

計畫編號：DOH95-DC-2022

行政院衛生署疾病管制局九十五年度自行研究計畫

游離恙蟲的採集與恙蟲病立克次體基因資料庫的建立

成 果 報 告

執行機構：疾病管制局研究檢驗中心

研究主持人：王錫杰、舒佩芸

研究人員：陳俊憲

執行期間：95年1月1日至95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*

中文摘要

恙蟲病是經由帶有恙蟲病立克次體的未食幼蟎叮咬所引起，過往台灣地區許多恙蟲病病媒之調查是以捕捉老鼠採集老鼠身上恙蟎為主，此方法雖易於進行，且從恙蟎體內亦可檢測到恙蟲病立克次體，但究竟此病原體是來自恙蟎親代或藉由叮咬感染老鼠而獲得則無法區分，因此捕鼠法對於確定病媒種類並不適合，必須檢測地表游離的未食恙蟎，始能分辨病媒。本研究今年度於花蓮縣、金門縣及台東縣蘭嶼鄉進行游離恙蟲採集，使用墊木板法、黑布法(Suzuki method)及收集地表枯枝落葉及土壤以 Tullgren 漏斗採集恙蟎(Direct method)，發現採集地表枯枝落葉及土壤能收集的恙蟲較黑布法多，但與墊木板法相較這三種方法互有優缺點，可依不同孳生地使用。目前研究恙蟲病立克次體，分離病原體已成趨勢，除可對此病原體進行各項特性分析如抗原性、毒力、基因親緣關係等，更可加入例行之恙蟲病 IFA 檢驗，成為恙蟲病血清學診斷之工具。今年度於花蓮縣捕鼠採集恙蟲分離培養恙蟲病立克次體，發現恙蟲感染恙蟲病立克次體之比率為 73%，且發現 6 株恙蟲病立克次體菌株，其中以序列近似 TW45R 及 TW73R 數量最多。另於金門縣及台東縣蘭嶼鄉捕鼠採集恙蟲分離培養恙蟲病立克次體，發現恙蟲感染恙蟲病立克次體之比率分別為 50% 及 96%，且分別發

現 3 株恙蟲病立克次體菌株，其中以序列近似 Karp 及序列近似 TW261 數量最多。在檢測恙蟲病之同時檢測斑點熱立克次體，發現花蓮縣、金門縣及台東縣蘭嶼鄉恙蟲感染斑點熱立克次體之比率分別為 65%、12.5% 及 46%，且發現 3 株斑點熱立克次體菌株，其中以 OmpB 近似 *Rickettsia australis* 及 CS 近似 TwKM02 分布最廣，於三個地區皆可發現。花蓮縣、金門縣、台東縣蘭嶼鄉鼠類血清恙蟲病立克次體、斑點熱立克次體及地方性斑疹傷寒立克次體抗體陽性率分別為 *Oriental tsutsugamushi* 86.6%、*R. rickettsii* 88.2%、*R. conorii* 77.2% 及 *R. typhi* 3.15%，顯示鼠類曾感染恙蟲病及斑點熱之情形嚴重。

關鍵詞：游離恙蟎、恙蟲病、恙蟲病立克次體、斑點熱、聚合酶連鎖反應

Abstract

Tsutsugamushi disease is transmitted by unengorged larvae of trombiculid mite, which carrying the pathogen *Oreintia tsutsugamushi*. In the past, trombiculid mites survey have mainly been done by rodent trapping. Although this method was easily preformed and can detect *O. tsutsugamushi* from mites. However we cannot make sure whether the pathogen was from mite or rodent. Therefore rodent trapping is not suitable to confirm vector species. We need to detect unengorged larvae of trombiculid mites on the ground. In this year, we collected free-living trombiculid mites with bakelite plates, Suzuki method and Direct method in Hualien County, Kinmen County and Lanyu Island. More trombiculid mites have been collected by Direct method than Suzuki method, but comparing with bakelite plates these three methods had merit and drawback, we should use them depending on breeding site of trombiculid mites. To study *O. tsutsugamushi*, rickettsial isolation was very popular. It not only can analyze characters of *O. tsutsugamushi* such as antigenicity, virulence and genetic phylogeny, but also increase the accuracy of indirect immunoassay. We collected trombiculid mites from rodents in Hualien County and isolated *Rickettsia* with cell culture. The infection rate of *O. tsutsugamushi* in trombiculid mites was 73%. Six strains of *O. tsutsugamushi* were found, and the most abundant strain was sequence like TW45R and TW73R. The infection rates of *O. tsutsugamushi* in trombiculid mites, which collected in Kinmen County and Lanyu Island, were 50% and 96% respectively. Three strains of *O. tsutsugamushi* were found, and the most abundant strains were sequence like

Karp and like TW201 in Kinmen County and Lanyu Island respectively. In the same time, we detected *Rickettsia* of Spotted fever, and found the infection rates of *Rickettsia* of Spotted fever in trombiculid mites in Hualien County, Kinmen County and Lanyu Island were 65%, 12.5% and 46% respectively. Three strains of Spotted fever *Rickettsia* were found, and the most abundant strain was sequence OmpB like *Rickettsia australis* and CS like TwKM02. Detecting seropositive rate of rodents in three areas showed *O. tsutsugamushi*, *R. rickettsii*, *R. conorii* and *R. typhi* were 86.6%, 88.2%, 77.2% and 3.15% respectively.

Keywords: unengorged larvae of trombiculid mites, tsutsugamushi disease, *Oreintia tsutsugamushi*, Spotted fever, PCR

目 錄

	頁次
中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
目錄.....	v
圖次.....	vi
表次.....	vii
壹、前言.....	1
貳、材料與方法.....	7
一、採集地點.....	7
二、採集方法.....	7
三、恙蟎鑑定方法.....	8
四、恙蟲體內立克次體分離培養及檢測.....	9
五、恙蟲病立克次體特性分析.....	18
六、鼠類血清立克次體抗體檢測.....	21
參、結果.....	22
一、5月花蓮縣野外採集.....	22
二、6月金門縣野外採集.....	23
三、9月台東縣野外採集.....	25
四、11月花蓮縣野外採集.....	27
五、鼠類血清立克次體抗體檢測.....	27
肆、討論.....	29
伍、結論與建議.....	36
陸、參考文獻.....	38
柒、圖.....	45
捌、表.....	51

圖 次

	頁次
圖一、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅恙蟲病立克次體 56kDa 蛋白質 variable domain 1 之 PCR 產物.....	45
圖二、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅恙蟲病立克次體 56kDa 蛋白質 variable domain 1 之 PCR 產物.....	45
圖三、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅恙蟲病立克次體 56kDa 蛋白質 variable domain 1 之 PCR 產物.....	46
圖四、恙蟲體內恙蟲病立克次體經 L929 細胞培養後 IFA 檢測結果.....	46
圖五、恙蟲體內立克次體經 L929 細胞培養後進行 Gimenez stain 結果.....	47
圖六、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅斑點熱立克次體 OmpB gene 之 PCR 產物.....	47
圖七、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅斑點熱立克次體 OmpB gene 之 PCR 產物.....	48
圖八、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅斑點熱立克次體 OmpB gene 之 PCR 產物.....	48
圖九、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅斑點熱立克次體 CS gene 之 PCR 產物.....	49
圖十、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅斑點熱立克次體 CS gene 之 PCR 產物.....	49
圖十一、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅斑點熱立克次體 CS gene 之 PCR 產物.....	50

表 次

	頁次
表一、95 年 5 月花蓮縣捕鼠及恙蟲採集結果.....	51
表二、95 年 5 月花蓮縣恙蟎恙蟲病及斑點熱立克次體培養及 PCR 檢 測結果.....	52
表三、95 年 6 月金門縣恙蟎恙蟲病及斑點熱立克次體培養及 PCR 檢 測結果.....	57
表四、95 年 6 月金門游離恙蟲調查結果.....	60
表五、95 年 9 月台東縣恙蟎恙蟲病及斑點熱立克次體培養及 PCR 檢 測結果.....	61
表六、95 年 9 月蘭嶼游離恙蟲調查結果.....	68
表七、花蓮縣、金門縣、蘭嶼鄉鼠類血清 IFA 檢測結果.....	69

壹、前言

恙蟎的生活史雖分為七個時期：卵(egg)、次卵(deutovum)、幼蟲(larva)、前若蟎(protonymph)、次若蟎(deutonymph)、三若蟎(tritonymph)及成蟲(adult)，但只有幼蟲階段行寄生生活，其餘皆在土壤表面行自由生活，以土中之小形節肢動物之幼蟲及卵為食。恙蟎體型微小採集不易，惟利用恙蟎幼蟲寄生的特性，捕捉野鼠檢查恙蟎可間接獲得恙蟎密度資料，故為最常使用評估恙蟎密度的方法。老鼠身上恙蟎寄生的情形將恙蟎密度分為帶蟎率(被寄生鼠數/全部捕獲鼠數)及恙蟎指數(寄生恙蟎總數/全部捕獲鼠數)，帶蟎率代表恙蟎在採樣地區分佈的均勻性，恙蟎指數則代表恙蟎數量的多寡。不同宿主的帶蟎率及恙蟎指數亦表示某種恙蟎對宿主的選擇性(黎等，1997)。台灣地區許多恙蟎的調查研究即使用捕鼠法，如在澎湖曾進行的一系列調查，包括恙蟎種類、密度及孳生地 (Cooper *et al.*, 1964; Lien *et al.*, 1967)，鼠形動物及恙蟎帶原情形 (Cooper *et al.*, 1964; Olson *et al.*, 1978)，恙蟎密度與病例發生之關係 (Olson *et al.*, 1982)，恙蟎密度與平均溫度及平均降雨量的關係 (Dirk Van Peenen *et al.*, 1976) 等均使用捕鼠法調查恙蟎。除此之外，Gale *et al.* (1974) 及 Lien *et al.* (1974) 分別於花蓮豐濱及台東蘭嶼以捕鼠法進行恙蟎採集；1985 年前台灣省傳染病研究所在台東、宜蘭、花蓮、高雄、台南、雲林、嘉義、彰化、台中及南投等 10 縣 36 鄉鎮以捕鼠

法進行野鼠恙蟲病調查 (王, 1988); 1986 年至 1987 年在花蓮縣壽豐鄉進行恙蟎季節消長調查 (林, 1999)。Hasegawa *et al.* (1990) 在台北、台東、阿里山、高雄、屏東及澎湖進行恙蟲病病媒調查。王等 (2004) 於金門進行恙蟎的調查與病原體檢測。以上有關恙蟎的調查報告均以捕鼠法採集為主, 依國外學者報告, 恙蟎幼蟲恙蟲病立克次體的感染情形早先亦由採自野鼠身上之恙蟎測定 (Tamiya, 1962; Asanuma, 1983), 但漸漸許多學者質疑這些幼蟲可能自然攜帶恙蟲病立克次體或經由取食立克次體血症之野生齧齒動物而感染 (Traub *et al.*, 1975; Walker *et al.*, 1975; Takahashi *et al.*, 1994), 因為未食幼蟲是目前所知唯一能傳播疾病給齧齒動物及人的時期, 未食幼蟲所攜帶的恙蟲病立克次體被認為源自感染的雌蟎經卵傳播所產下的卵 (Urakami *et al.*, 1994; Takahashi and Tanaka, 1995; Kollars *et al.*, 2000; Frances *et al.*, 2001), 故進行病媒判定應由未食幼蟲檢測進行 (Misumi *et al.*, 2002)。

對於游離的恙蟎可用動物誘捕法、土壤漂浮法或墊木板法 (bakelite plate) 採集恙蟎 (黎等, 1997), 於澎湖的恙蟲調查亦曾使用動物誘捕法及墊木板法 (Cooper *et al.*, 1964; Lien *et al.*, 1967)。Tullgren 漏斗法及黑布法 (Suzuki method) 為 Suzuki 等所開發 (Suzuki, 1973; Suzuki and Tabaru, 1987), 本研究期望探討此二方法及墊木板法是否更易於防疫人員進行恙蟎密度評

估，成為恙蟲病監測及防治成果之指標。

引起恙蟲病之病原體--恙蟲病立克次體 (*Orientia tsutsugamushi*) 原命名為 *Rickettsia tsutsugamushi*，但因其 (1) 細胞壁的形態與化學結構；(2) 種專一性蛋白質；(3) 抗生素的敏感性；(4) 16S rRNA 基因序列等皆與 *Rickettsia* 屬不同而另成立一新屬 *Orientia* (Tamura *et al.*, 1995)。其為一種絕對細胞內寄生之微生物，在細胞內行二分裂法生殖。個體大小約 0.3×1.0-1.2 μm，其基本的形態類似於革藍氏陰性菌 (Gram-negative bacteria)，56 kDa 蛋白質為細胞壁最主要蛋白質，並呈現型別專一抗原 (Type specific antigen, TSA) 之特性 (Ohashi *et al.*, 1988)。早期恙蟲病立克次體的分類是採用補體結合試驗 (Cross-complement fixation, CF)，首先確定分離自新幾內亞的 Karp 型，緬甸的 Gilliam 型及日本的 Kato 型為不同抗原血清型的原型株，並以此為恙蟲病立克次體分類鑑定的國際標準株。1963 年 Bozeman and Elisberg 引進間接免疫螢光法 (Indirect immunofluorescence assay, IFA) 於檢測恙蟲病患血清後，即陸續發現在許多分離株中除三個標準型外，還存在混合型或其他抗原型。Elisberg *et al.* (1978) 報告用幾個高效價免疫血清對分離株進行交叉免疫螢光反應，發現泰國五個分離株 (TA₆₇₈、TA₆₈₆、TA₇₁₆、TA₇₆₃ 和 TH₁₈₁₇) 抗原性不同于原型株，其後在日本又從病人分離出 Shimokoshi、Kawasaki、Kuroki、Irie 和 Hirano 型，這些立克次體菌株均是

經由環磷酰胺 (cyclophosphamide) 處理過的小鼠分離出，有些菌株已被證實對小鼠呈低致病性 (Yamamoto *et al.*, 1986)。

應用單株抗體對恙蟲病立克次體抗原性變異的研究有長足的進展，許多學者製備多種單株抗體，包括株 (strain) 或型 (type) 特異性及群 (group) 特異性。幾乎所有株特異性的單株抗體都針對位於立克次體表面的 56 kDa 蛋白質，這些單株抗體對新分離株可做清楚區分，因沒有分離株可與多種單株抗體交互作用，因此可以解決間接免疫螢光法因各型間有部分交互作用，判定上易於混淆的問題。在韓國經由鼠單株及多株抗體，證實由病人分離出一株新的恙蟲病立克次體 Boryong 型 (Chang *et al.*, 1990; Chang and Kang, 1991)。中國大陸目前發現除 Gilliam、Karp、Kato 3 個基本血清型外，亦在江蘇發現 Kawasaki 型 (郭等，1995)，湖南發現 TA763 型 (俞及陳，1998)。而在台灣澎湖由病人、老鼠及恙蟎所分離 49 株恙蟲病立克次體菌株中發現對 Karp、TA₆₈₆、TA₇₁₆、TA₇₆₃ 及 TH₁₈₁₇ 型具抗原性 (Shirai *et al.*, 1982)。1995 年陳等自恙蟲病患者分離 33 株恙蟲病立克次體菌株，以間接免疫螢光法測定，發現台東、金門為 Gilliam、Karp 型，馬祖為 Gilliam 型，除此之外尚發現多株為 Gilliam、Karp 及 Kato 多重抗原性。

恙蟲病立克次體的抗原型別取決於其菌體外圍之型別專一性抗原 (TSA) 56 kDa 蛋白質，1990 至 1993 年編碼 Gilliam、Karp、Kato、Shimokoshi、

Kawasaki、Kuroki 和 Boryong 等七型之 56 kDa 型別專一性抗原核苷酸及胺基酸序列首先被定出 (Ohashi *et al.*, 1990; Stover *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1993)，由已知 TSA 序列之比對發現有 70 到 90% 相似度，同時有四個變異區 (variable domain) (Ohashi *et al.*, 1992)。根據這些變異區序列，運用聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 及雙階聚合酶連鎖反應 (two-step polymerase chain reaction 或 Nested-PCR) 配合限制酶切割法 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 進行恙蟲病的診斷及恙蟲病立克次體的分型 (Furuya *et al.*, 1991, 1993; Murai *et al.*, 1992; Kawamori *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1994)。由於 PCR 的敏感性，已可由單個恙蟎體內檢測到立克次體 (郭等，1996；嚴等，1996)。Ohashi *et al.* (1996) 由單株抗體及 PCR-RFLP 的檢測發現分離自日本 40 株恙蟲病立克次體，在同一血清型中，尚可分出許多亞型 (subtype)。近年來基因定序技術蓬勃發展，使各新分離株 56 kDa 蛋白質之完整序列更易取得，且目前菌株分離的工作已成為亞洲各國研究者常規的工作 (Frances *et al.*, 1999; Urakami *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2002; Misumi *et al.*, 2002; 彭等，2001；王等，2002)，同時藉由亞洲地區越來越多新的恙蟲病立克次體菌株被發現 (Ohashi *et al.*, 1996; Enatsu *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2001; Qiang *et al.*, 2003; Tay *et al.*, 2005)，對於這些新的菌株的親緣關係，以及對人體的抗體表現及致病力，都將會有更進一步瞭解。國內目前由花蓮慈濟醫院病毒及立克次體合約實

驗室自恙蟲病病人分離出幾株恙蟲病立克次體，可望納入本局病原體基因資料庫，惟在恙蟎分離恙蟲病立克次體部份，應積極進行，除與病人之分離株比對外，更可探討恙蟲病血清學檢驗的敏感性，同時做為防疫之基本參考資料。

貳、材料與方法

一、採集地點

恙蟎之採集以恙蟲病高流行區為採集地點，第一年進行金門縣、花蓮縣及台東縣；第二年進行台東縣、澎湖縣及連江縣。每一縣春夏及秋冬各採集一次，以便採集不同季節偏好性之恙蟎。

二、採集方法：以下列 4 種方法採集恙蟎，並收集採集時間採集地點之中央氣象局氣象資料。

1. 黑布法(Suzuki method): 以 50×50 公分黑色絨布，置於採樣點地表鋪平，用手輕壓絨布使其接觸地表植物、落葉或土壤，然後用手指抓住絨布角落輕輕水平拖行，翻面再進行一次。將黑布置於塑膠袋，內置一些新鮮樹葉以保持濕度，帶回實驗室以 Tullgren funnel 烘烤收集游離恙蟎。
2. 墊木板法：工作人員手持 5 片 15×15 cm 墊木板 (bakelite plates)，每隔 1 min 於草地適當地點放置 1 片墊木板，當第 5 片墊木板放置後 1 min，拾起第 1 片墊木板於 1 min 內檢查正反面，若有任何移動的小蟲，均以沾水毛筆挑起置入無菌水之檢體瓶中，再檢查第二片，如此反復於每個地點至少檢查 100-300 片墊木板，將採獲小蟲以顯微鏡鑑別出恙蟎。
3. Tullgren 漏斗法(Direct method): 在老鼠洞穴或老鼠行走通道上取約 2 公

升(20 公分長×20 公分寬×5 公分深)土壤置於塑膠袋，帶回實驗室以 Tullgren funnel 烘烤收集游離恙蟎。

4. 捕鼠法：在選定地點佈鼠籠 40 個，以地瓜為誘餌，下午置放隔日早上收籠。捕獲老鼠後，依體型大小以 0.1~0.3 ml Zoletil 50 進行腹腔注射迷昏，再將有恙蟎寄生之外耳殼及其他部位如生殖器附近、胸部、後腿之皮膚剪下置於直徑 3.7 cm，高 5.8 cm 有蓋塑膠瓶中，內鋪 1 cm 石膏碳粉 (熟石膏粉：活性碳粉=9：1) 保持濕度，靜置 1 天讓恙蟎脫離鼠體。鼠體外其他外寄生節肢動物如跳蚤、蝨子、蟎類以毛刷刷下置於 70% 酒精中，蜱類則置於石膏碳粉瓶中。

所有游離恙蟎或自鼠體脫離之恙蟎及蜱類均移入置於 4°C 冰箱，準備進行鑑定及恙蟲體內立克次體分離檢測。

三、恙蟎鑑定方法

將部份恙蟎浸泡於 70% 酒精殺死，再置於去離子水 3~4 次，每次 30 min。再將恙蟎以 Hoyer's 封片液 (含有 50 ml 去離子水，30 g 阿拉伯膠 (Gum Arabic, Sigma)，200 g 含水氯醛 (Chloral hydrate, Merck)，20 ml 甘油 (Glycerin, Merck) 蓋片。以 Olympus BX50 顯微鏡鏡檢。恙蟲之分類方法則參考 Nadchatram and Dohany (1974)、Vercammen-Grandjean and Langston (1976)、Wang and Yu (1992) 及黎等 (1997) 之報告。鑑定完成之標本以數位影像系統照

相存檔。

四、恙蟲體內立克次體分離培養及檢測

(一) L929 細胞繼代培養

1. 以 37°C 水浴 preheat MEM 培養液及 0.25% Trypsin-EDTA。MEM 培養液的組成爲(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%CO₂ 培養箱中培養一日以上。

(三) 恙蟲研磨液接種 shell vial

1. 挑恙蟲：以針尖將鼠耳及石膏碳粉瓶內之恙蟲挑入裝有 1cc

PBS(Phosphate Buffer Solution)之微量離心管中，100 隻為一個 pool，微量離心管應保持低溫，以免恙蟲活動。

2. 將微量離心管以 13,500 轉離心離下恙蟲，去除 PBS 後，加入數滴優碘溶液(10% Povidone Iodine)消毒恙蟲體表，輕搖微量離心管，使恙蟲與優碘能均勻接觸。

3. 加入約 1cc PBS 稀釋優碘，以 13,500 轉將恙蟲離心下來，吸取 PBS(注意不可將恙蟲吸起)，再加入 PBS 清洗，如是反覆數次，至洗過之 PBS 不帶顏色為止。

4. 每管加入 50~100 μ l 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。

5. 取前一日培養之 shell vial，每管加入 400 μ l 研磨液進行接種，以剩餘研磨液萃取 DNA 進行 PCR。

6. 將 shell vial 於 32°C，700xg 離心一小時，使立克次體進入 L929 細胞。

7. 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，如是清洗三次，最後加入 1cc MEM，旋緊瓶蓋防止污染，

置入 32°C 培養箱中進行培養。

(四) *Orientia tsutsugamushi* IFA test

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

IgG+A+M 血清 (FITC-goat anti-mouse IgG+A+M (H+L), Zymed

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

10. 重複 5~8 步驟，盡量在陰暗場所操作。

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

(五) 斑點熱立克次體 Gimenez stain

1. 接種後之 L929 細胞株，於 32°C 培養箱中進行培養 8 日後，即可進行 Gimenez stain。

2. 輕搖瓶身並略傾斜，以尖頭鑷取出玻片，細胞著生面朝上，置入甲醛中 10 分鐘進行固定。

3. 取出玻片，細胞著生面朝上置於濾紙或乾淨擦手紙上風乾。

4. 置入新鮮配置的 working solution (2 ml basic fuchsin stock solution+5ml buffer (NaH₂PO₄+Na₂HPO₄))兩分鐘，取出後以無菌水清洗。

5. 以尖頭鑷夾取玻片置入 malachite green 九秒，立刻取出以無菌水清洗。

6. 重複步驟 5。

7. 取出玻片，細胞著生面朝上置於濾紙或乾淨擦手紙上風乾。

8. 載玻片上滴少許甘油+PBS，細胞著生面朝下蓋在載玻片上，以亮視野顯微鏡檢視。

(六) 恙蟲病立克次體 nested-PCR 檢測

1. 將恙蟲或蜱之研磨液放入 1.5 ml 之 eppendorf tube，加入 200 μ l 的 Buffer AL，再加入 20 μ l proteinaseK，vortex 約 15 sec 後，置於 56 $^{\circ}$ C 10 分鐘。稍微離心後，將附著於管壁上的 sample 集中，加入 200 μ l 的酒精 (濃度 96-100%)。vortex 約 15 sec 後，稍微離心集中液體。
2. 將處理好的檢體個別置入 QIAamp spin coloum(in a 2 ml collection tube)，蓋上蓋子後以 8000 rpm 離心 1min，取下 QIAamp spin coloum，套入另一 collection tube 中，丟棄原 2 ml collection tube 及其中液體。
3. 小心打開蓋子，加入 500 μ l buffer AW1，蓋上蓋子後以 8000 rpm 離心 1min，取下 QIAamp spin coloum，套入另一 collection tube 中，丟棄原 2 ml collection tube 及其中液體。
4. 小心打開蓋子，加入 500 μ l buffer AW2，蓋上蓋子後以 14000 rpm 離心 3 min，取下 QIAamp spin coloum，套入一 1.5 ml eppendorf tube 中，丟棄原 2 ml collection tube 及其中液體。
5. 小心打開蓋子，加入 50 μ l H₂O，於 70 $^{\circ}$ C 中浸潤 5min，以 8000 rpm 離心 1min。此為 DNA 模板。

6. 游離恙蟎則以同一種恙蟎 10 隻一樣本(pool)，以去離子水脫去酒精後，置於 1.5 ml 微量離心管中，加入 0.1 ml SPG buffer (3.0 mM KH_2PO_4 (Merck)，7.2 mM K_2HPO_4 (Merck)，40 mM L-glutamic acid (Sigma)及 218 mM sucrose (Sigma)，pH 7.0)，以拋棄式研磨棒研磨。離心 11,600x g，5 min。再採沉積物懸浮於含有 0.1 mg proteinase K (Sigma)，0.5% Nonidet P-40 (Meck)，0.5% Tween 20 (Merck) 之 50 μl 10 mM Tris-HCl buffer (Merck)，pH 8.3 之萃取液中，於 56°C 下，隔夜處理，以去除蛋白質及酯質；然後於 95°C，處理 10 min，以此處理後之產物為 PCR 反應之模板。
7. 引子為選用 TSA gene 高保守區域，以增幅其間各血清型變異區。第一次 PCR 每一管 0.5 ml 微量離心管依序加入含有 35.5 μl 去離子水、5 μl 之 10X PCR buffer (50 mM KCl，0.1% Triton X-100 in 10 mM Tris-HCl，pH 9.0) (Promega)、2 μl 之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200 μM)、3 μl 之 25 mM MgCl_2 (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、1 μl 之 5 μM primer A：5'-AGAATCTGCTCGCTTGGATCCA-3' (Karp 株之 TSA 基因，約 144 bp~165 bp) (購自 Mission Biotech) 及 primer C：5'-ACCCTATAGTCAATACCAGCACAA-3' (Karp 株之 TSA 基因，約 552 bp~575 bp) (引子之終濃度為 100 nM)、3 μl 之 DNA 模板及 0.5 μl 酵素

Taq (Promega) (5 U/ μ l) (終濃度為 2.5 U) 等之 PCR 反應液。PCR 反應流程為：先於 94°C，預熱 3 min；再依序進行 94°C (45 s)/ 50°C (45 s)/ 72°C (45 s) 之循環，一共 40 循環；最後，於 72°C，7 min 中止反應。第二次 PCR 反應液中引子更改為 1 μ l 之 20 μ M primer a：

5'-GAGCAGAGATAGGTGTTATGTA-3' (Karp 株之 TSA 基因，約 260 bp~281 bp) 及 primer b：5'：TATTCATTATAGTAGGCTGA-3' (Karp 株之 TSA 基因，約 408 bp~427 bp) (引子終濃度為 400 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，更改為 94°C (45 s)/ 50°C (45 s)/ 72°C (45 s)，一共進行 25 循環；其餘相同。

8. 取 10 μ l 第二次 PCR 增幅的產物，於 3% NuSieve 及 1% agarose gel (BMA, USA) 之 1X TBE buffer (Sigma) 的膠片中進行電泳分析。將 agarose 取出，用溴化乙錠 (ethidium bromide, aMRESCO) 染色，以紫外光照射觀察並照相，並將其二次 PCR 增幅的產物進行 DNA 序列定序，以作不同型別區分。

(七) 斑點熱立克次體 nested-PCR 檢測

1. 偵測斑點熱立克次體的標的基因為 citrate synthase (*gltA*) 及 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)，引子為選用各標的基因 TSA gene 高保守區域。

2. 檢測 OmpB, PCR 反應每一管 0.5 ml 之微量離心管依序加入含有去離子水、5 μ l 之 10X PCR buffer (50 mM KCl, 0.1% Triton X-100 in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0) (Promega)、2 μ l 之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200 μ M)、3 μ l 之 25 mM MgCl₂ (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、6 μ l 之 3.3 μ M primer rompB OF, rompB OR (購自 Mission Biotech) (引子之終濃度為 400 nM)、5 μ l 之 DNA 模板及 0.5 μ l 酵素 Taq (Promega) (5 U/ μ l) (終濃度為 2.5 U) 等之 PCR 反應液, 最終體積為 50 μ l。第二次 PCR 將 primer 改為 3 μ l 之 3.3 μ M rompB SPG IF, rompB SPG/TG, rompB IF。
3. 檢測 citrate synthase (*gltA*), PCR 反應每一管 0.5 ml 之微量離心管依序加入含有去離子水、5 μ l 之 10X PCR buffer (50 mM KCl, 0.1% Triton X-100 in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0) (Promega)、2 μ l 之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200 μ M)、3 μ l 之 25 mM MgCl₂ (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、6 μ l 之 3.3 μ M primer RpCS.877p, RpCS.1258n (購自 Mission Biotech) (引子之終濃度為 400 nM)、5 μ l 之 DNA 模板及 0.5 μ l 酵素 Taq (Promega) (5 U/ μ l) (終濃度為 2.5 U) 等之 PCR 反應液, 最終體積為 50 μ l。第二次 PCR 將 primer 改為 3 μ l 之 3.3 μ M RpCS.896p, RpCS.1233n。

4. PCR 反應流程 OmpB 為：先於 95°C，預熱 5 min；再依序進行 95°C (15 s)/ 54°C (15 sec)/ 74°C (30 sec) 之循環，一共進行 35 循環；最後，於 74°C，3 min 中止反應。第二次 PCR 反應流程為：先於 95°C，預熱 5 min；再依序進行 95°C (15 s)/ 56°C (15 sec)/ 74°C (30 sec) 之循環，一共進行 35 循環；最後，於 74°C，3 min 中止反應。
5. PCR 反應流程 citrate synthase 為：先於 95°C，預熱 5 min；再依序進行 95°C (15 s)/ 54°C (15 sec)/ 74°C (30 sec) 之循環，一共進行 35 循環；最後，於 74°C，3 min 中止反應。第二次 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 sec)/ 74°C (30 sec) 之循環，一共進行 35 循環；最後，於 74°C，3 min 中止反應。
6. PCR 反應後取 10 µl 產物於 1.5% agarose gel (Promega) 之 1X TBE buffer (Sigma) 的膠片中進行電泳分析。將 agarose 取出，用溴化乙錠 (ethidium bromide, aMRESCO) 染色，以紫外光照射觀察並照相。將 PCR 增幅的產物進行 DNA 序列定序，再以 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 進行 DNA 序列之 BLAST 比對。

五、恙蟲病立克次體特性分析

1. 56kDa 蛋白質全長基因定序(參考 Qiang *et al.* (2003) 之方法並略加修改)

2. 將含立克次體之細胞懸浮液於-70°C及 37°C重複凍解三次，再於 4°C離心 200×g，5 分鐘以去除細胞碎片。
3. 上清液以 10,000 ×g 離心 5 分鐘，沉澱物(pellet) 加入 180 μl STE lysis buffer (0.5 M NaCl, 0.2M Tris-HCl, 0.01 M EDTA(2Na), pH 7.5, 1% SDS (Sodium N-lauroyl sarcosine))及 20 μl Proteinase K (QIAGEN) 以 Vortex 振盪，於 50°C下，處理 1 小時。
4. 再依照 QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) 所附的說明書之操作步驟萃取 DNA，其步驟如下：首先加入 200 μl Buffer AL，以 Vortex 振盪 15 sec 後，放入 70°C 乾浴處理 10 min。然後加入 200 μl 100% ethanol，以 Vortex 振盪 15 sec。將 QIAamp spin column 套入收集管 (2 ml 容量) 中，再將反應溶液加入 QIAamp spin column 中，於室溫下以 8000 rpm 離心 1 min。丟棄濾液及收集管。將先前之 QIAamp spin column 套入新的相同收集管中，加入 500 μl Buffer AW1 於 QIAamp spin column 中，於室溫下以 8000 rpm 離心 1 min，丟棄濾液及收集管。再套入新的收集管中，加入 500 μl Buffer AW2，於室溫下以 14,000 rpm 離心 3 min。將 QIAamp spin column 套入 1.5 ml 之微量離心管，加入 50 μl 之 70°C 去離子水於 QIAamp spin column 中，於 70°C 乾浴處理 5 min 後，以 8,000 rpm 離心 1 min，所獲得之產物即為 PCR 反應之 DNA 模板。

5. 56kDa 蛋白質全長基因約 1.8KB，分兩段進行 PCR 反應，第一段使用 Primer A, B，第二段使用 Primer C, D。增幅第一段每一管 0.5 ml 微量離心管依序加入含有 35.5 μ l 去離子水、5 μ l 之 10X PCR buffer (50 mM KCl, 0.1% Triton X-100 in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0) (Promega)、2 μ l 之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200 μ M)、3 μ l 之 25 mM $MgCl_2$ (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、1 μ l 之 1.25mM primer A(5'-TTTCGAACGTGTCTTTAAGC-3', Gilliam 株之 56kDa 基因, 約-266 bp~-285 bp) 及 primer B (5'-ACAGATGCAACTATTAGGCAA-3', Gilliam 株之 56kDa 基因, 約 847 bp~865 bp)(引子之終濃度為 200 μ M)、10 μ l 之 DNA 模板及 1 μ l 酵素 Taq (Promega) (5 U/ μ l) (終濃度為 2.5 U) 等之 PCR 反應液。PCR 反應流程為：先於 94 $^{\circ}$ C，預熱 2 min；再依序進行 94 $^{\circ}$ C (1 min)/ 55 $^{\circ}$ C (1.5 min)/ 72 $^{\circ}$ C (2 min) 之循環，一共進行 30 循環；最後，於 72 $^{\circ}$ C，7 min 中止反應。增幅第二段所使用反應條件與第一段相同，惟使用 primer C(5'-ATGCTAATAAACCTAGCGCT-3', Gilliam 株之 56kDa 基因, 約 731 bp~749 bp) 及 primer D(5'-CTAGAGTTATAGCGTACACCTGCA-3', Gilliam 株之 56kDa 基因, 約 1546 bp~1575 bp)，同時 anneal 時間縮短為 1 min。

6. 將兩段 PCR 產物定序，並以 Clustal W 軟體將全長序列排出。以 BioEdit 軟體 5.0.9 版將不同菌株序列排列，以 MEGA 軟體 2.1 版採用 Neighbor-joining、UPGMA 及 Maximum Parsimony 方法進行親緣關係分析。

六、鼠類血清立克次體抗體檢測

1. 以間接螢光免疫法(IFA)檢測恙蟲病(*Oriental tsutsugamushi*)、斑點熱(*R. rickettsii*, *R. conorii*)及地方性斑疹傷寒(*R. typhi*)抗體。
2. 將血清以磷酸鹽緩衝溶液(phosphate buffered saline, PBS)做 40 倍稀，加在固定有(1) *Oriental tsutsugamushi* (購自谷元生物科技公司)；(2)*R. typhi* 及 *R. rickettsii*(購自 Focus Technologies Inc., USA)；(3) *R. conorii* (購自 Focus Technologies Inc., USA)之去活性化抗原的螢光玻片上，置於潮濕水箱中於 37 作用 30 分鐘，以 PBS 洗掉多餘血清並浸泡 5 分鐘，蒸餾水沖洗、風乾、加標幟有螢光物質 FITC (fluorescein isothiocyanate)的山羊抗鼠 IgG+A+M 抗體(Zymed Laboratories Inc., USA)，置於潮濕水箱中於 37 作用 30 分鐘，以 PBS 浸洗風乾後，滴加 PBS:甘油=1:1 的緩衝溶液及蓋玻片後於螢光顯微鏡下以 400 倍觀察。

參、結果

一、 5月花蓮縣野外採集

5月15日至18日於花蓮縣壽豐鄉東華大學旁草地進行捕鼠，計捕獲鬼鼠7隻，小黃腹鼠6隻，另於吉安鄉建國路二段210號草地捕獲鬼鼠1隻，小黃腹鼠4隻。這18隻老鼠中有15隻有恙蟲寄生，合計採獲2531隻恙蟲。採集結果如表一。

經將恙蟲帶回實驗室，取相當數量為一池(pool)，研磨並接種入生長於shell vial之L929細胞，於32°C培養箱培養，經一段時間使用免疫螢光染色法(IFA)檢測是否培養出恙蟲病立克次體。部份恙蟲研磨液進行 *O. tsutsugamushi*(OT)及 Spotted fever nested-PCR(OmpB 及 CS)檢測，結果如表二。

全部26池中有19池為 *O. tsutsugamushi* nested-PCR 陽性，陽性率為73% (如圖一至三)，gene target 為56 kDa 蛋白質 variable domain 1 約126 bp 片段，陽性檢體經定序後以NCBI網站進行BLAST，表二中列出 gene bank 中最相似之 strain 及其相似度。花蓮恙蟲病立克次體菌株約可分為6株，其中數量最多為序列近似 TW45R 及 TW73R (6池)，其次為近似 Karp (4池)，序列近似 ISS-2 (3池)，序列近似 Hualien-6 等 3 strain (3池)，序列近似 TW461 等 5 strain (2池)及序列近似 LF-1 (1池)。此結果顯示有相當多存在於恙蟲之立克

次體為首次發現。

此 26 池檢體經 L929 細胞培養，有 10 池細胞生長情況不佳死亡或污染，剩餘檢體中有 8 池顯現 *O. tsutsugamushi* IFA 陽性(如圖四)，IFA 陽性檢體皆以 25T flask 擴大培養後冷凍保存。26 池檢體中部份檢體進行 Gimenez stain，以 1000 倍油鏡觀察，發現有疑似立克次體的顆粒(如圖五)。

Spotted fever nested-PCR 的 gene target 為 OmpB 及 Citrate synthase (CS)，26 池中分別有 17 池 OmpB 陽性(圖六至八)，17 池 CS 陽性(圖九至十一)，陽性率 65%。陽性檢體經定序後以 NCBI 網站進行 BLAST，同樣表中列出 gene bank 中最相似之 strain 及其相似度。結果以 OmpB 近似 *Rickettsia australis* 及 CS 近似 TwKM02 佔 9 池最多，其餘有近似 *R. rickettsii* 或 *R. conorii* 均需進一步確認。

5 月份花蓮採集期間適逢大雨，無法進行墊木板法及黑布法採集，取回 6 個土壤檢體經 Tullgren 漏斗烘烤僅在二處土壤分別獲得 1 及 5 隻恙蟲。

二、 6 月金門縣野外採集

6 月 19 日至 23 日於金門縣金城鎮泗湖、金寧鄉西山、金沙鎮英坑及金湖鎮小徑進行捕鼠，計捕獲小黃腹鼠 60 隻，錢鼠 4 隻，其中 59 隻小黃腹鼠有恙蟲寄生，僅一隻未發現。除恙蟲外另採獲粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*) 15 隻，選取其中 9 隻研磨進行 *O. tsutsugamushi* 及 Spotted fever nested-PCR

檢測，結果有 2 隻為 *O. tsutsugamush* 陽性，定序結果為近似 Karp，而 Spotted fever 則皆為陰性，研磨液接種入生長於 shell vial 之 L929 細胞，並未檢測出 *O. tsutsugamushi* IFA 陽性(如表三)。

老鼠身上恙蟲取約 100 隻為一池，研磨並接種入生長於 shell vial 之 L929 細胞，於 32°C 培養箱培養，經一段時間使用免疫螢光染色法(IFA)檢定是否培養出恙蟲病立克次體。部份恙蟲研磨液進行 *O. tsutsugamushi*(OT)及 Spotted fever nested-PCR(OmpB 及 CS)檢測，結果如表三。

全部 24 池中有 12 池為 *O. tsutsugamushi* nested-PCR 陽性,陽性率為 50%，陽性檢體經定序後以 NCBI 網站進行 BLAST，表三中列出 gene bank 中最相似之 strain 及其相似度。金門縣恙蟲病立克次體菌株約可分為 3 株，其中數量最多為序列近似 Karp (7 池)，其次為序列近似 TW201 等 4 strain (3 池)，序列近似 TW45R 及 TW73R (1 池)。

此 24 池檢體經 L929 細胞培養，有 6 池細胞生長情況不佳死亡或培養污染，剩餘檢體中有 4 池顯現 *O. tsutsugamushi* IFA 陽性，IFA 陽性檢體皆以 25T flask 擴大培養，再確認 *O. tsutsugamushi* IFA 陽性後冷凍保存。

Spotted fever nested-PCR 檢測，24 池中分別有 3 池為 OmpB 陽性，3 池為 CS 陽性，陽性率為 12.5%。陽性檢體經定序後以 NCBI 網站進行 BLAST，同樣表三中列出 gene bank 中最相似之 strain 及其相似度。結果

OmpB 近似 *Rickettsia australis* 及 CS 近似 TwKM02 佔 2 池，OmpB 近似 *Rickettsia felis* 及 CS 近似 TwKM03 佔 1 池。

在每一處老鼠捕獲地點，先以墊木板法檢測地表是否有游離恙蟲存在，選擇游離恙蟲較多的地點以黑布法採集，並採集一些地表枯枝落葉及土壤，黑布及土壤皆帶回實驗室經 Tullgren 漏斗烘烤，結果如表四。在大金門四鄉鎮共有 14 個游離恙蟲採集點，其中有 8 個點同時進行黑布法及落葉(土壤)採集，除金湖鎮小徑這個採集點外，皆顯示落葉(土壤)所採獲的恙蟲數較黑布法高，但黑布法在掃過金寧鄉西山一片茂密的草地之草頂，可採集到恙蟲，仍有其優點。

三、 9 月台東縣野外採集

9 月 4 日至 8 日於台東縣蘭嶼鄉紅頭村、野銀村、東清村、郎島村及椰油村進行捕鼠，計捕獲小黃腹鼠 48 隻，其中每隻老鼠皆有恙蟲寄生。除恙蟲外另採獲粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*) 18 隻，選取其中 4 隻研磨進行 *O. tsutsugamushi* 及 Spotted fever nested-PCR 檢測，結果有 1 隻為 *O. tsutsugamushi* 陽性，定序結果為近似 Karp，而 Spotted fever 則有 3 隻陽性，定序結果皆為 OmpB 近似 *Rickettsia conorii* 等 19 strain 及 CS 近似 *Rickettsia mongolotimona* 等 13 strain，研磨液接種入生長於 shell vial 之 L929 細胞，並未檢測出 *O. tsutsugamushi* IFA 陽性(如表五)。

老鼠身上恙蟲取約 100 隻為一池，研磨並接種入生長於 shell vial 之 L929 細胞，於 32°C 培養箱培養，經一段時間使用免疫螢光染色法(IFA)檢定是否培養出恙蟲病立克次體。部份恙蟲研磨液進行 *O. tsutsugamushi*(OT)及 Spotted fever nested-PCR(OmpB 及 CS)檢測，結果如表五。

全部 26 池中有 25 池為 *O. tsutsugamushi* nested-PCR 陽性，陽性率為 96%，陽性檢體經定序後以 NCBI 網站進行 BLAST，表五中列出 gene bank 中最相似之 strain 及其相似度。蘭嶼恙蟲病立克次體菌株約可分為 3 株，其中數量最多為序列近似 TW261 等 3 strain (7 池)，其次為序列近似 TW201 等 4 strain (4 池)，序列近似 Karp (1 池)，其餘尚需重新定序。

此 26 池檢體經 L929 細胞培養，有 4 池細胞生情況不佳死亡或培養污染，剩餘檢體中有 7 池顯現 *O. tsutsugamushi* IFA 陽性，IFA 陽性檢體皆以 25T flask 擴大培養後冷凍保存。

Spotted fever nested-PCR 檢測，26 池中分別有 12 池 OmpB 陽性，11 池 CS 陽性，陽性率為 46%。陽性檢體經定序後以 NCBI 網站進行 BLAST，同樣表五中列出 gene bank 中最相似之 strain 及其相似度。結果 OmpB 近似 *Rickettsia australis* 及 CS 近似 TwKM02 佔 9 池，OmpB 近似 *Rickettsia conorii* 等 19 strain 及 CS 近似 *Rickettsia mongolotimona* 等 13 strain 佔 3 池。

在每一處老鼠捕獲地點，先以墊木板法檢測地表是否有游離恙蟲存在，選

擇游離恙蟲較多的地點以黑布法採集，並採集一些地表枯枝落葉及土壤，黑布及土壤皆帶回實驗室經 Tullgren 漏斗烘烤，結果如表六。在蘭嶼鄉紅頭村、野銀村及朗島村共有 12 個游離恙蟲採集點，其中有 11 個點同時進行黑布法及落葉(土壤)採集，結果有 5 處落葉(土壤)所採獲的恙蟲數較黑布法高，3 處黑布法較高。

四、 11 月花蓮縣縣採集

11 月 6 日至 10 日於花蓮縣壽豐鄉東華大學旁草地及吉安鄉建國路二段 210 號及 42 號旁草地進行花蓮縣冬季捕鼠，計捕獲鬼鼠 20 隻，小黃腹鼠 12 隻，緬甸小鼠(*Rattus exulans*) 1 隻。這 20 隻老鼠中有 16 隻有恙蟲寄生，無恙蟲寄生之老鼠集中於東華大學前草地。目前已進行 20 池恙蟲檢體之 *O. tsutsugamushi* nested-PCR 檢測，結果有 15 池為 *O. tsutsugamush* 陽性。

五、 鼠類血清立克次體抗體檢測

檢測花蓮縣、金門縣與台東縣蘭嶼鄉鼠類曾感染立克次體疾病(恙蟲病、斑點熱及地方性斑疹傷寒)之情形，結果如表七。三個地區恙蟲病立克次體抗體陽性率皆在 80% 以上，平均值為 86.6%，以花蓮縣 94.4% 最高。以鼠種區分，小黃腹鼠及鬼鼠的抗體陽性率相同 88%，錢鼠較低 33%。斑點熱立克次體曾感染情形，三個地區 *R. conorii* 抗體陽性率皆在 70% 以上，平均值為 77.2%，以

花蓮縣與蘭嶼鄉相同為 83.3% 較高；*R. rickettsii* 抗體陽性率皆在 83% 以上，平均值為 88.2%，以金門縣 90.2% 最高。以鼠種區分，鬼鼠曾感染 *R. conorii* 及 *R. rickettsii* 的比率皆為 100%。地方性斑疹傷寒立克次體 *R. typhi* 的感染僅在金門縣的小黃腹鼠發現，平均抗體陽性率為 3.15%

由於高雄縣市登革熱疫情嚴峻，本計畫主持人及專任研究助理奉命於 10 月 15 日至 10 月 31 日及 11 月 25 日至 12 月 7 日支援登革熱防治工作 30 天(連續無假日)，以至計畫研究之進行有所影響。恙蟲鑑定及游離恙蝨恙蟲病立克次體檢測正進行中。

肆、討論

恙蟲病為台灣地區蟲媒傳染病中每年確定病例數僅次於登革熱之疾病，自 86 年起每年確定病例數約介於 240 至 370 例之間，去年(94 年)則已突破達到 462 例。這些確定病例數的增加，與近年來國民旅遊的風氣普遍，增加野外的曝露有關，同時衛教宣導增進醫師及一般民眾對恙蟲病的認知增加通報機會也有關係。但再查看確定病例數與通報病例數之比例，近十年來仍維持約 20%，顯示有 80% 通報恙蟲病的發熱疾病可能還不知病因，此顯示檢驗方法的改進或探索其他病原為我們應該努力的方向。

恙蟲病的檢驗以間接免疫螢光法(IFA)為主，其使用之立克次體國際標準株為 Gilliam、Karp、Kato，但除此三株外亞洲各國尚有許多地方株，如日本的 Shimokoshi、Kawasaki、Kuroki、Irie 和 Hirano，韓國的 Boryong，泰國的 TA₆₇₈、TA₆₈₆、TA₇₁₆、TA₇₆₃ 和 TH₁₈₁₇ 等，這些地方株基本上與國際標準株有抗原上的不同而造成抗體反應的不同，以傳統的 IFA 檢測可能有遺漏。前預防醫學研究所病毒組自恙蟲病患者分離出 71 株病原體，以 nested-PCR/RFLP 發現有 34 株類似 Kuroki 型，7 株類似 Karp 型及 2 株類似 Gilliam 型，另有 28 株皆與國際標準株不同，可能為本土變異株 (陳等，1999)。王等(2004)在金門縣地里恙蟎 95 池檢體中經 56kDa 蛋白質 variable domain 1 部份定序結果發現有 4 株與國際標準

株不同，顯示台灣地區確實有許多地方株存在。這些地方株需經由分離培養及特性分析，以做為將來檢驗上之工具。

由定序的初步結果來看，花蓮縣的恙蟲病立克次體菌株有 6 株，為序列近似 TW45R 及 TW73R(6 池)，其次為近似 Karp(4 池)，序列近似 ISS-2(3 池)，序列近似 Hualien-6 等 3 strain(3 池)，序列近似 TW461 等 5 strain(2 池) 及序列近似 LF-1(1 池)。金門縣及蘭嶼鄉各 3 株：金門為序列近似 Karp(7 池)，其次為序列近似 TW201 等 4 strain(3 池)，序列近似 TW45R 及 TW73R(1 池)；蘭嶼為序列近似 TW261 等 3 strain (7 池)，其次為序列近似 TW201 等 4 strain (4 池)，序列近似 Karp (1 池)。由上述結果顯示 Karp 為分布最廣之菌株，其次為 TW45R, TW73R 及 TW201。Qiang *et al.*, (2003) 在 1990 年蘭嶼的地里恙蟎分離出 Twyu81，溝鼠分離出 TW201、TW261 及 1999 年在金門的小黃腹鼠分離出 TW45R, TW73R，這些菌株在本研究中仍可發現。惟目前本研究的初步檢測為恙蟲病立克次體 56kDa 蛋白質 variable domain 1 部份序列，將來仍需要將 56kDa 蛋白質全長完整定序出，以做更詳細比較及與已知菌株做親緣關係之分析。

斑點熱(Spotted fever)是一種世界性散發的立克次體疾病，主要是經由蜱(tick)及蟎(mite)的媒介而使人得病。引起斑點熱的病原體種類繁多，例如發生在西半球如美國、加拿大及墨西哥等地，由 *R. 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，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、韓國及前蘇聯，由 *R. akari* 引起的立克次體膿皰(Rickettsial pox)及發生在日本，由 *R. japonica* 引起的日本紅斑熱(Japanese spotted fever)等(Lennette *et al.*, 1988; Marmion 1990; Takada *et al.*, 1994)。雖然台灣地區至目前為止尚未有斑點熱之本土病例報告，僅在今年5月有一自南非旅遊回來，感染 *Rickettsia africae* 之境外移入個案，但陳等(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%。筆者去年研究捕獲自 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%，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% (41/113) 及 30.1% (34/113)，而本研究中花蓮、金門、蘭嶼之野鼠 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 血清抗體陽性率更高達 88.2% 及 77.2%，顯示在台灣地區港口、都市及野地確實有某些立克次體存在於台灣地區鼠類中。

目前市售的斑點熱立克次體 IFA 抗原玻片僅有 *R. rickettsii* 及 *R.*

conorii，台灣地區鼠類可能存在 *R. rickettsii* 或 *R. conorii* 或其他立克次體菌株，其在鼠類產生之抗體可與 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 產生交互作用。依 Fang and Raoult (2003) 報告，11 株立克次體經由 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)。此報告顯示 *R. rickettsii* 抗原玻片較易與其他立克次體產生之抗體發生交互作用，由本研究發現鼠類血清抗體陽性率 *R. rickettsii* 皆高於 *R. conorii*，也證實此現象。

以 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*) 及 citrate synthase (*gltA*) 為檢測斑點熱立克次體的標的基因，使用 nested-PCR，結果發現恙蟲檢體在花蓮、金門及蘭嶼分別有 65%、12.5% 及 46% 陽性率。其中花蓮主要發現 1 株：*OmpB* 近似 *Rickettsia australis* 及 CS 近似 TwKM02 佔 9 池；金門發現 2 株：*OmpB* 近似 *Rickettsia australis* 及 CS 近似 TwKM02 佔 2 池，*OmpB* 近似 *Rickettsia felis* 及 CS 近似 TwKM03 佔 1 池；蘭嶼發現 2 株：*OmpB*

近似 *Rickettsia australis* 及 CS 近似 TwKM02 佔 9 池，OmpB 近似 *Rickettsia conorii* 等 19 strain 及 CS 近似 *Rickettsia mongolotimona* 等 13 strain 佔 3 池。由上述結果顯示共發現 3 株斑點熱立克次體菌株，其中 OmpB 近似 *Rickettsia australis* 及 CS 近似 TwKM02 這株分布最廣，於花蓮、金門及蘭嶼皆發現，其他二株分別分布於金門及蘭嶼。

全世界斑點熱立克次體菌株之菌株種類繁多，本研究所發現 3 株菌株是否為新菌株，依 Fournier *et al.*, (2003) 之建議尚需進行 16S rRNA(*rrs*)、Citrate Synthase (CS)、OmpA、OmpB 及 gene D 全長之序列分析比較方能確定。

本研究另發現有 29 池恙蟲檢體有重覆感染恙蟲病立克次體及斑點熱立克次體之現象，其中花蓮縣有 14 池(53.8%)，金門縣有 2 池(8.3%)，蘭嶼有 13 池(50%)。由於每池恙蟲約有 100 隻，因此可能為不同隻恙蟲感染不同立克次體，或同一隻恙蟲感染不同立克次體，這可透過單隻恙蟲的檢測釐清此一問題。檢測 13 隻蜱並未發現恙蟲病立克次體及斑點熱立克次體重覆感染之現象。

立克次體的分離培養可經由動物接種或細胞培養接種，動物接種較接近自然狀態且雜菌污染的問題較小，惟立克次體在病原微生物危害性分類中均屬於第三級危險群微生物 (Risk group3, RG3)，其必須在生物安全第三

等級 (P3) 的實驗室加上特殊防護衣才能進行微生物的操作 (Anonymous, 1993; Klietmann and Ruoff, 2001)。本局並無 P3 等級之動物實驗室，因此無法進行動物實驗，而細胞培養時由於恙蟲非常微小，使用約 100 恙蟲，雖以優碘溶液(10% Povidone Iodine)消毒恙蟲體表，但仍無法排除恙蟲體內雜菌可能污染細胞培養之情形，此問題尚待解決。

在培養細胞立克次體的檢測方面，恙蟲病立克次體有市售之單株抗體可經由 IFA 檢測，而斑點熱立克次體並無市售之抗體，雖可經由 Gimenez stain，結果也可在細胞周圍發現疑為立克次體之顆粒(圖五)，但由於其不具專一性，無法分辨那一種立克次體。此問題可使用確認含斑點熱立克次體抗體之老鼠血清嘗試解決。

恙蟲在自然界的分布是點狀分布，同時與老鼠的活動有關，通常在老鼠洞穴或行經路線採獲游離恙蟲的機會較高。本研究選擇在每一處老鼠捕獲地點，先以墊木板法檢測地表是否有游離恙蟲存在，選擇游離恙蟲較多的地點以黑布法採集，並採集一些地表枯枝落葉及土壤，黑布及落葉(土壤)皆帶回實驗室經 Tullgren 漏斗烘烤收集恙蟲。初步結果顯示採集地表枯枝落葉及土壤能收集的恙蟲較黑布法多，表示該地點恙蟲多存在地表，不易為黑布所採集。但黑布法可在大片草地做草頂之採集，另同一地表若有大量恙蟲，墊木板法由於可反覆使用，可採到較多恙蟲。因此這三種方法可

依不同孳生地使用。

伍、結論與建議

1. 花蓮縣恙蟲感染恙蟲病立克次體之比率為 73%，發現恙蟲病立克次體菌株約可分為 6 株，其中數量最多為序列近似 TW45R 及 TW73R(6 池)，其次為近似 Karp(4 池)，序列近似 ISS-2(3 池)，序列近似 Hualien-6 等 3 strain(3 池)，序列近似 TW461 等 5 strain(2 池)及序列近似 LF-1(1 池)。吉安鄉建國路二段 210 號草地發現帶有恙蟲病立克次體之恙蟎，且靠近民宅，應提醒民眾小心防範。
2. 金門縣恙蟲感染恙蟲病立克次體之比率為 50%，恙蟲病立克次體菌株約可分為 3 株，其中數量最多為序列近似 Karp(7 池)，其次為序列近似 TW201 等 4 strain(3 池)，序列近似 TW45R 及 TW73R(1 池)。
3. 台東縣蘭嶼鄉恙蟲感染恙蟲病立克次體之比率為 96%，恙蟲病立克次體菌株約可分為 3 株，其中數量最多為序列近似 TW261 等 3 strain (7 池)，其次為序列近似 TW201 等 4 strain (4 池)，序列近似 Karp (1 池)。紅頭村青青草原恙蟲數量多且感染情形嚴重，應提醒民眾及遊客注意。
4. Karp 為分布最廣之菌株，其次為 TW45R,TW73R 及 TW201。
5. 花蓮縣恙蟲感染斑點熱立克次體之比率為 65%，主要發現 1 株菌株：OmpB 近似 *Rickettsia australis* 及 CS 近似 TwKM02 佔 9 池。

6. 金門縣恙蟲感染斑點熱立克次體之比率為 12.5%，發現 2 株菌株：
OmpB 近似 *Rickettsia australis* 及 CS 近似 TwKM02 佔 2 池，OmpB 近似 *Rickettsia felis* 及 CS 近似 TwKM03 佔 1 池。
7. 台東縣蘭嶼鄉恙蟲感染斑點熱立克次體之比率 46%，發現 2 株菌株：
OmpB 近似 *Rickettsia australis* 及 CS 近似 TwKM02 佔 9 池，OmpB 近似 *Rickettsia conorii* 等 19 strain 及 CS 近似 *Rickettsia mongolotimona* 等 13 strain 佔 3 池。
8. OmpB 近似 *Rickettsia australis* 及 CS 近似 TwKM02 為分布最廣的斑點熱菌株，於花蓮、金門及蘭嶼皆發現。
9. 花蓮縣、金門縣、蘭嶼鄉三個地區鼠類恙蟲病立克次體抗體陽性率皆在 80% 以上，平均值為 86.6%，以花蓮縣 94.4% 最高。斑點熱立克次體曾感染情形，三個地區 *R. conorii* 抗體陽性率皆在 70% 以上，平均值為 77.2%，以花蓮縣與蘭嶼鄉相同為 83.3% 較高；*R. rickettsii* 抗體陽性率皆在 83% 以上，平均值為 88.2%，以金門縣 90.2% 最高；地方性斑疹傷寒立克次體 *R. typhi* 的感染僅在金門縣的小黃腹鼠發現，平均抗體陽性率為 3.15%。
10. 游離恙蟲採集，採集地表枯枝落葉及土壤能收集的恙蟲較黑布法多，但與墊木板法相較這三種方法互有優缺點，可依不同孳生地使用。

陸、參考文獻

- 王珊珊、詹道成、彭桂福、潘華、黃佳亮、曾年華、王志斌。2002。西沙群島恙蟎所攜恙蟲病東方體的序列分析。中國人獸共患病雜誌 18：66-68。
- 王愷。1988。從台灣地區的恙蟲病談起。台灣醫界 31：79-85。
- 王錫杰，鍾兆麟，林鼎翔，王重雄，吳文哲 (2004) 金門縣鼠類恙蟲病病媒與病原體調查研究。台灣昆蟲 24(4)：257-272。
- 林鼎翔。1999。台灣地區恙蟲病病媒之生態與分布。第二屆蝨蟎學研討會專刊 中華昆蟲特刊 12: 171-178。
- 俞樹榮、陳香蕊。1998。立克次體與立克次體病。軍事醫學科學出版社，北京。201 頁。
- 郭恆彬、吳光華、唐家琪、李先富、于明明、張 云、潘秀珍、李越希。1995。應用 NPCR 發現我國 Kawasaki 型恙蟲病立克次體。中國人獸共患病雜誌 11：22-24。
- 郭恆彬、吳光華、潘秀珍、李先富、唐家琪、張 云、李越希。1996。用 PCR 檢測現場單個小盾織恙蟎體內恙蟲病立克次體的研究。中國人獸共患病雜誌 12：10-11。

陳慧玲、謝國珍、陳豪勇、洪其璧。1995。由病人血液中分離台灣地區

Rickettsia tsutsugamushi 之探討。台灣醫誌 94：S112-S119。

陳慧玲、邱淑君、陳豪勇、王躬仁。1999。利用限制酶切割片段圖法分析

台灣地區的恙蟲病立克次菌。微免與感染雜誌 32：68-72。

彭桂福、王珊珊、黃佳亮、姜普林、曾年華、陳香蕊、崔紅、王志斌、朱

少凡、張永國。2001。南澎列島恙蟲病東方體分離株的基因分型。中

國人獸共患病雜誌 17：43-45。

黎家燦、王敦清、陳興保。1997。中國恙蟎：恙蟲病媒介和病原體。廣東

科技出版社，廣州。570 頁。

嚴延生、王惠榕、鄭兆雙、何似、于恩庶、廖灝溶、李世清、何培瑞、俞

云彬、李榕晃、沈桂成。1996。套式 PCR 用于恙蟲病的早期診斷及恙

蟎幼蟲體內立克次體的檢驗。中國人獸共患病雜誌 12：12-14。

Anonymous. 1993. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories.

U.S. Government printing office, Washington. pp. 124.

Asanuma, K. 1983. Vector trombiculid mites and their infection rates with

Rickettsia tsutsugamushi. Clin. Bacteriol. 10: 174-179.

Bozeman, F. M., and B. L. Elisberg. 1963. Serological diagnosis of scrub typhus

by indirect immunofluorescence. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112:
568-573.

Chang, W. H., and J. S. Kang. 1991. Current status of Tsutsugamushi disease in

Korea. pp. 16-19. In: Abstracts of the 1st Korea-Japan Interational
Congress of Microbiology.

Chang, W. H., J. S. Kang, W. K. Lee, M. S. Choi, and J. H. Lee. 1990.

Serological classification by monoclonal antibodies of *Rickettsia*
tsutsugamushi isolated in Korea. J. Clin. Microbiol. 28: 685-688.

- Cooper, W. C., J. C. Lien, S. H. Hsu, and W. F. Chen. 1964. Scrub typhus in the Pescadores Islands: an epidemiologic and clinical study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13: 833-838.
- Dirk Van Peenen, P. F., J. C. Lien, F. J. Santana, and R. See. 1976. Correlation of chigger abundance with temperature at a hyperendemic focus of scrub typhus. *J. Parasitol.* 62: 653-654.
- Elisberg, B. L., C. F. Needy, and F. M. Bozeman. 1978. Antigenic inter-relationships among strains of *Rickettsia tsutsugamushi*. pp. 253-262. *In: J. Kazar, R. A. Ormsbee, and I. N. Tarasevich, eds. Rickettsiae and Rickettsial Diseases. VEDA Publ. House Slovak. Acad. Sci., Bratislava.*
- Enatsu, T., H. Urakami, and A. Tamura. 1999. Phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* strains based on the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 180: 163-169.
- Fang, R. and Raoult D. 2003. Antigenic classification of *Rickettsia felis* by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:221-228.
- Fournier, P-E., J. S. Dumler, G. Greub, J. Zhang, Y. Wu, and D. Raoult. 2003. Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 41:5456-5465.
- Frances, S. P., P. Watcharapichat, D. Phulsuksombati, and P. Tanskul. 1999. Occurrence of *Orientia tsutsugamushi* in chiggers (Acari: Trombiculidae) and small animals in an orchard near Bangkok, Thailand. *J. Med. Entomol.* 36: 449-453.
- Frances, S. T., P. Watcharapichat, and D. Phulsuksombati. 2001. Vertical transmission of *Orientia tsutsugamushi* in two lines of naturally infected *Leptotrombidium deliense* (Acari: trombiculidae). *J. Med. Entomol.*, 38: 17-21.
- Furuya, Y., Y. Yoshida, T. Katayama, S. Yamamoto, and A. Kawamura, Jr. 1993. Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1637-1640.
- Furuya, Y., Y. Yoshida, T. Katayama, F. Kawamori, S. Yamamoto, N. Ohashi, A. Tamura, and A. Kawamura, Jr. 1991. Specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2628-2630.
- Gale, J. L., G. S. Irving, H. C. Wang, J. C. Lien, W. F. Chen, and J. H. Cross. 1974. Scrub typhus in eastern Taiwan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23:

679-684.

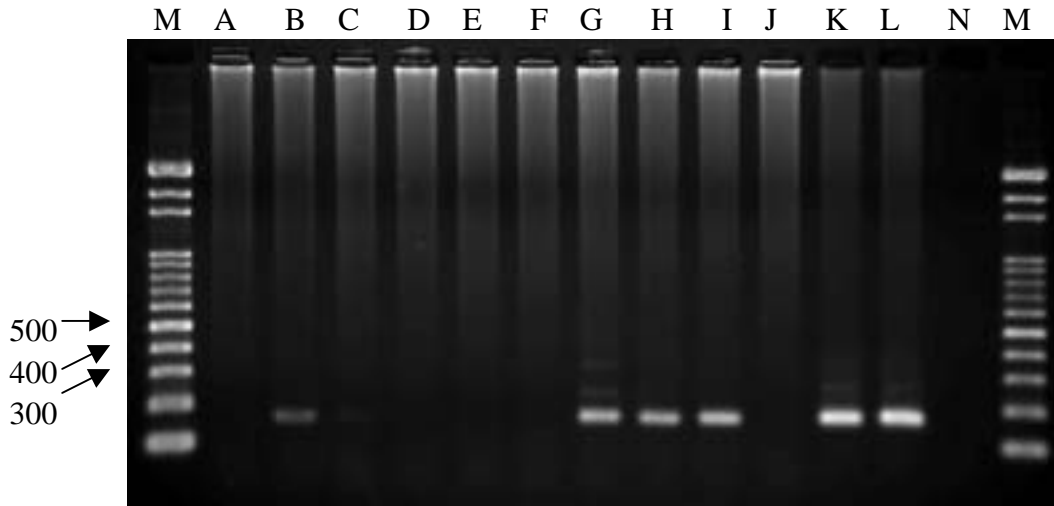
- Hasegawa, H., M. Otsuru, T. Fuji, H. Toma, and Y. Sato. 1990. Surveys on vector mites of tsutsugamushi disease in Taiwan and the Ryukyu Islands. *Jpn. J. Sanit. Zool.* 41: 235-246.
- Kawamori, F., M. Akiyama, M. Sugieda, T. Kanda, S. Akahane, S. Yamamoto, N. Ohashi, and A. Tamura. 1993. Two-step polymerase chain reaction for diagnosis of scrub typhus and identification of antigenic variants of *Rickettsia tsutsugamushi*. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 749-755.
- Kim, I. S., S. Y. Seong, S. G. Woo, M. S. Choi, J. S. Kong, and W. H. Chang. 1993. High-level expression of a 56-kilodalton protein gene (*bor 56*) of *Rickettsia tsutsugamushi* Boryong and its application to enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.* 31: 598-605.
- Klietmann, W. F. and K. L. Ruoff. 2001. Bioterrorism: Implications for the clinical microbiologist. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 364-381.
- Kollars, T. M. Jr., B. Tippayachai, D. Phulsuksombati, D. Bodhidatta, K. Lerdthusnee, J. Parrish, and R. Coleman. 2002. Variation in weight loss in *Mus musculus* (Rodentia) fed upon by *Leptotrombidium imphalum* (Acari: Trombiculidae) infected with two strains of *Orientia tsutsugamushi* (Rickettsia) *Int. J. Acarol.*, 26:73-176.
- Lennette, E. H, Halonen, P., Murphy, F. A. 1988. Laboratory diagnosis of infectious diseases. Principles and Practice Vol. II. pp 865-890. Springer-Verlag New York Inc.
- Lien, J. C., C. I. Cheng, and S. C. Lien. 1974. A team approach to a disease survey on an aboriginal island (Orchid Island, Taiwan) IV. Mosquitoes and chiggers on Lan-yu (Orchid Island), Taitung Hsien, Taiwan. *Chinese J. Microbiol.* 7: 36-41.
- Lien, J. C., S. Y. Liu, and H. M. Lin. 1967. Field observation on the bionomics of *Leptotrombidium deliense*, the vector of scrub typhus in the Pescadores. *Acta Med. Biol.* 15(Suppl): 27-31.
- Marmion, B.P. 1990. Rickettsial diseases of man and animals. Pp 674-689. Edward Arnold, London
- Misumi, H., M. Takahashi, H. Urakami, I. Matsumoto. 2002. Distributions of infective spots composed of unfed larvae infected with *Orientia tsutsugamushi* in *Leptotrombidium* mites and their annual fluctuations on the soil surface in an endemic area of tsutsugamushi disease (Acari: trombiculidae). *Med. Entomol. Zool.* 53: 227-247.
- Murai, K., N. Tachibana, A. Okayama, E. Shishime, K. Tsuda, and T. Oshikawa.

1992. Sensitivity of polymerase chain reaction assay for *Rickettsia tsutsugamushi* in patients' blood samples. *Microbiol. Immunol.* 36: 1145-1153.
- Nadchatram, M., and A. L. Dohany. 1974. A pictorial key to the subfamilies, genera and subgenera of Southeast Asian chiggers (Acari: Prostigmata, Trombiculidae). *Bull. Inst. Med. Res. Malaysia* 16: 1-67.
- Ohashi, N., Y. Koyama, H. Urakami, M. Fukuhara, A. Tamura, F. Kawamori, S. Yamamoto, S. Kasuya, and K. Yoshimura. 1996. Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype. *Microbiol. Immunol.* 40: 627-638.
- Ohashi, N., H. Nashimoto, H. Ikeda, and A. Tamura. 1990. Cloning and sequencing of the gene (*tsg 56*) encoding a type-specific antigen from *Rickettsia tsutsugamushi*. *Gene* 91: 119-122.
- Ohashi, N., A. Tamura, and T. Suto. 1988. Immunoblotting analysis of anti-rickettsial antibodies produced in patients of Tsutsugamushi disease. *Microbiol. Immunol.* 32: 1085-1092.
- Ohashi, N., H. Nashimoto, H. Ikeda, and A. Tamura. 1992. Diversity of immunodominant 56-kDa type-specific antigen (TSA) of *Rickettsia tsutsugamushi*: sequence and comparative analyses of the genes encoding TSA homologues from four antigenic varigenic variants. *J. Biol. Chem.* 267: 12728-12735.
- Olson, J. G., A. L. Bourgeois, and R. C. Fang. 1982. Population indices of chiggers (*Leptotrombidium deliense*) and incidence of scrub typhus in Chinese military personnel, Pescadores Islands of Taiwan, 1976-77. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76: 85-88.
- Olson, J. G., C. M. Ho, P. F. D. Van Peenen, and F. J. Santana. 1978. Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* from mammals and chiggers (Fam. Trombiculidae) in the Pescadores Islands, Taiwan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72: 192-194.
- Qiang, Y., A. Tamura, H. Urakami, Y. Makisaka, S. Koyama, M. Fukuhara, and T. Kadosaka. 2003. Phylogenetic characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan according to the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. *Microbiol. Immunol.* 47: 577-583.
- Shirai, A., J. C. Coolbaugh, E. Gan, T. C. Chan, D. L. Huxsoll, and G. Groves. 1982. Serological analysis of scrub typhus isolates from the Pescadores and Philippine islands. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 35: 255-259.

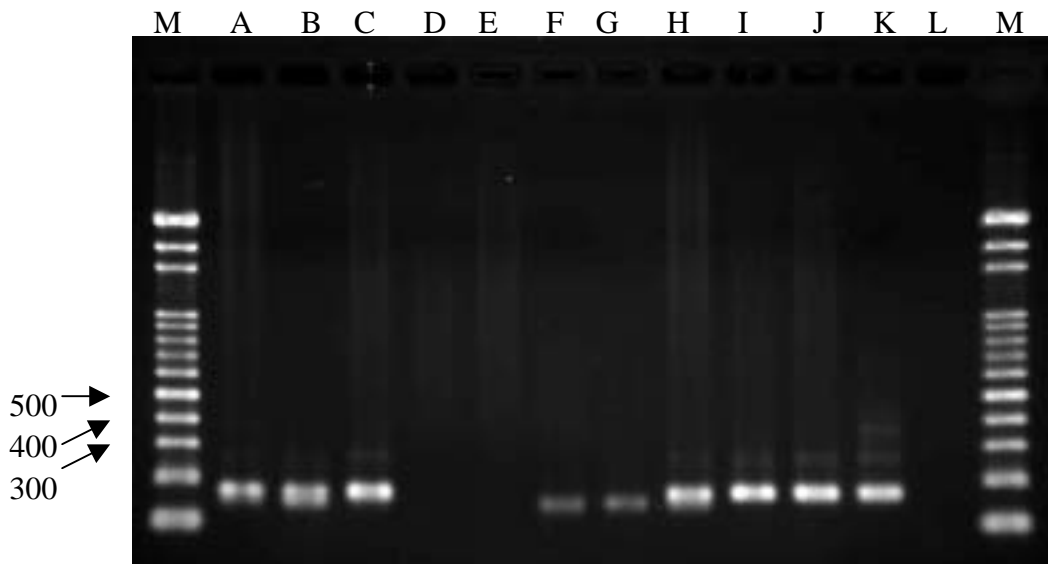
- Stover, C. K., D. P. Marana, J. M. Carter, B. A. Roe, E. Mardis, and E. V. Oaks. 1990. The 56-kilodalton major protein antigen of *Rickettsia tsutsugamushi*: molecular cloning and sequence analysis of the *sta 56* gene and precise identification of a strain-specific epitope. *Infect. Immun.* 58: 2076-2084.
- Suzuki, H. 1973. Reports of medico-zoological investigations in the Nansei Islands. Part 1. The chigger fauna of southern Amami-Oshima. *Jpn. J. sanit. Zool.* 24: 135-142.
- Suzuki, H. and Y. Tabaru. 1987. Field control test against *Leptotrombidium scutellare* in the western part of Nagasaki Prefecture. *Jpn. J. sanit. Zool.* 38:122.
- Takada, N., Fujita, H., Yano, Y., Tsuboi, Y. and Mahara, F. 1994. First isolation of a rickettsia closely related to Japanese spotted fever pathogen from a tick in Japan. *Entomol. Sci. America* 31:183-185.
- Takahashi, M., M. Murata, H. Misumi, E. Hori, A. Kawamura Jr., and H. Tanaka. 1994. Failed vertical transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) acquired from rickettsemic mice by *Leptotrombidium pallidum* (Acari: Trombiculidae). *J. Med. Entomol.* 31:212-216.
- Takahashi, M., H. Urakami, H. Misumi, S. Noda, S. Yamamoto, H. Suzuki, and I. Matsumoto. 2002. Detection and serotyping of *Orientia tsutsugamushi* from the unfed larval trombiculid mite *Leptotrombidium scutellare* (Nagayo, Miyagawa, Mitamura, Tamiya et Tenjin, 1921) (Acari: Trombiculidae). *Med. Entomol. Zool.* 53: 65-72.
- Takahashi, M. and H. Tanaka. 1995. Transmission dynamics of *Rickettsia tsutsugamushi* in vector mites. *Jpn. J. Sanit. Zool.*, 46: 319-329.
- Tamiya, T. 1962. Recent advances in studies of tsutsugamushi disease in Japan. 309 pp. Medical Culture Inc., Tokyo.
- Tamura, A., N. Ohashi, H. Urakami, and S. Miyamura. 1995. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* Gen. Nov. as *Orientia tsutsugamushi* Comb. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 589-591.
- Tamura, A., N. Yamamoto, S. Koyama, Y. Makisaka, M. Takahashi, K. Urabe, M. Takaoka, K. Nakazawa, H. Urakami, and M. Fukuhara. 2001. Epidemiological survey of *Orientia tsutsugamushi* distribution in field rodents in Saitama Prefecture, Japan, and discovery of a new type. *Microbiol. Immunol.* 45: 439-446.
- Tay, S. T., Y. M. Rohani, T. M. Ho, and D. Shamala. 2005. Sequence analysis of the hypervariable regions of the 56 kDa immunodominant protein genes

- of *Orientia tsutsugamushi* strains in Malaysia. *Microbiol. Immunol.* 49: 67-71.
- Traub, R., C. L. Wisseman Jr., M. R. Jones, and J. O'keefe. 1975. The acquisition of *Rickettsia tsutsugamushi* by chiggers (trombiculid mites) during the feeding process. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 226:91-114.
- Urakmi, H., A. Tamura, I. V. Tarasevich, T. Kadosaka, and F. N. Shubin. 1999. Decreased prevalence of *Orientia tsutsugamushi* in trombiculid mites and wild rodents in the Primorye region, Far East Russia. *Microbiol. Immunol.* 43: 975-978.
- Urakami, H., M. Takahashi, H. Misumi, K. Okubo, T. Enatsu, and A. Tamura. 2000. Detection, isolation and characterization of *Orientia tsutsugamushi* in *Leptotrombidium intermedium*. *Med. Entomol. Zool.*, 51: 169-177.
- Vercammen-Grandjean, P. H., and R. Langston. 1976. The Chigger Mites of the World. Vol. III. *Leptotrombidium* complex. Sect. A-C. George Williams Hooper Foundation, University of California, San Francisco, CA. 1-1061 pp.+ 298 pl.
- Walker, J. S., T. C. Chan, C. Manikumar, and B. L. Elisberg. 1975. Attempts to infect and demonstrate transovarial transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* in three species of *Leptotrombidium* mites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 266: 80-90.
- Wang, D. Q., and Z. Z. Yu. 1992. Chigger mites of the genus *Leptotrombidium*: key to species and their distribution in China. *Med. Vet. Entomol.* 6: 389-395.
- Yamamoto, S., N. Kawabata, A. Tamura, H. Ohashi, M. Murata, Y. Yoshida, and A. Kawamura, Jr. 1986. Immunological properties of *Rickettsia tsutsugamushi*, Kawasaki strain, isolated from a patient in Kyushu. *Microbiol. Immunol.* 30: 611-620.

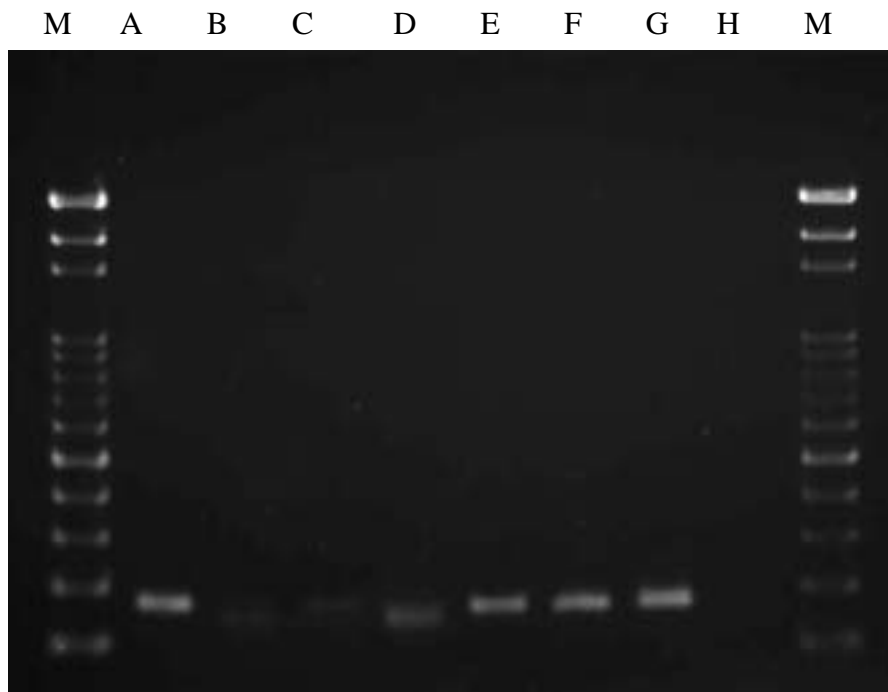
柒、圖



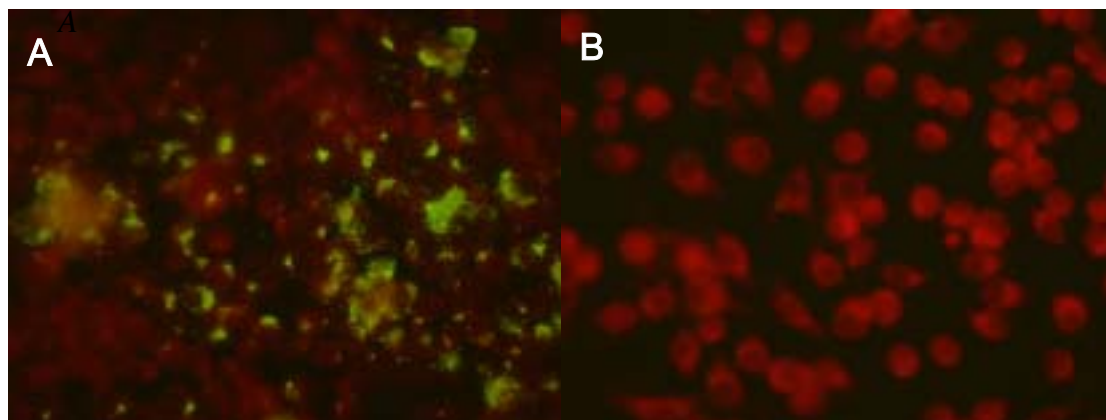
圖一、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅恙蟲病立克次體 56kDa 蛋白質 variable domain 1 之 PCR 產物，M: 100 bp DNA ladder; A-J: 恙蟲檢體(8430-31, 8432, 8432-36, 8436, 8436', 8429, 8435, 8437, 8438A, 8438B); K: 陽性對照組 (Karp); L: 陽性對照組(Gilliam);N: 陰性對照組。



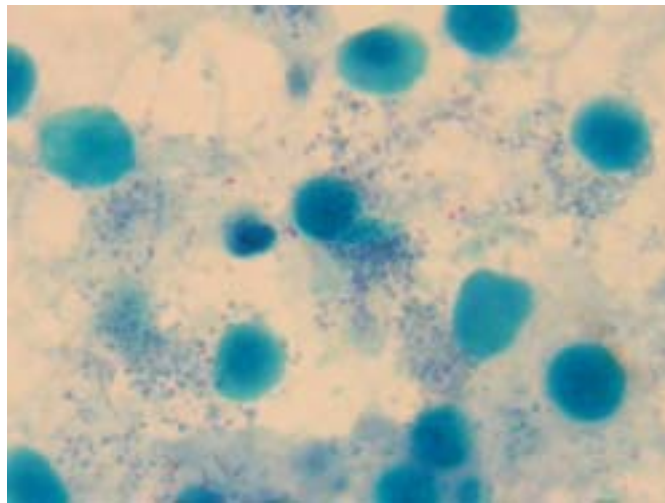
圖二、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅恙蟲病立克次體 56kDa 蛋白質 variable domain 1 之 PCR 產物，M: 100 bp DNA ladder; A-J: 恙蟲檢體(8440A, 8441A, 8441B, 8442, 8443A, 8443B, 8444A, 8445A, 8445B, 8446A); K: 陽性對照組 (Karp); L: 陰性對照組。



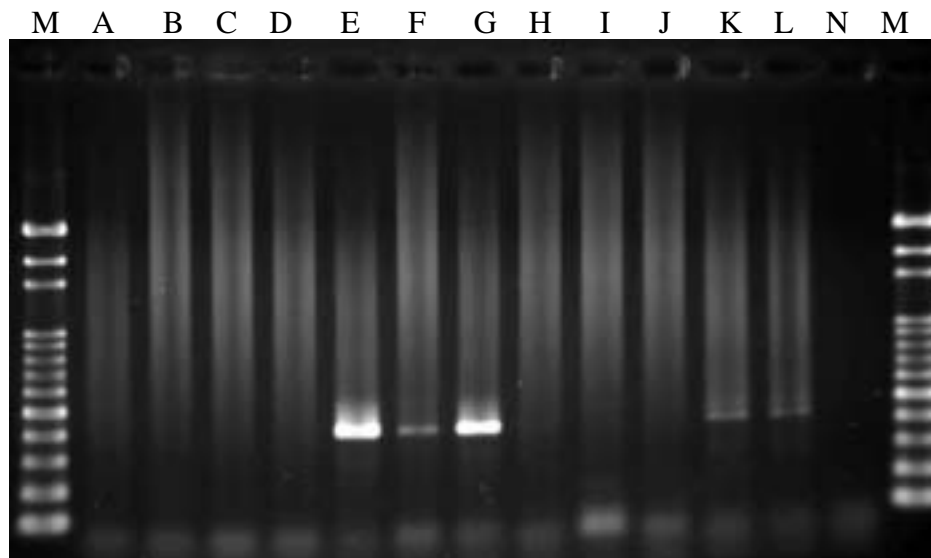
圖三、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅恙蟲病立克次體 56kDa 蛋白質 variable domain 1 之 PCR 產物，M: 100 bp DNA ladder; A-F: 恙蟲檢體(8440B, 8443C, 8443D, 8444B, 8444C, 8446B); G: 陽性對照組(Gilliam); H: 陰性對照組。



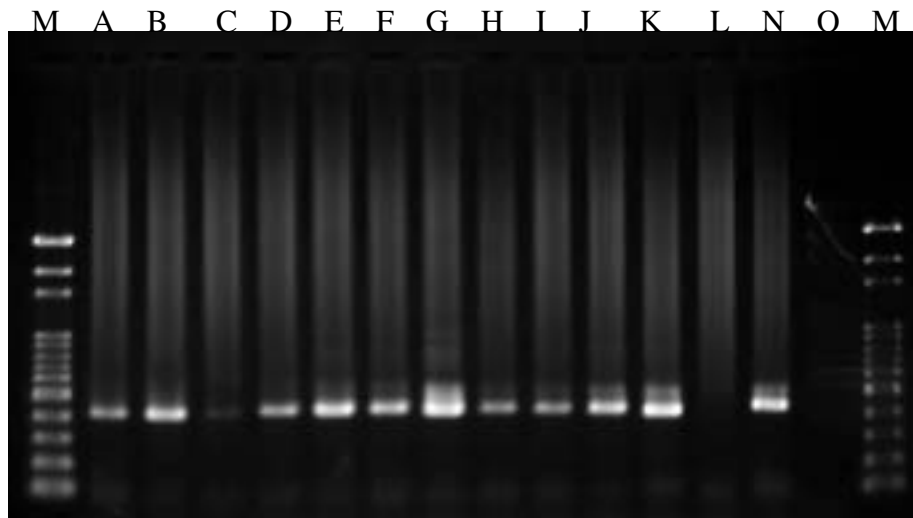
圖四、恙蟲體內恙蟲病立克次體經 L929 細胞培養後 IFA 檢測結果：A, *Orientia tsutsugamushi* 陽性; B, *Orientia tsutsugamushi* 陰性對照組。



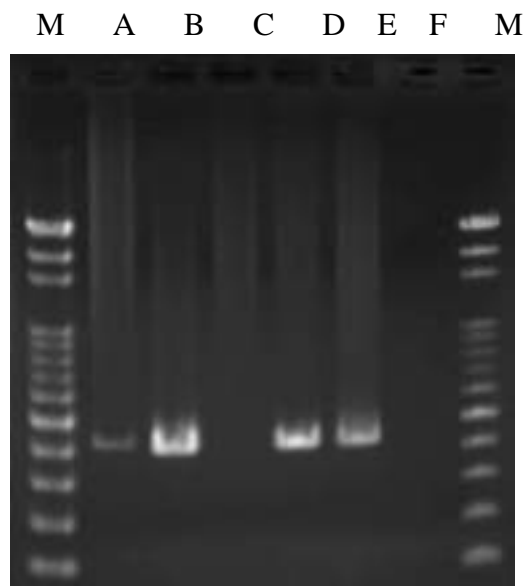
圖五、恙蟲體內立克次體經 L929 細胞培養後進行 Gimenez stain 結果，細胞周圍顆粒疑為立克次體。



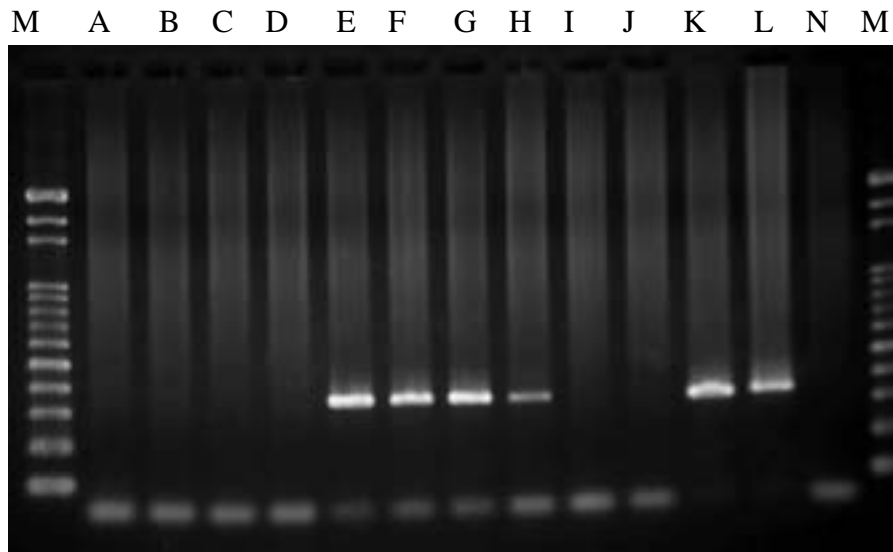
圖六、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅斑點熱立克次體 OmpB gene 之 PCR 產物，M: 100 bp DNA ladder; A-J: 恙蟲檢體(8430-31, 8432, 8432-36, 8436, 8436', 8429, 8435, 8437, 8438A, 8438B); K: 陽性對照組(*R. rickettsii*); L: 陽性對照組(*R. conorii*); N: 陰性對照組。



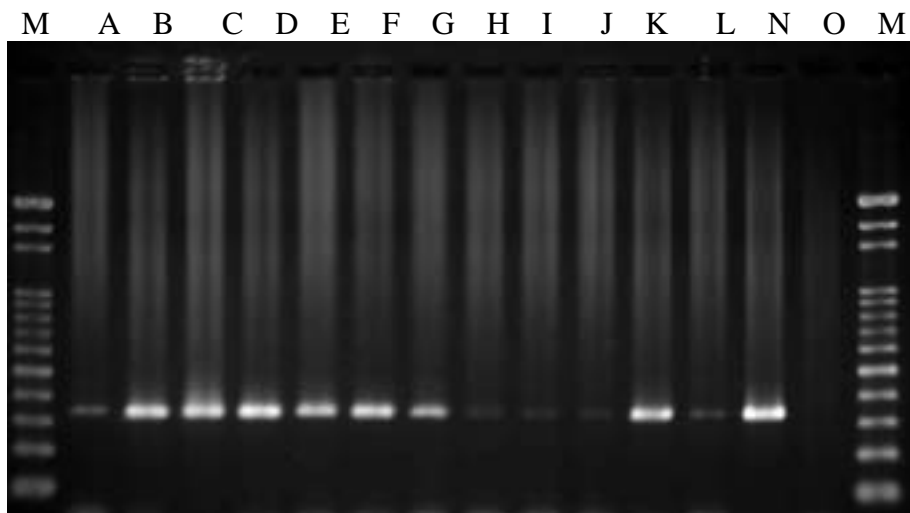
圖七、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅斑點熱立克次體 OmpB gene 之 PCR 產物，M: 100 bp DNA ladder; A-L: 恙蟲檢體(8440A, 8441A, 8441B, 8442, 8443A, 8443B, 8444A, 8445A, 8445B, 8446A, 8440B, 8443C); N: 陽性對照組(*R. rickettsii*); O: 陰性對照組。



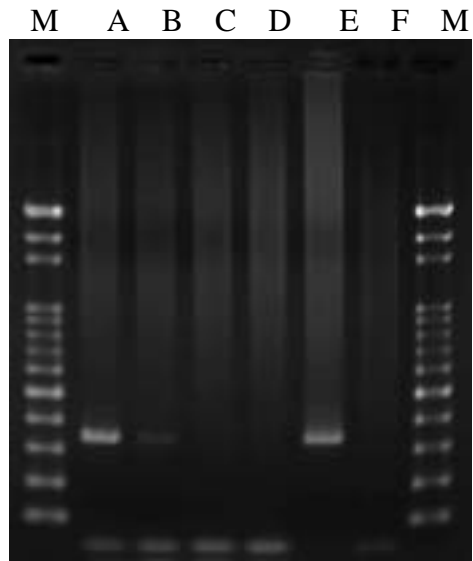
圖八、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅斑點熱立克次體 OmpB gene 之 PCR 產物，M: 100 bp DNA ladder; A-D: 恙蟲檢體(8443D, 8444B, 8444C, 8446B); E: 陽性對照組(*R. conorii*); F: 陰性對照組。



圖九、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅斑點熱立克次體 CS gene 之 PCR 產物，M: 100 bp DNA ladder; A-J: 恙蟲檢體(8430-31, 8432, 8432-36, 8436, 8436', 8429, 8435, 8437, 8438A, 8438B); K: 陽性對照組(*R. rickettsii*); L: 陽性對照組(*R. conorii*); N: 陰性對照組。



圖十、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅斑點熱立克次體 CS gene 之 PCR 產物，M: 100 bp DNA ladder; A-L: 恙蟲檢體(8440A, 8441A, 8441B, 8442, 8443A, 8443B, 8444A, 8445A, 8445B, 8446A, 8440B, 8443C); N: 陽性對照組(*R. rickettsii*); O: 陰性對照組。



圖十一、花蓮縣恙蟲體內 DNA 增幅斑點熱立克次體 CS gene 之 PCR 產物，M: 100 bp DNA ladder; A-D: 恙蟲檢體(8443D, 8444B, 8444C, 8446B); E: 陽性對照組(*R. conorii*); F: 陰性對照組。

捌、表

表一、95 年 5 月花蓮縣捕鼠及恙蟲採集結果

老鼠編號	老鼠種類	採集地點	恙蟲總數
8429	<i>Bandicota indica</i>	花蓮東華大學後草地	28
8430	<i>Bandicota indica</i>	花蓮東華大學前草地	12
8431	<i>Rattus losea</i>	花蓮東華大學前草地	36
8432	<i>Rattus losea</i>	花蓮東華大學前草地	61
8433	<i>Bandicota indica</i>	花蓮東華大學前草地	0
8434	<i>Bandicota indica</i>	花蓮東華大學前草地	0
8435	<i>Bandicota indica</i>	花蓮東華大學前苗圃	77
8436	<i>Rattus losea</i>	花蓮東華大學前苗圃	205
8437	<i>Bandicota indica</i>	花蓮東華大學前草地	86
8438	<i>Rattus losea</i>	花蓮東華大學前苗圃	206
8439	<i>Bandicota indica</i>	花蓮東華大學前草地	0
8440	<i>Rattus losea</i>	花蓮東華大學後草地	133
8441	<i>Rattus losea</i>	花蓮東華大學後草地	216
8442	<i>Bandicota indica</i>	吉安鄉建國路二段 21 號草地	48
8443	<i>Rattus losea</i>	吉安鄉建國路二段 21 號草地	674
8444	<i>Rattus losea</i>	吉安鄉建國路二段 21 號草地	320
8445	<i>Rattus losea</i>	吉安鄉建國路二段 21 號草地	253
8446	<i>Rattus losea</i>	吉安鄉建國路二段 21 號草地	176

表二、95年5月花蓮縣恙蟎恙蟲病及斑點熱立克次體培養及PCR檢測結果

檢體編號(恙蟲數量)	OT PCR	細胞培養 OT IFA	OT 定序結果	Spotted fever PCR(OmpB)	SF 定序結果 (OmpB)	Spotted fever PCR(CS)	SF 定序結果 (CS)	細胞保存
8430(12) 8431(36)	-	-	ND*	-	ND	-	ND	-
8432(56)	++**	++**	Karp(100%)	-	ND	-	ND	+**
8432(5) 8436(50)	+	+	Hualien-9(100%) TW461 Hualien-2 Taitung-5 AF050669	-	ND	-	ND	-
8436(50)	-	-	ND	-	ND	-	ND	-
8436(105)	-	-	ND	++	Rickettsia australis strain,358/382 (93%), (AF149109, AF123709)	++	TwKM02, 298/299 (99%)	-
8429(28)	-	-	ND	+	Rickettsia australis strain,359/382 (93%), (AF149109, AF123709)	++	TwKM02, 298/299 (99%)	-
8435(77)	++	+++	ISS-2,125/127 (98%)	++	Rickettsia australis	++	TwKM02, 298/299 (99%)	+

					strain,358/382 (93%), (AF149109, AF123709)			
8437(86)	++	++	Karp(100%)	-	ND	+	Rickettsia conorii str. Malish 7, 298/299 (99%) Rickettsia conorii Seven	+
8438A(108)	++	ND	Karp(100%)	-	ND	-	ND	-
8438B(98)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	-
8440A(100)	++	Cell died	ISS-2(kp-b')	++	Rickettsia australis strain,359/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02, 298/299 (99%)	-
8440B(33)	++	-	Karp(100%)	++	Rickettsia australis strain,359/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02, 298/299 (99%)	+
8441A(136)	++	Cell died	TW45R(kp-b') TW73R	++	Rickettsia australis strain,359/382 (93%),	++	TwKM02, 298/299 (99%)	-

					(AF149109, AF123709)			
8441B(80)	++	Cell died	TW45R(100%) TW73R	+	Rickettsia australis strain,359/382 (93%), (AF149109, AF123709)	++	TwKM02, 298/299 (99%)	-
8442(48)	-	Cell died	ND	+	R.rickettsii, 379/382 (99%)	++	未定出	-
8443A(100)	-	Cell died	ND	++	Rickettsia conorii str. Malish 7 (100%) Rickettsia conorii strain Seven, 16 種	+	未定出	-
8443B(100)	+	Cell died	Hualien-6, 102/103 (99%) Hualien-5 LF-1	+	R.rickettsii (100%)	++	未定出	-
8443C(250)	+	+	LF-1, 101/102 (99%)	-	ND	-	ND	+
8443D(224)	+	+	Hualien-9(100%) TW461 Hualien-2 Taitung-5 AF050669	+	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02, 299/299 (100%)	+

8444A(100)	+	Cell died	Hualien-6(100%) Hualien-5	++	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	未定出	-
8444B(75)	++	-	Hualien-5(kp-b'),91/92 (98%)	++	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	Rickettsia conorii str. Malish 7, 298/299 (99%) Rickettsia conorii Seven	+
8444C(145)	++	+	TW45R(100%) TW73R	-	ND	-	ND	+
8445A(139)	++	Cell died	TW45R(kp-b'),76/82 (92%) TW73R	+	Rickettsia conorii str. Malish 7 (100%) Rickettsia conorii strain Seven, 16 種	+	未定出	-
8445B(114)	++	Cell died	TW45R(100%) TW73R	+	Rickettsia conorii str. Malish 7 (100%) Rickettsia conorii strain Seven, 16 種	+	Rickettsia conorii str. Malish 7, 298/301 (99%) Rickettsia conorii Seven	-

8446A(109)	++	Cell died	TW45R(100%) TW73R	++	Rickettsia conorii str. Malish 7 (100%) Rickettsia conorii strain Seven, 16 種	+	Rickettsia conorii str. Malish 7 (100%) Rickettsia conorii Seven	-
8446B(67)	++	+	ISS-2,125/126 (99%)	++	未定出	-	ND	+

*No done

**+為 PCR 或 IFA 陽性或細胞冷凍保存；-為 PCR 或 IFA 陰性或細胞未冷凍保存

表三、95 年 6 月金門縣恙蟎恙蟲病及斑點熱立克次體培養及 PCR 檢測結果

檢體編號 (恙蟲數量)	OT PCR	細胞培養 OT IFA	OT 定序結果	Spotted fever PCR(OmpB)	SF 定序結果 (OmpB)	Spotted fever PCR(CS)	SF 定序結果 (CS)	細胞保存
tick1	+**	<i>Cell died</i>	Karp(100%)	-	ND*	-	ND	-**
tick2	-	-**	ND	-	ND	-	ND	-
tick3	-	-	ND	-	ND	-	ND	-
tick4	-	-	ND	-	ND	-	ND	-
tick5	-	-	ND	-	ND	-	ND	+
tick6	-	-	ND	-	ND	-	ND	-
tick7	-	<i>Cell died</i>	ND	-	ND	-	ND	-
tick8	-	-	ND	-	ND	-	ND	-
tick9	++	<i>Cell died</i>	Karp, 125/126(99%)	-	ND	-	ND	-
8447(105)	++	-	Taitung-3, 145/145 (100%) Taitung-1 TWyu81 TW201	-	ND	-	ND	-
8448(120)	++	-	Karp(100%)	-	ND	-	ND	-
8449(108)	++	+	Taitung-3, 148/148 (100%) Taitung-1 TWyu81 TW201	+	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02 (100%)	-
8450(120)	-	<i>Cell died</i>	ND	-	ND	-	ND	-
8451A(139)	++	<i>Cell died</i>	Taitung-3, 145/145	-	ND	-	ND	-

			(100%) Taitung-1 TWyu81 TW201					
8451B(105)	-	-	ND	-	ND	-	ND	-
8452(106)	++	-	未定出	++	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02 (100%)	-
8457(105)	+	+	TW45R, 125/126 (99%) TW73R	-	ND	-	ND	+
8458A(108)	-	-	ND	-	ND	-	ND	-
8458B(110)	++	+	Karp(100%)	-	ND	-	ND	-
8466(105)	-	Cell died	ND	-	ND	-	ND	-
8467(109)	-	-	ND	+	Rickettsia felis URRWXCal2, 379/382 (99%) Rickettsia sp. California 2	++	TwKM03(100%) Rickettsia felis URRWXCal2 Rickettsia sp. Hf187 Rickettsia felis(RAU33922) Rickettsia sp. California 2	-
8468A(110)	-	-	ND	-	ND	-	ND	-
8468B(76)	-	-	ND	-	ND	-	ND	-

8469(110)	++	-	Karp, 125/126 (99%)	-	ND	-	ND	-
8470(104)	+	+	Karp (100%)	-	ND	-	ND	+
8473A(105)	++	Cell died	Karp, 125/126 (99%)	-	ND	-	ND	-
8473B(87)	-	-	ND	-	ND	-	ND	-
8474(103)	-	-	ND	-	ND	-	ND	-
8476(100)	+	Cell died	Karp(100%)	-	ND	-	ND	-
8477(100)	-	Cell died	ND	-	ND	-	ND	-
8478(101)	-	-	ND	-	ND	-	ND	+
8494(108)	-	-	ND	-	ND	-	ND	+
8495(112)	+	-	Karp(100%)	-	ND	-	ND	+

*No done

**+為 PCR 或 IFA 陽性或細胞冷凍保存；-為 PCR 或 IFA 陰性或細胞未冷凍保存

表四、95年6月金門游離恙蟲調查結果

採集地點	樣本種類	恙蟲數
金城鎮泗湖 1	黑布	0
金城鎮泗湖 1	地表枯枝落葉及土壤	2
金城鎮泗湖 2	黑布	1
金城鎮泗湖 2	地表枯枝落葉及土壤	14 幼蟲 2 成蟲
金城鎮泗湖 3	黑布	0
金城鎮泗湖 3	地表枯枝落葉及土壤	2 幼蟲 1 成蟲
金沙鎮英坑 1	黑布	0
金沙鎮英坑 1	地表枯枝落葉及土壤	1
金沙鎮英坑 2	黑布+地表枯枝落葉及土壤	0
金沙鎮英坑 3	黑布	0
金沙鎮英坑 3	地表枯枝落葉及土壤	3 幼蟲 1 成蟲
金寧鄉西山草頂 1	黑布	1
金寧鄉西山草頂 2	黑布	1
金寧鄉西山草頂 3	黑布	0
金寧鄉西山 4	黑布	1
金寧鄉西山 4	地表枯枝落葉及土壤	2
金湖鎮小徑 1-1	黑布	5
金湖鎮小徑 1-2	黑布	8
金湖鎮小徑 1-3	葉	6
金湖鎮小徑 1-4	黑布	1
金湖鎮小徑 1-5	葉	3
金湖鎮小徑 2	地表枯枝落葉及土壤	0
金湖鎮小徑 3	地表枯枝落葉及土壤	0
金湖鎮小徑 4	地表枯枝落葉及土壤	1

表五、95年9月台東縣恙蟎恙蟲病及斑點熱立克次體培養及PCR檢測結果

檢體編號(恙蟲數量)	OT PCR	細胞培養 OT IFA	OT 定序結果	Spotted fever PCR(OmpB)	SF 定序結果 (OmpB)	Spotted fever PCR(CS)	SF 定序結果(CS)	細胞保存
8518tick	-**	-**	ND*	+	Rickettsia conorii str. Malish 7,378/382 (98%) Rickettsia conorii strain Seven, 19 種	+	Rickettsia mongolotimonae isolate URRMTMFEe65, 297/299 (99%) 13 種	***
8539tick	+	-	LHGM2, 125/126 (99%) M33004.1 AY956315.1(Karp) AJ512110.1	-	ND	-	ND	+
8552tick	-	-	ND	+	Rickettsia conorii str. Malish 7,378/382 (98%) Rickettsia conorii strain Seven, 19 種	+	Rickettsia mongolotimonae isolate URRMTMFEe65, 297/299 (99%) 13 種	+
8560tick	-	-	ND	+	Rickettsia conorii str.	+	Rickettsia mongolotimonae	+

					Malish 7,378/382 (98%) Rickettsia conorii strain Seven, 19 種		isolate URRMTMFEe65, 297/299 (99%) 13 種	
8513-14-1(102)	+	+	未定出	-	ND	-	ND	+
8513-14-2(105)	+	-	未定出	-	ND	-	ND	+
8515-16(100)	+	-	未定出	-	ND	-	ND	+
8517-18(102)	+	+	未定出	+	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02, 299/299 (100%)	+
8519-21-1(103)	+	-	未定出	-	ND	-	ND	+
8519-21-2(105)	+	-	未定出	+	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02, 299/299 (100%)	
8522-23(102)	+	-	未定出	+	未定出	+	Rickettsia mongolotimonae isolate URRMTMFEe65, 297/299 (99%) 13 種	+
8524-25(103)	+	+	未定出	-	ND	-	ND	+

8526-27(100)	+	+	Taitung-3, 140/146 (95%) Taitung-1 TWyu81 TW201	-	ND	-	ND	+
8528-29(101)	+	+	未定出	-	ND	+	Rickettsia rickettsii R(100%)	+
8530-31(100)	+	+	LHGM2, 118/126 (93%) M33004.1 AY956315.1(Karp) AY283180.1 AJ512110.1	+	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02, 299/299 (100%)	+
8532-34(104)	+	+	DQ517963.1, 145/148 (97%) DQ517961.1 TW261	+	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02, 299/299 (100%)	+
8535-36(105)	+	<i>Cell died</i>	未定出	+	Rickettsia conorii str. Malish 7 , 380/381 (99%) Rickettsia conorii strain Seven, 16 種	-	ND	-
8537-38(105)	+	-	DQ517963.1, 100/108	+	Rickettsia	+	TwKM02,	+

			(92%) DQ517961.1 TW261		australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)		299/299 (100%)	
8539-40(100)	+	Cell died	DQ517963.1, 100/108 (92%) DQ517961.1 TW261	+	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02, 299/299 (100%)	-
8541-42(104)	+	-	未定出	+	Rickettsia conorii str. Malish 7,378/382 (98%) Rickettsia conorii strain Seven, 19 種	-	ND	+
8543-44(100)	+	-	未定出	+	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02, 299/299 (100%)	+
8545-46(105)	+	-	未定出	-	ND	-	ND	+
8547-48(100)	+	Cell died	Taitung-3, 123/135 (91%) Taitung-1	-	ND	-	ND	-

			Twyu81 TW201					
8549-50(100)	+	-	DQ517963.1, 108/113 (95%) DQ517961.1 TW261	+	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02, 299/299 (100%)	+
8551-52(100)	-		ND	-	ND	-	ND	
8553-54(102)	+	Cell died	Taitung-3, 134/145 (92%) Taitung-1 Twyu81 TW201	-	ND	-	ND	-
8555-56(101)	+	-	DQ517963.1, (100%) DQ517961.1 TW261	+	Rickettsia australis strain,357/382 (93%), (AF149109, AF123709)	+	TwKM02, 299/299 (100%)	+
8557-58(100)	+	-	Taitung-3, 115/131 (87%) Taitung-1 Twyu81 TW201	-	ND	-	ND	+
8558(104)	+	-	DQ517963.1, 142/142 (100%) DQ517961.1 TW261	-	ND	-	ND	+

8560(103)	+	-	DQ517963.1, 111/116 (95%) DQ517961.1 TW261	-	ND	-	ND	+
-----------	---	---	---	---	----	---	----	---

*No done

**+為 PCR 或 IFA 陽性或細胞冷凍保存；-為 PCR 或 IFA 陰性或細胞未冷凍保存

表六、95年9月蘭嶼游離恙蟲調查結果

採集地點	樣本種類	恙蟲數
紅頭村青青草原	草	0
紅頭村青青草原 1	黑布	5
紅頭村青青草原 1	地表枯枝落葉及土壤	10
紅頭村青青草原 2	黑布	7
紅頭村青青草原 2	地表枯枝落葉及土壤	6
紅頭村青青草原 3	黑布	1
紅頭村青青草原 3	地表枯枝落葉及土壤	13
紅頭村青青草原 4	黑布	1
紅頭村青青草原 4	地表枯枝落葉及土壤	2
野銀村永興農莊 1	黑布	4
野銀村永興農莊 1	地表枯枝落葉及土壤	1
野銀村永興農莊 2	黑布	1
野銀村永興農莊 2	地表枯枝落葉及土壤	6
野銀村永興農莊 3	黑布	5
野銀村永興農莊 3	地表枯枝落葉及土壤	7
朗島村 1	黑布	3
朗島村 1	地表枯枝落葉及土壤	2
朗島村 2	黑布	0
朗島村 2	地表枯枝落葉及土壤	0
朗島村 3	黑布	0
朗島村 3	地表枯枝落葉及土壤	0
朗島村 4	黑布	0
朗島村 4	地表枯枝落葉及土壤	0

表七、花蓮縣、金門縣、蘭嶼鄉鼠類血清 IFA 檢測結果

地區	捕獲鼠種	數目	O. T(+)	陽性率	R. conorii(+)	陽性率	R. rickettsii(+)	陽性率	R. typhi(+)	陽性率
花蓮	<i>B. indica</i>	8	7	87.50%	8	100.00%	8	100.00%	0	0.00%
	<i>R. losea</i>	10	10	100.00%	7	70.00%	7	70.00%	0	0.00%
	total	18	17	94.44%	15	83.33%	15	83.33%	0	0.00%
金門	<i>R. losea</i>	58	48	82.76%	42	72.41%	54	93.10%	4	6.90%
	<i>S. murinus</i>	3	1	33.33%	1	33.33%	1	33.33%	0	0.00%
	total	61	49	80.33%	43	70.49%	55	90.16%	4	6.56%
蘭嶼	<i>R. losea</i>	48	44	91.67%	40	83.33%	42	87.50%	0	0.00%
	total	48	44	91.67%	40	83.33%	42	87.50%	0	0.00%
總計	<i>R. losea</i>	116	102	87.93%	89	76.72%	103	88.79%	4	3.45%
	<i>B. indica</i>	8	7	87.50%	8	100.00%	8	100.00%	0	0.00%
	<i>S. murinus</i>	3	1	33.33%	1	33.33%	1	33.33%	0	0.00%
	total	127	110	86.61%	98	77.17%	112	88.19%	4	3.15%

