

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-113112

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫

監測五種新興人畜共通傳染病原體(Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, Spotted fever group rickettsiae, *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia spp.*, *O. tsutsugamushi*)基因序列及抗原特異性變化之分析研究

年度研究報告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：舒佩芸

協同主持人：楊素鈴

研究人員：楊正芬、陳湘妃、張梅君

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

目錄

	頁碼
封面	
中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
本文	
(1) 前言	(5-9)
(2) 材料與方法	(10-13)
(3) 結果	(14-15)
(4) 討論	(16)
(5) 結論與建議	(17)
(6) 計畫重要研究成果及具體建議	(18)
(7) 參考文獻	(19-22)
(8) 表次	(23-24)
(9) 圖次	(25-31)

共 (31) 頁

中文摘要

發熱伴血小板減少綜合症(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) 是藉由感染新型布尼亞病毒(SFTSV)的蜱蟲叮咬而致病。發熱伴血小板減少綜合症是一種新興傳染病，最早在 2009 年中國大陸的河北與河南省被報導，近年在韓國與日本也陸續發現 SFTS 及死亡病例。台灣目前雖未發現本土病例，但因與中國大陸、日本及南韓往來密切，因此監測 SFTS 的境外移入及調查本土是否存在病毒，對防疫有很大的幫助。斑點熱(spotted fever) 是斑點熱立克次體(spotted fever group rickettsiae; SFGR)感染所引起的疾病。SFGR 可感染許多種類的節肢動物，再經由節肢動物叮咬傳至人或哺乳動物。全球每年都有斑點熱病例發生。台灣在 2005 年首次發現人的斑點熱病例。無形體病(human granulocytic anaplasmosis; HGA)是由嗜吞噬球無形體 (Anaplasma phagocytophilum) 感染引起的疾病，人類單核球艾利希氏體症 (human monocytic ehrlichiosis; HME)是由查非艾利希氏體 (Ehrlichia chaffeensis) 感染引起的疾病。兩種疾病均是由蜱蟲媒介的傳染病。目前台灣雖無 HGA 及 HME 病例報導，但由研究發現台灣蜱蟲帶有 A. phagocytophilum 及 E. chaffeensis。故有必要加強人的病例監測。恙蟲病為 Orientia tsutsugamushi 感染引起的疾病，由恙蟲幼蟲傳播。恙蟲病為台灣最主要的立克次體疾病，每年約有 300-500 個確定病例。2017 年 1 月至 10 月監測結果共檢驗出 372 個恙蟲病陽性病例及 6 個 HGA 疑似病例，未發現 SFTS，spotted fever 及 HME 病例。分離出 23 株恙蟲病立克次體，屬於 TW-1, TW-10, TW-19, TW-22,及 TW-26 sequence types，與泰國株最相似。

關鍵詞：發熱伴血小板減少綜合症、斑點熱、無形體病、人類單核球艾利希氏體症、恙蟲病

英文摘要

Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is an emerging infectious disease. SFTS caused by the bite of ticks infected with SFTSV (a new bunyavirus). SFTS was initially reported in Henan and Hebei in mainland China in 2009. Subsequently, SFTS cases were reported by South Korea and Japan. Taiwan is located near mainland China, Japan and South Korea, surveillance and molecular characterization of SFTSV are crucial for disease prevention and control. Spotted fever group rickettsiae (SFGR) are zoonotic pathogens which cause spotted fever in human and animals. Spotted fever disease is found throughout the world. We previously reported a patient infected with *R. felis* in 2005. In addition, several *Rickettsia* spp. have been found in small mammals in Taiwan. Human granulocytic anaplasmosis (HGA) and Human monocytic ehrlichiosis (HME) are tick-borne diseases caused by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*, respectively. Although no human cases have been reported in Taiwan, these pathogens have been found in several tick species and small mammals in Taiwan. Scrub typhus is caused by *Orientia tsutsugamushi* transmitted by mite bites. Scrub typhus has been a notifiable disease in Taiwan since 1955, and is the most important rickettsial disease in Taiwan with approximately 300-500 confirmed cases each year. During Jan-Oct in 2017, a total of 372 confirmed scrub typhus cases and 6 suspected HGA were identified. No SFTS, spotted fever and HME cases were found during the study period. A total of 23 *O. tsutsugamushi* strains were isolated. Sequence analysis of TSA gene revealed these strains belonged to TW-1, TW-10, TW-19, TW-22 and TW-26 sequence types and are closely related to Thailand strains.

Key words: Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, Spotted fever group rickettsiae, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp., *Orientia tsutsugamushi*

前言

一、發熱伴血小板減少綜合症(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS):

發熱伴血小板減少綜合症(SFTS)是被 severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV)感染的蜱蟲所叮咬而引起一種新興傳染病，SFTS 最早在 2009 年中國大陸河北與河南省被報導，2010 年中國大陸 CDC 對 6 個省份進行 SFTSV 監測，共發現了 12 株不同 SFTSV strains，後續中國大陸從南到北的 16 個省份也陸續監測到 SFTSV 的蹤跡(1-6)。由於 SFTSV 的臨床症狀為發熱和腸道不適症，並伴有血小板和白血球減少，故於 2010 年將此疾病命名為 SFTS。近年在韓國與日本也陸續發現 SFTS(7-12)。動物血清流行病學調查發現，病例居住地附近的牛、羊、狗、豬、雞皆可測到 SFTSV 抗體，顯示這些動物都可被 SFTSV 感染(13-14)。故一般認為蜱與這些動物都可能是 SFTSV 的宿主，另外人與人之間也可能藉由血液或體液接觸而感染。SFTS 早期的臨床症狀包括發熱和腸道不適症，並伴有血小板和白血球減少，晚期會發展成漸進式的多重器官衰竭至死，死亡率達 12-30%，其中以中老年人居多。值得注意的是，近年在日本及南韓陸續發現 SFTS 病患及死亡病例，其中在日本個案的死亡率高達 55%，已明顯高於中國大陸。依據近年文獻報導，SFTSV 病原體能在感染蜱內及動物宿主進行基因變異重組，重新 reassortment 進行快速演化。目前尚無有效藥物治療及疫苗可以預防 SFTS。台灣鄰近國家包括中、日、韓陸續發現 SFTSV，台灣與這些國家往來十分密切，因此監測 SFTSV 的基因序列與抗原性變異，對流行病學與防疫扮演重要的角色。本計畫將對機場發燒篩檢、醫師通報或不明發燒病患的血液檢體進行 SFTSV 檢測，陽性病例將作基因定序及分析。

二、斑點熱 (Spotted fever)

斑點熱是斑點熱立克次體(spotted fever group rickettsiae; SFGR)感染引起的疾病。SFGR 為革蘭氏陰性、絕對細胞內寄生的立克次體。當人類受到寄生在齧齒類及狗貓牛羊等動物身上的蜱、跳蚤、蝨子等節肢動物叮咬後，如果節肢動物帶有致病性的立克次體，就會因此被感染。斑點熱的潛伏期約 1-2 周，通常為 12 天，臨床症狀為頭痛、發燒、腹痛、出疹、肌肉痠痛等。目前主要的病例分佈在地中海周圍國家、印度、中東、非洲、歐洲、美洲及東亞等地。引起人類斑點熱之立克次體有十幾種，包括 *R. conorii* 引起 Boutonneus fever 及 Marseilles fever; *R. sibirica* 引起 North Asian tick typhus; *R. australis* 引起 Queensland tick typhus; *R. japonica* 引起 Japanese spotted fever; *R. rickettsia* 引起 Rocky Mountain spotted fever 等。

最早發現的斑點熱是美國的洛磯山斑疹熱 (Rocky mountain spotted fever)，隨後陸續有地中海斑點熱 (Mediterranean spotted fever)、北亞蜱媒介斑疹傷寒 (North Asian tick typhus)、日本紅斑熱等 (Japanese spotted fever)。目前全世界已知斑點熱立克次體疾病大都由蜱所媒介(15)。台灣曾在 2008 年發現人血清有斑點熱抗體的文獻報導，但對斑點熱立克次體感染情形與流行病學仍有待監測與研究(16-18)。

本計畫將對醫師通報或不明發燒病患的血液進行檢測是否具有 Spotted fever Rickettsiae 感染，進一步進行 Spotted fever Rickettsiae 的培養與建立完整基因庫資料。分析不同流行期間、地點及型別之 SFGR，對主要抗原 outer membrane protein A (ompA), and outer membrane protein B (ompB) 及 highly conserved housekeeping gene 16S rRNA, citrate synthase, 17-kD lipoprotein 進行基因定序分析及親緣性分析。並研究這些基因的變異性是否與病原體毒力相關，並進行防疫措施，這對立克次體傳染病之防治工作極為重要。

三、人類無形體病(human granulocytic anaplasmosis, 簡稱 HGA)

嗜吞噬細胞無形體 (*Anaplasma phagocytophilum*) 是一種絕對細胞內寄生的立克次體，人受感染嗜吞噬細胞無形體的蜱所叮咬會引起人類無形體病(HGA)。*A. phagocytophilum* 不只會感染人，也會感染家畜(馬、狗、牛、羊等)，是一種人畜共通傳染病，後續也發現 HGA 也能經由病人的血液或呼吸懸浮液造成院內感染。美國在 1994 年最早報告 HGA 病例，其後陸續在歐洲及亞洲(China, Japan and South Korea)也發現病例。Li H, Zhou Y 等人曾於 2011 年發表研究指出 HGA 在大陸河北與湖南省的致死率高達 26.5%。*A. phagocytophilum* 感染所引起的臨床症狀與一般細菌或病毒感染的症狀極為類似，會出現發燒、頭痛、肌肉痛、冷顫、腹痛、咳嗽、皮膚紅疹、白血球減少症 (Leukopenia) 或血小板減少症 thrombocytopenia 等。其他疾病如 leptospirosis, murine typhus, dengue fever 也會引起相類似的症狀，難於區別(19-26)。因此常因誤診而延誤了正確治療時機，導致患者死亡。

本計畫將對醫師通報或不明發燒病患的血液檢體進行檢測是否被 *Anaplasmae* 感染，陽性檢體進一步進行 *Anaplasma* 培養與建立基因庫，分析不同流行期間、地點及型別之 *Anaplasma* 病原體，培養分離病原體，對主要抗原 msp2 及 highly conserved housekeeping gene 16S rRNA 進行基因定序及親緣性分析，並研究這些基因的變異性是否與病原體毒力相關，並進行防疫措施。

四、人類單核球艾利希氏體症(human monocytic ehrlichiosis; 簡稱 HME)

艾利希氏體 (*Ehrlichia spp.*) 是一種絕對細胞內寄生的立克次體，不僅會感染人也會感染家畜(狗、牛、羊等)，是一種人畜共通傳染病。最早在 1986 年發現查非艾利希氏體 (*Ehrlichia chaffeensis*) 可引起 HME，主要

是由被感染的蜱所叮咬而致病。*Ehrlichia spp.*可感染單核球(monocyte)、多形核白血球(polymorphonuclear granulocyte; PMN)、紅血球及血小板等。大部份受感染的人無症狀或症狀輕微，主要症狀是發燒、頭痛、肌肉關節疼痛、腸胃道不適、肝脾腫大、淋巴結腫大、偶有出現皮膚斑疹。少數會發展成呼吸衰竭、腎衰竭、中樞神經症狀(27)。

艾利希體症在台灣的感染情形目前尚無流行病學調查與相關研究。本計畫將對醫師通報或不明發燒病患的血液進行檢測是否具有 Ehrlichia，陽性檢體進一步培養病原體並建立完整基因庫資料。分析不同流行期間、地點及型別之 Ehrlichia 病原體，培養分離病原體，對 highly conserved housekeeping gene 16S rRNA, heat shock protein, major outer membrane gene (omp-1) 作基因定序分析及親緣性分析，並研究這些基因的變異性是否與病原體毒力相關，並進行防疫措施，這對傳染病之防治工作是極為重要。

五、恙蟲病

恙蟲病(又稱叢林型斑疹傷寒)，為患者遭帶有病原 *Orientia tsutsugamushi* 之恙蟲幼蟲叮咬，所引起的急性傳染性疾病。恙蟲病的潛伏期約 1-2 週，通常為 9-12 天，特徵為在螫口處形成特有的無痛性洞穿式潰瘍性焦痂(eschar)，主要臨床症狀包括發熱、頭痛、肌肉酸痛、紅疹與淋巴結病變等症狀。恙蟲病之地理分佈，北由日本北部與俄羅斯東部，南至澳洲北部與西太平洋群島，西至巴基斯坦與阿富汗，均有病例發生(28, 29)。台灣在 1955 年將此病列為通報傳染病，現歸類為第四類傳染病。台灣地區的恙蟲病近年來每年約有 300-500 個確定病例(在韓國 2001~2005 年已累計 17450 確定病例; 在日本自 1999 年後每年約有 313-791 個確定病例)，在台灣各縣市均有病例報告，主要是在金門縣、台東縣、花蓮縣、高雄縣市及南投縣，發生月份以每年 5 月至 10 月較多，感染的年齡層多為 20

~29 歲。

Orientia tsutsugamushi 依據膜蛋白質 TSA56 抗原特異性，目前可歸類為 20 多種不同的血清型別，其中 prototype Karp, Kato, 及 Gilliam 為 highly virulence strains，韓國主要流型菌株為 Boryong 屬於 lower virulence strain. TSA56 為恙蟲病立克次體最主要的膜蛋白質，也是最主要為人類免疫系統所辨識的病原體蛋白，TSA56 可做為血清學診斷的主要標的抗原 (30-34)。本計畫將分析不同流行期間、地點及型別之 *Orientia tsutsugamushi* 病原體，培養分離病原體，基因定序及演化分析，除了比較 TSA56 基因序列與抗原性差異外，我們也同時對 heat shock gene(GroEL) 或 16S ribosomal RNA (rRNA) 基因定序及親緣性分析，並研究這些基因的變異性是否與病原體毒力相關，並對研究結果進行防疫措施，這對恙蟲病傳染病之防治工作是極為重要。

材料與方法

主要的實施方法及進行步驟

- 一、檢體及細菌株：血液檢體來源為通報自疾病管制署之新興人畜共通傳染病原體 (SFTSV, SFGR, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *O.tsutsugamushi*) 傳染病之疑似病例血液。全部檢體 (含 Heparin 或 EDTA 之全血 5~10c.c. 及血清 3c.c.) 皆由各地區衛生所或醫院之醫護人員使用無菌空針採取血樣，並分別注入符合標準之特製無菌真空採血管內，以保持低溫之國內快捷郵件寄送或由專人親送方式送達實驗室。而實驗室於收到檢體後立即置於 4°C 冰箱內靜置保存，隨後進行後續之檢驗分析事項。病人血清及血液檢體包括急性期(症狀出現後 0-7 天)、早恢復期(症狀出現後 8-13 天)、晚恢復期(症狀出現後 14-30 天)之檢體。病人檢體收集後，將進行病原分離、血清學及分子生物學之實驗室診斷，以確認感染源。不同期血清，將用以分析病人對各種抗原之抗體反應，如抗體之效價、種類、特異性及動力學變化，建立免疫保護力及免疫病理機轉之相關性。經實驗室確診為陽性反應之檢體將加以分裝，儲存於 -80 °C 冷凍櫃長久保存。
- 二、建立最適化培養新興人畜共通傳染病原體(SFTSV, SFGR, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *O.tsutsugamushi*)技術:陽性檢體以 Vero, L929 或 HL-60 細胞株培養 7-28 天後分離出細菌或病毒，將依據 SuparatGiengkam 等人在 2015 年 PLOS Neglected Tropical Diseases 期刊文獻報導對所添加 FBS serum 濃度、抗生素濃度、細胞生長 confluence、儲存培養液與病原體純化技術調至最適化條件，以建立最優化的新興人畜共通傳染病原體(SFTSV, spotted fever group rickettsia, *Anaplasma* spp, *Ehrlichia* spp, *O.tsutsugamushi*)培養技術。
- 三、血液標本及細胞培養製備新興人畜共通傳染病原體(SFTS,SFGR,

Anaplasma spp., Ehrlichia spp., *O.tsutsugamushi*) 核酸：RNA 以 QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN) 抽取病毒 RNA，主要原理為利用裝有矽土-膠膜的離心圓柱，可以選擇性的與核酸結合，再經過數次清洗步驟，進而達到純化的目的。取 140 μ L 的病人血清，根據製造商的說明使用 QIAamp viral RNA mini kit (cat. no. 52,906, Qiagen, Hilden, Germany) 萃取病毒 RNA，最後將 RNA 溶於 70 μ L 純水(Water, containing 0.02% sodium azide)。DNA 以 ROCHE High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat. No. 11 796 828 001) 萃取病人檢體全血或細胞培養之 SFGR, Anaplasma spp., Ehrlichia spp., *O.tsutsugamushi* 核酸。首先取加抗凝血劑之全血 200 μ L，與 200 μ L 之 Binding Buffer 均勻混合後，再加入 40 μ L Proteinase K，以震盪器混合均勻，置於 70°C 水浴槽加熱 10 分鐘。再加入 isopropanol 100 μ L 均勻混合後，加到 High Pure Filter Tube 以 8,000 x g 離心 1 分鐘。置換 High Pure Filter Tube 至新的 Collection Tube 後，加入 500 μ L 之 Inhibitor Removal Buffer，以 8,000 x g 離心 1 分鐘。再置換 High Pure Filter Tube 至新的 Collection Tube 後，加入 500 μ L 之 Wash Buffer，以 8,000 x g 離心 1 分鐘，重複此步驟再 wash 一次。置換 High Pure Filter Tube 至新的 Collection Tube 後，以 13,000 x g 離心 1 分鐘，將 High Pure Filter Tube 上殘留的廢液甩乾淨。最後將 High Pure Filter Tube 放至新的 eppendorf，加入 50 μ L 預熱 70°C 的 Elution Buffer，靜置 10 分鐘，以 8,000 x g 離心 1 分鐘，eppendorf 中的液體即為欲萃取之 DNA。

四、引子(Primer)的設計與合成與聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)：引子的設計可依不同的需要而定，其功能是在有效地擴增模版 RNA 或 DNA 序列，引子(Primer)的設計與合成將依不同抗原選定進行 PCR。以新興人畜共通傳染病原體(SFTSV, SFGR,

Anaplasma spp, Ehrlichia spp, O.tsutsugamushi)核酸為 template，設計不同的 primers 加入反應試劑內，進行 PCR 反應。利用 One-step SYBR Green I-based real-time RT-PCR 篩檢 SFTS 病人，詳細的檢驗方法如下：(1)使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 μ L 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，0.5 μ L QuantiTect RT Mix，最後加入 10 μ L 檢體 RNA，反應最終體積為 50 μ L。再進行 SYBR Green one-step RT-PCR 反應：50°C RT 作用 30 分鐘，PCR 作用 95°C 15 分鐘，45 次循環之 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 20 秒、77°C 30 秒。以 real-time PCR 篩檢 SFGR, Anaplasmaspp, Ehrlichiaspp, O.tsutsugamushi 取 5 μ LRNA 或 DNA 加入含有 2X buffer Mix(50mM KCl、10mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、dNTP mixture 1mM)、5 units Taq polymerase 共 50 μ L，於 94°C 變性(denature)10 分鐘後，以 94°C：30 秒、60°C：30 秒、72°C：1 分鐘，進行 30 次反應(上述反應依不同 primer 特性而有不同的溫度及反應設定)，最後在 72°C 作用 10 分鐘。經 PCR 增幅放大之產物片段，須以 DNA 電泳確認產物大小。以 DNA sequencing 確認基因正確。

五、新興人畜共通傳染病原體(SFTSV, SFGR, Anaplasma spp, Ehrlichia spp, O.tsutsugamushi)的分離與鑑定：RT-PCR 或 PCR 陽性檢體將進一步進行病毒或細菌分離與基因定序。病毒或細菌的分離與鑑定，係將病人血清或全血以 Vero, L929 及 HL-60 等細胞株培養 7-28 天，再以細菌或病毒專一性單株抗體 specific mAb 等做免疫螢光染色，或 Real-time RT-PCR 或 PCR 鑑定分離之病原體型別。由於從病患檢體分離 SFTSV, SFGR, Anaplasma spp, Ehrlichia spp, O.tsutsugamushi 非常困難，為避免細菌或病毒株產生變異，分離出後立刻於 T-25 培養瓶擴

大培養後即分裝、冷凍於液態氮中。

六、新興人畜共通傳染病原體(SFTSV, spotted fever group rickettsia, Anaplasma spp, Ehrlichia spp, O.tsutsugamushi)核酸定序：對於分離的細菌與病毒株，抽取核酸，進行特定基因定序及親緣性分析，可利用MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net/>) 分析方法及工具進行。

結果

1. SFTSV 之監測:2017 年 1/1-10/31，來自機場發燒篩檢及確定病例擴大疫調採檢等主動監測檢體共 3,097 件及醫師通報檢體共 520 件，以 real-time RT-PCR 篩檢 SFTSV，未發現陽性病例。Fig. 1A 所示為利用 SFTSV 引子與 SFTSV RNA 所得之標準曲線，靈敏度可達 2.3×10^{-3} TCID₅₀。Fig. 1B 所示為病媒病毒例行性分子檢驗之篩檢策略。引子 SFTSV 引子與 DENV1-4 group-specific 引子可混合一起，用於 SYBR Green 1-based multiplex real-time RT-PCR。
2. *Orientia tsutsugamushi* 之監測: 2017 年 1/1~10/31，共檢驗出 369 例恙蟲病確定病例，6-7 月病例數最多，主要分布於花蓮縣、台東縣、澎湖縣與高雄市(Fig 2A)。以 real-time PCR 方法，共檢驗 2,058 個檢體，其中有 189 例為 PCR 陽性，占有確定病例的 51.2% (189/369) (Fig. 2B)。目前分離出 23 株立克次體菌株。Type-specific antigen (TSA)gene 序列分析結果顯示台灣菌株之 TSA gene 序列變異大，可區分為 30 種 sequence types (TW-1~TW-30)，台灣株的序列與泰國、中國、韓國及日本等國家相似，但也有 TSA 序列為台灣所特有，如 TW-12 與 TW-22 (Table 1)。2017 年的 23 個 *O. tsutsugamushi* 分離株分屬於 5 類 sequence types (Fig. 3)，包括 TW-1 有 12 株，來自台東縣、花蓮縣、金門縣、連江縣、高雄市及台北市；TW-10 有 3 株，來自台東縣、花蓮縣及台北市；TW-19 有 2 株，來自花蓮縣及金門縣；TW-22 有 5 株，來自台東縣、金門縣、屏東縣及高雄市；TW-26 有 1 株，來自花蓮縣。演化親緣性分析顯示，TW-1、TW-10、TW-19、TW-22 及 TW-26 均與泰國株最相似。
3. Spotted fever group Rickettsia (SFGR)之監測: 2017 年 1/1~10/31，以 real-time PCR 方法，共檢測 863 件通報立克次體傳染病全血檢體，未發現陽性病例 (Fig. 4)。

4. *Anaplasma* spp.之監測: 本研究建立 *Anaplasma* spp. 之 real-time PCR 檢測方法。Fig. 5A 為使用 *Anaplasma*-specific primers msp2 903f-1024r 測試結果，Cq=36 時，靈敏度為 1.14 copies/reaction。Fig. 5B 為使用 *Anaplasma*-specific primers msp2 F1-R1 測試結果，Cq=36 時，靈敏度為 28.23 copies/reaction。2017 年 1/1~11/7 共檢測 853 件通報立克次體傳染病全血及 PBMC 檢體，發現 6 個疑似 Anaplasmosis 病例 (Table 2)。PCR 產物定序結果為 *A. phagocytophilum* (Fig. 6)。六個病例居住於不同地區，包括台北市、新北市、屏東縣、苗栗縣、澎湖縣及連江縣。
5. *Ehrlichia* spp.之監測: 建立 *Ehrlichia* real-time PCR 檢測系統，Fig. 7 為使用 *Ehrlichia*-specific primers HE1-HE3 測試結果，Cq=36 時，靈敏度為 22.66 copies/reaction。2017 年 1/1~6/7 共檢測 853 件通報立克次體傳染病全血及 PBMC 檢體，未發現陽性病例。

討論

2017年1-10月，以 real-time RT-PCR 方法，共檢測 3,617 支機場發燒篩檢及醫師通報疑似病媒病毒傳染病檢體，均未發現 SFTS 病例，顯示 SFTS 在台灣傳播的風險仍低。恙蟲病為台灣地方性疾病，近幾年來，每年病例數皆超過 400 例，有逐漸增加的趨勢。由基因序列及演化親緣分析顯示，台灣恙蟲病立克次體具有多種基因型別，病人感染其中一種基因型別後，可能只對該型別具有免疫力，若再感染其他型別時，可能無免疫力，會再次感染發病。故恙蟲病有多次感染的可能，也因此，恙蟲病疫苗的開發較為困難，至今仍無有效的疫苗。故有效的預防疾病的發生極為重要，一旦受感染，早期診斷及治療對病患的健康也極為重要。本研究以 real-time qPCR 共檢測 2,058 支檢體，測得 189 支 PCR 陽性檢體，在所有 369 個確定病例中，PCR 陽性占 51.2%，為一良好的篩檢方法。分離出 23 株恙蟲病立克次體，屬於 TW-1, TW-10, TW-19, TW-22, 及 TW-26 五種 sequence types，與泰國株最相似。

本研究亦建立 *Anaplasma* spp. 與 *Ehrlichia* spp. real-time qPCR 方法，靈敏度高，可偵測 1-30 copies/reaction。檢測 853 支檢體中，發現 6 例疑似 anaplasmosis 陽性病例，這是台灣首次發現人的 anaplasmosis 病例。Real-time PCR 共檢測 853 支檢體，未發現 Ehrlichiosis 病例。Real-time PCR 共檢測 1,200 支檢體，未發現 SFGR 病例。

結論與建議

由於國際間交通便捷及氣候變遷等因素，各種新興及再浮現病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，對人類健康所造成的威脅日益嚴重，實施完整的病媒性傳染病監測及防治是十分重要的。實驗室應時時精進傳染病的檢驗方法，包括發展新的檢測方法，提升檢驗的靈敏度與專一性，開發新的病原體檢測項目，並建立對未知病原體快速偵測的能力。此外，也需建立病原體基因資料庫，應用於演化親緣性分析，以瞭解本土流行病原體之來源、擴散及分布情形，及新的病原體之引進情形，可以對流行疫情的現況與防治工作提供重要的資訊與對策。未來仍應加強機場發燒篩檢，減少病原體的境外移入，監測國內的病原體，以及早發現指標病例及病原體來源，實施及時的防疫措施。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

2017年1-10月，監測機場發燒篩檢及醫師通報疑似病媒病毒傳染病檢體，均未發現SFTS病例，顯示SFTS在台灣傳播的風險仍低。恙蟲病為台灣地方性疾病，近幾年來，每年病例數皆超過400例，有逐漸增加的趨勢。由基因序列及演化親緣分析顯示，台灣恙蟲病立克次體具有多種基因型別，病人感染其中一種基因型別後，可能只對該型別具有免疫力，若再感染其他型別時，可能無免疫力，會再次感染發病。故恙蟲病有多次感染的可能，也因此，恙蟲病疫苗的開發較為困難，至今仍無有效的疫苗。故有效的預防疾病的發生極為重要，一旦受感染，早期診斷及治療對病患的健康也極為重要。本研究亦建立 *Anaplasma* spp. 與 *Ehrlichia* spp. real-time qPCR 方法，靈敏度高，可偵測 1-30 copies/reaction。發現 6 例疑似 anaplasmosis 陽性病例，這是台灣首次發現人的 anaplasmosis 病例。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

相關單位在舉辦研討會及教育訓練時，應加強恙蟲病感染之臨床特徵及防治方法納入宣導及教育內容。有效的預防疾病的發生，一旦受感染，早期診斷及治療對病患的健康也極為重要。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

因應交通便捷及氣候變遷等因素，台灣地區可能發生已知及新興病媒性傳染病的流行。應加強監測，配合實驗室為基礎的檢驗系統，有系統的進行各種病媒性傳染病的監測、檢驗與流行病學研究。

參考文獻

1. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med.* 2011;364:1523–32.
2. Liu Q, He B, Huang SY, Wei F, Zhu XQ. Severe fever with thrombocytopeniasyndrome, an emerging tick-borne zoonosis. *Lancet Infect Dis.* 2014;14:763–72.
3. Fu Y, Li S, Zhang Z, Man S, Li X, Zhang W, Zhang C, Cheng X. Phylogeographic analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from Zhoushan Islands, China: implication for transmission across the ocean. *Sci Rep.* 2016 Jan 25;6:19563. doi: 10.1038/srep19563.
4. Xing X, Guan X, Liu L, Zhan J, Jiang H, Liu L, Li G, Xiong J, Tan L, Xu J, Jiang Y, Yao X, Zhan F, Nie S. Natural Transmission Model for Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Bunyavirus in Villages of Hubei Province, China. *Medicine (Baltimore).* 2016 Jan;95(4):e2533.
5. Li Z, Hu J, Bao C, et al. Seroprevalence of antibodies against SFTS virus infection in farmers and animals, Jiangsu, China. *J Clin Virol.* 2014;60:185–9.
6. Liu JW, Zhao L, Luo LM, Liu MM, Sun Y, Su X, Yu XJ. Molecular Evolution and Spatial Transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Based on Complete Genome Sequences. *PLoS One.* 2016 Mar 21;11(3):e0151677.
7. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, et al. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. *J Infect Dis.* 2014;209:816–27.
8. Hayasaka D, Fuxun Y, Yoshikawa A, Posadas-Herrera G, Shimada S,

- TunMM, et.al.Seroepidemiological evidence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infections in wild boars in Nagasaki, Japan.Trop Med Health. 2016 Apr 3;44:6. doi: 10.1186/s41182-016-0009-6. eCollection 2016.
9. Hayasaka D, Shimada S, Aoki K, et al. Epidemiological survey of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Nagasaki, Japan. Trop Med Health. 2015;43:159–64.
 10. Kurihara S, Satoh A, Yu F, Hayasaka D, Shimojima M, Tashiro M, et al.The world first two cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome: An epidemiological study in Nagasaki, Japan.J Infect Chemother. 2016 Jul;22(7):461-5.
 11. Fukuma A, Fukushi S, Yoshikawa T, Tani H, Taniguchi S, Kurosu T, et al.Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antigen Detection Using Monoclonal Antibodies to the Nucleocapsid Protein.PLoSNegl Trop Dis. 2016 Apr 5;10(4):e0004595
 12. Kim KH, Yi J, Kim G, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, South Korea, 2012. Emerg Infect Dis. 2013;19:1892–4.
 13. Liu S, Chai C, Wang C, et al. Systematic review of severe fever with thrombocytopenia syndrome: virology, epidemiology, and clinical characteristics. Rev Med Virol. 2014;24:90–102.
 14. Chen H, Hu K, Zou J, Xiao J. A cluster of cases of human-to-human transmission caused by severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus. Int J Infect Dis. 2013;17:e206–208.
 15. Fang R, Blanton LS, Walker DH.Rickettsiae as Emerging Infectious Agents.Clin Lab Med. 2017 Jun;37(2):383-400. doi: 10.1016/j.cll.2017.01.009. Review. PMID: 2845735
 16. Zhang L, et al. 2008. Rickettsialseroepidemiology among farm workers, Tianjin, People’s Republic of China. Emerg. Infect. Dis. 14:938 –940.

17. Tsai K-H, Lu H-Y, Tsai J-J, Yu S-K, Huang J-H, Shu P-Y. 2008. Human case of *Rickettsia felis* infection, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 14:1970.
18. Tsai K-H, Wang H-C, Chen C-H, Huang J-H, Lu H-Y, Su C-L, Shu P-Y. 2008. Isolation and identification of a novel spotted fever group rickettsia, strain IG-1, from *Ixodes granulatus* ticks collected on Orchid Island (Lanyu), Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 79:256-261.
19. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol* 1994;32:589–95.
20. Bakken JS, et al. 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *JAMA* 272:212–218.
21. Brouqui P, Dumler JS, Lienhard R, Brossard M, Raoult D. 1995. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Lancet* 346:782–783.
22. Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, et al. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1828–34.
23. Demma LJ, Holman RC, McQuiston JH, Krebs JW, Swerdlow DL. Epidemiology of human ehrlichiosis and anaplasmosis in the United States, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:400–9.
24. Zhang S, Hai R, Li W, Li G, Lin G, He J, et al. Seroprevalence of human granulocytotropic anaplasmosis in central and southeastern China. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81:293–5.
25. Dhand A, Nadelman RB, Agüero-Rosenfeld M, Haddad FA, Stokes DP, Horowitz HW. Human granulocytic anaplasmosis during pregnancy: case series and literature review. *Clin Infect Dis* 2007;45:589–93.
26. Zhang L, Liu Y, Ni D, Li Q, Yu Y, Yu XJ, et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA* 2008;300:2263–70.

27. Dunning Hotopp JC, et al. 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genet.* 2:e21.
28. Kelly DJ, Fuerst PA, Ching W-M, Richards AL. 2009. Scrub typhus: the geographic distribution of phenotypic and genotypic variants of *Orientiatsutsugamushi*. *Clin Infect Dis* 48:S203-S230.
29. Saifudheen K, Kumar KS, Jose J, Veena V, Gafoor VA. 2012. First case of scrub typhus with meningoencephalitis from Kerala: An emerging infectious threat. *Ann Indian AcadNeurol* 15:141.
30. Elisberg B, Campbell J, Bozeman F. 1968. Antigenic diversity of *rickettsia tsutsugamushi*: epidemiologic and ecologic significance. *J HygEpidemiolMicrobiolImmunol* 12:18.
31. Enatsu T, Urakami H, Tamura A. 1999. Phylogenetic analysis of *Orientiatsutsugamushi* strains based on the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. *FEMS Microbiol Lett* 180:163-169.
32. Ohashi N, Nashimoto H, Ikeda H, Tamura A. 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 variants. *J BiolChem* 267:12728-12735.
33. Yang H-H, Huang I-T, Lin C-Chen T-Y, Chen L-K. 2012. New genotypes of *Orientiatsutsugamushi* isolated from humans in eastern Taiwan. *PLoS ONE* 7(10): e46997. doi:10.1371/journal.pone.0046997
34. Giengkam S, Blakes A, Utsahajit P, Chaemchuen S, Atwal S, Blacksell SD et al. 2015. Improved Quantification, Propagation, Purification and Storage of the Obligate Intracellular Human Pathogen *Orientiatsutsugamushi*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* DOI:10.1371/journal.pntd.0004009

Table1.

Sequence type and phylogenetic closest foreign strains of *O. tsutsugamushi*

Seq type	Representative Isolate	Length of ORF of 56kD-TSA gene	Genotype	Pairwise nucleotide sequence similarity (%) to phylogenetically closest foreign <i>O. tsutsugamushi</i> strain from NCBI
TW-1	KM0605a	1608	Karp	98.3% similarity to UT150 strain, Thailand (EF213086)
TW-2	TY0610a	1605	Karp	97.4% similarity to UT336 strain, Thailand (EF213089)
TW-3	TP0607a	1605	Karp	97.5% similarity to Karp strain, New Guinea (M33004)
TW-4	TP0708a	1608	Karp	96.0% similarity to UT336 strain, Thailand (EF213089)
TW-5	KM0607h	1632	Karp	95.8% similarity to UT176 strain, Thailand (EF213081)
TW-6	KHC0609c	1608	Karp	97.7% similarity to UT176 strain, Thailand (EF213081)
TW-7	KHC0606a	1608	Karp	96.4% similarity to yeo-joo strain, Korea (AF430144)
TW-8	CH0711a	1692	Karp	96.3% similarity to pa-joo strain, Korea (AF430142)
TW-9	TPC0701a	1599	Kuroki	99.7% similarity to Boryong strain, Korea (AM494475)
TW-10	KHC0704a	1566	TA763	93.8% similarity to TA763 strain, Thailand (U80636)
TW-11	NT0707a	1584	TA763	96.7% similarity to TA763 strain, Thailand (U80636)
TW-12	TT0705a	1593	TW-12	86.8% similarity to UT302 strain, Thailand (EF213095)
TW-13	NT0711a	1557	Kawasaki	92.6% similarity to Sxh951 strain, China (AF050669)
TW-14	TT0711a	1551	Kawasaki	92.6% similarity to Ikeda strain, Japan (AP008981)
TW-15	PT0712b	1569	Kawasaki	99.3% similarity to Kawasaki strain, Japan (M63383)
TW-16	KHC0707a	1572	Kawasaki	97.2% similarity to UT329 strain, Thailand (EF213099)
TW-17	TPC0707a	1596	Kawasaki	97.7% similarity to UT125 strain, Thailand (EF213096)
TW-18	KHC0706a	1596	Kawasaki	98.4% similarity to UT125 strain, Thailand (EF213096)
TW-19	KM0606a	1572	Kawasaki	97.2% similarity to UT125 strain, Thailand (EF213096)
TW-20	HC0605a	1572	Kato	99.9% similarity to LF-1 strain, Malaysia (AF173050)
TW-21	KM0607b	1590	Kato	98.6% similarity to Kato strain, Japan (M63382)
TW-22	KHC0606b	1575	TW-22	88.3% similarity to FPW1038 strain, Thailand (EF213087)
TW-23	KM0806c	1611	Karp	97% similarity to S0902151-KH strain, Cambodia (HQ718422)
TW-24	TN0807a	1602	Karp	97% similarity to UT336 strain, Thailand (EF213089)
TW-25	TT0908a	1605	Karp	96% similarity to UT336 strain, Thailand (EF213089)
TW-26	TT0910a	1605	Karp	97% similarity to UT176 strain, Thailand (EF213081)
TW-27	KM0807h	1605	TA763	97% similarity to 45QN-VN strain, Vietnam (HQ817459)
TW-28	TPC0911a	1587	TA763	96% similarity to 02QNg-VN strain, Vietnam (HQ817449)
TW-29	CH0807a	1575	TW-12	87% similarity to UT302 strain, Thailand (EF213095)
TW-30	HL1004b	1572	Kawasaki	98% similarity to UT329 strain, Thailand (EF213099)

Table 2.

Anaplasma + Ehrlichia screening

(統計至 2017/11/7)

2017年	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
個案數 (全血 +PBMC)	38 x2	101 x2	100 x2	100 x2	100 x2	80 x2	120 x2	100 x2	96 x2	18 x2		853 x2
陽性數	0	0	0	0	0	2	0	4	0			6
陽性率 (%)	0	0	0	0	0	2.5	0	4	0			0.7

Primer ID	Seq	Target
903f	AGTTTGACTGGAACACACCTGATC	Anaplasma spp.
1024r	CTCGTAACCAATCTCAAGCTCAAC	
Ap msp2 F1	ACGTTAGCGCTTTGGAGACT	
Ap msp2 R1	TCTTGAAGCGCTCGTAACCA	
HE1	CAATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAAT	Ehrlichia spp.
HE3	TATAGGTACCGTCATTATCTCCCTAT	

WB: 連江縣, 新北市
PBMC: 屏東縣, 台北市,
 苗栗縣, 澎湖縣

Figure 1

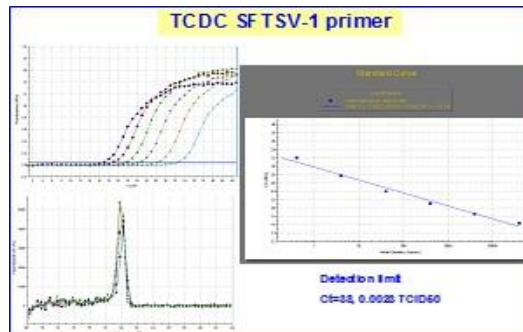
A.

SFTS傳染病之監測

- 病例监测 (2017/1/1- 10/31)
- 主动监测: 机场发烧筛检、确定病例扩大疫调採检等 (3,097例)
- 被动监测: 医师通报 (520例)

Real-time RT-PCR:

未發現SFTS病例

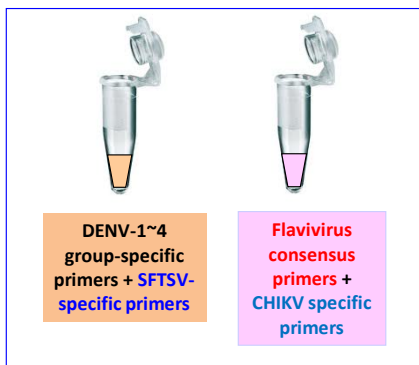


B.

Molecular diagnosis

SYBR Green I-based multiplex real-time RT-PCR

Suspected case of
arbovirus infection



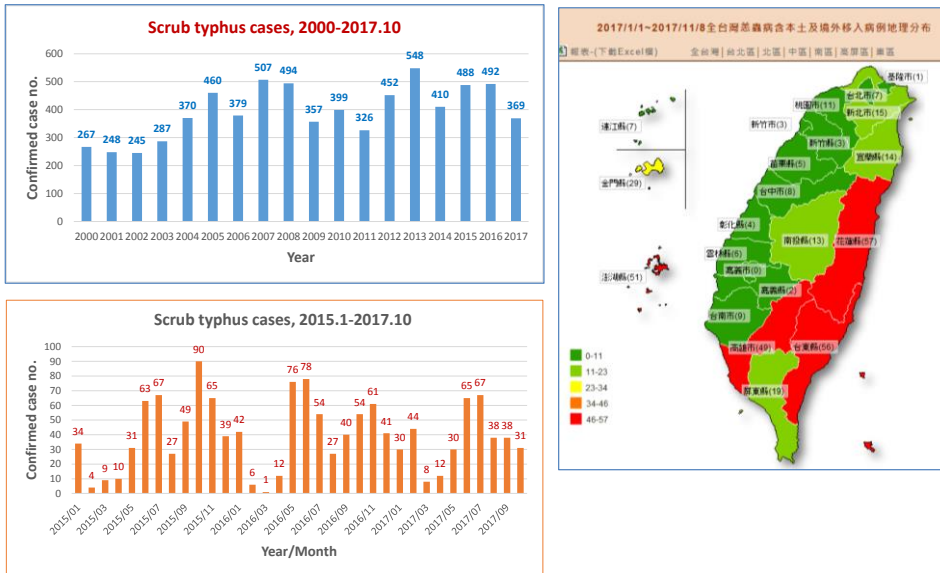
Suspected case of
ZIKV infection



Figure 2

A.

恙蟲病之監測



B.

SYBR Green I-based multiplex real-time qPCR

- *Rickettsia* 16S rRNA + *O. tsutsugamushi* 56-kDa TSA gene
- TG 17-kDa gene + SFGR 17-kDa gene
- *Anaplasma* msp2 gene (903f-1024r; msp2F1-msp2R1)+ *Ehrlichia* (HE1-HE3)
 ➔ If (+), DNA sequencing

疾病名稱	PCR檢驗件數 2017/1/1-10/31	PCR陽性數
恙蟲病(ST)	2058	189
斑點熱(SFG)	863	0
無形體病(HGA)	853x2	6*
艾利希氏症(HME)	853x2	0

Figure 3

Phylogenetic tree of OT TSA gene (23 strains in 2017)

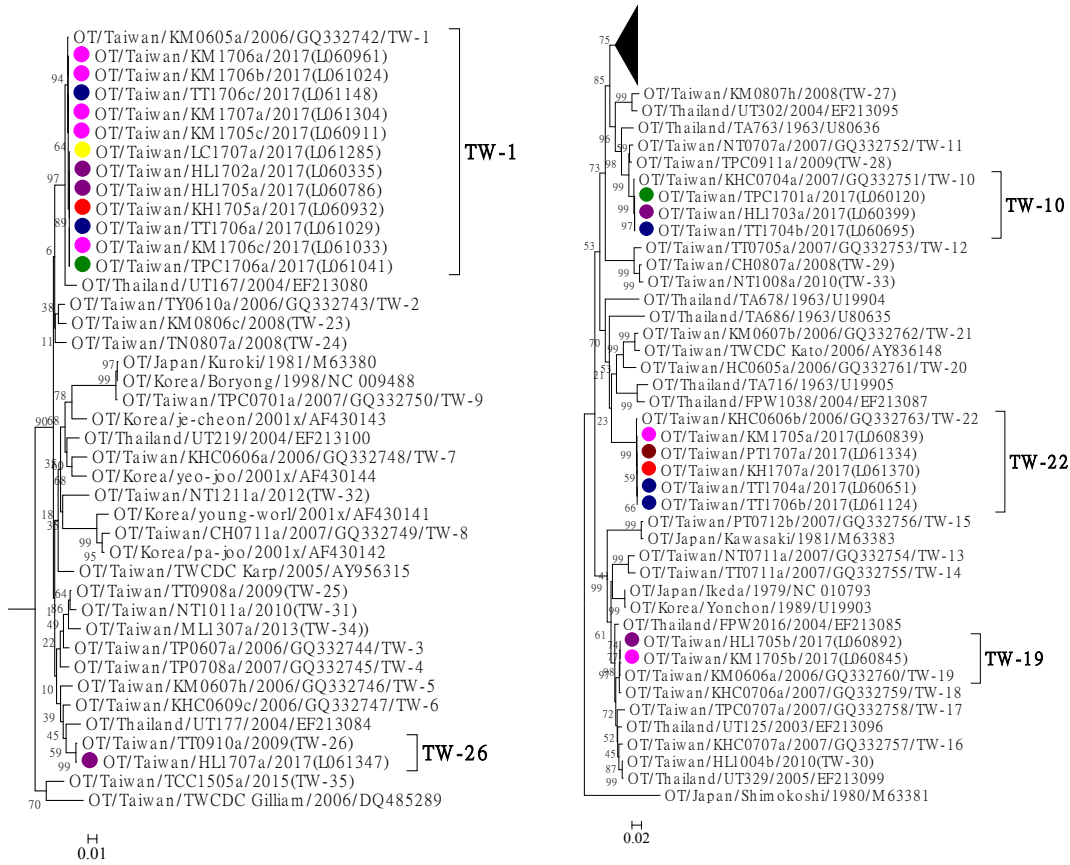


Figure 4

今年仍未發現SFG病例

Phylogenetic tree of *omp A* gene of spotted fever group Rickettsiae

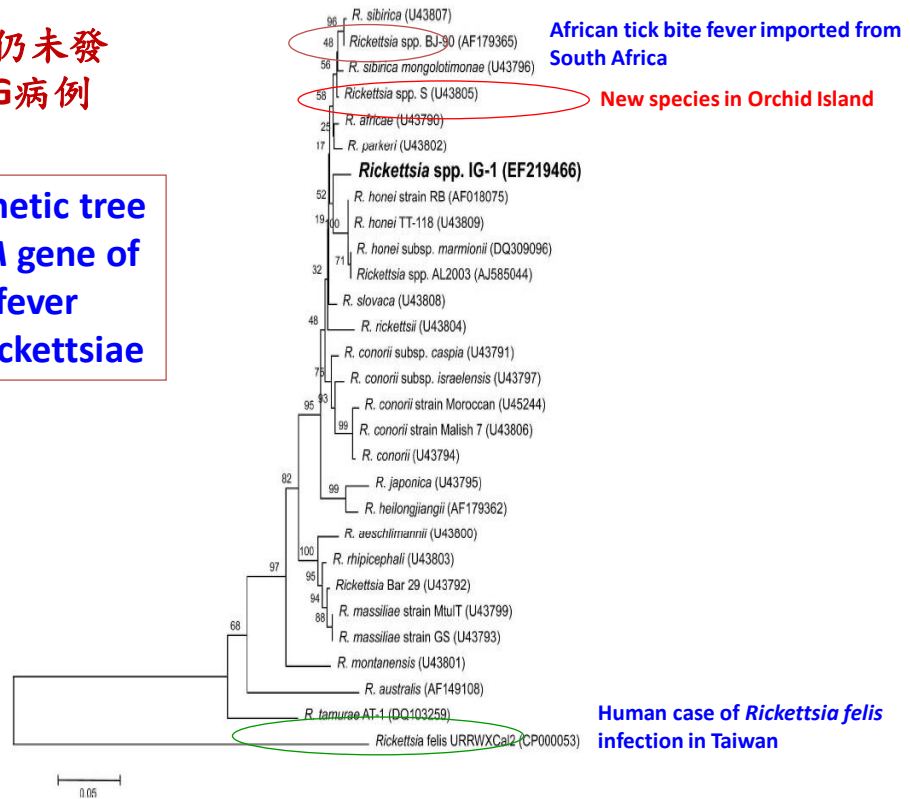


Figure 5

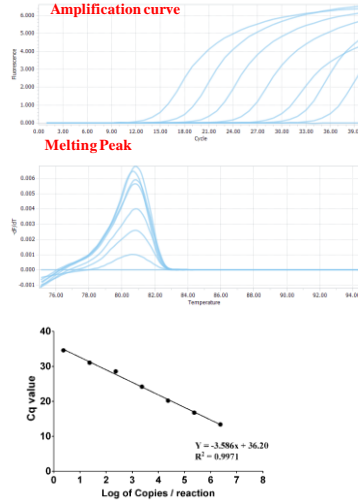
A.

Real-time qPCR detection of *A. phagocytophilum*

Primer : **msp2 903f-1024r** (Vet Diag Invest 2014, 23:770–774) 400-400nM
 Sample : *Anaplasma phagocytophilum* (whole-genome DNA, from IFA slide)

Sample Name	Copy number/Rx	Well	Cq	EPF	Tm
<i>A. phagocytophilum</i> DNA	2.36E+06	A3	13.41	6.4	80.67
	2.36E+05	B3	16.77	6.55	80.75
	2.36E+04	C3	20.2	6.19	80.93
	2.36E+03	D3	24.19	5.74	80.85
	2.36E+02	E3	28.56	4.34	80.86
	2.36E+01	G4	31.04	4.75	80.72
	2.36E+00	G3	34.58	3.06	80.72
NTC		A2	-	-	77.3

Cq=36, LOD=1.14 copies/Rx



B.

Real-time qPCR detection of *A. phagocytophilum*

Primer : **F1/R1** (msp2, TCDC, 2017) + HE1-HE3
 Sample : *Anaplasma phagocytophilum* (whole-genome DNA, from IFA slide)

Sample Name	Copy number/Rx	Well	Cq	EPF	Tm
<i>A. phagocytophilum</i> DNA	1.26E+07	A3	12.66	4.56	81.3
	1.26E+07	A4	12.65	4.63	81.28
	1.26E+06	B3	15.94	4.74	81.33
	1.26E+06	B4	15.94	4.82	81.53
	1.26E+05	C3	19.55	4.51	81.31
	1.26E+05	C4	19.52	4.52	81.54
	1.26E+04	D3	24.09	3.7	81.25
	1.26E+04	D4	24.04	3.8	81.51
	1.26E+03	E3	29.63	3.1	81.49
	1.26E+03	E4	29.3	3.02	81.32
	1.23E+02	F3	33.55	3.1	81.84
	1.23E+02	G4	33.66	3.1	81.47
	1.26E+01	G3	35.09	2.16	81.91
	1.26E+01	F4	-	0.08	77.37
	1.26E+00	H3	-	0.01	77.27
1.26E+00	H4	-	0.03	77.41	
1.26E-01	A5	-	0.19	80.9	
1.26E-01	B5	-	0.04	78.55	
NTC		D5	-	0.04	77.3

Cq=36, LOD=28.23 copies/Rx

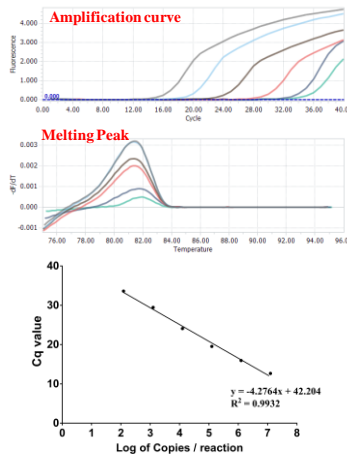


Figure 6

Anaplasma + Ehrlichia screening

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum str. Dog2 genome	551	15149	99%	4e-153	100%	CP006618.1
<input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum str. JM, complete genome	551	14618	99%	4e-153	100%	CP006617.1
<input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum str. HZ2, complete genome	551	14605	99%	4e-153	100%	CP006616.1
<input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum isolate SCID8_D20 major surface protein p44-18E (p44) gene, complete sequence	551	551	99%	4e-153	100%	AY763498.1
<input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum HZ, complete genome	551	14611	99%	4e-153	100%	CP000235.1
<input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum P44ESup1 and major surface protein 2 genes, complete cds	551	551	99%	4e-153	100%	AY164494.1

PCR and sequencing: *Anaplasma phagocytophilum*
Serological tests: IFA (-), Western blot (1:10 dilution, msp2 +)
Bacterial isolation: HL-60 cell line (in progress)

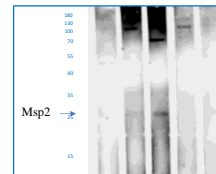


Figure 7.

Real-time qPCR detection of *E. chaffeensis*

Primer : **HE1-HE3** (J Clin Microbiol 1992, 30:775-780) 400 nM

Sample : *Ehrlichia chaffeensis* (whole-genome DNA, from IFA slide)

Sample Name	Copy number/Rx	Well	Cq	EPF	Tm
<i>E. chaffeensis</i> DNA	1.81E+06	A3	17.39	5.07	84.38
	1.81E+05	B3	20.78	4.62	84.6
	1.81E+04	C3	25.1	4.06	84.6
	1.81E+03	D3	29.1	3.84	84.51
	1.81E+02	E3	33.11	2.53	84.52
	1.81E+01	G4	35.51	0.99	84.05
	1.81E+00	G3	-	0.04	84.08
NTC		B2	-	-	83.36

Cq=36, LOD=22.66 copies/Rx

