

# 天津地区2013年百日咳感染状况及分子流行病学特征分析

刘勇 黄海涛 刘鹏 苏旭 高志刚 郭丽茹 张颖

**【摘要】** 目的 了解2013年天津地区百日咳感染状况及分子流行病学特点。方法 选取天津地区监测点181例百日咳疑似病例作为研究对象,采集鼻咽拭子和血清标本,应用Real-time PCR检测百日咳鲍特菌双目标基因,同时采用ELISA检测其特异性百日咳毒素IgG(PT-IgG)。30份百日咳DNA阳性标本应用PCR扩增菌毛蛋白2(FIM2)、菌毛蛋白3(FIM3)基因,并对PCR产物进行DNA测序分析。结果 148例百日咳病例Real-time PCR检测阳性率为68.24%;108例PT-IgG检测阳性率为55.56%。101例核酸阳性病例的病程中位数为11 d;60例PT-IgG阳性病例的病程 $M$ 为21 d。<1岁病例的Real-time PCR检测阳性率为84.28%,与其他年龄段阳性率比较差异有统计学意义。30份标本百日咳鲍特菌基因核苷酸同源性为99.6%~100.0%,与GenBank国际标准株TohamaI、中国疫苗株同源性为99%。结论 2013年天津地区流行的百日咳鲍特菌与国际标准株及中国疫苗株亲缘关系较近,<1岁病例Real-time PCR检测阳性率高于其他年龄段。

**【关键词】** 百日咳; 荧光定量PCR; 分子流行病学

**The status of pertussis infection and molecular epidemiological characteristics of pertussis in Tianjin, 2013** Liu Yong, Huang Haitao, Liu Peng, Su Xu, Gao Zhigang, Guo Liru, Zhang Ying. Tianjin Center for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China

Corresponding author: Liu Yong, Email: harbour5111@aliyun.com

This work was supported by a grant from the Science and Technology Major Project of Tianjin (No. 07SYSYSF05100).

**【Abstract】 Objective** To understand the status of pertussis infection and characteristics of molecular epidemiology of pertussis in 2013 in Tianjin. **Methods** Totally, 181 suspected pertussis cases were selected and their nasopharyngeal swabs and serum were sampled at the Disease Monitoring Settings in Tianjin. Real-time PCR was used to detect *Bordetella pertussis* double target genes and enzyme linked immune-sorbent assay (ELISA) method was used to detect the specific pertussis toxin IgG (PT-IgG) antibody. Fimbriae 2 (FIM2) and Fimbriae 3 (FIM3) genes of pertussis was amplified by PCR for sequencing, from 30 pertussis DNA positive samples. **Results** The positive rate of Real-time PCR was 68.24% in 148 cases and the positive rate of PT-IgG antibody was 55.56% in 108 cases. Among 101 cases that nucleic acid were positive, the median duration of disease was 11 days. Among the PT-IgG Positive cases (60 cases), the median duration of disease was 21 days. In cases under 1 year old, the Real-time PCR testing positive rate was 84.28%. Positive rates among other age groups, the differences were statistically significant. Nucleotide homologies of FIM2 and FIM3 genes from 30 pertussis strains were 99.6%–100.0%, while it was 99% when compared to both international standard Tohama strain and Chinese vaccine strain. **Conclusion** Detection of pertussis by Real-time PCR from clinical nasopharyngeal swab sample was quick and sensitive for the diagnosis. *Bordetella pertussis* epidemic strains in Tianjin area appeared close relation with both the international standards and China vaccine strains.

**【Key words】** Pertussis; Real-time PCR; Molecular epidemiology

百日咳是由百日咳鲍特菌(*Bordetella pertussis*)

引起,人群普遍易感,尤以婴幼儿多见<sup>[1]</sup>。目前90%的病例来自发展中国家<sup>[2]</sup>,即便是发达国家或百日咳疫苗接种率很高的国家,其发病率也有上升趋势,即“百日咳再现”<sup>[3]</sup>。近年来青少年和成人患百日咳的人数逐渐增多,但其临床症状并不典型,流行病学

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.12.010

基金项目:天津市科技支撑重大项目(07SYSYSF05100)

作者单位:300011 天津市疾病预防控制中心

通信作者:刘勇, Email: harbour5111@aliyun.com

特征也有改变,因此有必要开展百日咳监测。本研究对天津市2013年百日咳疑似病例应用Real-time PCR检测百日咳鲍特菌双目标基因,并选择部分阳性标本分析其主要抗原菌毛蛋白基因序列。

### 对象与方法

1. 研究对象:为2013年1—12月在天津市监测点医院就诊的百日咳疑似病例。就诊病例均由接诊医生按照监测定义进行诊断,同时填写个案调查表开展流行病学调查,并采集鼻咽拭子及静脉血(分离血清),置-20℃冰箱保存待检。鼻咽拭子接种于培养皿后置37℃生化培养箱中孵育。百日咳疑似病例参照文献[4]的定义;临床诊断病例按我国卫生部百日咳诊断标准(WS 274-2007);百日咳疑似病例经PCR检测阳性者,或ELISA检测特异性百日咳毒素IgG(PT-IgG)抗体浓度 $\geq 80$  IU/ml判定为百日咳确诊病例。

#### 2. 研究方法:

(1)细菌培养及鉴定:鼻咽拭子标本接种于碳血琼脂选择培养基,置37℃生化培养箱中孵育3~7 d,连续观察。百日咳可疑菌落经涂片染色、触酶及玻片凝集试验鉴定。

(2)百日咳PT-IgG定量检测:按照ELISA试剂盒使用说明书检测血清标本中PT-IgG浓度(IU/ml)。

(3)Real-time PCR检测:采用法国生物梅里埃全自动核酸提取系统提取鼻咽拭子百日咳鲍特菌核酸<sup>[5]</sup>。百日咳鲍特菌双目标基因包括重复插入序列481(insertion sequences 481, IS481)基因和1002(IS1002)基因,检测标本中双目标基因扩增循环阈值(*C<sub>t</sub>*)均 $\leq 36$ 则判定为阳性。

(4)百日咳FIM区域基因扩增:FIM2上下游引物序列为5'-ACC CAT GCA AAT CCC TTT CCA ACG C-3', 5'-TCC GGT TCG GAT GAA CCA TGC ATA-3',目的片段673 bp;FIM3上下游引物序列为5'-TCA GTA TCA GAA TCA CCA TGT-3', 5'-CAG CTG GGG TAG ACG ACG GAA AAG-3',目的片段638 bp。反应条件:95℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 56℃退火35 s, 72℃延伸60 s,共40个循环,72℃延伸5 min。

(5)测序分析:PCR产物测序由上海英俊生物技术有限公司完成,根据测序结果应用DNASar软件进行分析,并与GenBank中相应百日咳鲍特菌基因序列的核苷酸比对。采用GenBank国际标准株Tohama I(BX640415.1)、中国百日咳疫苗CS株

(CP002695)、18323株(HE965805.1)进行序列比较和分析,其他百日咳鲍特菌FIM2、FIM3基因序列对应登录号分别为Y00527.1和X51543.1。

3. 统计学分析:采用Excel 2003软件建立数据库,SPSS 13.0软件进行统计分析,率的比较采用 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结果

1. 病例概况:2013年共检出181例百日咳疑似病例,其中采集到鼻咽拭子标本148例,血清标本108例;经临床诊断和实验室确诊百日咳病例共169例,其中男性92例,女性77例,性别比1.19:1;病例年龄最小为出生后15 d,最大64岁;以婴儿和成人两年龄段高发,<1岁组75例(44.37%),其中<3月龄30例(17.75%),3~5月龄27例(15.97%),6~12月龄18例(10.85%);1~6岁21例(12.42%),7~14岁12例(7.1%), $\geq 15$ 岁61例(36.09%)。全市16个区县均有病例报告,病例数居前3位的区县为静海(70例)、津南(13例)、西青(11例),宁河县仅1例;各月均有病例报告,但以夏季高发,6—8月发病84例(49.7%),其中7月最多45例(26.62%)。101例核酸检测阳性病例其病程为3~56( $M=11$ )d;60例PT-IgG抗体阳性病例的病程为12~78( $M=21$ )d。

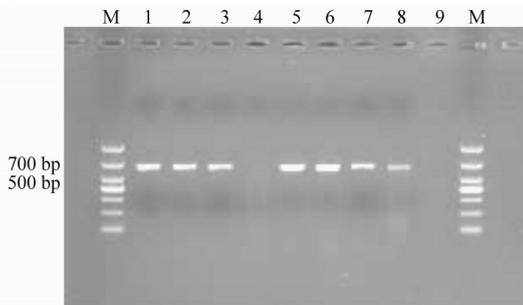
2. Real-time PCR检测:148份鼻咽拭子标本采用Real-time PCR检出阳性101份,阳性率为68.24%;108份血清标本中ELISA检出阳性60份,阳性率为55.56%。两种检测方法比较,差异有统计学意义( $\chi^2=4.809$ , $P=0.028$ )。在Real-time PCR检出阳性的101份标本中,28份采用两种方法检测均阳性,23份为Real-time PCR阳性、PT-IgG阴性;ELISA检出阳性的60份标本中有13份PT-IgG阳性、Real-time PCR阴性。43份鼻咽拭子进行细菌培养,鉴定出百日咳鲍特菌5份(阳性率11.62%),后经Real-time PCR检测均为阳性。经Real-time PCR检测阳性的101例中<1岁年龄组59例,阳性率为84.28%,与其他年龄组比较差异有统计学意义( $\chi^2=43.128$ , $P < 0.001$ ),见表1。

3. 百日咳鲍特菌FIM基因扩增及序列分析:从101份核酸阳性标本中随机选择30份,应用PCR扩增百日咳鲍特菌FIM2和FIM3基因,扩增产物经过1.2%琼脂糖电泳分析,分别可见673 bp、638 bp的特异性条带,其大小与理论值一致(图1)。

FIM2基因开放阅读框(ORF)从181位碱基到801位碱基,编码一个207个氨基酸的蛋白。对30

**表1** 2013年天津市148例不同年龄组百日咳病例  
Real-time PCR 检测结果

年龄组(岁)	诊断例数	检测例数	检测阳性例数	阳性率(%)
0~	75	70	59	84.28
1~	21	19	14	73.68
7~	12	12	6	50.00
15~	61	47	22	46.80
合计	169	148	101	68.24



注:M:DL 1 000 Marker; 1~8:病例标本; 9:阴性对照

**图1** PCR扩增百日咳FIM2基因DNA电泳图

份核酸阳性标本百日咳FIM2基因中673个核苷酸(177~849)进行扩增,包括整个ORF。序列比对分析结果显示30株百日咳鲍特菌FIM2基因(673 bp)核苷酸序列同源性在99.6%~100.0%,与GenBank中登录的相应百日咳国际标准株 Tohama I (BX640415.1)、中国百日咳疫苗CS株(CP002695.1)、疫苗株18323 (HE965805.1)和FIM2 (Y00527)的FIM2基因进行序列同源性比对,结果显示核苷酸序列同源性均为99%,在811、813、839、842位置碱基发生A-G、A-T、T-C、G-A的无义突变,突变位置在ORF外。FIM2基因ORF核苷酸序列推导的氨基酸序列未发生变异。

FIM3基因ORF从336位碱基到947位碱基,编码一个204个氨基酸的蛋白。对30份核酸阳性标本百日咳FIM3基因中638个核苷酸(318~955)进行扩增,包括整个ORF。序列比对分析结果显示30株百日咳鲍特菌FIM3基因(638 bp)核苷酸序列同源性在99.8%~100.0%,与GenBank中登录的相应百日咳国际标准株 Tohama I (BX640415.1)、中国的百日咳疫苗CS株(CP002695.1)、疫苗株18323 (HE965805.1)和FIM3 (X51543)的FIM3基因进行序列同源性比对,结果显示核苷酸序列同源性均为99%,在328、329位置碱基发生G-A、A-G的无义突变,突变位置在ORF外。FIM3基因ORF核苷酸序列推导的氨基酸序列未发生变异。分析结果显示天津地区流行的百日咳鲍特菌与国际标准株 Tohama I及CS菌株、18323菌株亲缘关系较近。

## 讨 论

诊断百日咳感染的实验室方法主要包括细菌培养、免疫学和分子生物学的检测,基于细菌培养作为金标准。经典的细菌培养法虽然具有较好的特异性,但菌培养影响结果因素较多,且培养一般需要3~7 d才能出结果,不利于快速诊断和治疗。由于PCR准确快速对病原学诊断已成为WHO和美国疾病预防控制中心进行百日咳实验室确诊标准之一,现在国际上荧光定量PCR成为发展方向<sup>[6,7]</sup>。由于感染人类呼吸道的不同鲍特菌属间存在遗传基因的高度相似性,如霍氏百日咳鲍特菌和支气管(败血)百日咳鲍特菌,并能引发百日咳样症状,故单独使用IS481作为目标基因检测百日咳鲍特菌的方法,特异性难以保证<sup>[8,9]</sup>。由于IS1002是百日咳鲍特菌除IS481以外的另一段特异性重复插入序列,且霍氏百日咳鲍特菌和支气管(败血)百日咳鲍特菌尚未发现IS1002序列,因此选择IS481和IS1002双目标基因方法避免单一基因检测可能出现的假阳性。

本研究分析了2013年天津地区百日咳疑似病例百日咳鲍特菌分子流行病学监测结果,PCR检测阳性率高于PT-IgG阳性率,检测病程 $M=11$  d,比PT-IgG检测的病程 $M=21$  d缩短近一半时间,表明该方法更利于百日咳早期诊断。本研究结果显示<1岁病例PCR检测阳性率显著高于其他年龄段,其原因可能是婴幼儿百日咳病例症状典型,就诊及时,在发病早期就能采集到检测标本。成人百日咳病例因症状不典型、易漏诊误诊,发现并采集标本是已到患病后期,因此检测阳性率低,同时作为重要传染源,易造成未接种或未完全接种疫苗的婴幼儿百日咳感染。

百日咳鲍特菌FIM2和FIM3为百日咳疫苗生产用菌株主要抗原片段,是重要抗原成分<sup>[10]</sup>。本研究对天津地区临床上分离的百日咳流行株FIM2和FIM3重要抗原成分进行同源性比较,结果显示目前流行株的同源性高,与国际标准株 Tohama I、中国的百日咳疫苗CS株、疫苗株18323亲缘关系较近,说明我国百日咳疫苗对目前流行的百日咳菌免疫仍然有效。近年接种过百日咳疫苗的青少年和成人患百日咳的病例逐渐增多,甚至局部地区发生暴发。近来在百日咳疫苗覆盖率较高的国家,每间隔3~5年发生百日咳流行高峰,传播模式从过去的“儿童-儿童”转变为现今的“青少年-成人-婴幼儿”。应建立健全实验室诊断及监测技术,早期及时诊治,切断传

播途径, 预防和控制百日咳感染。

参 考 文 献

[1] Crowcroft NS, Booy R, Harrison T, et al. Severe and unrecognised: pertussis in UK infants [J]. Arch Dis Child, 2003, 88(9): 802-806.

[2] McNabb SJ, Jajosky RA, Hall-Baker PA, et al. Summary of notifiable diseases—United States, 2005 [R]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2007, 54(53): 1-92.

[3] Nicholas W, Peter M. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention [J]. Paediatr Respir Rev J, 2008, 9(3): 201-211.

[4] Zhang Y, Huang HT, Liu Y, et al. Incidence surveillance of pertussis based on community and analysis of its transmitted features in Tianjin [J]. Chin J Vacc Immun, 2011, 17(3): 209-211. (in Chinese)  
张颖, 黄海涛, 刘勇, 等. 天津市社区人群百日咳发病监测及传播特征研究 [J]. 中国疫苗和免疫, 2011, 17(3): 209-211.

[5] Liu Y, Guo LR, Liu P, et al. Development and application of a Real-time polymerase chain reaction method based on the duplex target gene for detection of *Bordetella pertussis* [J]. Chin J Vacc Immun, 2012, 18(5): 447-450. (in Chinese)  
刘勇, 郭丽茹, 刘鹏, 等. 百日咳鲍特菌双目标基因荧光定量聚

合酶链检测方法的建立及应用 [J]. 中国疫苗和免疫, 2012, 18(5): 447-450.

[6] Kusters K, Reischl U, Schmetz J, et al. Real-time light cyclers PCR for detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(5): 1719-1722.

[7] Probert WS, Ely J, Schrader K, et al. Identification and evaluation of new target sequences for specific detection of *Bordetella pertussis* by Real-time PCR [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(10): 3228-3231.

[8] Roorda L, Buitenwerf J, Ossewaarde M, et al. A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant *Bordetella* species by the presence and distribution of three insertion sequence elements [J]. BMC Res Notes, 2011, 1(4): 11-14.

[9] Register KB, Sanden GN. Prevalence and sequence variants of IS481 in *Bordetella bronchiseptica*: implications for IS481-based detection of *Bordetella pertussis* [J]. Clin Microbiol, 2006, 44(12): 4577-4583.

[10] Berbers GA, de Greeff SC, Mooi FR. Improving pertussis vaccination [J]. Hum Vacc, 2009, 5(7): 497-503.

(收稿日期: 2014-06-25)

(本文编辑: 张林东)

## 中华流行病学杂志第七届编辑委员会成员名单

(按姓氏汉语拼音排序)

顾 问	曲成毅(山西)	王滨有(黑龙江)	乌正赉(北京)	张孔来(北京)	赵仲堂(山东)	庄 辉(北京)
名誉总编辑	郑锡文(北京)					
总编辑	李立明(北京)					
副总编辑	曹务春(北京)	冯子健*(北京)	顾东风(北京)	何 耀(北京)	贺 雄(北京)	姜庆五(上海)
	汪 华(江苏)	徐建国*(北京)	詹思延(北京)			
编辑委员	(含总编辑、副总编辑)					
	毕振强(山东)	蔡 琳*(福建)	曹广文(上海)	曹务春(北京)	陈 峰*(江苏)	陈 坤(浙江)
	陈可欣*(天津)	陈维清(广东)	程锦泉*(广东)	杜建伟*(海南)	段广才(河南)	方向华*(北京)
	冯子健*(北京)	龚向东(江苏)	顾东风(北京)	郭志荣*(江苏)	何 耀(北京)	何剑峰*(广东)
	贺 雄(北京)	胡东生*(广东)	胡国良*(江西)	胡永华(北京)	胡志斌*(江苏)	贾崇奇*(山东)
	姜宝法*(山东)	姜庆五(上海)	阚 飙(北京)	康德英*(四川)	李 丽*(宁夏)	李 群*(北京)
	李敬云(北京)	李俊华*(湖南)	李立明(北京)	廖苏苏*(北京)	刘 静*(北京)	刘 民(北京)
	刘殿武(河北)	刘天锡(宁夏)	卢金星*(北京)	陆 林(云南)	栾荣生(四川)	罗会明*(北京)
	吕 繁(北京)	吕 筠*(北京)	马文军(广东)	孟 蕾(甘肃)	米 杰(北京)	潘凯枫(北京)
	祁 禄*(美国)	乔友林(北京)	邱洪斌*(黑龙江)	仇小强*(广西)	沈洪兵(江苏)	施 榕*(上海)
	施小明*(北京)	时景璞(辽宁)	苏 虹*(安徽)	谭红专(湖南)	唐金陵*(香港)	汪 华(江苏)
	汪 宁(北京)	王 蓓*(江苏)	王 岚*(北京)	王 鸣(广东)	王定明*(贵州)	王建华(天津)
	王全意*(北京)	王素萍*(山西)	吴 凡(上海)	吴先萍(四川)	吴尊友(北京)	夏洪波*(黑龙江)
	项永兵(上海)	徐 飏(上海)	徐爱强*(山东)	徐建国*(北京)	许汴利(河南)	闫永平(陕西)
	严延生(福建)	杨维中(北京)	叶冬青(安徽)	于普林(北京)	于雅琴(吉林)	余宏杰*(北京)
	俞 敏*(浙江)	詹思延(北京)	张 瑜*(湖北)	张博恒*(上海)	张建中(北京)	张顺祥(广东)
	张作风*(美国)	赵方辉*(北京)	赵根明*(上海)	赵亚双*(黑龙江)	周宝森*(辽宁)	周晓农*(上海)
	朱 谦*(河南)	庄贵华*(陕西)				

注: \* 为新聘编委