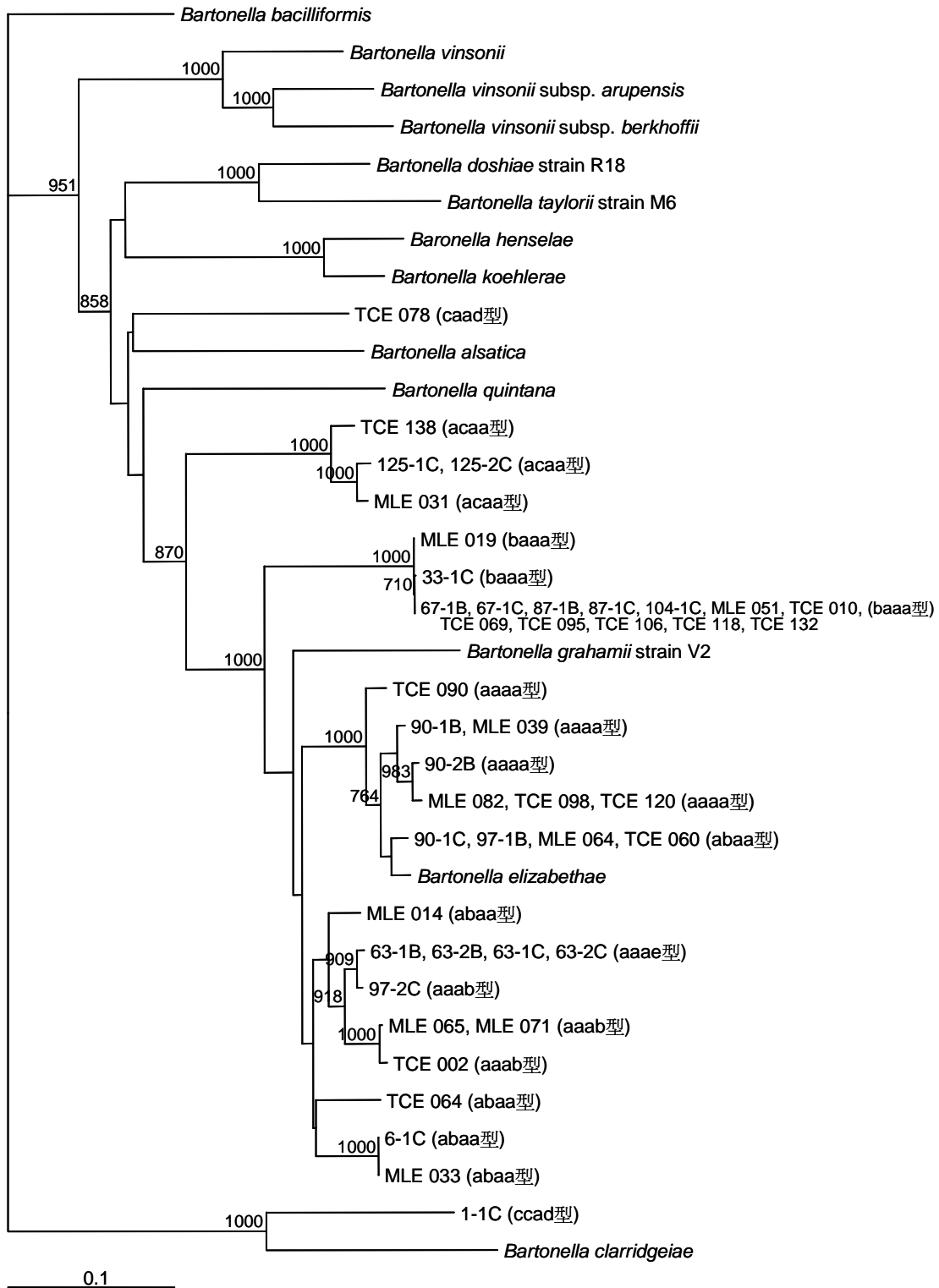


圖 17. 利用 16S-23S 基因以鄰近相互關係法 (neighbor-joining method) 進行 bootstrap 1000 次親源樹狀圖分析結果。(bootstrap 值低於 70 % 則不顯示)

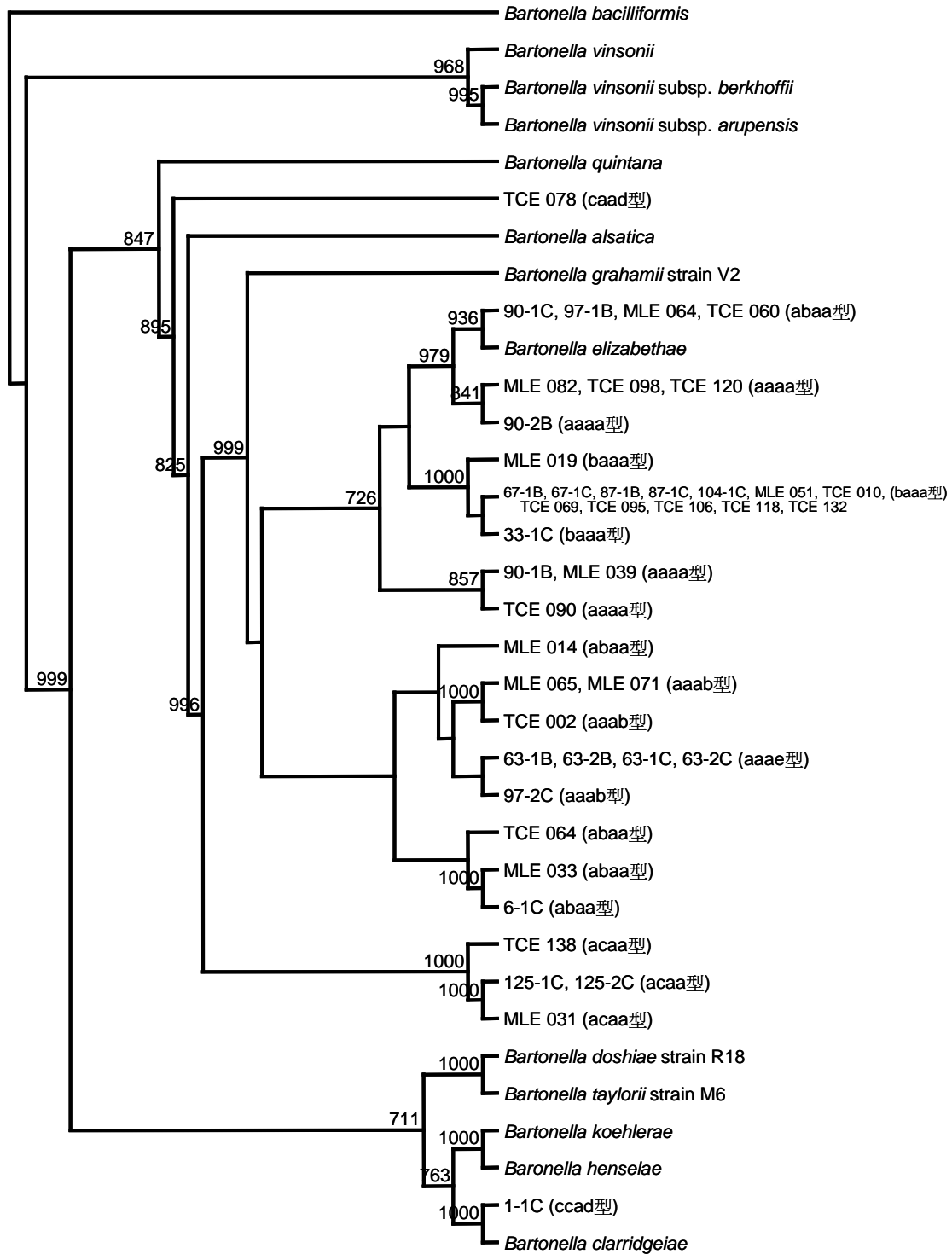


圖 18. 利用 16S-23S 基因以最大簡約法(maximum parsimony method)進行 bootstrap 1000 次親源樹狀圖分析結果。(bootstrap 值低於 70 %則不顯示)

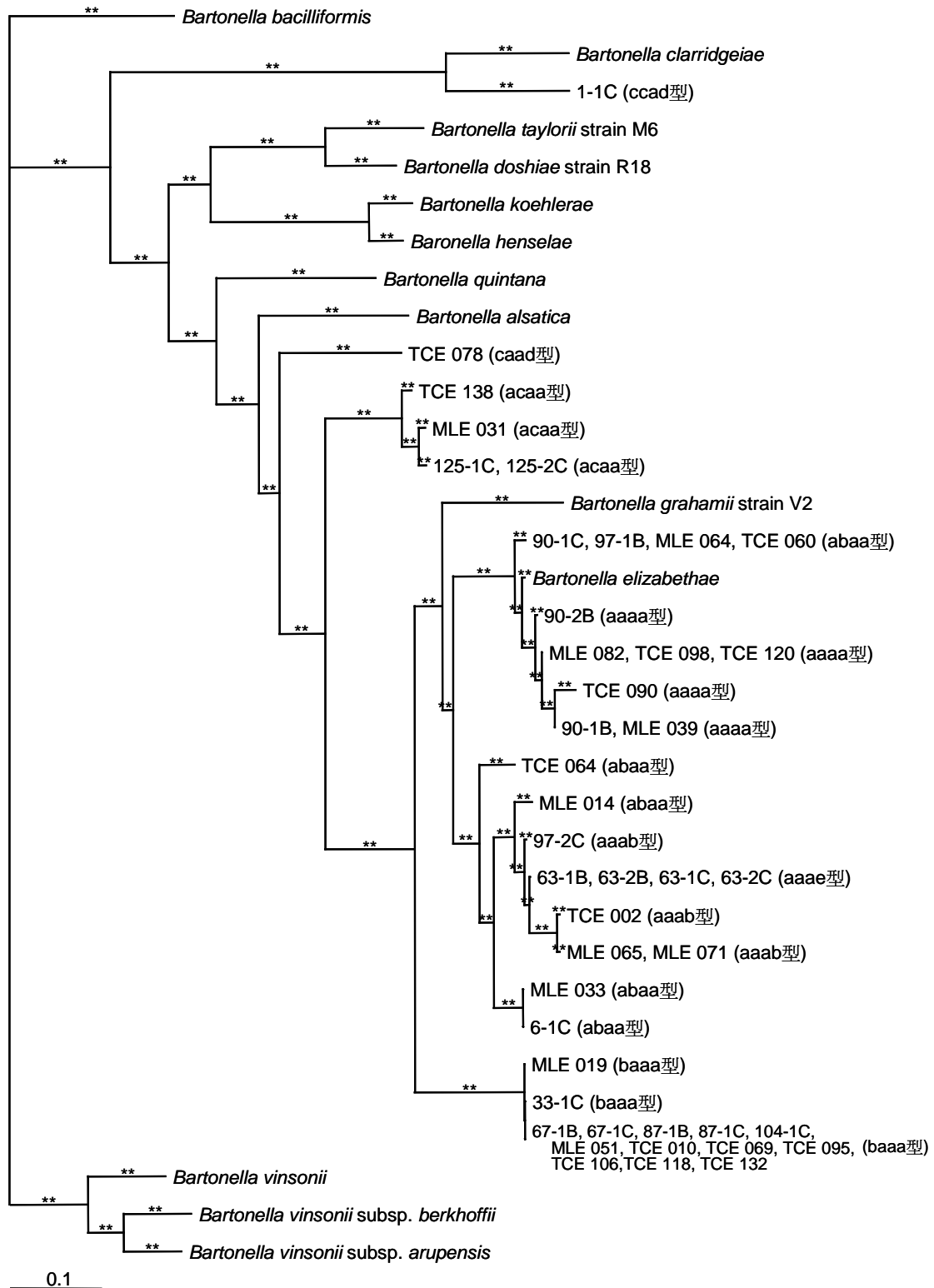


圖 19. 利用 16S-23S 基因以最大相似關係法 (maximum likelihood method) 進行親源樹狀圖分析。