

儿童百日咳实验室检查研究进展

谢 君^{1*}, 周卫华², 刘权娥³, 龙茂林⁴

¹吉首大学医学院, 湖南 吉首

²湘西自治州人民医院产前诊断中心, 湖南 吉首

³湘西自治州人民医院小儿肾病风湿免疫内分泌呼吸专科, 湖南 吉首

⁴湘西自治州人民医院检验科, 湖南 吉首

收稿日期: 2024年7月27日; 录用日期: 2024年8月19日; 发布日期: 2024年8月29日

摘 要

百日咳是一种可预防的急性呼吸道疾病, 主要表现为阵发性痉咳、咳嗽末尾声和咳嗽伴呕吐。百日咳临床表现受诸多因素影响, 婴幼儿、青少年和成人可表现不典型, 这使百日咳难以识别, 易导致诊断和治疗延误, 采用实验室检查方法辅助诊断可提高百日咳诊断率, 本文就国内外百日咳实验室检查研究进展进行综述。

关键词

百日咳, 实验室检查

Research Progress on Laboratory Examination of Pertussis in Children

Jun Xie^{1*}, Weihua Zhou², Quan'e Liu³, Maolin Long⁴

¹School of Medicine, Jishou University, Jishou Hunan

²The Prenatal Diagnosis Center of the People's Hospital of Xiangxi Autonomous Prefecture, Jishou Hunan

³Pediatric Kidney Disease, Rheumatism, Endocrine and Respiratory Department, Xiangxi Autonomous Prefecture People's Hospital, Jishou Hunan

⁴The Clinical Laboratory Department of the People's Hospital of Xiangxi Autonomous Prefecture, Jishou Hunan

Received: Jul. 27th, 2024; accepted: Aug. 19th, 2024; published: Aug. 29th, 2024

Abstract

Pertussis (whooping cough) is a preventable acute respiratory disease, mainly manifested as par-

*通讯作者。

文章引用: 谢君, 周卫华, 刘权娥, 龙茂林. 儿童百日咳实验室检查研究进展[J]. 临床医学进展, 2024, 14(8): 1662-1667. DOI: 10.12677/acm.2024.1482403

oxysmal convulsive cough, cough ending and cough with vomiting. The clinical manifestations of pertussis are affected by many factors, and infants, adolescents and adults may show atypical manifestations, which makes it difficult to identify pertussis and easily leads to delayed diagnosis and treatment. The use of laboratory examination to assist diagnosis can improve the diagnosis rate of pertussis. This paper reviews the research progress in laboratory examination of pertussis at home and abroad.

Keywords

Pertussis (Whooping Cough), Laboratory Examination

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

百日咳(Pertussis)是一种急性呼吸道疾病,由百日咳鲍特菌(*Bordetella Pertussis*)感染所致,具有很高传染性,典型临床表现为阵发性痉咳、咳嗽末鸡鸣样吸气性回声和咳嗽伴呕吐。但需要注意的是,百日咳临床表现受多种因素影响,婴幼儿、青少年及成人可表现不典型,这种疾病特点容易导致百日咳诊治延误,病情加重,危及患儿身心健康,给家庭和社会带来负担,因此及时有效的诊断对百日咳诊治具有重要的指导意义。因此,本文综述了国内外百日咳实验室检查的进展,为实验室检查辅助百日咳诊断提供参考。

2. 百日咳的实验室检查方法

2.1. 外周血常规和涂片检查

外周血常规检查对百日咳诊断无特异性,但 75%未接种百日咳疫苗的儿童初次感染百日咳鲍特菌可表现为白细胞升高,分类以淋巴细胞为主[1]。有研究表明白细胞和淋巴细胞计数显著增高,可引起严重的、致死性的百日咳[2] [3]。Winter K 等[4]研究显示致死性百日咳病例(53)外周血白细胞和淋巴细胞计数峰值明显高于非死亡组(183),白细胞 $\geq 30 \times 10^9/L$ 病例数(98%)高于非死亡组(20%),故怀疑百日咳感染患儿应完善血常规检查。另有研究发现外周血涂片中存在裂隙淋巴细胞提示可能存在百日咳感染[5] [6]。陈奕颖等[7]对 80 例疑似百日咳的患儿分组比较发现,裂隙淋巴细胞阳性的 22 例患儿中有 21 例确诊百日咳感染,特异度为 95.45%,证明裂隙淋巴细胞的出现与百日咳感染有关。但伍金倩等[8]发现,裂隙淋巴细胞并非百日咳患者所特有,因此,裂隙淋巴细胞不能作为百日咳一项特异性指标。综上,外周血涂片出现裂隙淋巴细胞是否提示有百日咳感染仍存在争议,两者之间的关系有待进一步研究明确。

2.2. 降钙素原

国外有研究表明降钙素原(PCT)联合淋巴细胞计数可鉴别新生儿百日咳、细菌和病毒感染。细菌感染时 $PCT \geq 0.75 \text{ ng/ml}$ 。PCT $< 0.75 \text{ ng/ml}$ 且淋巴细胞计数 $\geq 10.4 \times 10^9/L$,考虑新生儿百日咳。PCT $< 0.75 \text{ ng/ml}$ 且淋巴细胞计 $< 10.4 \times 10^9/L$,考虑病毒感染[9]。国内彭晓康等人研究发现百日咳患儿伴 PCT 升高应考虑存在混合感染,PCT 升高越明显,混合细菌感染风险越高[10]。目前国内外关于降钙素原与百日咳的报道较少,尚需更多的研究明确两者之间的关系。

2.3. 细菌培养

细菌培养并分离百日咳鲍特菌特异性高,是实验室诊断百日咳的“金标准”,但其灵敏度低,且培养周期长,一般需 7~10 天[11],且可能受样本采集、运输、分离、培养及鉴定等多种因素的影响,检出率有差异[12]。但细菌培养可以分离百日咳鲍特菌菌株以及检测药物敏感性,对监测病原抗原变异及耐药性具有重要的意义。因此,百日咳鲍特菌培养不利于疑似患者的快速诊断,但可用于细菌分型和药敏分析。

2.4. 血清学方法

2.4.1. ELISA 法

目前,ELISA 法诊断百日咳在西方国家已被广泛使用。中国百日咳诊疗与预防指南中将“单份百日咳毒素(pertussis toxin, PT) IgG 抗体滴度大于说明书用于诊断急性感染的推荐阈值,恢复期血清 PT-IgG 水平比急性期 ≥ 4 倍用于回顾性诊断”[13]。但临床不同时间点双份血清血采集比较困难,因此单份血清操作性更强。ELISA 法诊断百日咳在基层医院普及率高,操作简单,检测时间短,但影响血清学诊断结果的因素较多,如年龄、胎传抗体、疫苗抗原的含量和疫苗接种史等。

2.4.2. IgM、IgA、IgG 抗体诊断

百日咳鲍特菌可以产生多种毒力因子,包括百日咳毒素(pertussis toxin, PT)、腺苷酸环化酶毒素(adenylate cyclase-haemolysin toxin, ACT)、丝状血凝素(filamentous haemagglutinin adhesin, FHA)、菌毛(fimbriae, FIM)和黏附素(pertactin, PRN)等[7],但 FHA、FIM、PRN 的特异性抗体可与支气管败血性鲍特菌、霍氏鲍特菌、副百日咳鲍特菌及非典型流感嗜血杆菌等一些抗原产生交叉反应,特异性低,而 PT 具有百日咳鲍特菌特异性。初次感染百日咳的患儿,经过一定潜伏期后体内会产生 IgM、IgA 和 IgG 抗体。有研究表明,IgG 抗体的敏感性和特异性高于其他类别的免疫球蛋白[14],因此,临床上通常检测 PT-IgG 抗体水平用于诊断。血清抗体诊断血液标本容易获取,操作简单快捷,便于基层开展,但抗体产生需要一定的潜伏期,因此,抗体检测存在一定时间限制,不适用百日咳的早期诊断。

2.5. 核酸检测

2.5.1. 传统 PCR 和多重 PCR

传统 PCR 用于从少量 DNA 样本中扩增特定的 DNA 序列,涉及三个温度依赖性步骤的一系列重复循环,即变性、退火和延伸,每次循环都会使目标 DNA 序列数量翻倍。但传统的 PCR 不能提供目标 DNA 数量的实时信息,不能进行精确的定量分析。多重 PCR 是在扩增体系中加入 2 对及以上的引物,可同时扩增出多个不同靶区域的核酸片段。但多引物的使用可能会降低检测的灵敏度[3]。

2.5.2. qRT-PCR

qRT-PCR 是在传统 PCR 的体系中加入荧光物质或荧光基因,通过观察荧光信号的变化来监测核酸扩增的过程。相比较传统 PCR,qRT-PCR 法具有更高的特异度和敏感度,且操作简单,检测迅速,可在几小时内出结果,是目前诊断百日咳感染的主要方法。有研究发现,qRT-PCR 法在 3~4 周内,敏感性能达到最高,能够达到 78%以上,特异性达 90%以上[15] [16]。因此,qRT-PCR 适用于百日咳疑似病例的早期诊断。但 qRT-PCR 法设备成本高,基层医院难以开展,并且,靶基因并非具有绝对特异性,结果也可能会出现假阳性。

2.5.3. 巢氏 PCR 和半巢氏 PCR

巢氏 PCR 是通过两对 PCR 引物扩增有限的目的基因,特异性强,灵敏度高。半巢氏 PCR 原理与巢

氏 PCR 相似,只是在第二轮 PCR 反应中只使用一条第一轮 PCR 的引物。在一些需要利用巢氏 PCR 进行扩增的实验中,如果基因的 3'端或者 5'端无法设计出两条引物,可以使用半巢氏 PCR。

2.5.4. 环介导等温扩增

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术是根据目的基因的保守序列设计出一组引物,可对核酸靶序列 109~1010 倍扩增[17]。多位研究者[18] [19]实践证明 LAMP 技术拥有便捷、快速、灵敏度高、特异性强,结果稳定可靠的特征。目前, LAMP 在呼吸道病毒感染诊断中已纳入临床常规检测项目[20]。据最新报道[21],一种新型 uvrD_2LAMP 检测方法对检测鼻咽拭子中的百日咳鲍特菌 DNA 具有高度敏感性和特异性,其诊断性能不亚于 PCR,但其更快捷、简单和便宜,因此 LAMP 可作为 PCR 替代品,广泛应用于基层医院。当然 LAMP 技术也存在一些缺点,如引物设计方案复杂,需要大量的时间和精力;引物间的错配可能带来假阳性[17]。

2.5.5. 高通量测序技术

高通量测序技术也称二代测序技术(NGS),通过对样本核酸进行检测,对比数据库获得序列信息,继而对样本所包含的病原体种类进行判断,理论上其能够分析一个样本的所有基因序列[22],病原检测范围广且迅速,并同时可以预测耐药基因组。高通量测序技术主要包括靶向二代测序(targeted next-generation sequencing, tNGS)、宏基因组学二代测序(metagenomics next-generation sequencing, mNGS)和全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)。

tNGS 是使用特异性探针或引物捕获特定 DNA,通过高通量测序技术对这些 DNA 片段进行测序,实现对病原体的鉴定[23]。tNGS 提高了对靶向区域的覆盖度和深度,降低时间和技术成本,提高了检测灵敏度,可以快速鉴别细菌、病毒、真菌、寄生虫等多种已知微生物,并且还可以检测耐药基因[24]。目前 tNGS 已经应用于呼吸道、血液、脑脊液、粪便等样本的病原体检测中[25]。但需要注意的是, tNGS 无法鉴别污染、定值还是活动性感染;且检测范围具有局限性,不能检测新病原体[23]。

mNGS 是直接对样本中所有的核酸进行无偏倚高通量测序[26]。与 tNGS 相比较,其可以无偏倚地检测样本中所有的遗传信息,提高罕见和未知病原体的检测能力。大量的临床研究也证实了 mNGS 在罕见、新发病原体检测[27]和多重病原体感染[28] [29]等临床应用场景中具有临床价值。mNGS 现已广泛应用在呼吸[27]、消化[30] [31]、血液[32]、中枢神经系统[33] [34]、泌尿生殖系统[35] [36]和假体关节[37]等临床感染性疾病的诊断实践中。但 mNGS 仍然具有一些局限性,包括难以区分定植和感染菌、宿主背景信息干扰、检测成本高、缺乏实验过程和结果判读的统一标准等[38]。

WGS 一般应用于流行病学调查,耐药菌株进化研究等,临床应用较少。

3. 总结与展望

综上所述,应根据疑诊患儿的年龄、病程、疫苗接种情况及抗生素使用情况等选择细菌培养、血清学或核酸检测等实验室检测方法辅助诊断百日咳,降低百日咳的误诊、漏诊率,以便准确诊断及及时治疗百日咳。

参考文献

- [1] 吴丹遐(综述),陈强,申昆玲(审校).百日咳的临床研究进展[J].中国当代儿科杂志,2016,18(9):897-902.
- [2] Cherry, J.D., Wendorf, K., Bregman, B., Lehman, D., Nieves, D., Bradley, J.S., et al. (2018) An Observational Study of Severe Pertussis in 100 Infants ≤120 Days of Age. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 37, 202-205. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001710>
- [3] van der Zee, A., Schellekens, J.F.P. and Mooi, F.R. (2015) Laboratory Diagnosis of Pertussis. *Clinical Microbiology*

- Reviews, **28**, 1005-1026. <https://doi.org/10.1128/cmr.00031-15>
- [4] Winter, K., Zipprich, J., Harriman, K., Murray, E.L., Gornbein, J., Hammer, S.J., *et al.* (2015) Risk Factors Associated with Infant Deaths from Pertussis: A Case-Control Study. *Clinical Infectious Diseases*, **61**, 1099-1106. <https://doi.org/10.1093/cid/civ472>
- [5] 陈奕颖, 林宏昌. 裂隙淋巴细胞对百日咳的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(7): 918-920.
- [6] 许秀妆, 章金灿. 裂隙淋巴细胞辅助诊断儿童百日咳的临床价值[J]. 中国当代儿科杂志, 2020, 22(9): 996-1000.
- [7] 刘倩, 王文慧, 豆巧华, 等. 百日咳疑似病例实验室检测法的比较研究[J]. 微生物学免疫学进展, 2022, 50(1): 53-57.
- [8] 伍金倩, 黄道连, 崔经和, 等. 外周血裂隙淋巴细胞计数对百日咳诊断价值的研究[J]. 实验与检验医学, 2020, 38(5): 872-875.
- [9] Tascini C, Carannante N, Sodano G, *et al.* (2019) Neonatal Pertussis Diagnosis: Low Procalcitonin Level and High Lymphocyte Count Are Able to Discriminate Pertussis from Bacterial and Viral Infections. *The New Microbiologica*, **42**, 49-51.
- [10] 彭晓康, 刘小乖, 李亚绒, 等. 合并其他病原感染的百日咳患儿临床特征与炎症指标特点[J]. 中国妇幼健康研究, 2020, 31(8): 5.
- [11] Zhang, R., Li, Z., Li, G., Tie, Y., Li, X., Gao, Y., *et al.* (2020) A Highly Sensitive One-Tube Nested Quantitative Real-Time PCR Assay for Specific Detection of *Bordetella Pertussis* Using the LNA Technique. *International Journal of Infectious Diseases*, **93**, 224-230. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.053>
- [12] 马富艳. 儿童百日咳实验室诊断的研究进展[J]. 浙江医学, 2023, 45(9): 993-997.
- [13] 中华医学会感染病学分会儿科感染学组, 国家卫生健康委能力建设和继续教育儿科专委会感染组, 中国临床实践指南联盟方法学专委会, 等. 中国百日咳诊疗与预防指南(2024 版) [J]. 中华医学杂志, 2024, 104(15): 1258-1279.
- [14] Markey, K., Douglas-Bardsley, A., Asokanathan, C., Fry, N.K., Barkoff, A., Bacci, S., *et al.* (2019) Improvement in Serological Diagnosis of Pertussis by External Quality Assessment. *Journal of Medical Microbiology*, **68**, 741-747. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000926>
- [15] 王青, 刘莹, 袁林, 等. 实时荧光定量聚合酶链式反应检测百日咳鲍特菌的效能研究[J]. 中国全科医学, 2019, 22(23): 2815-2819.
- [16] Al-Hinai, H., Al-Rashdi, A. and Al Azri, S. (2022) Laboratory Performance and Clinical Correlation of Real-Time Polymerase Chain Reaction as a Diagnostic Test for *Bordetella Pertussis* Isolated from Patients in Oman. *Oman Medical Journal*, **37**, e372. <https://doi.org/10.5001/omj.2022.62>
- [17] 董莉真, 王成雪, 李瑶瑶, 等. 幽门螺杆菌的感染诊断及环介导等温扩增技术在该领域的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2024, 47(2): 162-170.
- [18] Soroka, M., Wasowicz, B. and Rymaszewska, A. (2021) Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells*, **10**, Article 1931. <https://doi.org/10.3390/cells10081931>
- [19] Wong, Y.-P., Othman, S., Lau, Y.-L., Radu, S. and Chee, H.-Y. (2018) Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Versatile Technique for Detection of Micro-Organisms. *Journal of Applied Microbiology*, **124**, 626-643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>
- [20] Si, Y., Zhang, T., Chen, N., Cheng, Y., Wang, L., Yuan, J., *et al.* (2021) A Lamp-Based System for Rapid Detection of Eight Common Pathogens Causing Lower Respiratory Tract Infections. *Journal of Microbiological Methods*, **190**, Article 106339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106339>
- [21] Juscamayta-López, E., Valdivia, F., Soto, M.P., Nureña, B. and Horna, H. (2023) A Pangenome Approach-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Specific and Early Detection of *Bordetella Pertussis*. *Scientific Reports*, **13**, Article No. 4356. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29773-9>
- [22] 邵有和, 李磊, 覃淑娟. 探析高通量测序技术在肺部感染性疾病中的应用进展[J]. 中外医药研究, 2023, 2(7): 165-167.
- [23] 徐伟玲, 于少飞. 病原靶向二代测序在下呼吸道感染病原体诊断中应用价值研究进展[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(20): 3068-3072.
- [24] Schultzhaus, Z., Wang, Z. and Stenger, D. (2021) Crispr-Based Enrichment Strategies for Targeted Sequencing. *Biotechnology Advances*, **46**, Article 107672. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107672>
- [25] 赵聪琳, 刘凯, 周永召. 靶向二代测序技术与宏基因组二代测序技术在病原微生物检测中的应用[J]. 中华预防医学杂志, 2024, 58(1): 114-121.

- [26] Gu, W., Miller, S. and Chiu, C.Y. (2019) Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, **14**, 319-338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751>
- [27] Pendleton, K.M., Erb-Downward, J.R., Bao, Y., Branton, W.R., Falkowski, N.R., Newton, D.W., *et al.* (2017) Rapid Pathogen Identification in Bacterial Pneumonia Using Real-Time Metagenomics. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **196**, 1610-1612. <https://doi.org/10.1164/rccm.201703-0537le>
- [28] Burnham, P., Dadhania, D., Heyang, M., Chen, F., Westblade, L.F., Suthanthiran, M., *et al.* (2018) Urinary Cell-Free DNA Is a Versatile Analyte for Monitoring Infections of the Urinary Tract. *Nature Communications*, **9**, Article No. 2412. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04745-0>
- [29] Thoendel, M., Jeraldo, P.R., Greenwood-Quaintance, K.E., Yao, J.Z., Chia, N., Hanssen, A.D., *et al.* (2016) Comparison of Microbial DNA Enrichment Tools for Metagenomic Whole Genome Sequencing. *Journal of Microbiological Methods*, **127**, 141-145. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.022>
- [30] Zhou, Y., Wylie, K.M., El Feghaly, R.E., Mihindukulasuriya, K.A., Elward, A., Haslam, D.B., *et al.* (2016) Metagenomic Approach for Identification of the Pathogens Associated with Diarrhea in Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **54**, 368-375. <https://doi.org/10.1128/jcm.01965-15>
- [31] 庄思琪, 毛怡心, 邓富昌, 等. 健康老年人肠道菌群宏基因组与 16S rDNA 测序的比较研究[J]. 中华预防医学杂志, 2022, 56(11): 1618-1624.
- [32] Blauwkamp, T.A., Thair, S., Rosen, M.J., Blair, L., Lindner, M.S., Vilfan, I.D., *et al.* (2019) Analytical and Clinical Validation of a Microbial Cell-Free DNA Sequencing Test for Infectious Disease. *Nature Microbiology*, **4**, 663-674. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0349-6>
- [33] Simner, P.J., Miller, H.B., Breitwieser, F.P., Pinilla Monsalve, G., Pardo, C.A., Salzberg, S.L., *et al.* (2018) Development and Optimization of Metagenomic Next-Generation Sequencing Methods for Cerebrospinal Fluid Diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology*, **56**, e00472-18. <https://doi.org/10.1128/jcm.00472-18>
- [34] Wilson, M.R., O'Donovan, B.D., Gelfand, J.M., Sample, H.A., Chow, F.C., Betjemann, J.P., *et al.* (2018) Chronic Meningitis Investigated via Metagenomic Next-Generation Sequencing. *JAMA Neurology*, **75**, 947-955. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.0463>
- [35] Thoendel, M.J., Jeraldo, P.R., Greenwood-Quaintance, K.E., Yao, J.Z., Chia, N., Hanssen, A.D., *et al.* (2018) Identification of Prosthetic Joint Infection Pathogens Using a Shotgun Metagenomics Approach. *Clinical Infectious Diseases*, **67**, 1333-1338. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy303>
- [36] 姜梦杰, 唐浩能, 唐玲丽. 宏基因组学技术在女性生殖道疾病中应用的研究进展[J]. 中华预防医学杂志, 2023, 57(2): 172-178.
- [37] Ivy, M.I., Thoendel, M.J., Jeraldo, P.R., Greenwood-Quaintance, K.E., Hanssen, A.D., Abdel, M.P., *et al.* (2018) Direct Detection and Identification of Prosthetic Joint Infection Pathogens in Synovial Fluid by Metagenomic Shotgun Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, **56**, e00402-18. <https://doi.org/10.1128/jcm.00402-18>
- [38] Miller, S., Naccache, S.N., Samayoa, E., Messacar, K., Arevalo, S., Federman, S., *et al.* (2019) Laboratory Validation of a Clinical Metagenomic Sequencing Assay for Pathogen Detection in Cerebrospinal Fluid. *Genome Research*, **29**, 831-842. <https://doi.org/10.1101/gr.238170.118>