

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：肺炎披衣菌於兒童血管炎症候群之致病角色

計畫編號：NSC

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：李秉穎

執行機構及單位名稱：台大醫學院小兒科

## 中文摘要

肺炎披衣菌 (*Chlamydia pneumoniae*) 是目前已知的四種披衣菌的一種，目前的研究知道肺炎披衣菌常常引起肺炎、支氣管炎、鼻竇炎、咽喉炎等呼吸道疾病，其臨床症狀相當類似肺炎黴漿菌(*Mycoplasma pneumoniae*) 引起的肺炎。台大醫學院小兒科最近完成了的研究中，在 97 名非典型肺炎的兒童之中，有 16 例肺炎披衣菌感染病例，顯示肺炎披衣菌感染在台灣兒童的社區肺炎僅次於黴漿菌，而是第二常見的原因。

本研究計畫對於此菌做詳細的研究，進一步分析它在兒童未知原因疾病所佔的角色。根據肺炎披衣菌 IgA 與 IgM 抗體的檢驗結果，73 名川崎病兒童中，有 6 位 (8.2%) 抗體陽性，其陽性比率與正常兒童 15/143 (10.5%) 比較並無明顯差異。7 例菊池病兒童中 3 例 (42.9%) 抗體陽性，陽性率明顯高於對照 ( $P=0.048$ )。2 例幼年風濕性關節炎兒童均為陰性。31 例腦炎兒童中有 4 例 (13%) 陽性，其陽性比率與正常兒童比較並無明顯差異。11 例過敏性紫斑症兒童中有 3 例 (27.3%) 陽性，其陽性比率與正常兒童比較並無明顯差異。58 例腸病毒感染兒童中有 9 例 (15.5%) 陽性，其陽性比率與正常兒童比較並無明顯差異。

關鍵詞：肺炎披衣菌、川崎病、菊池病、血管炎

## 計畫緣由與目的

肺炎披衣菌 (*Chlamydia pneumoniae*) 是目前已知的四種披衣菌的一種，在這四種披衣菌之中，肺炎披衣菌與沙眼披衣菌 (*Chlamydia trachomatis*) 主要感染人類；鸚鵡熱披衣菌 (*Chlamydia psittaci*) 主要感染鳥類與低等哺乳類，偶而感染人類；*Chlamydia pecorum* 則只感染牛羊，沒有人類的病例報告 [1-3]。肺炎披衣菌的首度發現是在 1965 年於台灣發現 [4]，其第一次分離的菌株被稱為 TW-183，後來在美國一位罹患咽喉炎的大學生分離出名為 AR-39 的菌株 [5]，所以最初被命名為 TWAR。其中，TW 就是台灣英文的前兩個字。1989 年，TWAR 被認定是披衣菌的一個新的菌種，又因為它被證實主要可以引起人類的肺炎，所以訂名為肺炎披衣菌 [1]。目前的研究知道肺炎披衣菌常常引起肺炎、支氣管炎、鼻竇炎、咽喉炎等呼吸道疾病 [6]，其臨床症狀相當類似肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma pneumoniae*) 引起的肺炎。它在兒童肺炎所佔的比例在各個報告不同，由 1% [7] 到 10% [3] 都有報告。大致而言，在社區感染的肺炎之中，肺炎披衣菌佔了大約 5-15% 的比例 [3]。

在血清流行病學的研究之中，肺炎披衣菌感染最常發生在五至十五歲的兒童，顯示學校是傳染此菌的重要場所 [1]。在軍營 [8]、托兒所與幼稚園 [9]、醫院內 [10] 都有發生傳染的報告。在高雄的調查，曾經發現十歲以下的抗體陽性率為 23.1%，十至二十歲為 66.7% [11]，此抗體陽性率明顯高於世界其他地區，顯示溫熱帶地區的感染年齡較早 [12]，而台灣地區的感染年齡極早。但是上述高雄地區的報告在十歲以下與十至二十歲之間各只檢驗了二十幾名兒童，無法詳細地分析兒童的感染年齡，有待更多兒童的血清抗體檢驗，以了解台灣地區的詳細感染情形。此點尤其是在五歲以下的兒童特別重要，因為有一些數據顯示五歲以下兒童罹病可能會比較厲害 [1]，而目前台灣地區的幼兒大多會去托兒所等容易發生傳染的場所，是否會使得我們的兒童的罹病年齡較早，值得深入研究。

台大醫學院小兒科在衛生署的補助下，最近完成了一個兒童肺炎披衣菌感染的研究 (DOH88-TD-1006：肺炎披衣菌於兒童感染之研究)。在血清流行病學的調查中，475 件血清檢體的肺炎披衣菌抗體陽性率是 56.2%。5-10 歲之間的抗體陽性率是 10.3%，此後抗體陽性率直線上升，直到 40-50 歲的年齡層。高於 40-50 歲者，抗體陽性率維持在 70-80% 之間。在 97 名非典型肺炎的兒童之中，有 55 位診斷出病因，包括肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma pneumoniae*) 32 例、肺炎披衣菌 16 例、混合黴漿菌與披衣菌感染 1 例、混合黴漿菌與 B 型流行性感冒病毒感染 1 例、呼吸道細胞融合病毒 (respiratory syncytial virus) 1 例、A 型流行性感冒病毒 2 例、B 型流行性感冒病毒 1 例與腺病毒 1 例。此資料顯示肺炎披衣菌感染在台灣兒童的社區肺炎僅次於黴漿菌，而是第二常見的原因。

肺炎披衣菌除了引起呼吸道感染以外，還會引起很多其他的併發症，包括肋膜炎 [13]、Guillain-Barré 症候群 [14]、腦膜腦炎 [15]、心肌炎、心包膜炎與心內膜炎 [16]、結節性紅斑 (erythema nodosum) [17]、關節炎 [18]、引發氣

喘發作 [19] 等。最近有很多報告也提及肺炎披衣菌與動脈硬化有關 [20-21]，甚至在發生硬化的動脈上可以找到菌體 [22]，這些發現顯示肺炎披衣菌可能可以發生全身性的感染 [1]，而是人類一些重要疾病的致病因子。最近更有些報告指出肺炎披衣菌可能跟川崎病 (Kawasaki disease) 和其它的一些血管炎症候群有關 [23-25]，因為披衣菌本來就有著可能可以感染血管的特點，所以值得我們進一步去研究各種兒童常見的血管炎症候群 (vasculitis syndrome)，是否與肺炎披衣菌有關。這些所謂的血管炎症候群，包括了幼年型類風濕性關節炎 (juvenile rheumatoid arthritis)、系統性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus)、川崎病 (Kawasaki disease)、過敏性紫斑症 (anaphylactoid purpura) 等，雖然這些疾病在過去都被歸類為自體免疫疾病，但是根據其急性發作、急性緩解的臨床表現，其實早就被人懷疑它們可能是一些感染症的特殊表現。

肺炎披衣菌是首度在台灣發現的披衣菌，但是台灣還沒有專門而深入的研究。本研究計畫對於此菌做詳細的研究，進一步分析它在兒童未知原因疾病所佔的角色，並且釐清國外所謂有相關性的研究是否為事實。

### 材料與方法

〔研究對象〕本研究一共收集 73 例川崎病兒童、7 例菊池病 (Kikuchi disease)、2 例幼年風濕性關節炎 (juvenile rheumatoid arthritis)、31 例腦炎、11 例過敏性紫斑症 (anaphylactoid purpura)，並收集罹患腸病毒感染的 58 例兒童與 143 名健康兒童以資對照。

#### 〔檢體〕

1. 咽喉擦拭檢體：將喉嚨擦拭檢體浸泡於 2 ml 緩衝液 (Phosphate buffered saline) 之中，每次檢驗取 500 微升液體做 PCR 檢查。
2. 血清檢體：病童於發病後間隔 2-4 週抽取兩次血液，每次 3 毫升，分離出血清以後保存於攝氏零下二十度。
3. 其他檢體：視疾病種類保留適當的檢體，包括腦脊髓液、肋膜積水、關節囊液等。

#### 〔肺炎披衣菌抗體檢驗〕

血清的肺炎披衣菌的抗體使用 microimmunofluorescence assays 測定，測定的抗體包括 IgM、IgA (Chlamydia IgM SeroFIA, Chlamydia IgA SeroFIA, Savyon Diagnostic Ltd, Israel)。根據檢驗試劑的說明，急性肺炎披衣菌感染

的診斷條件包括：IgM 效價 $\geq 20$ 、IgA 效價 $\geq 32$ 。

#### [ 聚合酵素連鎖反應 ]

1. 以 phenol/chloroform 純化 100–500  $\mu$ l 檢體中的 DNA，檢體包括血液、咽喉擦拭與其他體液。
2. 將 DNA 做 nested PCR 增幅反應。肺炎披衣菌的兩對先質 (primer) 為 5' TTA CAA GCC TTG CCT GTA GG、5' GCG ATC CCA AAT GTT TAA GGC (outer primers) 與 5' TTA TTA ATT GAT GGT ACA ATA、5' ATC TAC GGC AGT AGT ATA GTT (inner primer)。
3. PCR: 取 DNA 抽取液 10  $\mu$ l 做為模板 (template) 進行反應。反應終體積為 100  $\mu$ l，成分包括 10 mM Tris.HCl (pH 8.3)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、0.01% gelatin (wt/vol)、200  $\mu$ M dNTP、1  $\mu$ M 先質 (primer)、2U Taq 聚合酵素。反應設定為先在攝氏 94 度 3 分鐘，然後跑 32 循環的 94 度 40 秒、55 度 1 分鐘、72 度 1 分鐘，最後在攝氏 72 度 10 分鐘。此反應的敏感度約為 10 個病毒 DNA。
4. 1.5% gel electrophoresis，判讀檢體中有否肺炎披衣菌之核酸。

#### [ 聚合酵素連鎖反應 ]

1. 以 phenol/chloroform 純化 100  $\mu$ l 血清中的 DNA。
2. 將包含抗原位址 a 的一段 DNA 做 nested PCR 增幅反應。第一次 PCR 的先質 (primer) 為 5' ATCGCTGGATGTGTCTGCGG (map position 369 - 388) 與 5' TTAGGGTTTAAATGTATACCC (map position 842 - 822)。第二次 PCR 的先質為 5' CATCCTGCTGCTATGCCTCATCTT (map position 409 - 432) 與 5' CAATACCACATCATCCATATAACT (map position 757 - 734)。
3. PCR: 取 DNA 抽取液 10  $\mu$ l 做為模板 (template) 進行反應。反應終體積為 100  $\mu$ l，成分包括 10 mM Tris.HCl (pH 8.3)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、0.01% gelatin (wt/vol)、200  $\mu$ M dNTP、1  $\mu$ M 先質 (primer)、2U Taq 聚合酵素。反應設定為先在攝氏 94 度 3 分鐘，然後跑 32 循環的 94 度 40 秒、55 度 1 分鐘、72 度 1 分鐘，最後在攝氏 72 度 10 分鐘。此反應的敏感度約為每個檢體 10-20 個 B 型肝炎病毒 DNA。
4. 以 GENE CLEAN II kit (BIO 101 Inc., USA) 純化 PCR 產物。
5. 用第二次 PCR 反應的 inner primer，使用 AmpliCycle Sequencing kit (Perkin Elmer, USA) 直接作核酸序列分析。每個檢體用兩個先質，至少分別作兩次序列分析。

### [ 統計分析 ]

以 Chi-square test with Yates' correction 分別比較各組之間數據的差異。

### 結果

根據肺炎披衣菌 IgA 與 IgM 抗體的檢驗結果 (表)，73 名川崎病中，有 6 位 (8.2%) 抗體陽性，其陽性比率與正常兒童 15/143 (10.5%) 比較並無明顯差異。7 例菊池病兒童中 3 例 (42.9%) 抗體陽性，陽性率明顯高於對照 (P=0.048)。2 例幼年風濕性關節炎兒童均為陰性。31 例腦炎兒童中有 4 例 (13%) 陽性，其陽性比率與正常兒童比較並無明顯差異。11 例過敏性紫斑症兒童中有 3 例 (27.3%) 陽性，其陽性比率與正常兒童比較並無明顯差異。58 例腸病毒感染兒童中有 9 例 (15.5%) 陽性，其陽性比率與正常兒童比較並無明顯差異。

所有兒童的咽喉擦拭檢體的 PCR 反應均為陰性。

### 討論

本研究結果中，只有菊池病兒童的肺炎披衣菌抗體陽性率高於正常對照組，這是值得進一步研究的對象。菊池病是一種原因不明的淋巴腺炎，大多表現為單側或雙側的疼痛性淋巴腺腫大，病人常有長期發燒而對一般抗生素無治療反應。其病因不明，大多數學者認為這可能是一種自體免疫疾病。本研究的發現將有助於釐清菊池病的原因，但因為本研究受限於研究期限，所收集的個案數太少，將來必須收集更多病例以釐清其致病角色。

### 參考文獻

1. Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:675-85.
2. Cook PJ, Honeybourne D. *Chlamydia pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 859-73.
3. Kauppinen M, Saikku P. Pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae*: prevalence, clinical features, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 1995;21 (Suppl.):S244-52.
4. Grayston JT, Woolridge RL, Wang SP, et al. Field studies of protection from infection by experimental trachoma virus vaccine in preschool-aged children on Taiwan. *Proc Soc Exp Biol Med* 1963; 112: 589-95.
5. Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J Med* 1986;315:

- 161-8.
6. Aldous MB, Grayston JT, Wang SP, Foy HM. Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families, 1966-1979. J Infect Dis 1992; 166: 646-9.
  7. Jantos CA, Wienpahl B, Schiefer HG, Wagner F, Hagemann JH. Infections with *Chlamydia pneumoniae* in infants and children with acute lower respiratory tract disease. Pediatr Infect Dis J 1995; 14: 117-22.
  8. Kleemola M, Saikku P, Visakorpi R, Wang SP, Grayston TJ. Epidemics of pneumonia caused by TWAR, a new Chlamydia organism, in military trainees in Finland. J Infect Dis 1988; 157:230-6.
  9. Pether JVS, Wang SP, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, as the cause of an outbreak in a boys' school previously called psittacosis. Epidemiol Infect 1989; 103: 395-400.
  10. Grayston JT, Mordhorst CH, Bruu AL, Vene AL, Wang SP. Country-wide epidemics of *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, in Scandinavia, 1981-1983. J Infect Dis 1989; 159: 1111-4.
  11. Wang JH, Liu YC, Cheng DL, Yeng MY, Chen YS, Chen BC. Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* in Taiwan. Scand J Infect Dis 1993;25: 565-68.
  12. Wang SP, Grayston JT. Population prevalence antibody to *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR. In: Bowie WR, Caldwell HD, Jones RP, et al, eds. Chlamydia infections. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1990; 402-5.
  13. Augenbraun MH, Roblin PM, Mandel LJ, Hammerschlag MR, Schachter J. *Chlamydia pneumoniae* with pleural effusion: diagnosis by culture. Am J Med 1991; 91: 437-8.
  14. Haidl S, Ivarsson S, Bjerre I, Persson K. Guillain-Barré syndrome after *Chlamydia pneumoniae* infection. N Engl J Med 1992; 10: 1042-7.
  15. Socan M, Beovic B, Kese D. Chlamydia pneumonia and meningoencephalitis. N Engl J Med 1994; 331: 406.
  16. Odeh M, Oliven A. Chlamydia infections of the heart: a review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11: 885-93.
  17. Erntell M, Ljunggren K, Gadd T, Persson K. Erythema nodosum - a manifestation of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection. Scand J Infect Dis 1989; 21: 693-6.
  18. Braun J, Laitko S, Treharne J, et al. *Chlamydia pneumoniae* - a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. Ann Rheumat Dis 1994; 53: 100-5.
  19. Hahn DL, Dodge RW, Golubjatnikov R. Association of *Chlamydia pneumoniae*

- (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. J Am Med Assoc 1991; 266: 225-30.
20. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet 1988; 2: 983-6.
  21. Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA, Benditt EP. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR and atherosclerosis: a review. Eur Heart J 1993; 14: 66-71.
  22. Grayston JT, Thom DH, Kuo CC, Campbell LA, Wang SP. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) and atherosclerosis: a review. In: Orfila J, Byrne GL, Chernesky MA, et al, eds. Chlamydial infections. Bologna, Italy: Societa Editrice Esculapio, 1994: 199-208.
  23. Normann E, Naas J, Gnarpe J, Backman H, Gnarpe H. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular tissues from children with Kawasaki disease. Pediatr Infect Dis J 1999; 18:72-3.
  24. Ljungstrom L, Franzen C, Schlaug M, Elowson S, Viidas U. Reinfection with *Chlamydia pneumoniae* may induce isolated and systemic vasculitis in small and large vessels. Scand J Infect Dis 1997; 104(Suppl): 37-30.
  25. Juvonen J, Juvonen T, Laurila A, et al. Immunohistochemical detection of *Chlamydia pneumoniae* in abdominal aortic aneurysms. Ann NY Acad Sci 1996; 800:236-8.

表、肺炎披衣菌抗體檢驗結果

| 診斷                               | 病例數 | Chlamydia pneumoniae 抗體檢驗<br>(病例數) |        |                     | P value* |
|----------------------------------|-----|------------------------------------|--------|---------------------|----------|
|                                  |     | IgA(+)                             | IgM(+) | IgA(+) or<br>IgM(+) |          |
| Kawasaki disease                 | 73  | 3                                  | 4      | 6 (8.2%)            | NS       |
| Kikuchi disease                  | 7   | 2                                  | 1      | 3 (42.9%)           | 0.048    |
| Juvenile<br>rheumatoid arthritis | 2   | 0                                  | 0      | 0 (0%)              | NS       |
| Encephalitis                     | 31  | 2                                  | 2      | 4 (13%)             | NS       |
| Anaphylactoid<br>purpura         | 11  | 3                                  | 0      | 3 (27.3%)           | NS       |
| Enterovirus<br>infection         | 58  | 6                                  | 3      | 9 (15.5%)           | NS       |
| Normal control                   | 143 | 8                                  | 10     | 15 (10.5%)          | NS       |

\*與對照組比較，Chi-square test with Yates' correction。

#NS: not significant。