

贵州省百日咳频发地区 605 份健康人血清 百日咳抗体水平检测

张德著¹, 刘淳婷¹, 万永虎¹, 蒋凤¹, 刘铭¹, 刘清², 管庆虎¹, 王涛¹, 李祝薇³, 叶新贵¹

1. 贵州省疾病预防控制中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 钟山区疾病预防控制中心, 贵州 六盘水 553000;

3. 威宁县疾病预防控制中心, 贵州 毕节 551700

摘要:目的 了解贵州省百日咳病例频发地区健康人群抗体水平, 评估真实发病水平和疾病风险, 为其预防和控制提供依据。方法 2016 年 12 月在贵州省钟山区和威宁县 2 个百日咳频发地区, 采用分层抽样和随机抽样的方法采集健康人群的静脉血清 3~5 ml; 通过酶联免疫吸附实验 (ELISA) 定量测定血清中百日咳鲍特菌总 IgG 含量; 采用 Microsoft Excel 软件整理测定结果, 通过 SPSS 18.0 选用方差分析和卡方检验等统计方法进行数据分析。结果 共检测钟山区和威宁县健康人群血清 605 份, 百日咳鲍特菌总 IgG 阳性率为 10.41%, 其浓度几何均值为 10.46 IU/ml; 男女性别间百日咳鲍特菌总 IgG 抗体阳性率 (10.55%, 10.00%) 和抗体浓度 (9.91 IU/ml, 10.95 IU/ml) 均无统计学差异 ($\chi^2 = 0.049$, $P = 0.893$; $F = 2.957$, $P = 0.355$); 4 剂次无细胞百白破疫苗 (DTaP) 免疫人群与 3 剂次 DTaP 疫苗免疫人群间的百日咳鲍特菌总 IgG 浓度分别为 2.96 IU/ml、2.76 IU/ml, 二者间百日咳鲍特菌总 IgG 浓度差异无统计学意义 ($F = 6.757$, $P = 0.694$); 0~3 岁人群百日咳鲍特菌总 IgG 浓度随接种时间推移而下降, 末次接种疫苗后 5 个月内为 3.61 IU/ml, 2~3 年后降至 2.19 IU/ml ($F = 2.731$, $P = 0.035$); 受百日咳感染影响, 青少年和成人百日咳鲍特菌总 IgG 浓度有较明显的峰值, 抗体水平随年龄增长呈波动性上升。结论 贵州省百日咳频发的钟山区和威宁县健康人群血清中百日咳鲍特菌总 IgG 水平较低, 可能存在接受疫苗免疫的人群仍然感染百日咳的现象, 需进一步加强监测, 优化免疫策略。

关键词: 健康人群; 百日咳; 抗体

中图分类号: R195 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2018)01-0164-05

Pertussis antibody level in serum among the 605 healthy population from high-prevalence area, Guizhou

ZHANG De-Zhu*, LIU Chun-Ting, WAN Yong-Hu, JIANG Feng, LIU Ming, LIU Qing, GUAN Qing-Hu, WANG Tao, LI Zhu-Wei, YE Xin-Gui

* Guizhou Province Center for Disease Control and Prevention, Guiyang, Guizhou 550004, China

Abstract: Objective To survey the level of Pertussis antibody level among the healthy population from the area with a high frequent report rate of Pertussis in Guizhou province, to evaluate the true level and risk factors of the disease, and to provide evidence for disease prevention and control. **Methods** stratified sampling and random sampling method were used to sample healthy person lived ZhongShan district and WeiNing country. 3-5 milliliters serum of venous blood was collected from each sampled person. Pertussis immunoglobulin G (IgG) antibody was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Microsoft Excel was used to organize the result of test, and analysis of variance and chi-square test were conducted with SPSS18.0. **Results** 605 serum samples collected from the two high prevalence areas were tested, the IgG antibody positive rate was 10.41% and the geometric mean of concentration was 10.46 IU/ml. In male and female, the IgG antibody positive rates were 10.55% and 10.00% and the average concentration was 9.91 IU/ml and 10.95 IU/ml in male and female respectively, both of difference was not statistically significant ($\chi^2 = 0.049$, $P = 0.893$; $F = 2.957$, $P = 0.355$). There was no significant difference ($F = 6.757$, $P = 0.694$) between the population inoculated 3 doses and 4 doses of the Diphtheria, Tetanus Toxoids and acellular Pertussis Vaccine (DTaP), the concentration of IgG was 2.96 IU/ml and 2.76 IU/ml respectively, the concentration of IgG was decreasing with inoculation time among the people under 3 years old, from 3.61 IU/ml within 5 months after inoculation to 2.19 IU/ml after 2-3 years ($F = 2.731$, $P = 0.035$). Due to infection influence, there were two slightly peaks of IgG among teenagers and adults, antibody concentration presented a fluctuated increasing trend with age growth. **Conclusion** Currently, the pertussis antibody level of serum among the healthy population in ZhongShan district and WeiNing country of Guizhou Province is relatively low, although vaccinated people could still infect with pertussis disease. It is very necessary to strengthen surveillance and optimize immunization strategy.

Keywords: Healthy population; Pertussis; Antibody

基金项目: 贵州省疾病预防控制中心青年基金 (No: 2016-E-7 青)

作者简介: 张德著 (1987-), 男, 硕士, 主管技师, 研究方向: 疫苗可预防性疾病监测

通讯作者: 叶新贵, E-mail: 604986014@qq.com

百日咳(*Pertussis*)是由百日咳鲍特菌(*Bordetella Pertussis*)引起的呼吸道传染病,典型临床症状为阵发性、痉挛性咳嗽,人群普遍易感^[1]。血清抗体检测是评价感染或疫苗免疫后产生保护性抗体的重要方法^[2]。

我国自 1978 年以全细胞百白破疫苗(Diphtheria, Tetanus Toxoids and whole-cell Pertussis Combined Vaccine, DTwP)对适龄儿童进行预防接种。贵州省自 2008 年以来开始实行以无细胞百白破疫苗(Diphtheria, Tetanus Toxoids and acellular Pertussis Vaccine, DTaP)逐步替代全细胞百白破疫苗(DTwP)对适龄儿童进行接种,2010 年 4 月,贵州全省统一使用无细胞百白破疫苗(DTaP)全面替代 DTwP,按照原免疫程序(3、4、5 月龄各免疫 1 剂次,18-24 月龄加强免疫 1 剂次)对适龄儿童进行接种,2010 年以来全省报告接种率均在 90% 以上^[3]。2011-2015 年,贵州省百日咳发病率一直维持在 1/10 万以下,但钟山区、威宁县等地百日咳病例频发,近 5 年来钟山区、威宁县报告病例占全省病例的 95% 以上。因此,开展此次研究,调研当地健康人群百日咳相关抗体血清负荷水平,为进一步建立贵州省百日咳主动监测体系提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 血清标本采集 采用分层抽样和随机抽样的方法,2016 年 12 月在贵州省百日咳频发的钟山区和威宁县,以百白破疫苗接种率高低评价其免疫规划工作优劣,将上述两个地区的乡镇划分为上、中、下 3 个水平,在免疫规划工作中等水平的乡镇中按照随机抽样的原则各选取 1 个乡镇,按年龄分组:0~1 岁、2~3 岁、4~6 岁、7~12 岁、13~16 岁、17~20 岁、21~30 岁、31~40 岁、41~50 岁、50 岁以上,每个组随机选取 30 名健康者(近 3 个月内无持续 2 周以上阵发性或痉挛性咳嗽),肘部采集静脉血 3~5ml,分离血清,冻存于 -20℃ 待检。

1.2 血清百日咳鲍特菌总抗体检测 通过酶联免疫吸附实验(ELISA)定量测定健康人群血清中百日咳鲍特菌总抗体(IgG)浓度,以每 ml 血清中含抗体活性(IU)表示。检测试剂为德国 Virion-Serion 公司生产

的 Pertussis IgG ELISA 试剂盒(批号:SBG.AX),具体操作按试剂盒说明书进行,通过 Multiskan Mk3 (Thermo 公司)酶标仪读取检测结果,按试剂盒提供的判读标准:IgG 浓度 > 50IU/ml 为阳性,< 40IU/ml 为阴性。

1.3 数据分析与统计 采用 EpiData3.0 录入基本信息,利用 Excel 整理检测结果,通过统计产品与服务解决方案(Statistical Product and Service Solutions, SPSS) 18.0 统计软件,用百日咳鲍特菌总 IgG 浓度几何平均数和阳性率等统计指标描述健康人群中百日咳抗体水平,不同性别、年龄、免疫状况等组间抗体浓度差异用方差分析,阳性率的差异用卡方检验,95% 可信区间(95% CI) 设 $\alpha = 0.05$ 。

百日咳鲍特菌总 IgG 浓度参照试剂盒提供的标准血清,以每 ml 血清含抗体活性(IU)表示,其浓度值 > 50IU/ml 认为血清百日咳鲍特菌总 IgG 含量为阳性,百日咳鲍特菌总 IgG 含量阳性血清数与检测总血清数的比值为百日咳鲍特菌抗体的阳性率,用百分比表示。

2 结果

2.1 性别与抗体水平 共采集 605 名健康者血清,百日咳鲍特菌总 IgG 浓度几何均值为 10.46IU/ml, IgG 阳性率为 10.41% (表 1)。其中男性 275 人、女性 330 人, IgG 浓度几何均值分别为 9.91IU/ml 和 10.95IU/ml, IgG 阳性率分别为 10.55% 和 10.00%, 男女性别间 IgG 浓度几何均值和阳性率均无统计学差异($F = 2.957$, $P = 0.355$; $t = 0.049$, $P = 0.893$)。

2.2 年龄与抗体水平 血清百日咳鲍特菌总 IgG 浓度几何均值总体上随年龄增长而增加(表 1), 6 岁以下人群 IgG 含量较低,其中 2~3 岁人群低至 2.33 IU/ml。青少年人群 IgG 浓度几何均值随年龄增长呈波动性上升,17~20 岁达到峰值 22.95IU/ml; 然而 21~30 岁人群降至 14.67IU/ml。后续年龄段(21~50 岁)人群又有所增加,41~50 岁达到 25.40IU/ml; 50 岁以上人群降至 20.08 IU/ml。不同年龄段 IgG 阳性率大致表现出相同的增减趋势(图 1)。

表 1 不同年龄组人群血清百日咳抗体水平分布

年龄组	调查人数	IgG 浓度几何均值(IU/ml)	95% CI		阳性率(%)
			下限	上限	
0-1 岁	59	2.98	2.29	3.87	0.00
2-3 岁	64	2.33	1.75	3.11	3.13
4-6 岁	65	5.36	3.86	7.45	9.23

(续表)

年龄组	调查人数	IgG 浓度几何均值(IU/ml)	95% CI		阳性率(%)
			下限	上限	
7-12 岁	62	10.81	8.18	14.29	9.68
13-16 岁	60	14.88	11.52	19.24	8.33
17-20 岁	61	22.95	17.63	29.89	19.67
21-30 岁	63	14.67	11.49	18.75	7.94
31-40 岁	60	19.24	15.44	23.98	13.33
41-50 岁	52	25.40	20.22	31.91	21.15
50 岁以上	59	20.08	16.09	25.06	13.56
合计	605	10.46	9.42	11.61	10.41

6 岁以下 3 个年龄组间(0~1 2~3 4~6 岁)百日咳鲍特菌总 IgG 抗体浓度几何均值与 13 岁以上各年龄组间差异性显著($P < 0.05$);青少年和成人血清 IgG 浓度几何均值具有较为明显的两个峰值,但彼此间的差异无统计学意义($P > 0.05$);2~3 岁组人群血清 IgG 浓度几何均值最低并与其余大年龄组间有显著性差异($P < 0.05$)(图 1)。

2.3 不同免疫状况人群中百日咳抗体水平分布

2.3.1 不同疫苗类型 此次调查接种 DTwP 疫苗人群和接种 DTaP 疫苗人群,其血清中百日咳鲍特菌总 IgG 浓度几何均值分别为 13.96IU/ml 和 2.96IU/ml ($F = 1.389, P = 0.000$);百日咳鲍特菌总 IgG 阳性率分别为 16.22% 和 3.54% ($t = 7.198, P = 0.015$)(表 2)。即接种 DTwP 疫苗人群与接种 DTaP 疫苗人群间

百日咳抗体水平差异具有统计学意义。

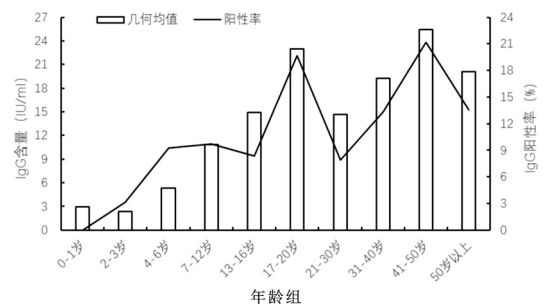


图 1 不同年龄段人群百日咳血清抗体水平增减趋势
注:柱形图上方不同字母表示各年龄组间 IgG 浓度几何均值差异有统计学意义,含任意一个相同字母表示差异无统计学意义

表 2 接种 DTaP 与接种 DTwP 疫苗人群血清百日咳抗体水平对比

接种疫苗类型	人数	接种剂次数	IgG 几何均值(IU/ml)	IgG 阳性率(%)
DTwP	37	4	13.96	16.22
DTaP	113	4	2.96	3.54

2.3.2 不同免疫剂次数 接种 DTaP 疫苗的 0-6 岁人群,完成基础免疫(3 剂次)和加强免疫(4 剂次)的分别为 43 人和 113 人,其 IgG 浓度几何均值分别为 2.76 IU/ml 和 2.96 IU/ml ($F = 6.757, P = 0.694$), IgG 阳性率分别为 0 和 3.54% ($t = 1.562, P =$

0.576)(表 3),即 4 剂次加强免疫与 3 剂次基础免疫人群血清 IgG 浓度几何均值及阳性率差异都不具有统计学意义。

表 3 基础免疫与加强免疫人群血清百日咳抗体水平比较

接种剂次数	人数	IgG 几何均值(IU/ml)	IgG 阳性率(%)
3 剂次基础免疫	43	2.76	0.00
4 剂次加强免疫	113	2.96	3.54

2.4 末次疫苗接种后 IgG 随时间的变化 接种 4 剂次 DTaP 疫苗人群在末次接种 3 年内 IgG 含量较低,

末次接种疫苗 1 年内 IgG 浓度几何均值为 3.09IU/ml 在 2 年和 3 年内分别降至 2.14IU/ml 和 2.98IU/ml

ml,但三者之间无统计学差异(表4),此外,IgG 阳性率在末次接种 1 年内(3.03%)与接种 2、3 年内(均为 0)无统计学差异($\chi^2 = 0.954, P = 1$; $\chi^2 = 0.5226, P = 1$);末次接种 3 年以上人群,IgG 水平随时间推移波

动性上升,在第 7~8 年升至峰值 14.67IU/ml,并与末次接种后 3 年内的 IgG 浓度几何均值间均具有统计学差异($P < 0.05$)。这部分人群具有较高的 IgG 阳性率(表 4)。

表 4 完成 DTaP 加强免疫人群血清百日咳抗体水平随时间的变化

组别	末次接种间隔(月)	调查人数	IgG 浓度几何均值(IU/ml)	均值的 95% 置信区间		IgG 浓度几何均值差异性 ^a	阳性率(%)
				下限	上限		
1	0~11	33	3.09	1.91	5.00	bc	3.03
2	12~23	31	2.14	1.44	3.17	c	0.00
3	24~35	17	2.98	1.92	4.64	bc	0.00
4	36~47	16	5.64	2.26	14.11	abc	12.50
5	48~59	41	6.15	4.06	9.32	ab	9.76
6	60~71	12	8.55	4.57	16.01	ab	8.33
7	72~83	14	10.00	5.40	18.53	ab	0.00
8	84~95	15	14.67	7.45	28.90	a	26.67
9	96~197	14	12.06	6.03	24.12	a	14.29
合计	-	193	5.10	4.20	6.20	-	7.25

注:^a不同字母表示各个组间 IgG 浓度几何均值差异有统计学意义,含任一相同字母表示各个组间 IgG 浓度几何均值差异无统计学意义

有疫苗接种史的 0~3 岁儿童(表 5),抗体水平随接种时间推移而下降,末次接种疫苗后 5 个月内

IgG 浓度几何均值为 3.61IU/ml,2~3 年内下降至 2.19IU/ml($F = 2.731, P = 0.035$)。

表 5 0~3 岁人群末次疫苗接种后血清百日咳抗体水平随时间的分布

末次疫苗接种间隔(月)	调查人数	IgG 浓度几何均值(IU/ml)	均值的 95% CI		阳性率(%)
			下限	上限	
0~5	36	3.61	2.49	5.24	2.78
6~11	35	2.23	1.57	3.16	0.00
12~30	46	2.19	1.60	2.99	0.00
合计	117	2.57	2.11	3.12	0.85

3 讨论

不同性别人群间百日咳抗体水平无统计学差异,总体上百日咳抗体水平随年龄的增长呈波动性增加,学龄前儿童,尤其 3 岁以下婴幼儿抗体水平明显低于其它年龄段。李怡秋和喻文雅的研究表明^[4],百日咳抗体阳性率、平均浓度在末次疫苗接种后 1~5 年内达到最低,加强免疫人群抗体阳性率并未明显升高。此次的调查结果与其一致,提示接种疫苗诱导的抗体不持久。

然而此次调查人群中青少年及成人抗体水平较高,鉴于百日咳抗体水平与疫苗接种和自然感染有关^[5],同时相关研究^[6-8]也表明疫苗免疫所致的抗体水平随接种时间延长而衰减,推测 13~20 岁及 31~50 岁人群的高抗体水平与百日咳的感染有关,因为

相关报道^[9]认为近几年百日咳在未免疫、未全程免疫及免疫后 10 年左右的青少年人群中暴发,美国、加拿大等国证实百日咳高发人群已向 5 月龄以下的婴幼儿及青少年和成人转移^[5,9],提示此次调查中成人和青少年人群的高抗体水平可能为感染百日咳后所诱导。

据报道^[6]DTaP 疫苗诱导的抗体保护性较 DTwP 差,此次调查分别选取 2008 年之前接种 DTwP 疫苗和 2010 年 4 月以后接种 DTaP 疫苗的人群,检测其血清中百日咳鲍特菌总 IgG 含量,虽然 IgG 几何均值有统计学差异,但由于疫苗接种时间有 3 年的跨度,鉴于百日咳抗体水平与疫苗接种和自然感染有关^[5],抗体浓度也有可能由感染百日咳所诱导,因此要评价这两种疫苗免疫效果的优劣还需进一步验证。

综上所述,钟山区、威宁县当前健康人群血清百

日咳鲍特菌总 IgG 阳性率、浓度值均较低,疫苗免疫后 1~3 年抗体水平下降明显,且可能存在免疫后人群仍然感染百日咳的现象。提示在加强百日咳监测的同时还需进一步优化免疫策略、研发更为有效的疫苗及建立快速准确的病例诊断方法。

参考文献

- [1] Edwards KM ,Decker MD. 23 - Pertussis vaccines [J]. Vaccines , 2013 ,31(4) : 447 - 492.
- [2] Denoel PA ,Goldblatt D ,De Vleeschauwer I ,et al. Quality of the haemophilus influenzae type b(Hib) antibody response induced by diphtheria - tetanus - acellular pertussis/Hib combination vaccines [J]. Clinical and vaccine immunology: CVI ,2007 ,14(10) : 1362 - 1369.
- [3] 蒋凤 穆秋玥 张大勇 等. 2004 - 2013 年贵州省百日咳报告病例的流行病学特征分析[J]. 现代预防医学 ,2015 ,42(11) : 1927 - 1930.
- [4] 李怡秋 喻文雅 闫玉英. 石家庄市健康人群百日咳抗体水平分析[J]. 现代预防医学 ,2015 ,42(23) : 4377 - 4378 ,4391.
- [5] Bettinger JA ,Halperin SA ,De Serres GA ,et al. The effect of changing from whole - cell to acellular pertussis vaccine on the epidemiology of hospitalized children with pertussis in Canada [J]. Pediatric Infectious Disease Journal ,2007 ,26(1) : 31 - 35.
- [6] 孙海燕 刘佩莉 袁家麟 等. 两种百白破联合疫苗免疫后百日咳的血清学效果[J]. 中国计划免疫 ,2001 ,7(6) : 345 - 348.
- [7] 邹光荣 兰红 项美娟 等. 吸附无细胞百白破联合疫苗的免疫原性及免疫持久性[J]. 中国生物制品学杂志 ,2013 ,26(12) : 1805 - 1808 ,1811.
- [8] Aoyama T ,Harashima M ,Nishimura K ,et al. Outbreak of pertussis in highly immunized adolescents and its secondary spread to their families [J]. Acta paediatrica Japonica; Overseas edition ,1995 ,37(3) : 321 - 324.
- [9] Tanaka M ,Vitek CR ,Pascual FB ,et al. Tanaka M ,vitek C ,pascual FB ,et al. trends in pertussis among infants in the United States ,1980 - 1999 [J]. JAMA ,2004 ,290(22) : 2968 - 2975.

收稿日期: 2017 - 07 - 30

(上接第 148 页)

CD4⁺T 淋巴细胞水平较低时造成死亡的主要原因之一,周琳^[9]等研究发现入组治疗时 CD4⁺T 水平与研究对象生存时间存在统计学关联。患者基线 CD4⁺T 淋巴细胞越高,对于患者的生存状况和生存质量更加有利。

入组治疗年龄也对患者抗病毒治疗效果有着重要影响^[5]。理论上患者年龄越大,其机体功能越低,同时在社会关注和接受、理解能力等方面都较年龄小患者的低,Wong KuenAlencar^[10]等的研究也得出了类似结果。青壮年患者免疫重建潜力、身体机能等不同方面常强于高龄患者,故在免疫重建效果与生存时间均优于较年龄较大患者。研究显示,随着年龄的增大,抗病毒治疗失败的风险增大^[11],提示对年龄大的患者应该多给予关注。

本文通过多因素 Cox 比例风险回归模型分析发现,患者基线 CD4⁺T 淋巴细胞、入组年龄和感染途径是接受 HAART 的患者生存情况的影响因素。近年来,随着艾滋病筛查工作的普及,促进了艾滋病病毒感染者和病人早期发现;抗病毒治疗的基线 CD4⁺T 淋巴细胞不断提高,抗病毒治疗门槛降低,促进了艾滋病病毒感染者和病人的早期治疗,同时加强对高龄患者特别是 60 岁以上人群的关注,对延迟艾滋病患者生存时间,提高抗病毒治疗成效有着重要意义。

参考文献

- [1] Zhang FJ ,Dou ZH ,Ma Y ,et al. Five - year outcomes of the China National Free Antiretroviral Treatment Program [J]. Annals of Internal Medicine ,2009 ,151(4) : 1 - 42.
- [2] 丁盈盈 贾望谦 王晋生 等. 142 例农村艾滋病病毒感染者/艾滋病患者免费抗病毒治疗效果及生存分析 [J]. 中华流行病学杂志 ,2008 ,29(12) : 1176 - 1180.
- [3] 张福杰. 国家免费艾滋病抗病毒治疗手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社 ,2012.
- [4] 方积乾. 卫生统计学 [M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社 ,2003: 368 - 373.
- [5] 何海 李巧巧 周超 等. 重庆市 2004 - 2013 年艾滋病抗病毒治疗患者生存时间及影响因素分析 [J]. 中华疾病控制 ,2016 ,20(1) : 21 - 25.
- [6] Zhang FJ ,Dou ZH ,Ye M ,et al. Five - Year outcomes of the China national free antiretroviral treatment program [J]. Annals of Internal Medicine ,2009 ,151(4) : 241 - 251.
- [7] 杨红 陈果 周良君 等. 绵阳市 228 例艾滋病感染者和病人 CD4⁺T 淋巴细胞检测分析 [J]. 中国热带医学 ,2013 ,13(3) : 335 - 336 ,342.
- [8] 原琛利 穆生财 薛子东. 山西省艾滋病抗病毒治疗死亡病例流行病学分析 [J]. 中华疾病控制杂志 ,2014 ,18(12) : 1184 - 1186.
- [9] 周琳 吴琼海 沈伟伟 等. 浙江台州市接受抗病毒治疗的艾滋病患者生存分析 [J]. 中华疾病控制杂志 ,2013 ,17(12) : 1049 - 1051.
- [10] Alencar WK ,Duarte PS ,Waldman EA. Survival analysis of acquired immune deficiency syndrome patients with and without hepatitis C virus infection at a reference center for sexually transmitted diseases/acquired immune deficiency syndrome in Sao Paulo ,Brazil [J]. Brazilian Journal of Infectious Diseases ,2014 ,18(2) : 150 - 157.
- [11] Di Giambenedetto S ,Torti C ,Prosperi M ,et al. Effectiveness of antiretroviral regimens containing abacavir with tenofovir in treatment - experienced patients; predictors of virological response and drug resistance in a multi - cohort study [J]. Infection ,2009 ,37(5) : 438 - 444.

收稿日期: 2016 - 07 - 30