

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-000111

衛生福利部疾病管制署106年署內科技研究計畫

計畫名稱：疫苗可預防之病原體監測-百日咳菌抗原變化

106年度/全程研究報告

執行機構：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：姚淑滿

研究人員：江春雪、王恩慈、張秀芳、蕭惠心、潘怡心、鄭螢瞳

執行期間：106年1月 1日至106年 12月31日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

封面	
目錄	(2)
壹、 中文摘要	(3)
貳、 英文摘要	(4)
參、 成果報告內容	
一、 前言	(5)
二、 材料與方法	(8)
三、 結果	(10)
四、 討論	(14)
五、 結論與建議	(19)
六、 計畫重要研究成果及具體建議	(20)
七、 參考文獻	(21)
八、 圖、表	(25)
九、 附錄	(無)

共 (33) 頁

壹、中文摘要

面對百日咳對國人健康的威脅，政府以提供公費疫苗來預防疾病發生，許多國家疫苗政策皆以非細胞性百日咳疫苗(ACVs)取代全細胞性百日咳疫苗(WCVs)，台灣也自2010年全面提供ACVs。病原面對疫苗篩選的壓力，國外研究調查已發現一些抗原基因表現的變化。本研究的Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)圖譜分析，發現百日咳菌一直進行著動態的變化，以適應疫苗與人體免疫的壓力。台灣Pertactin-deficient (Prn-)的菌株在2011年首次被發現，2011-2017年間出現機率為3.6%-22.2%平均6.5%，Prn-菌株在台灣尚未導致疾病的流行，但若是出現機率持續增加，是否會導致疾病流行值得關注。由疾病罹病率觀察，小於6個月的嬰幼兒其罹病率高，從國際研究結果得知目前的ACVs對於疾病預防有效但對於感染傳播預防無效，完成免疫的學齡前兒童可能受感染但症狀輕微不明顯而成為潛在的病原傳播者，需加強民眾對疾病與疫苗的認知，讓年紀太小無法得到疫苗免疫保護的嬰幼兒能獲得良好的照護。

關鍵字：百日咳、百日咳菌、血清型、表面蛋白質、疫苗、病原適應

貳、英文摘要

Abstract

Taiwan government started to provide free acellular vaccines (ACVs) to prevent pertussis in 2010, when the whole-cell vaccines (WCVs) have been replaced by ACVs in many countries. Studies from other countries reported observation of variations in the expression of antigen genes due to selective pressure from vaccination. Analysis of the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles in our study indicated that *Bordetella pertussis* strains continued to change dynamically in order to adapt to pressure from vaccination and human immunity. In Taiwan, pertactin-deficient (Prn-) strains first appeared in 2011, representing 3.6%-22.2% strains isolated in 2011-2017, with an average of 6.5%. Although the occurrence of Prn- strains has not yet resulted in epidemics in Taiwan, it should be closely monitored if the incidence keeps increasing. The morbidity rate stays high in children younger than 6 months old. Published studies indicated that ACVs can prevent diseases but not transmission, therefore, pre-school children who have completely vaccinated might be infected with *B. pertussis* showing mild symptoms and become reservoirs. In conclusion, public awareness of pertussis and its vaccines should be emphasized, in order to protect children who are too young to complete the vaccination courses.

Keyword : pertussis, *Bordetella pertussis*, serotype, surface antigen, vaccine, pathogen adaptation

叁、成果報告內容

一 前言

在1940-1950年代百日咳疫苗使用後，百日咳的發生率極劇下降，然而自1980-1990年代百日咳再度流行，台灣自1954年開始施行百日咳疫苗接種後，一直維持低發生率，直到1992年爆發流行，通報數量突增80倍(1)。這幾十年間，每2-5年就會有一波疫情，各國皆有此現象，即使百日咳接種涵蓋率很高，在世界各地仍陸續傳出疫情(2-5)，百日咳仍然是威脅嬰幼兒健康的重要疾病，百日咳的監測控制依舊非常重要。

百日咳再度流行的原因包括：1.對百日咳的知識增加、有新的病例定義(6)，2.實驗室診斷方法改變、增加PCR檢驗提高檢出率，3.疫苗免疫效能減弱，免疫效能不能維持終生，大約只有5-8年的保護力，疫苗效能的減弱可以解釋為何發生族群波峯由學齡期轉到青少年和成年人，然後擴散傳染給尚未接受完整免疫的新生兒(1, 7)，4.最後需考慮的是，百日咳菌在疫苗選擇壓力下產生的基因型改變，可能進而導致抗原性改變，因此使得目前使用的疫苗其保護力降低。台灣在1997和2000年百日咳高發生率的研究調查中，皆能發現百日咳菌有重要的基因型別轉變，菌株特性除Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)型別的改變外，其表面抗原pertactin的基因型由 *prn1* 轉變到 *prn2*，且另一個表面抗原fimbriae其基因型也由 *fim3-1* 轉變到 *fim3-2* (8, 9)。

百日咳菌在面對疫苗篩選壓力下產生的適應，除表現在毒力因子 (pertussis toxin, pertactin, fimbriae) 的抗原變異之外，其毒力因子表現調控也扮演重要角色，荷蘭在Ptx啟動子(promoter of Ptx, *ptxP*) 的多形性調查研究中發現，18種 *ptxP* 基因型裡以 *ptxP3* 取得優勢，自2004年以後分離的菌株都帶 *ptxP3*，BpSR11為歐洲廣泛流行的PFGE型也帶 *ptxP3*，*ptxP3* 的菌株出現在疫苗施打之後，*ptxP3* 菌株會產生更多 pertussis toxin，宿主需要更多的中和抗

體才能抵抗，研究認為這是病原體適應疫苗篩選壓力產生的基因改變(10, 11)。除了荷蘭之外，在澳洲、加拿大、瑞典也因*ptxP3*菌株造成百日咳再流行(12-14)。

百日咳菌在面對疫苗篩選壓力下產生的適應，除抗原基因型(*ptxA*、*prn*、*fim3*)及調控基因型(*ptxP*)改變外，最近在日本、法國、芬蘭和美國皆發現Prn-菌株，日本於1997年首度發現Prn-菌株，自1990-2009年收集的121個菌株，有27%菌株不表現pertactin，日本自1981年開始使用非細胞性百日咳疫苗(ACVs)預防百日咳，Prn-菌株自2000年代初期開始增加 (15)；法國於1998年開始使用ACVs，到2002年ACVs已全部取代全細胞性疫苗，在ACVs使用7年後，Prn-菌株開始出現，2007年Prn-菌株佔7.8%，到了2011年Prn-菌株佔13.3% (16)；芬蘭於2005年全面以ACVs取代全細胞性百日咳疫苗，於2011年發現了2株不表現pertactin (17)；美國在2011-2012年間也發現了11株不表現pertactin (18)。全細胞性百日咳疫苗(WCVs)是以熱殺死細菌製成的疫苗，對廣泛的細菌蛋白引發免疫反應，可以對相似於疫苗株的流行菌株產生免疫保護作用，而ACVs由1-4種純化去毒性的毒素和細菌黏附蛋白所組成，只對疫苗成分中的幾種細菌蛋白引發免疫反應，可以對細菌的幾種特定毒力因子產生免疫保護作用，ACVs引發的免疫作用改變，讓它也能適用於青少年和成年人的免疫接種。pertactin是某些ACVs的成分，扮演引發免疫保護的角色，一般認為Prn-菌株出現，是百日咳菌面對ACVs篩選壓力，而引發病原體適應的結果(19, 20)。ACVs於1996年在台灣取得上市許可，民眾可以自費選擇接種，到2010年由公費提供ACVs，百日咳菌的pertussis toxoid (PT)、filamentous hemagglutinin (FHA)、pertactin (PRN)和 fimbriae (agglutinogens 2+3)這4種抗原為ACVs的成份，依不同廠牌含有1-5種成份不等，台灣核可上市的ACVs有3種，為Sanofi Pasteur製造的Pediaceel(含4種抗原成份)和Pentaxim(含PT和FHA)及GSK製造的Infanrix-IPV+Hib(含PT、FHA

和PRN)。台灣百日咳菌株在面對疫苗篩選的壓力下，基因型與抗原表現是否出現變化，其變化是否會影響疫苗保護效果，這個問題值得持續關切。

二 材料與方法

1. 菌株收集及流行病學分析

收集由傳染病通報系統送到實驗室的臨床檢體，進行病原體分離與鑑定；急性組協助流行病學資料收集分析，呼吸道傳染病科協助個案的流行病學資料收集與分析，預防接種科協助進行接種資料分析。

2. 百日咳菌PFGE基因群分析

進行細菌培養，洋菜膠包埋，用Xba I 限制性酵素進行全基因體切割，基因片段經脈衝電泳分離形成電泳圖譜，利用Bionumerics分析軟體分析，詳細步驟見已發表的論文(8)。

3. 百日咳菌具多形性的重要抗原基因型(*ptxA*、*prn*、*fim3*)和百日咳菌*ptx* 啟動子(*ptxP*)基因型分析

依基因具多形性的特定片段，選取適當引子進行PCR放大特定片段，產物經定序取得核酸序列資料，進行序列比對分型(21-23)。

引子資料如下列所列：

ptxA 基因引子序列Sequence (5'-3')

S1F- TAGGCACCATCAAAACGCAG

S1R- TCAATTACCGGAGTTGGGCG

prn 基因引子序列Sequence (5'-3')，AF/AR放大*prn* region1，BF/BR放大*prn* region2

AF-GCCAATGTCACGGTCCAA

AR-GCAAGGTGATCGACAGGG

BF-AGCTGGGCGGTTCAAGGT

BR-CCGGATTCAGGCGCAACTC

*fim3*基因引子序列Sequence (5'-3')

fim3F- CCCCCGGACCTGATATTCTGATG

fim3R- GCTGAGCGTGCTGAAGGACAAGAT

ptx 啟動子基因引子序列Sequence (5'-3') ,

forward primer: AATCGTCCTGCTCAACCGCC

reverse primer: GGTATACGGTGGCGGGAGG

5.百日咳菌pertactin表現分析

運用西方墨點法分析抗原表現，選擇適當培養基進行細菌培養，利用超音波打破細胞進行蛋白質萃取定量，SDS-PAGE電泳後轉錄到適當的膜上，利用冷光免疫偵測系統，檢測百日咳菌pertactin的表現(15)。

6.百日咳菌fimbriae血清型

採用玻片凝集方法，使用WHO國際標準單株抗體anti-FIM2(NIBSC 06/124)和anti-FIM3(NIBSC 06/128)，將培養72小時之新鮮菌落，以生理食鹽水製成懸浮液和稀釋1/10的單株抗體混合均勻，3分鐘後觀察凝集反應(21)。

三結果

(一)疫苗與流行病學資料

1.ACVs在臺灣上市使用狀況：

GSK之嬰護寧三合一疫苗(DTaP)於1998年取得國內許可證；嬰護寧五合一疫苗(DTaP-IPV-Hib)於2002年取得國內許可證；嬰護寧六合一疫苗 (DTaP-IPV-Hib-HepB)於2004年取得許可證，上述三種非細胞型百日咳抗原都相同，為3-component (百日咳類毒素(PT)、絲狀血凝素(FHA)、與Pertactin (PRN/69 kiloDalton 外膜蛋白)；2. Sanofi 之巴斯德五合一疫苗於2006年取得國內許可證，其非細胞型百日咳抗原為4-component(百日咳類毒素(PT)、絲狀血凝素(FHA)、Pertactin (PRN/69 kiloDalton 外膜蛋白)與Fimbriae (agglutinogens 2+3))。國內自2010年3月起全面接種五合一疫苗，提供出生滿2、4、6及18個月之幼兒常規接種。2012年因應國內五合一疫苗短缺，陸續專案進口使用Sanofi 之Pentaxim五合一疫苗為2-component (百日咳類毒素(PT)和絲狀血凝素(FHA))。2014年1月因應全球五合一疫苗缺貨，暫時將五合一疫苗第四劑接種年齡調整為出生滿27個月接種，經不斷尋求貨源，國內五合一疫苗供貨漸趨穩定，為使幼兒及早獲得完整保護力，故自2017年5月1日起，再將五合一疫苗第4劑的接種年齡調整回出生滿18個月接種。2001-2017(1-6月)年DTP/DTaP疫苗接種率(表一)，2010年之後3劑接種完成率達95%以上，甚至高達97%接近98%，4劑接種完成率也有達93%以上。

2. 2013到2017年5月底不同廠牌的ACVs在臺灣使用量如表二：

因應2012年疫苗短缺陸續採用專案進口疫苗，使得Sanofi 之Pentaxim 為台灣主要使用的疫苗，其含有2個Pertussis保護抗原成份PT和FHA，2015年起佔有比例達65%以上。

3. 2011-2016年百日咳個案疫苗接種狀況：

0劑接種平均為41.3%，完成1劑接種平均為12.3%，完成2劑接種平均為1.8%，完成3劑接種平均為3.1%，完成4劑接種平均為11.4%，完成5劑接種平均為2.8%，已逾疫苗保護年齡(>13歲) 平均為27.3%，未完成基礎免疫與超過疫苗保護的個案平均為85.8%。

4. 2007-2017(1-9月)年臺灣百日咳流行趨勢：

2007-2017(1-9月)年共計611例百日咳病例，年平均確定病例為55.5例，每十萬人口發生率分別為0.19、0.18、0.39、0.26、0.33、0.23、0.33、0.30、0.07、0.12。2012-2017(1-9)年小於1歲每十萬人口發生率為10.96、16.32、20.07、20.84、6.09、9.09。

(二) 百日咳菌PFGE型和基因型變化

2005-2017(1-9月)年台灣百日咳菌株256株與歐洲常見6種型別(BpSR11, BpSR10, BpSR3, BpSR5, BpSR12, BpSR2)比較的PFGE圖譜(圖二)。，以相似程度95%分群，將256株分成35型，常見3型占71.5%，分別是9430(25.8%)，9403(12.9%)，9803(32.8%)。9430與BpSR11分群相近，9403與BpSR5相同，9803與BpSR10相近。在2010年前主要的流行型別為9430和9403，9803為2009年出現的PFGE新型，自2011年後成為台灣主要的流行型(圖三)。逐年陸續出現新的PFGE型，分別在2014年出現1個新型10327，2015年出現3個新型(10402、10404和10409)，2016年出現2個新型(10501和10503)，2017年出現1個新型10601，自2014年起出現7個新型，7個新型的菌株特性、宿主年齡和分離區域資料如表三，7個新型有3個基因型組合，其中一株為Prn-菌株，有3株是Fim -的菌株，宿主年齡有5個未滿1歲，另外2個分別為11.8和37.1歲，宿主居住區域在台北區、北區、中區和南區，幾乎是台灣全區分佈。雖然新型別一直被發現但新型皆未能持續出現造成流行，目前主要的PFGE流

行型別仍為9803，主要基因型為*ptxA1*、*prn2*、*ptxP3*和*fim3-1*維持不變。

(三) PFGE主要3個流行型別的流行病學特性

1. PFGE主要3個流行型區域分佈如圖四，3個主要型別區域分佈於台灣各區，廣泛分佈於台灣各區無特定區域聚集。

2. PFGE主要3個流行型年齡分佈如圖五，9803為自2011年起的為主要的流行型，其年齡分佈與百日咳傳染病通報個案的年齡分佈相近，小於1歲和大於19歲年齡群數量最多，比較於2010年前流行的PFGE型9403和9430，9803的年齡分佈小於1歲年齡群佔比例下降而大於19歲年齡群佔比例上升。

(四) 百日咳菌抗原表現

2005-2017(1-9月)年台灣百日咳菌株256株百日咳菌的抗原表現，結果如表四，目前共分離到7株Prn-的菌株，分別在2011年1株、2014年2株、2015年2株和2017年2株，2011-2017年Prn-的菌株間出現機率為3.6%-22.2%平均6.5%，大部份的菌株為Prn+的菌株。Fimbriae 血清型調查結果，在2013年以前大部分表現Serotype 3 fimbriae (Fim3+)占了97.0%，Serotype 2 fimbriae (Fim2+)只占3.0%，Fim-的菌株在2011年首次發現，但2015年Fim-的菌株突然增加占了21.1%，2016年Fim-占37.5%，2017年占11.1%，2017年表現Fim2+Fim3+占88.9%，分離的菌株雖然同時表現Fim2和Fim3，但其凝集力價小於2。Fim-菌株分屬4個PFGE型，無特定型別聚集。

(五) Prn+與Prn-兩族群菌株的分子特性、宿主年齡與居住區域分佈分析

Prn+與Prn-兩族群菌株的分子特性、宿主年齡與居住區域分佈如圖六，。Prn+族群宿主居住分佈於台灣各區域無特定區域聚集，Prn-族群宿主居住分佈於台灣北部地區；Prn+族群的年齡分佈於各年齡群，Prn-

族群年齡分佈於3歲以下的嬰幼兒。Prn+族群菌株分子型分屬於20個PFGE型，最主要的型別是9803占61.7%、其次是9435占7%，Prn-族群菌株分子型分屬於4個PFGE型，最主要的PFGE型是9846占42.9%、其次是9435占28.6%，其餘9803和10327皆有一例占14.3%。Prn+族群有115例出現13件群聚案件，發生率為11.3%，Prn-族群有7例出現1件群聚案件，發生率為14.3%，無顯著差異。

四 討論

2007-2017(1-9月)年臺灣百日咳流行趨勢分析，其中以2009、2011、2014及2015年病例數較多，依據疾病管制署監視資料顯示這四年有多起家庭群聚及校園群聚事件報告，可能因為百日咳初期症狀與感冒類似，在臨床上不易區別容易被忽略，往往通報時已有接觸者受到感染，因此病例數高於其他年度。分析歷年(2007-2017(1-9月)年)疾病管制署傳染病通報系統資料顯示，百日咳病例以未滿1歲嬰幼兒為多(45%)，其中又以出生未滿2個月嬰兒為主；其餘年齡層占比分別為1至3歲(7%)、4-6歲(3%)、7-12歲(9%)、13-18歲(14%)及19歲以上(22%)，未滿1歲嬰幼兒未完成基礎免疫 (45%)和13歲以上超過疫苗保護的年齡群(36%)，二者占有比率達81%，由圖五的PFGE主要3個流行型年齡分佈圖，2010年以前流行的型別(9430和9403)和2010年以後流行型9803的年齡分佈比較分析，發現2010年以後流行型9803的年齡分佈，小於1歲年齡群佔比例下降而大於19歲年齡群佔比例上升，除此之外發現4-6歲應在疫苗保護的年齡群有4例個案，分析這些個案發現有1例(25%)是經由防疫系統接觸者主動採檢細菌培養陽性的陽轉個案，而若是分析1-3歲年齡群則是3例有2例(66.6%)是接觸者採檢陽轉個案。有研究報告指出目前的ACVs對於疾病預防有效，但對於感染傳播預防無效(24)，主動採檢發現的個案接受疫苗保護，被傳染後症狀輕微常被忽略而未接受治療，但其仍具有疾病傳播能力，親密接觸者若有嬰幼兒，因小於1歲未完成免疫尚未得到疫苗完整保護，被傳染後其症狀往往嚴重需經醫療處理。大於19歲年齡群佔比例上升原因，除大家對疾病認知的增加外與ACVs疫苗對疾病預防有效但傳播預防無效的特性可能有關。另外小於1歲年齡群佔比例下降，推測原因可能與懷孕婦女自費接種ACVs疫苗，藉由胎盤將抗體給新生兒而獲得保護有關。

本研究由PFGE圖譜分析發現台灣地區逐年出現新的型別，百日咳菌進行著動態的變化，以適應宿主的免疫壓力。2005-2017(1-9月)年台灣百日咳菌株256株，以相似程度95%分群，將256株分成35型，常見3型占71.5%，分別是9430(25.8%)，9403(12.9%)，9803(32.8%)，在2010年前主要的流行型別為9430和9403，9803為2009年出現的PFGE新型，自2011年後成為台灣主要的流行型，逐年陸續出現新的PFGE型，分別在2014年出現1個新型10327，2015年出現3個新型(10402、10404和10409)，2016年出現2個新型(10501和10503)，2017年出現1個新型10601，自2014年起已出現7個新型。百日咳菌進行著動態的變化與歐洲9個國家在1998-2009的研究調查一樣 (25)，歐洲9個國家常見5個主要型別為BpSR3、BpSR5、BpSR10、BpSR11和BpSR12；BpSR11為歐洲最廣泛流行的型別，觀察10年間三期的流行演變，2004-2005年BpSR11由26%(1998-2001)上升到30%，接著開始減少到2007-2009年只剩下13%，相對的於BpSR11後來成為主要流行型的BpSR3，1998-2001年BpSR3還沒有出現，2004-2005年上升到8%，到了2007-2009年成為主要流行型別佔了22%；台灣地區百日咳菌型別也呈現動態變化，9430(近似BpSR11)和9403(與BpSR5相同)2種型別共同在2005-2010年間為台灣主要流行型，9803(近似BpSR10)在2009年出現後，快速擴散成為主要流行型別。由台灣與歐洲主要流行型別資料比較，發現有些PFGE型別例如BpSR5和BpSR11會快速擴散，在全球各地引起流行，有些型別則只會在地區流行，像歐洲、加拿大的主要流行型別BpSR12在台灣則沒有發現流行(13, 25)。7個PFGE新型分屬3個基因型組合，無特定的基因型聚集，宿主的區域分布於台灣各區，無特定區域聚集，年齡分布於小於1歲、7-12歲和19歲以上族群，由於數目少無法判定有無特定年齡族群分布。另外由以前的研究資料發現在流行期間PFGE型數目會增加(9)，新型數目增加有可能造成疾病流行的機會增

加，新型是否會造成流行還需要宿主因素配合，自2014年起出現的7個新型，皆短暫出現並未在隔年持續出現引起流行，但為了掌握新型取而代之流行的可能性，持續監測PFGE型別變化有其重要性。

Prn-菌株出現與疫苗的關係，台灣自1996年進口安全副作用比較小的ACVs，民眾可以自費施打，2010年公費全面提供。在2011年Prn-菌株首次被發現，2014年再度出現2例佔9.1%，2014年至今Prn-菌株平均佔有比例為10.5%，出現機率未如國外一些國家出現戲劇化的突然增加，可能原因與台灣疫苗使用有關，使用疫苗含有pertactin成分的比率在2013-2017(1-5月)年分別為60.7%、55.7%、32.2%、23.6%、6.3%，由使用的疫苗資料顯示，疫苗驅使Prn-菌株產生的壓力沒有逐年增加，未導致Prn-菌株大量出現而引發百日咳的流行。Prn-菌株在許多國家引起百日咳爆發流行(15-18, 26)，不表現pertactin的機制調查發現，大部分是因為*IS481*(insertion sequences 481)插入影響基因表現，少部分約17%在基因上沒有發現突變，不表現pertactin是發生在轉錄或轉譯的調控。目前在各國發現Prn-菌株其基因特性有差異，推想不是由同一個clone在全球擴散的結果(26)。台灣地區的Prn-菌株的PFGE型別分屬於4型，沒有特定聚集出現在某一型別，宿主年齡分佈於小於1歲(71%)和1-3歲(29%)2個年齡群，地區分佈於台北區和北區，由於數量少無法確定是否有特定年齡群或地區聚集的情況。與Prn+菌株比較在群聚出現機率上無顯著差異，說明Prn-菌株和Prn+菌株疾病傳播上沒有差別，國外比較Prn-菌株和Prn+菌株的臨床表現和分子特性報告中指出：未接受免疫的新生兒受Prn-菌株和Prn+菌株感染沒有差異，Prn-菌株和Prn+菌株的分子特性在PFGE分型上皆屬多樣性，pertactin不表現由多種原因導致(27)，另外有研究報告指出在完成免疫的族群裡，因Prn-菌株引起疾病比Prn+菌株要多(19)，由免疫小鼠的實驗中也發現Prn-菌株存活在免疫小鼠體內更久(28)，Prn-菌株可以更

適應於完成免疫的族群裡，且其在疾病傳播上與Prn+菌株沒有差異，Prn-菌株數量增多有可能引起疾病流行，監測Prn-菌株的出現的數量能夠提供流行的警訊。

Fim-菌株出現與疫苗的關係，在2014年以前台灣百日咳菌株大部分表現Serotype 3 fimbriae (Fim3)占了97.3，Fim-菌株原只在2011年出現過1株，但2015年Fim-菌株突然增加，占當年度的21.1%，隔年Fim-的菌株占有比例沒有下降占37.5%，今年Fim-的菌株占有比例下降占11.1%，對照疫苗使用的資料，fimbriae抗原表現受疫苗影響，2013年使用含有fimbriae成分的疫苗比率為7.9%，2014-2017(1-5月)年使用含有fimbriae成分的疫苗比率分別26.8%、32.2%、23.6%和6.3%，2014年使用含有fimbriae成分的疫苗比率比前一年增加3倍以上，導致2015年Fim-菌株數量增加，由疫苗使用的狀況推測Fim-菌株的出現受疫苗所驅使，此外2014年使用的疫苗占26.8%含有fimbriae和*Haemophilus influenzae* type b (Hib)的莢膜多醣體，2015年使用的疫苗含有有fimbriae和Hib莢膜多醣體的比率達32.2%，在國外已發表的研究報告中指出Hib莢膜多醣體是很好的免疫佐劑，可以產生更多的抗體，含Hib莢膜多醣體的疫苗對於Hib可以產生保護作用外，同時可以加強對百日咳的保護 (29)，由Fim-菌株出現的比率與2016年的百日咳發生率顯著下降，推論Hib莢膜多醣體是很好的免疫佐劑，但要證明含fimbriae和Hib莢膜多醣體的疫苗對百日咳有更好的保護效果則需要更多的資料支持。英國的資料顯示WCVs使用後讓Fim2/ Fim3或 Fim2的菌株減少(30)，在疫苗使用前期(1920-1956年) 分離株血清型分佈Fim2占58%和 Fim2/ Fim3占13%，在疫苗使用後初期(1963-1967年) Fim2減少到16%和 Fim2/ Fim3上升到38%，在1970年代中期因為疫苗安全性問題疫苗接種率下降，血清型又從Fim3轉回Fim2，接著使用含5種百日咳菌抗原成份的ACVs 後，Fim3血清型菌株繼續維持著優勢，但是有

些國家使用的ACVs不含Fim2/ Fim3，仍然可以觀察到菌株血清型由Fim3菌株取得優勢，與ACVs使用可能沒有直接相關；在這篇ACVs的 fimbriae 抗原角色研究中指出疫苗引發的免疫對於Fim2比Fim3有更強的保護作用(31)，推測因為抗原性的不同，在宿主免疫與疫苗免疫影響下，讓抗原性弱的Fim3菌株可以取得適應優勢。

由百日咳的發生率、抗原表現(pertactin、fimbriae)受疫苗使用影響與個案年齡分佈的資料顯示ACVs對疾病預防有作用，且分析1-7歲受疫苗保護族群的資料，發現本身症狀不明顯或無症狀，是經由接觸者主動採檢發現其鼻咽部帶有百日咳菌被記錄為陽轉個案，推測ACVs對疾病症狀的減輕有作用，受疫苗免疫保護的族群可免於疾病威脅但受感染後對病原仍具有傳播效果，完成ACVs免疫的幼兒和學齡前兒童可能受感染但症狀輕微不明顯而成為潛在的病原傳播者，ACVs的預防接種能讓完成免疫的孩童獲得保護免於疾病威脅，但年幼無法完成免疫的嬰幼兒依然是疾病高危險群，除期待有更好的疫苗上市外，對於症狀輕微的潛在感染者需加強監測，國際間面對百日咳的預防(32, 33)，皆將重點放於年紀太小無法接受疫苗保護的嬰幼兒，孕婦接種疫苗藉由胎盤將免疫抗體傳給新生兒，是目前有效保護新生兒面對百日咳威脅的方法(34)，此外還需考慮幼兒照護機構內的人員，接著再列入學童、青少年與成年人，在一篇個案報告研究中指出，一個5歲的小孩經完整疫苗免疫後，發生咳嗽症狀經實驗室診斷證實為罹患百日咳(34)。顯示完整疫苗免疫後的5歲兒童依然可能得到百日咳，建立醫護與民眾對疾病與疫苗的正確知識，一旦發現有咳嗽症狀無其他感染之可疑的人，提早通報百日咳採取檢體確認，讓年紀太小無法得到疫苗免疫保護的嬰幼兒能獲得良好的照護，免於疾病威脅。

五結論與建議

- 1.由PFGE圖譜分析發現百日咳菌株維持著動態變化，有些型別可造成全球快速擴散流行，有些型別則只在地區流行，持續監測本土菌株演變與國際比對有其重要性。
- 2.百日咳菌適應宿主免疫，已發展出不表現疫苗抗原的菌株，Prn-菌株在一些國家地區爆發百日咳流行，相同的情況在台灣還沒有出現，Prn-菌株和Fim-菌株在台灣會不會流行需要持續監測。
- 3.ACVs的預防接種能讓完成免疫的孩童獲得保護免於疾病威脅，但年幼無法完成免疫的嬰幼兒依然是疾病高危險群，除期待有更好的疫苗上市外，孕婦接種疫苗藉由胎盤將免疫抗體傳給新生兒，是目前有效保護新生兒面對百日咳威脅的方法，並對於症狀輕微的潛在感染者需加強監測，並增加醫護與大眾對疾病與疫苗的認知，讓年紀太小無法得到疫苗免疫保護的嬰幼兒能獲得良好的照護，免於疾病威脅。

六計畫重要研究成果與具體建議

- 1.獲取台灣本土菌株的基因圖譜與抗原型別概況，建立國際比對資料，有助於全球大流行的預測。
- 2.建立台灣本土菌株其疫苗成分抗原的抗原性變化資料，可作為疫苗選用參考。
- 3.疾病高危險群的釐定，ACVs的預防接種能讓完成免疫的孩童獲得保護免於疾病威脅，但年幼無法完成免疫的嬰幼兒依然是疾病高危險群，除期待有更好的疫苗上市外，孕婦接種疫苗藉由胎盤將免疫抗體傳給新生兒，是目前有效保護新生兒面對百日咳威脅的方法，並對於症狀輕微的潛在感染者需加強監測，增加醫護與大眾對疾病與疫苗的認知。

七 參考文獻

1. Lin YC, Yao SM, Yan JJ, Chen YY, Chiang CS, Wu HS, and Li SY. Epidemiological shift in the prevalence of pertussis in Taiwan: implications for pertussis vaccination. *Journal of medical microbiology*. 2007;56(Pt 4):533-7.
2. Guiso N, Wirsing von Konig CH, Forsyth K, Tan T, and Plotkin SA. The Global Pertussis Initiative: report from a round table meeting to discuss the epidemiology and detection of pertussis, Paris, France, 11-12 January 2010. *Vaccine*. 2011;29(6):1115-21.
3. Chiappini E, Stival A, Galli L, and de Martino M. Pertussis re-emergence in the post-vaccination era. *BMC infectious diseases*. 2013;13(151).
4. Winter K, Harriman K, Zipprich J, Schechter R, Talarico J, Watt J, and Chavez G. California pertussis epidemic, 2010. *The Journal of pediatrics*. 2012;161(6):1091-6.
5. Cherry JD. Epidemic pertussis in 2012--the resurgence of a vaccine-preventable disease. *The New England journal of medicine*. 2012;367(9):785-7.
6. Cherry JD, Tan T, Wirsing von Konig CH, Forsyth KD, Thisyakorn U, Greenberg D, Johnson D, Marchant C, and Plotkin S. Clinical definitions of pertussis: Summary of a Global Pertussis Initiative roundtable meeting, February 2011. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;54(12):1756-64.
7. Healy CM, Rench MA, Castagnini LA, and Baker CJ. Pertussis immunization in a high-risk postpartum population. *Vaccine*. 2009;27(41):5599-602.
8. Yao SM, Lin YC, Chou CY, Chen YY, Hsiao MJ, Chen HY, Yan JJ, Su HP, and Li SY. Antigenic divergence of Bordetella pertussis isolates in Taiwan. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(11):5457-61.
9. Lin YC, Yao SM, Yan JJ, Chen YY, Hsiao MJ, Chou CY, Su HP, Wu HS, and Li SY. Molecular epidemiology of Bordetella pertussis in Taiwan, 1993-2004: suggests one possible explanation for the outbreak of pertussis in 1997. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2006;8(8):2082-7.
10. Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, de Greeff SC, Diavatopoulos D, Teunis P, Nagelkerke N, et al. Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(8):1206-13.
11. King AJ, van der Lee S, Mohangoo A, van Gent M, van der Ark A, and van de Waterbeemd B. Genome-wide gene expression analysis of Bordetella pertussis isolates

- associated with a resurgence in pertussis: elucidation of factors involved in the increased fitness of epidemic strains. *PloS one*. 2013;8(6):e66150.
12. Advani A, Gustafsson L, Ahren C, Mooi FR, and Hallander HO. Appearance of Fim3 and ptxP3-Bordetella pertussis strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs. *Vaccine*. 2011;29(18):3438-42.
 13. Shuel M, Jamieson FB, Tang P, Brown S, Farrell D, Martin I, Stoltz J, and Tsang RS. Genetic analysis of Bordetella pertussis in Ontario, Canada reveals one predominant clone. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2013;17(6):e413-7.
 14. Octavia S, Sintchenko V, Gilbert GL, Lawrence A, Keil AD, Hogg G, and Lan R. Newly emerging clones of Bordetella pertussis carrying prn2 and ptxP3 alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008-2010. *The Journal of infectious diseases*. 2012;205(8):1220-4.
 15. Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, and Kamachi K. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient Bordetella pertussis in Japan. *PloS one*. 2012;7(2):e31985.
 16. Hegerle N, Paris AS, Brun D, Dore G, Njamkepo E, Guillot S, and Guiso N. Evolution of French Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis isolates: increase of Bordetellae not expressing pertactin. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(9):E340-6.
 17. Barkoff AM, Mertsola J, Guillot S, Guiso N, Berbers G, and He Q. Appearance of Bordetella pertussis strains not expressing the vaccine antigen pertactin in Finland. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2012;19(10):1703-4.
 18. Queenan AM, Cassiday PK, and Evangelista A. Pertactin-negative variants of Bordetella pertussis in the United States. *The New England journal of medicine*. 2013;368(6):583-4.
 19. Martin SW, Pawloski L, Williams M, Weening K, DeBolt C, Qin X, Reynolds L, Kenyon C, Giambrone G, Kudish K, et al. Pertactin-negative Bordetella pertussis strains: evidence for a possible selective advantage. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015;60(2):223-7.
 20. Safarchi A, Octavia S, Luu LD, Tay CY, Sintchenko V, Wood N, Marshall H, McIntyre P, and Lan R. Pertactin negative Bordetella pertussis demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model. *Vaccine*. 2015;33(46):6277-81.

21. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von Konig CH, Hoet B, and Guiso N. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2000;19(3):174-81.
22. Tsang RS, Lau AK, Sill ML, Halperin SA, Van Caesele P, Jamieson F, and Martin IE. Polymorphisms of the fimbria fim3 gene of *Bordetella pertussis* strains isolated in Canada. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(11):5364-7.
23. Lam C, Octavia S, Bahrame Z, Sintchenko V, Gilbert GL, and Lan R. Selection and emergence of pertussis toxin promoter ptxP3 allele in the evolution of *Bordetella pertussis*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2012;12(2):492-5.
24. Warfel JM, Zimmerman LI, and Merkel TJ. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(2):787-92.
25. Advani A, Hallander HO, Dalby T, Krogfelt KA, Guiso N, Njamkepo E, von Konig CH, Riffelmann M, Mooi FR, Sandven P, et al. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* isolates circulating in Europe from 1998 to 2009. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(2):422-8.
26. Lam C, Octavia S, Ricafort L, Sintchenko V, Gilbert GL, Wood N, McIntyre P, Marshall H, Guiso N, Keil AD, et al. Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerging infectious diseases*. 2014;20(4):626-33.
27. Vodzak J, Queenan AM, Souder E, Evangelista AT, and Long SS. Clinical Manifestations and Molecular Characterization of Pertactin-Deficient and Pertactin-Producing *Bordetella pertussis* in Children, Philadelphia 2007-2014. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2017;64(1):60-6.
28. Hegerle N, Dore G, and Guiso N. Pertactin deficient *Bordetella pertussis* present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. *Vaccine*. 2014;32(49):6597-600.
29. Crowley-Luke A, Reddin K, Gorringer A, Hudson MJ, and Robinson A. Formulation and characterisation of *Bordetella pertussis* fimbriae as novel carrier proteins for Hib conjugate vaccines. *Vaccine*. 2001;19(25-26):3399-407.
30. Gorringer AR, and Vaughan TE. *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for

- vaccines. *Expert review of vaccines*. 2014;13(10):1205-14.
31. Poolman JT, and Hallander HO. Acellular pertussis vaccines and the role of pertactin and fimbriae. *Expert review of vaccines*. 2007;6(1):47-56.
 32. Ridda I, Gao Z, and Macintyre CR. Attitudes, knowledge and perceptions towards whooping cough and pertussis vaccine in hospitalized adults. *Vaccine*. 2014;32(9):1107-12.
 33. Mooi FR, Zeddeman A, and Gent M. The pertussis problem: classical epidemiology and strain characterization should go hand in hand. *Jornal de pediatria*. 2015;91(4):315-7.
 34. Swamy GK, and Wheeler SM. Neonatal pertussis, cocooning and maternal immunization. *Expert review of vaccines*. 2014;13(9):1107-14.

八圖、表

表一、DTP/DTaP 接種率

	第三劑接種率	第四劑接種率
2001	94.66	-
2002	95.71	92.23
2003	95.31	92.22
2004	95.18	92.89
2005	95.17	91.87
2006	95.00	92.10
2007	95.34	92.36
2008	96.14	93.09
2009	96.04	94.37
2010	96.33	94.98
2011	96.68	95.94
2012	97.60	94.57
2013	97.34	96.16
2014	97.91	96.46
2015	97.78	93.01
2016	97.55	94.66
2017年6月	96.80	93.20

備註：

- 1.資料來源: 2001-2016 年傳染病統計監視年報。2017 年為全國性預防接種資訊管理系統 (NIIS) 截至 6 月底之統計資料。
2. GSK 之嬰護寧三合一疫苗(DTaP)於 1998 年取得國內許可證；嬰護寧五合一疫苗 (DTaP-IPV-Hib)於 2002 年取得國內許可證；嬰護寧六合一疫苗於 2004 年取得許可證
- 3.國內自 2010 年 3 月起全面接種五合一疫苗(DTaP-IPV-Hib)，取代原先使用之 DTP 及 OPV。
- 4.因應全球五合一疫苗缺貨，自 2014 年 1 月起暫時將五合一疫苗第四劑接種年齡調整為出生滿 27 個月接種。
- 5.經不斷尋求貨源，國內五合一疫苗供貨漸趨穩定，為使幼兒及早獲得完整保護力，故自 2017 年 5 月 1 日起，再將五合一疫苗第 4 劑的接種年齡調整回出生滿 18 個月接種

表二、2013-2017(5月底)DTaP 不同廠牌的使用狀況

廠牌	品名	Pertussis保護抗原成份	2013	2014	2015	2016	2017(5月底)
Sanofi	Pediacel	PT/FHA/Pertactin/Fimbriae	7.9%	17.6%	0.0%	23.6%	6.3%
Sanofi	Pentaxim	PT/FHA	39.3%	44.2%	67.8%	76.4%	93.7%
GSK	Infanrix-IPV+Hib	PT/FHA/Pertactin	52.8%	28.9%	0.0%	0.0%	0.0%
Sanofi	Pentacel/Quadracel+Hib	PT/FHA/Pertactin/Fimbriae	0.0%	9.2%	32.2%	0.0%	0.0%

表三：2014-2017 年出現 7 個 PFGE 新型的菌株特性、宿主年齡和居住區域

Newtype	<i>ptxA</i>	<i>prn</i>	<i>fim3</i>	<i>ptxP</i>	pertactin	Fimbriae2 serotype	Fimbriae3 serotype	年齡(y)	區域
10327	1	2	3-1	3	N	N	2+	0.1	北區
10402	1	2	3-1	3	P	N	1+	0.2	台北區
10404	1	2	3-1	3	P	N	3+	11.8	台北區
10409	1	1	3-4	1	P	4+	N	0.2	北區
10501	1	2	3-1	3	P	N	N	0.6	中區
10503	1	2	3-2	3	P	N	N	0.2	南區
10601	1	2	3-1	3	P	N	N	37.1	中區

表四：2005-2017(1-9)年 256 株百日咳菌其 pertactin 和 fimbriae 抗原表現

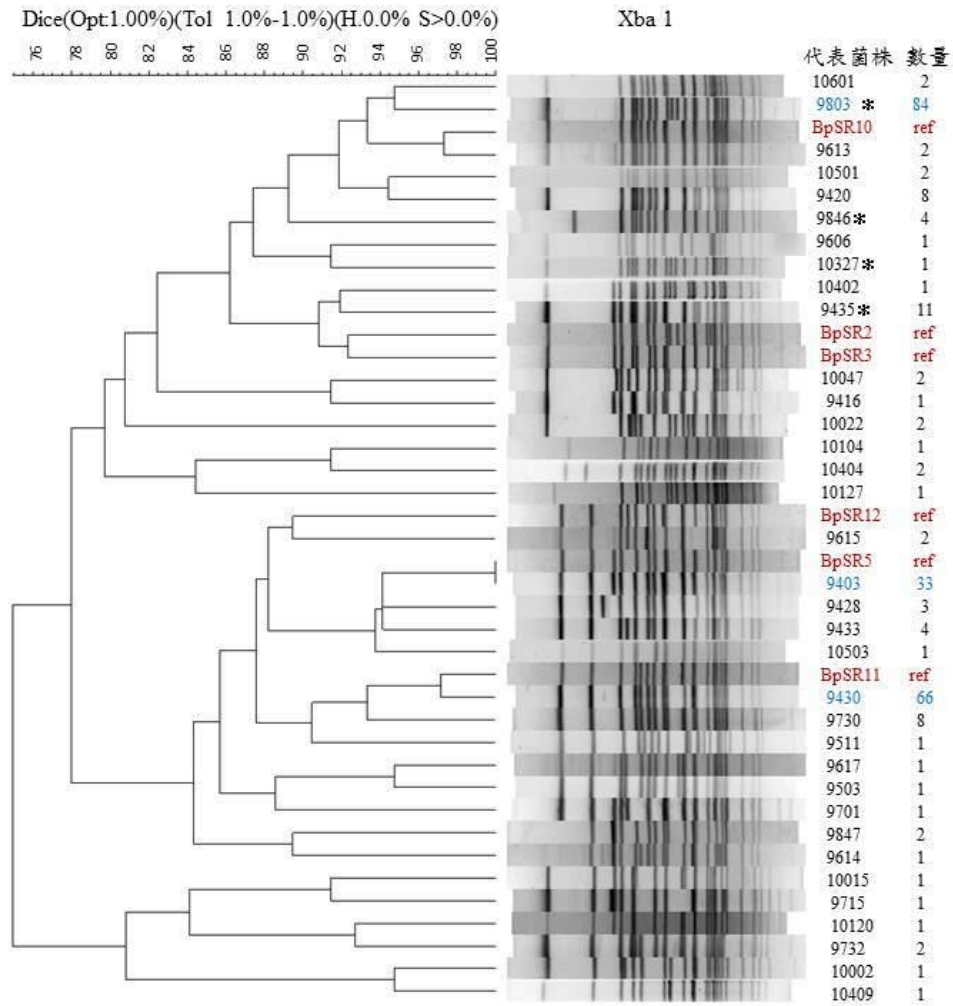
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017(1-9)
No.	23	15	28	21	30	13	28	24	16	22	19	8	9
Prn+	23	15	28	21	30	13	27	24	16	20	17	8	7
Prn-	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	0	2
Fim2 +	1	0	1	2	0	0	1	0	0	2	2	0	0
Fim3 +	22	15	27	19	30	13	26	24	16	20	12	6	0
Fim2+Fim3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	8
Fim-	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	3	1

註：

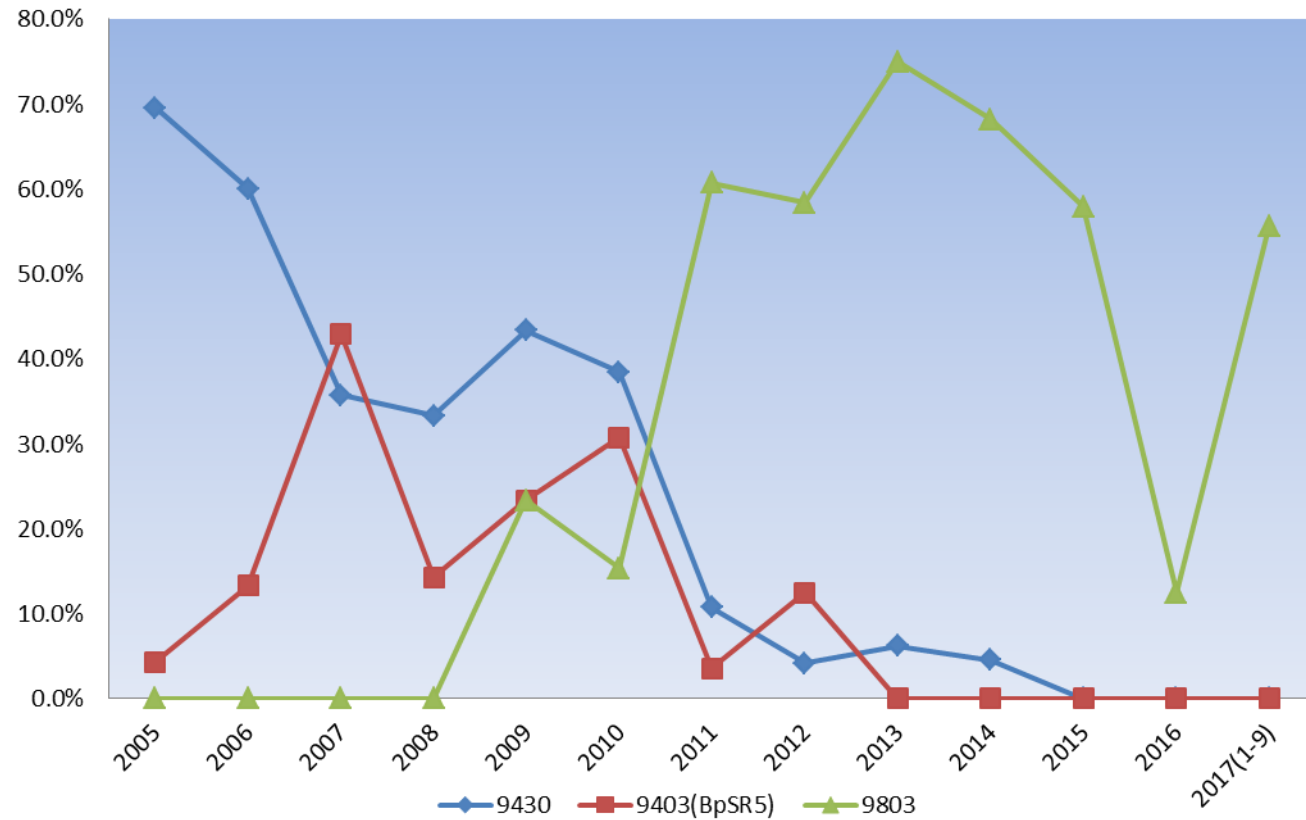
- 1.Tohama 疫苗株其 Fimbria2 凝集力價高於 4，Fimbria3 凝集力價微弱或不凝集。
2. 2017 年的菌株雖然表現 Fimbria2 和 Fimbria3，但其凝集力價低於 2。



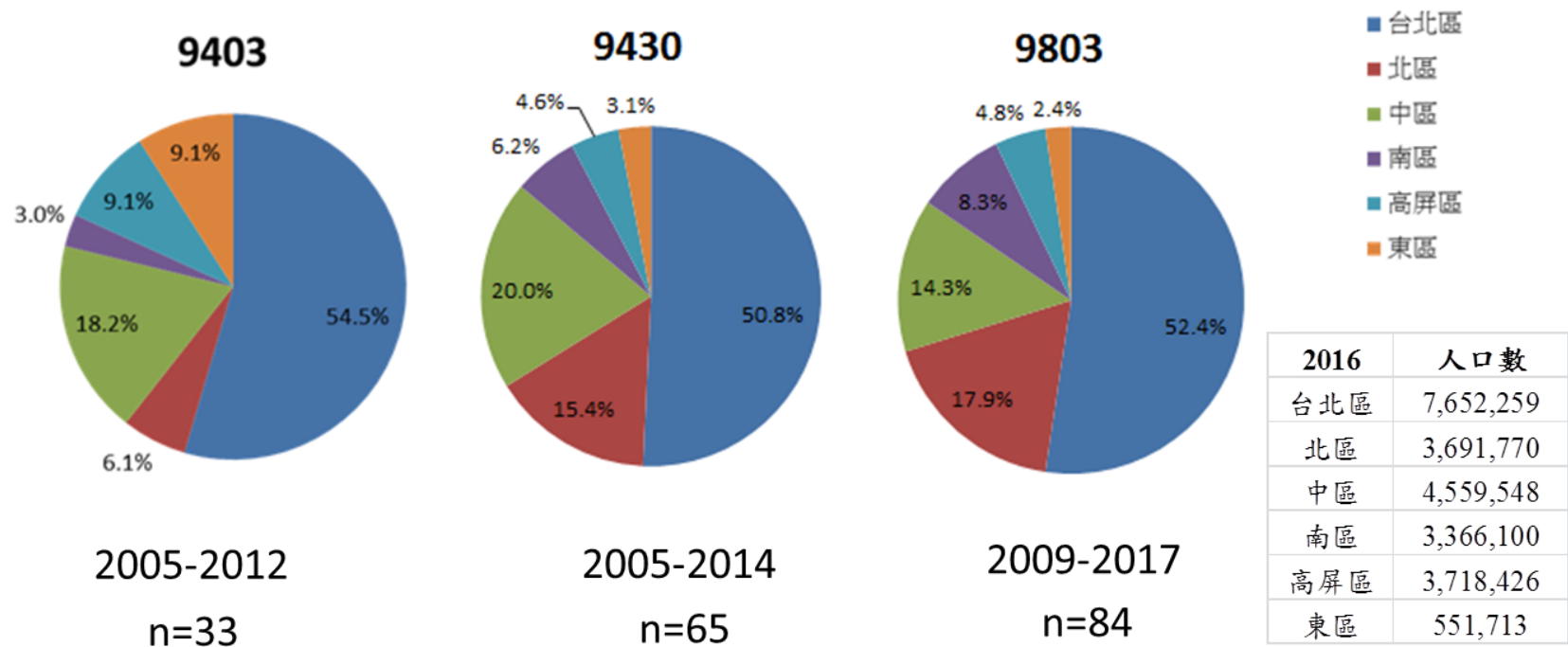
圖一、臺灣 2007-2017 年 9 月百日咳病例趨勢，2007-2017 年每十萬人口發生率分別為 0.19、0.18、0.39、0.26、0.33、0.23、0.33、0.30、0.07、0.12



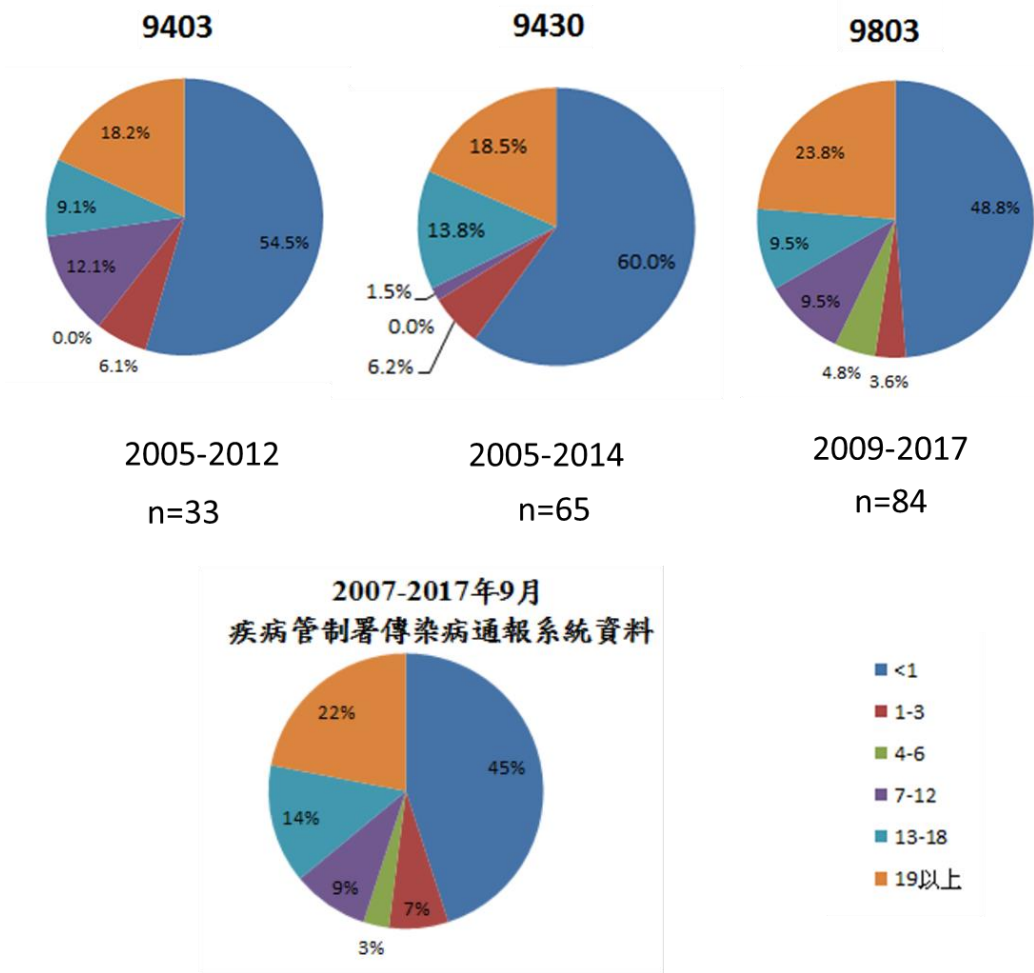
圖二、2005-2017(1-9)年台灣百日咳菌株 256 株與歐洲常見 6 種型別(BpSR11, BpSR10, BpSR3, BpSR5, BpSR12, BpSR2)比較的 PFGE 圖譜,256 株之 PFGE 型共有 35 型,常見 3 型占 71.5%,分別是 9430(25.8%),9403(12.9%),9803(32.8%)。9430 與 BpSR11 分群相近,9403 與 BpSR5 相同,9803 與 BpSR10 相近。



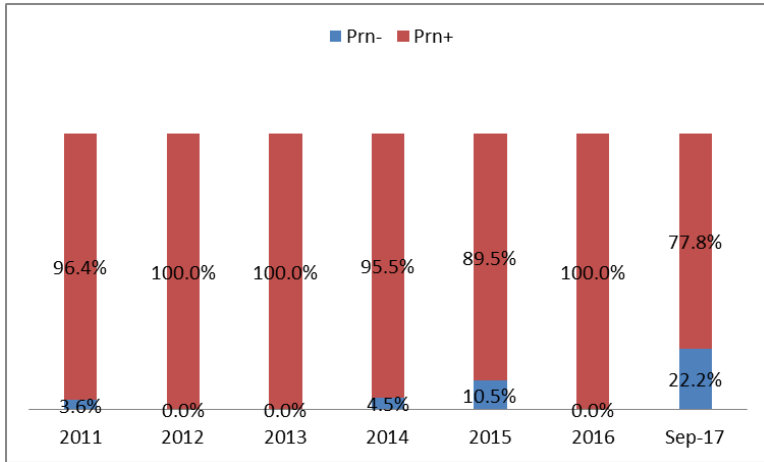
圖三、2005-2017(1-9)年台灣百日咳菌株256株，常見3型9430、9403、9803之流行變化，2010年前主要的流行型別為9430和9403，9803為2009年出現的PFGE新型，自2011年起至今為台灣地區主要的流行菌株。



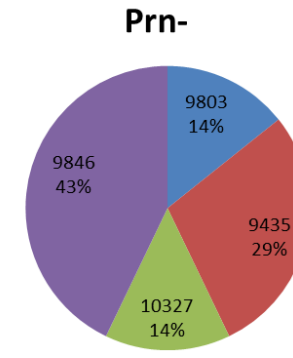
圖四、台灣流行的 3 個主要 PFGE 型(9430、9403 和 9803)的地區分佈，3 個主要 PFGE 型的地區分佈皆是廣泛分佈於台灣各地區。



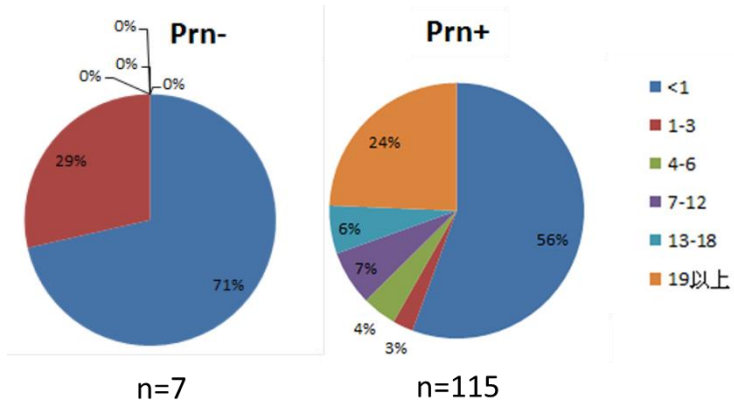
圖五、台灣流行的 3 個主要 PFGE 型(9430、9403 和 9803)和百日咳通報資料的年齡分佈圖，近年流行的 9803 型其年齡群分佈與 2007-2017 年 9 月年齡群佈相近。



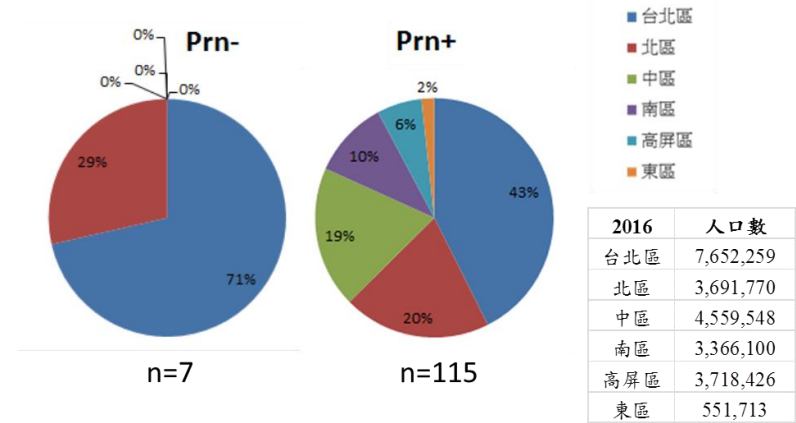
(a)



(b)



(c)



(d)

2016	人口數
台北區	7,652,259
北區	3,691,770
中區	4,559,548
南區	3,366,100
高屏區	3,718,426
東區	551,713

圖六、Prn- 菌株於2011年首次發現，圖(a)：Prn+和Prn-所占百分比，圖(b)：Prn-菌株出現於4個PFGE型分別為9846、9435、9803和10327。圖(c)：Prn+和Prn-宿主年齡分佈，圖(d)：Prn+和Prn-居住區域分佈