

# 开封市 14 岁以下百日咳疑似患者 抗体分布情况及诊断方法研究

陆寒, 董聪聪, 李艳玲

开封市疾病预防控制中心, 河南 开封 475004

**摘要:** **目的** 了解开封市 14 岁以下百日咳 (pertussis, PT) 疑似患者抗体分布情况, 探讨百日咳疑似患者实验室诊断方法。 **方法** 收集开封市哨点医院 2014–2016 年 186 例 14 岁以下百日咳疑似患者静脉血, 采用酶链免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay ELISA) 对抗 PT-IgG 进行检测; 采集鼻咽拭子采用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction Q-PCR) 对 CT 值进行检测。分析抗体分布情况和两种检测方法在百日咳诊断中的差异。 **结果** 186 例百日咳疑似患者中, 百日咳抗体阳性率 30.11%, 抗体浓度  $\geq 80$  U/ml 占比 11.83% (22/186)。ELISA 法确诊百日咳患者 26 例, Q-PCR 法确诊 33 例。男 (25.44%)、女 (34.72%) 阳性率差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 1.8459, P = 0.174$ )。年龄分布中, 7~14 岁年龄组阳性率最高, 为 45.45%; 职业分布中学生抗体浓度  $\geq 80$  U/ml 占阳性比率 (81.82%) 最高, 与托幼儿童、散居儿童差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 10.708, P = 0.004$ ); 186 名疑似患者中有免疫史 150 名, 其中免疫史 3 剂次疑似患者阳性率最高, 阳性率为 47.17%, 免疫史各组间阳性率差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 17.366, P = 0.002$ ); 采样时间对抗体的影响研究显示随着病程的延长, 抗体确诊率逐渐升高 ( $\chi^2_{趋势} = 4.303, P = 0.038$ ), Q-PCR 确诊率有下降趋势 ( $\chi^2_{趋势} = 13.107, P < 0.001$ )。 **结论** 7~14 岁学生是百日咳防控重点人群; 对不同病程的百日咳疑似患者的诊断可采用血清学和 Q-PCR 两种方法相辅进行, 以免漏诊。

**关键词:** 百日咳; 抗体; 分布; 诊断

**中图分类号:** R516.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)10-1231-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.10.020

百日咳 (pertussis, PT) 是由百日咳鲍特菌引起的一种急性呼吸道疾病, 传染性较强, 人群普遍易感, 据报道<sup>[1]</sup>, 我国 2011–2012 年百日咳报告发病率为 0.34/10 万, 2 岁以下的婴幼儿为高发群体, 但值得注意的是, 近年来成人和青少年的发病率有所增加<sup>[2]</sup>。美国等国研究发现高发人群已向青少年转移<sup>[3]</sup>, 我国天津等地高发人群也发生同样转移<sup>[4]</sup>。目前临床上诊断百日咳多以临床表现为主<sup>[5]</sup>, 但对于临床表现不典型的病例, 通过血清学等方法可以为诊断提供依据。本研究对开封市 186 例 14 岁以下百日咳疑似患者的抗体分布情况进行分析, 探讨不同病程百日咳诊断方法, 以期对百日咳后期诊断和治疗提供理论指导。

## 1 材料与方法

**1.1 材料来源** 开封市哨点医院采集 2014–2016 年百日咳疑似患者静脉血及鼻咽拭子各 186 份。百日咳疑似患者按照我国现行百日咳诊断标准 (WS 274–2007), 典型患者为阵发性、痉挛性咳嗽, 持续 2 周以

**基金项目:** 开封市科技发展计划项目 (1503059)

**作者简介:** 陆寒, 硕士, 副主任技师, 主要从事微生物检验及免疫规划管理工作。

上; 非典型患者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<sup>[6]</sup>。

**1.2 设备及试剂盒** 百日咳杆菌毒素 (PT)-IgG 抗体测定试剂盒 (酶联免疫法) 购自郑州亿特生物技术有限公司, PCR 检测试剂购自中山大学达安基因股份有限公司, 均在有效期内使用。通用细菌采样管购自友康恒业生物科技。酶标仪 (Elx808 Biotek), 恒温箱 (Thermo), 离心机 (Zonkia KDC-40), ABI-7500-Fast PCR 仪, 微量加样器 (Eppendorf)

**1.3 样品采集与处理** 每个疑似患者采集静脉血 3~5 ml, 1 500 rpm, 20 min 离心后 4 ℃ 放置分离血清; 鼻咽拭子 4 ℃ 保存后一并送开封市疾病预防控制中心。

### 1.4 检测方法

**1.4.1 ELISA 法检测抗 PT-IgG 抗体** ELISA 法每板设空白对照 1 孔, 标准品孔 12 孔 (0、10、20、40、80、160 IU/ml), 每个浓度及样品均重复 2 孔检测。样品用稀释液 1:100 稀释, 均按 100  $\mu$ L/孔加样。空白对照孔不加液。37 ℃ 温育 30 min, 洗板后加入 PT 酶标结合物, 100  $\mu$ L/孔, 底物空白对照不加液, 37 ℃ 温育 30 min, 加入显色剂 A 50  $\mu$ L/孔, 加完后再加入显色剂 B, 50  $\mu$ L/孔, 37 ℃ 温育 10 min 加入终止液 50  $\mu$ L/孔,

空白孔调零,450 nm 波长测各孔吸光度(OD 值)。结果判定:PT-IgG 抗体浓度含量 $\geq 20$  IU/ml 判定为阳性,浓度 $\geq 80$  IU/ml 说明可能为急性或近期感染。

1.4.2 PCR 检测百日咳鼻咽拭子 鼻咽拭子液中加入 0.9%NaCl 溶液 2 ml,混匀后取 1.5 ml 放入 Eppendorf 管,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀加入 50  $\mu$ l DNA 提取液充分混匀后 100  $^{\circ}$ C 放置 10 min,4  $^{\circ}$ C 冰浴 1 min,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清放入 Eppendorf 管备用。

PCR 反应液 A 17  $\mu$ l,反应液 B 3  $\mu$ l,样品 5  $\mu$ l(阳性对照、阴性对照均为 5  $\mu$ l),共 25  $\mu$ l。扩增条件:50  $^{\circ}$ C 2 min,1 个循环;95  $^{\circ}$ C 15 min,1 个循环;94  $^{\circ}$ C 15 s,55  $^{\circ}$ C 45 s,40 个循环。每个样本重复 3 管检测。结果判定:CT 值 $<26$  为阳性,CT 值 26~30 为弱阳性, $>30$  为阴性。

1.5 统计方法 使用 Gen5(2.06.10)软件以四参数拟合方式(logistic 曲线拟合四参数),以标准品浓度值为 x 轴,以标准品 OD 值的对数(log)值为 y 轴建立标准曲线,根据待测样品的 OD 值计算相应的浓度值。使用 SPSS 16.0 统计软件统计,率的比较采用 $\chi^2$  检

验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 百日咳疑似患者抗体浓度分布及诊断情况 186 名百日咳疑似患者抗 PT-IgG 抗体阳性 56 例,阳性率 30.11%,抗体浓度 $\geq 80$  U/ml 有 22 例,占比为 11.83%。186 例百日咳疑似患者血清学确诊 26 例,确诊率 13.98%;Q-PCR 确诊 33 例,确诊率 17.74%。

2.2 不同性别百日咳疑似患者抗体分布情况 186 名疑似患者中,男性 114 名,女性 72 名,男女比例 1.58:1。抗 PT-IgG 阳性率分别为 25.44%,34.72%,阳性率差异无统计学意义( $\chi^2=1.845$ , $P=0.174$ )。

2.3 不同年龄百日咳疑似患者抗体分布情况 在不同年龄组抗体阳性率分布中 7~14 岁年龄组阳性率最高,为 45.45%,各组间阳性率差异无统计学意义( $\chi^2=7.325$ , $P=0.198$ ,抗体浓度 $\geq 80$  U/ml 占阳性比率中 1~组和 7~14 组最高,分别为 100%和 80%,各组间 $\geq 80$  U/ml 占阳性比率差异有统计学意义( $\chi^2=24.093$ , $P<0.001$ ),见表 1。

表 1 开封市百日咳疑似患者不同年龄抗 PT-IgG 抗体分布情况

年龄(岁)	疑似患者(人)	阳性数(人)	阳性率(%)	$\chi^2$ 值	$P$ 值	抗体浓度 $\geq 80$ U/ml 例数	抗体浓度 $\geq 80$ U/ml 占阳性比率(%)	$\chi^2$ 值	$P$ 值
<1	8	2	25.00	7.325	0.198	0	0.00	24.093	<0.001
1~	21	4	19.05			4	100.00		
2~	28	11	39.29			2	18.18		
3~	44	11	25.00			1	9.09		
4~	52	13	25.00			3	23.08		
7~14	33	15	45.45			12	80.00		

表 2 开封市百日咳疑似患者不同职业抗体分布情况

职业	疑似患者(人)	阳性数(人)	阳性率(%)	浓度 $\geq 80$ U/ml(人)	浓度 $\geq 80$ U/ml 占阳性比率(%)	$\chi^2$ 值	$P$ 值
托幼儿童	33	10	30.30	4	40.00	10.708	0.004
散居儿童	125	35	28.00	9	25.71		
学生	28	11	39.29	9	81.82		

2.4 不同职业百日咳疑似患者抗体分布情况 14 岁以下百日咳疑似患者职业分布为托幼机构、散居儿童和学生,三者构成比为 1.18:4.46:1,三者百日咳抗体阳性率没有差异,抗体浓度 $\geq 80$  U/ml 占阳性比率中

学生最高,为 81.82%,各组间 $\geq 80$  U/ml 阳性占比率间差异有统计学意义( $\chi^2=10.708$ , $P=0.004$ ),见表 2。

2.5 不同免疫史百日咳疑似患者抗体分布情况 在调查的 186 名 14 岁以下百日咳疑似患者中,有免疫史记录的有 150 名,免疫史不同的各组阳性率差异有统计学意义( $\chi^2=17.366$ , $P=0.002$ )(见表 3)。其中免疫史 3 次疑似患者阳性率最高,阳性率为 47.17%,其次为免疫史 $\geq 4$  次,阳性率为 41.18%。抗体浓度 $\geq 80$  U/ml 占阳性比率各组间差异有统计学意义( $\chi^2=9.124$ , $P=0.039$ )。

表 3 开封市百日咳疑似患者不同免疫史抗体分布情况

免疫史	疑似患者(人)	阳性数(人)	阳性率(%)	$\chi^2$ 值	$P$ 值	抗体浓度 $\geq 80$ U/ml 例数	抗体浓度 $\geq 80$ U/ml 占阳性比率(%)	$\chi^2$ 值	$P$ 值
未种	22	4	18.18	17.366	0.002	4	100.00	9.124	0.039
1~2 次	63	10	15.87			5	50.00		
3 次	53	25	47.17			7	28.00		
$\geq 4$ 次	34	14	41.18			6	42.86		
不详	14	3	21.43			0	0.00		

2.6 不同采样时间百日咳疑似患者抗体情况 考虑到疑似患者就诊时间不同,致使采样在不同病程进行。

对疑似患者同时采集静脉血和鼻咽拭子,分别进行 ELISA 和 Q-PCR 检测,并结合临床表现和流行病学调

查进行诊断。ELISA 检测抗 PT-IgG 抗体阳性率为 30.11%, 确诊率 13.98%, Q-PCR 确诊率为 17.74%, 两者确诊率差异无统计学意义( $\chi^2=0.987, P=0.32$ )。采样间隔时间 $<7$  d 抗体阳性率为 0, 结合临床表现血清学确诊 1 例百日咳患者, Q-PCR 确诊 4 例, 随着采样间隔时间的延长, 抗体确诊率逐渐升高( $\chi^2_{趋势}=4.303, P=0.038$ ), Q-PCR 确诊率有下降趋势( $\chi^2_{趋势}=13.107, P<0.001$ ), 见表 4。

表 4 不同采样间隔时间对百日咳疑似患者抗体影响

间隔时间 (d)	疑似患者数 (人)	阳性数 (人)	确诊数 (人)	确诊率 (%)	Q-PCR 确诊数(人)	确诊率 (%)
$<7$	8	0	1	12.50	4	50.00
8~14	33	6	2	6.06	12	36.36
15~21	63	16	5	7.94	10	15.87
22~28	17	6	6	35.29	2	11.76
29~35	32	13	5	15.63	2	6.25
$>35$	33	15	7	21.21	3	9.09

### 3 讨论

百日咳作为一种急性呼吸道传染病, 在婴儿中多见, 但有研究显示, 在较大儿童或成人中多存在无症状的百日咳感染, 成为儿童感染百日咳的重要来源<sup>[7]</sup>。河南省健康人群百日咳抗体阳性率为 40.59%<sup>[8]</sup>, 14 岁以下疑似患者阳性率为 30.11%, 1~组阳性率最低, 7~14 组阳性率最高, 为 45.45%, 这与抗体水平随年龄增长而降低的逻辑相反,  $<1$  组儿童由于有母传抗体, 阳性率要高于 1~组, 此外有研究表明免疫后 10 年左右的青少年和成人有百日咳暴发和流行的可能<sup>[9-10]</sup>, 这可能与没有产生免疫或早期免疫抗体水平已下降至保护水平以下自然感染几率增高有关。按照说明书抗体浓度 $\geq 80$  U/ml 提示近期感染, 本次研究显示 1~组和 7~14 组 $\geq 80$  U/ml 占阳性比率较高, 可能与 1~组因抗体阳性率低, 7~14 组自然感染几率高有关。从职业分布来看, 学生因接触病菌自然感染几率高, 又因接种疫苗产生的抗体会在 3~5 年内下降至较低水平<sup>[11-13]</sup>, 或百日咳疫苗产生抗体保护率低<sup>[14]</sup>, 起不到保护作用, 故学生 $\geq 80$  U/ml 占阳性比率高于其他职业( $\chi^2=10.708, P=0.004$ )。目前儿童在 6 岁接种一剂次白破疫苗, 没有含百日咳成份, 而本研究显示 7~14 组儿童发病率高, 是否应考虑在 6 岁为儿童接种一剂次含百日咳成份疫苗提前预防百日咳。

20 世纪 80 年代 PCR 应用于百日咳检测, 可以快速检测百日咳, 灵敏度高, 特异性强, 检出率高<sup>[15-18]</sup>。PCR 使用鼻咽拭子进行检测, 相对于静脉血采集, 鼻咽拭子采集痛苦小, 患者尤其是小年龄儿童更易于配合, 因此样本采集率更高。且本次使用的 Q-PCR 无

需电泳, 结果更加精确、便捷, 有很好的应用前景<sup>[19]</sup>。但由于 PCR 检测相对要求条件较高, 在一些基层不易推广<sup>[20]</sup>, 且对于就诊较晚的病人, 已失去的 PCR 诊断的最佳时期。对于血清学诊断在感染百日咳后, 通常在痊愈期的第 2 周时会产生 IgM 和 IgG 抗体, IgM 抗体会持续 2~3 个月, IgG 抗体则在 6~8 周后达到峰值浓度<sup>[21]</sup>, 因此在早期抗体检测多为阴性, 在本研究中, 病程未超过 1 周的患者是通过临床表现和流行病学调查进行确诊的, 因此对于临床症状不明显的患者通过血清学诊断很容易造成漏诊。此次研究显示随着采样间隔时间延长, 血清抗体阳性率和确诊率均逐渐提高, 而 Q-PCR 检测在疾病初期有很高的确诊率, 随着病程进展, 发病超过 4 周就诊的患者其 Q-PCR 诊断率明显下降, 仅为 6.25%, 与血清学诊断有明显的差异, 这和以往研究相同<sup>[22]</sup>。因此, 在百日咳诊断过程中, 两种检测方法可以互相辅助, 在病程早期就诊的患者可以通过临床表现和 PCR 综合诊断, 对于中、晚期的患者可采用血清学和临床表现等手段综合诊断, 减少或避免漏诊。

### 参考文献

- [1] 宁桂军, 高源, 吴丹, 等. 中国 2011-2017 年百日咳流行病学特征分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2018, 24(3): 264-267, 273.
- [2] 钱晓华, 汤素文, 张莉, 等. 上海市虹口区中小学生和成人百日咳抗体水平疑似[J]. 上海预防医学, 2017, 29(7): 533-537.
- [3] Bettinger J, Halperin S, De Serres G, et al. The effect of changing from wholecell to acellular pertussis vaccine on the epidemiology of hospitalised children with pertussis in Canada[J]. Pediatr Infect Dis, 2007, 26(1): 31-35.
- [4] 高志刚, 黄海涛, 刘勇, 等. 天津市百日咳发病反弹及流行病学特征改变的影响因素分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2011, 17(3): 212-215.
- [5] 刘小乖, 李亚绒, 王增国, 等. 百日咳抗体及核酸检测技术在百日咳诊断中的作用[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(15): 3553-3556.
- [6] 王增国, 杨杨, 刘莹, 等. 百日咳实验室诊断方法的应用分析与比较[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(10): 1010-1012.
- [7] Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. 疫苗学[M]. 梁晓峰, 罗凤基, 封多佳, 译. 第 5 版. 人民卫生出版社, 2011: 511-559.
- [8] 刘倩, 丰达星, 赵升, 等. 河南省健康人群百日咳、白喉、破伤风抗体水平分析[J]. 当代医学, 2013, 19(31): 160-161.
- [9] 张德著, 刘淳婷, 蒋凤, 等. 贵州省两个地区 2006-2016 年百日咳流行特征和人群抗体水平[J]. 中国疫苗和免疫, 2018, 24(4): 383-386.
- [10] 侯启明, 梁雅文, 张路民, 等. 百日咳疫苗免疫后的抗体检测方法[J]. 中国计划免疫, 2001, 7(3): 165-167.
- [11] 柳艳萍, 齐秀英. 百日咳和白喉胎传抗体疑似分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015(23): 4126-4127, 4130.
- [12] 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.
- [13] 王涛, 王海红, 易文娟, 等. 2017 年北京市昌平区健康人群百日咳、白喉、破伤风抗体水平监测[J]. 实用预防医学, 2019, 26(5): 593-596.
- [14] 喻同琦, 占建波, 徐胜平, 等. 2011 年湖北省麻城市健康人群百日咳、白喉、破伤风抗体水平调查[J]. 实用预防医学, 2012, 19(11):