

百日咳实验室诊断方法的应用分析与比较

王增国 杨杨 刘莹 刘小乖 习艳丽 雷玲霞 李亚绒

【摘要】 目的 利用 <1 岁临床百日咳疑似病例实验室检测结果, 分析比较不同检测方法。方法 采集 2011 年 12 月至 2012 年 12 月西安市儿童医院 <1 岁百日咳临床疑似病例的鼻咽拭子及血清标本, 采用分离培养、IS481 PCR 及百日咳毒素 (PT) IgG 定量酶联免疫吸附试验 (PT-IgG) 检测百日咳鲍特菌感染, 并应用 SPSS 16.0 软件分析结果。结果 148 例临床疑似病例中实验室诊断病例 100 例, 其中 3 例百日咳鲍特菌分离培养阳性, 88 例 IS481 PCR 阳性, 34 例 PT-IgG 阳性, IS481 PCR 和 PT-IgG 均阳性 22 例。IS481 PCR 及 PT-IgG 检测结果与患儿发病天数的差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 百日咳鲍特菌分离培养方法敏感度较低, 而采用 IS481 PCR 和 PT-IgG 两种方法还应结合发病天数加以判断。

【关键词】 百日咳; 酶联免疫吸附试验; 聚合酶链反应

Comparative studies on different methods for laboratory diagnosis of pertussis WANG Zeng-guo¹, YANG Yang¹, LIU Ying¹, LIU Xiao-guai², XI Yan-li¹, LEI Ling-xia², LI Ya-rong². 1 Department of Vaccine Preventable Diseases, Xi'an Center for Disease Control and Prevention, Xi'an 710054, China; 2 Department of Infectious Diseases, Xi'an Children Hospital
Corresponding author: LI Ya-rong, Email: lyr640101@163.com

This work was supported by grants from the Project of Scientific Research of Shaanxi Province (No. 2012 k16-05-08) and the Project of Scientific Research of Xi'an Health Bureau (No. J2011049).

【Abstract】 **Objective** To confirm the clinically suspected pertussis cases (<1 years old) through laboratory methods. **Methods** From December, 2011 to December, 2012, patients with clinically suspected pertussis from Xi'an Children's Hospital were sampled, with their nasopharyngeal swabs collected, blood samples cultured and pertussis toxin IgG detected by PCR. Results were analyzed, using SPSS 16.0 software. **Results** 100 out of the 148 cases were laboratorially confirmed. 3, 88 and 34 cases were positive, through culture, PCR or pertussis toxin IgG respectively. 22 cases were both PCR and pertussis toxin IgG positive. There were significant differences between the results of IS481 PCR, days from the onset of symptoms ($P < 0.01$) and results of PT-IgG with the days from onset of symptoms ($P < 0.01$). **Conclusion** Since the sensitivity of culture on pertussis was low, diagnosis on the disease should be linked to the results from PCR, PT-IgG and the days from onset of symptoms.

【Key words】 Pertussis; Enzyme linked immunosorbent assay; Polymerase chain reaction

百日咳是由百日咳鲍特菌引起的儿童急性传染病, 我国在实施计划免疫后, 其发病率快速下降至目前的报告发病率 < 1/10 万。然而在全球较多疫苗高覆盖率的发达国家甚至一些发展中国家, 百日咳的发病呈现增多趋势, 这一现象被称为“百日咳重现”^[1-3]。目前百日咳实验室诊断主要依靠病原学诊断、鼻咽拭子 PCR 检测以及血清百日咳毒素 IgG (PT-IgG) 检测, 而我国对百日咳的实验室检测尚未普及。为此本研究针对临床疑似百日咳病例采用百

日咳鲍特菌分离培养、特异性 PCR 及血清 PT-IgG 检测, 并分析确诊百日咳病例的实验室检测结果。

材料与方法

1. 样本来源: 2011 年 12 月至 2012 年 12 月在西安市儿童医院采集 <1 岁临床疑似百日咳患儿鼻咽拭子 (NPS) 及血清标本。根据家长主诉或查验接种卡, 记录其采样时发病天数及患儿接种百日咳疫苗 (无细胞百白破疫苗, DTaP) 情况。

2. 相关定义: ①疑似病例: 按照我国现行百日咳诊断标准 (WS 274-2007), 典型病例为阵发性、痉挛性咳嗽, 持续 2 周以上; 非典型病例为有反复发作的呼吸暂停、窒息、青紫和心动过缓症状, 或有间歇的阵发性咳嗽。②实验室确诊病例: 百日咳鲍特菌分

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.10.016

基金项目: 陕西省科技计划项目 (2012 k16-05-08); 西安市卫生局科技项目 (J2011049)

作者单位: 710054 西安市疾病预防控制中心 (王增国、杨杨、刘莹、习艳丽); 西安市儿童医院 (刘小乖、雷玲霞、李亚绒)

通信作者: 李亚绒, Email: lyr640101@163.com

离培养阳性和(或)核酸检测阳性和(或)PT-IgG ≥ 100 IU/ml 的临床疑似病例。

3. 检测方法:

(1)百日咳鲍特菌分离培养:采集 NPS 标本后,置含 15%脱纤维羊血及百日咳选择性添加剂的半量碳琼脂(OXOID,英国)培养基中室温保存,3 d 内送至实验室,标本接种于含 15%脱纤维羊血及百日咳选择性添加剂的碳琼脂,37 °C 培养至少 15 d,疑似菌落采用百日咳诊断血清(BD,美国)鉴定。

(2)核酸检测:将采集的 NPS 标本置含 2 mTE 采样管中,使用 DNA 提取试剂盒(Qiagen)提取 DNA;聚合酶链反应(PCR)使用引物参考文献[4]分别检测 IS481 和 IS1001。20 μl PCR 主要组分终浓度分别为 MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 均为 0.2 mmol/L,各引物 0.5 μmol/L 及 1 U rTaq (TaKaRa, 大连)。热循环程序:94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 仪为 PTC-200(MJ Reaserch, USA)。IS481 阳性者同时使用引物 BPTOXF/BPTOXR 检测百日咳毒素启动子区域(*ptxA-Pr*),扩增条件同上^[4]。按参考文献[5]采用荧光 PCR 仪 CFX96 (Bio-rad, USA) 检测 *hIS1001* 基因以排除霍氏鲍特菌。IS481 阳性伴 IS1001 阴性或 *ptxA-Pr* 阳性者为百日咳鲍特菌感染;IS1001 阳性为副百日咳感染;hIS1001 阳性为霍氏鲍特菌感染。

(3)PT-IgG 检测:采用德国 Virion/Serion 公司的百日咳毒素 IgG 检测试剂盒,参考试剂盒说明,以 IgG 滴度 ≥ 100 IU/ml 判断为百日咳近期感染,排除采样时 1 年内曾接种百日咳疫苗患者^[6]。

4. 统计学分析:应用 SPSS 16.0 软件进行数据录入及统计学分析,规定检验水准 α=0.05, P<0.05 为差异有统计学意义,采用 GraphPad Prism5 软件制图。

结 果

1. 一般情况:共入组百日咳临床疑似病例 148 例(男/女:89/59),年龄 <3 月龄婴儿 83 例(56.1%)、3~5 月龄婴儿 47 例(31.8%)、5 月龄至 1 岁婴幼儿 18 例(12.2%)。经查验接种证(卡)或电话询问,24 例曾接种 1 剂次及以上无细胞百白破疫苗。148 例中经实验室确诊 100 例(男/女:56/44),实验室阳性率为 67.6%(100/148),未见副百日咳及霍氏百日咳鲍特菌感染病例。其中 <3 月龄婴儿 57 例(57.0%)、3~5 月龄婴儿 27 例(27.0%)、5 月龄至 1 岁婴幼儿 16 例(16.0%)。10 例曾接种 1 剂次及以上 DTaP。采样时患儿发病天数为 5~35 d。

2. 实验室检测:100 例实验室确诊病例中,百日咳鲍特菌分离培养阳性者 3 例。核酸检测(IS481)阳性者 88 例,56 例 *ptxA-Pr* 扩增阳性,未见 IS1001 及 *hIS1001* 基因扩增阳性。排除 1 年内曾接种过百白破疫苗的患儿,有 34 例(34%) PT-IgG ≥ 100 IU/ml,而 IS481 PCR 及 PT-IgG 同时阳性者 22 例(22%)(图 1)。

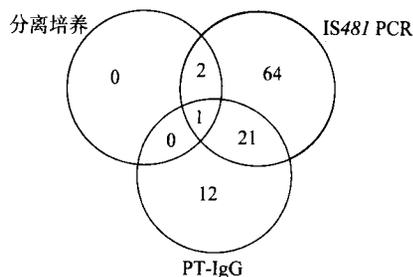


图 1 不同试验方法与百日咳检测阳性标本数相关性

3. 实验室检测结果与发病天数关联分析:

(1)IS481 PCR:由表 1 可见 IS481 PCR 阴性组的发病天数中位数为 22.5 d,阳性组发病天数的中位数为 16.0 d。经非参数 Mann-Whitney Test 检验,认为两组发病天数的差异有统计学意义(Z=3.831, P<0.01),认为 IS481 PCR 阳性组的发病天数明显小于阴性组。

表 1 两组 IS481 PCR 检测结果与百日咳发病天数的比较

IS481 PCR	发病天数	
	$\bar{x} \pm s$	中位数
阴性(n=12)	24.3 ± 5.91	22.5(14 ~ 35)
阳性(n=88)	16.7 ± 6.43	16.0(5 ~ 35)
合计	17.9 ± 6.91	18.0(5 ~ 35)

(2)PT-IgG 滴度:由图 2 可见,发病天数与 PT-IgG 滴度之间呈一定的正相关趋势。经 Kolmogorov-Smirnov 检验,发病天数与 PT-IgG 滴度分布数据均为非正态(P<0.01),采用 Spearman 相关分析,r=0.758, P<0.01,认为发病天数与 PT-IgG 滴度呈正相关,即随着发病天数的延长,PT-IgG 滴度呈逐渐上升趋势。

以单份血清 PT-IgG ≥ 100 IU/ml 作为阈值,将患儿划分为 IgG 阴性及阳性两组,IgG 阴性组的发病天数的中位数为 13.0 d, IgG 阳性组的发病天数的中位数为 23.5 d。经非参数 Mann-Whitney Test 检验,可认为两组的发病天数差异有统计学意义(Z=7.551, P<0.01),即 IgG 阳性组的发病天数明显大于阴性组(表 2)。

讨 论

本研究显示 2012 年西安市儿童医院 <1 岁百日咳实验室确诊病例为 100 例,而该市 2005—2011 年百日咳年均报告发病数为 31 例,提示西安市百日咳发病可能被低估,这与我国多数报道相同^[7,8]。本研

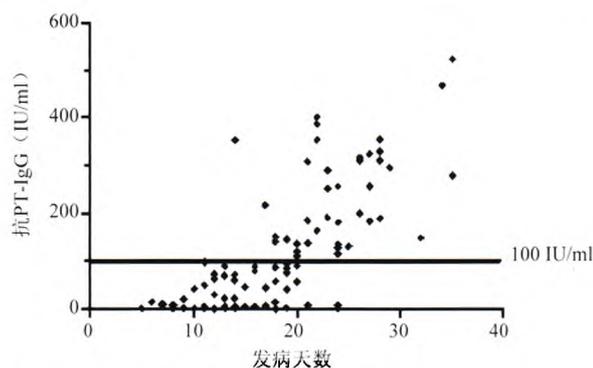


图2 百日咳患儿发病距采样时间与PT-IgG滴度的关系

表2 两组PT-IgG检测结果与百日咳发病天数的比较

PT-IgG	发病天数	
	$\bar{x} \pm s$	中位数
阴性(n=66)	13.6±4.47	13.0(5~24)
阳性(n=34)	23.9±4.92	23.5(14~35)
合计	17.9±6.91	18.0(5~35)

究发现 <3 月龄病例占全部 <1 岁确诊病例的 57.0%，并有 10% 的 <1 岁确证病例曾接种至少 1 剂次 DTaP，提示未全程接种 DTaP 的儿童对百日咳鲍特菌易感。

目前许多国家已将百日咳鲍特菌特异性 PCR、单份血清 PT-IgG 检测列为百日咳实验室诊断标准的方法。我国现行标准中，百日咳实验室诊断主要依靠病原分离培养，而百日咳鲍特菌的分离培养敏感性低、耗时长、难以培养，在诸多医疗机构中甚少开展。本研究发现其灵敏度仅为 3%，因此实验室诊断方法的不足可能是导致我国百日咳被低估的原因之一。

百日咳鲍特菌中的 IS481 基因易于检测，是百日咳 PCR 检测的首选基因^[9]。但单独使用该基因检测尚存有争议，多数研究认为部分霍氏鲍特菌也携带此基因，而有学者认为产生这种非特异性扩增的可能性很小，可以忽略不计^[10]。虽然百日咳毒素存在于百日咳鲍特菌、副百日咳鲍特菌及支气管炎鲍特菌中，但其 *ptxA-Pr* 对于百日咳鲍特菌的检测具有特异性^[11]。目前多数研究者根据不同目的基因组合采用二分层计算法检测百日咳鲍特菌，即采用 IS481 基因加其他针对霍氏鲍特菌的 PCR 方法，IS481 基因加 *ptxA-Pr* 的 PCR 方法。而后者常会因为 *ptxA-Pr* 基因扩增阳性而不能确认为百日咳鲍特菌。本研究发现 88 例 IS481 PCR 阳性标本中，56 例 (63.6%) *ptxA-Pr* PCR 阴性，该结果低于其他报道^[12,13]。而在这 88 例中均检测到霍氏鲍特菌，提示出现 *ptxA-Pr* 与 IS481 PCR 结果不符的原因主要是患儿病原菌核酸含量较低，未达到普通 *ptxA-Pr* PCR 检测方法限值。考虑到二分层计算法的成本高及检测费时，及在临

床诊断中存在一定缺陷，本研究认为应用于百日咳临床诊断的 PCR 方法可仅考虑 IS481 基因。当然由于本研究样本较少且人群可能存在偏倚，尚需更多研究予以证实。

本研究对 100 例 <1 岁儿童百日咳实验室确证病例的统计分析发现，IS481 PCR 阳性组的发病天数明显小于阴性组，而 PT-IgG 阳性组的发病天数明显大于阴性组。因此，建议针对疑似百日咳病例在发病早期 (尤其是发病约 2 周) 宜采用核酸检测方法确定，若发病天数超过 3 周，建议采用 IgG 检测方法，从而提高病例的诊断率。本研究结果与国外学者认为单份血抗 PT-IgG 的最佳检测时间为 2~8 周基本一致^[14]。

由于我国目前尚无标准的百日咳 PCR 及抗体实验室诊断方法，因此不同实验室间的结果可能存在差异，本研究为 PCR 及 PT-IgG 方法应用于百日咳诊断提供了基本的使用范围，为进一步制定统一标准及结果的解释提供了科学数据分析。

参考文献

- [1] Celentano LP, Massari M, Paramatti D, et al. Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr Infect Dis J*, 2005, 24(9):761-765.
- [2] Zouari A, Smaoui H, Njamkepo E, et al. The re-emergence of pertussis in Tunisia. *Med Mal Infect*, 2011, 41(2):97-101.
- [3] Grgic-Vitek M, Klavs I, Kraigher A. Re-emergence of pertussis in Slovenia: time to change immunization policy. *Vaccine*, 2008, 26(15):1874-1878.
- [4] Dragsted DM, Dohn B, Madsen J, et al. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *J Med Microbiol*, 2004, 53(Pt 8):749-754.
- [5] Tatti KM, Sparks KN, Boney KO, et al. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella species* in clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(12):405940-405966.
- [6] Guiso N, Berbers G, Fry NK, et al. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011, 30(3):307-312.
- [7] Wang CQ, Zhu QR. Seroprevalence of *Bordetella pertussis* antibody in children and adolescents in China. *Pediatr Infect Dis J*, 2011, 30(7):593-596.
- [8] Zhang Y, Huang HT, Liu Y, et al. Incidence surveillance of pertussis based on community and analysis of its transmitted features in Tianjin. *Chin J Vacc Immun*, 2011(6):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. *中国疫苗和免疫*, 2011(6):209-211.
- [9] Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(2):326-382.
- [10] Loeffelholz M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(7):2186-2190.
- [11] Riffelmann M, Wirsing von Konig CH, Caro V, et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(10):4925-4929.
- [12] Ma ZY, Wang HP, Chen XW, et al. Duplex PCR assay for detecting specific gene sequence from pertussis bacillus. *J Chin Pract Diag Ther*, 2011, 25(2):121-123. (in Chinese) 马卓娅, 王和平, 陈晓文, 等. 双重 PCR 快速检测百日咳杆菌. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2011, 25(2):121-123.
- [13] Wang HP, Zheng YJ, Chen XW, et al. Application study of PCR in the diagnose of pertussis infection. *J Mod Lab Med*, 2010, 25(1):37-40. (in Chinese) 王和平, 郑跃杰, 陈小文, 等. 聚合酶链反应检测技术在百日咳诊断中的应用研究. *现代检验医学杂志*, 2010, 25(1):37-40.
- [14] May ML, Doi SA, King D, et al. Prospective evaluation of an Australian pertussis toxin IgG and IgA enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19(2):190-197.

(收稿日期:2013-05-29)

(本文编辑:张林东)