

計畫編號：DOH98-DC-2012

行政院衛生署疾病管制局 98 年度科技研究發展計畫

鼠類及其外寄生節肢動物病原體監測整合型計畫

(子計畫一) 鼠類及其外寄生節肢動物鉤端螺旋體及疏螺旋體監測計畫 (慕蓉蓉)

(子計畫二) 鼠類及其外寄生節肢動物立克次體監測計畫 (王錫杰)

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：慕蓉蓉

研究人員：王錫杰、舒佩芸、王琇儀、邱詩惠、李沛龍、高英訓、

林穎君、林文珍

執行期間： 98 年 1 月 1 日至 98 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本局意見，如對外研究成果應事先徵求本局同意\*

## 目 錄

|                   |    |
|-------------------|----|
| 一、圖次              | 3  |
| 表次                | 4  |
| 二、摘要：中文摘要         | 5  |
| 英文摘要              | 7  |
| 三、本文              |    |
| (一)、前言            | 9  |
| (二)、材料與方法         | 17 |
| (三)、結果            | 32 |
| (四)、討論            | 39 |
| (五)、結論與建議         | 48 |
| (六)、計畫重要研究成果及具體建議 | 50 |
| (七)、參考文獻          | 52 |
| (八)、圖             | 62 |
| 表                 | 71 |

## 圖次

- 圖一、鈎端螺旋體菌 16S 序列親緣關係圖。 62
- 圖二、萊姆疏螺旋體菌 5S-23S 序列親緣關係圖。 63
- 圖三、莫拉克風災鈎端螺旋體疫情人體與環境檢體之序列親緣關係圖。 64
- 圖四、宜蘭縣斑點熱立克次體 *OmpB* 部分序列親緣關係圖，●為宜蘭縣菌株。 65
- 圖五、宜蘭縣斑點熱立克次體 *gltA* 部分序列親緣關係圖，●為宜蘭縣菌株 66
- 圖六、花蓮縣斑點熱立克次體 *OmpB* 部分序列親緣關係圖，●為花蓮縣菌株。 67
- 圖七、花蓮縣斑點熱立克次體 *gltA* 部分序列親緣關係圖，●為花蓮縣菌株 68
- 圖八、台東縣斑點熱立克次體 *OmpB* 部分序列親緣關係圖，●為台東縣菌株。 69
- 圖九、台東縣斑點熱立克次體 *gltA* 部分序列親緣關係圖，●為台東縣菌株 70

## 表次

|  |    |
|--|----|
| 表一、東部三縣鼠類捕獲數                                     | 71 |
| 表二、東部三縣鼠類捕獲數(以縣市別)                               | 71 |
| 表三、鼠類鈎端螺旋體血清抗體陽性率(以縣市別)                          | 72 |
| 表四、鼠類鈎端螺旋體血清抗體陽性率(以鼠種別)                          | 72 |
| 表五、鼠類鈎端螺旋體感染率(以縣市別)                              | 72 |
| 表六、鼠類鈎端螺旋體感染率(以鼠種別)                              | 73 |
| 表七、鼠類鈎端螺旋體培養陽性率(以縣市別)                            | 73 |
| 表八、鼠類鈎端螺旋體培養陽性率(以鼠種別)                            | 73 |
| 表九、鼠類體外節肢動物萊姆疏螺旋體病原檢測                            | 74 |
| 表十、鼠類萊姆疏螺旋體培養陽性率(以縣市別)                           | 74 |
| 表十一、鼠類萊姆疏螺旋體培養陽性率(以鼠種別)                          | 74 |
| 表十二、莫拉克風災鈎端螺旋體疫情                                 | 75 |
| 表十三、鼠類血清斑點熱立克次體及地方性斑疹傷寒立克次體血清抗體陽性率(以鼠種別)         | 75 |
| 表十四、鼠類血清斑點熱立克次體及地方性斑疹傷寒立克次體血清抗體陽性率(以縣市別)         | 76 |
| 表十五、鼠類內臟 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體 PCR 檢測(以縣市別)    | 76 |
| 表十六、鼠類內臟 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體 PCR 檢測(以鼠種別)    | 76 |
| 表十七、花蓮縣及台東縣蜚 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體 PCR 檢測      | 77 |
| 表十八、宜蘭縣、花蓮縣及台東縣恙蟲 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體 PCR 檢測 | 77 |
| 表十九、花蓮縣鼠類跳蚤 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體 PCR 檢測       | 77 |
| 表二十、鼠類屬蝨 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體 PCR 檢測          | 78 |
| 表二十一、外寄生節肢動物及鼠類脾肝腎臟 <i>Rickettsia</i> 屬立克次體分佈情形  | 78 |

## 摘要

關鍵詞：鼠類、鉤端螺旋體病、萊姆病、*Rickettsia* 屬立克次體、即時定量聚合酶連鎖反應、親緣樹狀圖演化分析

95 年至 98 年於宜蘭縣、花蓮縣和台東縣進行 8 次野外鼠類捕捉及鼠類體外節肢動物採集，共計捕獲鼠類 415 隻，其中以小黃腹鼠數量最多 199 隻佔 47.95%，錢鼠其次 85 隻佔 20.48%。血清鉤端螺旋體總抗體陽性率 28.7% (106/369)，腎臟中鉤端螺旋體帶菌率 25.4%(105/413)。東部三縣市中花蓮縣鼠類鉤端螺旋體盛行率及帶菌率為最高。鼠腎檢體培養鉤端螺旋體菌株共 19 株，總培養陽性率 6.1%。33 個檢體成功定序，經親緣樹狀圖分析均隸屬致病性鉤端螺旋體。本計畫建立之鉤端螺旋體分子偵測法成功應用於今年度莫拉克風災檢驗，152 個個案，6 個血液中以 real-time PCR 偵測出鉤端螺旋體病原，環境檢體也檢驗出致病性鉤端螺旋體菌。粒形硬蜱中萊姆疏螺旋體菌總感染陽性率 41.7%，並由一鼠耳檢體培養出疾管局第一個本土萊姆疏螺旋體菌。所有萊姆疏螺旋體序列經親緣樹狀圖分析均近似 *Borrelia valaisiana*。在 *Rickettsia* 屬立克次體檢測部份，採集之 391 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以宜蘭縣最高 100%(91/91)，其次為台東縣 90.91%(60/66)，花蓮縣最低 87.80%(36/41)；所有鼠種地方性斑疹傷寒立克次體抗體陽性率，宜、花、東三縣分別為 1.90%(2/105)、1.50%(2/133) 及 1.31%(2/153)，顯示宜蘭縣、花蓮縣及台東縣野外主要鼠類小黃腹鼠感染斑點熱立克次體情形非常嚴重。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，東部三縣老鼠脾肝腎臟中平均偵測出 *Rickettsia* 屬立克次體的比例為 87%、100%及 45%，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* 屬立克次體在採自東部三縣中粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)、恙蟎、無孔微棒蚤(*Stivalius aporus*)及厲蟎(*Laelaps* spp.)的 nested-PCR 陽性率分別為 41.7%、37.2%、25%及 14.3%。於台東縣蘭嶼鄉採獲之粒形硬蜱培養出一株斑點熱立克次體，經由幾個重要的基因如 16S rRNA, *gltA*, *ompA*, *ompB* 及 *sca4* 與目前已知斑點熱立克次體菌株序列不同，研判為一株新的斑點熱立克次體菌株序列，定名為 *Rickettsia* spp. IG-1。所有檢測出之 229 株 *Rickettsia* 屬立克次體菌株序列進行親緣關係分析，結果可分成 9 群，以近似 *R. conorii* 出現的機率最高。本研究顯示萊姆疏螺旋體菌及 *Rickettsia* 屬立克次體可透過這些鼠類體外節肢動物在鼠類間循環，甚至可能傳給人類。

## **Abstract**

Keywords: rodent, leptospirosis, lyme disease, *Rickettsia*, real-time PCR, phylogenetic analysis

Rodent trapping and ectoparasite collection were conducted eight times from 2006 to 2009 in Yilan, Hualien and Taitung. A total of 415 rodents were collected. *Rattus losea* was mostly trapped, with capture rate 47.95%. The total seroprevalence rate of leptospirosis is 28.7% (106/369) and the infection rate is 25.4% (105/413). Hualien has the highest rate for both seroprevalence and infection among these three counties. There are 19 isolates obtained from kidney culture. The phylogenetic analysis showed all the leptospira sequences belong to pathogenic leptospira. The molecular method applied in clinical diagnostic during the typhoon Morakot hit in this August, 6 out of 152 cases were identified as confirmed cases by using real-time PCR. The environmental samples were also detected using the same method. For lyme borrelia detection, the infection rate of *Borrelia* in *Ixodes granulatus* is 41.7%, the first *Borrelia* isolate in Taiwan CDC was cultured from rodent ear. The sequences from ticks and rodent ear are related to *Borrelia valaisiana*. The rodent sera were challenged to detect IgG against *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii* and *R. typhi* antigens with immunofluorescent antibody test (IFA). The seropositive rates of *R. losea* against *R. rickettsii* or *R. conorii* in Yilan, Hualien and Taitung were 100%, 87.8% and 90.9%, respectively, and the seropositive rates of rodents against *R. typhi* were 1.9%, 1.5% and 1.3% respectively. This revealed that *R. losea*, the locally dominant wild rodent species in these areas, was severely infected with spotted fever rickettsia. To detect the rickettsia infection in rodents, spleens, livers, kidneys were examined by nested-PCR with 120-135 kDa surface

antigens (*ompB*) and citrate synthase (*gltA*) as gene targets. Average PCR positive rates for spleens, livers and kidneys were 87%, 100% and 45%, suggesting rodents might be the reservoirs of spotted fever rickettsia in these three areas. The PCR positive rates for rickettsia *ompB* and *gltA* were 41.7%, 37.2%, 25% and 14.3% in *Ixodes granulatus*, Trombiculid mites, *Stivalius aporus*, and *Laelaps* spp. respectively. A novel species of spotted fever group rickettsia, *Rickettsia* spp. IG-1, was identified and isolated from adult *Ixodes granulatus* ticks collected from Orchid Island, Taitung. Pairwise nucleotide sequence analysis of 16SrRNA (*rrs*), *gltA*, *ompA*, *ompB*, and *sca4* shows that IG-1 belongs to spotted fever group rickettsiae. All 229 PCR positive samples were also sequenced and could be divided into 9 phylogenetic groups. Most sequences are closely related to *R. conorii*. These results suggest lyme borrelia and spotted fever rickettsia might therefore be transmitted among rodents by ectoparasites, and humans could also be infected.



## 前言

在人類所豢養的動物如狗、貓、雞、鴨等以外，鼠類是與人類生活最接近的小型哺乳動物，其生活的適應性強，取食廣，且具機敏性，極適合人類的居住環境，所以不論是居家、辦公廳舍、倉庫或廠房都可見到他們的蹤影。有些鼠類習慣棲息於屋內外四週如溝鼠(*Rattus norvegicus*)、屋頂鼠(*R. rattus*)、家鼯鼠(*Mus musculus*)及錢鼠(*Suncus murinus*)，或棲息於居家附近的農耕地及草地如小黃腹鼠(*R. losea*)、鬼鼠(*Bandicota indica*)、赤背條鼠(*Apodemus agrarius*)、田鼯鼠(*Mus caroli*)，而有些則已登堂入室成為寵物如楓葉鼠(*Phodopus sungorus*)、黃金鼠(*Mesocricetus auratus*)、花栗鼠(*Tamias sibiricus*)及天竺鼠(*Cavia porcellus*)等。鼠類的繁殖能力很強，根據估算亞熱帶地區鼠口約為人口之四倍，以台灣二千三百萬人口計算，鼠口即超過九千萬，因此其每年所消耗的糧食損失實在難以估計(王正雄，1999)。鼠類所帶來的危害還不僅於此，更重要的是疾病的傳播。鼠類為許多人畜共通傳染病的儲主(reservoir)，這些病原可經由鼠糞或鼠尿直接傳染給人類，如沙門氏菌病(Salmonellosis)、鉤端螺旋體病(Leptospirosis)、漢他病毒出血熱(Hanta virus)、原蟲病、條蟲病；或直接經由鼠咬傳染，如鼠咬熱(Rat-bite fever)；另可經由老鼠身上的外寄生節肢動物來傳播，如鼠蚤傳播鼠疫(Plague)、地方性斑疹傷寒(Murine typhus)；鼠蝨傳播恙蟲病(Scrub typhus)、立克次體痘(Rickettsial-pox)；鼠蟬傳播 Q 熱(Q fever)、萊姆病(Lyme disease)、巴比西亞原蟲症(Babesiosis)等(王和林，1995)。台灣地區近幾年與鼠類相關的傳染病都具有相當的病例數，95、96、97 年恙蟲病確定病例數分別為 384、510、492 例；Q 熱為 153、157、91 例；地方性斑疹傷寒為 25、47、31 例；漢他病毒出血熱在 95 年有 3 例，96 及 97 年各有 1 例。中國大陸為國人經常往來旅遊、探親及商務的地點，自從兩岸開放小三通，往來更是頻繁。根據行政院大陸委員會統計，國人於 95

年前往大陸探親旅遊商務的人數高達 400 萬人次，而大陸各地衛生情況不一，經鼠傳播的疾病相當嚴重，如 96 年漢他病毒出血熱 9,227 例、鉤端螺旋體病 865 例、斑疹傷寒 2,441 例(未具名，2009)，前年(96 年)6 月洞庭湖地區甚至發生十年來最嚴重的鼠患。

鼠類同時會直接傳播許多新興之人畜共通傳染病，如拉薩熱(Lassa fever)、淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎 Lymphocytic choriomeningitis(LCM)、南美沙狀病毒(South American Arenaviruses)及兔熱病(Tularemia)。淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎雖主要由家鼯鼠傳播，但美國有多次的疫情爆發是經由寵物鼠(CDC, 2005; Amman, 2007)。另外由鼠類可間接傳播的新興人畜共通傳染病如科羅拉多壁蝨熱(Colorado tick fever)、人粒細胞無形體病(Human granulocytic anaplasmosis)、波瓦桑病毒腦炎(Powassan virus encephalitis)及斑點熱立克次體病(Spotted fever rickettsiosis)等。

鉤端螺旋體病是由鉤端螺旋體 (*Leptospira* spp.) 感染引起的重要的人畜共通傳染病(Levett, 2001)。人類感染重症描述最早見於 1886 年德國醫師 Adolf Weil 在急性腎衰竭的病人身上觀察到的脾腫大、黃疸及腎臟炎等臨床表現(Faine, 1994; Weil, 1886)。近年來，在尼加拉瓜(Brandling-Bennett, 1996)、阿根廷(Seijo *et al.*, 2002)、秘魯(Johnson *et al.*, 2004)、巴西、印度(Chaudhry *et al.*, 2002)、東南亞(Laras *et al.*, 2002)、美國(CDC.1998, 1998)與馬來西亞(Sejvar *et al.*, 2003)等地爆發鉤端螺旋體病之重大疫情，令此病成為受到矚目的再現傳染病(re-emerging infectious disease)。

鉤端螺旋體為細桿狀螺旋型、兩端呈鉤狀具內鞭毛的高運動性螺旋體，其最佳生長溫度為 28 °C 到 30 °C，可以在潮溼的環境中存活很長的時間(Trueba *et al.*, 2004)。目前，全球已知的鉤端螺旋體約有兩百多種(Morey *et al.*, 2006)：

可應用基因分型方法將其分為 16 種基因型 (genomospecies)，依照致病性分為 3 大群：致病型 (pathogens)、中間型 (intermediate)、腐生型 (saprophytes)；血清型的分類則常用交叉凝集吸收測試 (cross agglutination absorption test)；另外，亦可利用 16S ribosomal RNA gene 進行序列比對及親緣樹狀圖演化分析 (phylogenetic tree analysis)，以確定分離菌株的親緣關係 (Matthias *et al.*, 2005)。

鈎端螺旋體可經由傷口或黏膜組織感染幾乎所有哺乳類。鼠類、狗、牛、豬等為保菌宿主 (reservoir hosts)，造成腎臟慢性感染，並且由尿液長時間持續地大量排菌，污染水或環境。人類或其他動物為意外感染宿主 (incidental hosts)，經由接觸受鈎端螺旋體污染的水或環境而感染，但病情較嚴重，排菌期卻較短 (行政院衛生署疾病管制局, 2002)。

鼠類被認為是鈎端螺旋體病的重要保菌宿主，也扮演重要的傳播角色 (Faine, 1994)。如 Saravanan *et al.* 研究顯示，病患住所周圍的鼠隻分離鈎端螺旋體，其血清型常和病患血清抗體吻合 (Saravanan *et al.*, 2000)。Vinetz *et al.* 研究也顯示，鈎端螺旋體病患可能因暴露於住家附近遭鼠尿污染的環境而罹病，調查發現病患住家附近捕獲的 21 隻溝鼠中，以 PCR 檢測，19 隻的腎臟組織呈陽性，故推論都市區鼠類族群鈎端螺旋體帶原率與居民罹病的機率有極大的相關性 (Vinetz *et al.*, 1996)。

台灣地區野鼠帶有鈎端螺旋體是在 1966 年 Yeh 和 Young 從台北市近郊捕捉野鼠，由腎臟組織中分離出 Javanica 與 Autumnalis 血清型的菌株而被證實 (Yeh and Young, 1966)。但由於鈎端螺旋體培養耗時 (Levett, 2001)，常以其血清盛行率調查代替，但歷年血清陽性盛行率、血清型及鼠種之分佈之結果不盡相同，如 1968 年 Fresh *et al.* 調查顯示 586 隻野鼠中有 4.81% 呈陽性反應 (Fresh

*et al.*, 1968)；2000 年邱對台灣地區港埠鼠隻調查，則發現鼠類總陽性率高達 53%、抗體陽性率最高者為錢鼠 (75%) 及 Shermani 血清型陽性率最高(邱, 2000)；2006 年吳於台中地區進行調查，結果顯示鼠類血清陽性率為 23%、溝鼠抗體陽性率最高、以 Pomona 血清型為主(吳, 2007)。加上，保菌宿主如鼠類除了本身攜帶的特有的鉤端螺旋體，亦可感染其他血清型造成急性感染，故血清抗體調查是否能確實反應其帶原情形仍有待商榷，故鼠類實際帶原情形仍有賴於菌株的分離培養與鑑定。

本計畫第一年(97 年)分析 95 年至 97 年離島三縣捕捉野鼠之鉤端螺旋體 MAT 血清學檢測，三縣中以金門縣平均感染率 65.3% (109/167) 最高，連江縣 21.4% (9/42) 次之，澎湖縣 2.2% (3/138) 最低。顯示不同地區野鼠鉤端螺旋體感染率不同，金門縣野鼠感染鉤端螺旋體情形最為嚴重。以 real-time PCR 偵測野鼠腎臟中之鉤端螺旋體帶菌率，金門縣野鼠平均鉤端螺旋體帶菌率 45.5%，為三縣最高，其次為澎湖縣的 5.4%，最低為連江縣 2.4%。顯示金門縣之野鼠成為鉤端螺旋體菌傳染窩(reservoir)的可能性遠高於連江縣及澎湖縣。

萊姆病是經蜱傳染之人畜共通疾病(tick-borne zoonotic disease)，萊姆病病原體為疏螺旋體，存在保菌宿主(如嚙齒動物，鳥類)與媒介(vector)蜱或蚤身上(Stanek and Strle, 2003)。人類被帶有疏螺旋體的蜱叮咬後，於皮膚上產生游走性紅斑(Erythema migrans)，進而侵犯心血管及神經系統(Steere, 1989; Steere *et al.*, 1983)。歐洲、北美甚至日本及俄羅斯均為萊姆病盛行區。疏螺旋體菌須在病患感染之初，取游走性紅斑周圍之皮膚病灶培養，常由於病患延誤或臨床醫師疏忽而無法在第一時間取得。因此，臨床上多倚賴血清學診斷。台灣萊姆病確定個案非常稀少，本局自 94 年將萊姆病收回自行檢驗以來，尚無確定個案。

是台灣無萊姆病發生？抑或台灣流行之本土型菌株與一般檢驗用的代表菌株差異性大而無法偵測，一直以來頗具爭議。文獻顯示，台灣地區有從野鼠分離出兩種疏螺旋體—*Borrelia burgdorferi sensu stricto* 及 *Borrelia valaisiana*，前者型別與歐、美相同，美國只有此種型別，後者為與歐洲相似，為亞洲特有型別。本計畫第一年(97年)監測，在粒形硬蜱中發現 *Borrelia valaisiana* 的存在，代表台灣地區的確有可作為萊姆疏螺旋體菌之媒介，而在台灣粒形硬蜱發現萊姆疏螺旋體菌蹤跡為世界首例。但是目前對於 *Borrelia valaisiana* 是否具致病性而導致萊姆病的發生仍不清楚。因此台灣是否有萊姆病傳播仍需持續觀察與監測。

斑點熱立克次體病是一種世界性散發的立克次體疾病，主要是經由蜱(ticks)及蟎(mites)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(Lennette *et al.*, 1988; Marmion 1990; Takada *et al.*, 1994)。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(Parola *et al.*, 2005; Brouqui *et al.*, 2007)。台灣第一例斑點熱病例報告為 95 年 5 月自南非旅遊回來，感染 *R. africae* 之境外移入個案(Tsai *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2009a)，而第一例斑點熱之本土病例報告也已出現證實感染 *R. felis* (Tsai *et al.*, 2009b)，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 1:320(Tsai, *et al.*, 2009c)。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%(Takada *et al.*, 1993)，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%。本局 94 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. asiatica*，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. tamurae* (Fujita *et al.*, 2006; Fournier *et al.*, 2006)。在韓國亦從長角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)檢測出 *R. japonica* 及 *R. rickettsii* (Lee *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006)，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(Choi *et al.*, 2007)。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(Robbin, 2005)，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。

本計畫第一年(97年)分析於 95 年至 97 年離島三縣鼠類及鼠類體外節肢動物採集之檢測結果。採集之 525 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。結果發現小黃腹鼠為連江縣、金門縣及澎湖縣 *Rickettsia* 屬立克次體抗體陽性率最高的鼠種，抗 *R. rickettsii* 抗體陽性率在 8 次的調查皆高於 80%，沒有季節性的差異，三縣中以澎湖縣最高 98.2%，連江縣最低 81.8%，顯示連江縣、金門縣及澎湖縣野外主要鼠種小黃腹鼠感染 *Rickettsia* 屬立克次體情形非常嚴重。而以 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，三縣老鼠脾肝腎臟中平均偵測出 *Rickettsia* 屬立克次體的比例為 70%、70%及 43%，顯示小黃腹鼠、田鼯鼠及錢鼠皆有成為 *Rickettsia* 屬立克次體傳染窩(reservoir)的可能性。而 *Rickettsia* 屬立克次體採自三縣中鐮形扇頭蜱(*Rhipicephalus haemaphysaloides*)、粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)、地里恙

蟎(*Leptotrombidium deliense*)、小板恙蟎(*L. scutellare*)、蒼白恙蟎(*L. pallidum*)、優勝病蚤(*Nosopsyllus nicanus*)及厲蟎(*Laelaps* spp.)的陽性率分別為 41.7%、14.9%、15.2%、15.0%、70.0%、37.0%及 40.0%。所有檢測出之 199 株 *Rickettsia* 屬立克次體菌株序列進行親緣關係分析，結果可分成 8 群，以近似 *R. rickettsii* 及近似 *R. conorii* 出現的機率最高。

本整合型研究計畫將延續 97 年之監測，98 年度至台灣東部宜蘭、花蓮及台東三縣進行野鼠及其外寄生蟲之捕捉與分析。期望藉此鼠類監測計畫釐清台灣地區鼠類鉤端螺旋體、萊姆疏螺旋體及 *Rickettsia* 屬立克次體帶原情形及其可能的傳播途徑，並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。



## 材料與方法

本整合型研究計畫擬以 3 年為期，進行台灣地區鼠類及其外寄生節肢動物鉤端螺旋體、萊姆疏螺旋體及 *Rickettsia* 屬立克次體帶原之調查，以 PCR 進行鼠類及其外寄生節肢動物帶原的快速診斷，並利用基因序列比對及親緣樹狀圖演化分析 (phylogenetic tree analysis)，確定分離菌株的種別及親緣關係。第一年將針對鉤端螺旋體的基因序列 16S ribosomal RNA，第二年將針對數種不同萊姆疏螺旋體的基因序列 hbb，進行即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR)，測試其特異性及敏感度，評估何者為最適用的快速篩檢診斷方法。同時進行台灣地區離島及本島各地的鼠類捕捉及其外寄生節肢動物採集，以蟬、恙蟲、鼠類腎臟及耳部檢體進行鉤端螺旋體、萊姆疏螺旋體及 *Rickettsia* 屬立克次體培養，並由基因序列比對及親緣樹狀圖演化分析 (phylogenetic tree analysis) 確定其種別，期望釐清本地鼠類鉤端螺旋體、萊姆疏螺旋體及 *Rickettsia* 屬立克次體帶原的實際情形、本土型菌株的基因型與血清型及臨床病例的關係。

### 一、樣本採集地點

樣本之採集分為離島及台灣本島，第一年進行連江縣、澎湖縣及金門縣三離島採集；第二年進行宜蘭縣、花蓮縣及台東縣等東部縣市採集；第三年進行桃園縣、台中縣及高高屏等西部縣市採集。

### 二、採集方法：

1. 捕鼠：在選定地點佈鏤空鼠籠(27×16×13 cm)20 至 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，

2. Dragging and flagging: 以 2m × 1m 棉布製成之拖曳帶及 1m × 1m 棉布製成之旗竿在適當的草地或灌木叢進行拖曳，將沾附上之蟬以鑷子移入石膏碳粉瓶中，置於 4°C 冰箱，準備進行鑑定及立克次體分離檢測。
3. 鼠類解剖：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 0.5 cm 置於 70%酒精之小管中，準備進行立克次體 PCR 檢測。

### 三、鼠體外節肢動物鑑定方法

1. 蟬：部份蟬浸泡於 70%酒精殺死後，置於 Leica MZ12 解剖顯微鏡下鑑定，蟬之分類方法參考鄭和姜(1991)、Yamaguti *et al.*(1971)及 Baker(1999)。
2. 跳蚤：將保存於 70 %酒精的蟲體置入水中 30 分鐘後，轉換成 5 % KOH 置於 45°C 烤箱 16-24 小時，冷卻後置於水中 30 分鐘，再以 10 % acetic acid 作用 5-10 分鐘，然後脫水 40 % 酒精 15 分鐘，70 % 酒精 2 小時，100% 酒精置換 2 次 2 小時後轉換成丁香油(clove oil)隔夜，再以加拿大膠(Canada balsam)封片，置於 45°C 烤箱 2 週。以 Olympus BX50 顯微鏡鏡檢。跳蚤之分類方法參考柳(1986)及 Hopkins and Rothschild(1953-1971)。
3. 蝨：當標本尚在酒精中時，以細針由腹面刺穿腹部，將標本置於 10 % KOH 於

4. 厲蟎及恙蟎：厲蟎由 70%酒精中取出，或將部份恙蟎浸泡於 70%酒精殺死，再置於去水 3~4 次每次 30 min。再將蟎類以 Berlese fluid 封片液(ASCO Lab. UK) 封片。以 Olympus BX50 顯微鏡鏡檢。厲蟎之分類方法參考 Jameson(1965)，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、鈎端螺旋體培養：將鼠檢體樣本以無菌針筒擠入含 5.0 ml EMJH 培養基 (Bacto Leptospira Medium Base EMJH, No.0794, Difco, Michigan, USA 及 Enrichment)並添加 5-fluorouracil (100-300 g/mL) 以抑制雜菌生長，將接種後之培養基置於 28-30°C 之培養箱中。每週 1 次以暗視野顯微鏡檢查，至少觀察 8 周，觀察是否分離出鈎端螺旋體。

五、鈎端螺旋體菌株：本計畫將採用 20 株鈎端螺旋體菌株：由潘銘正教授分讓之參考菌株 17 株及 89 年與 90 年間分離之人類臨床分離株 2 株 (CCF 及 CSY)；再加上本局 95 年度分離之人類臨床分離株 1 株。

六、細菌、鼠腎、鼠耳及蟬組織 DNA 之萃取

1. 鈎端螺旋體菌株：鈎端螺旋體菌株次培養於 EMJH 液體培養基以 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) 進行。取 1 ml 的液體培養基以 1,2000 g 離心 15 分鐘，去除上清，沈澱物加入 180 µl ATL 及 20 µl proteinase K，55°C 震盪作用 1 小時，染色體 DNA 萃取依照套組操作說明進行。
2. 非鈎端螺旋體之菌株：以 QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) 萃取染色體 DNA 並依照套組操作說明進行。
3. 鼠腎及鼠耳組織：以 DNeasy Tissue kit (QIAGEN) 進行。鼠腎及鼠耳樣本約 25 mg 加入 180 µl ATL 磨碎，再加入 20 µl proteinase K，55°C 震盪至少 3 小時，後依照套組操作說明進行。

#### 七、鈎端螺旋體及萊姆疏螺旋體即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR)

1. 即時 PCR 引子、探針、試劑與反應條件：

鈎端螺旋體 16S r-RNA 引子與探針序列與反應條件則是參考文獻(Ganoza *et al.*, 2006)。

LeptoF 5'-CCCGCGTCCGATTAG-3'

LeptoR 5'-TCCATTGTGGCCGRACAC-3'

Lepto probe 5'(FAM)CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC3'(BHQ)

萊姆疏螺旋體 hbb 引子與探針序列與反應條件則是參考文獻(Portnoi *et al.*, 2006)：

Probe:

hbb640: 5'-GTAAGGAAATTAGTTTATGTCTTT\*(red640)T-3'

hbbFluo2: 5'-CAATGTCTGACTTAGTAACCTTTGGTCTTCTTGA-3'(fluo)

Primer:

hbbBw: 5'-TAAGCTCTTCAAAAAAAGCATCTA-3'

本計畫將使用 Roche LightCycler 2.0 之儀器並配合 Roche LightCycler

FastStart DNA MasterHybPROBE 之 DNA 定量 PCR 試劑進行。

2. Real-time PCR 之靈敏度 (sensitivity) 測試：

將鉤端螺旋體參考菌株 *Leptospira interrogans* Icterohaemorrhagiae (CF1) 及萊姆疏螺旋體參考菌株 *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* 以 Petroff-Hausser Counting Chamber 計算原始菌量，重複計數取其平均值，之後以正常人的血漿做 10 倍序列之稀釋至  $10^2$  bacteria/ml。10 倍序列稀釋後的菌液利用 QIAamp DNA mini kit 萃取 DNA，之後進行一系列即時 PCR 分析。利用電腦計算出該 DNA 各稀釋倍數所得之  $C_p$  值與其所代表之粗估細菌數的相關曲線，作為日後各  $C_p$  值定性與定量之參考標準。

3. Real-time PCR 之特異性 (specificity) 測試：利用非鉤端螺旋體、非萊姆疏螺旋體之菌株萃取之 DNA 進行。

## 八、鼠類體外節肢動物 *Rickettsia* 屬之立克次體分離培養及檢測

### (一) L929 細胞繼代培養

1. 以  $37^\circ\text{C}$  水浴 preheat MEM 培養液及 0.25% Trypsin-EDTA。MEM 培養液的組成 (Minimum Essential Medium 1X+ Earle's salts+ L-Glutamine) 外加 4% FBS (Fetal Bovine Serum) 及 1% Antibiotic (Penicillin 10,000 units/ml, Streptomycin 10 mg/ml, Amphotericin 0.025 mg/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  $37^\circ\text{C}$  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

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% CO<sub>2</sub> 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  $5 \times 10^8$  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

8. 蓋上瓶蓋，但瓶蓋懸開，置入 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養一日以上。

### (三) 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. 每個微量離心管加入 50~100  $\mu$ 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。
4. 取前一日培養之 shell vial，每個 shell vial 加入 400  $\mu$ 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。

### (四) 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 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. 其餘步驟與四、(三)相同。

#### (五) *Rickettsia* 屬之立克次體 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 *Rickettsia* spp. 之 antibody 滴在 6 孔培養盤上，將風乾後的玻片反蓋在培養盤上，使 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 Laboratories



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 Leica DM2500 螢光顯微鏡檢視。

#### (六) *Rickettsia* 屬之立克次體 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 fuschin stock solution+5ml buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>))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 Olympus BX50 亮視野顯微鏡檢視。

#### (七) *Rickettsia* 屬之立克次體 nested-PCR 檢測

1. 參考 Choi *et al.*(2005)之方法，並略加修正。以 QIAamp DNA Mini

2. 前述蟬或恙蟲之研磨液 200  $\mu$ l 放入 1.5 ml 之 eppendorf tube，加入 200 $\mu$ l 的 Buffer AL，再加入 20  $\mu$ l proteinaseK，vortex 約 15 sec 後，置於 56°C 10 分鐘。稍微離心後，將附著於管壁上的 sample 集中，加入 200  $\mu$ l 的酒精(濃度 96-100%)。vortex 約 15 sec 後，稍微離心集中液體。
3. 其他鼠類體外節肢動物(厲蟎、跳蚤、蝨)以水脫去酒精後，單隻或數隻為一 pool 分別管置於 1.5 ml 微量離心管中，加入 180  $\mu$ l SPG buffer (3.0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck)，7.2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Merck)，40 mM L-glutamic acid (Sigma) 及 218 mM sucrose (Sigma)，pH 7.0)，再加入 20  $\mu$ l proteinase K，以拋棄式研磨棒研磨，vortex 後置於 56°C 下，隔夜處理。稍微離心後，加入 200 $\mu$ l 的 Buffer AL，置於 70°C 10 分鐘，稍微離心後，將附著於管壁上的 sample 集中，加入 200  $\mu$ l 的酒精(濃度 96-100%)。vortex 約 15 sec 後，稍微離心集中液體。
4. 切下鼠類肝臟、腎臟組織約 25mg，脾臟組織約 10mg，加入 20  $\mu$ l proteinase K，再加入 180 $\mu$ l 的 Buffer ATL，置於 70°C 10 分鐘，稍微離心後，將附著於管壁上的 sample 集中，加入 200  $\mu$ l 的酒精(濃度 96-100%)。vortex 約 15 sec 後，稍微離心集中液體。
5. 所有前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。
6. 小心打開蓋子，加入 500  $\mu$ 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

7. 小心打開蓋子，加入 500  $\mu\text{l}$  buffer AW2，蓋上蓋子後以 14000 rpm 離心 3 min，取下 QIAamp spin column，套入一 1.5 ml eppendorf tube 中，丟棄原 2 ml collection tube 及其中液體。
8. 小心打開蓋子，加入 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ，於  $70^\circ\text{C}$  中浸潤 5min，以 8000 rpm 離心 1min。此為 DNA 模板。
9. 偵測 *Rickettsia* 屬之立克次體的標的基因為 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)、citrate synthase (*gltA*)。
10. 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  $\mu\text{l}$  去離子水、10  $\mu\text{l}$  之 5X PCR buffer (Promega)、2  $\mu\text{l}$  之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200  $\mu\text{M}$ )、3  $\mu\text{l}$  之 25 mM  $\text{MgCl}_2$  (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、6  $\mu\text{l}$  之 3.3  $\mu\text{M}$  primer RpCS.877p：5'-GGGGGCCTGCTCACGGCGG-3' (購自 Mission Biotech) 及 primer RpCS.1258n：5'-AATGCAAAAAGTACAGTGAACA-3' (引子之終濃度為 400 nM)、3  $\mu\text{l}$  之 DNA 模板及 0.5  $\mu\text{l}$  酵素 Taq (Promega) (5 U/ $\mu\text{l}$ ) (終濃度為 2.5 U) 等之 PCR 反應液。PCR 反應流程為：先於  $95^\circ\text{C}$ ，預熱 5 min；再依序進行  $95^\circ\text{C}$  (15 s)/  $54^\circ\text{C}$  (15 s)/  $74^\circ\text{C}$  (30 s) 之循環，一共 35 循環；最後，於  $74^\circ\text{C}$  3 min 中止反應。第二次 PCR 反應液中引子更改為 3  $\mu\text{l}$  之 3.3  $\mu\text{M}$  primer RpCS.896：5'-GGCTAATGAAGCAGTGATAA-3' 及 primer RpCS.1233n：5'-GCGACGGTATACCCATAGC-3' (引子終濃度為 200 nM)，其餘反應液如同第一次。PCR 的反應流程中之溫度循環條件與第一次相同，一共進行 35 循環。

11. 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  $\mu$ l 去離子水、10  $\mu$ l 之 5X PCR buffer (Promega)、2  $\mu$ l 之 5 mM dNTPs (Promega) (終濃度為 200  $\mu$ M)、3  $\mu$ l 之 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega) (終濃度為 1.5 mM)、6  $\mu$ l 之 3.3  $\mu$ M primer rompB OF : 5'-GTAACCGGAAGTAATCGTTTCGTAA-3' (購自 Mission Biotech) 及 primer rompB OR : 5'-GCTTTATAACCAGCTAAACCACC-3' (引子之終濃度為 400 nM)、3  $\mu$ l 之 DNA 模板及 0.5  $\mu$ l 酵素 Taq (Promega) (5 U/ $\mu$ l) (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  $\mu$ l 之 3.3  $\mu$ M primer rompB SFG IF : 5'-GTTTAATACGTGCTGCTAACCAA-3', primer rompB SFG/TG IR : 5'-GGTTTGGCCCATATAACCATAAG-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。

12. 取 10  $\mu$ 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。

(八) *Rickettsia* 屬之立克次體即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR)

1. 即時 PCR 引子、探針、試劑與反應條件：

*Rickettsia* 屬之立克次體 17kDa 引子

**17kDa 142F: 5'-GGTATGAATAAACAAGGTACAGGAAC-3'**

**17kDa 447R: 5'-ATATTGACCAGTGCTATTTCTATAAG-3'**

**17kDa 139F: 5'-GGGTGGTATGAACAAACAAGGGACTG-3'**

**17kDa 378R: 5'-CGCCATTCTATGTTACTACCGCTAGG-3'**

**17kDa 133F: 5'-TGGTCAGAGTGGTATGAACAAACAAG-3'**

使用 STRATAGENE Mx3005P QPCR System 之儀器並配合 QIAGEN QuatiTect SYBR Green PCR Kit 之 DNA 定量 PCR 試劑進行。

九、*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。
3. 選殖之準備工作：取出冷藏之添加 kanamycin 之 plate，使回復至室溫並去除水滴。取出放置於-80°C 之 competent cell 解凍，放冰塊上備用，並打開 42°C 水浴槽。

(一)TOPO cloning reaction

1. 將預備進行 cloning 之 PCR 產物置於 0.2 cc 之 eppendorf 中，加入 1µl Salt solution (invitrogen, USA)，1µl TOPO vector (invitrogen, USA)，稍混合後靜置

2. 將作用後之混合物至於冰上。

## (二)Transforming 至 DH5 $\alpha$ -T1 Competent cell 中

1. 取 1.5cc 之 eppendorf，加入約 15 $\mu$ l 之 One shot chemically Competent *E.coli* (invitrogen, USA)，再加入 2 $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $^{\circ}$ 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。

## 十、親緣樹狀圖演化分析

鈎端螺旋體將依 Ganoza *et al.* 發表之論文進行 nested-PCR 反應(Ganoza *et al.*, 2006; Palaniappan *et al.*, 2005)，以取得近乎全長的 16S-rRNA 基因片段。萊姆疏螺旋體依 Rijpkema *et al.* 發表之論文進行 nested-PCR 反應( Rijpkema *et al.*, 1995)，以取得的 5S-23S RNA 基因片段。*Rickettsia* 屬之立克次體以 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)及 citrate synthase(*gltA*)為基因標的。進行定序後不同的鈎端螺旋體序列、萊姆疏螺旋體序列及 *Rickettsia* 屬之立克次體序列、以 Bioedit Ver 7.0 進行編輯，再以 MEGA 4 執行親緣樹狀圖分析。

## 結果

### 一、 宜蘭縣、花蓮縣及台東縣鼠類捕獲數

在 95 年至 98 年東部三縣完成宜蘭縣 2 次、花蓮縣 3 次及台東縣 3 次的調查，共捕獲鼠類 10 種共 415 隻，其中以小黃腹鼠數量最多 199 隻佔 47.95%，錢鼠其次 85 隻佔 20.48%(表一)。宜蘭縣小黃腹鼠佔絕對多數 86.67%(91/105)，花蓮縣捕獲鼠類 8 種種類最多，台東縣鼠類分佈較特殊，蘭嶼鄉僅捕獲小黃腹鼠 48 隻，綠島鄉則是錢鼠佔絕對多數 85%(51/60)，台東市、太麻里鄉、卑南鄉鼠種較多，以致台東縣整體而言錢鼠數量大於小黃腹鼠(表二)。

### 二、 宜蘭縣、花蓮縣及台東縣鼠類鉤端螺旋體調查

鼠類血清分別以 12 種鉤端螺旋體菌進行 MAT 血清學檢測，369 個血清樣本中 106 個呈現陽性，總抗體陽性率 28.7%。以縣市分，宜蘭縣 21.9% (23/105)，花蓮縣 32.5% (39/120)，台東縣 30.6% (44/144) (表三)。以鼠種區分，溝鼠(*R. norvegicus*) 50% (1/2)、刺鼠 (*Nivivente. coxingi*) 50% (1/2)、小黃腹鼠(*R. losea*) 41.4% (77/186)、鬼鼠(*B. indica*) 31.4% (12/37)、緬甸小鼠(*Rattus exulans*)18.5% (5/27)、錢鼠(*S. murinus*)13.6% (9/66)、赤背條鼠 (*A. agrarius*) 7.7% (1/13) 以及田鼯鼠(*M. caroli*)、家鼯鼠(*M. musculus*) 及赤腹松鼠(*Callosciurus erythraneus*) 0% (0/31、0/3 及 0/2) (表四)。除去僅有兩隻的溝鼠刺鼠，小黃腹鼠抗體陽性率最高，與 97 年離島結果相同。



宜蘭縣、花蓮縣及台東縣捕捉之 413 隻鼠類(2 隻赤腹松鼠只採血未採內臟檢體)以 real-time PCR 偵測其腎臟中鈎端螺旋體病原帶菌情形，其中 105 個檢體呈陽性，總帶菌率為 25.4% (表五、六)。以縣市分，花蓮縣帶菌率 36.1% (48/133)為最高，其次為台東縣 24.9% (44/177)，最低為宜蘭縣 12.6% (13/103) (表五)。以鼠種區分，刺鼠 50% (1/2)、鬼鼠 34.1% (15/44)、錢鼠 31.8% (27/85)、小黃腹鼠 24.1% (48/199)、赤背條鼠 23.1% (3/13)、緬甸小鼠 23.1% (6/26)、家鼯鼠 20 % (1/5)、以及田鼯鼠 10.8% (4/37)和溝鼠 0% (0/2) (表四)。共 33 個檢體成功以 16S nested PCR 序列分析，顯示均為致病性鈎端螺旋體菌(pathogenic *Leptospira*)(圖一)。

由鼠腎培養出鈎端螺旋體菌需新鮮檢體，從 98 年捕獲之 314 隻鼠類鼠腎檢體培養鈎端螺旋體菌株共 19 株，總培養陽性率 6.1%(表七、八)；其中宜蘭縣 11 株、花蓮縣 7 株，台東縣 1 株(表七)。以赤背條鼠培養率最高(15.4%)，其次為鬼鼠(13.3%)、小黃腹鼠(10.9%)及緬甸小鼠(3.8%)(表八)。鈎端螺旋體菌生長需 2~3 個月，因此台東縣 9 月份之檢體仍在培養中。

### 三、 宜蘭縣、花蓮縣及台東縣鼠類及硬蜱之萊姆疏螺旋體調查

萊姆疏螺旋體菌大多於節肢動物硬蜱 (*Ixodes*) 之 mid-gut 中存活。本實驗利用 hbb gene 為標的之 real-time PCR 偵測鼠類體外捕捉之蜱類是否帶有萊姆疏螺旋體菌。宜蘭、花蓮及台東縣共捕捉 24 隻粒形硬蜱(*I. granulatus*)，萊姆疏螺旋體病原感染總陽性率為 41.7%，依縣

市分別為 0% 及 80% 及 14.3%(表九)。顯示粒形硬蜱在台灣可能為萊姆疏螺旋體菌之媒介。

宜蘭縣、花蓮縣及台東縣捕捉之 413 隻鼠類以 hbb gene 為標的 real-time PCR 偵測其耳朵萊姆疏螺旋體病原帶菌情形，並無偵測出萊姆疏螺旋體菌。於 6 月份台東縣捕捉之田鼯鼠耳朵檢體成功分離出一株萊姆疏螺旋體(表十及十一)，以樹狀圖分析硬蜱及耳朵萊姆疏螺旋體分離株之序列，證實均為 *Borrelia valaisiana* (圖二)。

#### 四、莫拉克風災造成之鉤端螺旋體病檢測

98 年 8 月 8 日因莫拉克颱風爆發屏東縣萬丹鄉鉤端螺旋體群聚疫情，共收到 152 個疑似個案檢體，100 個二採 MAT 四倍上升，5 個二採陰性，12 個一採 MAT>100(表十二)。其中 6 個血液中以 real-time PCR 偵測出鉤端螺旋體病原，其中 5 位以 nested PCR 增幅取得鉤端螺旋體病原序列(human 621、626、642、737 及 744)(圖三)。82 個環境檢體(7 個漂流木、13 個土壤及 62 個家戶用水)中已完成 18 個檢體檢驗，共 9 個取得增幅片段，經選殖(cloning)後，每個增幅片段選擇 10 個 colony 進行序列分析、比對(圖三，例如 4-9 代表第四個環境檢體之增幅片段，經選殖後，第 9 個 colony)，樹狀圖顯示 9 個環境檢體均有致病性鉤端螺旋體菌存在(圖三)。

#### 五、宜蘭縣、花蓮縣及台東縣老鼠及其外寄生節肢動物 *Rickettsia* 屬立克次體調查

將所有採血成功的鼠類血清 391 支以 3 種立克次體抗原玻片(*R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. typhi*)進行檢測，結果如表十三及十四。除 2 隻赤腹松鼠(*Callosciurus erythraeus*)外，其他鼠種皆對斑點熱立克次體(*R. rickettsii*, *R. conorii*)有抗體反應，其中中型鼠及大型鼠如溝鼠、鬼鼠、小黃腹鼠及緬甸小鼠抗體陽性率皆超過 90%，小型鼠如家鼯鼠及田鼯鼠則小於 40%，錢鼠最低只有 5.80%。以數量最多的小黃腹鼠進行東部三縣比較，斑點熱抗體陽性率以宜蘭縣最高 100%(91/91)，其次為台東縣 90.91%(60/66)，花蓮縣最低 87.80%(36/41)，顯示宜蘭縣、花蓮縣及台東縣野外主要鼠類小黃腹鼠感染斑點熱立克次體情形非常嚴重。野外鼠類亦有感染地方性斑疹傷寒立克次體(*R. typhi*)的情形，宜蘭縣、花蓮縣及台東縣鼠類平均血清地方性斑疹傷寒立克次體抗體陽性率分別為 1.90%(2/105)、1.50%(2/133)及 1.31%(2/153)。其中 98 年 4 月在花蓮捕獲的赤背條鼠血清抗體陽性率為 15.38%(2/13)，特別值得關注。

為探究鼠類本身是否帶有 *Rickettsia* 屬立克次體，在各採集地點選取不同的鼠類 30 到 55 隻取其脾臟、肝臟及腎臟，以 120-135 kDa surface antigen (*OmpB*)及 citrate synthase(*gltA*)為基因標的，進行 nested-PCR 檢測。結果如表十五及十六，宜蘭縣、花蓮縣及台東縣鼠類脾肝腎臟中平均偵測出 *Rickettsia* 屬立克次體的比例為 87%、100%及 45%。宜蘭縣鼠類脾臟的感染率較高，花蓮縣鼠類肝臟的感染率較高，台東縣則較無差異。值得注意的是花蓮縣鼠類感染的情形非常高所有抽樣的 8 種鼠類都可檢測到。

鼠類是透過何種管道感染 *Rickettsia* 屬立克次體，由其體外節肢動物以 *OmpB* 及 *gltA* 為基因標的，進行 nested-PCR 檢測來瞭解。花蓮縣檢測 10 隻粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)，有 10% PCR 陽性；台東縣檢測 14 隻粒形硬蜱，PCR 陽性率 64%(表十七)，顯示粒形硬蜱可能為病媒。

恙蟲亦帶有 *Rickettsia* 屬立克次體，以 50 隻或 100 隻恙蟲為 1 池(pool)，宜蘭縣、花蓮縣及台東縣 PCR 陽性率分別為 32.5%、40.8%及 33.3%(表十八)。

98 年 4 月抽樣檢測花蓮縣所採獲無孔微棒蚤(*Stivalius aporus*)及印度鼠蚤(*Xenopsylla cheopis*)10 隻，結果無孔微棒蚤 PCR 陽性率為 25%(表十九)，宜蘭縣及台東縣並未採獲蚤類。

厲蝨(*Laelaps* spp.)為台灣地區常見鼠類寄生蝨類，宜蘭縣、花蓮縣及台東縣分別選取 40 至 50 隻檢測，PCR 陽性率分別為 0%、10%及 30%(表二十)。

合計東部三縣鼠類外寄生節肢動物 *Rickettsia* 屬立克次體感染情形，粒形硬蜱、恙蝨、無孔微棒蚤及厲蝨 PCR 的陽性率分別為 41.7%、37.2%、25%及 14.3%，顯示 *Rickettsia* 屬立克次體透過這些野外鼠類體外節肢動物在鼠類間循環，甚至可能傳給人類。

為瞭解台灣地區 *Rickettsia* 屬立克次體菌種及不同地理菌株，將捕捉鼠類部份外寄生之蜱及恙蟲進行 *Rickettsia* 屬立克次體 Shell vial 細胞

分離培養。蟬為單隻研磨接種，恙蟲則為 50 隻或 100 隻為一池(pool) 研磨接種。共計宜蘭縣接種恙蟲 40 池；花蓮縣接種蟬 10 隻、恙蟲 71 池；台東縣接種蟬 9 隻、恙蟲 45 池，經約 2 週培養後以 real-time PCR 檢測，僅於 95 年 9 月於台東縣蘭嶼鄉採獲之粒形硬蟬培養出一株斑點熱立克次體，經由幾個重要的基因如 16S rRNA, *gltA*, *OmpA*, *OmpB* 及 *sca4* 與目前已知斑點熱立克次體菌株序列不同，最近似的菌株為 *R. slovacica* 及 *R. honei*，研判為一株新的斑點熱立克次體菌株序列，定名為 *Rickettsia* spp. IG-1。

鼠類內臟組織、外寄生節肢動物及細胞分離培養液以 *OmpB* 及 *gltA* 為基因標的，進行 nested-PCR 檢測。PCR 產物定序後，以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 4.0 操作，採用 Neighbor-joining 方法，重覆計算(Bootstrap) 1,000 次，與重要的立克次體參考菌株一起進行親緣關係分析。宜蘭縣計有 17 個菌株進行 *OmpB* 基因片段序列分析，結果可分為 3 群，分別為近似 *R. conorii*、近似 *Rickettsia* sp. TwKM01 及近似 *R. typhi*，其中以近似 *R. conorii* 最多(圖四)。宜蘭縣有 36 個菌株進行 *gltA* 基因片段序列分析，結果分為 6 群，除近似 *R. conorii* 及近似 *R. typhi* 與 *OmpB* 相同外，另有近似 *Rickettsia* sp. IG-1、近似 *R. japonica*、近似 *R. felis* 及近似 *Rickettsia* sp. TwKM02，其中以近似 *R. typhi* 數量較多(圖五)。

花蓮縣計有 48 個菌株進行 *OmpB* 基因片段序列分析，結果可分為 5 群，分別為近似 *R. rickettsii*、近似 *Rickettsia* sp. IG-1、近似 *R. conorii*、近似 *Rickettsia* sp. TwKM01 及近似 *Rickettsia* sp. MB74-1，其

中以近似 *Rickettsia* sp. MB74-1 最多(圖六)。花蓮縣有 62 個菌株進行 *gltA* 基因片段序列分析，結果可分為 6 群除近似 *Rickettsia* sp. IG-1、近似 *R. rickettsii* 及近似 *R. conorii* 3 群與 *OmpB* 相同外，另尚有近似 *R. japonica*、近似 *R. typhi* 及近似 *Rickettsia* sp. TwKM02，其中以近似 *R. japonica* 最多(圖七)。

台東縣計有 30 個菌株進行 *OmpB* 基因片段序列分析，結果可分為 5 群，分別為近似 *Rickettsia* sp. IG-1、近似 *R. rickettsii*、近似 *R. conorii*、近似 *Rickettsia* sp. TwKM01 及近似 *Rickettsia* sp. MB74-1，其中以近似 *Rickettsia* sp. IG-1 最多(圖八)。台東縣有 36 個菌株進行 *gltA* 基因片段序列分析，結果可分為 6 群除近似 *Rickettsia* sp. IG-1、近似 *R. rickettsii* 及近似 *R. conorii* 3 群與 *OmpB* 相同外，另尚有近似 *R. typhi*、近似 *Rickettsia* sp. TwKM02 及近似 *R. felis*，其中以近似 *Rickettsia* sp. IG-1 及近似 *Rickettsia* sp. TwKM02 最多(圖九)。

## 討論

在 95 年 5 月至 98 年 9 月東部三縣 8 次的調查中，宜蘭縣、花蓮縣及台東縣捕獲鼠類 10 種共 415 隻，種類較離島的金、馬、澎湖只有 5 種為多，除小黃腹鼠、溝鼠、家鼯鼠、田鼯鼠及錢鼠外，尚捕獲鬼鼠、緬甸小鼠、赤背條鼠及刺鼠，甚至還有 2 隻赤腹松鼠。花蓮縣可捕獲 8 種鼠類，顯示棲地的多樣性，鼠種較多，但優勢種仍是小黃腹鼠及錢鼠與外島三縣相同。

今年東部地區鼠類鉤端螺旋體總血清抗體陽性率為 28.7% (106/369)，高於潘銘正老師 95 年度計畫結果之 11.49% (64/557，台灣各區)及 14.28% (9/63，東部地區)，其捕捉之鼠類以溝鼠最多，錢鼠次之，小黃腹鼠只有 5 隻。是由於其東部地區捕捉之樣本數較少，亦或捕捉之鼠種分布不同(本計畫捕捉最多為小黃腹鼠)，還是台灣地區鼠類鉤端螺旋體盛行率持續增加中，期待 99 年(明年)完成西部地區監測，有完整結果後，能有定論。

本計畫兩年來從硬蜱中偵測之萊姆疏螺旋體均為 *Borrelia Valaisiana*，而本年度分離出疾管局第一個本土萊姆疏螺旋體菌株，經序列比對後亦為 *Borrelia Valaisiana*，與 Masuzawa 等人在台灣的研究相同。國防師健民教授於鼠耳培養及硬蜱偵測出之萊姆疏螺旋體為 *Borrelia burgdorferi sensu stricto*，而我們偵測培養之 *Borreia valaisiana* 是否具致病性導致萊姆病的發生仍不清楚，因此台灣是否有萊姆病存在，爭議尚待解決。除仍需持續觀察與監測外，本土菌株的分離取得，對於台灣萊

姆病的檢驗將更有助益。

台灣地區經由節肢動物傳播的立克次體病首推恙蟲病，其次為地方性斑疹傷寒，兩者每年皆有數百及數十名確定病例，然而尚有為數眾多的不明熱患者雖經法定傳染病病原檢測，卻仍無法診斷出病原體，這些病例中有沒有可能是斑點熱患者，是本研究想要探討的問題。斑點熱立克次體病為全球性分布之節肢動物所媒介的重要傳染病，目前已報告該病發生的國家及地區高達 50 餘個，包括洛磯山斑點熱、蒲東熱、肯亞蜱熱、昆士蘭蜱熱、立克次體痘、日本斑點熱、北亞蜱熱、澳洲斑點熱、非洲蜱咬熱及蚤媒斑點熱等(Parola *et al.*, 2005)。斑點熱立克次體病的宿主動物主要以野生小型哺乳動物為主，包括齧齒目、食蟲目、兔形目及部份鳥類。另外，部份家畜如牛、羊、兔、駱駝等也可能做為宿主動物，本研究首先即檢測野外鼠類之斑點熱立克次體抗體陽性率。宜蘭縣兩次調查的差別不大，斑點熱立克次體抗體的盛行率皆達 96% 以上，僅 98 年 8 月發現在小黃腹鼠有 4.44% *R. typhi* 的感染。花蓮縣則在 98 年 4 月捕獲相當多的鼠種，其原因為較前兩次增加使用 Sherman 鼠籠，使中小型鼠類的捕獲率增加。3 次調查發現所有鼠類斑點熱立克次體抗體的盛行率在 98 年 4 月降低為 69%，其是因不同鼠種對斑點熱立克次體的感染率不同，中大型鼠類如溝鼠、鬼鼠、小黃腹鼠及緬甸小鼠抗體陽性率皆超過 90%，小型鼠如家鼯鼠及田鼯鼠則小於 40%，而錢鼠最低只有 5.80%。因此如捕獲小型鼠多即會使整體鼠類的感染率降低。在台東縣也有相同情形，95 年 9 月在蘭嶼，全部捕獲為小黃腹鼠，斑點熱立克次體抗體陽性率為 89.58%(43/48)；98 年 6 月在台東市、卑南鄉、太麻里鄉，及 98 年 9 月在



綠島鄉捕獲小黃腹鼠的比率較少，錢鼠較多，因此後兩次調查整體鼠類斑點熱立克次體抗體陽性率只有 36%(18/50)及 20%(11/55)。因此以東部三縣捕獲數量最多的小黃腹鼠來進行比較較為客觀，小黃腹鼠斑點熱立克次體抗體陽性率以宜蘭縣最高 100%(91/91)，其次為台東縣 90.91%(60/66)，花蓮縣最低 87.80%(36/41)。整體小黃腹鼠斑點熱立克次體抗體陽性率為 94.44%(187/198)與連江縣、金門縣及澎湖縣小黃腹鼠斑點熱抗體陽性率 94.46%(324/343)幾乎相同。

相較於亞洲其他國家日本鼠類平均抗 *R. japonica* 之抗體陽性率為 75%(539/716)，泰國鼠類平均抗 *R. sibirica* TT-118 之抗體陽性率為 62.2%(Ishikura *et al.*, 1992, Okabayashi *et al.*, 1996)，此兩國家皆有斑點熱病例，因此台灣極有可能也存在。

斑點熱立克次體為一群經節肢動物叮咬傳播的絕對細胞內寄生菌，在野生動物與節肢動物間循環，有著疫源性的特徵，因此必需以當地流行的菌株為抗原進行免疫螢光染色，才能得到正確的感染情形，如日本的 *R. japonica* 及泰國的 *R. sibirica* TT-118。台灣的研究早期一篇人群血清盛行率調查報告為 Takada *et al.*(1994)在台南的調查為 3.5-4.4%，是以 *R. japonica* 及 *R. sibirica* 為抗原，蔡等(2008)去年在台北縣貢寮鄉的血清流行病學調查，住民斑點熱 IgG 抗體盛行率為 3.09%(8/259)，使用抗原為 *R. rickettsii* 及 *R. conorii*。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，12 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* (1:512), *R. rickettsii* (1:4,096), *R. australis* (1:512), *R. montanensis* (1:256), *R. honei* (1:1,024), *R. japonica* (1:256), *R. typhi* (1:64), *R. canadensis* (1:64), *R. massiliae* (1:128), *R. belli* (1:64), *R. conorii* (1:128) 及 *R. akari* (1:1,028); 另 5 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* (1:512), *R. honei* (1:512), *R. japonica* (1:64), *R. massiliae* (1:256) 及 *R. conorii* (1:4,096)。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，同時 *R. rickettsii* 與其他 *Rickettsia* 屬立克次體產生之抗體發生交互作用的比率較 *R. conorii* 高，從本研究中也得到相同結果。在東部三縣全部檢測的鼠類血清檢體中，*R. rickettsii* 及 *R. conorii* 重覆感染的比率為 58.06%(227/391)，*R. rickettsii* 及 *R. conorii* 單獨感染的比率分別為 10.74%(42/391) 及 2.05%(8/391)，顯示雖然此二抗原對其他 *Rickettsia* 屬立克次體產生之抗體有很高的比率發生交互作用，但其對於台灣地區 *Rickettsia* 屬立克次體的涵蓋率仍有待分離出台灣地區之斑點熱立克次體才得以驗證。

鼠類能否成為 *Rickettsia* 屬立克次體的宿主端視其體內能否保存、增殖此病原體，本研究由檢測鼠類主要器官脾、肝及腎臟著手。結果發現除赤腹松鼠未檢測外，所有檢測的 9 種鼠類其內臟皆可檢測出 *Rickettsia* 屬立克次體，宜蘭縣、花蓮縣及台東縣整體的鼠類內臟 *Rickettsia* 屬立克次體感染率為 87%、100% 及 45%，台東縣較低是由於蘭嶼及綠島捕獲的 35 隻鼠類感染率較低。相較於連江縣、金門縣及澎湖縣鼠類內臟 *Rickettsia* 屬立克次體 70%、70% 及 43% 感染率，東部地區感染情形較嚴重。

中國大陸在黑龍江、內蒙古、新疆、浙江及貴州檢測 20 種 473 隻鼠類，結果有 12 種 69 隻鼠類在脾臟檢測出斑點熱立克次體，陽性率為 14.6%，5 個地區陽性率分別為 3.1%、21.6%、30.0%、10.8%及 21.4%(黃等，2006)，台灣東部及外島六縣的鼠類內臟檢出率相較下較高可能與使用 nested-PCR 檢測較靈敏有關。

斑點熱立克次體是由節肢動物所傳播，東部地區鼠類有如此高的斑點熱立克次體抗體陽性率應與其體外寄生之節肢動物(蝨、蟬、蚤)有關，由表十七至二十的結果也證實此點。雖然東部三縣採獲的蟬種類數量都較外島三縣低，但粒形硬蟬的 *Rickettsia* 屬立克次體感染率 41.7%(10/24) 較外島 14.9%(11/74) 為高。東部三縣採獲的恙蟲其 *Rickettsia* 屬立克次體感染率 37.2%(58/156)，亦較外島三縣 30.9%(50/162) 為高。厲蝨部份則為外島三縣 40%(12/30) 較東部三縣 14.3%(4/28) 高；跳蚤僅在花蓮採獲，其 *Rickettsia* 屬立克次體感染率 20%(2/10) 較外島三縣 37%(10/27) 低。

目前文獻中檢測出攜帶斑點熱立克次體的節肢動物種類為數眾多且具有地域性，其中多數為蟬，如日本已知有 9 種蟬檢測出斑點熱立克次體，包括褐黃血蟬(*Haemophysalis flava*)、豪豬血蟬(*H. hystericis*)、龜形花蟬(*Amblyomma testudinarium*)、長角血蟬(*H. longicornis*)、卵形硬蟬(*I. ovatus*)、具角血蟬(*H. cornigera*)、台灣革蟬(*Dermacentor taiwanensis*)、全溝硬蟬(*I. persulcatus*)及單刺硬蟬 *I. monospinosus*(Mahara, 2006)。而中國大陸已知至少有 14 種蟬檢測出斑點熱立克次體，包括草原革蟬(*D. nuttallii*)、邊緣革蟬(*D. marginatus*)、森林革蟬(*D. silvarum*)、銀盾革蟬(*D. niveus*)、中華革蟬(*D. sinicus*)、金澤革蟬(*D. auratus*)、嗜群血蟬(*H.*

*concinna*)、日本血蜱(*H. japonica*)、長角血蜱(*H. longicornis*)、越原血蜱(*H. yeni*)、徽上血蜱(*H. wellingtoni*)、亞東璃眼蜱(*Haylomma asiaticum*)、粒形硬蜱(*I. granulatus*)及微小牛蜱(*Boophius microplus*)(張, 1999)。台灣在文獻記載有 32 種蜱, 除本研究發現粒形硬蜱外應有可能在其他蜱種帶有斑點熱立克次體。

恙蟎為恙蟲病之媒介, 雖然 Choi *et al.*(2007)已發現在韓國恙蟎攜帶有斑點熱立克次體, 本研究發現在宜蘭縣、花蓮縣及台東縣之恙蟎亦發縣現帶有斑點熱立克次體, 由於恙蟎在東部三縣數量多、且發生時間長, 可能為斑點熱立克次體在鼠類間傳播的最主要媒介。而無孔微棒蚤(*Stivalius aporus*)為台灣東部野鼠常見的跳蚤, 為首次發現斑點熱立克次體的存在。東部地區鼠類血清有很高的斑點熱立克次體抗體, 鼠類內臟中高比率的感染 *Rickettsia* 屬立克次體, 而上述這些鼠類體外節肢動物在鼠與鼠間傳播 *Rickettsia* 屬立克次體扮有重要角色, 至於能否傳給人成為病媒, 尚待進一步研究。

全世界目前發現的斑點熱立克次體菌株已超過 50 種, 其中已知的致病株有 15 種, 如 *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. australis*, *R. akari*, *R. japonica*, *R. sibirica*, *R. honei*, *R. africae*, *R. slovac*, *R. heilongjiangensis*, *R. aeschlimannii*, *R. parkeri*, *R. massiliae*, *R. marmionii* 及 *R. felis*, 除此之外更有為數眾多的菌株尚未發現其致病性且數量持續在增加中(Parola *et al.*, 2005)。由 Parola *et al.*(2005)報告中可發現, 斑點熱立克次體的研究多侷限在歐洲、非洲、北美洲、美亞及東亞, 因此發現的菌株也以這些地區較多, 如日本有 3 個菌株 *Rickettsia japonica*, *R. tamurae* 及 *R.*

*asiatica*(Uchida *et al.*, 1992 ; Fournier *et al.*, 2006 ; Fujita *et al.*, 2006) ; 中國大陸有 4 個菌株 *R. sibirica*, *R. heilongjiangii*, *R. mongolotimonae* 及 *R. hulinii*(Zhang *et al.*, 2000) , 而東南亞及澳洲近年來則於泰國及澳洲發現 *R. honei* ; 於澳洲發現 *R. australis*(Kollars, Tippayachai and Bodhidatta, 2001 ; Stenos *et al.*, 1998 ; Stewart, 1991) 。台灣在這方面的研究尚在起步 , Tsui *et al.*(2007)報告於鑷形扇頭蜱發現 *Rickettsia* sp. TwKM01 ; 於地里恙蟎發現 *Rickettsia* sp. TwKM02 ; 於地里恙蟎、粒形硬蜱及中氣門亞目節肢動物發現 *Rickettsia* sp. TwKM03 , 此 3 株斑點熱立克次體的致病性尚不清楚。本研究於 95 年 9 月於台東縣蘭嶼鄉採獲之粒形硬蜱培養出一株斑點熱立克次體 , 經由幾個重要的基因如 16S rRNA(*rrs*), *gltA*, *OmpA*, *OmpB* 及 *sca4* 與目前已知斑點熱立克次體菌株序列不同 , 最近似的菌株為 *R. slovacica* 及 *R. honei* , 研判為一株新的斑點熱立克次體菌株序列 , 定名為 *Rickettsia* spp. IG-1 。 *R. slovacica* 經由邊緣革蜱(*Dermacentor marginatus*)及網紋革蜱(*D. reticulatus*)傳播蜱媒淋巴腺病(TIBOLA) , 主要分布於歐洲 (Raoult *et al.*, 1997) ; *R. honei* 分布較廣 , 包括東南亞、澳洲及北美 , 在不同蜱種如 *Aponomma hydrosauri*, *Amblyomma cajennense*, 粒形硬蜱及 *Haemaphysalis novaeguineae* 皆曾發現(Kollars *et al.*, 2001; Stenos *et al.*, 1998; Lane *et al.*, 2005; Billings *et al.*, 1998; Jing *et al.*, 2005) 。

宜蘭縣、花蓮縣及台東縣老鼠內臟組織、外寄生節肢動物及細胞分離培養液以 *OmpB* 及 *gltA* 部份序列為基因標的 , 與重要的立克次體參考菌株一起進行親緣關係分析。結果由親緣關係樹的分枝 , 與重要的立克次體參考菌株的相似度可將東部三縣所檢測到的 229 個菌株可分為 9 群

(group)：近似 *R. conorii*(相似度 97.9-100%)、近似 *R. rickettsii*(相似度 99.0-100%)、近似 *Rickettsia* sp. IG-1(相似度 99.0-100%)、近似 *Rickettsia* sp.TwKM01(相似度 96.9-100%)、近似 *Rickettsia* sp.MB74-1(相似度 97.6-98.1%)、近似 *R. felis*(相似 100%)、近似 *R. typhi*(相似度 97.3-100%)、近似 *R. japonica*(相似度 98.7-100%)及近似 *Rickettsia* sp.TwKM02(相似度 98.7-100%)。其中以近似 *R. conorii* group 出現的機率最高 23.1%(53/229)，在 6 個親緣關係分析中皆出現，與外島三縣優勢的情形相同 28.6%(57/199)，其次為近似 *Rickettsia* sp. IG-1 group 20.5%(47/229)。在外島三縣常出現的近似 *R. rickettsii* group 26.1%(52/199)反倒較少出現為 4.8%(11/229)，此種情形由鼠類血清學的檢測中也獲得印證。外島三縣鼠類血清抗 *R. rickettsii* 陽性而抗 *R. conorii* 陰性為 16.24%(76/468)，而東部三縣鼠類血清抗 *R. rickettsii* 陽性而抗 *R. conorii* 陰性為 10.74%(42/391)；相反的情形，鼠類血清抗 *R. rickettsii* 陰性而抗 *R. conorii* 陽性在外島及東部分別為 1.28%(6/468)、2.05%(8/468)，差異不大，反應出近似 *R. rickettsii* group 較少出現於東部。其他如 *R. felis*、*R. typhi* 及 *R. japonica* 都是 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 抗原玻片可以產生交互作用的菌株，此或許可以解釋為何宜蘭縣、花蓮縣及台東縣鼠類血清抗 *R. conorii* 的陽性率如此的高。而其他近似 *Rickettsia* sp.TwKM01、近似 *Rickettsia* sp.MB74-1 及近似 *Rickettsia* sp.TwKM02 很可能為新的菌株，這些菌株與 *R. rickettsii* 及 *R. conorii* 抗原玻片的交互作用情形，有待進一步確認，才能確保斑點熱檢測之完整性。另外 *R. rickettsii*、*R. conorii* 及 *R. felis* 都是致病株，有些菌株在 *OmpB* 及 *gltA* 部份序列的比對為與 *R. rickettsii*、*R. conorii* 及 *R. felis*100%相同，是否確實有這些致病株在鼠類及其外寄生節肢動物散

佈，都值得進一步研究。

由斑點熱立克次體在不同外寄生節肢動物及內臟組織之分佈亦有一些新的發現，如表二十一顯示 9 種 *Rickettsia* 屬立克次體菌株群中，近似 *Rickettsia* sp. IG-1 group 分佈最廣，除無孔微棒蚤外其他外寄生節肢動物及鼠類脾肝腎臟皆發現，其次為近似 *R. conorii* 菌株在恙蟎、粒形硬蜱、及鼠類脾肝腎臟發現，其他菌株也在不同外寄生節肢動物及鼠類脾肝腎臟發現，唯有近似 *Rickettsia* sp.MB74-1 只發現於恙蟲，近似 *R. felis* 只發現於鼠類脾及肝臟。近似 *R. felis* 菌株曾在金門恙蟎、粒形硬蜱及澎湖的恙蟎發現，而近似 *Rickettsia* sp.MB74-1 菌株也僅發現於金、馬、澎湖的恙蟲，似乎顯示近似 *Rickettsia* sp.MB74-1 菌株較不具致病性。*Rickettsia* sp.MB74-1 菌株為 Choi *et al.*(2007)在韓國恙蟎發現，顯示恙蟎中有一群共生的斑點熱立克次體。

## 結論與建議

1. 本年度東部捕捉之野鼠種類較 97 年離島為多，新增了鬼鼠、緬甸小鼠、刺鼠及赤背條鼠。本年度監測台灣東部三縣野鼠鉤端螺旋體血清盛行率及感染率均以花蓮縣最高，其次為台東縣、宜蘭縣。因此台灣東部野鼠亦可成為鉤端螺旋體菌傳染窩。
2. 粒形硬蜱為萊姆疏螺旋體菌之媒介，偵測台灣東部捕捉之粒形硬蜱中之萊姆疏螺旋體菌，經基因序列分析顯示與 *Borrelia valaisiana* 屬同一群系，此結果與 97 年度離島及 Dr. Mazusawa 從台灣野鼠分離出之萊姆疏螺旋體菌十分相近。本年度分離出之萊姆疏螺旋體 *Borrelia Valaisiana* 未來將用於臨床檢驗上，加強萊姆病的監測。
3. 莫拉克風災造成之鉤端螺旋體疫情顯示地下水為可能的致病源。由於鉤端螺旋體病無特定典型症狀，不易判斷，此次的經驗可提供未來類似情況發生時之借鏡。
4. 小黃腹鼠為東部三縣數量最多的鼠種，斑點熱立克次體抗體陽性率以宜蘭縣最高 100%(91/91)，其次為台東縣 90.91%(60/66)，花蓮縣最低 87.80%(36/41)，顯示宜蘭縣、花蓮縣及台東縣野外主要鼠類小黃腹鼠感染斑點熱立克次體情形非常嚴重。
5. 東部三縣野外鼠類亦有感染地方性斑疹傷寒立克次體(*R. typhi*)的情形，宜蘭縣、花蓮縣及台東縣鼠類平均血清地方性斑疹傷寒立克次體抗體陽性率分別為 1.90%(2/105)、1.50%(2/133)及 1.31%(2/153)。其中 98 年 4 月在花蓮捕獲



6. 宜蘭縣、花蓮縣及台東縣鼠類脾肝腎臟中平均偵測出 *Rickettsia* 屬立克次體的比例為 87%、100%及 45%。宜蘭縣鼠類脾臟的感染率較高，花蓮縣鼠類肝臟的感染率較高，台東縣則較無差異。值得注意的是花蓮縣鼠類感染的情形非常高所有抽樣的 8 種鼠類都可檢測到。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。
7. 東部三縣鼠類外寄生節肢動物 *Rickettsia* 屬立克次體感染情形，粒形硬蜱、恙蟎、無孔微棒蚤及厲蟎 PCR 的陽性率分別為 41.7%、37.2%、25%及 14.3%，顯示 *Rickettsia* 屬立克次體透過這些野外鼠類體外節肢動物在鼠類間循環，甚至可能傳給人類。
8. 於台東縣蘭嶼鄉採獲之粒形硬蜱培養出一株斑點熱立克次體，經由幾個重要的基因如 16S rRNA, *gltA*, *OmpA*, *OmpB* 及 *sca4* 與目前已知斑點熱立克次體菌株序列不同，最近似的菌株為 *R. slovaca* 及 *R. honei*，研判為一株新的斑點熱立克次體菌株序列，定名為 *Rickettsia* spp. IG-1。
9. 宜蘭縣、花蓮縣及台東縣鼠類內臟組織、外寄生節肢動物及細胞分離培養液以 *OmpB* 及 *gltA* 部份序列為基因標的，與重要的立克次體參考菌株一起進行親緣關係分析。結果由所檢測到的 229 個菌株可分為 9 群(group)，其中以近似 *R. conorii* group 出現的機率最高 23.1%(53/229)。

## 計畫重要研究成果及具體建議

1. 本次實驗分離出 19 株鈎端螺旋體菌，隸屬 pathogenic *Leptospira*，未來將其加入臨床 MAT 檢驗之菌株 pannel 中，以期能更正確進行台灣鈎端螺旋體之血清流行病學分析。
2. 從 97 年監測顯示台灣地區的確有粒形硬蜱可作為萊姆疏螺旋體菌之媒介，偵測出之萊姆疏螺旋體病原 *Borrelia Valaisiana* 與美國流行株不同。因此本年度成功從鼠耳分離出之萊姆疏螺旋體 *Borrelia Valaisiana*，更加證明台灣流行的萊姆病病原有別於美國，除原有檢驗試劑外，未來將加上此本土分離株以強化檢驗能量。
3. 因應本計劃建立之鈎端螺旋體 real-time PCR 及 nested PCR 偵測已應用至莫拉克風災疫情，除人體檢體外，環境檢體的偵測也發揮效能。研究成果實際應用於防疫工作上，能及時發現確定病例，尋找感染源，進行緊急防治工作，防止疫情的擴散。
4. 宜蘭縣、花蓮縣及台東縣鼠類身上檢測出抗斑點熱立克次體抗體陽性率非常高，平均達 70.84%，同時鼠體外寄生之節肢動物如蜱、恙蟎、跳蚤及厲蟎皆檢測出斑點熱立克次體，而老鼠脾肝腎臟亦檢出斑點熱立克次體，顯示斑點熱立克次體確實存在於東部三縣的鼠類及其體外寄生之節肢動物，因此應提醒醫師注意患者是否有斑點熱的相關症狀如發熱、畏寒、丘疹及焦痂等，以便及早通報，同時實驗室也應開發更敏感的檢測方法，以期偵測此病的發生。
5. 鼠類及其外寄生節肢動物所帶的病原體多，民眾仍應防範鼠類避免與鼠類接觸，同時加強滅鼠，如被蜱、蟎或跳蚤叮咬，應注意叮咬後的反應及早

6. 文獻中尚未發現無孔微棒蚤(*Stivalius aporus*)帶有斑點熱立克次體，本研究為首次發現。
7. 本研究分離出一株新的斑點熱立克次體菌株 *Rickettsia* spp. IG-1，同時發現此菌株及其近似種類廣泛分佈於東部三縣蜚、恙蟎、厲蟎及鼠類肝脾腎中，甚至連江縣及澎湖縣的恙蟎及鼠脾亦曾發現，應更進一步進行特性分析以瞭解其致病的可能性。

## 參考文獻

- 王正雄。1999。家鼠防治學。中華環境有害生物防治協會。台北。240 頁
- 未具名。2009。2008 年 12 月份全國甲乙丙類傳染病疫情動態簡介。疾病監測 24(1): 5。
- CDC, 2005. Interim guidance for minimizing risk for human lymphocytic choriomeningitis virus infection associated with rodents. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 5;54(30):747-9.
- Amman B. R., 2007. Pet rodents and fatal lymphocytic choriomeningitis in transplant patients. Emerg Infect Dis. 13(5):719-25.
- Levett, P.N. (2001). Leptospirosis. Clinical microbiology reviews 14, 296-326.
- Faine, S. (1994). Leptospira and leptospirosis. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Brandling-Bennett, A.D., and F. Pinheiro (1996). diseases in Latin America and the Caribbean: are they really emerging and increasing? Emerg Infect Dis 2, 59-61.
- Seijo, A., Coto, H., San Juan, J., Videla, J., Deodato, B., Cernigoi, B., Messina, O.G., Colli, O., de Bassadoni, D., Shtirbu, R., *et al.* (2002). Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. Emerging infectious diseases 8, 1004-1005.
- Johnson, M.A., Smith, H., Joeph, P., Gilman, R.H., Bautista, C.T., Campos, K.J., Cespedes, M., Klatsky, P., Vidal, C., Terry, H., *et al.* (2004). Environmental exposure and leptospirosis, Peru. Emerging infectious diseases 10, 1016-1022.
- Chaudhry, R., Premlatha, M.M., Mohanty, S., Dhawan, B., Singh, K.K., and Dey, A.B. (2002). Emerging leptospirosis, North India. Emerging infectious diseases 8, 1526-1527.
- Laras, K., Cao, B.V., Bounlu, K., Nguyen, T.K., Olson, J.G., Thongchanh, S., Tran, N.V., Hoang, K.L., Punjabi, N., Ha, B.K., *et al.* (2002). The importance of leptospirosis

- in Southeast Asia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 67, 278-286.
- Sejvar, J., Bancroft, E., Winthrop, K., Bettinger, J., Bajani, M., Bragg, S., Shutt, K., Kaiser, R., Marano, N., Popovic, T., *et al.* (2003). Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerging infectious diseases* 9, 702-707.
- Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P., and Haake, D. (2004). Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol* 7, 35-40.
- Morey, R.E., Galloway, R.L., Bragg, S.L., Steigerwalt, A.G., Mayer, L.W., and Levett, P.N. (2006). Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of clinical microbiology* 44, 3510-3516.
- Matthias, M.A., Diaz, M.M., Campos, K.J., Calderon, M., Willig, M.R., Pacheco, V., Gotuzzo, E., Gilman, R.H., and Vinetz, J.M. (2005). Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 73, 964-974.
- 行政院衛生署疾病管制局 (2002). 鉤端螺旋體病臨床症狀、診斷及治療指引.
- Saravanan, R., Rajendran, P., Thyagarajan, S.P., Smythe, L.D., Norris, M.A., Symonds, M.L., and Dohnt, M.F. (2000). *Leptospira autumnalis* isolated from a human case from Avadi, India, and the serovar's predominance in local rat and bandicoot populations. *Annals of tropical medicine and parasitology* 94, 503-506.
- Vinetz, J.M., Glass, G.E., Flexner, C.E., Mueller, P., and Kaslow, D.C. (1996). Sporadic urban leptospirosis. *Annals of internal medicine* 125, 794-798.
- Yeh, Y., and Young, S. (1966). Isolation of *Leptospira* from wild rats in Taiwan. *Memoir of College of Agriculture, National Taiwan University*, 184-195.

- Fresh, J.W., Tsai, C.C., Lai, C.H., and Chang, C.T. (1968). Leptospirosis in man and rodents on Taiwan. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 17, 760-768.
- 邱鴻英。2000 台灣地區國際港埠鼠隻鉤端螺旋體血清流行病學調查。應用流行病學人才訓練及養成計劃第十三期學員研究報告。行政院衛生署疾病管制局。
- 吳尚瀚。2007 台中地區小型哺乳動鉤端螺旋體感染調查暨應用恆溫式圈環型核酸增幅法進行鉤端螺旋體 *lipL* 32 基因偵測。國立中興大學獸醫學公共衛生學研究所碩士論文。
- Stanek, G., and Strle, F. (2003). Lyme borreliosis. *Lancet* 362, 1639-1647.
- Steere, A.C. (1989). Lyme disease. *The New England journal of medicine* 321, 586-596.
- Steere, A.C., Bartenhagen, N.H., Craft, J.E., Hutchinson, G.J., Newman, J.H., Rahn, D.W., Sigal, L.H., Spieler, P.N., Stenn, K.S., and Malawista, S.E. (1983). The early clinical manifestations of Lyme disease. *Annals of internal medicine* 99, 76-82.
- Lennette, E. H, Halonen, P. and Murphy, F. A. 1988. Laboratory diagnosis of infectious diseases. Principles and Practice Vol. II. pp 865-890. Springer-Verlag New York Inc.
- Marmion, B.P. 1990. Rickettsial diseases of man and animals. Pp 674-689. Edward Arnold, London.
- 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.
- Parola, P., C. D. Paddock and D. Raoult. 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbio. Rev.* 18(4): 719-756.
- Brouqui, P., P. Parola, P. E. Fournier and D. Raoult. 2007. Spotted fever rickettsioses in

- southern and eastern Europe. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 49: 2-12.
- Tsai, K. H., H. C. Wang, C. H. Chen, J. H. Huang, H. Y. Lu, C. L. Su, and P. Y. Shu. 2008. 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. 79(2):256-61.
- Tsai, K. H., H. Y. Lu, J. H. Huang, P-E. Fournier, O. Mediannikov, D. Raoult and P. Y. Shu. 2009a. African tick bite fever in a Taiwanese traveler returning from South Africa: molecular and serologic studies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 81(5):735-39.
- Takada, N., Fujita, H., Yano, Y., Huang W. H. Khamboonruang C. 1993. Serosurveys of spotted fever and murine typhus in local residents of Taiwan and Thailand compared with Japan. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 24(2):354-6.
- Tsai, Y. S., Y. H. Wu, P. T. Kao., and Y. C. Lin. 2008. African tick bite fever. J. Formos. Med. Assoc. 107:73-76.
- Tsai, K. H., H. Y. Lu, J. J. Tsai, S. K. Yu, J. H. Huang, P. Y. Shu. 2009b. Human Case of *Rickettsia felis* Infection, Taiwan. Emerg Infect Dis; 14: 1970-1972.
- Tsai K. H., H. Y. Lu, J. H. Huang, P. J. Wang, H. C. Wang, C. G. Huang, W. J. Wu, P. Y. Shu. 2009c. *Rickettsia felis* in Cat Fleas in Taiwan. Vector Borne Zoonotic Dis. 9(5): 561-563.
- 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., H. Fujita, N. Takada and D. Raoult. 2002. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. J. Clin. Microbiol. 40: 2176-2181.
- 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.
- Lee, J. H., H. S. Park, K. D. Jung, W. J. Jane, S. E. Koh, S. S. Kang, I. Y. Lee, W. J. Lee,

- B. J. Kim, Y. H. Kook, K. H. Park and S. H. Lee. 2003. Identification of the spotted fever group rickettsiae detected from *Haemaphysalis longicornis* in Korea. *Microbiol. Immunol.* 47(4): 301-304.
- Kim, C. M., Y. H. Yi, D. H. Yu, M. J. Lee, M. R. Cho, A. R. Desai, S. Shring, T. A. Klein, H. C. Kim, J. W. Song, L. J. Back, S. T. Chong, M. L. O'Guinn, J. S. Lee, I. Y. Lee, J. H. Park, J. Foley and J. S. Chae. 2006. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9): 5766-5776.
- Choi, Y. J., E. M. Lee, J. M. Park, K. M. Lee, S. H. Han, J. K. Kim, S. H. Lee, H. J. Song, M. S. Choi, I. S. Kim, K. H. Park and W. J. Jang. 2007. Molecular detection of various rickettsiae in mites (Acari: Trombiculidae) in Southern Jeolla Province Korea. *Microbiol. Immunol.* 51(3): 307-312.
- Robbin, R. G. 2005. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Taiwan: a synonymic checklist. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*; 107: 245-253.
- Yamaguti, N., V. J. Tipton, H. L. Keegan, and S. Toshiaoka. 1971. Ticks of Japan, Korea, and the Ryukyu islands. *Brigham Young Univ. Sci. Bull. Biol. Ser.* 15: 1-225.
- Baker, A. S. 1999. *Mites and ticks of domestic animals.* The Stationery Office, London. pp. 240.
- 柳支英。1986。中國動物誌 昆蟲綱 蚤目。科學出版社，北京。1334 頁。
- Hopkins, G.H.E., and M. Rothschild. 1953-1971. *All Illustrated Catalogus of the Rothschild Collection of Flea (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History).* Vol. I-V. British Museum (Natural History), London. Vol. I. (1953). *Tungidae and Pulicidae.* xv+361 pp; Vol. II. (1956). *Coptosyllidae, Vermipsyllidae, Macropsyllidae, Ischnopsyllidae, Chimaeropsyllidae and Xiphiopsyllidae.* xi+445 pp; Vol. III (1962). *Hystricopsyllidae (Anomiopsyllinae,*



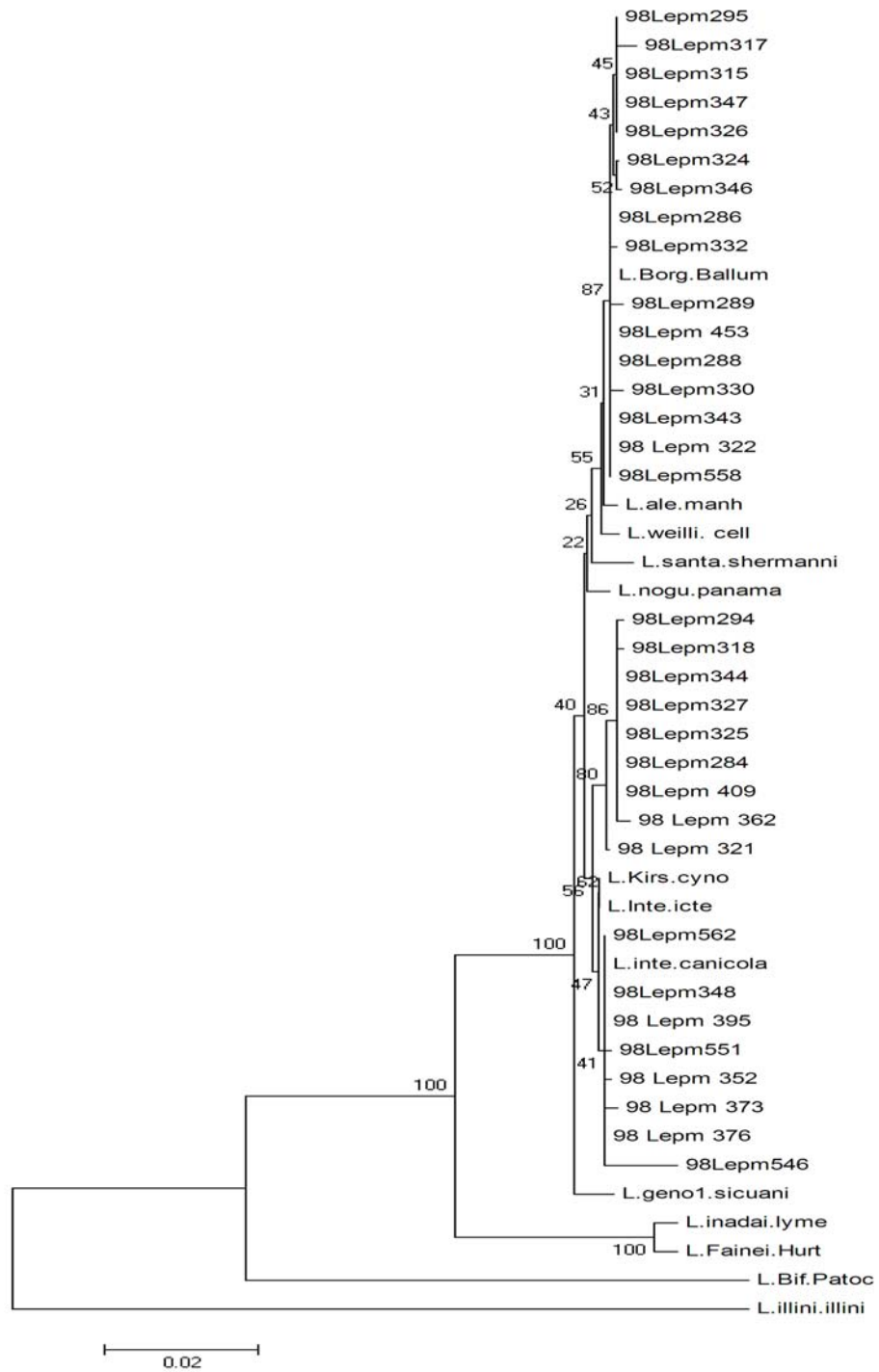
- Hystricopsyllinae, Rhadinopsyllinae and Stenoponiinae). ix+560 pp; Vol. IV (1966). Hystricopsyllidae (Ctenophthalmimae, Dinopsyllinae, Doratopsyllinae and Listropsyllinae). vii+549 pp; Vol V. (1971) Leptopsyllidae and Ancistropsyllidae. viii+530 pp.
- Kim, K. C., H. D. Pratt and C. J. Stojanovich. 1986. The sucking lice of North America: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London. 241 pp.
- 金大雄。1999。中國吸蟲的分類和檢索。科學出版社，北京。132 頁。
- 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.
- 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.
- 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.
- 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。
- Ganoza, C.A., Matthias, M.A., Collins-Richards, D., Brouwer, K.C., Cunningham, C.B., Segura, E.R., Gilman, R.H., Gotuzzo, E., and Vinetz, J.M. (2006). Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. PLoS medicine 3, e308.
- Portnoi, D., Sertour N., Ferquel E., Garnier M., Baranton G and Postic D. 2006. A single-run, real-time PCR for detection and identification of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species, based on the hbb gene sequence. FEMS Microbiol. Lett.

259:35-40.

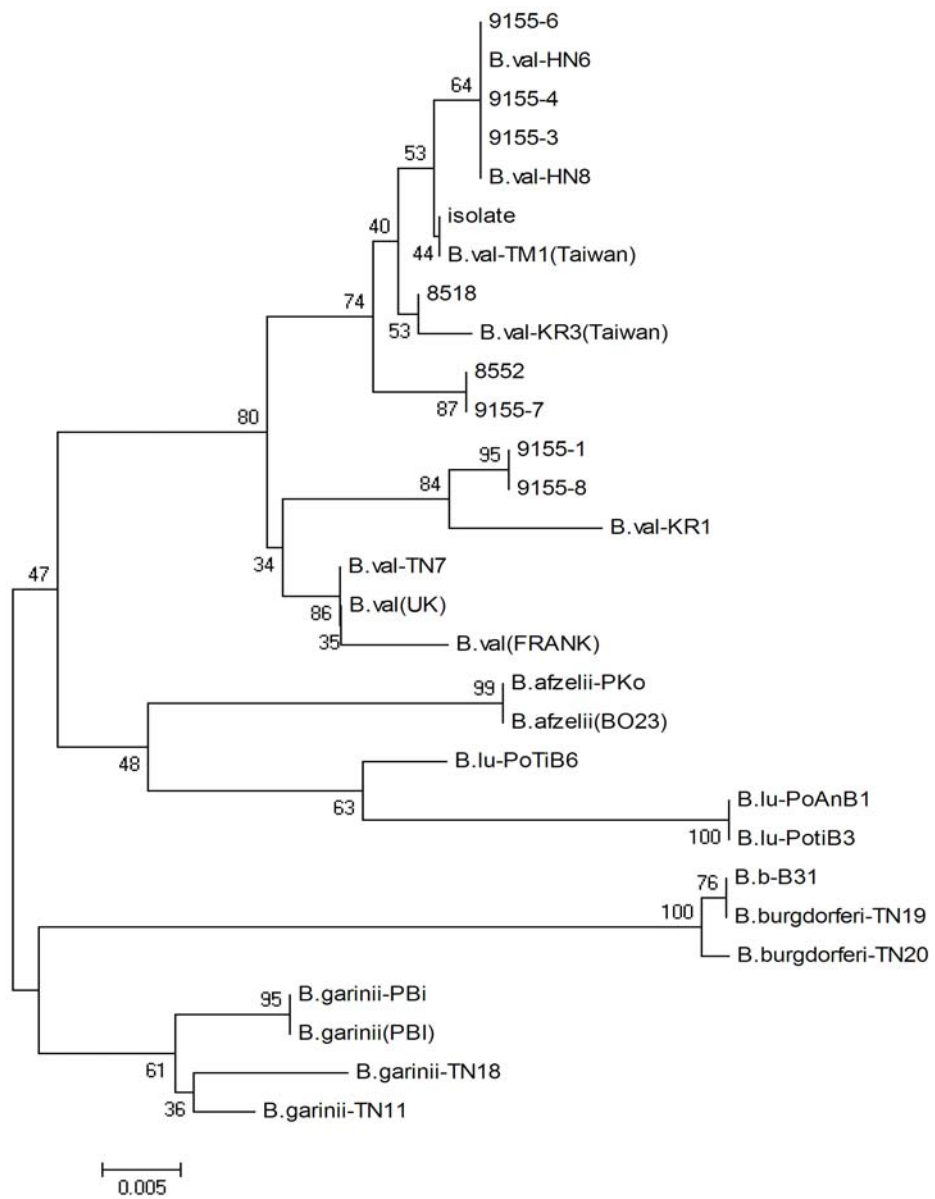
- Fournier, P. E., V. Roux, and D. Raoult. 1998. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 839-848.
- Roux, V., and D. Raoult. 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Res. Microbiol.* 146: 385-396.
- Roux, V., and D. Raoult. 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1449-1455.
- Roux, V., E. Rydkina, M. Ereemeeva, and D. Raoult. 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 252-261.
- Sekeyova, Z., V. Roux, and D. Raoult. 2001. Phylogeny of *Rickettsia* spp. Inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1353-1360.
- Palaniappan, R.U., Chang, Y.F., Chang, C.F., Pan, M.J., Yang, C.W., Harpending, P., McDonough, S.P., Dubovi, E., Divers, T., Qu, J., *et al.* (2005). Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospire. *Molecular and cellular probes* 19, 111-117.
- Rijkema S.G.T., Molkenboer M.J.C.H., Schouls L.M., Jongejan F. and Schellekens J.F.P. 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA Genes. *J. Clin. Microbiol.* 33(12):3091-3095.
- Ishikura, M., W. Mamoru, N. Takashi, M. Kumiko, M. Osayuki, and U. Takahiro. 1992. Seroepidemiology of spotted fever group rickettsiae in small field rodents in Japan.

- Microbiol. Immunol. 36(6):649-653.
- Okabayashi, T., K. Tsutiya, Y. Muramatsu, H. Ueno, and C. Morita. 1996. Serological survey of spotted fever group rickettsia in wild rats in Thailand in the 1970s. Mircobiol Immunol. 40 (12) : 895-8.
- 蔡坤憲、王珮茹、黃智雄、呂琇瑩、王錫杰、蘇千玲、舒佩芸。2008。台北縣貢寮鄉住民感染斑點熱立克次體之血清流行病學研究。2008 年臺灣昆蟲學會年會摘要。台灣昆蟲 28(4) : 349.
- 黃海楠、丁壯、何靜、吳曉明、蔣寶貴、高燕、趙秋敏、曹務春。2006。部分省齧齒動物中斑點熱立克次體的檢測。中國媒介生物學及控制雜誌。17 : 83-85。
- Uchida T., T. Uchiyama, K. Kumano, and D. H. Walker. 1992. *Rickettsia japonica* sp. Nov., the etiological agent of spotted fever group rickettsiosis in Japan. Int J Syst Bacteriol. 42 : 303-305.
- Zhang J. Z., M. T. Fan, Y. M. Wu, P. E. Fournier, V. Roux, and D. Raoult. 2000. Genetic classification of “*Rickettsia heilongjiangii*” and “*Rickettsia hulinii*” two Chinese spotted fever group rickettsiae. J. clin. Microbial. 38 : 3498-3501.
- Kollars T. M. Jr, B. Tippayachai, and D. Bodhidatta. 2001. Short report : Thai tick typhus, *Rickettsia honei*, and a unique rickettsia detected in *Ixodes granulatus* (Ixodidae : Acari) from Thailand. Am J Trop Med Hyg. 65 : 535-537.
- Stenos J., V. Roux, D. H. Walker, and D. Raoult. 1998. *Rickettsia honei* sp. Nov., the aetiological agent of Flinders Island spotted fever in Australia. Int J Syst Bacteriol. 48 : 1399-1404.
- Stewart R. S. 1991. Flinders Island spotted fever : a newly recognized endemic focus of tick typhus in Bass Strait. Part 1. Clinical and epidemiological features. Med J Aust. 154 : 94-99.

- Tsui, P. Y., K. H. Tsai, M. H. Weng, Y. W. Hung, Y. T. Liu, K. Y. Hu, J. C. Lien, P. R. Lin, M. F. Shaio, H. C. Wang, and D. D. Ji. (2007) Molecular detection and characterization of spotted fever group rickettsiae in Taiwan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77 (5): 883-890.
- Raoult, D. P. Berbis, V. Roux, W. Xu, M. Maurin. 1997. A new tick-transmitted disease due to *Rickettsia slovaca*. *Lancet* 350:112-113.
- Lane, A. M., M. D. Shaw, E. A. McGraw, S. L. O'Neill. 2005. Evidence of a spotted fever-like rickettsia and a potential new vector from northeastern Australia. *J. Med. Entomol.* 42: 918-921.
- Billings, A., X. Yu, P. Teel, D. Walker. 1998. Detection of a spotted fever group rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in south Texas. *J. Med. Entomol.* 35: 474-478.
- Jiang, J., V. sangkasuwan, K. Lerdthusnce, S. Sukwit, T. Chuenchitra, P. J. Rozmajzl, C. Eamsila, J. W. Jones, A. L. Richards. 2005. Human infection with *Rickettsia honei*, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1473-1475.
- Choi, Y. J., W. J. Jang, J. H. Kim, J. S. Ryu, S. H. Lee, K. H. Yark, H. S. Paik, Y. S. Koh, M. S. Choi, and I. S. Kim. 2005. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 11(2): 237-244.

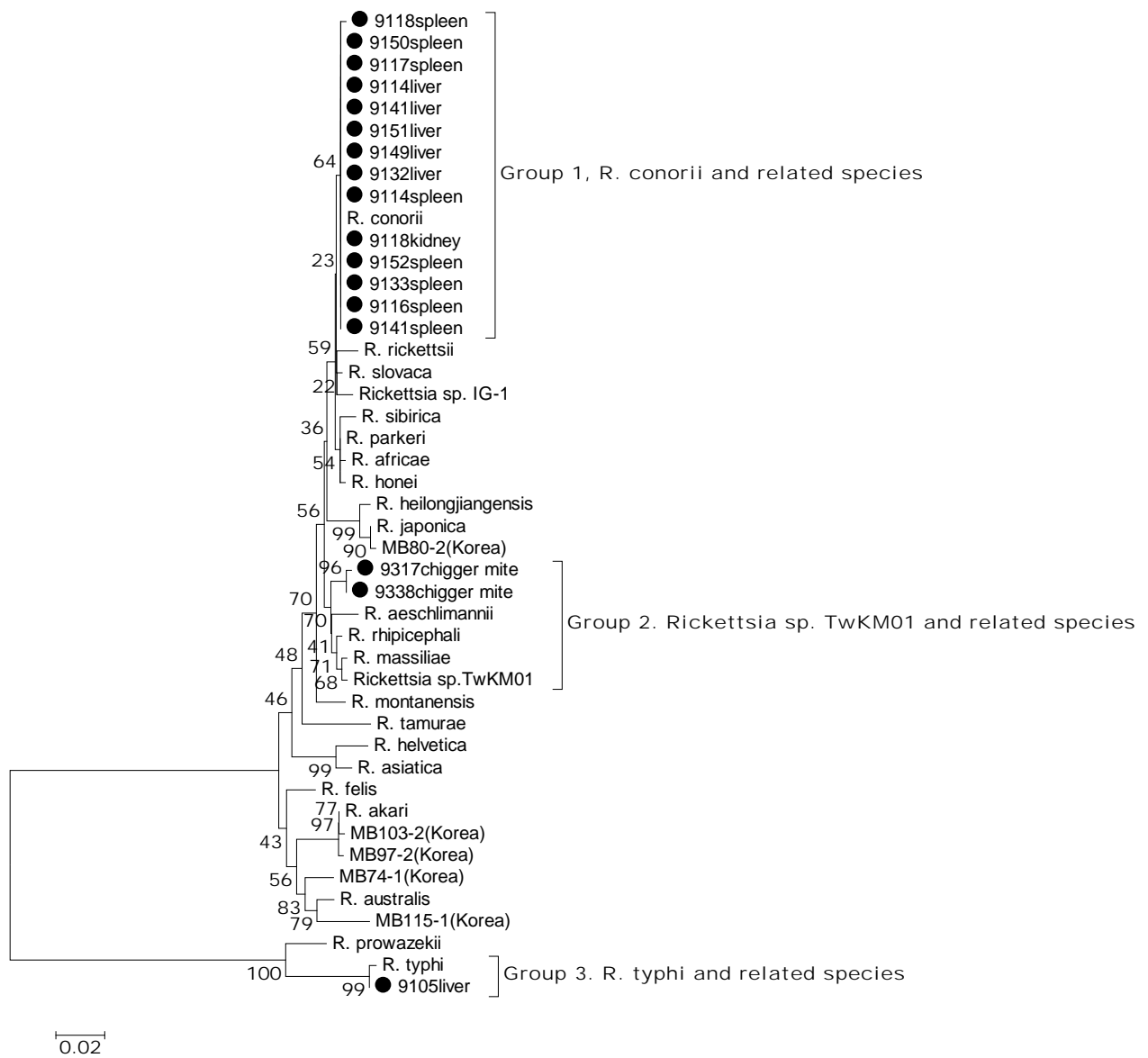


圖一、鈎端螺旋體菌 16S 序列親緣關係圖。



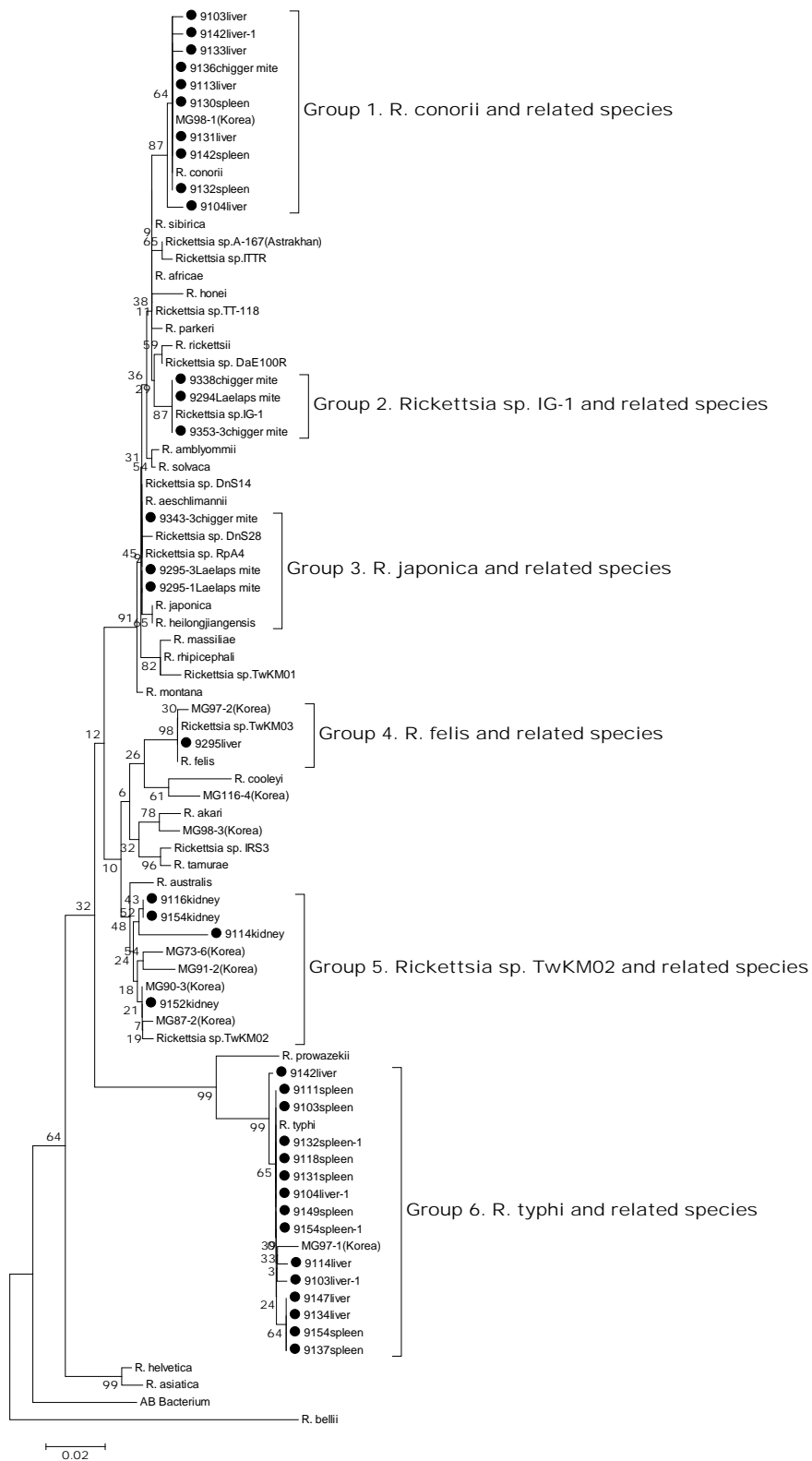
圖二、萊姆疏螺旋體菌 5S-23S 序列親緣關係圖。



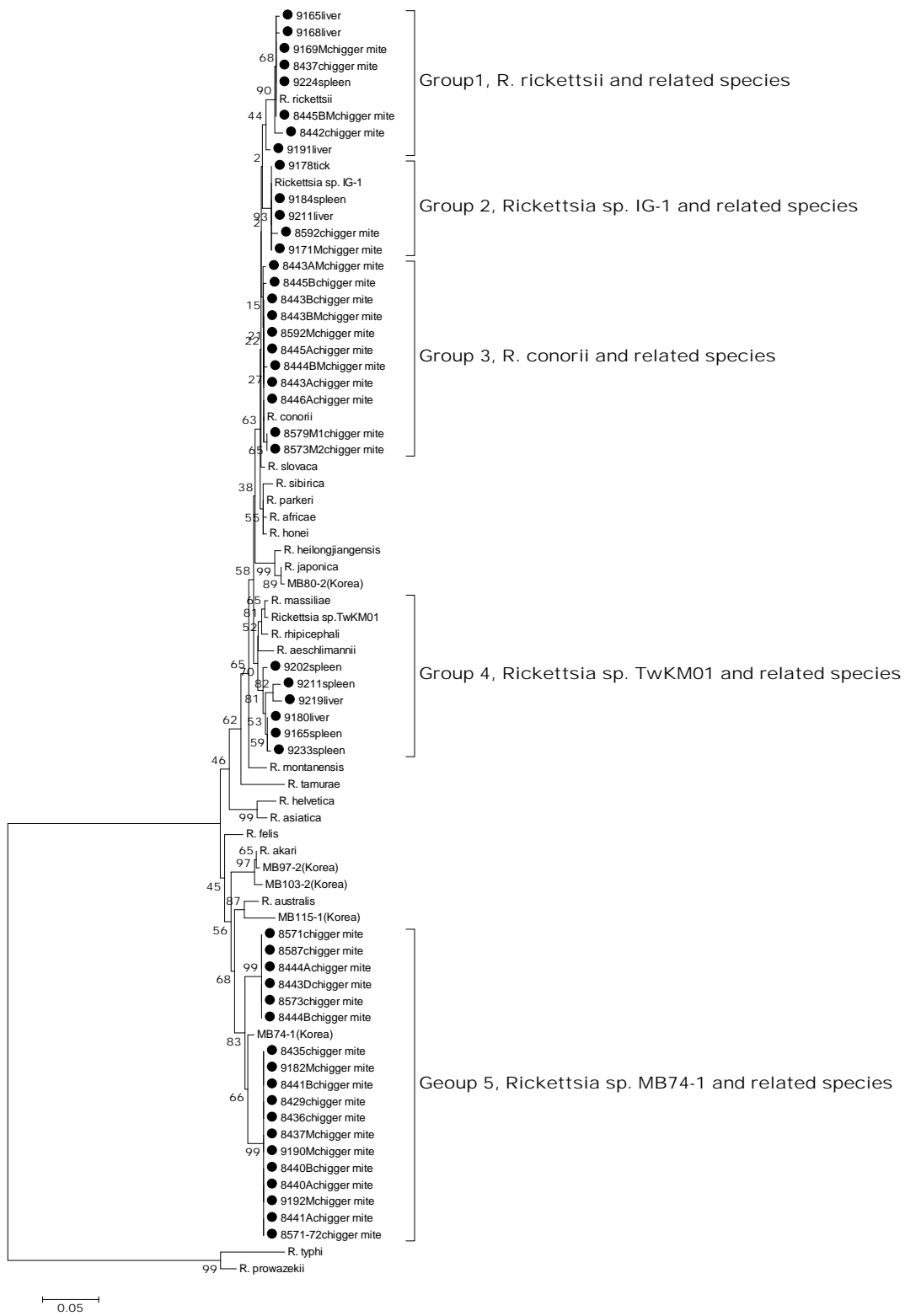


圖四、宜蘭縣斑點熱立克次體 *OmpB* 部分序列親緣關係圖，●為宜蘭縣菌株。

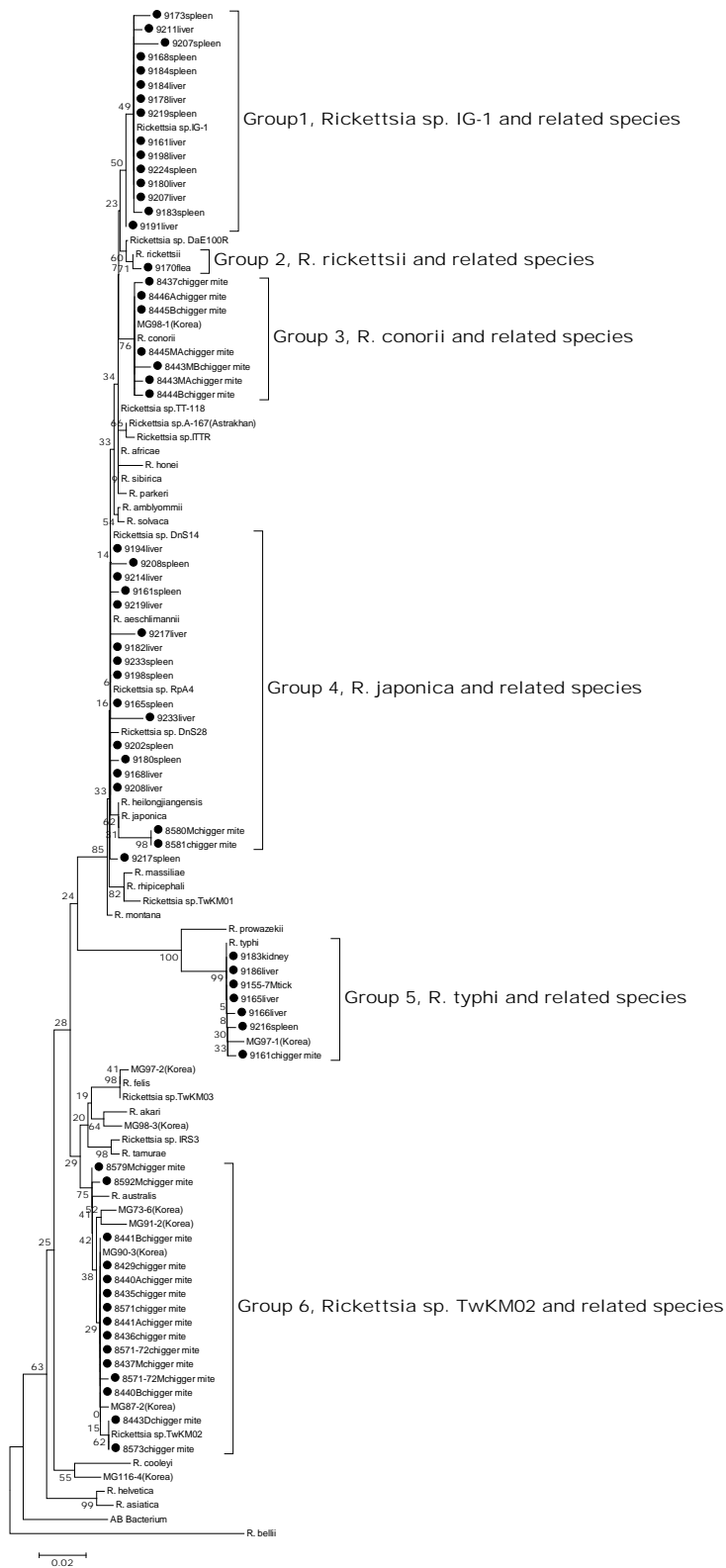




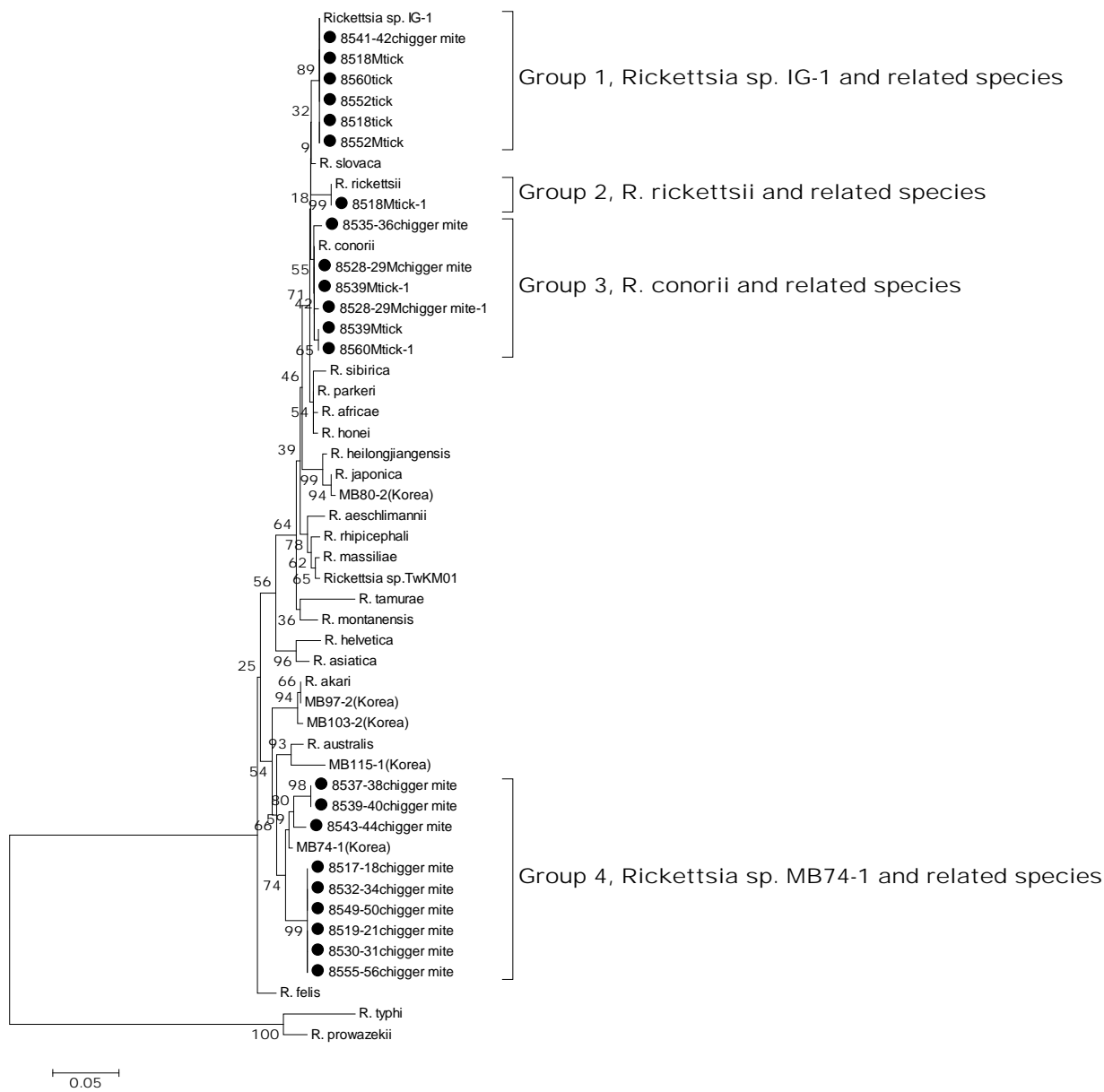
圖五、宜蘭縣斑點熱立克次體 *gltA* 部分序列親緣關係圖，●為宜蘭縣菌株。



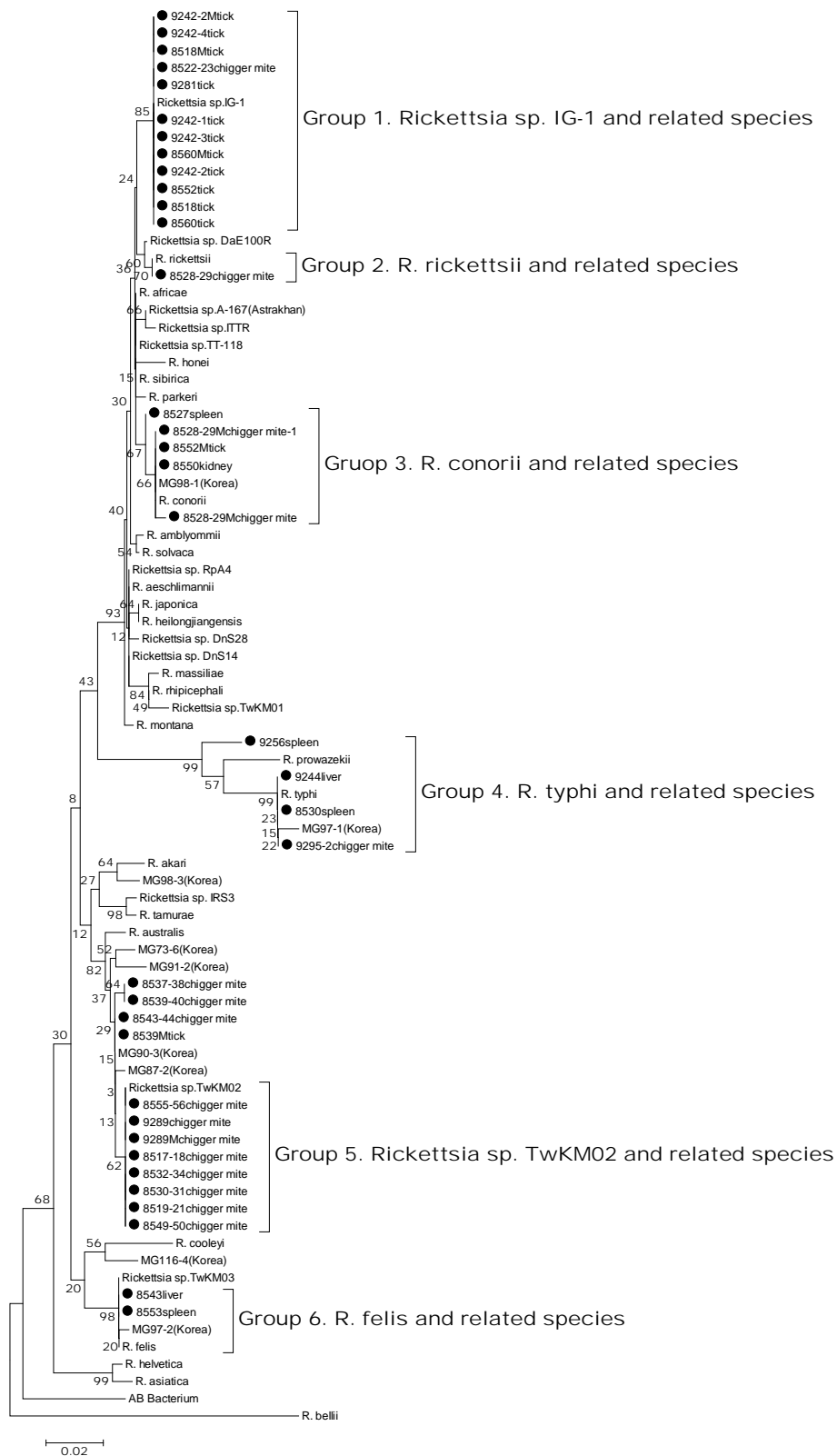
圖六、花蓮縣斑點熱立克次體 *OmpB* 部分序列親緣關係圖，●為花蓮縣菌株。



圖七、花蓮縣斑點熱立克次體 *gltA* 部分序列親緣關係圖，●為花蓮縣菌株。



圖八、台東縣斑點熱立克次體 *OmpB* 部分序列親緣關係圖，●為台東縣菌株。



圖九、台東縣斑點熱立克次體 *gltA* 部分序列親緣關係圖，●為台東縣菌株。

表一、東部三縣鼠類捕獲數

| 捕獲鼠種                  | 數目  | 捕獲率    |
|-----------------------|-----|--------|
| <i>R. losea</i>       | 199 | 47.95% |
| <i>S. murinus</i>     | 85  | 20.48% |
| <i>B. indica</i>      | 44  | 10.60% |
| <i>M. caroli</i>      | 37  | 8.92%  |
| <i>R. exulans</i>     | 26  | 6.27%  |
| <i>A. agrarius</i>    | 13  | 3.13%  |
| <i>M. musculus</i>    | 5   | 1.20%  |
| <i>R. norvegicus</i>  | 2   | 0.48%  |
| <i>N. coxingi</i>     | 2   | 0.48%  |
| <i>C. erythraneus</i> | 2   | 0.48%  |
| 總計                    | 415 |        |

表二、東部三縣鼠類捕獲數(以縣市別)

| 縣市                   | 捕獲鼠種                  | 數目    | 捕獲率    |
|----------------------|-----------------------|-------|--------|
| 宜蘭                   | <i>R. losea</i>       | 91    | 86.67% |
|                      | <i>B. indica</i>      | 9     | 8.57%  |
|                      | <i>C. erythraneus</i> | 2     | 1.90%  |
|                      | <i>M. caroli</i>      | 1     | 0.95%  |
|                      | <i>N. coxingi</i>     | 1     | 0.95%  |
|                      | <i>R. norvegicus</i>  | 1     | 0.95%  |
|                      | 小計                    | 105   |        |
| 花蓮                   | <i>R. losea</i>       | 41    | 30.83% |
|                      | <i>B. indica</i>      | 32    | 24.06% |
|                      | <i>R. exulans</i>     | 26    | 19.55% |
|                      | <i>A. agrarius</i>    | 13    | 9.77%  |
|                      | <i>S. murinus</i>     | 8     | 11.94% |
|                      | <i>M. caroli</i>      | 8     | 6.02%  |
|                      | <i>M. musculus</i>    | 4     | 3.01%  |
| <i>R. norvegicus</i> | 1                     | 0.75% |        |
| 小計                   | 133                   |       |        |
| 台東                   | <i>S. murinus</i>     | 77    | 43.50% |

|                    |     |        |
|--------------------|-----|--------|
| <i>R. losea</i>    | 67  | 37.85% |
| <i>M. caroli</i>   | 28  | 15.82% |
| <i>B. indica</i>   | 3   | 1.69%  |
| <i>M. musculus</i> | 1   | 0.56%  |
| <i>N. coxingi</i>  | 1   | 0.56%  |
| 小計                 | 177 |        |

表三、鼠類鉤端螺旋體血清抗體陽性率(以縣市別)

| 縣市  | 捕獲數目 | 有效血清數目 | Ab titer<br>>100X | 陽性率    |
|-----|------|--------|-------------------|--------|
| 宜蘭縣 | 105  | 105    | 23                | 21.9 % |
| 花蓮縣 | 133  | 120    | 39                | 32.5 % |
| 台東縣 | 177  | 144    | 44                | 30.6 % |
| 總計  | 415  | 369    | 106               | 28.7 % |

表四、鼠類鉤端螺旋體血清抗體陽性率(以鼠種別)

| 鼠種                    | 捕獲數目 | 有效血清數目 | Ab titer<br>>100X | 陽性率    |
|-----------------------|------|--------|-------------------|--------|
| <i>R. losea</i>       | 199  | 186    | 77                | 41.4 % |
| <i>S. murinus</i>     | 85   | 66     | 9                 | 13.6 % |
| <i>B. indica</i>      | 44   | 37     | 12                | 31.4 % |
| <i>M. caroli</i>      | 37   | 31     | 0                 | 0 %    |
| <i>R. exulans</i>     | 26   | 27     | 5                 | 18.5 % |
| <i>A. agrarius</i>    | 13   | 13     | 1                 | 7.7 %  |
| <i>M. musculus</i>    | 5    | 3      | 0                 | 0 %    |
| <i>R. novegicus</i>   | 2    | 2      | 1                 | 50 %   |
| <i>N. coxingi</i>     | 2    | 2      | 1                 | 50 %   |
| <i>C. erythraneus</i> | 2    | 2      | 0                 | 0 %    |
| 總計                    | 415  | 369    | 106               | 28.7 % |

表五、鼠類鉤端螺旋體感染率(以縣市別)

| 縣市 | 捕獲數目 | Real-time PCR | 陽性率 |
|----|------|---------------|-----|
|----|------|---------------|-----|

|     |     |     |        |
|-----|-----|-----|--------|
| 宜蘭縣 | 103 | 13  | 12.6%  |
| 花蓮縣 | 133 | 48  | 36.1 % |
| 台東縣 | 177 | 44  | 24.9 % |
| 總計  | 413 | 105 | 25.4 % |

表六、鼠類鉤端螺旋體感染率(以鼠種別)

| 鼠種                  | 捕獲數目 | Real-time PCR | 陽性率    |
|---------------------|------|---------------|--------|
| <i>R. losea</i>     | 199  | 48            | 24.1 % |
| <i>S. murinus</i>   | 85   | 27            | 31.8 % |
| <i>B. indica</i>    | 44   | 15            | 34.1 % |
| <i>M. caroli</i>    | 37   | 4             | 10.8 % |
| <i>R. exulans</i>   | 26   | 6             | 23.1 % |
| <i>A. agrarius</i>  | 13   | 3             | 23.1 % |
| <i>M. musculus</i>  | 5    | 1             | 20 %   |
| <i>R. novegicus</i> | 2    | 0             | 0 %    |
| <i>N. coxingi</i>   | 2    | 1             | 50 %   |
| 總計                  | 413  | 105           | 25.4%  |

表七、鼠類鉤端螺旋體培養陽性率(以縣市別)

| 縣市  | 捕獲數目 | 培養陽性數 | 陽性率   |
|-----|------|-------|-------|
| 宜蘭縣 | 103  | 11    | 10.7% |
| 花蓮縣 | 82   | 7     | 8.5 % |
| 台東縣 | 129  | 1     | 0.8 % |
| 總計  | 314  | 19    | 6.1 % |

表八、鼠類鉤端螺旋體培養陽性率(以鼠種別)

| 鼠種                | 捕獲數目 | Real-time PCR | 陽性率    |
|-------------------|------|---------------|--------|
| <i>R. losea</i>   | 129  | 14            | 10.9 % |
| <i>S. murinus</i> | 86   | 0             | 0 %    |
| <i>M. caroli</i>  | 38   | 0             | 0 %    |
| <i>R. exulans</i> | 26   | 1             | 3.8 %  |



|                     |     |    |        |
|---------------------|-----|----|--------|
| <i>B. indica</i>    | 15  | 2  | 13.3 % |
| <i>A. agrarius</i>  | 13  | 2  | 15.4 % |
| <i>M. musculus</i>  | 3   | 0  | 0 %    |
| <i>R. novegicus</i> | 2   | 0  | 0 %    |
| <i>N. coxingi</i>   | 2   | 0  | 0 %    |
| 總計                  | 314 | 19 | 6.1 %  |

表九、鼠類體外節肢動物萊姆疏螺旋體病原檢測

| 縣市  | 蜱種                   | 捕獲數目 | real-time PCR(+) | 陽性率    |
|-----|----------------------|------|------------------|--------|
| 宜蘭縣 | <i>I. granulatus</i> | 0    | 0                | 0 %    |
| 花蓮縣 | <i>I. granulatus</i> | 10   | 8                | 80 %   |
| 台東縣 | <i>I. granulatus</i> | 14   | 2                | 14.3%  |
| 總數  |                      | 24   | 10               | 41.7 % |

表十、鼠類萊姆疏螺旋體培養陽性率(以縣市別)

| 縣市  | 捕獲數目 | 培養陽性數 | 陽性率   |
|-----|------|-------|-------|
| 宜蘭縣 | 103  | 0     | 0 %   |
| 花蓮縣 | 82   | 0     | 0 %   |
| 台東縣 | 129  | 1     | 0.8 % |
| 總計  | 314  | 1     | 0.3 % |

表十一、鼠類萊姆疏螺旋體培養陽性率(以鼠種別)

| 鼠種                  | 捕獲數目 | Real-time PCR | 陽性率   |
|---------------------|------|---------------|-------|
| <i>R. losea</i>     | 129  | 0             | 0 %   |
| <i>R. exulans</i>   | 26   | 0             | 0 %   |
| <i>R. novegicus</i> | 2    | 0             | 0 %   |
| <i>B. indica</i>    | 15   | 0             | 0 %   |
| <i>N. coxingi</i>   | 2    | 0             | 0 %   |
| <i>A. agrarius</i>  | 13   | 0             | 0 %   |
| <i>M. caroli</i>    | 38   | 1             | 2.6 % |

|                    |     |   |       |
|--------------------|-----|---|-------|
| <i>M. musculus</i> | 3   | 0 | 0 %   |
| <i>S. murinus</i>  | 86  | 0 | 0 %   |
| 總計                 | 314 | 1 | 0.3 % |

表十二、莫拉克風災鉤端螺旋體疫情

| 檢體 | 只有一採<br>(MAT titer >100X) | *只有一採<br>(MAT titer <100X) | **二採>4 倍<br>上升 | 二採均無 titer |
|----|---------------------------|----------------------------|----------------|------------|
| 血液 | 12                        | 35                         | 100            | 5          |

\*包含 2 個一採 real-time PCR 陽性

\*\*包含 4 個一採 real-time PCR 陽性

| 檢體<br>環境 | 檢體數 | 已完成 | 增幅序列片段 |
|----------|-----|-----|--------|
|          | 82  | 18  | 9      |

表十三、鼠類血清斑點熱立克次體及地方性斑疹傷寒立克次體血清抗體陽性率  
(以鼠種別)

| 鼠種                    | 數目  | R.rickettsii (+) or R.conorii(+) | R.rickettsii (+) or R.conorii(+)<br>陽性率 | R. typhi(+) | 陽性<br>率 |
|-----------------------|-----|----------------------------------|---|-------------|---------|
| <i>R. losea</i>       | 198 | 187                              | 94.44%                                  | 3           | 1.52%   |
| <i>S. murinus</i>     | 69  | 4                                | 5.80%                                   | 0           | 0.00%   |
| <i>B. indica</i>      | 44  | 43                               | 97.73%                                  | 0           | 0.00%   |
| <i>M. caroli</i>      | 30  | 7                                | 23.33%                                  | 1           | 3.33%   |
| <i>R. exulans</i>     | 26  | 24                               | 92.31%                                  | 0           | 0.00%   |
| <i>A. agrarius</i>    | 13  | 7                                | 53.85%                                  | 2           | 15.38%  |
| <i>M. musculus</i>    | 5   | 2                                | 40.00%                                  | 0           | 0.00%   |
| <i>R. norvegicus</i>  | 2   | 2                                | 100.00%                                 | 0           | 0.00%   |
| <i>N. coxingi</i>     | 2   | 1                                | 50.00%                                  | 0           | 0.00%   |
| <i>C. erythraneus</i> | 2   | 0                                | 0.00%                                   | 0           | 0.00%   |

|    |     |     |        |   |       |
|----|-----|-----|--------|---|-------|
| 總計 | 391 | 277 | 70.84% | 6 | 1.53% |
|----|-----|-----|--------|---|-------|

表十四、鼠類血清斑點熱立克次體及地方性斑疹傷寒立克次體血清抗體陽性率  
(以縣市別)

| 縣市  | 數目  | R.rickettsii (+) or R.conorii(+) | R.rickettsii (+) or R.conorii(+)<br>陽性率 | R. typhi(+) | R. typhi(+)<br>陽性率 |
|-----|-----|----------------------------------|---|-------------|--------------------|
| 宜蘭縣 | 105 | 101                              | 96.19%                                  | 2           | 1.90%              |
| 花蓮縣 | 133 | 105                              | 78.95%                                  | 2           | 1.50%              |
| 台東縣 | 153 | 71                               | 46.41%                                  | 2           | 1.31%              |
| 總計  | 391 | 277                              | 70.84%                                  | 6           | 1.53%              |

表十五、鼠類內臟 *Rickettsia* 屬立克次體 PCR 檢測(以縣市別)

| 縣市  | 數目  | spleen PCR(+) | liver PCR(+) | kidney PCR(+) | Total PCR(+)* |
|-----|-----|---------------|--------------|---------------|---------------|
| 宜蘭縣 | 30  | 18(60%)       | 17(57%)      | 6(20%)        | 26(87%)       |
| 花蓮縣 | 30  | 25(83%)       | 30(100%)     | 26(87%)       | 30(100%)      |
| 台東縣 | 55  | 16(29%)       | 17(31%)      | 17(31%)       | 25(45%)       |
| 總計  | 115 | 59(51%)       | 64(56%)      | 49(43%)       | 81(70%)       |

\*spleen, liver or kidney PCR positive

表十六、鼠類內臟 *Rickettsia* 屬立克次體 PCR 檢測(以鼠種別)

| 鼠種                 | 數目 | Spleen PCR(+) | liver PCR(+) | kidney PCR(+) | Total PCR(+)* |
|--------------------|----|---------------|--------------|---------------|---------------|
| <i>R. losea</i>    | 70 | 28(40%)       | 26(37%)      | 14(20%)       | 39(56%)       |
| <i>A. agarirus</i> | 6  | 4(67%)        | 6(100%)      | 5(83%)        | 6(100%)       |
| <i>R. exulans</i>  | 6  | 5(83%)        | 6(100%)      | 6(100%)       | 6(100%)       |
| <i>M. caroli</i>   | 12 | 9(75%)        | 10(83%)      | 9(75%)        | 12(100%)      |
| <i>B. indica</i>   | 6  | 5(83%)        | 5(83%)       | 4(67%)        | 5(83%)        |
| <i>M. musculus</i> | 3  | 3(100%)       | 3(100%)      | 3(100%)       | 3(100%)       |

|                      |     |         |         |         |         |
|----------------------|-----|---------|---------|---------|---------|
| <i>R. norvegicus</i> | 2   | 2(100%) | 1(50%)  | 2(100%) | 2(100%) |
| <i>S. murinus</i>    | 8   | 3(38%)  | 5(63%)  | 5(63%)  | 6(75%)  |
| <i>N. coxingi</i>    | 2   | 0       | 2(100%) | 1(50%)  | 2(100%) |
| 總計                   | 115 | 59(51%) | 64(56%) | 49(43%) | 81(70%) |

\*spleen, liver or kidney PCR positive

表十七、花蓮縣及台東縣蜚 *Rickettsia* 屬立克次體 PCR 檢測

| 縣市  | 種類                   | 數目 | OmpB PCR(+) | gltA PCR(+) | Total PCR(+)* |
|-----|----------------------|----|-------------|-------------|---------------|
| 花蓮縣 | <i>I. granulatus</i> | 10 | 10%         | 0%          | 10%           |
| 台東縣 | <i>I. granulatus</i> | 14 | 57%         | 64%         | 64%           |
| 總計  |                      | 24 | 37.5%       | 37.5%       | 41.7%         |

\*OmpB PCR(+) or gltA PCR(+)

表十八、宜蘭縣、花蓮縣及台東縣恙蟲 *Rickettsia* 屬立克次體 PCR 檢測

| 縣市  | 檢測池數 | OmpB PCR(+) | gltA PCR(+) | Total PCR(+)* |
|-----|------|-------------|-------------|---------------|
| 宜蘭縣 | 40   | 12.5%       | 20%         | 32.5%         |
| 花蓮縣 | 71   | 36.6%       | 33.8%       | 40.8%         |
| 台東縣 | 45   | 28.9%       | 28.9%       | 33.3%         |
| 總計  | 156  | 28.2%       | 28.8%       | 37.2%         |

\*OmpB PCR(+) or gltA PCR(+)

表十九、花蓮縣鼠類跳蚤 *Rickettsia* 屬立克次體 PCR 檢測

| 種類                          | 檢測隻數 | OmpB PCR(+) | gltA PCR(+) | Total PCR(+)* |
|-----------------------------|------|-------------|-------------|---------------|
| <i>Stivalius aporus</i> ♀   | 8    | 0%          | 25%         | 25%           |
| <i>Xenopsylla cheopis</i> ♀ | 2    | 0%          | 0%          | 0%            |
| 總計                          | 10   | 0%          | 20%         | 20%           |

\*OmpB PCR(+) or gltA PCR(+)

表二十、鼠類屬蟎 *Rickettsia* 屬立克次體 PCR 檢測

| 縣市  | 種類                 | 檢測池數* | OmpB PCR(+) | gltA PCR(+) | Total PCR(+)** |
|-----|--------------------|-------|-------------|-------------|----------------|
| 宜蘭縣 | <i>Laelaps</i> sp. | 8     | 0%          | 0%          | 0%             |
| 花蓮縣 | <i>Laelaps</i> sp. | 10    | 0%          | 10%         | 10%            |
| 台東縣 | <i>Laelaps</i> sp. | 10    | 0%          | 30%         | 30%            |
| 總計  |                    | 28    | 0%          | 14.3%       | 14.3%          |

\**Laelaps* sp. 為 5 隻

\*\*OmpB PCR(+) or gltA PCR(+)

表二十一、外寄生節肢動物及鼠類脾肝腎臟 *Rickettsia* 屬立克次體分佈情形

|                         | 宜蘭                 |                                | 花蓮                         |                            | 台東   |  |
|-------------------------|--------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|--|--|
|                         | OmpB               | gltA                           | OmpB                       | gltA                       | OmpB   | gltA   |
| Chigger                 | TwKM01             | R. con<br>IG-1<br>R. jap       | R. ric<br>R. con<br>MB74-1 | R. con<br>R. typhi         | IG-1<br>R. con<br>MB74-1<br>TwKM02<br>R. jap | IG-1<br>R. ric<br>R. con<br>R. typhi<br>TwKM02 |
| <i>I. granulatus</i>    |                    |                                | IG-1                       | R. typhi                   | IG-1<br>R. con                               | IG-1<br>R. con                                 |
| <i>Stivalius aporus</i> |                    |                                |                            |                            |  | R. ric   |
| <i>Lealaps</i> spp.     |                    | IG-1<br>R. jap                 |                            |                            |  |  |
| Spleen                  | R. con             | R. con<br>R. typhi             | R. ric<br>IG-1<br>TwKM01   | IG-1<br>R. jap             | TwKM01                                       | R. con<br>R. typhi<br>R. felis                 |
| Liver                   | R. con<br>R. typhi | R. con<br>R. felis<br>R. typhi | R. ric<br>IG-1<br>TwKM01   | IG-1<br>R. jap<br>R. typhi | IG-1   | R. typhi<br>R. felis                           |
| Kidney                  | R. con             | TwKM02                         |                            | R. typhi                   | IG-1<br>R. ric                               | R. con   |

\*R. con: *R. conorii*, R. ric: *R. rickettsii*, MB74-1: *Rickettsia* sp. MB74-1, R. jap: *R. japonica*,

TwKM01: *Rickettsia* sp. TwKM01, TwKM02: *Rickettsia* sp. TwKM02, IG-1: *Rickettsia* sp. IG-1.