

封面樣式

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000106

衛生福利部疾病管制署104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

104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、王志銘、潘怡心  
、陳睿翔

執行期間：104年1月 1日至104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	( 11 )
五、 結論與建議	( 16 )
六、 計畫重要研究成果及具體建議	( 17 )
七、 參考文獻	( 18 )
八、 圖、表	( 23 )
九、 附錄	( 無 )
	共 ( 30 ) 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，*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-deficient (PRN-)菌株在許多國家導致疾病的流行，研究發現台灣PRN-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，PRN-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Taiwan government began to provide free acellular vaccines (ACVs) in 2010, when whole-cell vaccines (WCVs) have been replaced by ACVs in many countries.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, *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(2-6)，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(11, 12)。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(13-15)。

最近在日本、法國、芬蘭、美國和澳洲皆發現 PRN- 菌株因 ACVs 使用後增加，日本於 1997 年首度發現 PRN- 菌株，自 1990-2009 年收集的 121 個菌株，PRN- 菌株占 27%，日本自 1981 年開始使用 ACVs 預防百日咳，PRN- 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，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%(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 PRN- 菌株(18)；美國在 2011-2012 年間也發現了 11 株 PRN- 菌株 (19)；澳洲 2008 年 PRN- 菌株出現占 5%，逐年快速上升到 2012 年 PRN- 菌株占 78%(20)。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。2014 年的研究調查中發現 PRN- 菌株已出現，是否會在台灣引發流行值得關注。

## 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(21, 22)。

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, 23)

#### 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(16)。

#### 6. pertactin不同基因型間的抗原反應

採用玻片凝集方法，使用標準菌株ATCC9340萃取純化的pertactin免疫小鼠獲取血清，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50倍、100倍和200倍的小鼠血清混合均勻，1分鐘後觀察凝集反應。

#### 7.百日咳菌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，1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))。2001-2014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：

觀察2007-2015(1-11)年百日咳發生率，台灣每2-3年即有一個流行波峯，年發生率為每十萬人口0.19-0.39，平均0.27。(圖一)

## 3. 2013-2015(1-11)年百日咳確定病例疫苗接種狀況：

由全國性預防接種資訊管理系統(NIIS)之 嬰幼兒預防接種查詢子系統查尋疫苗資料，獲得2013-2015(1-11)年百日咳確定病例疫苗接種資料131筆，未施打疫苗的比率分別為42.4%、42.6%和35.3%，而疫苗接種未滿3劑的比率為60.6%、61.7%和 64.7%。(表二)，年齡中位數則分別為2.6m、2.4m、2.6m；疫苗接種3劑或4劑的比率在2013-2015(1-11)年分別為9.1%、19.1%和9.8%，年齡中位數則分別為10y、3.9y、4.6y；疫苗接種5劑者在2015(1-11)年有3例占有比率5.9%，年齡中位數為12.2y。

## 4. 2007-2015(1-11)年百日咳確定病例年齡別分布：

2007-2015(1-11)年百日咳確定病例年齡別發生率分布，0歲未滿一歲的幼童發生率最高，平均每十萬人口發生率為14.31，發生率高於各年齡群10倍之多；其次為1歲以上未滿2歲的族群，平均每十萬人口發生率為1.16；10-14歲群族的發生率為第三高，平均每十萬人口

發生率為0.77。(圖二)；1歲以上未滿2歲的族群每十萬人口發生率在2014年上升到2.02，2015(1-11)年仍維持2.49的高發生率，5-9歲年齡群發生率變化在2009-2010年平均每十萬人口為0.4，2011-2015(1-11)年平均每十萬人口發生率降為0.1。(表三)

## (二) 百日咳菌PFGE型變化

2005-2015(1-11)年臨床分離百日咳菌株237株與歐洲常見5種型別(BpSR11, BpSR10, BpSR3, BpSR5, BpSR12)比較的PFGE圖譜。(圖三)，以相似程度96%分群，將237株分成33型，常見3型占73.8%，分別是9430(27%)，9403(13.9%)，9803(32.9%)。9430與BpSR11分群相近，9403與BpSR5相同，9803與BpSR2相近。在2009年前主要的流行型別為9430和9403，9803為2009年出現的PFGE新型，自2009年後一直是台灣主要的流行型，在2014年出現新型10327，但2015年沒有再出現，而2015年則再出現3個新型，分別是10402、10404和10409。(圖三)

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

2005-2015(1-11)年臨床分離百日咳菌株237株，現今菌株主要攜帶基因型為*ptxA1/prn2/ptxP3/fim3-1*。*ptxA*基因型皆為*ptxA1*；*prn*基因以*prn2*為主要基因型，平均占有比率為96.6%，其間*prn1*、*prn3*、*prn4*和*prn7*零星出現；*ptxP*基因型本土有2種為*ptxP1*和*ptxP3*，*ptxP3*為主要流行型別占96.7%；*fim3*基因型本土菌株有3型 (*fim3-1*、*fim3-2*和*fim3-4*)，*fim3-4*零星出現平均占有比率為1.3%，2005-2010年流行的基因型主要為*fim3-2*平均占有比率為87.6%，而*fim3-1*平均占有比率為11.6%，但到2011年流行狀況轉變，*fim3-1*基因型成為主要的流行型別，占有比率為82.1%，一直至今皆維持優勢，2011-2015年平均占有比率為87.3%。

## (四) 百日咳菌之疫苗成分抗原表現

收集2005-2015(11)年的237株百日咳菌分析其抗原表現，結果如表四，目前共分離到4株PRN-的菌株，分別在2011年1株、2014年2株和2015年1株，PRN-的菌株占1.7%，大部份的菌株為PRN+的菌株。Fimbriae 血清型調查結果，台灣百日咳菌株大部分表現Serotype 3 fimbriae (Fim3+) 占了94.1%，Serotype 2 fimbriae (Fim2+)只占3.4%，Fim2-Fim3-的菌株占2.1%，原只在2011年出現過1株，但 2015年Fim2-Fim3-的菌株突然增加，占當年度的23.5%。

#### (五) Pertactin不同基因型間抗原反應

Pertactin的基因型在台灣有5型(*prn1*、*prn2*、*prn3*、*prn4*和*prn7*)，攜帶不同基因型的分離菌株與自ATCC9340(攜帶基因*prn6*)萃取純化的Pertactin免疫小鼠獲取的血清進行玻片凝集反應，結果如表五。

Tohama、CCUG48422、9606、10409和10410在血清稀釋200倍的凝集反應比較微弱，攜帶基因型有*prn1*、*prn2*和*prn3*，未發現凝集反應強弱與特定基因型有相關。

#### 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，以適應宿主的免疫壓力。歐洲9個國家在1998-2009這 10年間，分三期(1998-2001年、2004-2005年和2007-2009年)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(24)，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, 24)，而台灣近年流行的型別9803近似BpSR2，BpSR2在歐洲地區不是主要流行型而是流行與其相近的BpSR3。PFGE圖譜分析發現台灣地區百日咳菌是進行著動態變化，以前的調查資料發現在流行期間PFGE型數目會增加(10)，研究觀察到2015年新型數目增加，在未來是否會引發流行需持續密切觀察。

全球百日咳菌的演化調查(25)，收集19個國家百日咳菌343株，分離年代從1920-2010年，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 $ptx A5/ptxP4$ ，臨床菌株分離年代在1954-2000年；另一譜系分離年代1920-2010年，帶3種基因型分別為 $ptxA2/ptxP1$ 、 $ptxA1/ptxP1$ 和  $ptxA1/ptxP3$ 。台灣菌株的基因型調查發現本土流行菌株皆為分離年代1920-2010年之譜系，攜帶基因為 $ptxA1/ptxP1$ 和 $ptxA1/ptxP3$ 。 $fim3$ 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1960-1995年間被偵測到，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2005-2010年流行的基因型主要為 $fim3-2$ 平均占有比率為87.6%，而 $fim3-1$ 平均占有比率為11.6%，但到2011年流行狀況轉變， $fim3-1$ 基因型成為主要的流行型別，占有比率為82.1%，一直至今皆維持優勢，2011-2015年平均占有比率為87.3%，流行的基因型沒有一直固定在非疫苗型，推測

*fim3*基因可能是受到宿主免疫壓力篩選而產生流行變化，菌株適應環境產生流行菌株的改變，*fim3*基因由*fim3-2*轉成*fim3-1*可能是造成2009-2011年百日咳發生率增加的原因。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年以前和WCV(1960-1995年) *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年) 和ACV (2000年以後) *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反應，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, 23, 26, 27)，*ptxP3*在台灣流行狀況，1995年首度被偵測到，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年百日咳罹病率增加，可能與*ptxP3*菌株全球擴散流行有關係。

Fim2和Fim3血清型的轉變受疫苗影響，在英國的資料顯示WCVs使用後讓Fim2/ Fim3或 Fim2的菌株減少(28)，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(29)，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。台灣百日咳菌株大部分表現Serotype 3 fimbriae (Fim3)占了94.1%，Serotype 2 fimbriae (Fim2)只占3.4%，而Fim2-Fim3-的菌株占2.1%，原只在2011年出現過1株，但2015年Fim2-Fim3-的菌株突然增加，占當年度的23.5%，Fim2和Fim3是某些ACVs疫苗的保護免疫抗原成份，Fim2-Fim3-的菌株在台灣會不會流行需要持續監測，以作為未來選用疫苗的參考。

百日咳菌雖然攜帶不同PRN基因型但皆可以與經ATCC9340菌株純化的PRN免疫小鼠後取得的血清產生凝集反應，ATCC9340菌株攜帶的PRN基因型是*prn6*，顯示不同基因型的抗原有相當程度的相似度，PRN不同基因型引發的抗體具有交叉保護作用。Fim3基因型在台灣分離的菌株常見有2型為*fim3-1*和 *fim3-2*，菌株與WHO國際標準單株抗體anti-FIM3(NIBSC 06/128)進行玻片凝集方法測定血清型時，並未發現不同基因型有不同的表現，顯示不同基因型的抗原具有相當程度的相似性，若是*fim3-4*基因型則因是silent mutation而不表現Fim3(25)，台灣在2005-2015年間分離到3株攜帶*fim3-4*的百日咳菌，分別在2008、2011和2015年各分離到1株，血清型皆為Fim2+Fim3-。

PRN-菌株的出現，在許多國家引起百日咳爆發流行(16-20)，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(20)。PRN-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，PRN-菌株其生長速度比PRN+菌株快(16)，PRN-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PRN-菌株和PRN+菌株也沒有差異(30)。台灣流行菌株以PRN+菌株為主,占98.3%， PRN-菌株只占1.7%， PRN-菌株目前只零星出現，pertactin是ACVs的抗原成分之一，未來是否會有PRN-菌株大量增加需持續監測。

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型多轉為非疫苗型(*ptxA1/prn2*或*ptxA1/prn3*)，但由血清凝集反應觀察，PRN基因型不同但彼此間抗原抗體可以產生凝集反應，且Fim3不同基因型也不影響血清型的測定，並由疾病罹病率的觀察(圖二)，大於2歲、小於10歲的幼兒小孩其發生率明顯低於嬰幼兒，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1歲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)，在狒狒的研究實驗中發現，疫苗施打後的狒狒再經百日咳菌感染，實驗狒狒在疾病症狀的表現為，施打ACVs與WCVs表現相同；而在病原菌的清除實驗中發現，施打ACVs的狒狒其百日咳菌的清除速率比施打WCVs的狒狒慢，與未經免疫的狒狒一樣，且可以將百日咳傳染給沒有免疫的狒狒，實驗推論ACVs對於疾病預防有效但對於感染傳播預防無效。因而推論完成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(35)。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确知識，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.*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年百日咳的發生率增加。
- 3.百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，目前 98.3%的臨床分離株會表現PRN，而PRN-菌株會不會在台灣流行則需要繼續監測；fimbriae也是ACVs的免疫抗原成份，台灣百日咳菌株大部分表現Serotype 3 fimbriae (Fim3)占了94.1%，Serotype 2 fimbriae (Fim2)只占3.4%，Fim2-Fim3-的菌株占2.1%，原只在2011年出現過1株，但 2015年Fim2-Fim3-的菌株突然增加，占當年度的23.5%，Fim2和Fim3是某些



ACVs疫苗的保護免疫抗原成份，Fim2-Fim3-的菌株在台灣會不會流行需要持續監測。

- 4.百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型多轉為非疫苗型(*ptxA1/prn2* 或 *ptxA1/prn3*)，但由血清凝集反應觀察PRN不同基因型彼此間有交叉反應，且Fim3不同基因型也不影響血清型的測定，並由疾病發生率的觀察，大於2歲、小於10歲的小孩其發生率明顯低於嬰幼兒，顯示ACVs對疾病有一定的保護程度。
- 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，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，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ACVs，而台灣狀況大部份菌株依然會表現pertactin，含有pertactin成份的ACVs可能是比較好的選擇。
- 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. 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, Cassidy 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. 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.

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. 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.
25. 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.
26. 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.

27. 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.
28. Gorringe AR, and Vaughan TE. *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. *Expert review of vaccines*. 2014;13(10):1205-14.
29. Poolman JT, and Hallander HO. Acellular pertussis vaccines and the role of pertactin and fimbriae. *Expert review of vaccines*. 2007;6(1):47-56.
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.
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 van Gent M. The pertussis problem: classical epidemiology and strain characterization should go hand in hand. *Jornal de pediatria*. 2015.
34. Swamy GK, and Wheeler SM. Neonatal pertussis, cocooning and maternal immunization. *Expert review of vaccines*. 2014;13(9):1107-14.
35. Kmietowicz Z. One in five children with persistent cough found to have whooping cough. *Bmj*. 2014;348(g4211).

## 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	97.91	96.46

備註：

1. 資料來源: 2001-2013 年傳染病統計監視年報。2014 年為全國性預防接種資訊管理系統(NIIS)於 2015 年 5 月之統計資料。
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 Sanofi 之巴斯德五合一疫苗於 2006 年取得國內許可證
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

表二：2013-2015(1-11)年百日咳確定病例疫苗接種狀況

疫苗接種狀況 年	<3劑			3、4劑			5劑			不明		
	2013	2014	2015	2013	2014	2015	2013	2014	2015	2013	2014	2015
人數 (%)	20 (60.6)	29 (61.7)	33 (64.7)	3 (9.1)	9 (19.1)	5 (9.8)	0 (0)	0 (0)	3 (5.9)	10 (30.3)	9 (19.1)	10 (19.6)
年齡最小值	0.7 m	1.2 m	1 m	1.8	1.1	1	0	0	7.8	0.8 m	0.7 m	0.7 m
年齡最大值	6.4 m	5.9 m	1.3	13	18.5	14.9	0	0	13.1	57.5	41.7	47.7
年齡中位數	2.6m	2.2 m	2.6 m	10	3.9	4.6	0	0	12.2	3.4	3 m	2.1
年齡平均數	3 m	2.5 m	3.6 m	8.3	7.7	6.8	0	0	11	13	16.2	14.1

註：2013-2015(1-11)年未施打疫苗的比率分別為 42.4%、42.6%和 35.3%。

表三：2007-2015(1-11)年百日咳確定病例之年齡別發生率

年/年齡別	0歲	1歲	2~4歲	5~9歲	10~14歲	15~19歲	20-40歲	≥41歲	總計
2007	9.37	2.42	0.61	0	0.12	0.06	0.1	0.04	0.19
2008	6.93	0.97	0.16	0.15	1.03	0.19	0.03	0.01	0.18
2009	13.69	0.5	0.32	0.32	1.91	0.43	0.18	0.08	0.39
2010	15.26	1.03	0.98	0.43	0.33	0.12	0.13	0.08	0.24
2011	19.74	0	0.17	0.54	1.04	0.12	0.2	0.05	0.35
2012	10.96	0.5	1.06	0.09	0.22	0.06	0.13	0.06	0.22
2013	16.87	0.42	0.18	0	0.68	0.13	0.03	0.01	0.22
2014	19.07	2.02	0.66	0.1	1.04	0.33	0.07	0.04	0.32
2015(1-11)	18.72	2.49	0.32	0.2	0.58	0.13	0.08	0.05	0.29
總計	14.31	1.16	0.49	0.2	0.77	0.18	0.11	0.04	0.27

註：2009/6/15 增加 PCR 診斷；2009 年開始國小新生入學前施打 ACVs；2014 年 1 月起因應國際疫苗短缺，追加接種時程由 18m 延到 27m。



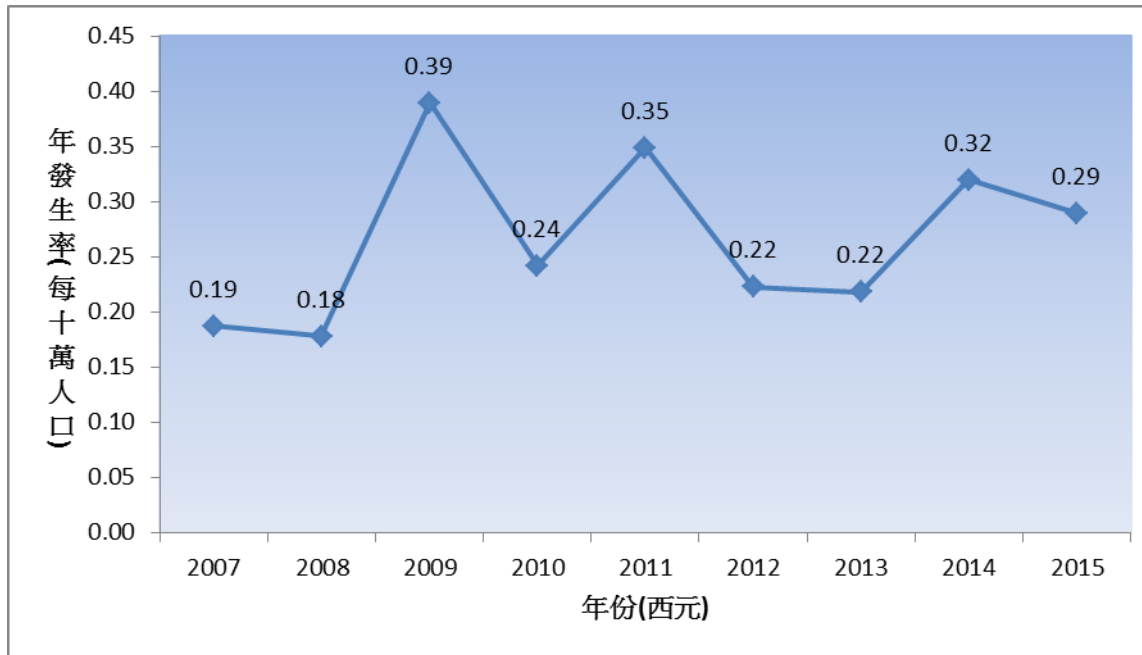
表四：2005-2015(1-11)年 237 株百日咳菌其 pertactin 和 fimbriae 抗原表現

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015 (1-11)
No.	23	15	28	21	30	13	28	24	16	22	17
PRN+	23	15	28	21	30	13	27	24	16	20	16
PRN-	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1
Fim2 +	1	0	1	2	0	0	1	0	0	2	1
Fim3 +	22	15	27	19	30	13	26	24	16	20	11
Fim2+Fim3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Fim2- Fim3-	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4

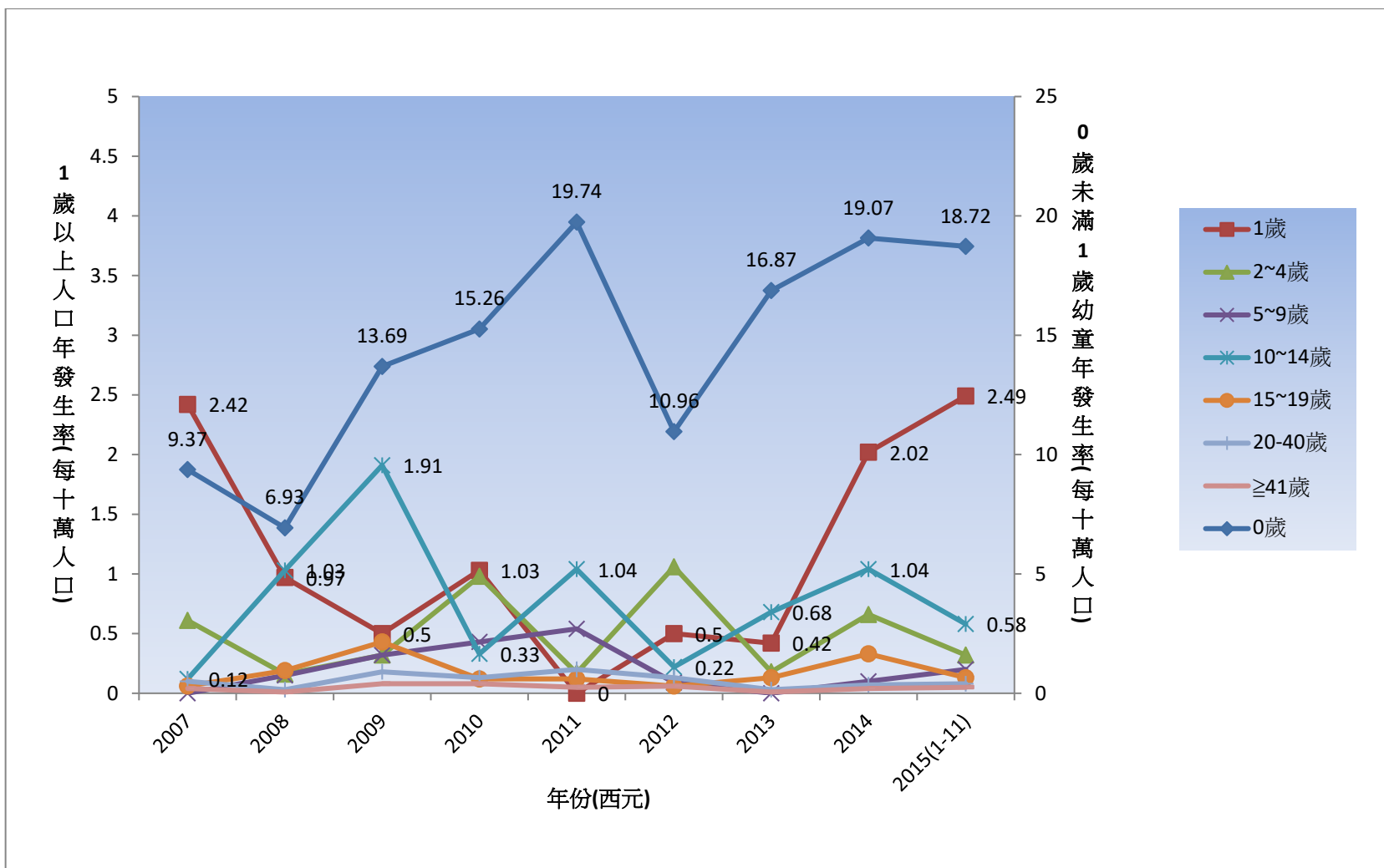
表五：不同 Prn 基因型的菌株其血清凝集反應

Strain	Year	Prn genotype	50X	100X	200X
ATCC9340	control	<i>prn6</i>	3+	2+	2+
Tohama	control	<i>prn1</i>	3+	2+	weak
CCUG48423	1971	<i>prn1</i>	3+	2+	1+
CCUG48428	1977	<i>prn2</i>	3+	2+	1+
CCUG48422	1998	<i>prn3</i>	3+	2+	weak
9604	2007	<i>prn4</i>	3+	2+	1+
9606	2007	<i>prn3</i>	3+	2+	weak
9607	2007	<i>prn2</i>	3+	2+	1+
9705	2008	<i>prn7</i>	3+	2+	1+
10120	2012	<i>prn1</i>	3+	2+	1+
10121	2012	<i>prn2</i>	3+	2+	1+
10405	2015	<i>prn2</i>	3+	2+	1+
10409	2015	<i>prn1</i>	3+	2+	weak
10410	2015	<i>prn2</i>	3+	2+	weak
10412	2015	<i>prn2</i>	3+	2+	1+

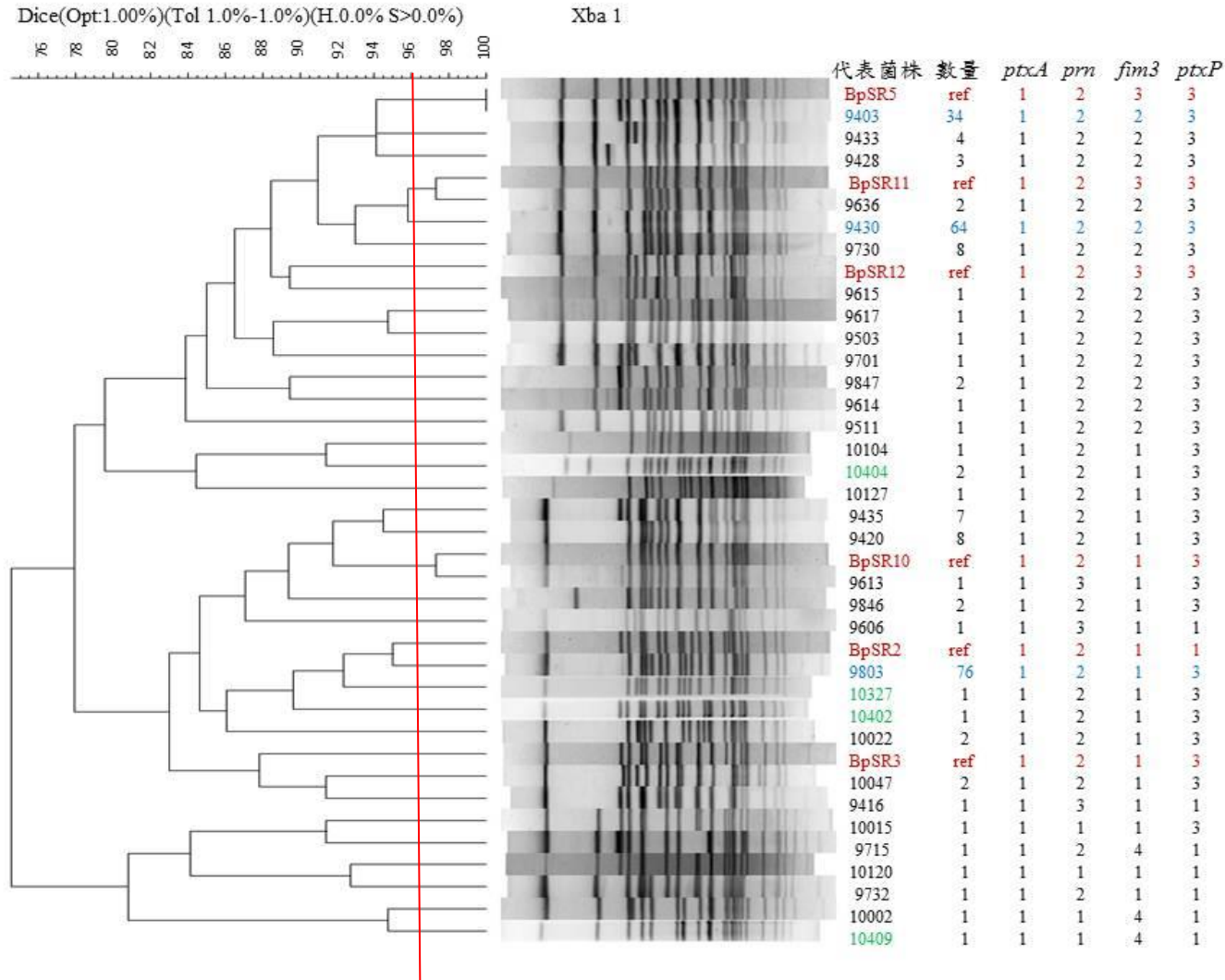
註： LTK-2 anti-PRN serum(mouse): ATCC9340



圖一、2007-2015(1-11)年百日咳發生率變化趨勢圖，每十萬人口年發生率為 0.19-0.39。



圖二、2007-2015(1-11)年百日咳確定病例年齡別發生率分布，0歲未滿一歲的幼童發生率最高，發生率高於各年齡群 10 倍之多，平均每十萬人口發生率為 14.31；其次為 1 歲以上未滿 2 歲的族群，平均每十萬人口發生率為 1.16； 10-14 歲的群族其發生率為第三高，平均每十萬人口發生率為 0.77。



圖三、2005-2015年台灣百日咳菌株 237 株與歐洲常見 5 種型別(BpSR11, BpSR10, BpSR3, BpSR5, BpSR12)比較的 PFGE 圖譜,237 株之 PFGE 型共有 33 型,常見 3 型占 73.8%,分別是 9430(27%),9403(13.9%),9803(32.9%)。9430 與 BpSR11 分群相近,9403 與 BpSR5 相同,9803 與 BpSR2 相近。



圖四、2005-2015年台灣百日咳菌株237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。