

## Molecular Survey and Characterization of *Mycoplasma* spp.

### Infection in Cats in central Taiwan

#### 台灣中部地區貓隻感染血巴東蟲之調查暨分子特性分析

Chia-Chia Huang<sup>1)</sup> Chau-Loong Tsang<sup>2)</sup> Yang-Tsung Chung<sup>3)</sup>

黃嘉嘉

曾秋隆

鍾楊聰

#### Abstract

The aim of this study was to survey *Mycoplasma* spp. infection in cats in central Taiwan, and to characterize *Mycoplasma* spp. by polymerase chain reaction (PCR). We collected 120 feline blood samples at National Chung-Hsing University Veterinary Medical Teaching Hospital and 5 veterinary hospitals from March to September 2011, and these samples were analyzed by PCR and blood examination. Of the 120 samples, 5 (4.2%) were *Mycoplasma haemofelis* (Mhf), 21 (17.5%) were *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (CMhm), 2 (1.6%) cats were *Candidatus Mycoplasma turicensis* (CMt), and 3 (2.5%) were *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis*. The main symptoms

of Mhf-infected cats included anemia, anorexia, and depression; and those of CMhm-infected cats included anemia and depression; and those of CMt-infected cats included anemia. In addition, we speculated that male, mixed breed and less than six-year-old cats were the risk factors for CMhm infection. The further 16S rRNA gene sequence analysis showed that the sequences of 5 Mhf Taiwan strains shared 100% identity with USA strain, and the sequences of 21 CMhm Taiwan strains shared 99.4-99.8% identity with United Kingdom and Israel strains, and the sequences of 2 CMt Taiwan strains shared 100% identity with Switzerland and South Africa strains. Phylogenetic analysis showed that Mhf, CMhm and CMt Taiwan strains were grouped with the same species. The data indicate that the main *Mycoplasma* spp. pathogens in cats in central

1) PhD. student, Dept. of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University, Taiwan, R.O.C.  
國立中興大學獸醫學系博士班研究生。

2) Associate Professor, Dept. of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University, Taiwan, R.O.C. 國立中興大學獸醫系副教授。

3) Professor, Dept. of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University, Taiwan, R.O.C.  
Corresponding Author, E-mail: ytchung@nchu.edu.tw 國立中興大學獸醫系教授，通訊作者。

Taiwan are CMhm, followed by Mhf and CMt.

**Key words:** *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis*, 16S rRNA, PCR

## 摘要

本研究目的為利用聚合酶連鎖反應 ( Polymerase chain reaction, PCR ) 方法調查台灣中部地區貓隻感染之 *Mycoplasma* 病原體，且進一步進行分子特性分析。本研究於 100 年 3 月至 9 月期間收集 120 隻於國立中興大學獸醫教學醫院及 5 間獸醫診所就診之貓隻抗凝血血液進行 PCR 檢驗及血液學分析。結果顯示共 5 ( 4.2% ) 隻貓隻為 *Mycoplasma haemofelis* ( Mhf ) 陽性，21 ( 17.5% ) 隻貓隻為 *Candidatus Mycoplasma haemominutum* ( CMhm ) 陽性及 2 ( 1.6% ) 隻貓隻為 *Candidatus Mycoplasma turicensis* ( CMt ) 陽性，3 ( 2.5% ) 隻貓隻共同感染 Mhf 及 CMhm。感染 Mhf 的貓隻主要症狀包括貧血 ( 80% )、厭食 ( 100% ) 及精神抑鬱 ( 80% )；感染 CMhm 的貓隻主要症狀包括貧血 ( 90.5% ) 及精神抑鬱 ( 81% )；而感染 CMt 的貓隻主要症狀包括貧血 ( 100% )。此外，本研究推測公貓、混種貓及年齡低於 6 歲貓隻為感染 CMhm 的可能相關危險因子。進一步進行 16S rRNA 基因分析顯示 5 個 Mhf 序列與美國株序列相似度為 100%，21 個 CMhm 序列與英國及以色列株相似度為 99.4-99.8%，2 個 CMt 序列則分別與瑞士及南非株之相似度為 100%。親緣關係樹狀圖顯示 Mhf、CMhm 及

CMt 皆聚集於相同種的族群。由本研究結果顯示台灣中部地區貓隻 CMhm 感染率最高，再來是 Mhf 及 CMt。

**關鍵詞：** *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis*, 16S rRNA, PCR

## 前言

血巴東蟲是一種小型 ( 0.3-0.8  $\mu\text{m}$  )、無法培養、寄生於紅血球表面且會造成溶血性貧血的革蘭氏陰性菌，其會造成貓血巴東蟲症 ( feline haemobartonellosis ) 或是貓傳染性貧血症 ( feline infectious anemia )<sup>(15)</sup>。貓血巴東蟲 ( *Haemobartella felis*, *H. felis* ) 因病原體的大小而分為俄亥俄州株 ( Ohio strain, 大型 ) 及加州株 ( California strain, 小型 )；*H. felis* 之 16S rRNA 基因經序列及種系發生 ( phylogeny ) 分析發現病原體從 *Haemobartonella* 科重新歸類至 *Mycoplasmaceae* 科，且因為一些表形的特徵，例如：此病原體擁有較小的形狀及基因體、缺乏細胞壁及鞭毛、抗青黴素但對四環黴素敏感等因素，這兩種株已經重新命名為 *Mycoplasma haemofelis* ( Mhf )<sup>(12)</sup> 及 *Candidatus Mycoplasma haemominutum* ( CMhm )<sup>(2)</sup>。此外，在 2005 年首度在瑞士發現造成溶血性貧血的第三種貓血巴東蟲病原體，並將其命名為 *Candidatus Mycoplasma turicensis* ( CMt )<sup>(24)</sup>。

這三種病原體因為它們之間致病力不同而有所差異，其中 Mhf 是致病力最高的一種，而 CMhm 及 CMt 則致病力較低<sup>(22)</sup>。感染 Mhf 急

性期症狀包括蒼白、昏睡、虛弱、心跳過速、呼吸急速、脾腫大及偶而有黃疸；感染 CMhm 急性期血容積值 (packed cell volume, PCV) 並沒有顯著的下降，且通常有共同感染反轉錄病毒或是化學治療期間才會有血容積值的下降<sup>(28)</sup>。CMt 的致病力則視共同感染的病原，例如免疫抑制或是其他種的血巴東蟲病原體而定，研究證實兩隻經實驗感染 CMt 的貓隻呈現中度至顯著貧血的情形<sup>(24)</sup>。貓血巴東蟲的傳播途徑至今尚未完全清楚，有研究指出由貓身上收集的貓蚤 (*Ctenocephalides felis*) 及貓蚤的糞便中有偵測到 CMhm 及 Mhf 的 DNA<sup>(10, 14)</sup>，也有研究指出在一些 *Ixodes* sp. 及 *Rhipicephalus* sp. 蜱身上偵測到血巴東蟲的 DNA<sup>(17, 27)</sup>。此外，有證據指出 2 隻經實驗感染 CMt 的貓隻其唾液及糞便中在感染 9 周後仍能偵測到 CMt DNA<sup>(27)</sup>。

目前臨床上常見的診斷方式為利用光學顯微鏡觀察血液抹片中是否存在病原體，但血液抹片有敏感度低 (< 20%)<sup>(19)</sup>，及判讀時易與染色顆粒或是 H-J 體 (Howell-Jolly bodies) 混淆的缺點<sup>(18)</sup>。此外，Willi 等人<sup>(28)</sup> 也提出只靠觀察血液抹片並不能區辨 Mhf 及 CMhm，故單單只靠血液抹片進行診斷並不可靠。鑒於血液抹片的缺點，已陸續有研究利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 的方式來診斷病原體，且證實利用 PCR 進行診斷的敏感度較觀察血液抹片要高<sup>(1, 7, 19)</sup>。故本實驗選擇利用 PCR 的方式來進行貓隻 *Mycoplasma* 病原體的診斷。

在亞洲地區，日本已證實境內的貓隻感染 Mhf、CMhm 及 CMt 這 3 種病原體<sup>(3, 23)</sup>，而韓國也證實境內貓隻感染 Mhf 及 CMhm 這 2 種

病原體<sup>(29)</sup>。直至目前為止，台灣地區貓隻尚未有相關病原體之研究，故本研究目的即是欲了解台灣地區貓隻流行的 *Mycoplasma* 病原體為何種，且進一步進行分子特性的分析以了解台灣地區與其他國家株之差異。

## 材料與方法

於 100 年 3 月至 100 年 9 月期間，本研究隨機選取 120 隻於國立中興大學獸醫教學醫院及 5 家獸醫診所就診貓隻之抗凝血血液。所有的貓隻皆進行血液學的檢驗，血液學檢查是使用全自動血液分析儀 (Sysmex Kx-21N)，而血清生化學檢查則是使用 Hitachi 704 automatic analyzer 分析儀器。將所有的血液皆使用抽取核酸套組 (AxyPrep™ Blood Genomic DNA Maxiprep Kit, Axygen, USA) 進行核酸萃取後置於 -20°C 冰箱保存。每個 PCR 試管 25 µl 反應溶液中包括 5 µl 的核酸，0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.2 µM 引子及 1U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen®)。本研究擴增 Mhf 及 CMhm 之引子對序列是參考 Watanabe 等人<sup>(23)</sup> 所設計的專一性引子對，Mhf (OH-OK1/00CB-r1) 之 PCR 預期產物長度為 274 bp，CMhm (CA-B2/00CB-r1) 之 PCR 預期產物長度為 202 bp，而 PCR 擴增條件則與 Watanabe 等人所述相同。擴增 CMt 之引子對序列是參考 Fujihara 等人<sup>(3)</sup> 設計的專一性引子對，其第一次 PCR 反應 (CMt F1/R1) 預期產物大小為 559 bp，第二次 PCR 反應 (CMt F2/R2) 之預期產物大小為 339 bp，而 PCR 擴增條件則與 Fujihara 等人所述相同 (表 1)。

表 1. 在此研究中擴增 Mhf, CMhm 及 CMT 的 PCR 引子對序列  
 Table 1. Oligonucleotide primer sets for PCR to amplify Mhf, CMhm and CMT in this study

Pathogen	Target Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Expected size	Goal	Reference
<i>M. haemofelis</i> / <i>Candidatus</i> <i>M. haemonintum</i>	16S rRNA	CA-B2	CTGGGAAACTAGAGCTTCGGGAGC (Candidates <i>M. haemonintum</i> )	202 bp	diagnosis	(23)
		OH-OK1	ATGCCCTCTGTGGGGATAGCCCG ( <i>M. haemofelis</i> )	274 bp		
		00CB-r1	ATGGTATTGCTCCATCAGACTTTCG			
<i>Candidatus</i> <i>M. turicensis</i>	16S rRNA	Mirc F1	GAACCTGTCCAAAAAGGCAGTT	559 bp	diagnosis	(3)
		Mirc R1	TGAATAGTATTCGGGCACAAA			
		Mirc F2 Mirc R2	TAATGTCCCTATAGTATCCTC TGCTGTACACTTATTCAGAGG			
<i>M. haemofelis</i>	16S rRNA	CMhml6S-F1	TCCTGGCTCAGGATTAATGCT	1 <sup>st</sup> :1,352 bp 2 <sup>nd</sup> :771 bp	for longer fragment amplification	
		Mhf R1	CCACTCCTCTCATAGTTTGAGG			
		Mhf R2	TCGTTTAGGGTGTGGACTACT			
<i>Candidatus</i> <i>M. haemonintum</i>	16S rRNA	CMhml6S-F1	TCCTGGCTCAGGATTAATGCT	1 <sup>st</sup> :1,452 bp 2 <sup>nd</sup> :924 bp	for longer fragment amplification	
		CMhml6S-R1	GGATCCGGCTACTTGTTAAGA			
		CMhml6S-R2	CAACATGCTCCACCACCTTGT			
<i>Candidatus</i> <i>M. turicensis</i>	16S rRNA	CMT F1	GAACCTGTCCAAAAAGGCAGTT	1 <sup>st</sup> :1,341 bp 2 <sup>nd</sup> :1,231 bp	for longer fragment amplification	
		CMT F2	TAATGTCCCTATAGTATC			
		CMT R	CTCAGAAGT TTCATCTTGACACAATTGAA			

為進一步了解 Mhf、CMhm 及 CMt 16S rRNA 基因序列與其他國家序列之差異，本研究進一步利用自行設計的引子對進行擴增，擴增 CMhm 的第一次 PCR (CMhm16S-F1/R1) 之預期產物大小為 1,452 bp，第二次 PCR (CMhm16S-F1/R2) 之預期產物大小為 924 bp。擴增 Mhf 的第一次 PCR 反應 (CMhm16S-F1/Mhf-R1) 之預期產物大小為 1,352 bp，第二次 PCR 反應 (CMhm16S-F1/Mhf-R2) 之預期產物大小為 771 bp。擴增 CMt 之第一次 PCR 反應 (CMt F1/R) 之預期產物大小為 1,341 bp，第二次 PCR (CMt F2/R) 預期產物大小為 1,231 bp (見表 1)。所有的 PCR 產物利用 1.5% 的瓊脂凝膠進行電泳反應，利用溴化乙錠染色後再置於 UV 燈箱上觀察。將預期產物自瓊脂凝膠切下後利用核酸純化套組 (QIAquick PCR purification kits, QIAGEN) 進行核酸的回收。利用 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits Version 3.1 於 ABI PRISM 3730 DNA 定序儀進行定序反應，核酸利用原來的引子對進行正反兩股之直接定序。序列相似度比對則是扣除引子的序列後將剩餘的序列以 GenBank 網站的 BLAST 程式 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 進行比對。親緣關係樹狀圖是利用 MEGA 4 軟體<sup>(16)</sup> 之 neighbor-joining (NJ) analysis 分析方法進行比對，以 Kimura's two-parameter model 模式進行計算。利用 bootstrap resampling 技術來計算，500 個 replications 結果來支持親緣關係樹狀圖的可信度。*M. hominis* 及 *M. pneumoniae* 被選定作為外群 (outgroup)。本研究所得到的 Mhf、CMhm 及 CMt 16S rRNA 序列皆登錄至

GenBank 網站，序列號碼如下：Mhf TWN no. 19 (JQ689951)、CMhm TWN no.170 (JQ689946)、CMhm TWN no.172 (JQ689947)、CMhm TWN no.79 (JQ689948)、CMt TWN no.66 (JQ689949)、CMt TWN no.93 (JQ689950)。

## 結果

所有的貓隻檢體皆進行三種病原體的 PCR 反應，結果顯示共有 5 (4.17%) 隻為 Mhf 陽性，21 (17.5%) 隻為 CMhm 陽性及 2 (1.7%) 隻貓隻為 CMt 陽性，3 (2.5%) 隻共同感染 Mhf 及 CMhm 病原體。其中感染 Mhf 的貓隻當中，其臨床症狀包括發燒 (20%, 1/5)、貧血 (80%, 4/5)、脫水 (40%, 2/5)、精神抑鬱 (80%, 4/5) 及厭食 (100%, 5/5) 等症狀；感染 CMhm 的貓隻當中，其臨床症狀包括精神抑鬱 (81%, 17/21)、貧血 (90.5%, 19/21) 及血小板減少 (33.2%, 7/21)；感染 CMt 的貓隻當中，臨床症狀包括貧血 (100%, 2/2) 及血小板減少 (50%, 1/2)，且其中一隻合併感染貓白血病病毒 (Feline Leukemia Virus, FeLV)。感染 Mhf、CMhm 及 CMt 的貓隻其血清生化學值皆在正常值範圍內。陽性感染貓隻的基本資料，由表 2 的結果顯示感染 CMhm 的貓隻在性別部份公貓 (42.9%, 9/21) 比母貓 (14.3%, 3/21) 的比例高，品種方面則是混種貓 (57.1%, 12/21) 比品種貓 (1%, 2/21) 比例高，而年齡部份則是低於 6 歲 (38.1%, 8/21) 比高於 6 歲 (28.6%, 6/21) 的貓隻比例高。

所有的 PCR 陽性檢體皆再使用另一組引子對擴增較長之 16S rRNA 基因序列，Mhf 16S rRNA 序列長度為 771 bp，CMhm 16S rRNA 序

表二、經 PCR 診斷陽性之 Mhf、CMhm 及 CMt 貓隻之數目及基本資料

Table 2. Number and information of cats that tested PCR positive for Mhf, CMhm, and CMt

Pathogen	Sex				Breed				Age			
	All cats	male	female	unknown	All cats	mix	DSH	unknown	All cats	> 6y	< 6y	unknown
CMhm	21	9	3	9	21	12	2	7	21	6	8	7
Mhf	5	2	3	0	5	3	2	0	5	0	3	2
CMhm+Mhf	3	1	1	1	3	1	0	2	3	1	1	1
CMt	2	1	1	0	2	2	0	0	2	0	2	0

列長度為 930 bp，CMt 16S rRNA 序列長度為 1,254 bp。定序結果顯示，5 個台灣 Mhf 株之 16S rRNA 序列彼此之間相似度為 100%，且與美國株 (AF178677) 之相似度為 100%。在 21 個 CMhm 台灣株中，13 個 CMhm 序列 (命名為 TWN no. 79) 相同且與英國株 (HE613254) 序列相似度為 99.8% (920/922 bp)。6 個 CMhm 序列相同 (命名為 TWN no. 170) 且與英國株 (HE613254) 序列相似度為 99.6% (919/922 bp)。2 個 CMhm 序列相同 (命名為 TWN no. 172) 與以色列株 (AY150974.1) 之相似度為 99.4% (917/922 bp)。此外，CMhm 台灣株之 16S rRNA 序列彼此之間相似度為 97.3%-99.8%，TWN no.79 與 TWN no. 170 株序列相似度為 99.8% (921/922 bp)，TWN no. 79 與 TWN no.172 株序列相似度為 97.5% (899/922 bp)，TWN No.170 與 TWN No.172 株序列相似度為 97.3% (898/922 bp)。2 個 CMt 台灣株之 16S rRNA 序列彼此之間相似度為 99% (1,240/1,253 bp)，其中一個 CMt TWN no. 66 株序列與南非株 (DQ464422) 之相似度為 100%，另一個 CMt TWN no. 93 株序列與瑞士 (AY831867) 株相似度為 100%。親緣關係

樹狀圖結果可看出 Mhf、CMhm 及 CMt 皆各自成為一族群，而 Mhf、CMhm 及 CMt 台灣株也分別分佈於相同病原體的位置 (圖 1)。

## 討論

本研究是台灣中部地區首次利用分子診斷方法進行貓隻感染 *Mycoplasma* 病原的調查。研究結果顯示台灣中部地區貓隻感染 Mhf、CMhm 及 CMt 這三種病原體，其中以 CMhm 的流行率最高，再來是 Mhf 及 CMt。這樣的流行率與加拿大<sup>(8)</sup>、德國<sup>(9)</sup>、義大利<sup>(4)</sup>、英國<sup>(13)</sup> 及日本<sup>(3)</sup> 等國家的情形相似。本研究有 3 隻貓隻有共同感染 Mhf 及 CMhm 的情形，先前美國、英國、瑞士、澳洲及非洲地區的貓隻也證實共同感染 2 種甚至 3 種不同 *Mycoplasma* 病原體<sup>(7, 11, 19, 25, 26)</sup>，而這些結果顯示這 3 種 *Mycoplasma* 病原體之間並沒有免疫性的交叉保護 (immunological cross-protection) 作用<sup>(26)</sup>，亦即表示感染其中一種血巴東蟲仍有可能會感染另一種血巴東蟲。在臨床症狀方面，研究指出感染 CMhm 不會有明顯的臨床症狀或是只有輕度的症狀<sup>(1)</sup>。但本研究中 21 隻感染 CMhm 的貓隻，其中有 19 隻貧血，7 隻血小板減少。

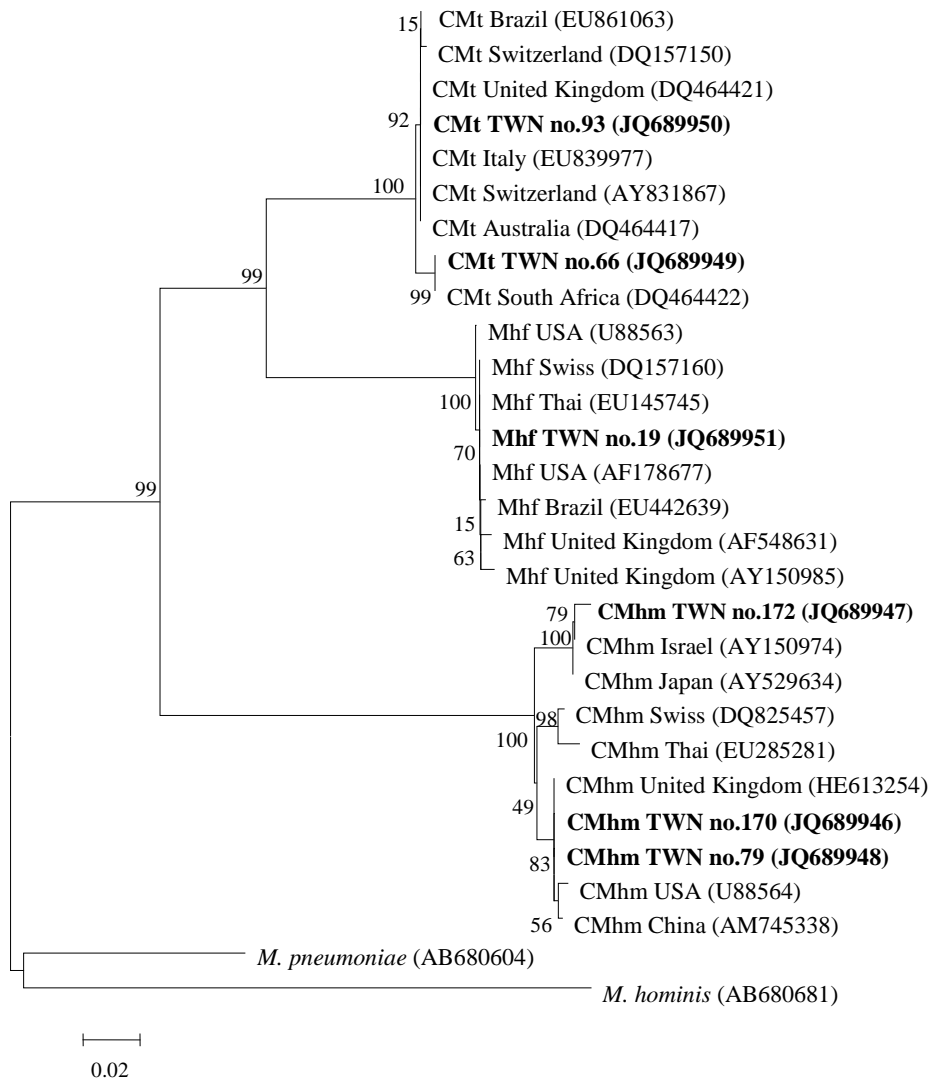


圖 1. 台灣地區之 Mhf、CMhm、CMt 株及相關 *Mycoplasma* spp. 16S rRNA 基因序列之親緣關係樹狀圖。此樹狀圖是利用 NJ 的方法建製。在分枝上數字是 500 個 replications 使用 bootstrap 運算方法所得。本研究提及的序列名稱及編號以粗體字表示。序列之 GenBank 編號則標示於括號內。

Fig. 1. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences of Taiwan Mhf, CMhm and CMt DNA isolates and closely related *Mycoplasma* spp. The phylogenetic tree was built by using neighbor-joining method. Number above the branch demonstrates bootstrap support from 500 replications. Sequences described in this study are indicated in bold. The GenBank accession numbers are given in parentheses.

3 隻脫水，顯示貓隻感染 CMhm 仍會造成不同的臨床症狀，不過仍不能排除是其他共同感染的病原體所造成的症狀。另一方面，有研究經實驗證實貓隻經實驗感染 FeLV 及 CMhm 比單獨只感染 CMhm 更會發展成嚴重的貧血，且感染 FeLV 的貓隻若感染 CMhm 可能會導致骨髓增生性 (myeloproliferative) 的疾病<sup>(5)</sup>。

本研究感染 CMt 的 2 隻貓隻皆未共同感染 Mhf 或是 CMhm，雖然 Willi 等人<sup>(26)</sup> 證實 CMt 與 CMhm 或 Mhf 共同感染有顯著的相關性，而相關性則可能由相同的傳播途徑所造成，例如藉由吸血的節肢動物。在臨床症狀方面，這 2 隻感染 CMt 貓隻皆有貧血的情形，其中 no.66 貓隻還合併感染 FeLV，而這可能是造成貓隻貧血的原因<sup>(24, 25)</sup>。由本研究的結果顯示感染 Mhf、CMhm 或 CMt 的貓隻呈現多樣性的臨床症狀，Willi 等人<sup>(27)</sup> 曾提及貓感染血巴東蟲的臨床症狀可能從無症狀到有威脅生命的溶血之差異，取決於貓隻感染何種血巴東蟲、宿主的易感受性 (susceptibility) 且正處於急性感染或是慢性感染的時期。研究指出貓感染血巴東蟲可能會降低共同感染的抵抗力<sup>(15)</sup>，所以獸醫師須注意貓隻感染血巴東蟲的潛在危險性。

貓自血巴東蟲急性期感染恢復之後，可能仍會有慢性感染的問題存在，且通常是 CMhm 感染較易造成終生的帶原狀況<sup>(25)</sup>。這些健康的貓隻可能成為環境當中其他貓隻感染的來源，而感染復發的情形則鮮少有報告<sup>(1, 2)</sup>。此外，有研究指出不論在何時高達 10% 健康的貓隻有感染貓血巴東蟲的情形<sup>(8, 19)</sup>，表示 PCR 陽性結果並不一定與臨床症狀有關係。因貓隻短暫接受抗生素治療後 PCR 檢驗呈現陰性結果，但在

一個禮拜後終止抗生素治療 PCR 結果又呈現陽性<sup>(1)</sup>。因此必須注意 PCR 診斷用的血液必須要在抗生素使用前採集。另一方面，在抗生素短暫治療後 PCR 呈現陰性結果也不能排除是慢性感染情形。因為有許多貓隻慢性感染血巴東蟲但卻缺乏臨床症狀，所以 Tasker 等人<sup>(20, 21)</sup> 建議陽性的 PCR 結果必須要跟臨床症狀、血液學檢查及其他共同感染的疾病一起進行考慮後再做診斷。在台灣臨床診斷部份，利用顯微鏡觀察血液抹片仍是最常使用的方法，因目前仍未有相關快速篩檢的商品且 PCR 檢驗方式並不普及，所以很有可能臨床上未診斷出感染貓血巴東蟲的貓隻比例會偏高。由以上的結果，我們建議未來在臨床檢驗部份能配合 PCR 檢驗方法及血液學檢查來進行診斷。

有研究指出年紀大、公貓、咬傷造成的膿瘡、反轉錄病毒感染、非純種的血統及有戶外活動等因素皆為造成貓隻感染 Mhf 及 CMhm 的危險因子<sup>(6, 11, 19, 25)</sup>。本研究因部分檢體病歷紀錄不全未能得到完整的資料，但就現有的資料顯示感染 CMhm 的貓隻也許與公貓、非純種血統相關，這樣的結果也符合上面所提及的 2 個危險因子，而公貓與混種貓是否也與戶外活動相關則無法了解，這部分仍需更進一步的研究。相反的，也有研究指出年齡小於 4-6 歲的貓隻是感染貓血巴東蟲的危險因子<sup>(7)</sup>，而本研究結果也支持這樣的結論。至於 Mhf、CMt 及共同感染 Mhf 和 CMhm 皆因陽性檢體太少且資料不全造成結果有所偏頗，所以在這裡不予以討論。在序列比對部份，CMhm 的貓隻 16S rRNA 序列與英國及以色列株非常接近，而兩者序列之間的相似度僅 97.3%，觀察親緣關係



樹狀圖結果也顯示 TWN no.79 與 TWN no.170 及 TWN no.172 這 3 株序列分別位在不同的分枝 ( branch ) 當中 ( 見圖 1 )。顯示中部地區貓隻流行兩種不同的 CMhm 株，而其中英國株佔較多數。兩個感染 CMt 的貓隻 16S rRNA 基因序列在親緣關係樹狀圖中也是位於不同的分枝中 ( 見圖 1 )。顯示台灣地區存在著兩種不同的 CMt 株。由親緣關係樹狀圖結果顯示不論是 Mhf、CMhm 或是 CMt 株並沒有顯示特有的地理相關性，但是同一種的病原皆聚集在相同的族群中，有研究推測可能因致病力不同而分成不同的族群<sup>(28)</sup>。

總而言之，本研究首度利用分子診斷的方式證實台灣中部地區貓隻感染 Mhf、CMhm 及 CMt 3 種不同的血巴東蟲，且分析 3 種不同病原所造成多樣的臨床症狀，也進一步了解台灣中部地區這 3 種病原與其他國家株的差異性。未來期許能由不同地區進行採樣，以了解台灣不同地區之病原體流行率是否有差異，且進一步收集更多數量的陽性檢體以利用統計分析了解台灣地區貓隻感染的相關危險因子為何，以提供獸醫師臨床上診斷的參考。

## 參考文獻

1. Foley, J. E., S. Harrus and A. Poland. 1998. Molecular, clinical and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *Am J. Vet Res.* 59: 1581-1588.
2. Foley, J. E. and N. C. Pedersen. 2001. "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*", a low-virulence epierithrocytic parasite of cats. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 815-817.
3. Fujihara, M., M. Watanabe, T. Yamada and R. Harasawa. 2007. Occurrence of "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" infection in domestic cats in Japan. *J. Vet Med Sci.* 69: 1061-1063.
4. Gentilini, F., M. Novacco, M. E. Turba, B. Will, M. L. Bacci and R. Hofmann-Lehmann. 2009. Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. *J. Feline Med Surg.* 11: 277-285.
5. George, J. W., B. A. Rideout, S. M. Griffey and N. C. Pedersen. 2002. Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. *Am J. Vet Res.* 63: 1172-1178.
6. Grindem, C. B., W. T. Corbett and M. T. Tomkins. 1990. Risk factors for *Haemobartonella felis* infection in cats. *J. Am Vet Med Assoc.* 196: 96-99.
7. Jensen, W. A., M. R. Lappin, S. Kamkar and W. J. Reagan. 2001. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *Am J. Vet Res.* 62: 604-608.
8. Kamrani, A., V. R. Parreira, J. Greenwood and J. F. Prescott. 2008. The prevalence of *Bartonella*, *hemoplasma*, and *Rickettsia felis*

- infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario. *Can J. Vet Res.* 72: 411-419.
9. Laberke, S., F. Just, K. Pfister and K. Hartmann. 2010. Prevalence of feline haemoplasma infection in cats in Southern Bavaria, Germany, and infection risk factor analysis. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 123: 42-48.
  10. Lappin, M. R., B. Griffin, J. Brunt, A. Riley, D. Burney, J. Hawley, M. M. Brewer and W. A. Jensen. 2006. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *J. Feline Med Surg.* 8: 85-90.
  11. Luria, B. J., J. K. Levy, M. R. Lappin, E. B. Breitschwerdt, A. M. Legendre, J. A. Hernandez, S. P. Gorman and T. T. Lee. 2004. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *J. Feline Med Surg.* 6: 287-296.
  12. Neimark, H., K. E. Johansson, Y. Rikihisa and J. G. Tully. 2001. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of “*Candidatus Mycoplasma haemofelis*”, “*Candidatus Mycoplasma haemomuris*”, “*Candidatus Mycoplasma haemosuis*” and “*Candidatus Mycoplasma wenyonii*”. *Int J. Syst Evol Microbiol.* 51: 891-899.
  13. Peters, I. R., C. R. Helps, B. Willi, R. Hofmann-Lehmann and S. Tasker. 2008. The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. *Vet Microbiol.* 126: 142-150.
  14. Shaw, S. E., M. J. Kenny, S. Tasker and R. J. Birtles. 2004. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. *Vet Microbiol.* 102: 183-188.
  15. Sykes, J. E. 2003. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 33: 773-789.
  16. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24: 1596-1599.
  17. Taroura, S., Y. Shimada, Y. Sakata, T. Miyama, H. Hiraoka, M. Watanabe, K. Itamoto, M. Okuda and H. Inokuma. 2005. Detection of DNA of “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. *J. Vet Med Sci.* 67: 1277-1279.
  18. Tasker, S. and M. R. Lappin. 2002. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. *J. Feline Med Surg.* 4: 3-11.
  19. Tasker, S., S. H. Binns, M. J. Day, T. J.

- Gruffydd-Jones, D. A. Harbour, C. R. Helps, W. A. Jensen, C. S. Olver and M. R. Lappin. 2003. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* in cats in the United Kingdom. *Vet Rec.* 152: 193-198.
20. Tasker, S., S. M. Caney, M. J. Day, R. S. Dean, C. R. Helps, T. G. Knowles, P. J. Lait, M. D. Pinches and T. J. Gruffydd-Jones. 2006a. Effect of chronic FIV infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on *Mycoplasma haemofelis* infection. *Vet Microbiol.* 117: 169-179.
21. Tasker, S., S. M. Caney, M. J. Day, R. S. Dean, C. R. Helps, T. G. Knowles, P. J. Lait, M. D. Pinches and T. J. Gruffydd-Jones. 2006b. Effect of chronic feline immunodeficiency infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*" infection. *Microbes Infect.* 8: 653-661.
22. Tasker, S. 2010. Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? *J. Feline Med Surg.* 12: 369-381.
23. Watanabe, M., M. Hisasue, K. Hashizaki, M. Furuichi, M. Ogata, S. Hisamatsu, E. Ogi, M. Hasegawa, R. Tsuchiya and T. Yamada. 2003. Molecular detection and characterization of *Haemobartonella felis* in domestic cats in Japan employing sequence-specific polymerase chain reaction (SS-PCR). *J. Vet Med Sci.* 65: 1111-1114.
24. Willi, B., F. S. Boretti, V. Cattori, S. Tasker, M. L. Meli, C. Reusch, H. Lutz and R. Hofmann-Lehmann. 2005. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. *J. Clin Microbiol.* 43: 2581-2585.
25. Willi, B., F. S. Boretti, C. Baumgartner, S. Tasker, B. Wenger, V. Cattori, M. L. Meli, C. E. Reusch, H. Lutz and R. Hofmann-Lehmann. 2006a. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *J. Clin Microbiol.* 44: 961-969.

Received: October 23, 2011.

Accepted: December 6, 2011.