

儿童呼吸道合胞病毒感染血清特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 表达的相关性研究*

吴 意, 金 娴, 樊春卉, 侯家兴, 赵 毅

(深圳市第七人民医院检验科, 广东深圳 518081)

摘要:目的 探讨住院儿童呼吸道合胞病毒(RSV)感染血清特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 表达的相关性, 筛选具有早期辅助诊断意义的抗体指标。方法 运用荧光定量聚合酶链反应技术(FQ-PCR)筛选出 2015~2017 年 50 例咽拭子 RSV 阳性的住院患儿; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测患儿血清中的特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA; 同时以 95 例无呼吸道感染症状的儿童血清标本作为对照组; 采用卡方检验对结果进行统计学分析。结果 50 例咽拭子 RSV 阳性患儿血清中 IgM, IgG, IgA 及三者同时出现阳性率分别为 24.00%, 60.00%, 22.00% 和 16.00%, 差异有统计学意义($\chi^2=28.19, P<0.01$); 同一性别患儿的 IgM, IgG 和 IgA 阳性率在实验组和对照组中差异有统计学意义($\chi^2=9.16, P<0.01$), 不同性别在同一实验组或对照组中各抗体阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.10, P>0.05$); 急性喉气管支气管炎中未检出 IgM, IgG 和 IgA, 仅在急性上呼吸道感染中检测到 1 例 IgG, 支气管肺炎及急性支气管炎中以 IgG 的检出率 41.38% 和 23.53% 最高, 且均未单独检测到 IgA; <6 个月年龄组患儿在 7 天和 21 天内均未检出 IgM 和 IgA, 1~5 岁年龄组患儿在 7 天内产生 IgM 阳性率为 50.00% 最高, 且在 21 天内均能检出 IgM, IgG 和 IgA, 5~10 岁年龄组患儿在 7 天内产生 IgG 和 IgA 的阳性率为 100% 和 66.67%。结论 RSV 特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 不能单独作为早期感染 RSV 的诊断指标, 特异性抗体产生不受性别因素影响, 上呼吸道感染 RSV 较难产生 IgM, IgG 和 IgA, 患儿年龄越小产生 IgM 和 IgA 的速度越慢, 同时 IgG 存在母婴垂直传播且对机体无保护作用, RSV 感染人体引起临床呼吸道症状可能与自身免疫力有关; IgA 产生最早且不单独出现。

关键词: 呼吸道合胞病毒; 抗体; 表达; 辅助诊断

中图分类号: R373.14; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)02-082-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.02.023

Correlation Research of Serum Specific Antibody Expression of IgM, IgG and IgA in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection

WU Yi, JIN Xian, FAN Chun-hui, HOU Jia-xing, ZHAO Yi

(Department of Clinical Laboratory,

Shenzhen Seventh People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518081, China)

Abstract: **Objective** To explore the correlation between the expression of serum specific antibody IgM, IgG and IgA in the respiratory syncytial virus (RSV) in hospitalized children, and the antibody indexes with early auxiliary diagnostic significance were screened. **Methods** Using fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) to screen 50 cases of throat swabs which RSV-RNA were positive in hospitalized children from 2015 to 2017 and using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detected specific antibodies IgM, IgG and IgA in the children's serum. Meanwhile 95 cases of children's serum specimens without respiratory symptoms were taken as the control group. The results were analyzed by chi-square test. **Results** In the 50 cases of serum from children who's RSV-RNA were positive from throat swabs, the positive rates of IgM, IgG, IgA and the three forms coming together were 24.00%, 60.00%, 22.00% and 16.00% respectively. And the difference was statistically significant ($\chi^2=28.19, P<0.01$). About the serums which were the same gender child patient in the experimental group and the control group, the positive rates of IgM, IgG and IgA had significant differences ($\chi^2=9.16, P<0.01$). There was no significant difference in the positive rate of each antibody in the same experimental group or control group or control group ($\chi^2=0.10, P>0.05$). IgM, IgG and IgA were not detected in acute laryngotracheal bronchitis. Only 1 case with IgG was detected in the acute upper respiratory infection. It was the highest that the detection rates of IgG in bronchial pneumonia and acute bronchitis were 41.38% and 23.53%, and IgA was not been detected alone. In the group of <6 months, IgM and IgA were not detected within 7 days and 21 days. In the group of 1~5 years old, the positive rate of IgM within 7 days was 50%, which was the highest in all groups. And IgM, IgG and IgA could be detected in 21 days also. The positive rates of IgG and IgA in the age group of 5~10 years old were 100% and 66.67% respectively. **Conclusion**

* 基金项目: 深圳市盐田区科技局科技计划资助项目(20160102)。

作者简介: 吴 意(1982—), 男, 本科学历, 主管检验师, 主要从事病原微生物分子诊断学研究, E-mail: 845007571@qq.com。

Specific antibodies of RSV-IgM, IgG and IgA cannot be used as a diadynamic criteria alone in early RSV infection. The specific antibody was not affected by gender. Upper respiratory tract infection RSV was difficult to produce IgM, IgG and IgA. The younger the child, was the slower the IgM and IgA were produced. At the same time, IgG was able to vertical transmission and it had no protective effect on body. That RSV could infect the body and cause clinical respiratory symptoms would be related with immunity. Finally, IgA was the earliest specific antibody and could not be alone.

Keywords: RSV; antibody; express; auxiliary diagnosis

呼吸道合胞病毒(RSV)是一种世界范围内广泛流行,能引起婴幼儿严重下呼吸道感染及威胁婴幼儿生命健康的病原菌。同时也是医院内感染的主要病原体之一^[1]。主要引起支气管肺炎和急性支气管炎^[2]。RSV感染的实验室辅助诊断指标主要以抗原、抗体检测为主,但多数以RNA的检测作为临床诊断依据。为了寻找RSV的特异性抗体,此次研究做了如下实验。

1 材料与方法

1.1 研究对象 从2015年10月~2017年5月因呼吸道感染在深圳市第七人民医院儿科住院治疗的儿童中筛选出咽拭子RSV-RNA阳性50例患儿。年龄为10天~10岁,男性患儿23例,女性患儿27例。根据临床疾病诊断标准,按临床症状、影像学 and 体征三者结合共确诊四种疾病分别为急性喉气管支气管炎、支气管肺炎、急性支气管炎和急性上呼吸道感染。选取95例无呼吸道感染症状的儿童血清标本作为对照组。男性48例,女性47例,年龄为58 min~10岁。

1.2 仪器和试剂 微量加样器购于德国 Eppendorf 公司;漩涡振荡混匀器购于美国 Vortex 公司;C1301 型迷你离心机购于美国 Labnet 公司;BSC-1100A2X 型生物安全柜购于济南鑫贝西公司;DW-FL253 低温冰箱购于中科美菱低温科技股份有限公司;Mastercycler ep realplex2 荧光定量 PCR 仪购于德国 Eppendorf 公司;DK-8B 型恒温水育箱购于上海精宏实验设备有限公司;RT-6000 酶标仪购于深圳雷杜生命科学股份有限公司。RSV 特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 试剂盒购于德国维润赛润研发有限公司;RSV 试剂盒购于中山大学达安基因股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样本的收集:用鼻咽拭子取患者咽部分泌物,将标本密封立即送检,运送采用 0℃ 冰壶。标本不能及时检测可保存于 -20℃,保存期为 12 个月。同时留取该患儿血清标本和无呼吸道感染症状的对照组血清标本。

1.3.2 样本 RSV-RNA 的提取:严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.3 PCR 扩增筛选阳性标本:RSV 加 10 μl

RNA 模板于 RSV 的 PCR 试剂盒反应管内,高速离心数秒后上机进行 PCR 扩增。PCR 的扩增循环条件为:首先 40℃ 30 min, 94℃ 3 min, 然后 93℃ 15 s, 55℃ 45 s 共 10 个循环,最后 93℃ 15 s, 55℃ 45 s 共 30 个循环,采集荧光信号。结果分析及质量控制:每次实验设置阴性质控品、强阳性质控品和临界(弱)阳性质控品作为质量控制,保证实验结果的准确可靠性。RSV 阴性质控品荧光信号无增长,且无明显 S 型扩增曲线;RSV 强阳性和临界阳性质控品荧光信号增幅明显,呈典型 S 型扩增曲线;且 RSV 强阳性质控品 CT 值在 9~12 范围,临界阳性质控品 CT 值在 17~20 范围,此三项要求必须在同次实验中同时满足,否则实验无效,需重新检测。

1.3.4 RSV 特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 检测: RSV-IgM 检测先在 800 μl 稀释液中加入 10 μl 标本和 200 μl RF 吸附剂,摇匀后室温放置 15 min, 使其充分反应;RSV-IgG 和 RSV-IgA 检测先在 1 000 μl 稀释液中加入 10 μl 标本,充分混匀。取上述 100 μl 稀释后的标本,阳性对照品(2 孔)和阴性对照品(1 孔),分别加入相应的抗体酶标板孔内,留空白对照 1 孔(不加任何液体);将加样后的酶标板轻微震荡,放置 37℃ 水浴箱中孵育 60 min;每孔注入稀释后的洗涤液 300 μl,静置 20~40 s 后快速吸掉或倒掉洗涤液,共洗涤 4 次,将酶标板放在吸水纸上拍干;除空白孔对照孔外,每孔加 100 μl 酶标结合物;将酶标板放置 37℃ 孵育箱中,孵育 30 min;再次洗板,操作步骤同上述洗板一致;每孔加 100 μl 底物溶液(含空白对照孔),将酶标板放置 37℃ 孵育箱中,避光孵育 30 min;每孔加 100 μl 终止液(含空白对照孔),终止显色反应;在加终止液后的 1 h 内进行判读结果(A 值),该测试为双波长(测定波长为 405 nm,参考波长为 620~690 nm 范围内的任一波长)。具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.4 统计学分析 采用卡方检验对结果进行统计学分析,应用 SPSS11.0 统计软件进行数据处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学显著性意义。

2 结果

2.1 RSV 特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 在不同组

别中的阳性率分布情况 实验组 IgM, IgG, IgA 及三者同时出现的阳性率分别是 24.00% (12/50), 60.00% (30/50), 22.00% (11/50) 和 16.00% (8/50), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 28.19, P < 0.01$); 对照组 IgM, IgG, IgA 及三者同时出现的阳性率分别是 8.42% (8/95), 94.74% (90/95), 14.74% (14/95) 和 0.00% (0/95), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 264.54, P < 0.05$)。IgM 和 IgG 在实验组与对照组之间差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 6.69, 27.70$, 均 $P < 0.05$); IgA 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.21, P > 0.05$)。

2.2 RSV 特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 在不同性别及组别中的阳性率分布情况 见表 1。不同性别在同一实验组或对照组中各抗体阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.10, P > 0.05$); 同性别在实验组与对照组之间各抗体阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 9.16, P < 0.01$)。

表 1 RSV 特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 在不同性别及组别中的阳性率分布情况 [%]

抗体类型	实验组 (n=50)		对照组 (n=95)	
	男性 (n=23)	女性 (n=27)	男性 (n=48)	女性 (n=47)
IgM	6(26.09)	6(22.22)	4(8.33)	4(8.51)
IgG	14(60.87)	16(59.26)	46(95.83)	44(93.62)
IgA	5(21.74)	7(25.93)	9(18.75)	5(10.64)

2.3 不同疾病组中 RSV 特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 的检出率情况 在急性喉气管支气管炎中均未检测到 RSV 特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA; 在急性上呼吸道感染中仅检测到 1 例 IgG 阳性; 在支气管肺炎及急性支气管炎中特异性抗体 IgM, IgG, IgA, IgM+IgG, IgG+IgA 和 IgM+IgG+IgA 六种不同组合模式的检出率分别为 3.45% (1/29), 41.38% (12/29), 0% (0/29), 3.45% (1/29), 3.45% (1/29), 17.24% (5/29) 和 5.88% (1/17), 23.53% (4/17), 0% (0/17), 5.88% (1/17), 11.76% (2/17), 17.65% (3/17)。IgM, IgG 和 IgA 在支气管肺炎中差异有统计学意义 ($\chi^2 = 24.06, P < 0.05$), 在急性支气管炎中差异也有统计学意义 ($\chi^2 = 12.42, P < 0.05$)。

2.4 RSV 特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 在不同年龄组及产生的时间段分布情况 见表 2。不同年龄段在 7 天内产生特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 24.63, P < 0.05$); 四个年龄段患儿在 21 天内产生 RSV 特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 仅出现在 1~5 岁年龄段, 检出率分别为 20.00% (2/10), 30.00% (3/10) 和 20.00% (2/

10)。不同年龄段在 21 天内产生特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.33, P < 0.05$)。

表 2 不同年龄段在 7 天内产生 RSV 特异性抗体的检出率分布情况 [%]

不同年龄段	n	IgM	IgG	IgA
<6 个月	19	0(0)	13(68.42)	0(0)
6~12 个月	18	6(33.33)	6(33.33)	5(27.78)
1~5 岁	10	5(50.00)	7(70.00)	4(40.00)
5~10 岁	3	1(33.33)	3(100)	2(66.67)

3 讨论 呼吸道合胞病毒(RSV)是一种有包膜的单股负链 RNA 病毒, 属于副黏病毒科, 肺炎病毒属, 有圆形和丝状两种形态。每年全球范围内 RSV 感染引起的婴幼儿急性下呼吸道感染(ALR-TI)病例约为 3 380 万, 感染造成死亡病例约为 6.6~19.9 万, 其中发展中国家占 99%^[3]。我国 5 岁以下婴幼儿 RSV 感染病例占急性呼吸道感染住院病例的 25% 以上, 约有 40%~50% 毛细支气管炎及 24% 肺炎是 RSV 感染所致^[4]。

此次实验研究选取的是 RSV-RNA 阳性且出现临床呼吸道症状的患儿, 而血清中 IgM 的阳性率仅为 24%, 说明此指标检出率与临床诊断符合率相距甚远, 不宜作为早期诊断的特异性指标, 且与靳庆娥等^[5]报道的 0.63% 和解娟等^[6]报道的 1.36% 存在较大差异, 这可能与研究对象人群不同和地域不同有关。对照组中 IgM 存在 8.42% 的阳性率, 说明无呼吸道感染症状的人群中存在一定的 RSV 隐性感染, 这可能是由于其自身免疫力强、感染的病毒量少或其基因型致病力弱的原因, 并未引起明显的临床症状, 同时也说明 IgM 阳性且无任何呼吸道感染症状时, 并不一定需要进行抗病毒治疗。对照组中 IgG 存在极高的阳性率, 说明大多数儿童都是 RSV 的易感人群, 这与靳庆娥等^[5]研究成人人群感染率低的结果是相符合的, 而且有研究证明半数以上儿童可多次反复感染^[7]。虽然人们已经认识到适应性免疫应答在抗 RSV 感染中的重要性, 但是固有免疫系统对病毒的早期反应也有可能决定感染的结果, 所以, 两者的作用都不可忽视。目前对儿童肺部固有免疫力的产生、成熟及其影响因素知之甚少, 肺的固有免疫系统可能与全身免疫系统不同, 其免疫机制也可能不相同。婴幼儿呼吸道上皮细胞及其对病毒感染的反应是不同于成人的, 广泛的上皮细胞脱落与严重的 RSV 疾病相关; 呼吸道上皮细胞被认为是早期细胞因子的重要来源, 细胞因子的产生、黏液的分泌及上皮细胞凋亡的程度均与感染病毒株相关^[8]。实验组 IgM

和 IgA 阳性检出率偏低, IgG 受母婴垂直传播和继往感染的影响, 容易造成漏诊和误诊, 因此三者均不适合单独作为早期辅助诊断 RSV 感染的特异性指标。

实验研究发现不同性别在同一实验组或对照组中各抗体阳性率无明显差异性, 说明特异性抗体产生不受性别因素影响; 而同性别在实验组与对照组之间各抗体阳性率有明显差异性, 说明此次实验选取的对象符合临床研究要求。研究中发现 RSV 感染主要引起儿童支气管肺炎, 其次是急性支气管炎, 支气管肺炎及急性支气管炎中以 IgG 的检出率最高, 且均未单独检测到 IgA。在急性喉气管支气管炎中均未检测到 RSV 特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA, 仅在急性上呼吸道感染中检测到 1 例 IgG 阳性, 这说明 RSV 感染上呼吸道较难产生各种抗体, 而感染下呼吸道产生 IgM 和 IgA 的阳性率较一致。

研究发现在 <6 个月这个年龄段, 患儿三周内都未产生 IgM 和 IgA, 而检出的 IgG 可能是母婴垂直传播的且对机体无保护作用, 这说明年龄越小, 患儿产生特异性抗体 IgM 和 IgA 的速度越慢, 其原因可能是由于患儿机体免疫系统不够完善, 不能及时有效地激活免疫应答所致。随着年龄的增长, 一周内产生 IgM 和 IgA 的阳性率随之增长, 虽然在 5~10 岁年龄段有所下降, 这可能与所选择的研究对象人数局限性有关。在 1~5 岁年龄段, 随着感染时间的增长, IgM, IgG 和 IgA 平均每周提高 10% 左右的阳性率。这说明患儿产生特异性抗体与年龄和感染时间有一定相关性, 年龄越大, 感染时间越久, 产生 IgM, IgG 和 IgA 的能力也随之增强, 并且其抗体产生时间因个体自身免疫力存在一定差异。在 5~10 岁年龄段, IgA 检出率最高, 说明分泌型抗体在机体免疫系统越成熟时越容易产生。同时研究发现, IgA 在 RSV 感染出现临床症状的第二天就产生, 比 IgM 提前一天出现, 是产生最早的抗体, 而且不单独出现。有研究表明, 儿童可以再感染相同的 RSV 株, 但是第二次 RSV 感染的程度较低, 表明自然感染可以产生部分保护性^[9], 但不能阻止 RSV 再感染。

因此, 以其血清学特异性抗体 IgM, IgG 和 IgA 作为 RSV 早期感染辅助诊断指标, 存在诸多影响因素。儿童 RSV 感染临床诊断应该以 RNA 检测为金标准, 结合临床症状、影像学 and 体征三要素。预防 RSV 暴发流行及院内感染, 关键是在高发流行季节做好婴幼儿和学龄儿童的防护措施, 及时发现、及时隔离、及时治疗、防止蔓延。

参考文献:

- [1] Chen K, Jia R, Li L, et al. The aetiology of community associated pneumonia in children in Nanjing, China and aetiological patterns associated with age and season[J]. BMC Public Health, 2015, 15(1): 113.
- [2] 吴意, 金嫻, 樊春卉, 等. 儿童呼吸道合胞病毒与肺炎支原体联合检测的应用研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(20): 4710-4713.
Wu Y, Jin X, Fan CH, et al. Application value of combined detection of respiratory syncytial virus and *Mycoplasma pneumoniae* in children[J]. Chin J Nosocomiol, 2016, 26(20): 4710-4713.
- [3] 吴春利, 陈洁润, 阳帆, 等. 2012~2013 年深圳市呼吸道合胞病毒流行规律及分子变异分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2014, 34(10): 737-741.
Wu CL, Chen JR, Yang F, et al. Epidemic pattern and molecular variation of respiratory syncytial virus strains isolated in Shenzhen from year 2012 to 2013 [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2014, 34(10): 737-741.
- [4] Zhang Q, Guo Z, Bai Z, et al. A 4 year prospective study to determine risk factors for severe community acquired pneumonia in children in southern China[J]. Pediatr Pulmonol, 2013, 48(4): 390-397.
- [5] 靳庆娥, 苏建荣, 乌娜娜, 等. 2015 年北京地区成人急性呼吸道感染 9 种病原体 IgM 抗体检测分析[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(2): 157-159.
Jin QE, Su JR, Wu SN, et al. Analysis of IgM antibody of nine acute respiratory tract infection pathogens in adults during 2015 in Beijing area[J]. J Mod Lab Med, 2017, 32(2): 157-159.
- [6] 解娟, 张梦瑶, 李小侠, 等. 九项呼吸道病原体 IgM 抗体联合检测对儿童呼吸道感染的临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(4): 110-112, 116.
Xie J, Zhang MY, Li XX, et al. Clinical significance of detecting immunoglobulin-M of nine pathogens in serum of children with respiratory tract infection[J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(4): 110-112, 116.
- [7] 李宏勇, 韩艳娟, 田新利, 等. 儿童对呼吸道合胞病毒感染免疫应答的研究进展[J]. 中华传染病杂志, 2016, 34(11): 698-701.
Li HY, Han YJ, Tian XL, et al. The progress of children's immune response to respiratory syncytial virus [J]. Chin J Infect Dis, 2016, 34(11): 698-701.
- [8] Villenave R, Shields MD, Power UF. Respiratory syncytial virus interaction with human airway epithelium [J]. Trends Microbiol, 2013, 21(5): 238-244.
- [9] Agoti CN, Mwihuri AG, Sande CJ, et al. Genetic relatedness of infecting and reinfecting respiratory syncytial virus strains identified in a birth cohort from rural Kenya[J]. J Infect Dis, 2012, 206(10): 1532-1541.

收稿日期: 2017-10-23

修回日期: 2017-12-22