

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000103

衛生福利部疾病管制署 103 年委託科技研究計畫

計畫名稱：疫苗可預防之細菌病原體監測：抗原性變化與流行病學分析

103 年 度/全 程 研 究 報 告

執行機構：研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：姚淑滿

研究人員：江春雪、蘇韋如、王恩慈、羅秀雲、溫宜霖、王志銘、  
潘怡心

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 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

	頁 碼
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	( 6 )
三、 結果	( 8 )
四、 討論	( 13 )
五、 結論與建議	( 17 )
六、 計畫重要研究成果及具體建議	( 18 )
七、 參考文獻	( 19 )
八、 圖、表	( 22 )
九、 附錄	( 無 )
	共 ( 29 )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，疫苗成份的抗原基因型也隨著疫苗的使用驅使轉變，由疫苗株基因型(*ptxA2/prn1* 或 *ptxA4/prn1*)轉變成非疫苗株的基因型(*ptxA1/prn2* 或 *ptxA1/prn3*)，*ptxP* 由 *ptxP1* 轉變成 *ptxP3* 使病原可以產生更多的毒力因子以對抗疫苗產生的免疫作用。*pertactin* 不表現的菌株在許多國家導致疾病的流行，研究發現台灣 *pertactin*-deficient (PRN-)的菌株只零星出現，大部份的菌株仍然表現 *pertactin*；抗原的表現直接影響 ACVs 的保護效果，*pertactin*-deficient (PRN-)的菌株的發生率，可以做為疾病流行警訊的參考指標與疫苗選用條件的參考。由疾病罹病率的觀察，小於 6 個月的嬰幼兒其罹病率很高沒有下降，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

For pertussis prevention, Taiwan government began to provide free acellular vaccines (ACVs) in 2010, when whole-cell vaccines (WCVs) have been replaced by ACVs in many countries. Due to selective pressure from vaccination, variations in expression of antigen genes have been observed in other countries. In our study, *Bordetella pertussis* strains continued to change dynamically according to pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles in order to adapt to pressure from vaccination and human immunity. In response to selective pressure of ACVs, genotypes for vaccine-component antigens (*ptxA2/prn1* or *ptxA4/prn1*) have changed to genotypes for non-vaccine strains (*ptxA1/prn2* or *ptxA1/prn3*), as well as *ptxP1* has changed to *ptxP3* that produces more virulence factors to counteract immunity induced by vaccines. Since expression of antigens directly affects protection efficiency of ACVs, the emergence of pertactin-deficient (PRN-) strains has resulted in circulation of pertussis, thus, incidence of PRN- strains could be used as a warning index for disease occurrence and a reference for selecting vaccines. In Taiwan, most *B. pertussis* strains express pertactin and occurrence of PRN- strains was only sporadic. According to some studies, ACVs is effective in disease prevention, but not disease transmission. Therefore, immunized preschool children could be infected with mild symptoms to become potential carrier for transmission among young children. Therefore, it is necessary to enforce knowledge on disease and vaccine in order to provide good care for children who are too young to gain full protection of vaccination.

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

### 參、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 3-5 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(2-6)，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(7)，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, 8)，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*(9, 10)。

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* 基因型別裡以 *ptxP3* 取得優勢，自 2004 年以後分離的菌株都帶 *ptxP3*，歐洲廣泛流行的 PFGE 型別 BpSR11 也帶 *ptxP3*，*ptxP3* 的

菌株出現在疫苗施打之後，帶 *ptxP3* 的菌株會產生更多 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(11, 12)。除了荷蘭之外，在澳洲、加拿大、瑞典也因帶 *ptxP3* 的菌株造成百日咳再流行(13-15)。

最近在日本、法國、芬蘭和美國皆發現有不表現 pertactin 的百日咳菌株，日本於 1997 年首度發現不表現 pertactin 的百日咳菌株，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 ACVs 預防百日咳，不表現 pertactin 的百日咳菌株自 2000 年代初期開始增加(16)；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，不表現 pertactin 的菌株開始出現，2007 年不表現 pertactin 的菌株佔 7.8%，到了 2011 年不表現 pertactin 的菌株佔 13.3%(17)；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 (18)；美國在 2011-2012 年間也發現了 11 株不表現 pertactin (19)。pertactin 是某些 ACVs 的成分，扮演引發免疫保護的角色，一般認為不表現 pertactin 的菌株出現，是百日咳菌面對疫苗篩選壓力，而引發病原體適應的結果。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。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，防疫醫師

協助提供個案臨床資料與疫苗失效與否分析。

## 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(9)。

## 3.百日咳菌具多形性的重要抗原基因型(*ptxA*、*prn*、*fim3*)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(20, 21)。

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

## 4.百日咳菌 *ptx* 啟動子(*ptxP*)基因型分析

*ptx* 啟動子基因引子序列 Sequence (5'-3')，

forward primer: AATCGTCCTGCTCAACCGCC

reverse primer: GGTATACGGTGGCGGGAGG

進行 PCR 放大 *ptx* 啟動子基因，產物經定序取得核酸序列資料，與

GenBank 上的序列比對分型，*ptxP1-ptxP19* accession nos. 分別如下所列  
FN252323, FN252322, FN252324, FN252325, FN252326, FN252327,  
FN252328, FN252329, FN252330, FN252331, FN252332, FJ980276,  
FR854395, HM440343, HM440344, HM440341, HM440342 and  
JQ029160.(11, 13, 22)

#### 5.百日咳菌 pertactin 表現分析

運用西方墨點轉漬法分析抗原表現，選擇適當培養基進行細菌培養，利用界面活性劑打破細胞萃取蛋白質進行定量，蛋白質跑 SDS-PAGE 電泳後轉錄到硝化纖維膜上，利用冷光免疫偵測系統，檢測百日咳菌 pertactin 的表現(16)。

#### 6.百日咳菌 fimbriae 血清型分析

使用 WHO 國際標準單株抗體 anti-FIM2(NIBSC 06/124)和 anti-FIM3(NIBSC 06/128)，採用玻片凝集方法，將培養 72 小時之新鮮菌落的生理食鹽水懸浮液與稀釋 1/10 的單株抗體混合均勻，1 分鐘後觀察凝集反應(20)。

#### 7.統計分析方法

本文中利用卡方檢定(chi-square test)與費雪精確性檢定(Fisher's exact test)來分析時間趨勢並檢驗分布趨勢的差異顯著性，當 p 值小於 0.05 時表示被比較兩者具有顯著差異。

### 三結果

#### (一)疫苗與流行病學資料

##### 1.ACVs 在台灣使用狀況：

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 5-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。另因應國內五合一疫苗短缺，自 2012 年起陸續專案進口使用 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))。2001-2013 年疫苗接種狀況，3 劑接種完成率達 95% 以上，4 劑接種完成率也有達 91% 以上。(表一)

## 2. 百日咳流行現況：

1991-2013 年百日咳疾病發生率觀察，1992 年通報個案突然增加，於 1997-2000 年出現一個流行高峰，後來在 2009-2011 年又出現另一個流行高峰，觀察這 22 年百日咳疾病的發生率變化，每 3-5 年即有一個流行波峯。(圖一)

## 3. 2006-2014 年百日咳菌分離培養陽性通報個案年齡分布與疫苗接種狀況分析：

由全國性預防接種資訊管理系統(NIIS) 嬰幼兒預防接種查詢子系統獲取疫苗資料，通報個案 138 筆、接觸者 53 筆共 191 筆。通報個案百日咳菌分離培養陽性年齡分布最多在小於 2 個月的嬰幼兒，其次發生在 10-14 歲的青少年，小於 2 個月未達疫苗接種年齡為 33.3%，小於 6 個月疫苗接種未滿三劑者達 64.5%。(圖二)；百日咳菌分離培養陽性接觸者年齡分布最多在 10-14 歲的青少年，皆完成 3

劑的基礎免疫，其中 1 例接受小一前的追加接種仍受感染，受感染日期離最後接種疫苗時間間距為 2.4 年。以 2010 年公費提供 ACVs 施打為界，觀察已經施打 3 劑疫苗罹病的個案數，結果為小於 1 歲施打三劑疫苗仍罹病人數，在 2010 年以前 0 位，在 2010 年後 2 位；年齡群 1-5 歲的觀察發現，在 2010 年以前 10 位，在 2010 年後 6 位，但可以觀察的個數太少，無法統計分析是否有差異。

#### 4.2007-2014(11 月)百日咳確定病例年齡別分布：

2007-2014(11 月)百日咳確定病例年齡別分布。(圖三)小於 6 個月的嬰幼兒最多，其次是青少年和成年人。觀察各年齡群在 2010 年公費提供 ACVs 使用後的變化，小於 6 個月的嬰幼兒一直維持高的發生率；5-9 歲年齡群自 2013 至今無確定個案，唯可觀察個數太少無法判定該年齡群發生率有下降趨勢。

#### (二) 百日咳菌 PFGE 型變化

2005-2014 年臨床分離百日咳菌株 204 株與歐洲常見 5 種型別 (BpSR11, BpSR10, BpSR3, BpSR5, BpSR12) 比較的 PFGE 圖譜。(圖三) 204 株的 PFGE 型有 33 型，常見 4 型代表菌株為 9702、9403、9430 和 9803，這 4 型佔有比率 78.6%，分別佔有比率為 9702(10.3%)，9430(24%)，9403(17.6%)，9803(26.5%)。9702 和 9430 與 BpSR11 分群相近，9403 與 BpSR5 相同而 9803 與 BpSR2 相近。觀察常見 4 型 9702, 9430, 9403, 9803 的流行變化，2005 年 9702 為主要流行型別，接著 9430 和 9403 開始轉變為主要流行型別，在 2009 年前主要的流行型別為 9430 和 9403，9803 為 2009 年新出現的 PFGE 型，其成為 2009 年後台灣地區主要的流行菌株型。(圖四)

#### (三) 百日咳菌基因型 (*ptxP*，*prn*，*ptxA1*，*fim3*) 變化

收集 1992-2013 年 354 株百日咳菌，進行疫苗重要抗原基因(*ptxP*，*prn*，*ptxA1*，*fim3*)的分型，*ptxA* 本土菌株有 3 型(*ptxA1*、*ptxA2* 和 *ptxA5*)，自 1993 年起主要流行型別是 *ptxA1*，*ptxA5* 只出現在 1992 年，而 *ptxA2* 也只在 1999 年出現過。*prn* 本土菌株有 6 型(*prn1*、*prn2*、*prn3*、*prn4*、*prn6* 和 *prn7*)，在 1997 年以前主要流行型別是 *prn1*，1998 年起 *prn2* 開始成為優勢型別，自 2000 年之後 90% 以上的菌株皆為 *prn2*。*ptxP* 基因型變化趨勢如圖六，*ptxP* 本土菌株有 3 型(*ptxP1*、*ptxP3* 和 *ptxP4*)，已知帶有 *ptxP3* 菌株其 pertussis toxin 和 pertactin 表現會增加，*ptxP3* 自 1995 年出現，快速成為流行的基因型，到 1998 年 *ptxP3* 已有 44.4%，1999 年占有比例為 66.7% 成為優勢流行基因型，2000 年之後占有比例皆達 85% 以上。*fim3* 本土菌株有 3 型(*fim3-1*、*fim3-2* 和 *fim3-4*)，在 1998 年以前主要流行基因型是 *fim3-1*，1999 年開始 *fim3-1* 逐年減少(88.9%，66.7%，40%，28.6%，33.3%，8.3%，17.4%)到 2006 年為 0%，接著 *fim3-1* 反轉增加(7.1%，9.5%，20%，15.4%)，2011 年占有比例高達 82.1%，接著都維持 80% 以上的盛行率。

為分析百日咳基因型的變化與 ACVs 的關係，將 1996 年引進自費 ACVs 與 2010 年推行公費 ACVs 作為分割點，分析 1992-1996 年引進自費 ACVs 前、1997-2010 年引進自費 ACVs 後以及 2011-2013 年推行公費 ACVs 後，觀察三個時間區段的百日咳菌株基因型分布狀況。

*ptxA1* 基因型，在自費 ACVs 引進前，佔病原菌株比例為 91.66% (33/36)，自費 ACVs 引進後，上升為 99.60% (249/250) ( $P < 0.05$ )，卡方檢定結果顯示此上升有顯著意義，同時 *ptxA1* 基因型在公費 ACVs 推行後，佔病原菌株比例成為 100% (68/68)。

*prn1* 基因型及 *prn2* 基因型的分布情形，自引進自費 ACVs 後，便

有顯著改變，*prn1* 基因型佔病原菌株比例下降，而 *prn2* 基因型則是上升。*prn1* 基因型從原本佔病原菌株 58.33% (21/36)，下降為 8.00% (20/250) (P<0.01)；*prn2* 基因型則從原本佔病原菌株 33.33% (12/36)，上升為 85.20% (213/250)(P<0.01)。兩種基因型在公費 ACVs 推行後，分布趨勢呈現更明顯的差異，*prn1* 基因型佔病原菌株比例下降為 4.41%(3/68)，*prn2* 基因型佔病原菌株比例則上升為 95.58%(65/68) (p<0.05)。此外，*prn* 基因型的變化並未影響病原菌株的抗原型表現，以抗體分析 PRN+與 PRN-所占病原菌株比例，公費 ACVs 推行前後分別為 100% (156/156)及 98.91% (91/92)並沒有顯著差異 (P>0.05)。

*ptxP1* 基因型在引進自費 ACVs 前，佔百日咳病原菌株 86.11% (31/36)，而引進自費 ACVs 後，佔病原菌株比例下降為 17.20% (43/250) (P<0.01，卡方檢定結果此下降具有顯著差異)，而公費 ACVs 推行後，更顯著下降為 2.94% (2/68) (P<0.01)。相對的 *ptxP3* 基因型在引進自費 ACVs 前，佔病原菌株 5.56% (2/36)，引進自費 ACVs 後，佔病原菌株比例明顯上升為 82.80% (207/250) (P<0.01)，公費 ACVs 推行後，所佔比例再次上升為 97.05% (66/68) (P<0.05)。

*fim3-1* 與 *fim3-2* 基因型在自費 ACVs 引進前，佔病原菌株比例分別為 97.22% (35/36)與 2.78% (1/36)，自費 ACVs 引進後，*fim3-1* 基因型佔病原菌株比例顯著下降為 38.80% (97/250) (P<0.01)，而 *fim3-2* 基因型佔病原菌株比例則顯著上升為 60.80% (152/250) (P<0.01)。但是在公費 ACVs 推行後，*fim3-1* 基因型佔病原菌株比例卻逆趨勢上升為 85.29% (58/68) (P<0.01)，*fim3-2* 基因型則同樣逆趨勢下降為 13.24% (9/68) (P<0.01)。

根據上述統計結果推論，*ptxP1*、*ptxP3*、*ptxA1*、*prn1* 與 *prn2* 基

因型受到 ACVs 使用的影響而產生分布趨勢變化，另一方面暗示 *fim3-1* 與 *fim3-2* 基因型的變化與 ACVs 的使用沒有直接關係。

#### (四)百日咳菌抗原表現

收集 2003-2014 年的 241 株百日咳菌分析其抗原表現，結果如表二，發現 2 株 PRN-的菌株，分別於 2011 年和 2014 年分離出，表現 PRN 的菌株占 99.2%，PRN-的菌株只占 0.8%；Fimbriae 血清型分析，台灣百日咳菌株大部分表現 Serotype 3 fimbriae (Fim3) 占了 97.3%，Serotype 2 fimbriae (Fim2) 只占 3.7%，其中發現一株 Fim2 和 Fim3 皆不表現的百日咳菌，也發現一株 Fim2 和 Fim3 皆有表現的百日咳菌。

#### 四 討論

本研究由 PFGE 圖譜分析發現台灣地區百日咳菌進行著動態的變化，以適應宿主的主動與被動(疫苗)免疫壓力。歐洲 9 個國家在 1998-2009 這 10 年間，分三期(1998-2001、2004-2005 和 2007-2009)將收集的菌株進行 PFGE 圖譜變化比較，發現百日咳菌進行著動態的變化(23)，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 BpSR11 由 26%(1998-2001)上升到 30%，接著開始減少到 2007-2009 只剩下 13%，相對的於 BpSR11 後來成為主要流行型的 BpSR3，1998-2001 BpSR3 還沒有出現，2004-2005 上升到 8%，到了 2007-2009 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，9702(近似 BpSR11)為 2005 年主要流行型別，接著減少往後幾年只零星出現，9430(近似 BpSR11)和 9403(與 BpSR5 相同) 2 種型別共同在 2005-2009 年間為台灣主要流行型，9803(近似 BpSR2)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(14, 23)，而台灣近年流行的型別 9803 近似 BpSR2，BpSR2 在歐洲地區也不是主要流行型別。

全球百日咳菌的演化調查(24)，收集 19 個國家百日咳菌 343 株，分離年代從 1920-2010，全球百日咳菌株演化分析結果分為 2 個譜系，一譜系只占 1.7%，與標準菌 18323 帶相同基因型為 *ptxA5/ptxP4*，臨床菌株分離年代在 1954-2000；另一譜系分離年代 1920-2010，帶 3 種基因型分別為 *ptxA2/ptxP1*、*ptxA1/ptxP1* 和 *ptxA1/ptxP3*。依疫苗使用種類分 4 期(WCVs 早期指 1960 以前、WCV 1960-1995、WCV/ACV 1996-2000 和 ACV 指 2000 以後)觀察基因型變化，*ptxA* 最常見的三型為 *ptxA1*、*ptxA2* 和 *ptxA4*，*ptxA2* 和 *ptxA4* 為 WCVs 早期(1960 以前)主要的流行型，*ptxA1* 的出現大約在 1921-1932，早在 WCVs 使用之前，在 WCVs 早期(1960 以前)約占 5%，接著三期占有率為 68%(1960-1995)、92%(1996/2000)和 90%(2000 之後)，台灣在 1992-1996 年 *ptxA1* 占有率即達 91.66%，接著上升到 99.6%(1997-2010)和 100%(2011-2013)，顯示在 WCV 期間已受到疫苗篩選壓力作用；*prn* 全球最常見的三型為 *prn1*、*prn2* 和 *prn3*，*prn1* 為 WCVs 早期主要的流行型，在 WCV 期間 *prn2* 和 *prn3* 新興崛起，*prn3* 出現的頻率保持恆定占 10-17%，*prn2* 則持續增加由 18%(1960-1995)上升到 65%(2000 年之後)，台灣在 1992-1996 年 *prn2* 占 33%，接著持續上升到 1997-2010 年占 85%，至 2011-2013 年占有頻率更提高到 96%，*prn2* 突變出現時間發生在 WCV 期間，ACV 期間更發揮疫苗篩選壓力使 *prn2* 成為最主要的流行型別；*fim3* 有 5 個基因型，*fim3-1*(疫苗型)和 *fim3-2* 為全球主要的基因型，*fim3-1* 一直為主要的流行型，直到 *fim3-2* 在

WCV(1960-1995)被偵測到，當時占有率 1%，接著持續上升到 ACV(2000 年之後)占有率為 37%，台灣在 1992-1996 年 *fim3-1* 占有率為 97%，到 1997-2010 年 *fim3-1* 減少到 39% 而 *fim3-2* 增加到 61%，2011-2013 年 *fim3-1* 和 *fim3-2* 出現頻率又轉換，*fim3-1* 轉為增加到 85% 而 *fim3-2* 轉為減少到 13%，結果顯示 *fim3* 基因一樣受到宿主免疫壓力篩選而產生流行變化，但與 *ptxA* 和 *prn* 有差異，*fim3* 受到疫苗的被動免疫影響不大，流行的基因型沒有一直固定在非疫苗型，而會隨著宿主的主動免疫而產生變化，菌株適應環境產生流行菌株的改變，這項改變也造成台灣在 2009-2011 百日咳的罹病率增加。百日咳菌 *ptx* 啟動子(*ptxP*)有十幾種基因型，最主要的流行型別是 *ptxP1* 和 *ptxP3*，在 WCVs 早期 1960 以前和 WCV(1960-1995) *ptxP1* 為主要流行型別分別占 68% 和 83%，但後來 *ptxP3* 開始取代 *ptxP1*，在 WCV/ACV(1996-2000)和 ACV (2000 以後) *ptxP3* 為主要流行型別分別占 48% 和 57%，*ptxP3* 基因突變出現的時間約在 1974-1977 年間。帶 *ptxP3* 基因比較帶 *ptxP1* 基因的菌株可以產生更多的百日咳毒素(PT)(11)，使菌株更適應宿主的免疫，在 1996 年之後在全球引起百日咳流行如加拿大、瑞典、荷蘭、法國、澳洲、日本和韓國(11, 13-15, 22, 25, 26)，*ptxP3* 在台灣流行狀況，1995 首度被偵測到，在 1999 年占有比率已超過 *ptxP1* 達 66.7%，到了 2000 年以後 *ptxP3* 占有比率皆達 85% 以上，台灣在 1997 百日咳罹病率增加，顯然與 *ptxP3* 菌株全球擴散流行有關係。

Fim2 和 Fim3 血清型受疫苗影響的轉變，在英國的資料顯示 WCVs 使用後讓 Fim2/ Fim3 或 Fim2 的菌株減少(27)，在疫苗使用前期(1920-1956) 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) 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，顯然與 ACVs 使用沒有直接相關；在這篇 ACVs 的 fimbriae 抗原角色研究中指出疫苗引發的被動免疫對於 Fim2 比 Fim3 有更強的保護作用(28)，推測因為抗原性的不同，在宿主的主動與被動免疫影響下，讓抗原性弱的 Fim3 菌株可以取得適應優勢。台灣臨床分離菌株以 Fim3 菌株為優勢菌群占 97.3%。Fim2 和 Fim3 皆是 WCVs 和 ACVs 疫苗重要的保護免疫抗原因子，未來考慮新疫苗的成份需小心謹慎。

pertactin-deficient (PRN-) 菌株的出現，在許多國家引起百日咳爆發流行(16-19, 29)，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。目前在各國發現不表現 pertactin 的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(29)。不表現 pertactin 的菌株可以逃避宿主因 ACVs 引發的免疫對抗，但缺乏 pertactin 的菌株會影響致病性嗎？在體外的研究試驗發現，缺乏 pertactin 的菌株其生長速度比表現 pertactin 的菌株快(16)，不表現 pertactin 的菌株因為具有生長優勢，缺乏 pertactin 不會影響其在宿主間的傳播，另外在引發宿主的疾病嚴重程度及住院天數的比較，發現不表現 pertactin 和會表現 pertactin 的菌株也沒有差異(30)。台灣流行菌株 PRN+ 的菌株占 99.2%，PRN- 的菌株只占 0.8%，不表現 pertactin 菌株只零星出現，pertactin 是 ACVs 的抗原成分之一，未來是否會有 PRN- 的菌株持續增加需密切關注。



百日咳菌株為適應生存，在疫苗壓力篩選下，流行菌株所帶的疫苗抗原基因多轉為非疫苗型，但由疾病罹病率的觀察(圖三)，大於6個月、小於10歲的幼兒小孩其罹病率低於其他年齡群，顯示ACVs對疾病有一定的保護程度，可是對於疾病的預防仍面臨的嚴峻的挑戰，小於6個月的嬰幼兒其罹病率一直很高，由一些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(31)，完成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，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。

## 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. 本研究結果顯示重要抗原基因型 *ptxA* 和 *prn* 受到疫苗篩選壓力，由疫苗型(*ptxA2* or *ptxA4*、*prn1* or *prn7*)變成非疫苗型(*ptxA1*、*prn2* or *prn3*)；*ptxP* 基因明顯受到 ACVs 壓力篩選，在 ACVs 的使用下，帶 *ptxP3* 的菌株可以產生更多的百日咳毒素中和免疫抗體，可以適應宿主免疫即快速擴散流行；*fim3* 沒有因為疫苗篩選壓力而一直維持著非疫苗型(*fim3-2*)，而是在宿主的主動免疫關係下，*fim3-1*(疫苗型)和 *fim3-2* 進行交互演替，菌株適應環境產生流行菌株的改變，這項改變也造成台灣在 2009-2011 百日咳的罹病率增加。

3. 帶 *ptxP3* 基因比較帶 *ptxP1* 基因的菌株可以產生更多的百日咳毒素 (PT)，使菌株更適應宿主的免疫，在 1996 年之後在全球多國引起百日咳流行，台灣 *ptxP3* 在 1995 首度被偵測到，在 1999 年占有比率已超過 *ptxP1* 達 66.7%，到了 2000 年以後 *ptxP3* 占有比率皆達 85% 以上，解釋台灣在 1997 百日咳罹病率增加，顯然與 *ptxP3* 菌株全球擴散流行有關係。
4. 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-的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，目前 PRN-的菌株在台灣只是零星出現，有 99.2% 的臨床分離株會表現 PRN，但是 PRN-的菌株會不會繼續增加值得關注；fimbriae 也是 ACVs 的免疫抗原成份，常見是 Fim2/ Fim3 一起純化提供使用，但日本使用的 Tohama 疫苗株則只會表現 Fim2，台灣菌株流行現況有 97.3% 表現 Fim3。流行菌株抗原表現情形可以提供疾病流行的預測與疫苗選用參考。
5. 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，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. 計畫之新發現或新發明

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。

### 2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

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，對於症狀輕微的潛在感染者需加強監測。

### 3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

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，例如許多國家其不表現 pertactin 的菌株比率增加，疫苗選用上即可以選擇不含 pertactin 成份的 ACV，而台灣狀況大部份菌株依然會表現 pertactin，含有 pertactin 成份的 ACV 可能是比較好的選擇。

## 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. de Melker HE, Schellekens JF, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rumke HC, and Conyn-van Spaendonck MA. Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. *Emerging infectious diseases*. 2000;6(4):348-57.
5. 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.

6. Cherry JD. Epidemic pertussis in 2012--the resurgence of a vaccine-preventable disease. *The New England journal of medicine*. 2012;367(9):785-7.
7. 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.
8. Healy CM, Rench MA, Castagnini LA, and Baker CJ. Pertussis immunization in a high-risk postpartum population. *Vaccine*. 2009;27(41):5599-602.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.

19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassiday PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, et al. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *mBio*. 2014;5(2):e01074.
25. Kim SH, Lee J, Sung HY, Yu JY, Kim SH, Park MS, and Jung SO. Recent trends of antigenic variation in *Bordetella pertussis* isolates in

- Korea Journal of Korean medical science. 2014;29(3):328-33.
26. Miyaji Y, Otsuka N, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, and Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. *PloS one*. 2013;8(10):e77165.
  27. Gorringe AR, and Vaughan TE. *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. *Expert review of vaccines*. 2014;13(10):1205-14.
  28. Poolman JT, and Hallander HO. Acellular pertussis vaccines and the role of pertactin and fimbriae. *Expert review of vaccines*. 2007;6(1):47-56.
  29. 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.
  30. Bodilis H, and Guiso N. Virulence of pertactin-negative *Bordetella pertussis* isolates from infants, France. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(3):471-4.
  31. 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.

## 八圖、表

表一：DTP 接種率

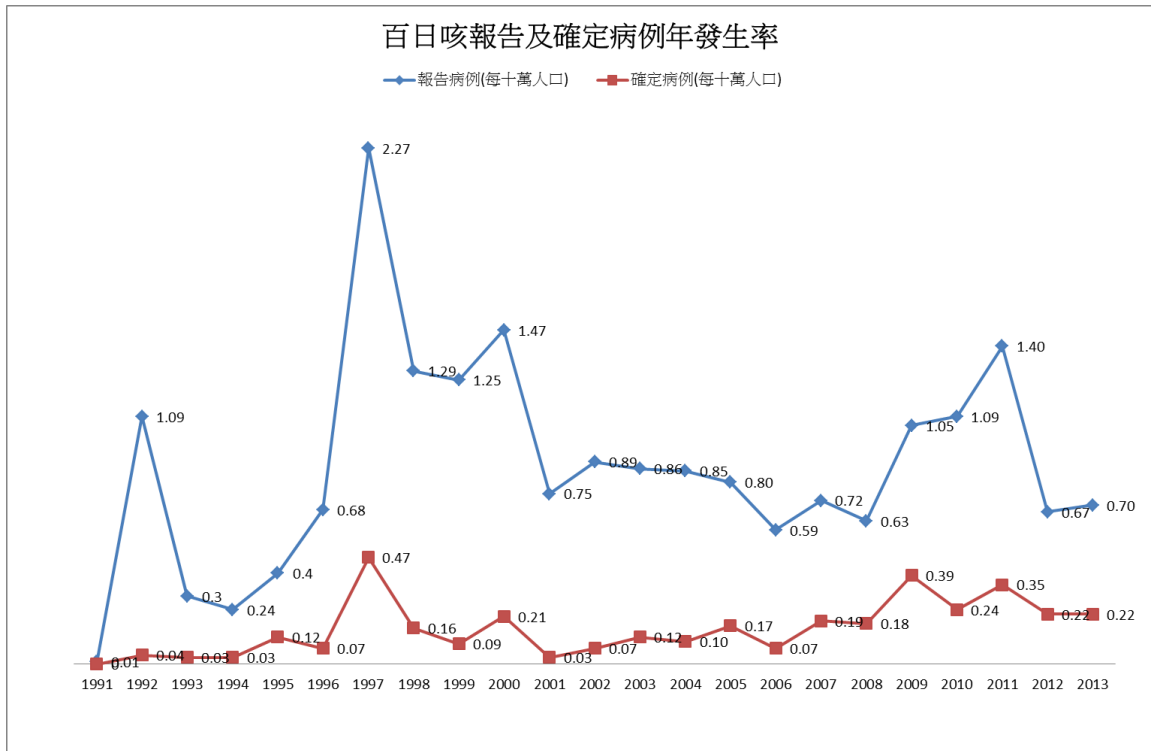
	第三劑接種率	第四劑接種率
2001	94.66	-
2002	95.71	92.23
2003	95.31	92.22
2004	95.18	92.89
2005	95.17	91.87
2006	95.00	92.10
2007	95.34	92.36
2008	96.14	93.09
2009	96.04	94.37
2010	96.33	94.98
2011	96.68	95.94
2012	97.60	94.57
2013	97.34	96.16
2014	-	-

備註:資料來源: 2001-2013 年傳染病統計監視年報。2014 年因部分統計世代尚未達接種年齡，故尚未有統計資料。

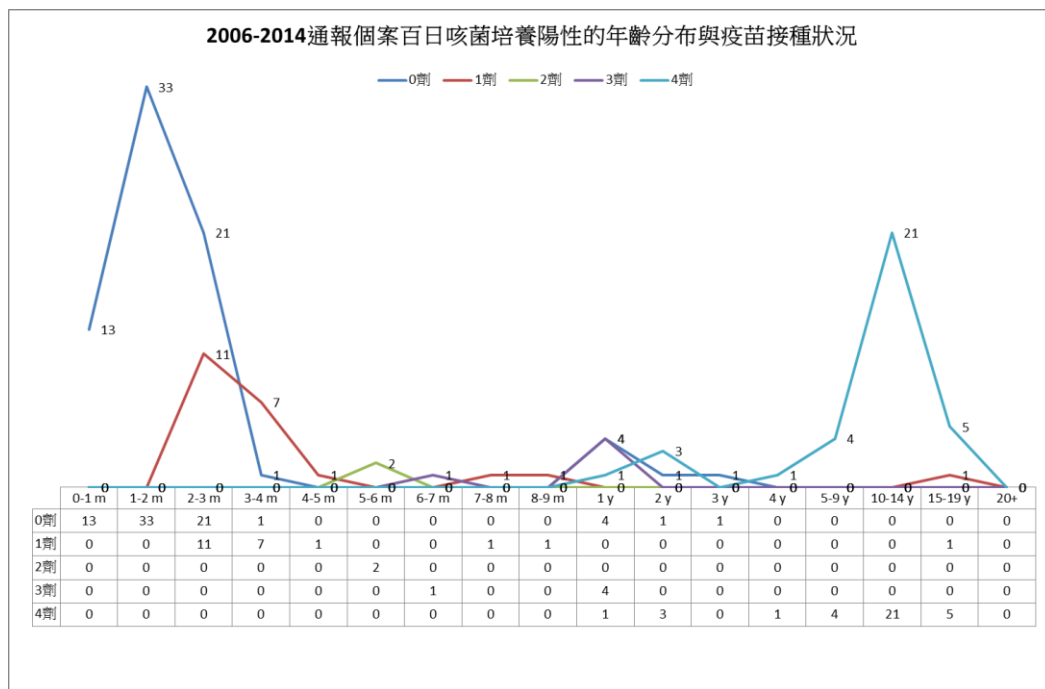
表二：2003-2014 年 241 株百日咳菌其 pertactin 和 fimbriae 抗原表現

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
no	15	11	23	15	28	21	30	13	28	24	16	17
PRN+	15	11	23	15	28	21	30	13	27	24	16	16
PRN-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Fim2 +	1	0	1	0	1	2	0	0	1	0	0	1
Fim3 +	14	10	22	15	27	19	30	13	26	24	16	16
Fim2+Fim3+	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fim2- Fim3-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0





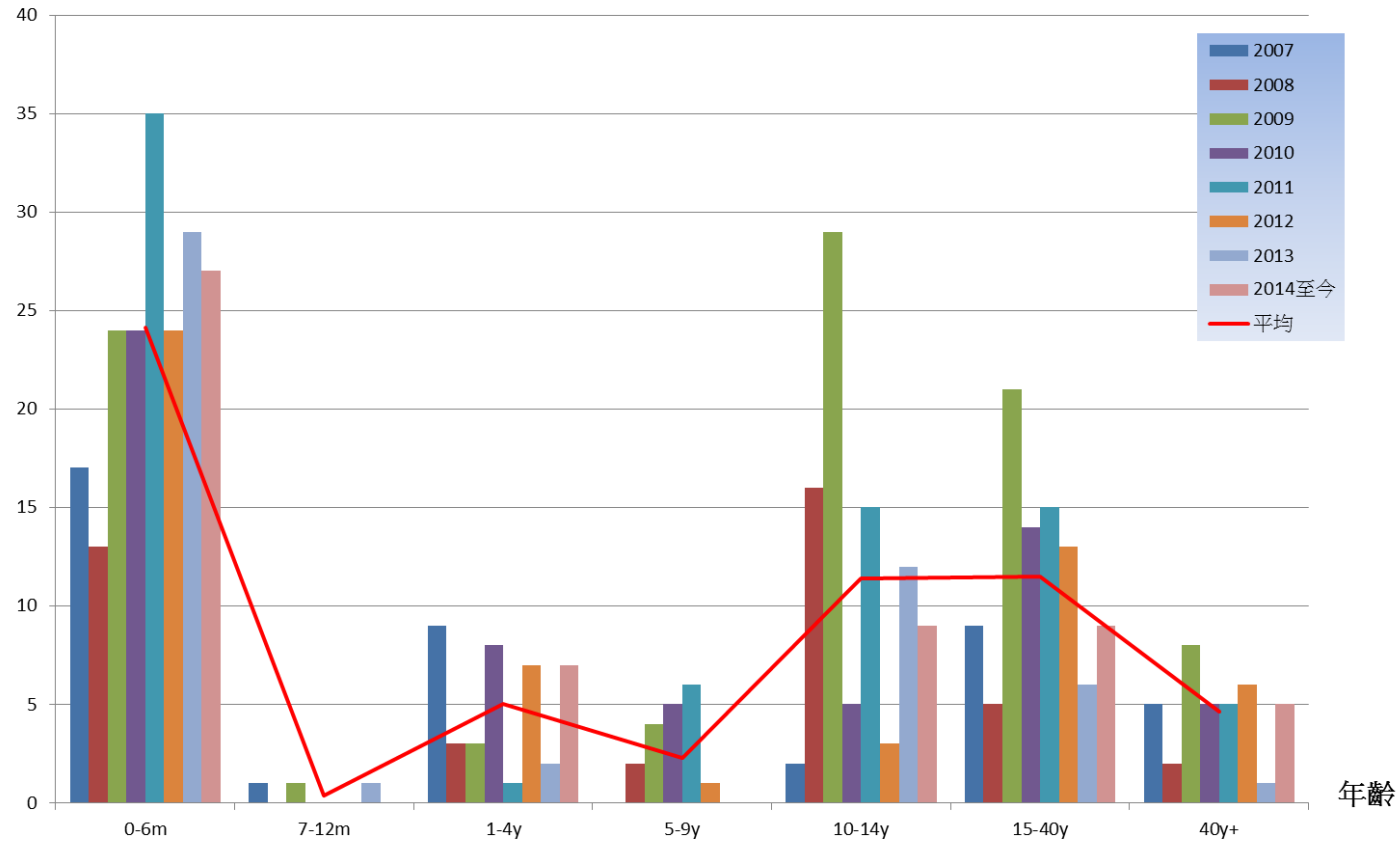
圖一、1991-2013 年百日咳發生率變化趨勢圖



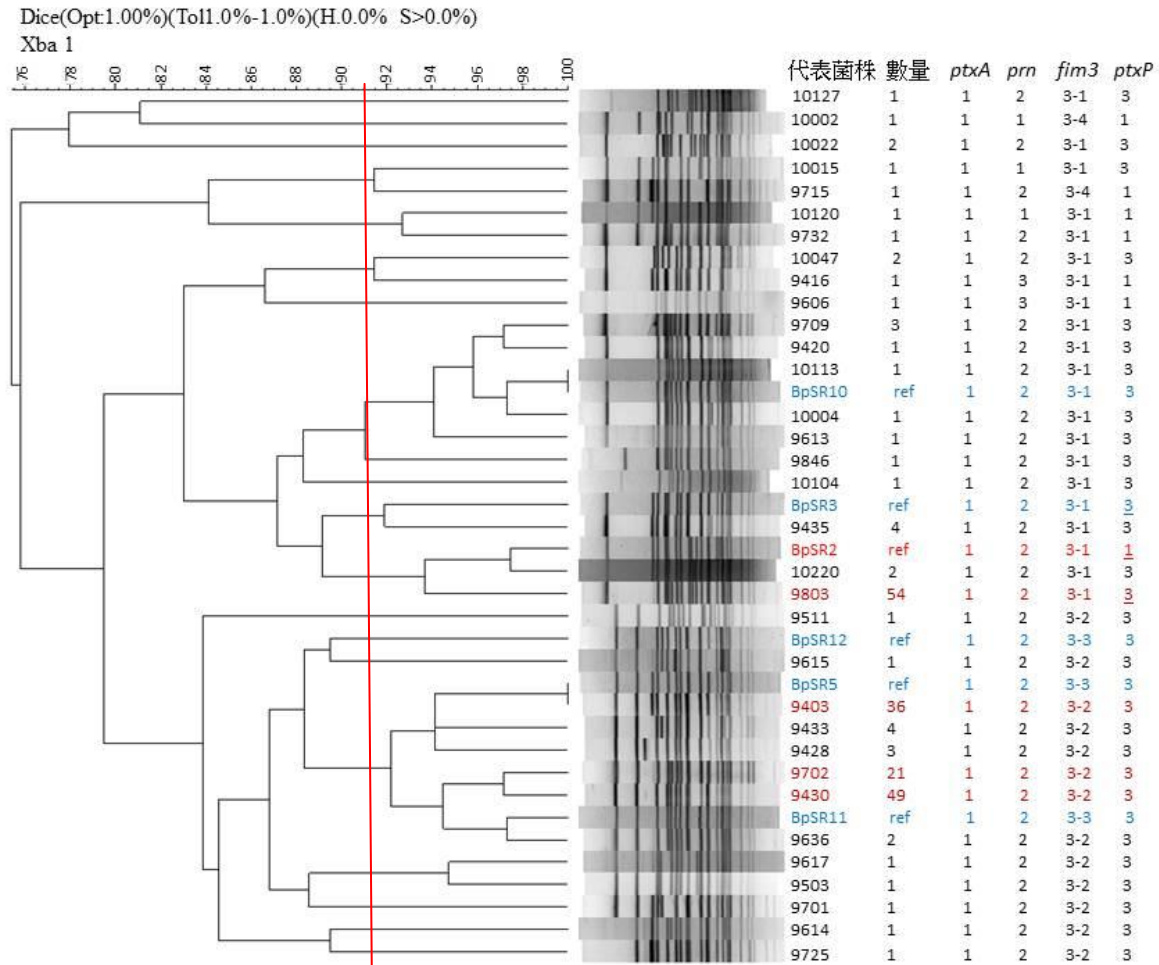
圖二、2006-2014 年通報個案百日咳菌分離培養陽性的年齡分布與疫苗接種狀況，年齡分布最多在小於 2 個月的嬰幼兒，其次發生在 10-14 歲的青少年，小於 6 個月疫苗接種未滿三劑者達 64.5%。

病例數

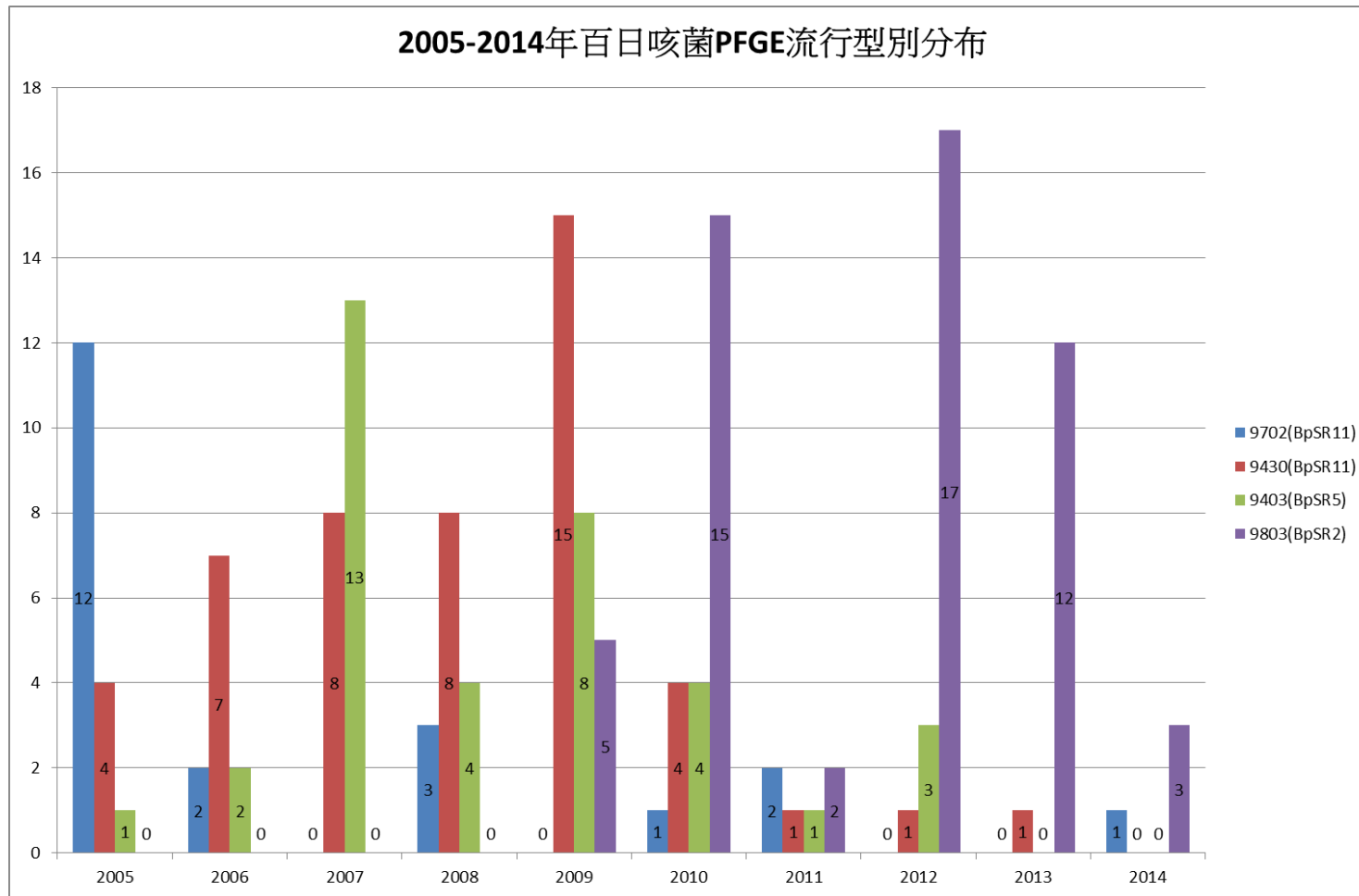
### 台灣地區百日咳確定病例年齡別分布



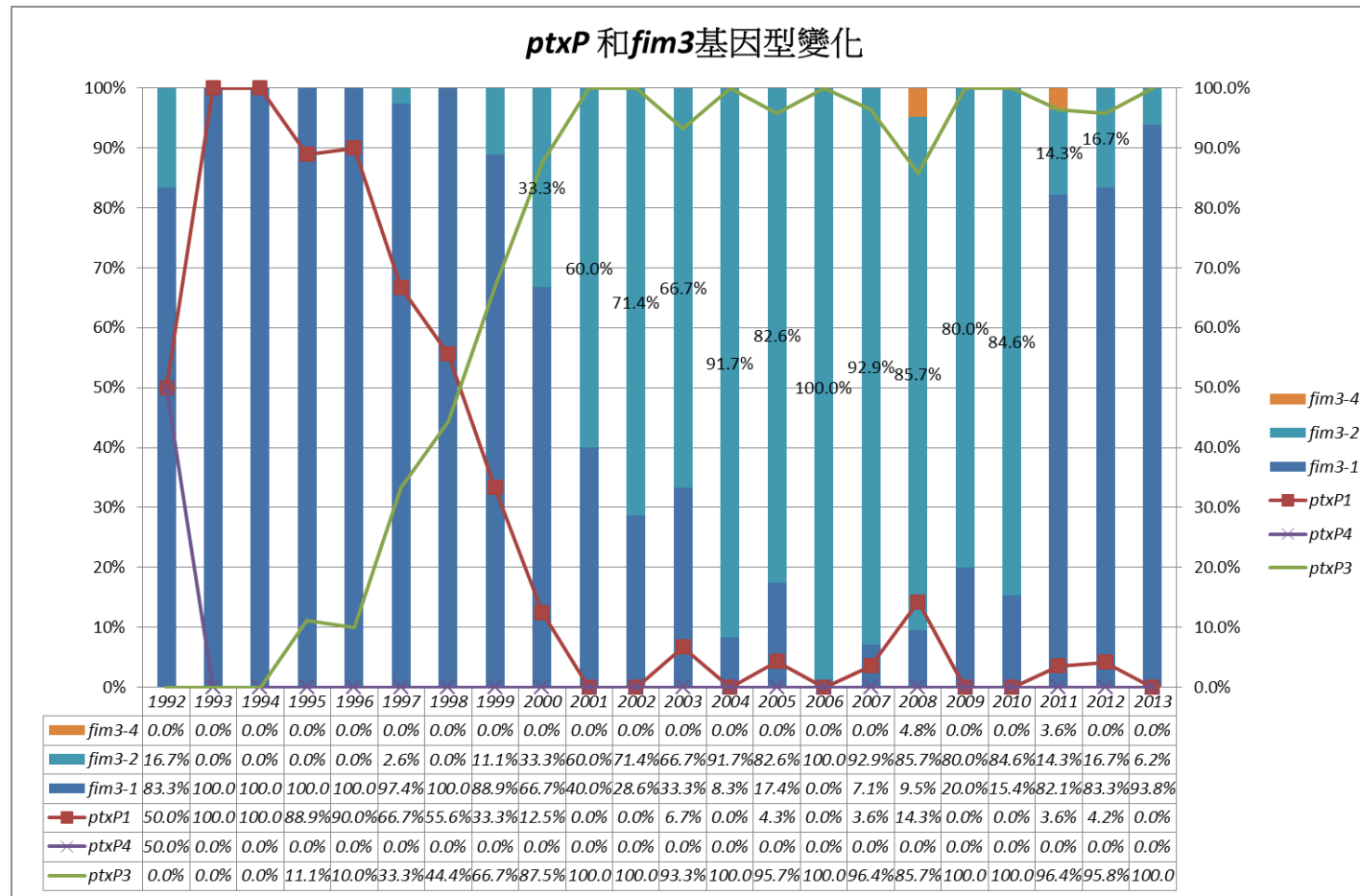
圖三、2007-2014(11月)年百日咳確定病例年齡別分布，小於6個月的嬰幼兒最多，其次是青少年和成年人。觀察各年齡群在2010年公費提供ACVs使用後的變化，小於6個月的嬰幼兒一直維持高的發生率；5-9歲年齡群自2013至今無確定個案，唯可觀察個數太少無法判定該年齡群發生率有下降趨勢。



圖四、2005-2014 年台灣百日咳菌株 204 株與歐洲常見 5 種型別(BpSR11, BpSR10, BpSR3, BpSR5, BpSR12)比較的 PFGE 圖譜，204 株之 PFGE 型有 33 型，常見有 4 型為 9702(10.3%)， 9430(24%)，9403(17.6%)，9803(26.5%)。9702 和 9430 與 BpSR11 分群相近，9403 與 BpSR5 相同，9803 與 BpSR2 相近。



圖五、2005-2014年台灣百日咳菌株 204 株，常見 4 型 9702, 9430, 9403, 9803 之流行變化，2009 年前主要的流行型別為 9430 和 9403，2009 年 9803 為新出現的 PFGE 型，成為 2009 年後台灣地區主要的流行菌株。



圖六、1992-2013 年 354 株百日咳菌其 *ptxP* 和 *fim3* 基因型變化趨勢圖。