

论著·临床研究

## 裂隙淋巴细胞辅助诊断儿童百日咳的临床价值

许秀妆 章金灿

(南方医科大学附属潮州市中心医院检验科, 广东 潮州 521000)

**[摘要]** **目的** 探讨外周血涂片裂隙淋巴细胞对辅助早期诊断百日咳的意义。**方法** 采集107例疑似百日咳患儿的鼻咽拭子和外周血。采用PCR-流式荧光杂交法进行百日咳杆菌核酸检测,根据结果分为百日咳组( $n=52$ )和非百日咳组( $n=55$ );百日咳组按年龄分为 $<1$ 岁组( $n=42$ )和 $\geq 1$ 岁组( $n=10$ ),按病情严重程度分为轻症组( $n=45$ )和重症组( $n=7$ )。采用全自动血细胞分析仪对各组患儿进行外周血细胞计数测定,血涂片后行瑞氏染色和过氧化物酶染色,显微镜下观察各组患儿裂隙淋巴细胞并计数。**结果** 裂隙淋巴细胞呈圆形,胞体较小,胞浆量少,胞核上有切迹或裂缝;过氧化物酶染色为阴性,细胞学分类属淋巴细胞。百日咳组患儿白细胞计数、淋巴细胞比例、血小板计数、裂隙淋巴细胞比例均明显高于非百日咳组( $P<0.001$ )。百日咳组患儿中, $<1$ 岁组患儿淋巴细胞比例、血小板计数、裂隙淋巴细胞比例均明显高于 $\geq 1$ 岁组患儿( $P<0.05$ );重症组患儿上述血细胞计数及细胞比例均高于轻症组,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 裂隙淋巴细胞联合外周血细胞计数可为百日咳患儿的早期诊断提供新思路。

[中国当代儿科杂志, 2020, 22(9): 996-1000]

**[关键词]** 百日咳;裂隙淋巴细胞;儿童

### Clinical value of cleaved lymphocytes in assisting the diagnosis of pertussis in children

XU Xiu-Zhuang, ZHANG Jin-Can. Department of Clinical Laboratory Medicine, Chaozhou Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong 521000, China (Email: 253516186@qq.com)

**Abstract: Objective** To study the value of cleaved lymphocytes in peripheral blood smear in assisting the early diagnosis of pertussis. **Methods** Nasopharyngeal swabs and peripheral blood samples were collected from 107 children with pertussis-like disease. PCR-flow fluorescent hybridization was used to detect the nucleic acids of *Bordetella pertussis*. Based on the detection results, the children were divided into two groups: pertussis ( $n=52$ ) and non-pertussis ( $n=55$ ). According to age, the pertussis group was divided into two subgroups:  $<1$  year old ( $n=42$ ) and  $\geq 1$  year old ( $n=10$ ). According to disease severity, the pertussis group was divided into another two subgroups: mild ( $n=45$ ) and severe ( $n=7$ ). An automatic blood cell analyzer was used to determine peripheral blood cell counts. Wright's staining and peroxidase staining were used to observe and count cleaved lymphocytes under a microscope. **Results** Cleaved lymphocytes in peripheral blood were round with small cytoplasm, less cytoplasm and cleaved or lobulated nuclei. According to the negative peroxidase staining results, these cells were confirmed as lymphocytes. Compared with the non-pertussis group, the pertussis group had significantly higher leukocyte count, lymphocyte percentage, platelet count, and percentage of cleaved lymphocytes ( $P<0.001$ ). For the children with pertussis, the  $<1$  year old subgroup had significantly higher lymphocyte percentage, platelet count, and percentage of cleaved lymphocytes than the  $\geq 1$  year old subgroup ( $P<0.05$ ). The severe subgroup had slightly higher leukocyte count, lymphocyte percentage, platelet count, and percentage of cleaved lymphocytes than the mild subgroup ( $P>0.05$ ). **Conclusions** The detection of cleaved lymphocytes combined with peripheral blood cell counts provides a new option for the early diagnosis of pertussis in children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(9): 996-1000]

**Key words:** Pertussis; Cleaved lymphocyte; Child

[收稿日期] 2020-03-01; [接受日期] 2020-07-10

[作者简介] 许秀妆,女,大学本科,副主任技师。Email: 253516186@qq.com。

百日咳是全世界最常见的感染致死性疾病之一，近年百日咳发病率呈显著上升趋势，在全球受到了高度重视，“百日咳再现”已经成为国内外学者关注的焦点之一<sup>[1]</sup>。百日咳是由百日咳杆菌（*Bordetella pertussis*, BP）感染引起的急性呼吸道传染性疾病，以学龄前儿童多见，婴儿成为百日咳发生率、住院率和病死率最高的人群<sup>[2]</sup>。新生儿百日咳临床表现不典型，易漏诊和误诊，致严重并发症甚至死亡<sup>[3-4]</sup>，应与其他病原体引起的支气管炎和肺炎相鉴别。目前百日咳实验室诊断主要依靠病原学诊断（BP分离培养）、鼻咽拭子PCR检测及血清百日咳毒素（PT）IgG检测<sup>[5]</sup>。国内外学者最新的病例报道提示在百日咳患儿外周血涂片中观察到裂隙淋巴细胞，此发现为实验室诊断百日咳提供了新线索<sup>[6-9]</sup>。多个病例报道提示百日咳患儿外周血涂片中有不典型的伴有裂缝或分叶状细胞核的细胞<sup>[6-9]</sup>。Meng等<sup>[10]</sup>通过动物实验证实，注射PT的小鼠在其外周血、骨髓和脾脏涂片中均观察到裂隙淋巴细胞的存在，而对照组则没有发现<sup>[10]</sup>。然而百日咳患者外周血出现裂隙淋巴细胞的机制尚不清楚，裂隙淋巴细胞的分类也存在争议。本研究针对我院收治的临床疑似百日咳病例，采用鼻咽拭子PCR检测诊断百日咳，并对其外周血实验室指标进行分析，包括裂隙淋巴细胞比例、白细胞计数、淋巴细胞比例、血小板计数，旨在为百日咳的辅助诊断提供新思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取2018年11月10日至2019年10月6日南方医科大学附属潮州市中心医院收治的疑似百日咳的住院患儿共107例为研究对象。其中男61例，女46例，男女比例为1.3:1；发病年龄为12d至10岁；<1岁73例，≥1岁34例。

纳入标准：住院患儿，年龄<18岁；临床诊断符合《中国儿童百日咳诊断及治疗建议》中百日咳的临床诊断标准<sup>[11]</sup>。行BP核酸检测，BP DNA检测结果为阳性者纳入百日咳组（ $n=52$ ）；BP DNA检测为阴性，经病原学检测确诊为由其他呼吸道病原体感染引起的呼吸道疾病者纳入非百日咳组（ $n=55$ ）。

按病情严重程度将百日咳组患儿分为轻症组（ $n=45$ ）与重症组（ $n=7$ ）；百日咳患儿出现反复呼吸暂停、低氧血症、百日咳脑病、心血管功能障碍之一者<sup>[4]</sup>诊断为重症百日咳。百日咳患儿按年龄分为<1岁组（ $n=42$ ）和≥1岁组（ $n=10$ ）。分别比较各组患者的血细胞计数和血涂片细胞形态学特征。

### 1.2 外周血细胞计数及瑞氏染色

采集患儿外周血2 mL，在Sysmex XE-5000全自动血细胞分析仪上进行外周血细胞计数自动测定；将患儿血液进行手工推片制备合格的血涂片2~3张，并进行瑞氏染色（杭州滨和微生物试剂有限公司）。

### 1.3 人工分类计算裂隙淋巴细胞百分比及过氧化物酶染色

由有经验的工作人员在光学显微镜（日本Olympus公司）下观察细胞形态，裂隙淋巴细胞形态特点为：胞体较小，圆形；胞浆量少，深染，清透，无颗粒，胞核染色质浓缩致密，核型不规则，可见深浅不等的切迹或裂缝，部分细胞核呈对称双核或分叶状，无核仁。油镜下计数100个有核细胞中裂隙淋巴细胞所占比例，对裂隙淋巴细胞比例>5%的标本采用过氧化物酶（POX）染色（珠海贝索生物技术有限公司），并根据染色结果进行细胞学分类。

### 1.4 BP DNA检测

采集所有病例的鼻咽拭子送广州达安临床检验中心，应用流式荧光杂交法进行BP DNA检测，BP DNA阳性为实验室确诊。

### 1.5 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件对数据进行统计学分析，计量资料采用均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组间比较采用成组 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 外周血细胞计数和血涂片检查结果

从表1中分析可得，百日咳组患儿白细胞计数、淋巴细胞比例及血小板计数均明显高于非百日咳组患儿（ $P < 0.01$ ）。血细胞形态学观察结果显示百日咳组患儿均可见到裂隙淋巴细胞，裂隙淋

淋巴细胞比例范围为3%~20%，平均 $(11 \pm 4)\%$ ，非百日咳组患儿均未见到裂隙淋巴细胞，两组比较差异有统计学意义 $(P < 0.01)$ 。裂隙淋巴细胞形态特点见图1。年龄 $< 1$ 岁组百日咳患儿，淋巴细胞比例、裂隙淋巴细胞比例及血小板计数均明显高于年龄 $\geq 1$ 岁组百日咳患儿 $(P < 0.05)$ 。重症组百日咳患儿白细胞计数、血小板计数、淋巴细胞

比例、裂隙淋巴细胞比例均高于轻症组患儿，但差异无统计学意义 $(P > 0.05)$ 。52例百日咳患儿有9例(17%)合并其他病原体感染，43例(83%)为BP单一感染，混合感染组白细胞计数、血小板计数、淋巴细胞比例及裂隙淋巴细胞比例与单一感染组比较，差异均无统计学意义 $(P > 0.05)$ 。

表1 不同分组患儿的外周血细胞计数及比例比较  $(\bar{x} \pm s)$

组别	例数	白细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	血小板计数 ( $\times 10^9/L$ )	淋巴细胞 (%)	裂隙淋巴细胞 (%)
非百日咳组	55	$11 \pm 4$	$384 \pm 116$	$49 \pm 19$	0
百日咳组	52	$23 \pm 16$	$544 \pm 172$	$68 \pm 11$	$11 \pm 4$
<i>t</i> 值		-5.790	-5.600	-6.580	-18.490
<i>P</i> 值		$< 0.001$	$< 0.001$	$< 0.001$	$< 0.001$
$< 1$ 岁组	42	$24 \pm 15$	$578 \pm 164$	$70 \pm 9$	$12 \pm 4$
$\geq 1$ 岁组	10	$23 \pm 18$	$400 \pm 128$	$58 \pm 15$	$8 \pm 4$
<i>t</i> 值		0.151	3.190	2.320	2.568
<i>P</i> 值		0.880	0.002	0.042	0.013
轻症组	45	$21 \pm 11$	$526 \pm 116$	$68 \pm 11$	$11 \pm 4$
重症组	7	$40 \pm 30$	$547 \pm 180$	$71 \pm 10$	$14 \pm 4$
<i>t</i> 值		1.670	-0.296	0.738	1.981
<i>P</i> 值		0.144	0.768	0.464	0.053
单一感染组	43	$23 \pm 16$	$552 \pm 175$	$68 \pm 12$	$11 \pm 4$
混合感染组	9	$27 \pm 16$	$504 \pm 161$	$69 \pm 9$	$12 \pm 5$
<i>t</i> 值		-0.694	0.761	-0.436	-0.540
<i>P</i> 值		0.491	0.450	0.665	0.591

注：百日咳患儿依据年龄分为 $< 1$ 岁组和 $\geq 1$ 岁组；依据病情严重程度分为轻症组和重症组；依据感染情况分为百日咳杆菌单一感染组和混合感染组。

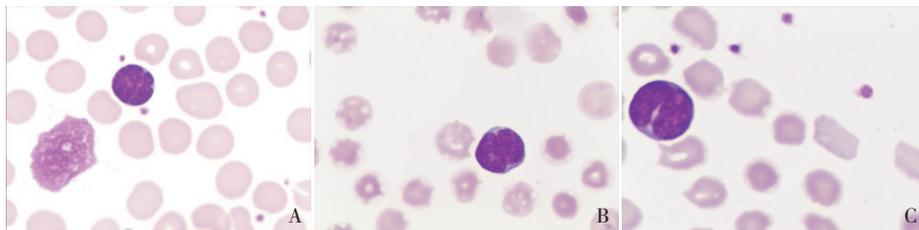


图1 裂隙淋巴细胞镜下形态(瑞氏染色,  $\times 1000$ ) 裂隙淋巴细胞胞体较小, 圆形; 胞浆量少, 深染, 清透, 无颗粒; 胞核染色质浓缩致密, 无核仁。图A细胞核上有浅切迹, 核型呈不规则; 图B细胞核上有深切迹, 呈对称双核; 图C细胞核上有裂缝, 呈分叶状。

## 2.2 POX 染色结果

可见裂隙淋巴细胞 POX 染色均为阴性，细胞学分类属淋巴细胞，见图 2。

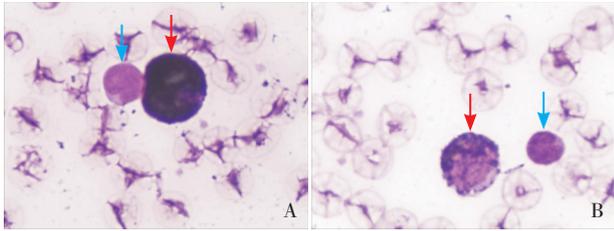


图 2 过氧化物酶染色结果 ( $\times 1000$ ) 图 A: 粒细胞过氧化物酶 (POX) 染色呈强阳性 (红色箭头示), 裂隙淋巴细胞 POX 染色呈阴性 (蓝色箭头示, 细胞核上有切迹); 图 B: 单核细胞 POX 染色呈弱阳性 (红色箭头示), 裂隙淋巴细胞 POX 染色呈阴性 (蓝色箭头示, 细胞核上有切迹)。

## 3 讨论

由于百日咳患者缺乏典型的临床表现, 因此建立准确、快速的实验室诊断方法尤为重要。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, 其特异度高但灵敏度低, 未能普遍开展<sup>[12]</sup>。美国疾病控制中心已将 BP 核酸检测阳性作为确诊百日咳的依据, 取鼻咽拭子或鼻咽抽吸物行 PCR 检测 BP 的灵敏度优于细菌培养<sup>[13]</sup>。本研究通过流式荧光杂交法对 107 例疑似百日咳患儿鼻咽拭子标本进行 BP 核酸检测, BP 检出率达 48.6% (52/107), 与文献报道的检出率相近<sup>[5]</sup>。

外周血常规尽管对于百日咳的诊断缺乏特异性, 但对于症状不典型、初次感染者的诊断可以提供重要的线索<sup>[14]</sup>。我国将白细胞计数和分类列为百日咳临床诊断条件之一<sup>[11]</sup>。多项研究表明外周血白细胞计数升高是百日咳常见的实验室特征, 白细胞升高以淋巴细胞升高为主<sup>[12]</sup>。

有研究认为当白细胞计数达到  $23.5 \times 10^9/L$ 、淋巴细胞计数达到  $17 \times 10^9/L$  时, 诊断百日咳的特异性分别可达 96.6% 和 98.3%, 但其灵敏度仅分别为 50.0% 及 41.0%<sup>[12]</sup>。有研究显示白细胞高于  $30 \times 10^9/L$ , 提示重症百日咳可能, 高于  $100 \times 10^9/L$  时病死率高达 80.0%<sup>[9]</sup>。本研究还发现  $<1$  岁的患儿白细胞计数升高更明显, 特别是淋巴细胞比例明显高于  $\geq 1$  岁的患儿, 提示血细胞计数对于婴儿百日咳的诊断具有意义。有研究认为百日咳患儿外周

血白细胞计数升高与病情的严重程度呈正相关<sup>[11]</sup>, 本研究中 7 例重症患儿的白细胞计数升高虽然高于轻症患儿, 但是两组比较差异无统计学意义, 有待今后增加样本量再作探讨。本研究还发现百日咳患儿外周血小板计数也明显增多, 其意义有待进一步探索研究。

近年有病例报道提出, 在百日咳患儿外周血涂片中观察到裂隙淋巴细胞<sup>[8]</sup>, 此发现为实验室诊断提供了新思路。目前国内外的研究仅限于个别案例的报道, 本研究通过病例对照研究比较分析裂隙淋巴细胞在百日咳辅助诊断中的意义。52 例百日咳患儿中, 均见到数量不等的裂隙淋巴细胞, 而 55 例疑似百日咳患儿中均未见到裂隙淋巴细胞, 该结果提示外周血裂隙淋巴细胞计数可能可以作为早期筛查百日咳患儿的方法之一, 有望弥补 BP 病原分离培养灵敏度低而外周血细胞计数特异性低的缺点。1 岁以内患儿的裂隙淋巴细胞计数较  $\geq 1$  岁组升高, 提示裂隙淋巴细胞与患儿的年龄相关。

目前对于百日咳患者血涂片中裂隙淋巴细胞的细胞分类尚有争议<sup>[10]</sup>, 本研究对百日咳患儿外周血涂片进行 POX 染色, 可见裂隙淋巴细胞 POX 染色阴性。POX 主要存在于粒细胞和单核细胞中, 粒系和单核系细胞 POX 染色结果分别为阳性和弱阳性 (胞质有蓝黑色颗粒), 并与细胞成熟程度有关, 淋巴细胞、有核红细胞和巨核细胞阴性 (胞质无蓝黑色颗粒)<sup>[15]</sup>。结合裂隙淋巴细胞的形态特点和 POX 染色结果, 本研究认为裂隙淋巴细胞应归属于淋巴细胞。临床上裂隙淋巴细胞还可见于淋巴瘤和白血病患者, 因此在诊断时应排除恶性肿瘤患者<sup>[6]</sup>。百日咳患儿出现裂隙淋巴细胞的机制尚不清楚, 有研究通过动物实验证实了裂隙淋巴细胞的产生与 PT 相关, 认为裂隙淋巴细胞的出现可能是 BP 感染后的特征现象<sup>[10]</sup>。然而 PT 导致裂隙淋巴细胞产生的机制、裂隙淋巴细胞在百日咳患者体内的生物学功能等均不明确, 需要进一步探索。

本研究显示, 结合百日咳临床表现, 患儿外周血有白细胞计数升高、淋巴细胞比例升高、血小板计数升高, 同时血涂片观察到裂隙淋巴细胞, 应高度怀疑百日咳疾病。外周血细胞计数和裂隙淋巴细胞在早期百日咳筛查诊断中可能起到重要

的作用。该实验室检测方法简单易行，可以在基层医院全面开展，在尚未获取细菌培养、PCR检测或血清学检测结果之前，研究外周血细胞计数的变化特点，重视显微镜下细胞形态学的观察，是对疑似百日咳病例进行早期筛查的有效手段。

#### [参 考 文 献]

- [1] Tong J, Buikema A, Horstman T. Epidemiology and disease burden of pertussis in the United States among individuals aged 0-64 over a 10-year period (2006-2015)[J]. *Curr Med Res Opin*, 2020, 36(1): 127-137.
- [2] Hartzell JD, Blaylock JM. Whooping cough in 2014 and beyond: an update and review[J]. *Chest*, 2014, 146(1): 205-214.
- [3] Swamy GK, Wheeler SM. Neonatal pertussis, cocooning and maternal immunization[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2014, 13(9): 1107-1114.
- [4] Wu DX, Chen Q, Yao KH, et al. Pertussis detection in children with cough of any duration[J]. *BMC Pediatr*, 2019, 19(1): 236.
- [5] 唐铭钰, 李锦, 干驰, 等. 婴儿疑似百日咳的临床特征及病原比较分析[J]. *中国小儿急救医学*, 2018, 25(5): 367-371.
- [6] Funaki T, Miyairi I. Lymphocytosis in a baby with pertussis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2015, 15(1): 130.
- [7] Pandey S, Cetin N. Peripheral smear clues for *Bordetella pertussis*[J]. *Blood*, 2013, 122(25): 4012.
- [8] Zhang RM, Wang HM, Deng JK. A 4-year-old girl with progressive cough and abnormal blood smear[J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 64(11): 1630-1631.
- [9] 邓继岗, 王红梅, 田树凤. 儿童百日咳的临床特点及实验室诊断[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2017, 32(22): 1692-1695.
- [10] Meng QH, Shi W, Li LJ, et al. "Cleaved Lymphocytes" could be induced by pertussis toxin injection in mice, and are actually not lymphocytes[J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 66(4): 639-640.
- [11] 中华医学会儿科学分会感染学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 中国儿童百日咳诊断及治疗建议[J]. *中华儿科杂志*, 2017, 55(8): 568-572.
- [12] 吴升伟, 刘淳婷, 张德著. 贵州省一起家庭聚集性百日咳病例的实验室诊断[J]. *中国疫苗和免疫*, 2017, 23(6): 716-717.
- [13] 刘霞, 吕芳, 侯安存. 百日咳综合征的概念及诊疗进展[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(10): 1118-1121.
- [14] 李丽君, 叶金艳, 姚开虎. 百日咳的实验室诊断方法研究进展[J]. *中华传染病杂志*, 2017, 35(12): 765-768.
- [15] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 46.

(本文编辑: 万静)