

# 百日咳鲍特菌的研究进展

马科尔, 蒋蒙毅, 徐志豪 (通信作者)

(浙江大学医学院附属第四医院呼吸与危重症医学科 浙江 金华 322000)

**【摘要】**百日咳鲍特菌是一种革兰氏阴性、短小的卵圆形球杆菌, 该菌可通过飞沫传播, 导致人们出现一系列呼吸道症状, 称为“百日咳”疾病。近年来, 百日咳的发病率在世界范围内呈上升趋势, 学者们称之为“百日咳再现”。本文从微生物病原学、流行菌株的改变、病原学诊断、抗生素的应用及疫苗的研究进展几个方面进行综述。

**【关键词】**综述; 百日咳鲍特菌; 流行病学; 耐药; 疫苗

**【中图分类号】**R516.6

**【文献标识码】**A

**【文章编号】**2095-1752 (2022) 33-0039-04

Advances of *Bordetella pertussis*

MA Keer, JIANG Mengyi, XU Zhihao (Corresponding author)

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The Fourth Affiliated Hospital Zhejiang University School of Medicine, Jinhua, Zhejiang 322000, China

**【Abstract】** *Bordetella pertussis* is a Gram-negative, short, oval coccus bacterium that spreads through droplets and causes people to experience a range of respiratory symptoms known as “whooping cough”. In recent years, the incidence of pertussis has been on the rise worldwide, which called “reemergence of pertussis”. This article reviews the latest research advances of *Bordetella pertussis*, including microbial etiology, circulating strains, etiological diagnosis, applications of antibiotics and vaccine progress, in order to draw attention to this microorganism.

**【Key words】** Review; *Bordetella pertussis*; Epidemiology; Drug Resistance; Vaccines

百日咳鲍特菌 (*Bordetella pertussis*, BP) 是一种严格的人类病原体, 没有已知的动物或环境宿主。在 1900 年, Bordet 和 Gengou 通过显微镜在患者痰液中观察到了 BP 的存在, 于 1906 年报告了该菌的首次分离。BP 可导致人们出现一系列呼吸道症状, 称为“百日咳”疾病。据文献记载, 早在隋朝时期, 巢元方观察到了百日咳这种疾病, 其撰写的《诸病源候论》描述为这种病症好发于小儿, 咳嗽可持续 100 d。在西方国家, Sydenham 于 1679 年将这种疾病命名为 Pertussis, 意思是剧烈咳嗽。BP 的传染性较强, 在疫苗接种前的基本传染数  $R_0$  为 5.5, 是流行性感 (  $R_0 = 1.28$  ) 的 4 倍左右, 细菌可通过咳嗽或打喷嚏的方式传染密切接触者, 感染者通常出现经久不愈的痉挛性咳嗽, 典型者可有鸡鸣样咳嗽或咳嗽后呕吐, 严重者出现肺炎、惊厥、百日咳脑病等一系列严重的并发症, 甚或死亡。在疫苗前时代, 百日咳是导致儿童人群死亡的重要疾病之一。数据显示, 我国于 1978 年将百白破疫苗纳入计划免疫, 百日咳发病率从 20 世纪 70 年代的 100/10 万~200/10 万降至 90 年代末的 1/10 万以下, 病死率更是降低至 0.001/10 万左右。但近年来, 在疫苗的高接种率下, 全球百日咳的发病率有着不降反升的趋势, 我国 2019 年报道的发病率上升至 2.15/10 万<sup>[1]</sup>, 学者们称之为“百日咳再现”, 这种现象引发了我们对该疾病的重视。

## 1. 微生物病原学

### 1.1 生物学特征

BP 属于产碱杆菌科鲍特菌属, 它是一种革兰氏阴性、短小的卵圆形球杆菌, 无芽孢、无鞭毛, 有荚膜和菌毛。它的培养条件苛刻, 需在鲍-金培养基或者木炭琼脂培养基上进行培养, 适宜温度为 35~37℃左右, 是一种专性需氧菌。BP 的生长缓慢, 培养 3~7 d 才可见细小、圆形、光滑、凸起、灰色半透明的菌落, 周围可见模糊的溶血环。它的生化反应弱, 一般不发酵糖类, 但分解蔗糖和乳糖, 产酸不产气, 不产生  $H_2S$  和吲哚, 过氧化氢酶试验阳性。该菌的抵抗力弱, 在 56℃环境下 30 min 或日光照射 1 h 可致死亡。

### 1.2 基因组特征

BP 的基因组约为 4.1 Mb, G+C 含量约为 67.7%<sup>[2]</sup>, 它的基因组中存在近 250 个插入序列 IS481 拷贝, 具有基因组结构多样化机制。这些移动元件允许基因组内重组和切除和/或插入侧翼基因组区域, 导致基因组衰变、基因组重排和基因表达改变。BP 含有约 3 121 种蛋白质, 其中多种蛋白质具有抗原性或生物活性。其中, 百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) 是 BP 特有的主要的毒力因子, 它是一种 A-B 型毒素, A 结构域为具有免疫保护特性和多种酶活性的 S1 亚基 (催化亚基), 由 *ptxA* 基因表达, B 结构域包含 5 个结合亚基 (S2、S3、2 个 S4、S5)。根据 S1 亚基第 68、228、232 位氨基酸的核苷酸

差异,将ptxA基因分为1、2、3、4这四种等位基因型,毒力因子的表达受bvg操纵子的调节。百日咳毒素启动子(pertussis toxin promoter, ptxP)区域约有170个碱基,在基因组中位于百日咳毒素基因的上游,呈现一定的多态性。根据特定位置碱基的突变,ptxP可分为11个亚型,控制百日咳基因的表达。菌毛(fimbriae, FIM)是BP表面上的蛋白质投射物,具有高度免疫原性并被认为具有黏附的作用。BP产生两种菌毛血清型,分别由fim2和fim3基因编码。

### 1.3 致病机制

BP通常通过飞沫进行传播,密接者一旦吸入含菌的液滴,感染会通过4个过程发生:附着、逃避宿主防御、局部组织损伤和全身表现,每个过程都由特定的毒力因子介导<sup>[3]</sup>。①附着:BP通过至少8种不同的黏附因子附着在上呼吸道纤毛上皮细胞上,其中重要的是丝状血凝素(filamentous hemagglutinin, FHA)、黏附素(adhesin, PRN)和FIM,它们是气道定植所需的高度免疫原性蛋白质。②逃避宿主防御:腺苷酸环化酶毒素(adenylate cyclase, ACT)和PTX两种毒力因子主要负责逃避宿主防御。ACT通过将三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)催化成环状单磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)来抑制中性粒细胞趋化和吞噬作用。PTX的B亚基负责与细胞膜结合,促进A亚基侵入,而A亚基通过G蛋白偶联受体途径改变细胞功能并抑制中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞的迁移,防止它们到达感染区域。③呼吸道组织的局部损伤是由多种毒力因子介导的,其中最重要的是气管细胞毒素(tracheal cytotoxin, TCT),它通过局部产生一氧化氮特异性地破坏和杀死呼吸道纤毛上皮细胞,导致上皮脱落,促进炎症反应,这种损伤被认为是导致特征性阵发性咳嗽的主要原因。皮肤坏死毒素(dermonecrotic toxin, DNT)存在细胞质中<sup>[4]</sup>,会导致该细菌所在的部位附近出现炎症和局部坏死。④百日咳感染的全身表现并不常见,PTX是导致未免疫个体感染BP时出现的白细胞增多和淋巴细胞增多的原因,而白细胞增多是未受疫苗保护的婴儿出现重症百日咳的主要危险因素之一。据研究发现PTX可使胰岛细胞致敏和高胰岛素血症,这可能导致低血糖,尤其是在婴幼儿中好发<sup>[5]</sup>,以及增加对组胺的敏感性,从而导致增加毛细血管通透性、低血压和休克。PTX还会影响免疫系统,导致肺炎和中耳炎等继发感染的增加。另外,TCT、脂寡糖(lipo-oligosaccharides, LOS)等毒力因子可刺激细胞因子IL-1的释放,从而引起发烧。

## 2. 流行菌株的改变

### 2.1 等位基因的改变

20世纪90年代以来,美国、荷兰、澳大利亚等地发现BP流行株的抗原基因型出现了转变。具有ptxP3等位基因的菌株能产生更多的PTX,它取代了原有ptxP1菌株的地位成为流行菌株<sup>[6]</sup>。百日咳疫苗株Tohama I和CS以及20世纪早期分离株的等位基因型为ptxA2或ptxA4,而近年来分离的菌株以ptxA2为主导,研究人员认为含有ptxA2的疫苗可能对含有ptxA1基因的菌株的保护作用较弱<sup>[3]</sup>。自1980年代以来,prn2亚型出现在一些欧洲国家,而到2000年代,prn2或prn3已成为荷兰、芬兰、法国、美国和其他国家分离株的主要基因型,取代了早期prn1基因型的主导地位。近年来,先前的观察表明,PRN缺乏可能是无细胞百日咳疫苗(acellular pertussis vaccine, aPV)驱动的<sup>[7]</sup>。相比其他抗原,fim2-1和fim3-1这两个抗原相关基因相对保守<sup>[8]</sup>。我国李丽君等<sup>[9]</sup>将2015年—2016年分离的224株菌株进行测序,这些菌株分离自来自全国14个省的患儿,其中203株(90.6%)的抗原基因型为ptxA1/ptxC1/ptxP1/prn1/fim2-1/fim3-1。而2018年深圳的一项研究对50株分离株进行检测,其中31株(62%)基因型为ptxA1/ptxC2/ptxP3/prn2/fim2-1/fim3-1<sup>[3]</sup>,另外,上海的一项研究结果也发现了流行菌株基因型的改变,这似乎表明了我国的流行菌株与国际趋势逐渐一致。据一项研究显示,我国当前分离菌株与疫苗株的亲缘关系相距甚远,而与国外的部分分离株有较近的系统发育关系,这也表明当前菌株在国际广泛流动与传播<sup>[3]</sup>。据推测,免疫压力选择下导致BP的基因发生改变,从而导致流行菌株变化,同时,该菌的抗原漂移导致临床分离菌株与疫苗株的抗原蛋白亚型不同,从而削弱了百日咳疫苗的免疫作用,这可能是在高度接种疫苗的国家中出现“百日咳再现”的原因之一。

### 2.2 PRN缺陷型菌株的流行

近年,在使用aPV的许多国家(包括美国、澳大利亚、英国、法国、瑞典、意大利、日本等)报告了PRN缺陷型的BP。并且这些菌株在部分国家已占主导地位(占比>50%)。据统计发现,日本报告PRN缺陷型的BP的频率较低,并且从2008年—2010年的41%大幅下降至2014年—2016年的8%,这种现象被认为与使用了排除PRN抗原成分的aPV有关。此外,丹麦使用单组分的PTX疫苗,丹麦2012年前未有PRN缺陷的分离株相关报道,而2012年后报道的4种PRN缺陷的菌株已被证实由其他国家传入。这些结果似乎均提示PRN缺陷株的出现与使

用含有 PRN 成分的 aPV 与有关,而通过对菌株进行全基因测序,研究人员发现而 IS481 位点核酸片段的插入和缺失是 PRN 缺陷的最常见原因。临床鲜有 PTX 缺陷型的 BP 相关报道,但不论 PRN、PTX 或是其他无细胞疫苗抗原的任何突变都可能对当前疫苗的功​​效产生严重影响,这似乎提示疫苗的更替和改进似乎是必要的。

### 2.3 耐药菌株的流行

自从 1994 年在亚利桑那州首次报道了耐红霉素的 BP,世界各地陆续发现大环内酯类耐药的 BP,这种现象可能对全球公共卫生产生威胁。我国耐药情况尤其严重,这可能与我国大环内酯类药物使用量增加有关。2012 年我国首次报道从山东的 2 名患儿中分离出 2 株红霉素耐药的菌株,此后北京、陕西、浙江、江西、湖南、上海、天津、广东、安徽等地区陆续出现报道<sup>[9-14]</sup>,大环内酯类的耐药率逐渐高达 50% 以上,部分地区接近 100%,并且从单一的红霉素耐药转变为广泛的大环内酯类耐药,这给儿童百日咳的治疗带来了新的挑战。国外的耐药情况也不容忽视,目前美国、俄罗斯、伊朗、法国、日本、越南等国家均报道了耐大环内酯类药物的 BP,而由于国外使用对聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 等核酸检测方法作为诊断的金标准,细菌的培养率低,实际情况可能因诊断的局限性而被低估。2003 年, Bartkus 等<sup>[4]</sup>发现对红霉素耐药的 BP 存在 23S rRNA A2047G 突变。此后,多项研究证明了甲基化酶基因的获得及 23S rRNA A2047G 或 A2058G 突变是其耐药的主要机制。此外,日本于 2009 年报道了 6 株 BP 对萘啶酸 (NAL) 具有高水平的耐药性 (最小抑菌浓度 MIC > 256 mmol/L),并考虑 gyrA QRDR 突变是其耐药机制。目前尚未发现该细菌对其他抗生素耐药的报道,但仍需警惕耐药情况向其他喹诺酮类蔓延。

### 3. 病原学诊断

临床中百日咳疾病的病原学诊断通常分为鼻咽拭子的核酸扩增、血清学检测抗体以及细菌的培养结果。目前血清学检测主要通过 ELISA 法定量检测该菌特有的 PTX 特异性 IgG 抗体。实时 PCR 检测方便快捷,通常针对鲍特菌目的基因序列重复插入序列进行扩增,主要采用 IS481 作为检测靶点,这种方法灵敏度和特异性较好,但支气管鲍特菌和霍氏鲍特菌也存在 IS481 基因片段,这就可能造成假阳性结果,而基于多靶点的多重 PCR、环介导等温扩增等核酸检测方法可进一步区分百日咳鲍特菌、副百日咳鲍特菌和霍氏鲍特菌,但以上方法均无法获得分离株。临床中获取 BP 的途径主要来自患者鼻咽拭子的培养,细菌培养阳性是我国诊断百日咳的金标准。

BP 的培养条件苛刻,培养时间长,不能达到快速诊断的临床需求,优点是培养获得的菌株可进一步进行药敏试验及基因测序等研究。BP 培养的敏感性较低,据统计研究,在患者出现咳嗽的 3 周内取样,敏感性通常只有 20% ~ 80%,并且敏感性随着取样时病程的延长而更低。另外,培养的敏感性受多方面因素影响:年龄、免疫状态、抗生素的使用、采样时间、样本的质量、转运介质及转运时间 (在 48 h 内最佳) 等。

### 4. 抗生素的应用

抗生素的使用对于控制 BP 的传播起着重要作用,临床中对于百日咳的抗菌治疗通常首选大环内酯类药物,但近年来世界各地报道的红霉素耐药率维持在高水平状态,阿奇霉素、克拉霉素及克林霉素的耐药率也有明显的上升趋势<sup>[15]</sup>。我国 2017 年发布的中国儿童百日咳诊断和治疗建议中提到,当大环内酯类抗生素治疗效果不佳时可考虑改用复方新诺明 (SMZ-TMP) 治疗,但复方新诺明不能用于 2 月龄以下的婴儿,因此需要寻找其他合适的替代治疗药物。国内外多项研究进行了 BP 的体外药敏试验,发现头孢曲松、头孢呋酮、哌拉西林、左氧氟沙星、美罗培南等抗生素均有较低的 MIC,理论上可作为患儿或成人患者的抗菌治疗药物。我国 2021 年发表的一项临床研究证明,对于大环内酯类耐药的 BP,β-内酰胺类药物治疗后 14 d 对鼻咽部该菌的清除率明显高于大环内酯类药物<sup>[16]</sup>。因此,对于重症患儿及大环内酯类抗生素治疗效果不佳的病例,及时更换抗生素类别对治疗及预后具有重大意义。

### 5. 疫苗研究进展

20 世纪 60 年代起,我国使用全细胞百日咳疫苗 (whole cell pertussis vaccine, wPV) 进行预防接种,但由于其杂质成分较多,引发的不良反应发生率较高,因此 21 世纪初我国开始使用 aPV。由于计划免疫的实施,我国目前已基本实现疫苗的全覆盖。aPV 包含多种纯化的百日咳抗原,包括 ptxP、PTX、PRN 以及 FIM。据一项荟萃分析显示,疫苗的保护力度与疫苗的成分有关,含有三种或更多成分的 aPV 的保护效果优于只包含一种和两种成分的疫苗,且疫苗在预防典型的百日咳的保护效果优于轻度百日咳疾病。Le 等<sup>[17]</sup>进行的一项大型随机临床试验中发现,针对 3 种 aPV 抗原 (PTX、FHA 和 PRN) 的 IgG 抗体反应和衰减表明其几何平均滴度可能保持高于定量限 (LOQ) 2 ~ 9 年,高于检测限 (LOD) 4 ~ 13 年,表明疫苗的有效保护期是有效的。我国当前的疫苗政策为对 3、4、5 个月龄婴儿实行基础免疫,18 ~ 24 个月龄

幼儿接种加强针,而青少年及成人少有主动接种百日咳疫苗。国外部分地区已将青少年及成人纳入加强针计划,并且建议医护人员等重点人群接种加强针。近年来国外已有大型临床试验显示了aPV对孕妇的安全性,美国自2013年以来推荐所有孕妇接种aPV疫苗预防婴儿患病。目前我国尚未制定青少年及成人的加强免疫策略,因此,探索新的免疫接种方案和研发新型百日咳疫苗有着重大意义。目前国内外新型百日咳疫苗的开发主要有以下几个方向:增加新的抗原成分来提高aPV的保护性,利用百日咳外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMV)制作疫苗,基因工程改造全菌体疫苗,及核酸疫苗等。

## 6. 展望

在过去十年中,我国基本实现无细胞百日咳疫苗的全覆盖,但百日咳鲍特菌的流行仍不容忽视。鉴于百日咳鲍特菌在可预见的未来将持续存在,我们仍需进一步研究该细菌的基因变异和流行状况。鉴于目前流行菌株对大环内酯类抗生素高度耐药的现状,开展大样本、多中心的临床研究来评估不同抗生素方案对鼻咽部细菌的清除率是有意义的。同时,未来可进一步探讨更为合适的免疫接种方案,并探索和开发安全及长效的疫苗。

### 【参考文献】

- [1] 蔡路奎,李婧妍,姬秋彦,等. 2004—2019年我国百日咳报告病例流行病学特征分析[J]. 预防医学情报杂志, 2021, 37(8): 1036-1043.
- [2] KOIDE K, YAMAGUCHI T, KATSUKAWA C, et al. Complete Genome Sequence of a Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* Isolated in Japan[J/OL]. Microbiol Resour Announc, 2022, 11(10): e0071822. <https://doi.org/10.1128/mra.00718-22>.
- [3] WU S, HU Q H, YANG C, et al. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* and analysis of vaccine antigen genes from clinical isolates from Shenzhen, China [J/OL]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2021, 20(1): 53. <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00458-3>.
- [4] BELCHER T, DUBOIS V, RIVERA-MILLOT A, et al. Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host [J]. Virulence, 2021, 12(1): 2608-2632.
- [5] SPECTOR T B, MAZIARZ E K. Pertussis [J]. Med Clin N Am, 2013, 97(4): 537-552.
- [6] 张娟胜,王小强,张弟强,等. 百日咳鲍特菌的基因多样性及分子流行病学分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2021, 41(9): 687-691.
- [7] LEITE D, CAMARGO C H, KASHINO S S, et al. Prevalence and characterization of pertactin deficient *Bordetella pertussis* strains in Brazil, a whole-cell vaccine country [J/OL]. Vaccine X, 2021(8): 100103. <https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2021.100103>.
- [8] 汪丙松,张先来,李振,等. 安徽省芜湖市2018年百日咳疑似病例病原菌药敏与基因型分析[J]. 中国热带医学, 2022, 22(1): 37-41.
- [9] 李丽君,袁林,贾举,等. 百日咳致病菌株的药物敏感性和疫苗相关基因型研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(8): 660-665.
- [10] 陈小春,刘琦,陈益平. 耐大环内酯类抗菌药物百日咳的研究现状[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2020, 47(1): 1-6.
- [11] 姜含芳,刘孝荣,陈虹宇,等. 31株深圳地区婴幼儿感染百日咳鲍特菌的流行特点、基因型、亲缘关系与大环内酯耐药性[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019, 39(4): 270-276.
- [12] 雷炎玲,王红梅,张交生,等. 百日咳患儿及密切接触者的细菌培养和药物敏感性检测[J]. 儿科药科学杂志, 2021, 27(4): 37-39.
- [13] 马富艳,华春珍,谢永平,等. 成人百日咳鲍德特菌感染的临床特点及菌株体外耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(9): 879-883.
- [14] 汪丙松,张先来,李振,等. 安徽省芜湖市2018年百日咳疑似病例病原菌药敏与基因型分析[J]. 中国热带医学, 2022, 22(1): 37-41.
- [15] FENG Y, CHIU C H, HEININGER U, et al. Emerging macrolide resistance in *Bordetella pertussis* in mainland China: findings and warning from the global pertussis initiative [J/OL]. Lancet Reg Health West Pac, 2021(8): 100098. <https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2021.100098>.
- [16] MI Y M, HUA C Z, FANG C, et al. Effect of macrolides and  $\beta$ -lactams on clearance of *bordetella pertussis* in the nasopharynx in children with whooping cough [J]. Pediatr Infect Dis J, 2021, 40(2): 87-90.
- [17] LE T, CHERRY J D, CHANG S J, et al. Immune responses and antibody decay after immunization of adolescents and adults with an acellular pertussis vaccine: the APERT Study [J]. J Infect Dis, 2004, 190(3): 535-544.