計畫編號：DOH90-DC-1027

行政院衛生署疾病管制局九十年度委託研究計畫

台灣鉤端螺旋菌感染之血清流行病學調查暨鉤端螺旋菌導致無菌性腦膜炎之研究

委 託 研 究 成 果 報 告

執行機構：國立臺灣大學醫學院附設醫院小兒部

研究主持人：呂俊毅

研究人員： 黃立民、蔡秀媛、邱婷芳、林文川

執行期間： 90 年 2 月 9 日至 90 年 12 月 31 日

＊本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見＊

目　　錄

	頁　碼
封面	
目錄	
壹、中文摘要	（ 2 ）
貳、英文摘要	（ 3 ）
參、計畫緣起與目的	（ 4-5 ）
肆、材料及方法	（6-10）
伍、結果	（11-15）
陸、討論與結論建議	（16-17）
柒、重要參考文獻	（18-19）
	共 19 頁

中文摘要：

致病性鉤端螺旋菌為人畜共通疾病之重要病原菌，感染的主要的途徑是經由直接或間接接觸被感染的動物或其尿液。此病臨床表現包含結膜充血、皮膚起紅疹、腦膜炎、蛋白尿及寡尿、黃疸、腸胃或肺出血、心律不整甚至器官衰竭。臨床雖然多為無症狀或輕微症狀之感染，但是有 5-10% 患者會有生命危險。在台灣，此病之重要性因診斷不易而被低估。鉤端螺旋菌造成的疾病可用抗生素做有效的治療，所以嚴重病例若能早期診斷、早期治療，可預防併發症、甚至死亡的產生。此外，在小兒科臨床上常見之無菌性腦膜炎，有一大部分的病患得不到確定的病因診斷，根據國外文獻報告，鉤端螺旋菌感染可能佔有相當比例，若能做出正確的診斷，對於無菌性腦膜炎的治療能夠提供很大的幫助。

本研究的第一部份，以酵素連結免疫吸收法(ELISA)，針對台北市居民施行血清 IgG 抗體之流行病學調查，以期了解台北市社區居民鉤端螺旋菌感染之盛行率及分析感染之危險因子。共計收集士林區居民 519 位及北投區居民 500 位之血清及問卷調查表。酵素連結免疫吸收法，採用 INDX®IVD™ 公司的檢驗組（INDX®IVD™MICROWELL ELISA LEPTOSPIRA TEST）來測量血清中 IgG 抗體的指數。

研究結果顯示，士林區及北投區的血清陽性率，分別為 8.5%及 22.8%，北投區明顯高於士林區。在年齡分布上，兩區受檢者皆於 2-4 歲時便有許多人感染，說明社區居民於孩童早期便已接觸過感染原。在性別分布上，血清陽性者以女性居多。由女性及孩童之高感染率來說，感染源來自居家環境的可能性甚高(如家中鼠類及寵物)。在職業分布及旅遊史上，以 logistic regression analysis 分析，並無發現特殊之危險因子。飼養寵物狗之受檢者，其血清陽性率有較高之趨勢（卡方檢定，p = 0.06)。

本計劃第二部份，收集小兒科無菌性腦膜炎之病患進行分析。目前已經完成 116 位病患的檢驗，並持續收集中。在此 116 位病患中有 91 位進行了血清 IgM 的檢驗，其中 4 位是呈陽性。另一方面，116 位當中 114 位進行了 CSF 的 PCR 檢驗，有 3 位呈現陽性。這 3 位 PCR 呈陽性的病例中，有兩位的 IgM 也是陽性，另一位則是沒有血清可供檢驗。反之，4 位 IgM 陽性的病例中，有兩位的 CSF PCR 檢驗為陽性，另外兩位則為陰性。整體而言，有 5 位病患的 leptospirosis 呈陽性。這樣的結果顯示，台灣地區確實也有 leptospirosis 引起的腦膜炎，但是並不常見。在本研究當中，leptospirosis 引起的腦膜炎佔所有腦膜炎的 4.3%(5/116)。

中文關鍵詞(至少三個)：勾端螺旋菌、血清流行病學、無菌性腦膜炎、台北市

Abstract:

Leptospirosis is a worldwide zoonosis, especially in tropical and subtropical regions. The infection is acquired through contact with urine or tissues from animal reservoirs or environment contaminated by their urine. Leptospirosis is still an ignored disease in Taiwan. However, some sporadic cases have being reported in recent years. To realize the true prevalence and risk factors of leptospiral infection in Taipei city, we performed this community-based study. In 1999, 519 residents in Shilin and 500 residents in Peitou districts were enrolled. All sera of these residents were tested for IgG antibody against Leptospira and the 519 sera from Shilin were also tested for IgM antibody using commercial ELISA kits. Telephone visiting completed questionnaires to all 1019 subjects, which included age, sex, occupation, travelling history, pet's ownership, source of household water, and medical history in recent one month. χ^2 test and logistic regression analysis were used to analyze the relationship between seropositivity and some possible risk factors of leptospiral infection. The seroprevalence rates were 8.5% in Shilin and 22.8% in Peitou. The seroprevalence rates increased with age and some residents got this infection in their very early lives. Resident district, age, and sex were independent risk factors for leptospirosis. No occupation or travelling to locales at risk was found. Dog ownership might play a role in leptospirosis but the statistic evidence did not reach statistic significance. Only one of 519 sera from Shilin was positive for anti-leptospira IgM. Our results revealed leptospirosis is a common disease in Taipei city; this disease should be kept in mind during daily medical practice.

In addition, because exposure at home (pet dogs or rats) may be the major transmission route in the city, the general preventive measures should include vaccination of pet dogs and rodent control.

On the other hand, we also tested samples collected from 116 children with aseptic meningitis. Of the 114 CSF tested, 3 were positive of leptospirosis DNA; of the 91 sera tested, 4 were positive of IgM against leptospirosis. Two of them were positive for both CSF DNA and serum IgM. The overall postitive rate of leptospirosis in children with aseptic meningitis was 4.3% (5/116).

Keyword: leptospirosis, seroepidemiology, meningitis, Taipei

計畫緣起與目的

致病性鉤端螺旋菌為人畜共通疾病之重要病原菌，感染的主要的途徑是經由直接或間接接觸被感染的動物或其尿液。此病臨床表現包含結膜充血、皮膚起紅疹、腦膜炎、蛋白尿及寡尿、黃疸、腸胃或肺出血、心律不整甚至器官衰竭。臨床雖然多為無症狀或輕微症狀之感染，但是有 5-10% 患者會有生命危險。在台灣，此病之重要性因診斷不易而被低估。鉤端螺旋菌造成的疾病可用抗生素做有效的治療，所以嚴重病例若能早期診斷、早期治療，可預防併發症、甚至死亡的產生。此外，在小兒科臨床上常見之無菌性腦膜炎，有一大部分的病患得不到確定的病因診斷，根據國外文獻報告，鉤端螺旋菌感染可能佔有相當比例，若能做出正確的診斷，對於無菌性腦膜炎的治療能夠提供很大的幫助。本計劃第一部份，檢測來自台北市士林區和北投區兩地不同年齡層居民的血清檢體，共計 1000 人，使用酵素免疫吸收法(enzyme-linked- immunosorbent assay, ELISA)，測其對鉤端螺旋菌的 IgG 抗體指數，以估計此病在社區居民之盛行率。並透過對受檢者的問卷調查，試圖找出罹患鉤端螺旋菌感染的危險因子，做為日後傳染病防治的參考。本計劃第二部份，收集小兒科無菌性腦膜炎之病患進行分析。患者的腦脊髓液，以對鉤端螺旋菌具特異性的 16S 核醣核酸基因序列（16S RNA gene）為標的物，採用聚合脢鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)，進行鉤端螺旋菌核酸之檢測。同時使用酵素免疫吸收法，測其對鉤端螺旋菌的 IgM 與 IgG 抗體指數，作為診斷之參考。並透過病歷調閱及直接之病史詢問，收集相關之臨床資訊。期望發現鉤端螺旋菌腦膜炎在無菌性腦膜炎中所佔的比例及其臨床特徵、危險因子，對日後此類患者能給予正確的診斷和即時之治療。

材料及方法

【壹】台北市居民的鉤端螺旋菌血清流行病學調查

鉤端螺旋菌為人畜共通疾病的重要病因，本計劃擬檢測來自台北市士林區和北投區兩地居民的血清檢體，將其分為十個年齡層，依序為 0-1、1-2、2-3、3-4、4-6、6-12、13-20、21-30、31-50 及 >50 歲。每個年齡層取一百人，共計 1000 人，測其對鉤端螺旋菌的 IgG 抗體指數，以估計此病在社區居民中的盛行率。

鉤端螺旋菌包含超過 23 種血清型，我們擬使用酵素免疫吸收法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)來測試社區居民是否有鉤端螺旋菌抗體。一般在發病後後七到十天內即可在血液中發現 IgM 抗體，會持續數個月，且幾乎所有病例都可以見到。IgG 抗體則在症狀出現後十到三十天才見明顯上升，可持續數十年。本研究將採用 PanBio InDx, Inc, USA 公司的檢驗組（INDX®IVD™ MICROWELL ELISA LEPTOSPIRA TEST,）來測量血清中 IgG 抗體的指數。此檢驗組利用附著有特異性鉤端螺旋菌共同抗原（Leptospira Patoc 1 antigen）的小格（microwell）來偵測受試者血清中的抗體校價。先將受檢者的血清以 1 比 40 的比例稀釋，取 100 μL 置於含共同抗原的小格中，於室溫下十分鐘後，待抗原、抗體反應完全，再加入連接有過氧化脢的抗人類免疫球蛋白抗體（anti-human Ig antibody

conjugated to peroxidase)； 之後加入過氧化氫及呈色劑（tetramethylbenzidine, TMB)，若顏色由透明轉藍則顯示有抗體存在。使用酵素免疫吸收法判讀器（ELISA reader)，大於 0.5 OD 單位則視為陽性。以此法測 IgG 具有高敏感度與特異性（9)，使用方便又不需要特殊訓練即可操作，目前廣泛為國外學界採用。

除了使用 PanBio InDx, Inc, USA 公司的 INDX®IVD™ MICROWELL ELISA LEPTOSPIRA TEST Kit 以外，我們原本計劃同時使用 LEPTOSPIRA-MC TEST, Japan Lyophilization Laboratory, 以及 LEPTO DIPSTICK, Organon Teknika. 等試劑，以比較各種試劑在台灣地區鉤端螺旋菌感染的適用性。但是後來發現這些試劑購買不易，故更改做法，將已知 MAT 檢驗結果的檢體，用 INDX®IVD™ MICROWELL ELISA LEPTOSPIRA TEST Kit 檢驗，以測試其結果與 MAT 的一致性。

受檢者的問卷調查，內容包受檢者的個人基本資料（姓名、年齡、性別)、居住地址、職業、人口數、使用水源、旅行史、飼養寵物史、動物接觸史等。這些可能的危險因子，將配合受檢者血清抗體之情況，以卡方檢定的統計方式，找出罹患鉤端螺旋菌感染的真正危險因子。

【貳】鉤端螺旋菌導致無菌性腦膜炎之分析

本研究計劃收集台北市一家醫學中心（台大醫院）及兩家區域醫院（忠孝醫院、和平醫院）小兒科無菌性腦膜炎之病患進行分析。時間為民國八十

九年七月一日至民國九十年三月三十一日止，對象為上述三家醫院小於十八歲（含十八歲）無菌性腦膜炎之患者，預計收案 30 至 50 人。除了收集患者的血清及腦脊髓液，問卷調查將以病歷調閱及直接詢問病人或其家屬行之。問卷之內容包含病患個人基本資料（姓名、年齡、性別）、居住地址、父母（或本人）職業、使用水源、旅行史、飼養寵物史、動物接觸史，此次患病之臨床表現及相關檢查結果（臨床症狀、理學檢查、血球數、血液生化檢查、尿液分析、腦脊髓液血球數及生化檢查、腦波檢查、神經影像檢查、治療及預後）等。

無菌性腦膜炎患者的腦脊髓液，採用聚合脢鏈反應（PCR），進行鉤端螺旋菌核酸之檢測。參照國外 F.Merien 及 Eliete C. Romero 等學者的方法（11-13），本研究選用對鉤端螺旋菌具特異性的 16S 核醣核酸基因序列（16S rRNA gene）為標的物，設計出一對引子（primers）：A：5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3'（對應第 38 至 57 核酐酸）；B：5'-TTCCCCCCATTGAGCAAGATT-3'（對應第 348 至 368 核酐酸）。基因的放大，在總體積 50μL 的溶液中進行（內含 primers, Taq DNA polymerase, dATP, dTTP, dCTP, dGTP），經 30 週期的放大、凝膠電泳後，若在 331-BP 處出現條狀信號則是陽性結果。

對於這些病患，亦採用酵素免疫吸收法測量其體內 IgM 抗體，作為急性感染的另一項診斷證據，並和聚合脢鏈反應之結果相比較。本研究亦採用 INDX®IVD™ 公司的試劑（INDX®IVD™MICROWELL ELISA LEPTOSPIRA TEST）來

測量血清中 IgM 抗體的存在與否。方法同上述 IgG 的檢測，但在血清置入小格前，先與抗人類 G 型免疫球蛋白抗體（goat anti-human IgG）反應，除去 IgG 抗體，則最後測出來的結果即是 IgM 抗體的陽性與否。

透過本研究，期望發現鉤端螺旋菌腦膜炎在無菌性腦膜炎中所佔的比例及其臨床特徵、危險因子，對日後此類患者能給予正確的診斷和即時之治療。

結果

為了確定我們使用的 ELISA kit (INDX®IVD™ MICROWELL ELISA LEPTOSPIRA TEST)的可靠性，我們首先測試了 MAT 與 ELISA kit 的一致性。我們使用了 8 個已知 MAT 結果的檢體，以 INDX®IVD™MICROWELL ELISA LEPTOSPIRA TEST 進行測試，結果一致性為百分之百，如表一。

表一. The correlation between MAT and ELISA for leptospiral antibody detection

Sample No.	MAT results	ELISA results
1	Semaranga 400 ×	Strongly positive
	Shermani 100 ×	
	Tsaratsovo 100 ×	
	Ranarum 100 ×	
2	Shermani 800 ×	Strongly positive
3	Shermani 800 ×	Strongly positive
4	Shermani 100 ×	Positive
	bratislava 100 ×	
5	Tarassovi 100 ×	Borderline
6	Bratislava 100 ×	Negative
	lai 100 ×	
	Pomona 100 ×	
	balcanica 100 ×	
	Icterohaemorrhagiae 100 ×	
7	Negative	Negative

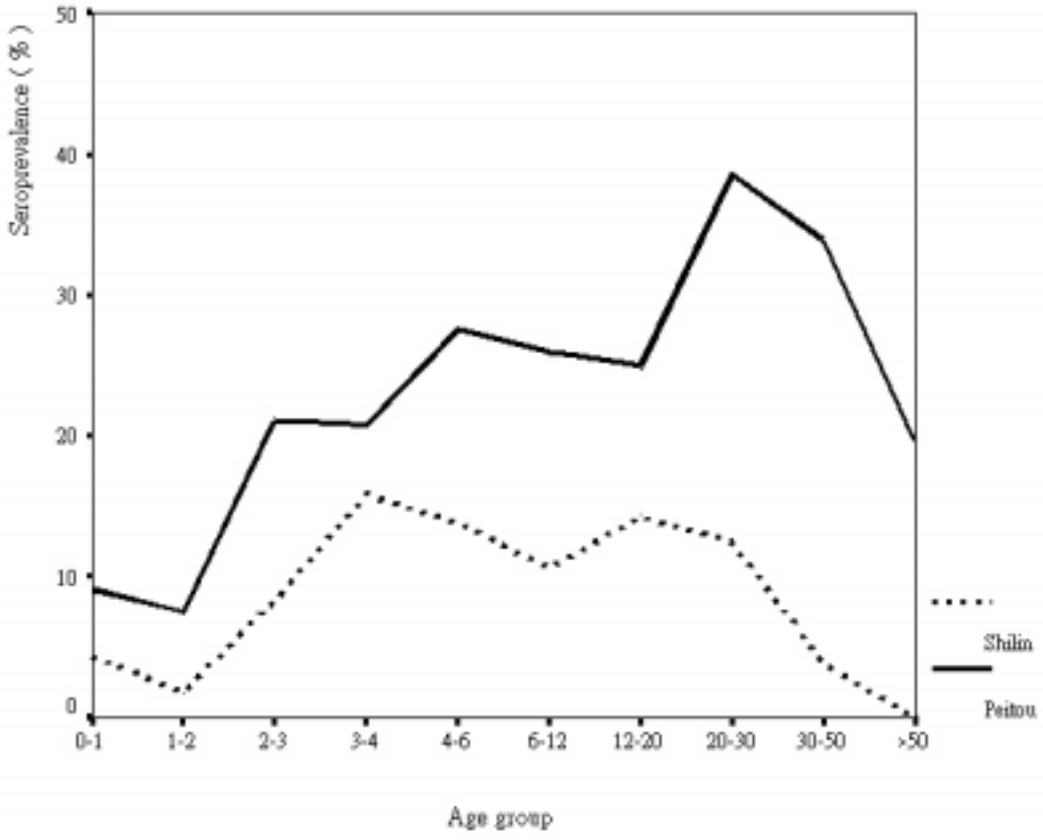
接著進行 seroepidemiology 的檢驗，總共測試了 1019 份血清檢體，這些檢體分別來自士林及北投地區，年齡及性別分佈如表二所示：

表二. 血清流行病學研究對象之年齡與性別統計資料

Demographic data	District		Statistics[a]
	Shilin(n=519)	Peitou(n=500)	
Age (years)			*p*= 0.785
Mean	15.6	15.9	
S.D.	18.5	19.5	
Median	5.8	5.3	
Sex			*p*= 0.100
Male	238	256	
Female	281	244	
Male/ Female	0.85	1.05	

[a] student's t test, χ^2 test were used

檢驗結果顯示，整體的陽性率在士林地區是 8.5%，在北投地區是 22.8%。小於一歲的兒童也有 4-10%的比率呈現陽性，不過此比率在 1-2 歲年齡層中便下降，可見其為母親的抗體。最早的感染發生在 2-3 歲，之後隨著年齡增加，陽性的比率也增加。約在 20 歲左右達到高原期(15-40%)。之後陽性率略有下降。


Seroprevalence (%)
50
40
30
20
10
0
0-1
1-2
2-3
3-4
4-6
6-12
12-20
20-30
30-50
>50
Age group
Shilin
Peitou

關於危險因子的分析，我們以問卷的方式進行，表三是有關職業方面的分析。表三. 不同職業之血清陽性率

Occupation	Prevalence (%)	Statistics[b]
Soldier	1 / 4 (25.0)	NS
Government employee	3 / 28 (10.7)	NS
Teacher	3 / 11 (27.3)	NS
Laborer	3 / 23 (13.0)	NS
Business man	10 / 45 (22.2)	NS
Medical personnel	3 / 20 (15.0)	NS
Others	4 / 15 (26.7)	NS
Student	57 / 286 (19.9)	$p = 0.027$
Non-employed		
Small children	48 / 430 (11.2)	$p = 0.001$
Housewife	15 / 71 (21.1)	NS
Others	3 / 18 (16.7)	NS
Total	150 / 951 (15.8)	

[a] only 951 subjects were analyzed due to occupation was not available in 68 subjects

[b] χ^2 test comparing a specific occupation with others; NS: not significant.

除了職業，我們也針對各種寵物飼養、旅行(國內及國外)進行分析，結果如表四。

表四. 危險因子之分析

Risk factor	Seropositive (n = 158)	Seronegative (n = 861)	Statistics[a]
Pet ownership			
Dog	43 (27.2)[b]	175 (20.3)	NS[c]
Cat	4 (2.5)	22 (2.6)	NS
Bird	5 (3.2)	19 (2.2)	NS
Rodent	2 (1.3)	6 (0.7)	NS
Fish	3 (1.9)	9 (1.0)	NS
Travel (oversea)			
Mainland	12 (7.6)	45 (5.2)	NS
Hong Kong	9 (5.7)	33 (3.8)	NS
South-eastern Asia	24 (15.2)	110 (12.8)	NS
America	14 (8.9)	64 (7.4)	NS
Europe	5 (3.2)	23 (2.7)	NS
Australia, New Zealand	10 (6.3)	25 (2.9)	NS
Travel (Taiwan) [d]			
Taipei county	27 (17.1)	94 (10.9)	0.038
Northern Taiwan	13 (8.2)	49 (5.7)	NS
Central Taiwan	4 (2.6)	65 (7.5)	NS
Southern Taiwan	5 (3.2)	24 (2.8)	NS

本計劃第二部份，收集小兒科無菌性腦膜炎之病患包括臺大醫院及忠孝、和平醫院的病患）進行分析。患者的腦脊髓液，以對鉤端螺旋菌具特異性的 16S 核醣核酸基因序列（16S RNA gene）為標的物，採用聚合脢鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)，進行鉤端螺旋菌核酸之檢測。同時使用酵素免疫吸收法，測其對鉤端螺旋菌的 IgM 抗體指數，作為診斷之參考。

目前已經完成 116 位病患的檢驗(結果如附件 2)，並持續收集中。現正進行結果的的進一步透過病歷調閱及直接之病史詢問，收集相關之臨床資訊。期望發現鉤端螺旋菌腦膜炎在無菌性腦膜炎中所佔的比例及其臨床特徵、危險因子，對日後此類患者能給予正確的診斷和即時之治療。在此 116 位病患中有 91 位進行了血清 IgM 的檢驗，其中 4 位是呈陽性。另一方面，116 位當中 114 位進行了 CSF 的 PCR 檢驗，有 3 位呈現陽性。這 3 位 PCR 呈陽性的病例中，有兩位的 IgM 也是陽性，另一位則是沒有血清可供檢驗。反之，4 位 IgM 陽性的病例中，有兩位的 CSF PCR 檢驗為陽性，另外兩位則為陰性。整體而言，有 5 位病患的 leptospirosis 呈陽性。這樣的結果顯示，台灣地區確實也有 leptospirosis 引起的腦膜炎，但是並不常見。在本研究當中，leptospirosis 引起的腦膜炎佔所有腦膜炎的 4.3%(5/116)。

Table 6. 兒童無菌性腦膜炎患者之檢驗結果

No. of CSF PCR Positive	No. of CSF PCR tested	No. of serum IgM positive	No. of serum IgM tested
3	114	4	91

討論與結論建議

由研究結果來說，鉤端螺旋菌感染在台北市居民並不罕見，士林區及北投區的血清陽性率，分別為 8.5%及 22.8%，北投區明顯高於士林區。在年齡分布上，兩區受檢者皆於 2-4 歲時便有許多人感染，說明社區居民於孩童早期便已接觸過感染原。在性別分布上，血清陽性者以女性居多。由女性及孩童之高感染率來說，感染源來自居家環境的可能性甚高（如家中鼠類及寵物）。在職業分布及旅遊史上，以 logistic regression analysis 分析，並無發現特殊之危險因子。飼養寵物狗之受檢者，其血清陽性率有較高之趨勢（卡方檢定，p = 0.06）。在此疾病的防護上，居家環境感染源的排除十分重要（如撲滅鼠類及寵物預防注射）。此部份之結果已經撰寫成 manuscript，已經投稿，現在審閱中。

由於此類病例數目並不多，所以檢體的收集並不容易，雖然已經收集一百多位病患的檢體，但並不十分完整，尤其缺乏 paired serum，無法以 antibody titer 的四倍上升作為診斷標準，只好以 IgM 作為診斷標準。也有部分病例只有 CSF 而沒有 serum，或只有 serum 而沒有 CSF。這些情形都使此研究略有缺憾，我們將會繼續這方面的實驗，也就是繼續收集此類病患的檢體，做同樣的檢驗，以提高此項研究的價值。

現有的結果說明，leptospirosis 引起的無菌性腦膜炎確實存在於台北地區，比率雖然並不高，只有 4.3%(5/116)，但是在無菌性腦膜炎這樣一個重要而且能會致命的傳染病中，這仍是一個不可忽視的病因。進一步分析此五例病例的臨床特徵、危險因子、以及病程變化，於是顯得非常重要而

有價值。我們將一方面繼續收集此類病例，以累積更多病例數，一方面分析陽性病例的上述特徵，以增進對此類疾病的進一步了解。

重要參考文獻

1. Farr RW. Leptospirosis. Clin Infect Dis 1995; 21: 1-8.
2. Ko AI, Reis MG, Dourado CMR, Johnson Jr WD, Riley LW, the Salvador Leptospirosis Study Group. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Lancet 1999; 354: 820-5.
3. Binder WD, Mermel LA. Leptospirosis in an urban setting: case report and review of an emerging infectious disease. J Emerg Med 1998; 16: 851-6.
4. Lin KC . Serological study of leptospirosis in military personnel on Taiwan. Chin Med J 1981; 28: 98-102.
5. 林朝雄，潘銘正：人鉤端螺旋體症血清流行病學調查暨血液透析病患抗心磷脂抗體血清流行病學調查。國立台灣大學獸醫研究所碩士論文：民國八十七年六月。
6. Yang CW, Pan MJ, Wu MS, Chen YM, Tsen YT, Lin CL, Wu CH, Huang CC. Leptospirosis: An ignored cause of acute renal failure in Taiwan. Am J Kid Dis 1997; 30:840-5.
7. 高敏雅，潘銘正：台灣地區豬與軍犬鉤端螺旋體症的血清流行病學調查。國立台灣大學獸醫研究所碩士論文：民國八十六年六月。
8. Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. J Gener Microbiol 1985;131: 377-85.
9. Winslow WE, Merry DJ, Pirc ML, Devine PL. Evaluation of a commericial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. J Clin Microbiol

1997;35: 1938-42.

10. Beeson PB, Hankey DD. Leptospiral meningitis. Arch Int Med 1952; 89:575-83.
11. Romero EC, Billerbeck AEC, Lando VS, Camargo ED, Souza CC, Yasuda PH. Detection of Leptospira DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. J Clin Microbiol 1998; 36:1453-5.
12. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Girons IS. Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples. J Clin Microbiol 1992; 30: 2219-24.
13. Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. J Infect Dis 1995; 172: 281-5.
14. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, Kemp HVD, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard COR, Terpstra WJ, Levett PN. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. J Med Microbiol 1995; 43: 110-4.
15. 陸夢賢，潘銘正：核醣體 16S RNA 基因增幅應用在鉤端螺旋體之類源關係、偵測和分型。國立台灣大學獸醫研究所碩士論文：民國八十五年六月。