

银川地区持续性咳嗽儿童百日咳博德特菌感染临床调查

陈彦香¹ 王传清² 李乐¹ 赵忠¹ 黄列¹ 孙云¹

1. 宁夏医科大学第二附属医院 银川市第一人民医院儿科 (宁夏银川 750001);

2. 复旦大学附属儿科医院感染管理科 (上海 201102)

摘要: 目的 了解银川地区持续性咳嗽儿童百日咳博德特菌感染现状及感染患儿的临床特点。方法 随机选取银川地区 2岁健康儿童292例为正常对照组,选择同期年龄 6岁持续性咳嗽儿童157例作为可疑百日咳组,应用ELISA法测定两组儿童血清特异性百日咳博德特菌毒素IgG抗体 (PT IgG),可疑百日咳组患儿留取鼻咽拭子进行百日咳博德特菌多重PCR检测及分离培养。结果 在可疑百日咳患儿中百日咳博德特菌感染率为2.6% (4/157),其中6~8岁组为1.6% (1/63),~10岁组2.8% (1/36),~12岁组2.5% (1/34),~14岁组4.2% (1/24),各组间差异有统计学意义 ($\chi^2=363.7, P<0.05$)。正常对照组儿童血清PT IgG平均几何浓度 (GMC) 为1.3 FDA-U/ml,其中2~4岁组为2.5 FDA-U/ml,高于其他年龄组 ($H=25.6, P<0.01$),~14岁正常对照组儿童中PT IgG>30 FDA-U/ml者占12.5%,和其他年龄组相比差异无统计学意义 ($\chi^2=6.66, P>0.05$)。结论 百日咳博德特菌感染仍是银川地区持续性咳嗽儿童病因之一。由于本地区健康儿童中百日咳保护性抗体水平较低,有必要增加百日咳疫苗预防接种。

[*临床儿科杂志*,2012,30(9):862-865]

关键词: 百日咳博德特菌; 咳嗽; 聚合酶链反应; 儿童

中图分类号: R725 文献标志码: A 文章编号: 1000-3606(2012)09-0862-04

Clinical investigation of *Bordetella pertussis* infection in children with persistent cough in Yinchuan CHEN Yanxiang¹, WANG Chuanqing², LI Le¹, ZHAO Zong¹, HUANG Lie¹, SUN Yun¹ (1. The First People's Hospital of Yinchuan, Yinchuan 750001, Ningxia, China; 2. Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China)

Abstract: **Objective** To understand current situation of *Bordetella pertussis* infection in children with persistent cough and analyze its clinical characteristics. **Methods** A total of 292 healthy children (2 years old) were randomly selected from Yinchuan area as the healthy group, and 157 children (6 years old) with persistent cough suspected of *Bordetella pertussis* infection were assigned to patient group. Specific toxin antibody of *Bordetella pertussis* (PTIgG) was detected by ELISA. Nasopharyngeal swabs specimens from all subjects of patient group were examined by multiplex PCR and bacterial culture. **Results** The *Bordetella pertussis* infection rate was 2.6% (4/157) in patient group, 1.6% (1/63) in 6 - 8 years old, 2.8% (1/36) in 8 - 10 years old, 2.5% (1/34) in 10 - 12 years old and 4.2% (1/24) in 12 - 14 years old. There was a significant difference between each ages. In healthy group, PT IgG level was 1.3 FDA-U/ml. The PT IgG level was 2.5 FDA-U/ml in 2 - 4 years old, significantly higher than other ages ($H=25.6, P<0.01$). In 12 - 14 years old, the percentage of the children whose PT IgG level over 30 FDA-U/ml was 12.5%. There were no significant differences among deifferent ages ($\chi^2=6.66, P>0.05$). **Conclusions** *Bordetella pertussis* infection is still one of the causes of children's persistent cough in Yinchuan area. It is necessary to encourage the pertussis vaccination because of low levels of protective serum antibody in healthy children.

(*J Clin Pediatr*,2012,30(9):862-865)

Key words: *Bordetella pertussis*; cough; polymerase chain reaction; child

百日咳是由百日咳博德特菌感染所引起的一种儿童常见呼吸道传染病,以阵发性痉挛性咳嗽、伴有鸡鸣样吸气声为主要特征。典型的百日咳主要发生在未免疫儿童的初期感染,25%~30%的感染儿童

可表现轻度或非典型临床特征,因此常被误诊而成为传染源。本研究对银川地区157例持续性咳嗽儿童进行百日咳博德特菌感染调查,旨在了解银川地区儿童百日咳博德特菌感染现状及临床特点。

通信作者:陈彦香 电子信箱:yanxiangchen@hotmail.com

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取2008年11月1日至2009年10月31日持续性咳嗽儿童作为可疑百日咳患儿组，并随机选取同期银川地区无呼吸道及其他组织脏器感染的健康儿童作为正常对照组。可疑百日咳组入组标准：以咳嗽为主要症状，持续时间超过2周，排除过敏性疾病和支原体感染患儿，常规治疗无效。共入选157例，其中男100例，女57例；年龄6~8岁63例，~10岁36例，~12岁34例，~14岁24例。正常对照组292例中，2~4岁49例，~6岁47例，~8岁52例，~10岁48例，~12岁48例，~14岁48例。

百日咳感染诊断标准：临床疑似百日咳感染；实验室分离到百日咳博德特菌或聚合酶链反应(PCR)阳性(WHO, 2006)；单份血清百日咳博德特菌特异毒素IgG (PTIgG) 30 FDA-U/ml判断抗体阳性。PT IgG>80 FDA-U/ml，诊断为百日咳博德特菌现症感染^[1]，凡符合疑似百日咳感染和血清学抗体阳性或分离到百日咳博德特菌或PCR阳性，诊断百日咳感染。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集 收集受试者临床资料，包括性别、年龄、疫苗接种史、既往史、治疗(抗生素应用)史。

1.2.2 鼻咽拭子标本采集 所有患儿均采集鼻咽拭子标本，行百日咳博德特菌培养鉴定和百日咳博德特菌多重PCR检测。采集鼻咽拭子标本时固定患儿头部，用小而柔软的鼻咽尼龙拭子(COPAN, 美国产)向下鼻腔面推进至鼻咽部后，在轻轻旋转拭子几秒后抽出，左右鼻孔各1次，采取的两份鼻咽拭子标本(A、B拭子)尽快送入实验室。A拭子标本2h内进行百日咳博德特菌分离培养；B拭子标本放入另一无菌干燥试管中，-20 保存，并集中于冷冻环境下送复旦大学儿科医院进行百日咳博德特菌PCR检测。

1.2.3 百日咳博德特菌培养鉴定 百日咳博德特菌分离培养采用木炭-马血或脱纤维羊血(CHB,

OXIOID) 琼脂培养基。百日咳博德特菌鉴定采用特异性诊断血清(Remel Europe Ltd.)及API生化鉴定系统(Biomerieux)。百日咳博德特菌标准菌株ATCC15311，副百日咳博德特菌标准菌株ATCC9797购自美国CDC。

1.2.4 百日咳博德特菌多重PCR检测 鼻咽尼龙拭子细菌总DNA提取采用商品化试剂盒(北京博迈德科技发展有限公司)。多重PCR检测包括筛选PCR及确诊试验PCR，筛选PCR阳性的标本需用原始标本再进行一次确证PCR检测，2次PCR检测均阳性标本判断为PCR检测阳性。引物序列(上海生物工程有限公司合成)见表1^[2-4]。PCR检测仪采用S1000(Bio-Rad)。

1.2.5 血清百日咳PT IgG检测 抽取所有研究对象外周血3~4 ml，分离血清于-20 保存，并集中于冷冻环境下送复旦大学儿科医院进行PT IgG检测。PT IgG检测试验采用商品化ELISA试剂盒(Virion serion)，酶标仪及洗板机采用测定仪(Thermo Multiskan MK3)。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.1软件进行统计分析，计数资料以百分比或率表示，组间比较采用卡方检验。组间抗体浓度分布采用多个样本Kruskal-Wallis秩和检验，以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 可疑百日咳患儿百日咳博德特菌感染率

入组的157例可疑百日咳患儿中有4例百日咳博德特菌实验室检测阳性，总感染率2.6%(4/157)，4例患儿血清PTIgG抗体阳性，其中2例同时PCR检测阳性，鼻咽拭子百日咳博德特菌分离培养均阴性。各年龄组可疑百日咳患儿博德特菌感染率差异有统计学意义($\chi^2=363.7, P<0.001$)。见表2。

2.2 可疑百日咳患儿抗生素使用情况

157例可疑百日咳患儿中有109例在进行百日咳博德特菌分离培养之前已使用抗生素治疗，总使用率69.43%(109/157)，各年龄组可疑百日咳患儿抗生素使用率的差异无统计学意义($\chi^2=4.378, P=0.223$)。见表2。

表1 PCR检测引物

引物名称	引物序列	PCR产物(bp)
筛选PCR检测引物	BP1 (5'-GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT-3') BP2 (5'-AATTGCTGGACCATTTTCGAGTCGACG-3')	145
确证PCR检测引物	BPTOX F(5'-CCAACGCGCATGCGTGCAGATTCGTC-3') BPTOX R (5'-CCCTCTGCGTTTTGATGGTGCCCTATTITA-3')	191

2.3 正常对照儿童血清PT IgG水平检测情况

正常对照儿童血清PT IgG平均几何浓度(GMC)为1.3 FDA-U/ml, 其中2~4岁组为2.5 FDA-U/ml, 高于其他年龄组, 差异有统计学意义 ($H=25.6$, $P<0.01$), ~12岁为0.5 FDA-U/ml, 最低。在~14岁正常对照儿童中, PT IgG>30 FDA-U/ml占12.5%, 但和其他年龄组相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表3。

2.4 两组特异性抗体阳性率比较

可疑百日咳患儿和正常对照儿童百日咳特异性抗体阳性率分别为2.55% (4/157) 和6.50% (19/292), 两组差异无统计学意义 ($\chi^2=3.293$, $P>0.05$)。

2.5 百日咳博德特菌感染患儿的临床特征

4例感染患儿的年龄分别为6、10、11、13岁, 血清中PT IgG几何平均浓度为107.85 FDA-U/ml。平均咳嗽时间为3周。2例间断性干咳, 2例夜间咳嗽为主, 其中1例为持续性咳嗽且痰多, 但均无咳嗽后典型的鸡鸣样吼声; 2例伴有咳后呕吐, 其中1例伴发热, 2例咳嗽症状较轻, 无伴随症状。2例有肺部体征及胸片表现。1例表现为上呼吸道感染症状。4例患儿在诊断前有3例未使用抗生素, 1例(11岁)口服阿奇霉素5 d。

3 讨论

本研究中入组的157例持续性咳嗽儿童中百日咳博德特菌感染率为2.6% (4/157), 且随着年龄的增

加, 感染率逐渐增加。但患儿百日咳博德特菌分离培养结果均为阴性, 这可能与入选的标准有关, 即咳嗽持续时间超过2周, 在进行百日咳博德特菌分离培养之前, 抗生素使用率已达69.43%, 使培养的阳性率明显下降。有报道, 抗生素使用超过3~5 d, 细菌培养的阳性率下降31.8%~33.5%^[5]。由于目前在百日咳的实验室诊断方法中, 并无金标准^[6], 缺乏诊断百日咳感染的敏感实验室指标, 部分长期咳嗽的患儿不能完全排除百日咳杆菌感染, 造成诊治延误或增加传染机会。在诊断百日咳感染时, 百日咳博德特菌分离培养虽然采样方便, 但培养的阳性率很低, 尤其是对已经使用抗生素治疗的患儿。

本研究中正常对照儿童血清PT IgG的GMC为1.3 FDA-U/ml, 其中2~4岁组为2.5 FDA-U/ml, 与文献报道基本一致^[1,7]。说明婴幼儿接种3剂的DPT疫苗基础免疫之后产生IgG抗体提供针对百日咳的保护作用。~12岁为0.5 FDA-U/ml (最低), 提示保护性抗体已处于较低水平。有报道, 在第4剂DPT疫苗的加强免疫后抗体水平明显增高达到高峰, 但随着年龄的增长, IgG抗体水平逐渐降低^[8], 对百日咳的保护作用减弱, 从而增加了较大年龄儿童感染百日咳杆菌的机会。本研究中, ~14岁正常对照儿童中PT IgG>30 FDA-U/ml占12.5%, 相对高于其他年龄组, 存在较多的隐性感染, 这部分隐性感染儿童可能会成为百日咳感染的传染源, 并容易被人们忽视。有调查发现, 在18岁无明显咳嗽疾患、持续咳嗽7 d的

表2 可疑百日咳患儿各年龄组百日咳博德特菌感染率

年龄(岁)	入组例数	接种例数	抗生素使用例数	感染数 [n(%)]
6~8	63	58 (92.07)	39 (61.90)	1 (1.6)
~10	36	35 (97.22)	25 (69.45)	1 (2.8)
~12	34	34 (100.00)	28 (82.35)	1 (2.9)
~14	24	24 (100.00)	17 (70.83)	1 (4.2)
总计	157	151 (96.18)	109 (69.43)	4 (2.6)

表3 正常对照儿童血清PTIgG水平

年龄(岁)	入组例数	接种人数	GMC (95%CI)(FDA-U/ml)	阳性人数 [n(%)]
2~4	49	46 (93.9)	2.5 (0.5~41.8)	4 (8.2)
~6	47	39 (83.0)	1.1 (0.4~33.0)	3 (6.4)
~8	52	47 (90.4)	1.4 (0.1~24.2)	1 (1.9)
~10	48	40 (83.3)	1.0 (0.2~31.9)	4 (8.3)
~12	48	43 (89.6)	0.5 (0.1~10.1)	1 (2.1)
~14	48	46 (95.8)	1.8 (0.1~105.9)	6 (12.5)
总计	292	261 (89.4)	1.3 (0.1~39.3)	19 (6.5)
统计量			$H=25.6$	$\chi^2=6.66$
P			<0.01	>0.05

成年人中,符合百日咳诊断标准,即持续咳嗽同时血清学或PCR阳性的感染者高达32%^[9]。本研究结果也显示,可疑百日咳患儿和正常对照儿童百日咳特异性抗体阳性率无统计学差异,说明百日咳感染症状不典型,部分儿童是百日咳的隐形感染者。所以应考虑在年长儿中进行百日咳疫苗的加强免疫,以提高对百日咳杆菌感染的免疫力。

本研究的4例感染患儿中,3例 10岁;正常对照儿童中PT IgG阳性也在~14岁年龄组中最高,说明百日咳最主要的传染源来自于年长儿^[10]。由于其临床表现多样、不典型甚至无症状,可能在家庭或其他区域造成感染的传播扩散,从而成为未接种或未完全接种疫苗的婴幼儿百日咳感染的主要传染源。本研究确诊的患儿中,其症状具有高度不典型性,除了咳嗽时间较长和阵发性咳嗽外,并无痉挛性咳嗽和咳嗽后典型的鸡鸣样吼声,和国内文献报道一致^[11]。

在临床诊治中,一般对于长期咳嗽的患者尤其是较大年龄的儿童只给予抗生素和止咳药对症治疗,很少进行百日咳博德特菌感染的实验室检查,可能造成大量临床感染病例的漏诊。所以,提高百日咳的检测技术和加强疫苗诱导的保护性作用非常重要。

参考文献:

- [1] De Melker HE, Versteegh FG, Conyn-van Spaendonck MA, et al. Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis* [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 800-806.
- [2] Qin X, Turgeon DK, Ingersoll BP, et al. *Bordetella pertussis* PCR: simultaneous targeting of signature sequences [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2002, 434(4): 269-275.
- [3] Glare EM, Paton JC, Premier RR, et al. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(9): 1982-1987.
- [4] Birkebaek NH, Heron I, Skjødt K. *Bordetella pertussis* diagnosed by polymerase chain reaction [J]. APMIS, 1994, 102(4): 291-294.
- [5] 邱宗文,涂继伟,解晓珍.服用抗生素后对尿液细菌培养的影响及其对策 [J].重庆医学,2006,35(18):1660-1662.
- [6] Gustafsson L, Hessel L, Storsaeter J, et al. Long-term follow-up of Swedish children vaccinated with acellular pertussis vaccines at 3, 5, and 12 months of age indicates the need for a booster dose at 5 to 7 years of age [J]. Pediatrics, 2006, 118(3): 978-984.
- [7] 欧金玲,姚开虎,杨永弘.中国学者对百日咳的研究历史及现状 [J].临床儿科杂志,2007,25(7):607-609.
- [8] Vickers D, Ross AG, Mainar-Jaime RC, et al. Whole-cell and acellular pertussis vaccination programs and rates of pertussis among infants and young children [J]. CMAJ, 2006, 175(10): 1213-1217.
- [9] 杨晓明.百日咳疫苗现状和发展方向 [J].中国生物制品学杂志,2003,16(2):128.
- [10] 张卫平,黄玉蓉,罗琼.新疆地区小儿百日咳感染率、临床特点及分子流行病学特点 [J].实用儿科临床杂志,2008,23(11):1745-1749.
- [11] 王传清,朱启.百日咳与非百日咳迁延性慢性咳嗽儿童及青少年临床特征分析 [J].临床儿科杂志,2010,28(6):542-544.

(收稿日期:2012-01-08)