

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000116

衛生福利部疾病管制署 104 年署內科技研究計畫

計畫名稱：台灣無形體症與斑點熱流行病學調查

年度研究報告

執行單位：研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：王錫杰

研究人員：舒佩芸、施函君、廖顯竣、鍾珞璿

執行期間：104 年 1 月 1 日至 104 年 12 月 31 日

目 錄

一、表次	3
二、摘要：中文摘要	4
英文摘要	6
三、本文	
(一)、前言	7
(二)、材料與方法	15
(三)、結果	26
(四)、討論	31
(五)、結論與建議	35
(六)、計畫重要研究成果及具體建議	37
(七)、參考文獻	38
(八)、表	42

表次	
表一、104 年宜蘭縣、花蓮縣及台東縣鼠類捕捉結果	42
表二、台灣鼠類脾臟 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體檢測結果	44
表三、台灣鼠類脾臟 <i>Anaplasma</i> & <i>Ehrlichia</i> 立克次體檢測結果	46
表四、台灣鼠類脾臟 <i>Anaplasma</i> & <i>Ehrlichia</i> 立克次體檢測陽性率	48
表五、台灣鼠類脾臟感染 <i>Anaplasma</i> spp. 及 <i>Ehrlichia</i> spp. 種類及比率	49
表六、台灣 6 縣市鼠類脾臟感染 <i>Anaplasma</i> spp. 及 <i>Ehrlichia</i> spp. 種類及數量	49
表七、第一批 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體細胞培養結果	50
表八、第二批 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體細胞培養結果	50
表九、老鼠脾臟及全血 <i>Anaplasma</i> & <i>Ehrlichia</i> 立克次體檢測及培養整理	51

摘要

關鍵詞：蜱，蜱媒立克次體，無形體症，斑點熱，台灣

為分離培養台灣地區無形體症(*Anaplasmosis*)及斑點熱(*Spotted fever*)立克次體菌株，以 *ompB* & *gltA* nested PCR 檢測103年採集自桃園縣、台中市、雲林縣及104年採集自宜蘭縣、花蓮縣、台東縣共468隻鼠類脾臟 *Rickettsia* 屬立克次體，結果有3隻陽性，分別是桃園縣1隻小黃腹鼠檢出序列近似 *Rickettsia rickettsii* str. Morgan *ompB* 381/382(99%)，宜蘭縣1隻小黃腹鼠檢出序列近似 *Rickettsia* sp. TwKM03 *gltA* 299/300(99%)及花蓮縣1隻錢鼠檢出序列近似 *Rickettsia rickettsii* str. Morgan *ompB* 382/382(100%)。相同檢體以 *Anaplasma* & *Ehrlichia* real time PCR 檢測，有55隻鼠類陽性，平均陽性率為11.75%，以赤背條鼠(*Apodemus agrarius*) 陽性率最高52.63%。鼠類感染立克次體菌株最多為 *Uncultured Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009，佔全部之52.73%，其次為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (27.27%) 及 *Anaplasma phagocytophilum* (14.55%)。5種被檢測出感染 *Anaplasma* & *Ehrlichia* 的鼠種中，田鼯鼠感染4種立克次體菌株最多，而赤背條鼠只有1種。檢測出數量較多的 *Uncultured Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 及 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 普遍分布於台灣東西部，而 *Anaplasma phagocytophilum* 目前僅發現於花東地區。*Rickettsia* 屬立克次體、*Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 均正

進行細胞培養中。

Abstract

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

In order to isolate rickettsiae of anaplasmosis and spotted fever from Taiwan, a total of 648 rodent spleen samples from 6 Counties were detected by *ompB* and *gltA* nested PCR and Anaplasma & Ehrlichia real time PCR. Three *Rickettsia* strains were found including sequence similar to *Rickettsia rickettsii* str. Morgan *ompB* 381/382(99%) from *Rattus losea*, Taoyuan County; *Rickettsia* sp. TwKM03 *gltA* 299/300(99%) from *Rattus losea*, Yilan County; *Rickettsia rickettsii* str. Morgan *ompB* 382/382(100%) from *Suncus murinus*, Hualian County. In addition, 55 *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. were discovered, the average positive rate was 11.75%, *Apodemus agrarius* showed the highest rate 52.63%. Uncultured *Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 was the most frequent found strain (29/55, 52.73%), followed by *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (15/55, 27.27%) and *Anaplasma phagocytophilum* (8/55, 14.55%). Among *Anaplasma* & *Ehrlichia* infected rodents, four *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. strains were found in *Mus caroli*, whereas only one strain was found in *Apodemus agrarius*. We could find Uncultured *Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* distributed in eastern and western part of Taiwan but *Anaplasma phagocytophilum* only could find in Hualian and Taitung Counties. Isolation of *Rickettsia* spp, *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. using cell culture are ongoing.

前言

人類粒球無形體症(human granulocytic anaplasmosis, HGA), 人單核球艾利希氏體症(human monocytic ehrlichiosis, HME)及斑點熱(spotted fever)為臨床症狀類似, 流行病學與病因學迥異的蜱媒立克次體疾病(Tickborne rickettsial diseases, TBRD)。HGA 的病原體為 *Anaplasma phagocytophilum*, HME 的病原體為 *Ehrlichia chaffeensis* 皆屬於立克次體目(Rickettsiales)之無形體科(Anaplasmataceae), 而斑點熱的病原體則為一群立克次體(spotted fever group rickettsia, SFGR)屬於立克次體目(Rickettsiales)之立克次體科(Rickettsiaceae)。無形體科(Anaplasmataceae)除 *A. phagocytophilum*、*E. chaffeensis* 外尚包括 *E. ewingii*、*E. canis* 及 *Neorickettsia sennetsu* 等, 其攻擊人類的標的為循環系統中的白血球。*A. phagocytophilum* 引起人類粒球無形體症(human granulocytic anaplasmosis, HGA; 舊稱 human granulocytic ehrlichiosis, HGE); *E. chaffeensis* 造成人單核球艾利希氏體症(human monocytic ehrlichiosis, HME)¹⁻³; 而造成犬類粒球艾利希氏體症(canine granulocytic ehrlichiosis, CGE)之病原體 *E. ewingii* 於 1998 年發現亦會感染人類, 稱為 human ewingii ehrlichiosis⁴; *Neorickettsia sennetsu* 則造成人腺熱(sennetsu fever)。這些不同病原體所造成的共同病徵包括發燒、白血球減少、血小板減少及血清轉胺酶(transaminase)活性增加等, 在臨床上不易區分各個

疾病，惟其皆對 doxycycline 敏感^{5,6}。近年來有許多新的艾利希氏體陸續被發現，如 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 在 2000 年左右曾報告發現於中國與日本的溝鼠(*Rattus norvegicus*)，日本的卵形硬蜱(*Ixodes ovatus*)及荷蘭的篋豆硬蜱(*Ixodes ricinus*)⁷，而其對人的致病性則在 2010 年由 3 名德國、瑞典及瑞士的患者身上才被發現⁸⁻¹⁰。

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

HGA 之病媒在美東為 *Ixodes scapularis*，美西為 *I. pacificus*，歐洲及亞洲分別為 *I. ricinus* 及 *I. persulcatus*。一些小型哺乳動物如白足鼠(*Peromyscus leucopus*)、灰足林鼠(*Neotoma fuscipes*)及 *Apodemus*、*Microtus*、*Clethrionomys* 種類鼠種可能為其貯主(reservoir)，而鹿科動物亦有此可能⁶。HME 之病媒為 *Amblyomma americanum*，犬及鹿可能為其貯主。

HGA 及 HME 的診斷可經由血液塗抹片、PCR、細胞培養及血清學檢測。其中發病小於 1 週的患者以 PCR 敏感性最高約 60-90%，發病超過 3 週的患者經由血清抗體陽轉 4 倍上升，敏感性可達 95% 以上¹³。PCR 的標的基因以 16S rRNA gene 為主，其他還有 *gltA* gene、*p44* gene、*ank* gene 及

groE gene 等¹⁴⁻¹⁷。

台灣有關艾利希氏體之研究在動物界較多，尚無人類感染之病例報告。其中犬隻會感染 *E. canis*、*E. platys* 及 *E. euqi*，台灣北部犬隻 *E. platys* 感染率在都市犬中盛行率為 8.9%，來自嚴重蜱感染的狗窩為 97.1%；臺灣南部地區犬隻 *E. canis* 感染率為 14.4%¹⁸⁻²⁰。陳(2007)以 *gp36* 基因做為檢測 *E. canis* 之標的，*gltA* 基因做為檢測 *Anaplasma platys*(舊稱 *Ehrlichia platys*)之標的，發現台灣地區家貓血液檢體中，分別有 5.5% 及 2.0% 陽性率²¹。Hsieh *et. al.*(2010)發現經由 16S rRNA、*gp19* 及 *gp36* 三段基因序列分析，台灣的 *E. canis* 至少有 4 種不同株(strain)，在親緣關係上屬同一群，而與其他不同地理群有區別²²。不同艾利希氏體屬病原體雖有其主要病媒蜱種及侵犯宿主，但仍有報告在其他蜱種發現及感染其他宿主，如日本有 *E. canis* 感染人類之報告²³。翁等(2010)調查金門地區鼠類外寄生蜱發現於小黃腹鼠採集之鐮形扇頭蜱(*Rhipicephalus haemaphysaloides*)與粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)檢測出 *Ehrlichia chaffeensis*，所有蜱之最小感染率為 1.8%²⁴。並在 2012 年於金門 108 隻野鼠發現體內肝蜱等內臟 *E. chaffeensis* DNA 感染率為 14.8%²⁵。

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

故稱邊蟲。但另一種 *A. marginale* ssp. *Centrale* (*A. centrale*)則寄生在紅血球細胞質中央，病原性較弱²⁶。*A. marginale* 會破壞紅血球而導致漸進性貧血及黃膽。林(2007)調查台灣 12 個牧場，發現乳牛邊蟲症盛行率為 53.3%，以南部地區較高²⁷。

斑點熱是一種世界性散發的立克次體疾病，主要是經由蜱(ticks)、蟎(mites)及跳蚤(fleas)的媒介而使人得病。引起斑點熱的病原體種類繁多且不斷的有新的種類被發現，早期發現的如發生在美國、加拿大及墨西哥等地，由 *Rickettsia rickettsii* 引起的洛磯山斑點熱(Rocky mountain spotted fever)；發生在非洲、印度及地中海沿岸，由 *R. conorii* 引起的蒲東熱(Boutonneuse fever)、肯亞蜱熱(South African tick typhus)，發生在澳洲，由 *R. australis* 引起的昆士蘭蜱熱(Queensland tick typhus)；發生在美國、韓國、烏克蘭及克羅埃西亞，由 *R. akari* 引起的立克次體痘及發生在日本，由 *R. japonica* 引起的日本斑點熱(Japanese spotted fever)等²⁸⁻³⁰。後來發現的種類如發生在俄國、中國、蒙古及巴基斯坦等地由 *R. sibirica* 引起的北亞蜱熱(North Asian tick typhus)，發生在澳洲南部及泰國由 *R. honei* 引起的澳洲斑點熱(Flinders Island spotted fever)，發生在非洲撒哈拉沙漠以南及加勒比海，由 *R. africae* 引起的非洲蜱咬熱(African tick bite fever)及全世界分佈經由跳蚤媒介，由 *R. felis* 引起的蚤媒斑點熱(Flea-borne spotted fever)等，如今斑點熱病原體已至少有

18 種以上且陸續的被發現中^{31,32}。台灣第一例斑點熱病例報告為 2006 年 5 月自南非旅遊回來，感染 *R. africae* 之境外移入個案^{33,34}，而第一例斑點熱之本土病例報告也已出現證實感染 *R. felis*³⁵，同時野外貓蚤族群之 *R. felis* 感染率，單隻貓蚤平均感染率為 18.8%(13/69)，亦於流浪貓中檢測出血清抗 *R. felis* IgG 抗體效價為 1:320³⁶。而人群斑點熱血清流行病學調查，在台南的盛行率調查為 3.5-4.4%³⁷，同時陳等(1997)報告金門地區的鼠類血清檢體斑點熱的抗體陽性率為 66.4%；採自台北市南港區、松山區，台北縣中和市，永和市及宜蘭縣福山植物園的 21 隻鼠類，斑點熱的抗體陽性率為 42.9%³⁸。本署前身疾病管制局 2005 年研究報告指出捕獲自台灣地區 13 個空海港的 810 隻鼠類，其 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 血清抗體陽性率分別為 50.3% 及 26.8%，兩者重複感染比率為 23.7%；另自南部 11 個地方性斑疹傷寒確定病例病媒調查、屏東市市場及台北市北投區捕獲 113 隻鼠類，其 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 血清抗體陽性率分別為 36.3% 及 30.1%。斑點熱立克次體的菌株雖然很多，但目前商品化的斑點熱立克次體 IFA 抗原玻片之菌株僅有 *R. rickettsii* 及 *R. conorii*，依 Fang and Raoult (2003)報告，11 株 *Rickettsia* 屬立克次體經由 BALB/c 老鼠產生之多株抗體，可對 *R. rickettsii* 抗原玻片產生螢光反應，其效價分別為 *R. felis* (1:64), *R. rickettsii* (1:4,096), *R. australis* (1:1,024), *R. montanensis* (1:512), *R. honei* (1:1,024), *R. japonica* (1:1,024), *R. canadensis* (1:128), *R. prowazekii* (1:128), *R. massiliae* (1:2,048), *R. belli*

(1:1,024)及 *R. conorii* (1:512)；另 8 株 *Rickettsia* 屬立克次體經由 BALB/c 老鼠產生之多株抗體，可對 *R. conorii* 抗原玻片產生螢光反應，其效價分別為 *R. rickettsii* (1:128), *R. australis* (1:64), *R. montanensis* (1:1,024), *R. honei* (1:512), *R. prowazekii* (1:128), *R. massiliae* (1:1,024), *R. conorii* (1:4,096)及 *R. akarii* (1:128)³⁹。此報告顯示 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 抗原玻片易與其他 *Rickettsia* 屬立克次體產生之抗體發生交互作用，故台灣地區港口、都市及野地鼠類可能存在 *R. rickettsii* 或 *R. conorii* 或其他 *Rickettsia* 屬立克次體菌株，其在鼠類產生之抗體可與 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 產生交互作用，應以分子生物技術或菌株分離培養來進一步分析台灣地區 *Rickettsia* 屬立克次體之菌株種類。

Rickettsia 屬之立克次體除可經由鼠類血清抗體監測外，亦可由鼠類外寄生節肢動物發現。在日本於台灣革蜱(*Dermacentor taiwanensis*)及褐黃血蜱 (*Haemaphysalis flava*) 分離出 *R. japonica*，於單刺硬蜱 (*Ixodes monospinosus*)、卵形硬蜱 (*I. ovatus*)及全溝硬蜱 (*I. persulcatus*)分離出 *R. helvetica*，同時亦於龜形花蜱(*Amblyomma testudinarium*)分離出新的斑點熱立克次體菌株 *R. anan*^{40,41}。在韓國亦從長角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)檢測出 *R. japonica* 及 *R. rickettsia*^{42,43}，甚至從恙蟲體內檢測出近似 *R. australis*, *R. akari*, *R. japonica*, *R. conorii* 及 *R. felis* 之立克次體種類⁴⁴。台灣地區依文獻記載有 32 種蜱，包括硬蜱科有 7 屬 29 種，軟蜱科有 2 屬 3 種

⁴⁵，是否有蜱種攜帶 *Rickettsia* 屬立克次體，在鼠類間造成傳播循環甚至叮咬人成為病媒，都是值得探究的。

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

的斑點熱立克次體菌株序列。所有檢測出之 500 株 *Rickettsia* 屬立克次體菌株序列進行親緣關係分析，結果可分成 10 群，其中以近似 *R. conorii* 的菌株最多，佔 37.43%，其次為近似 *Rickettsia* sp. MB74-1 的菌株，佔 22.91%。
R. conorii 為重要的病原株，由於檢體 DNA 含量少，無法進行基因全長定序增幅及確認。

本研究計畫為期 2 年，藉由先前調查資料進行捕鼠採檢，以分離培養 *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. 及 *Rickettsia* spp. 為主要目標，以 16S rRNA, p44/msp2, *gltA* 及 *groESL* 進行 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 特性分析；在 *Rickettsia* spp. 部分則使用 190 kDa surface antigen (*OmpA*)、120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)、citrate synthase (*gltA*)、17 kDa antigen gene (*htrA*)、16S rRNA 及 gene D，透過這幾個基因之全長序列比對可分辨出所有 *Rickettsia* 屬種類，甚至可以區分出新的 *Rickettsia* 菌株 (Fournier *et al.*, 2003)。期望以此分離出更多的本土型菌株納入本局病原體基因資料庫及加入例行的血清學檢驗中以提高人類感染的檢出率。在人群的檢測方面則先建立血液檢體 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 檢驗方法，再進一步檢測恙蟲病及萊姆病等蜱媒通報病例，瞭解是否可能感染 Anaplasmosis。

材料與方法

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

一、樣本採集地點

樣本之採集分為台灣本島及離島，2013 年已採集桃園縣、台中市、雲林縣、台南市及屏東縣等西部縣市檢體，故第一年進行宜蘭縣、花蓮縣及台東縣等東部縣市採集；第二年進行連江縣、金門縣及澎湖縣三離島採集。

二、採集方法及檢體處理

1. 捕鼠及血清採集：選取地點以大片芒草地能捕獲中大型老鼠為主，在選定地點佈鏤空鼠籠(27×16×13 cm) 40 個，Sherman 鼠籠(26.5×10×8.5 cm) 80 個

以地瓜加花生醬為誘餌，下午置放隔日早上收籠。捕獲鼠類後，依體型大小以 0.1~0.4 ml Zoletil 50 進行腹腔注射迷昏，心臟採血後將血液置於室溫 1 小時後，以 3000 rpm，10 分鐘離心，分離血清至預先標示好的冷凍小瓶，冷凍於-20°C 的冰箱。

2. 鼠類器官採集：將鼠體腹面朝上固定後，由表皮層及肌肉層逐層剪開固定，避免體表的污染，取脾臟、肝臟及腎臟約 8 mm³ 組織塊置於內含 70% 酒精之 2 ml 檢體小管中，再取 125 mm³ 組織塊置於 2 ml 檢體小管中，於乾冰保存。準備進行蜱媒立克次體檢測及分離。
3. 將 25 mg 鼠類肝、腎或 10 mg 脾放入 2ml 之圓底 eppendorf tube，加入 200 µl 的 MEM 培養液，再加入 3 mm 鋼珠用 TissueLyser 以每秒 30 下共 2.5 分鐘將組織打散，再加入 500 µl 的 MEM 培養液，離心 10,000 rpm 10 分鐘，取上清液依 OIA amp DNA blood Kit (Qiagen) 萃取 DNA，以 100 µl Buffer AE elute，將 DNA 置於-20°C 冰箱保存。

三、Anaplasma & Ehrlichia PCR 檢測方法

1. Anaplasma & Ehrlichia real time PCR：參考 Parola *et al.*(2000)的方法⁴⁸，使用 Ehrlichia genus-specific primer
EHR 16SD 5'- GGT ACC (C/T) AC AGA AGA AGT CC-3'
EHR 16SR 5'-TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC-3'

SYBR Green real-time PCR 反應流程為：先於 95°C，預熱 15 min；再依序進行 94°C (30 sec)/ 55°C (30 sec)/ 72°C (90 sec) 之循環，一共 45 循環，於 95°C 1 min 後進行 Melting 65°C 30 sec, 0.5°C/ cycle，一共 45 循環。

將陽性 PCR 產物直接進行定序，再以 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 進行 DNA 序列之 BLAST 比對。

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

的方法⁴⁹，基因標的為 p44/msp2

第一次 PCR primer

p3726F: GCTAAGGAGTTAGCTTATGA

p4257R: AGAAGATCATAACAAGCATTG

第二次 PCR primer

p3761F: CTGCTCTKGCCAARACCTC

p4183R: CAATAGTYTTAGCTAGTAACC

PCR 反應流程為：先於 94°C，預熱 3 min；再依序進行 94°C (1 min)/ 55°C (1 min)/ 72°C (2 min) 之循環，一共 40 循環，於 72°C 10 min 中止反應。第二次與第一次相同。

將陽性 PCR 產物直接進行定序，再以 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 進行 DNA 序列之 BLAST 比對。

四、建立人類血液檢體 *Anaplasma phagocytophilum* PCR 檢測方法

1. 將含有 heparin (10U/ml)之血液，以 Ficoll-Paque 分離白血球。
2. 以 Blood & Cell Culture Mini Kit (Qiagen) 萃取 DNA，以 100 µl Buffer AE elute，將 DNA 置於-20°C 冰箱保存。
3. 設計不同 primers 進行 real time PCR。

五、*Rickettsia* 屬之立克次體 nested-PCR 檢測

1. 參考 Choi *et al.*(2005)之方法⁵⁰，並略加修正。偵測 *Rickettsia* 屬之立克次體的標的基因為 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)、citrate synthase (*gltA*)。
2. 增幅 citrate synthase (*gltA*)：第一次 PCR 每一管 0.5 ml 微量離心管依序加入含有 17.5 µl 去離子水、10 µl 之 5X PCR buffer (Promega)、2 µl 之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200 µM)、3 µl 之 25 mM MgCl₂ (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、6 µl 之 3.3 µM primer RpGLTA.877p : 5'-GGGGGCCTGCTCACGGCGG-3' 及 primer RpGLTA.1258n : 5'-AATGCAAAAAGTACAGTGAACA-3' (引子之終濃度為 400 nM)、3 µl 之 DNA 模板及 0.5 µl 酵素 Taq (Promega) (5 U/µl) (終濃度為 2.5 U) 等之 PCR 反應液。PCR 反應流程為：先於 95°C，預熱 5 min；再依序進行 95°C (15 s)/ 54°C (15 s)/ 74°C (30 s) 之循環，一共 35 循環；最後，於 74°C 3 min 中止反應。第二次 PCR 反應液中引子更改為 3 µl 之 3.3

μM primer RpGLTA.896 : 5'-GGCTAATGAAGCAGTGATAA-3' 及 primer RpGLTA.1233n : 5'-GCGACGGTATACCCATAGC-3' (引子終濃度為 200 nM), 其餘反應液如同第一次。PCR 的反應流程中之溫度循環條件與第一次相同, 一共進行 35 循環。

3. 增幅 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*): 第一次 PCR 每一管 0.5 ml 微量離心管依序加入含有 17.5 μl 去離子水、 10 μl 之 5X PCR buffer (Promega)、 2 μl 之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200 μM)、 3 μl 之 25 mM MgCl_2 (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、 6 μl 之 3.3 μM primer rompB OF : 5'-GTAACCGGAAGTAATCGTTTCGTAA-3' 及 primer rompB OR : 5'-GCTTTATAACCAGCTAAACCACC-3' (引子之終濃度為 400 nM)、 3 μl 之 DNA 模板及 0.5 μl 酵素 Taq (Promega) (5 U/ μl) (終濃度為 2.5 U) 等之 PCR 反應液。PCR 反應流程為: 先於 95°C, 預熱 5 min; 再依序進行 95°C (15 s)/ 54°C (15 s)/ 74°C (30 s) 之循環, 一共 35 循環; 最後, 於 74°C 3 min 中止反應。第二次 PCR 反應液中引子更改為 3 μl 之 3.3 μM primer rompB SFG IF : 5'-GTTTAATACGTGCTGCTAACCAA-3', primer rompB SFG/TG IR : 5'-GGTTTGGCCCATATACCATAAG-3' 及 primer rompB TG IF : 5'-AAGATCCTTCTGATGTTGCAACA-3' ((引子終濃度為 200 nM), 其

餘反應液如同第一次。PCR 的反應流程中之溫度循環條件與第一次相同，一共進行 35 循環。

4. 取 10 μ l 第二次 PCR 增幅的產物，於 1.5% agarose gel (Promega, USA) 之 1X TBE buffer (Sigma) 的膠片中進行電泳分析。將 agarose 取出，用溴化乙錠 (ethidium bromide, aMRESCO) 染色，以紫外光照射觀察並照相，並將其二次 PCR 增幅的產物進行 DNA 序列定序，再以 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 進行 DNA 序列之 BLAST 比對。

六、*Rickettsia* 屬之立克次體選殖與定序

1. 界定新菌種的 *Rickettsia* 屬之立克次體需經由下列標的基因全長基因的選殖與定序：190 kDa surface antigen (*OmpA*)、120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)、citrate synthase (*gltA*)、17 kDa antigen gene (*htrA*)、16S rRNA 及 gene D。
2. 標的基因的 PCR 增幅依 Fournier *et al.*(1998)、Roux and Raoult(1995)、Roux and Raoult(2000)、Roux *et al.*(1997)及 Sekeyova *et al.*(2001)報告所述⁵¹⁻⁵⁴。
3. 選殖之準備工作：取出冷藏之添加 kanamycin 之 plate，使回復至室溫並去除水滴。取出放置於-80°C之 competent cell 解凍，放冰塊上備用，並打開 42°C 水浴槽。

(一) TOPO cloning reaction

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

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

1. 取 1.5cc 之 eppendorf，加入約 15 μ l 之 One shot chemically Competent *E.coli* (invitrogen, USA)，再加入 2 μ l 作用後之混合物，以 tip 尖輕攪混合之，插於冰上使其作用約 5-30 分鐘(通常 15 分鐘即可)。
2. 將作用後產物置於 42 $^{\circ}$ C 水浴槽中進行 heat shock，40 秒後馬上取出置於冰上使其急冷約五分鐘，目的在使 plasmid 進入 Competent cell 中。
3. 每管加入 250 μ l 的 S.O.C medium (invitrogen, USA)。
4. 將 eppendorf 倒放固定於架上，置於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱中，以 200 rpm 水平震盪培養一小時，同時將去除水滴之 plate 也放入 37 $^{\circ}$ C 中預熱。
5. 取出混合物，吸取 50-100 μ l 滴於預熱後之 plate 上，加入玻璃珠輕搖，使其均勻塗布於 plate 上。建議每個 sample 可塗布兩個 plate，滴上不同液量如 50、100 μ l，較有機會得到生長良好的 colony。塗布後將玻璃珠倒入 70 % 酒精中回收。

6. plate 置於 37°C 中培養 overnight。

(三)檢查 transformation 結果

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

七、老鼠組織及蟬 *Rickettsia* 屬之立克次體分離培養

(一) L929 細胞繼代培養

1. 以 37°C 水浴 preheat MEM 培養液及 0.25% Trypsin-EDTA。MEM 培養液的組成為(Minimum Essential Medium 1X+ Earle's salts+ L-Glutamine) 外加 4%FBS(Fetal Bovine Serum) 及 1% Antibiotic(Penicillin 10,000units/ml, Streptomycin 10mg/ml, Amphotericin 0.025mg/ml)
2. 原 75T flask 中細胞培養至八分滿以上，倒乾或吸乾 flask 中的培養液。
3. 加入 2~3cc 之 Trypsin-EDTA，緩緩搖晃 flask 使 Trypsin-EDTA 均勻分布，待 Trypsin-EDTA 顏色開始變黃後，吸去 Trypsin-EDTA 至餘 0.2~0.3cc，蓋上瓶蓋置入 37°C 培養箱 2~3 分鐘。

4. 取出 flask，可先以些許 MEM 輕輕沖洗 L929 細胞再吸起，視細胞生長情形及實驗需求決定稀釋比例，以 1:6 為例，取 12cc MEM 由 flask 底部開始沖洗，反覆吸放，可分四至五個區域將整個 flask 沖洗一次，至底部 L929 細胞均勻分布在 MEM 中為止。
5. 取 2cc 細胞懸浮液置入新 75T flask 中，再加入 13cc MEM，蓋上瓶蓋，但將瓶蓋懸開，置入 37°C, 5% CO₂ 培養箱中培養。

(二) Shell vial 細胞培養

1. 以 37°C 水浴 preheat MEM 培養液及 Trypsin-EDTA，shell vial 空瓶先置於架上以 UV 燈殺菌半小時以上。
2. 75T flask 中細胞培養至八分滿以上，倒乾或吸乾 flask 中的培養液。
3. 加入 2~3cc 之 Trypsin-EDTA，緩緩搖晃 flask 使 Trypsin-EDTA 均勻分布，待 Trypsin-EDTA 顏色開始變黃後，吸去 Trypsin-EDTA 至餘 0.2~0.3cc，蓋上瓶蓋置入 37°C 培養箱 2~3 分鐘。
4. 取出 flask，可先以些許 MEM 輕輕沖洗 L929 細胞再吸起，視細胞生長情形及實驗需求決定稀釋比例，一般八成以上細胞可先以約 10cc MEM 由 flask 底部開始沖洗，反覆吸放，分四至五個區域將整個 flask 沖洗一次，至底部 L929 細胞均勻分布在 MEM 中為止。
5. 計數細胞：取 0.1cc 細胞懸浮液加入 0.9cc MEM，吸取 0.5cc，加入 0.5cc

之 Trypan blue，即得稀釋 20 倍之細胞稀釋液，取一滴輕滴在血球計數器上，蓋上蓋玻片後在顯微鏡下進行細胞計數。

6. 培養所需濃度約為每 cc 中含 5×10^8 個細胞，依此比例以 MEM 稀釋。

每個 shell vial 需要 1cc 細胞液。

7. 將細胞液加入 shell vial 中，並略側瓶身輕搖，去除玻片底部氣泡以免玻片傾斜影響細胞的貼附。

8. 蓋上瓶蓋，但瓶蓋懸開，置入 37°C , 5% CO_2 培養箱中培養一日以上。

(三) 老鼠組織及蟬研磨液接種 shell vial

1. 選取相同種類相同生活階段的蟬一或數隻為一個 pool，置於微量離心管中，微量離心管應保持低溫，以免蟬活動。將微量離心管 spin down，加入數滴優碘溶液(10% Povidone Iodine)消毒蟬體表，輕搖微量離心管，使蟬與優碘能均勻接觸。

2. 加入約 1cc PBS(Phosphate Buffer Solution)稀釋優碘，以 spin down 將蟬離心下來，吸取 PBS(注意不可將蟬吸起)，再加入 PBS 清洗，如此反覆數次，至洗過之 PBS 不帶顏色為止。

3. 將蟬或 1 g 老鼠肝、脾、腎組織置入微量離心管，每個微量離心管加入 50~100 μl MEM 培養液，以拋棄式研磨棒均勻研磨，磨碎後加入 MEM 補至 1.5cc。

4. 取前一日培養之 shell vial，每個 shell vial 加入 400 μ l 研磨液進行接種，以剩餘研磨液萃取 DNA 進行 PCR。
5. 將 shell vial 於 32°C，700xg 離心一小時，使立克次體進入 L929 細胞。
6. 丟棄 shell vial 離心後的上清液，加入 1cc MEM 輕搖瓶身，洗去雜質後丟棄上清液，如此清洗三次，最後加入 1cc MEM，旋緊瓶蓋防止污染，置入 32°C 培養箱中進行培養。

八、老鼠組織及蜱 *Anaplasma phagocytophilum* 的分離與鑑定

Anaplasma phagocytophilum 的分離，係將鼠類內臟等 *A. phagocytophilum* PCR 陽性檢體以 HL-60、THP-1 細胞株，培養至少 7 天後分離出立克次體，再以 PCR 方法偵測立克次體核酸分子，當 PCR 為陽性時，可將 PCR 產物進行核酸定序及分析。

結果

一、樣本採集

捕鼠採集：與主持人另一項計畫(台灣蜚媒病毒監測與蜚種基因庫建立 MOHW104-CDC-C-315-000118)共同使用採集檢體。104 年 2 月至宜蘭縣 6 鄉鎮捕鼠，捕獲鼠類 80 隻；104 年 4 月及 7 月至花蓮縣 9 鄉鎮捕鼠，捕獲鼠類 176 隻；104 年 6 月及 10 月至台東縣 7 鄉鎮捕鼠，捕獲鼠類 82 隻，合計 338 隻(表一)。

二、鼠類宿主動物蜚媒立克次體檢測

(一) *Rickettsia* 屬立克次體檢測：103 年桃園縣 60 隻鼠類脾臟 *Rickettsia* *OmpB* 及 *gltA* nested PCR，有 1 隻小黃腹鼠(*Rattus losea*)的 *OmpB* nested PCR 為陽性，定序後 Blast 結果為 *Rickettsia rickettsii* str. Morgan, 381/382(99%)。103 年台中市 43 隻及雲林縣 27 隻鼠類脾臟 *Rickettsia* *OmpB* 及 *gltA* nested PCR，皆陰性。104 年宜蘭縣 80 隻鼠類脾臟 *Rickettsia* *OmpB* 及 *gltA* nested PCR，有 1 隻小黃腹鼠的 *gltA* nested PCR 為陽性，定序後 Blast 結果為 *Rickettsia* sp. TwKM03，299/300(99%)。花蓮縣 176 隻鼠類脾臟 *Rickettsia* *OmpB* 及 *gltA* nested PCR，有 1 隻錢鼠(*Suncus murinus*)的 *OmpB* nested PCR 為陽性，定序

後 Blast 結果為 *Rickettsia rickettsii* str. Morgan, 382/382(100%)。台東縣 82 隻鼠類脾臟 *Rickettsia OmpB* 及 *gltA* nested PCR, 皆陰性(表二)。

(二) Anaplasma & Ehrlichia 檢測: 103 年桃園縣 60 隻鼠類脾臟 Anaplasma & Ehrlichia real time PCR, 有 14 個陽性, 分別為 5 隻鬼鼠, 2 隻田鼯鼠(*Mus caroli*)及 7 隻小黃腹鼠。定序後 Blast 結果有 8 個為 Uncultured *Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%), 6 個為 Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* gene for 16S rRNA, strain:TK4456 306/306(100%)。103 年台中市 43 隻鼠類脾臟 Anaplasma & Ehrlichia real time PCR, 有 13 個陽性, 分別為 1 隻赤背條鼠, 4 隻鬼鼠, 2 隻田鼯鼠, 5 隻小黃腹鼠及 1 隻錢鼠。定序後 Blast 結果有 11 個為 Uncultured *Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%), 而在田鼯鼠檢出 *Ehrlichia* sp. TC251-2 16S ribosomal RNA gene 305/305(100%), 錢鼠檢出 Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* gene for 16S rRNA, strain:TK4456 306/306(100%)。103 年雲林縣 27 隻鼠類脾臟 Anaplasma & Ehrlichia real time PCR, 有 1 個陽性, 為小黃腹鼠。定序後 Blast 結果為 Uncultured *Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%), 104 年宜蘭縣 80 隻鼠類脾臟 Anaplasma & Ehrlichia real time PCR, 皆陰性。花蓮縣 176

隻鼠類脾臟 *Anaplasma* & *Ehrlichia* real time PCR，有 16 個陽性，分別為 9 隻赤背條鼠，3 隻鬼鼠，3 隻小黃腹鼠及 1 隻錢鼠。定序後 Blast 結果，9 隻赤背條鼠皆為 *Uncultured Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%)，鬼鼠皆為 *Anaplasma phagocytophilum* strain rod-D3006 16S ribosomal RNA gene 305/305(100%)，小黃腹鼠及錢鼠皆檢出 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* gene for 16S rRNA, strain:TK4456。台東縣 82 隻鼠類脾臟 *Anaplasma* & *Ehrlichia* real time PCR，有 11 個陽性，分別為 5 隻小黃腹鼠，3 隻錢鼠，2 隻鬼鼠及 1 隻田鼯鼠。定序後 Blast 結果有 4 個 *Anaplasma phagocytophilum* strain rod-D3006 16S ribosomal RNA gene，4 個 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* gene for 16S rRNA, strain:TK4456 306/306(100%)，3 個 *Ehrlichia* sp. 360 gene for 16S rRNA, partial sequence 305/305(100%) (表三)。

就台灣東西部六縣市檢測 468 隻鼠類脾臟 *Anaplasma* & *Ehrlichia*，平均陽性率為 11.75%，以赤背條鼠(*Apodemus agrarius*)陽性率最高 52.63%，其次為鬼鼠(37.83%)及小黃腹鼠(14.89%) (表四)。感染菌株最多為 *Uncultured Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009，佔全部 52.73%，其次為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (27.27%)及 *Anaplasma*

phagocytophilum (14.55%)，5種被檢測出感染的鼠種中，田鼯鼠感染4種菌株最多，鬼鼠、小黃腹鼠及錢鼠各3種，而赤背條鼠只有1種。(表五)。檢測出數量較多的 *Uncultured Anaplasma sp. clone* ZJ05/2009 及 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 普遍分布於台灣東西部，而 *Anaplasma phagocytophilum* 目前僅發現於花東地區(表六)。

三、鼠類宿主動物蜱媒立克次體培養

(一) *Rickettsia*屬立克次體培養：為熟悉細胞培養方法，先以過去培養之 *Rickettsia* 菌株進行練習。10584 F6V, 10584 F4V, C008 NV, 9697, 9543 N3V為過去自不同蜱種研磨後初步培養之後冷凍的菌液。經解凍只有 C008 NV原液有較低的Ct值(30.99)，然而經二次繼代培養，Ct值仍不見降低，顯見並未培養成功(表六)。嘗試第二批菌液解凍，得到相類似情形(表七)，表示培養方法仍待建立。

(二) *Anaplasma* & *Ehrlichia* 培養：*Anaplasma spp.*及 *Ehrlichia spp.*使用 HL-60 進行培養，經由病媒病毒及立克次體實驗室的協助建立培養技術。首先由於 *Anaplasma spp.*及 *Ehrlichia spp.*是血液寄生蟲，寄生於白血球，因此由全血中取得 buffy coat，可得到濃度較高的 *Anaplasma spp.*及 *Ehrlichia spp.*寄生之白血球，將之接種入 HL-60 細胞，較易培養成功。目前有 13 株採得足量全血並分離 buffy coat 接

種 HL-60 細胞，有 10 株初步培養成功先行冷凍保存。這 13 株經 Anaplasma & Ehrlichia real time PCR 檢測，皆為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*。在鼠類脾臟部分，有 4 株直接研磨接種 HL-60 細胞，目前培養情形皆不理想，技術尚有待克服(表八)。

討論

台灣地區經由節肢動物傳播的立克次體病首推恙蟲病，其次為地方性斑疹傷寒，兩者每年皆有數百及數十名確定病例，然而尚有為數眾多的不明熱患者雖經法定傳染病病原檢測，卻仍無法診斷出病原體，這些病例中沒有可能感染 Ehrlichia, Anaplasma 或 Spotted fever Group Rickettsia 等蜱媒疾病，如何增加檢測的敏感度，是本研究想要解決的問題。

在本署 97-99 年研究計畫中，發現取鼠類內臟以 120-135 kDa surface antigen (*ompB*)及 citrate synthase (*gltA*)為基因標的進行 *Rickettsia* 屬立克次體 nested-PCR 檢測，離島、東部、西部鼠類脾肝腎臟中平均偵測出 *Rickettsia* 屬立克次體的比例為 61.1%、70.4%及 49%，而 *Rickettsia* 屬立克次體在採自台灣地區蜱、恙蟎、跳蚤及厲蟎的 nested-PCR 的陽性率分別為 31.9%、37.4%、26.9%及 20.7%。惟當時由鼠類內臟或外寄生蟲所獲得的 *Rickettsia* 屬立克次體 DNA 濃度太低，不足以進行多種基因標的的序列分析，且雖嘗試由蜱研磨培養 *Rickettsia* 屬立克次體，但可能由於蜱體內有許多其他細菌，使細胞培養污染情形嚴重，導致培養結果不理想。為取得大量 *Rickettsia* 屬立克次體，進行多種基因標的的序列分析並研判是否為新菌株，本計畫希冀藉由無菌取得鼠類內臟及全血，以減少細胞培養污染情形。然而經二年台灣東西部捕鼠採集，在 468 隻鼠類中脾臟檢測卻只有 3 隻陽性，陽性率

0.64%，遠低於預期。經檢討檢測方法前後並無改變，將 97-99 年採集保存鼠類內臟檢體仍可檢測出 *Rickettsia* 屬立克次體，為何幾年內環境中 *Rickettsia* 屬立克次體急遽減少原因尚不清楚。

Rickettsia 屬立克次體的培養方法在本署病媒病毒及立克次體實驗室已建立，以 L929 細胞透過 shell vial 技術培養已能例行性將病人檢體恙蟲病立克次體(*Orientia tsutsugamushi*) 培養出，惟 *Rickettsia* 屬立克次體的培養的培養經驗較少。本研究將先經由已知的恙蟲病立克次體及地方性班疹傷寒立克次體(*Rickettsia typhi*)培養起，熟悉培養條件及檢測方法，再進行鼠類內臟檢體 *Rickettsia* 屬立克次體培養。

本署在 100-102 年對台灣環境中的 *Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp.進行調查，發現鼠蟬、狗蟬(血紅扇頭蟬 *Rhipicephalus sanguineus*)及野生動物外寄生蟬 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 19.75%、11.94%及 35.8%。共檢出 18 種 *Anaplasma* spp.& *Ehrlichia* spp.，其中已知有 8 種可能為人畜致病性(*A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. bovis*, *A. marginale*, *A. central*, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensi*)；另在鼠類脾臟及血液中 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 64.13% 及 47.25%。今年在 468 隻鼠類脾臟檢出 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率為 11.75%較 100-102 年檢測結果(64.13%)低，其原因可能是因 100-102 年所選取的鼠隻為有蟬寄生

的鼠類，顯示其所處環境有較多蜱存在，由於 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 在蜱與動物之間循環，使所選取的鼠類有較高感染機會。

在這些檢出的 *Alaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 中人類重要的病原體 *A. phagocytophilum* 在鼠蜱、狗蜱及野生動物外寄生蜱中 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 2.62%、8.36% 及 13.89%；鼠類脾臟及血液 *Anaplasma* & *Ehrlichia* PCR 陽性率分別為 14.13% 及 4.40%。人群檢體的部份，檢驗 100-101 年金門縣恙蟲病通報病例 *A. phagocytophilum* 血清抗體陽性率為 19.7% (57/289)，而對照組血清抗體陽性率 6.38% (3/47)，具有顯著性差異 ($X^2=4.9$, $p=0.0268$)，同時在 87 個配對血清中發現 12 個病例兩次採血 *A. phagocytophilum* 血清抗體效價有四倍上升，顯示金門地區發燒病人確實需要注意是否為 Anaplasmosis。基於過去的研究，確認台灣是否有致病性的 *Alaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 格外重要，也必需藉由細胞培養得到大量菌株得以確認。就目前鼠類脾臟檢測結果，與 100-102 年發現相同，當時發現 58 個菌株中最多的也是 Uncultured *Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 (23 個)、*Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (14 個) 及 *Anaplasma phagocytophilum* (13 個)。

Alaplasma spp. 及 *Ehrlichia* spp. 培養方法最常使用 HL-60 細胞，尤其以 buffy coat 取得濃縮白血球接種 HL-60 細胞成功率較高⁵⁵⁻⁵⁶。本研究自 104

年 4 月捕鼠採集開始增加採集全血，並已成功自 10 隻鼠類全血中初步培養出 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*，惟在鼠類脾臟部分，因組織打碎後雜質頗多，培養方法尚需努力建立。

結論與建議

1. 檢測 103 年採集桃園縣、台中市、雲林縣及 104 年採集宜蘭縣、花蓮縣、台東縣共 468 隻鼠類脾臟 *Rickettsia* 屬立克次體，結果有 3 隻陽性，分別是桃園縣 1 隻小黃腹鼠檢出 *Rickettsia rickettsii* str. Morgan 381/382(99%)，宜蘭縣 1 隻小黃腹鼠檢出 *Rickettsia* sp. TwKM03 299/300(99%)及花蓮縣 1 隻錢鼠檢出 *Rickettsia rickettsii* str. Morgan, 382/382(100%)。
2. 台灣東西部六縣市檢測 468 隻鼠類脾臟 *Anaplasma* & *Ehrlichia*，平均陽性率為 11.75%，以赤背條鼠(*Apodemus agrarius*)陽性率最高 52.63%，其次為鬼鼠(37.83%)及小黃腹鼠(14.89%)。
3. *Anaplasma* spp.及 *Ehrlichia* spp.感染菌株最多為 *Uncultured Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009，佔全部 52.73%，其次為 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (27.27%)及 *Anaplasma phagocytophilum* (14.55%)。
4. 5 種被檢測出感染的鼠種中，田鼯鼠感染 4 種菌株最多，鬼鼠、小黃腹鼠及錢鼠各 3 種，而赤背條鼠只有 1 種。鬼鼠及小黃腹鼠檢出率高，又多是病原株 *Anaplasma phagocytophilum* 及 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 尤須注意。
5. 檢測出數量較多的 *Uncultured Anaplasma* sp. clone ZJ05/2009 及

Candidatus Neoehrlichia mikurensis 普遍分布於台灣東西部，而 *Anaplasma phagocytophilum* 目前僅發現於花東地區。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 經由 100-102 年及 103-104 年二次調查，台灣鼠類體內有可能的病原株 *Anaplasma phagocytophilum* 及 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 存在，應積極確認這些菌株病原的特性，以建立防治策略。

參考文獻

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

15. Massung RF, Owens JH, Ross D, et al. Sequence analysis of the ank gene of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol* 2000;38:2917-22.
16. Inokuma H, Oyamada M, Kelly PJ, et al. Molecular detection of a new Anaplasma species closely related to Anaplasma phagocytophilum in canine blood from South Africa. *J Clin Microbiol* 2005;43:2934-7.
17. Alberti A, Zobba R, Chessa B, et al. Equine and canine Anaplasma phagocytophilum strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:6418-22.
18. Chang AC, Chang WL, Lin CT, Pan MJ, Lee SC. Canine infectious cyclic thrombocytopenia found in Taiwan. *J Vet Med Sci* 1996;58:473-6.
19. 張祖駿. 利用巢式聚合酶連鎖反應調查台北市犬艾利希氏體病 [碩士論文]: 國立台灣大學; 2003.
20. 黃嘉嘉. 以巢式聚合酶連鎖反應偵測犬隻狗型、血小板型艾利希體症及犬心絲蟲感染症 [碩士論文]: 國立嘉義大學; 2003.
21. 陳昱憲. 以巢式聚合酶連鎖反應調查台灣家貓血液寄生蟲之感染疫情 [碩士論文]: 國立中興大學; 2007.
22. Hsieh YC, Lee CC, Tsang CL, Chung YT. Detection and characterization of four novel genotypes of Ehrlichia canis from dogs. *Vet Microbiol* 2010;146:70-5.
23. Suto Y, Suto A, Inokuma H, Obayashi H, Hayashi T. First confirmed canine case of Ehrlichia canis infection in Japan. *Vet Rec* 2001;148:809-11.
24. 翁明輝, 連日清, 蔡惠坪, 林佩如, 郭明德, 劉文燦. 2009 年金門地區鼠類寄生蟬感染查菲艾利希氏體之調查. *疫情報導* 2010;26:134-9.
25. 翁明輝, 蔡惠坪, 林佩如, 陳國卿, 郭明德, 劉文燦. 2012 年金門地區鼠類感染查菲艾利希氏體之調查. *疫情報導* 2014;30:134-41.
26. 潘明正. 牛邊緣無形體症 (Bovine anaplasmosis). In: (編著) 潘劉張, ed. 媒介重要人畜傳染疾病的有害生物—節肢動物篇. 台北市: 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局; 2007:138-9 頁.
27. 林怡孜. 以 PCR 技術調查台灣乳牛焦蟲症及邊蟲症之流行病學 [碩士論文]: 國立中興大學; 2007.
28. Lennette EH, Halonen P, Murphy FA. Laboratory diagnosis of infectious diseases. Principles and Practice Vol. II. . Springer-Verlag New York Inc.; 1988:865-90.
29. Marmion BP. Rickettsial diseases of man and animals. London: Edward Arnold; 1990:674-89.
30. Takada N, Fujita H, Yano Y, Tsuboi Y, Mahara F. First isolation of a rickettsia closely related to Japanese spotted fever pathogen from a tick in Japan. *J Med Entomol* 1994;31:183-5.
31. Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet*

Res 2005;36:469-92.

32. Brouqui P, Parola P, Fournier PE, Raoult D. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;49:2-12.
33. Tsai YS, Wu YH, Kao PT, Lin YC. African tick bite fever. *J Formos Med Assoc* 2008;107:73-6.
34. Tsai KH, Lu HY, Huang JH, et al. African tick bite Fever in a Taiwanese traveler returning from South Africa: molecular and serologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81:735-9.
35. Tsai KH, Lu HY, Tsai JJ, Yu SK, Huang JH, Shu PY. Human case of *Rickettsia felis* infection, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1970-2.
36. Tsai KH, Lu HY, Huang JH, et al. *Rickettsia felis* in cat fleas in Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:561-3.
37. Takada N, Fujita H, Yano Y, Huang WH, Khamboonruang C. Serosurveys of spotted fever and murine typhus in local residents of Taiwan and Thailand compared with Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993;24:354-6.
38. Chen HL, Chen HY, Chung CL, Lin TH, Wang GR, Horng CB. [Primary surveillance of spotted fever group antibodies on rats in the Kinmen area]. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 1997;30:115-21.
39. Fang R, Raoult D. Antigenic classification of *Rickettsia felis* by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:221-8.
40. Ishikura M, Fujita H, Ando S, Matsuura K, Watanabe M. Phylogenetic analysis of spotted fever group *Rickettsiae* isolated from ticks in Japan. *Microbiol Immunol* 2002;46:241-7.
41. Fournier PE, Fujita H, Takada N, Raoult D. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. *J Clin Microbiol* 2002;40:2176-81.
42. Lee JH, Park HS, Jung KD, et al. Identification of the spotted fever group rickettsiae detected from *Haemaphysalis longicornis* in Korea. *Microbiol Immunol* 2003;47:301-4.
43. Kim CM, Yi YH, Yu DH, et al. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:5766-76.
44. Choi YJ, Lee EM, Park JM, et al. Molecular detection of various rickettsiae in mites (*Acari: Trombiculidae*) in Southern Jeolla Province Korea. *Microbiol Immunol* 2007;51:307-12.
45. Robbins RG. THE TICKS (ACARI" IXODIDA: ARGASIDAE, IXODIDAE) OF TAIWAN" A SYNONYMIC CHECKLIST. *PROC ENTOMOL SOC WASH* 2005;107:245-53.
46. Tsai KH, Wang HC, Chen CH, et al. Isolation and Identification of a Novel Spotted Fever Group *Rickettsiae*, Strain IG-1, from *Ixodes granulatus* Ticks Collected on Orchid Island (Lanyu), Taiwan. . *Am J Trop Med Hyg* 2008;79:256-61.

47. Huang CM, Wang HC, Lin YC, et al. The presence of *Borrelia valaisiana*-related genospecies in ticks and a rodent in Taiwan. . *Journal of Microbiology* 2010;48:877-80.
48. Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D. Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94:707-8.
49. Ohashi N, Gaowa, Wuritu, et al. Human granulocytic Anaplasmosis, Japan. *Emerg Infect Dis* 2013;19:289-92.
50. Choi YJ, Jang WJ, Ryu JS, et al. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2005;11:237-44.
51. Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48 Pt 3:839-49.
52. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Res Microbiol* 1995;146:385-96.
53. Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:252-61.
54. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50 Pt 4:1449-55.
55. Zhang, L., Wang, G., Liu, Q. et al Molecular analysis of *Anaplasma phagocytophilum* isolated from patients with febrile diseases of unknown etiology in China. *PLoS One* 2013; 8: e57155.
56. Zhan, L., Cao, W. C., Jiang, J. F. et al. *Anaplasma phagocytophilum* from Rodents and Sheep, China. *Emerg Infect Dis*. 2010. 16: 764-768.

表一、104年宜蘭縣、花蓮縣及台東縣鼠類捕捉結果

宜蘭縣	鼠種	花蓮縣	鼠種	台東縣	鼠種
三星鄉	<i>Bandicota indica</i> 3 <i>Mus caroli</i> 1 <i>Rattus losea</i> 10	鳳林鎮	<i>Apodemus agrarius</i> 15 <i>Bandicota indica</i> 2 <i>Mus musculus</i> 1 <i>Rattus losea</i> 6	關山鎮	<i>Mus caroli</i> 1 <i>Rattus losea</i> 2 <i>Suncus murinus</i> 8
五結鄉	<i>Mus caroli</i> 7 <i>Niviventer coxingi</i> 1 <i>Rattus losea</i> 8	壽豐鄉	<i>Bandicota indica</i> 3 <i>Rattus exulans</i> 4 <i>Rattus losea</i> 2 <i>Suncus murinus</i> 21	太麻里鄉	<i>Rattus losea</i> 2 <i>Suncus murinus</i> 1
壯圍鄉	<i>Bandicota indica</i> 1 <i>Mus caroli</i> 2 <i>Rattus losea</i> 28	吉安鄉	<i>Bandicota indica</i> 3 <i>Mus musculus</i> 1 <i>Rattus exulans</i> 9 <i>Suncus murinus</i> 17	台東市	<i>Mus caroli</i> 4 <i>Rattus losea</i> 1
員山鄉	<i>Bandicota indica</i> 3 <i>Mus caroli</i> 4 <i>Rattus losea</i> 8	花蓮市	<i>Bandicota indica</i> 1 <i>Mus caroli</i> 7 <i>Rattus exulans</i> 2	卑南鄉	<i>Mus caroli</i> 1 <i>Rattus losea</i> 4 <i>Suncus murinus</i> 2
頭城鎮	<i>Mus caroli</i> 2 <i>Rattus losea</i> 1	新城鄉	<i>Bandicota indica</i> 1 <i>Suncus murinus</i> 9	池上鄉	<i>Bandicota indica</i> 1 <i>Mus caroli</i> 2 <i>Rattus losea</i> 2 <i>Suncus murinus</i> 6
礁溪鄉	<i>Rattus losea</i> 1	玉里鎮	<i>Bandicota indica</i> 1 <i>Mus caroli</i> 7 <i>Rattus losea</i> 5 <i>Suncus murinus</i> 3	延平鄉	<i>Bandicota indica</i> 1 <i>Mus caroli</i> 2 <i>Rattus losea</i> 3 <i>Suncus murinus</i> 13
		光復鄉	<i>Bandicota indica</i> 1 <i>Mus caroli</i> 2 <i>Rattus losea</i> 3 <i>Suncus murinus</i> 2	鹿野鄉	<i>Mus caroli</i> 21 <i>Rattus losea</i> 1 <i>Suncus murinus</i> 4
		瑞穗鄉	<i>Bandicota indica</i> 3		

		萬榮鄉	<i>Mus caroli</i> 18 <i>Rattus losea</i> 6 <i>Suncus murinus</i> 10 <i>Bandicota indica</i> 1 <i>Mus caroli</i> 6 <i>Rattus losea</i> 4	
合計	<i>Bandicota indica</i> 7 <i>Mus caroli</i> 16 <i>Niviventer coxingi</i> 1 <i>Rattus losea</i> 56		<i>Apodemus agrarius</i> 15 <i>Bandicota indica</i> 16 <i>Mus caroli</i> 40 <i>Mus musculus</i> 2 <i>Rattus exulans</i> 15 <i>Rattus losea</i> 26 <i>Suncus murinus</i> 62	<i>Bandicota indica</i> 2 <i>Mus caroli</i> 31 <i>Rattus losea</i> 15 <i>Suncus murinus</i> 34

表二、台灣鼠類脾臟 *Rickettsia* 屬立克次體檢測結果

地區	鼠種	數量	OmpB 陽性數	gltA 陽性數	Blast 結果
桃園縣	<i>Bandicota indica</i>	8	0	0	
	<i>Mus caroli</i>	24	0	0	
	<i>Rattus losea</i>	24	1	0	<i>Rickettsia rickettsii</i> str. Morgan, 381/382(99%)
台中市	<i>Suncus murinus</i>	4	0	0	
	<i>Apodemus agrarius</i>	4	0	0	
	<i>Bandicota indica</i>	4	0	0	
	<i>Mus caroli</i>	3	0	0	
	<i>Rattus losea</i>	9	0	0	
雲林縣	<i>Suncus murinus</i>	23	0	0	
	<i>Mus caroli</i>	5	0	0	
	<i>Rattus losea</i>	11	0	0	
宜蘭縣	<i>Suncus murinus</i>	11	0	0	
	<i>Bandicota indica</i>	7	0	0	
	<i>Mus caroli</i>	16	0	0	
	<i>Niviventer coxingi</i>	1	0	0	
花蓮縣	<i>Rattus losea</i>	56	0	1	<i>Rickettsia</i> sp. TwKM03 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene 299/300(99%)
	<i>Apodemus agrarius</i>	15	0	0	
	<i>Bandicota indica</i>	16	0	0	
	<i>Mus caroli</i>	40	0	0	
	<i>Mus musculus</i>	2	0	0	
	<i>Rattus exulans</i>	15	0	0	
	<i>Rattus losea</i>	26	0	0	
台東縣	<i>Suncus murinus</i>	62	1	0	<i>Rickettsia rickettsii</i> str. Morgan, 382/382(100%)
	<i>Bandicota indica</i>	2	0	0	
	<i>Mus caroli</i>	31	0	0	
	<i>Rattus losea</i>	15	0	0	

<i>Suncus murinus</i>	34	0	0
-----------------------	----	---	---

表三、台灣鼠類脾藏 Anaplasma & Ehrlichia 立克次體檢測結果

地區	鼠種	檢測數量	Anaplasma & Ehrlichia 陽性數	Blast 結果
桃園縣	<i>Bandicota indica</i>	8	5	Candidatus Neoehrlichia mikurensis gene for 16S rRNA, strain:TK4456 306/306(100%)(2), Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%)(3)
	<i>Mus caroli</i>	24	2	Candidatus Neoehrlichia mikurensis gene for 16S rRNA, strain:TK4456 306/306(100%), Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%)
	<i>Rattus losea</i>	24	7	Candidatus Neoehrlichia mikurensis gene for 16S rRNA, strain:TK4456 306/306(100%)(3), Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%)(4)
台中市	<i>Suncus murinus</i>	4	0	
	<i>Apodemus agrarius</i>	4	1	Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%)
	<i>Bandicota indica</i>	4	4	Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%)
	<i>Mus caroli</i>	3	2	Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%), Ehrlichia sp. TC251-2 16S ribosomal RNA gene 305/305(100%)
	<i>Rattus losea</i>	9	5	Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%)
	<i>Suncus murinus</i>	23	1	Candidatus Neoehrlichia mikurensis gene for 16S rRNA, strain:TK4456 306/306(100%)
雲林縣	<i>Mus caroli</i>	5	0	
	<i>Rattus losea</i>	11	1	Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%)
宜蘭縣	<i>Suncus murinus</i>	11	0	
	<i>Bandicota indica</i>	7	0	
	<i>Mus caroli</i>	16	0	

	<i>Niviventer coxingi</i>	1	0	
	<i>Rattus losea</i>	56	0	
花蓮縣	<i>Apodemus agrarius</i>	15	9	Uncultured Anaplasma sp. clone ZJ05/2009 16S ribosomal RNA gene 303/305(99%)
	<i>Bandicota indica</i>	16	3	Anaplasma phagocytophilum strain rod-D3006 16S ribosomal RNA gene 305/305(100%)
	<i>Mus caroli</i>	40	0	
	<i>Mus musculus</i>	2	0	
	<i>Rattus exulans</i>	15	0	
	<i>Rattus losea</i>	26	3	Candidatus Neoehrlichia mikurensis gene for 16S rRNA, strain:TK4456 306/306(100%)(2), Candidatus Neoehrlichia mikurensis gene for 16S rRNA, strain:TK4456 306/307(99%)
	<i>Suncus murinus</i>	62	1	Candidatus Neoehrlichia mikurensis gene for 16S rRNA, strain:TK4456 306/306(100%)
台東縣	<i>Bandicota indica</i>	2	2	Candidatus Neoehrlichia mikurensis gene for 16S rRNA, strain:TK4456 306/306(100%)
	<i>Mus caroli</i>	31	1	Anaplasma phagocytophilum strain rod-D3006 16S ribosomal RNA gene 305/305(100%)
	<i>Rattus losea</i>	15	5	Candidatus Neoehrlichia mikurensis gene for 16S rRNA, strain:TK4456 306/306(100%)(2), Anaplasma phagocytophilum strain rod-D3006 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 299/302(99%), Anaplasma phagocytophilum strain rod-D3006 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 303/305(99%), Anaplasma phagocytophilum strain rod-D3006 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 296/300(99%)
	<i>Suncus murinus</i>	34	3	Ehrlichia sp. 360 gene for 16S rRNA, partial sequence 305/305(100%)(2), Anaplasma phagocytophilum strain rod-D3006 16S ribosomal RNA gene 305/305(100%)

表四、台灣鼠類脾藏 Anaplasma & Ehrlichia 立克次體檢測陽性率

鼠種	檢測數	陽性數	陽性率(%)
<i>Apodemus agrarius</i>	19	10	52.63
<i>Bandicota indica</i>	37	14	37.83
<i>Mus caroli</i>	119	5	4.20
<i>Mus musculus</i>	2	0	0
<i>Niviventer coxingi</i>	1	0	0
<i>Rattus exulans</i>	15	0	0
<i>Rattus losea</i>	141	21	14.89
<i>Suncus murinus</i>	134	5	3.73
合計	468	55	11.75

表五、台灣鼠類脾臟感染 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 種類及比率

	<i>Apodemus agrarius</i>	<i>Bandicota indica</i>	<i>Mus caroli</i>	<i>Rattus losea</i>	<i>Suncus murinus</i>	合計	%
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	0	3	1	3	1	8	14.55
<i>Anaplasma</i> sp. ZJ05/2009	10	7	2	10	0	29	52.73
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	0	4	1	8	2	15	27.27
<i>Ehrlichia</i> sp. 360	0	0	0	0	2	2	3.64
<i>Ehrlichia</i> sp. Tc251-2	0	0	1	0	0	1	1.82
合計	10	14	5	21	5	55	

表六、台灣 6 縣市鼠類脾臟感染 *Anaplasma* spp. 及 *Ehrlichia* spp. 種類及數量

	桃園縣	台中市	雲林縣	宜蘭縣	花蓮縣	台東縣	合計
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	0	0	0	0	3	5	8
<i>Anaplasma</i> sp. ZJ05/2009	8	11	1	0	9	0	29
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	6	1	0	0	4	4	15
<i>Ehrlichia</i> sp. 360	0	0	0	0	0	2	2
<i>Ehrlichia</i> sp. Tc251-2	0	1	0	0	0	0	1
合計	14	13	1	0	16	11	55

表七、第一批 *Rickettsia* 屬立克次體細胞培養結果

編號	來源	sequence close to	原液 Ct 值	第 12 天 Ct 值	繼代第一次培養到第 12 天 Ct 值	繼代第二次培養到第 19 天 Ct 值
10584 F6V	台中市 <i>A. geoemydae</i>	<i>R. sibirica</i>	No Ct.	No Ct.	No Ct.	No Ct.
C008 NV	金門縣 <i>R. haemaphysaloides</i>	<i>Rickettsia sp.</i> TwKM01	30.99	35.22	35.46	36.38
9697	台中市 <i>H. bandicota</i>	<i>Rickettsia marmionii</i>	36.13	No Ct.	No Ct.	No Ct.
9543 N3V	桃園縣 <i>R. haemaphysaloides</i>	<i>Rickettsia sp.</i> TwKM01	34.88	37.33	No Ct.	No Ct.

表八、第二批 *Rickettsia* 屬立克次體細胞培養結果

編號	來源	sequence close to	原液 Ct 值	第 12 天 Ct 值
10584 F4V	台中市 <i>A. geoemydae</i>	<i>R. sibirica</i>	No Ct.	No Ct.
C008 NV	金門縣 <i>R. haemaphysaloides</i>	<i>Rickettsia sp.</i> TwKM01	30.37	37.74
9697	台中市 <i>H. bandicota</i>	<i>Rickettsia marmionii</i>	36.72	No Ct.
9543 N3V	桃園縣 <i>R. haemaphysaloides</i>	<i>Rickettsia sp.</i> TwKM01	35.97	No Ct.

表九、老鼠脾臟及全血 Anaplasma & Ehrlichia 立克次體檢測及培養整理

老鼠 編號	鼠種	spleen / Ana & Ehr 16S	buffy coat / Ana & Ehr 16S	buffy coat 種到 HL-60 培 養	buffy coat 種到 HL-60 培養後 凍起來	冷凍 spleen 種到 HL-60 培 養
10136	<i>R. losea</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	凍細胞	
10223	<i>B. indica</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	凍細胞	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>
10239	<i>R. losea</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	凍細胞	無 Ct 值
10240	<i>R. losea</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	凍細胞	
10255	<i>R. losea</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	凍細胞	
10258	<i>R. losea</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	凍細胞	
10265	<i>B. indica</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	凍細胞	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>
10291	<i>R. losea</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	凍細胞	
10302	<i>R. losea</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	凍細胞	
10303	<i>B. indica</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	凍細胞	<i>A. phagocytophilum</i>
10339	<i>B. indica</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>			
10340	<i>R. losea</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>		
10391	<i>B. indica</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>C. Neoehrlichia mikurensis</i>			

C. Neoehrlichia mikurensis : Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*

A. phagocytophilum : *Anaplasma phagocytophilum*