

住院儿童呼吸道合胞病毒 A、B 亚型与特异性抗体 IgM、IgG 和 IgA 的关系研究

吴意¹, 金嫻¹, 樊春卉¹, 陆学东², 赵毅¹

(1. 深圳市第七人民医院 检验科, 深圳 518081; 2. 中山大学附属第八医院 检验医学部, 深圳 518033)

摘要:为探讨住院儿童呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV) A、B 亚型与特异性抗体 IgM、IgG 和 IgA 的相关性, 以筛选具有早期辅助诊断意义的抗体指标, 应用 FQ-PCR 筛选出 50 例住院儿童咽拭子 RSV 阳性标本。根据 RSV 的 G 蛋白编码基因核苷酸序列设计单管多重巢式 PCR 引物进行基因分型(A、B 亚型); 采用 ELISA 检测患儿血清中的特异性抗体 IgM、IgG 和 IgA 并对结果进行分析。结果 50 例阳性患儿血清中 IgM、IgG、IgA 及三者同时出现阳性者百分率分别为 24.0%(12/50)、60.0%(30/50)、22.0%(11/50)和 16.0%(8/50), 差异显著($P < 0.05$); RSV A、B 亚型及混合感染率分别为 82.0%(41/50)、14.0%(7/50)和 4.0%(2/50), 差异显著($P < 0.05$); A、B 亚型及混合感染产生 IgM 的最快时间均为 3 d, 7 d 内产生 IgM 阳性率分别为 17.1%(7/41)、28.6%(2/7)和 50.0%(1/2); IgA 最快 2 d 产生; A、B 亚型及混合感染在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中的感染率分别为 100.0%(3/3)、100.0%(29/29)、47.1%(8/17)和 100.0%(1/1), 0.0%(0/3)、0.0%(0/29)、41.2%(7/17)和 0.0%(0/1), 0.0%(0/3)、0.0%(0/29)、11.8%(2/17)和 0.0%(0/1), A 亚型在 4 种疾病各组之间差异显著($P < 0.05$), B 亚型在 4 种疾病各组之间差异显著($P < 0.05$), A、B 混合感染在 4 种疾病各组之间差异不显著($P > 0.05$)。研究发现 RSV A、B 亚型与特异性抗体 IgM、IgG 和 IgA 无明显相关性; A、B 亚型及混合感染最快产生 IgM 的时间较一致; IgA 产生最早且不单独存在; RSV 感染出现临床症状越久, 3 种抗体同时出现的概率越大, 且均不适合作为早期辅助诊断的特异性指标; A 亚型感染均能引起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, 混合感染并未加重临床症状, B 亚型的致病力可能比 A 亚型弱。

关键词:住院儿童; RSV; 亚型; 特异性抗体; 辅助诊断

中图分类号: R392.11

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2018)04-0281-08

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)为有包膜的单股负链 RNA 病毒, 编码 8 个结构蛋白和 2 个非结构蛋白。病毒呈圆形或丝状, 大小 100~350 nm, 其核酸不分片段, 核衣壳螺旋对称, 含 RNA 依赖的 RNA 多聚酶。RSV 有 F、G、P 和 N 4 种蛋白, 其中包膜上 F 蛋白能引起病毒包膜之间的融合, 包膜上 G 蛋白对宿主细胞有吸附作用。RSV 根据 F 和 G 蛋白上的抗原组分不同, 分为 A 和 B 两种亚型^[1]。4 种蛋白均具有抗原变异性, 以 G 蛋白的可变性最高。目前国内外未见报导 RSV 亚型与特异性抗体 IgM、IgG、IgA 的相关性研究, 了解 RSV 亚型与特异性抗体之间的关系, 有助于临床疾病的预防、诊断和治疗。对于各种相应抗体在不同年龄段产生所需时间, 目前国

内外也未见明确报导, 因此本实验室做了以下工作。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2015 年 10 月至 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, 筛选出咽拭子 RSV 阳性患儿 50 例, 年龄为 10 d~9 岁。男性患儿 23 例, 女性患儿 27 例。根据临床诊断标准, 按临床症状、影像学 and 体征三者结合, 咽拭子 RSV 阳性患儿共确诊 4 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。

1.2 方法

1.2.1 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。标本未及时检测时可保存于-20℃, 保存期为 12 个月。同时留取咽拭子 RSV 阳性患儿的血清标本。

1.2.2 RSV-RNA 的提取 严格按照 RSV 试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司)操作说明书执行。

收稿日期: 2017-12-25

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, 汉族, 本科, 主管检验师, 主要从事病原微生物分子诊断学研究

通信作者: 吴意(E-mail: 845007571@qq.com)

1.2.3 PCR 扩增筛选阳性标本 加 10 μL RSV-RNA 模板于 PCR 试剂盒反应管内, 高速离心数秒后上 Mastercycler ep realplex2 荧光定量 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司)进行扩增。扩增条件为: 40 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 93 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 共 10 个循环, 93 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 共 30 个循环并采集荧光信号。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 3 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。

1.2.4 RSV-RNA 模板反转录为 cDNA 模板 在 0.5 mL PCR 反应管内加入 2 μL Random 6 mers, 1 μL dNTP Mixture 和 10 μL RNA 模板, 上机 65 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 取出放置冰盒内 1~2 min; 在反应管内再加入 4 μL 的 5X PrimeScript Buffer、0.5 μL 的 RNase Inhibitor、1 μL 的 PrimeScript RTase 和 1.5 μL 的 RNase Free dH₂O, 上机 30 $^{\circ}\text{C}$ 10 min、42 $^{\circ}\text{C}$ 40 min、70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 后结束, 反转录的 cDNA 模板于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.5 RSV 亚型 PCR 扩增 RSV 通用引物序列(华大基因武汉分公司)为 GGGGCAAATGCAAA-CATGTCC, A 亚型特异性引物序列为 GGGGTT-GTGTCTTGTATC, B 亚型特异性引物序列为 GCTGTGGGTATTTGTGTG。在 0.5 mL PCR 反应管内加入 12.5 μL 2X mix 酶混合物、通用引物和 A、B 亚型引物各 1 μL , cDNA 模板 2 μL , 再加 ddH₂O 至 25 μL , 高速离心 10 s 后上机扩增。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 结束循环扩增。

1.2.6 电泳及测序 2% 的琼脂糖凝胶 120 V 电压电泳 45 min, 在凝胶成像系统(美国伯乐公司)下观察电泳结果。PCR 产物测序由华大基因武汉分公司和广州分公司共同完成。

1.2.7 RSV 特异性抗体 IgM、IgG 和 IgA 检测 采用 ELISA 方法, RSV-IgM 检测时先在 800 μL 稀释液中加入 10 μL 血清标本和 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 检测时先在 1 000 μL 稀释液中加入 10 μL 血清标本, 充分混匀。其余操作严格按照试剂盒说明书(德国维润赛润研发有限公司)步骤进行。抗体阳性的判读按 D 值区分, 具体标准参照试剂盒说明书。

1.3 统计学处理 采用 χ^2 检验对结果进行统计学分析, 应用 SPSS 11.0 统计软件进行数据处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RSV 亚型的检测结果 A 亚型扩增产物目的片段为 277 bp, B 亚型扩增产物目的片段为 863 bp, RSV 的 A、B 亚型及混合感染产物电泳见图 1。

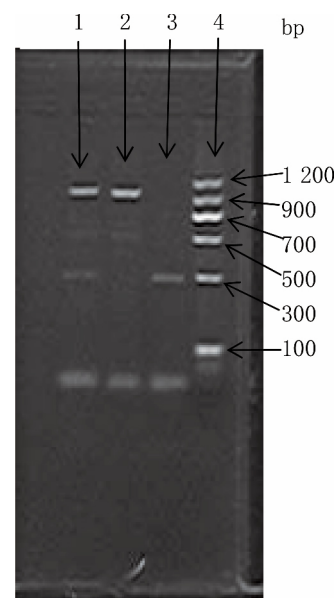


图 1 RSV 亚型及混合感染电泳图

注: 1 为 AB 混合型; 2 为 B 亚型; 3 为 A 亚型; 4 为 Marker

2.2 A 亚型产物正向核苷酸序列及测序峰图

RSV 的 A 亚型正向核苷酸序列为 CCAGTTCACG CACCGCCAGACACTAGAAGAACCTGGGACA CTCTCAATCATCTATTATTCATATCATCGT GCTTATACAAGTTAAATCTTAAATCTATA GCACAAATCACATTATCTATTTTGGCAATG ATAATCTCAACCTCACTTATAATTGCAGCC ATCATATTCATAGCCTCGGCAAACCACAAA GTCACACTAACAACCTGCAATCATACAAGAT GCAACGAACCAGATCAAGAACACAACCCC。部分测序峰图见图 2。

2.3 A 亚型产物反向核苷酸序列及测序峰图

RSV 的 A 亚型反向核苷酸序列为 AGATGAGAT

GCAGTTGTTAGTGTGACTTTGTGGTTATGC
CGAGGCTATGAATATGATGGCTGCAATTAT
AAGTGAGGTTGAGATTATCATTGCCAAAAT
AGATAATGTGATTTGTGCTATAGATTTAA
GATTAACTTGTATAAGCACGATGATATG

AATAATAGATGATTGAGAGTGTCCCAGGTT
CTTTCTAGTGTCTTGGCGGTGCGTTGGTCC
TTGGTTTTGGACATGTTTGCATTGCCCC。

部分测序峰图见图 3。

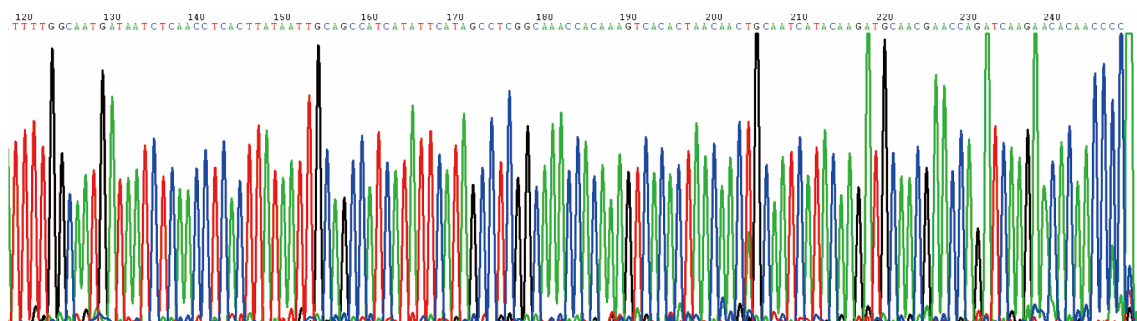


图 2 RSV 的 A 亚型扩增产物正向核苷酸测序峰图

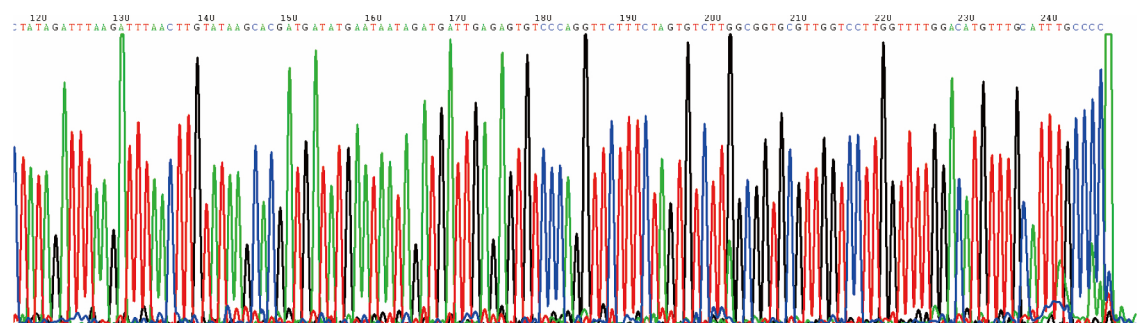


图 3 RSV 的 A 亚型扩增产物反向核苷酸测序峰图

2.4 B 亚型产物正向核苷酸序列及测序峰图

B 亚型产物正向核苷酸序列为 CCGGGTCACGCACT
GCCAGGACTCTAGAAAGACCTGGGATACTC
TTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAAATTTAAAATCTATAGCA
CAAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATA
ATCTCAACCTCTCTTATAATTGCAGCCATA
ATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAAGT
TACACTAACAAGTGTACAGTTCAAACAA
TAAAAAACCACTGAGAAAAACATAACCA
CTTACCTTACTCAGGTCTCACCAGAAAGGG
TTGGCCCATCCAAACAACCCACAGCCACAC
CACCAATCCACACAACTCAGCCACAATAT
CACCCAATACAAAATCAGAAACACACCATA
CAACAGCACAAACCAAGGCACAACCTCTA
TTCCAACACAGAACAACAAGCCAAGCACAA

AACCACGTCCAAAAAATCCACCAAAAAAAG
ATGATTACCATTTTGAAGTGTTCACCTTT
GTTCCCTGTAGTATATGTGGCAACAATCAA
CTCTGCAAATCCATTTGCAAAACAATACCA
AGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACTAC
AAAACCCACAAACAAACCACCTACCAAAAC
CACAAACAAAAGAGACCCCAAAACACTAGC
CAAAACACCGAAAAAAGAAACCACCATTAA
CCCAACAAAAAACCAACCCCAAGACTAC
AGAAAGAGACACCAGCACCCCAATCCAC
TGTGCTCGACATAACCACATCAAAACACAC
AGAAAGGGACACCAGCACCTCACAATCCAT
TGCGCTTGACACAACCACATCAAAACACAC
AACCACAGCAATCTCTCTACTCAACCAT
CCCCGAAAACACACCAACTCCACACAATT
TCCCCCCCAGCA。部分测序峰图见图 4。

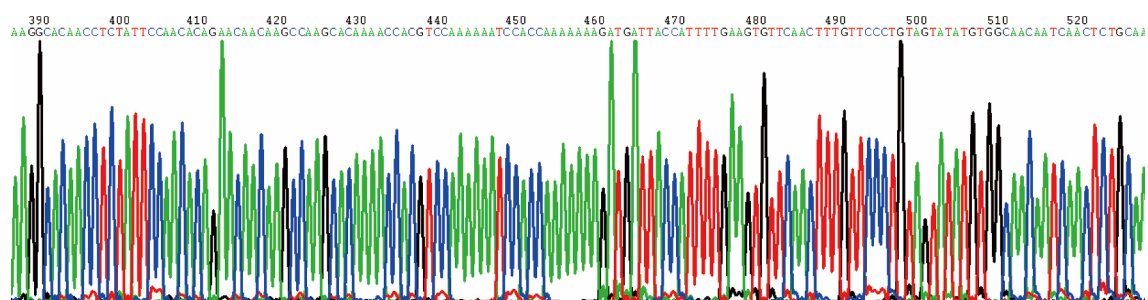


图4 RSV的B亚型扩增产物正向核苷酸测序峰图

2.5 B亚型产物反向核苷酸序列及测序峰图

B亚型扩增产物反向核苷酸序列为 CATTTCGACC AGGTTGAGTAGAGAGTTGCTGTTGGGTTG TGTGTTTTGATGTGGTTGTGTCAAGCGCA ATGGATTGTGAGGTGCTGGTGTCCCTTTC TGTGTGTTTTGATGTGGTTATGTTCGAGCA CAGTGGATTGTGGGGTGTGGTGTCTCTTT CTGTAGTCTTGGGGGTTGGTTTTTTTTGTT GGGTTAATGGTGGTTTCTTTTTTCGGTGT TTTGGCTAGTGTTTTGGGGTCTCTTTTGT TTGTGGTTTTTGGTAGGTGGTTTGTGTGTT GGGTTTTGTAGTTGGTTTTTTCTTTGGTT TATTGCTTGGTATTGTTTTTGCAAATGGA TTTGCAGAGTTGATTGTTGCCACATATAC TACAGGGAACAAAGTTGAACACTTCAAAAT GGTAATCATCTTTTTTTTGGTGGATTTTTTG

GACGTGGTTTTGTGCTTGGCTTGTGTTCT GTGTTGGAATAGAGGTTGTGCCTTTGGTGT GTGCTGTTGTATGGTGTGTTTCTGATTTTG TATTGGGTGATATTGTGGCTGAGTTTGTGT GGATTGGTGGTGTGGCTGTGGGTGTTTGG ATGGGCCAACCCTTTCTGGTGAGACCTGAG TAAGGTAAGTGGTTATGTTTTTCTCAGTGT GGTTTTTTTATTGTTTGAAGTGTGACAGTTG TTAGTGTAACCTTTGTGATTGGCAGAGATGA TGAATATTATGGCTGCAATTATAAGAGAG GTTGAGATTATCATTGCCAAAAGTATAG TGCTATTTGTGCTATAGATTTTAAATTTAA TTTGTATAACAAGAGGATATTACAATTA GATGATTAAGAGTATCCCAGGTCTTCTTCT AAAGTCCTGGCAGTGCGTTGA。部分测序峰图见图5。

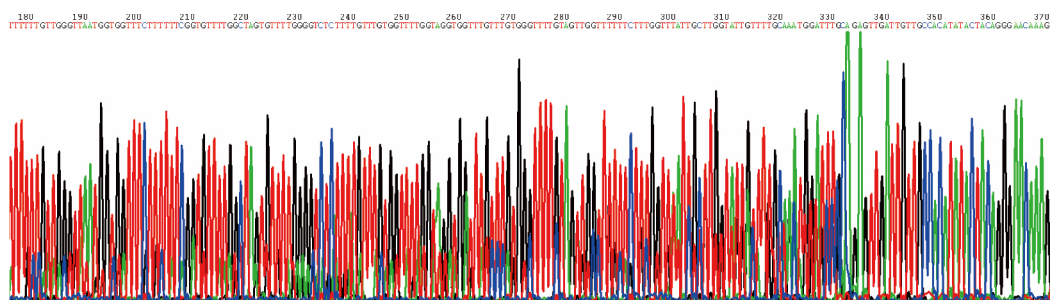


图5 RSV的B亚型扩增产物反向核苷酸测序峰图

2.6 RSV A、B亚型及混合感染在不同疾病中的分布情况 RSV A、B亚型及混合感染感染率分别为 82.0%(41/50)、14.0%(7/50)和 4.0%(2/50)，差异有统计学意义($P < 0.05$)；A、B亚型及混合感染在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中的感染率分别为 100.0%

(3/3)、100.0%(29/29)、47.1%(8/17)和 100.0%(1/1)，0.0%(0/3)、0.0%(0/29)、41.2%(7/17)和 0.0%(0/1)，0.0%(0/3)、0.0%(0/29)、11.8%(2/17)和 0.0%(0/1)。A亚型在4种疾病各组之间差异有统计学意义($P < 0.05$ ，表1)。

表 1 RSV A、B 亚型及混合感染在不同疾病中的分布情况(%)

RSV 亚型	总例数	感染率	急性喉气管支气管炎(<i>n</i> =3)		支气管肺炎(<i>n</i> =29)		急性支气管炎(<i>n</i> =17)		急性上呼吸道感染(<i>n</i> =1)	
			例数	阳性率	例数	阳性率	例数	阳性率	例数	阳性率
A	41	82.0	3	100.0	29	100.0	8	47.1	1	100.0
B	7	14.0	0	0.0	0	0.0	7	41.2	0	0.0
A+B	2	4.0	0	0.0	0	0.0	2	11.8	0	0.0
合计	50	100.0	3	100.0	29	100.0	17	100.0	1	100.0

2.7 RSV 特异性抗体 IgM、IgG 和 IgA 阳性率情况
RSV 阳性患儿血清中 IgM、IgG 和 IgA 阳性率分别为 24.0%(12/50)、60.0%(30/50)和 22.0%(11/50)，差异有统计学意义($P < 0.05$)；IgM+IgG、

IgG+IgA、IgM+IgG+IgA 三种组合模式阳性率分别为 4.0%(2/50)、6.0%(3/50)和 16.0%(8/50)，差异无统计学意义($P > 0.05$ ，表 2)。

表 2 RSV 特异性抗体 IgM、IgG 和 IgA 阳性率情况(%)

性别	检测 例数	IgM		IgG		IgA		IgM+IgG		IgG+IgA		IgM+IgG+IgA	
		阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率
男	23	6	26.09	14	60.87	5	21.74	2	8.70	2	8.70	3	13.04
女	27	6	22.22	16	59.26	6	22.22	0	0.00	1	3.70	5	18.52
合计	50	12	24.00	30	60.00	11	22.00	2	4.00	3	6.00	8	16.00

2.8 不同年龄段产生 RSV 特异性抗体 IgM、IgG 和 IgA 的时间与 A、B 亚型的关系 A 亚型在 ≤ 0.5 岁、0.5~1 岁、1~5 岁、5~10 岁年龄段 7 d 内和 21 d 内产生 IgM 的阳性率分别为 0%和 0%、50%和 0%、60.0%和 20.0%、100%和 0%；A 亚型在 ≤ 0.5 岁、0.5~1 岁、1~5 岁、5~10 岁年龄段 7 d 内和 21 d 内产生 IgG 的阳性率分别为 100%和 0%、83.3%和 0%、71.4%和 14.3%、100%和 0%；A 亚型在 ≤ 0.5 岁、0.5~1 岁、1~5 岁、5~10 岁年龄段 7 d 内和 21 d 内产生 IgA 的阳性率分别为 0%和 0%、60.0%和 0%、33.3%和 33.3%、100%和 0%；B 亚型在 ≤ 0.5 岁、0.5~1 岁、1~5 岁、5~10 岁年龄段 7 d 内和 21 d 内产生 IgM 的阳性率分别为 0%和 0%、33.3%和 0%、0%和 20.0%、0%和 0%；B 亚型在 ≤ 0.5 岁、0.5~1 岁、1~5 岁、5~10 岁年龄段 7 d 内和 21 d 内产生 IgG 的阳性率分别为 0%和 0%、16.7%和 0%、0%和 14.3%、0%和 0%；B 亚型在 ≤ 0.5 岁、0.5~1 岁、1~5 岁、5~10 岁年龄段 7 d 内和 21 d 内产生 IgA 的阳性率分别为 0%和 0%、20.0%和 0%、0%和 33.3%、0%和 0%；A、B 混合型在 0.5~1 岁年龄段 7 d 内产生 IgM 和 IgA 的阳性率为 16.7%和 20.0%，详见表 3。

3 讨论

近年来 RSV 的流行病学研究发现，A、B 两个亚型在一个地区的某个流行季节里以一个亚型占优势、两个亚型交替流行为特征。RSV 表面的 G 蛋白是刺激机体产生保护性抗体最主要的病毒抗原之一，而不同的 RSV 亚型 G 蛋白所产生的保护性抗体不能有效地提供交叉保护，因此 RSV 亚型的存在可能就是引起反复感染的重要原因。Zlateva 等^[2]对比比利时连续 10 年的 RSV 流行病学监测发现 A、B 亚型每 3 年一个周期优势交替进行，这与 Cui 等^[3]对北京和 Agoti 等^[4]对肯尼亚地区的监测结果一致。

此次研究发现 RSV 以 A 亚型为主，且存在双重混合感染，与靳庆娥等^[5]报导的 A 亚型 78%较符合，但与董琳等^[6]报导的 A 亚型 46.2%差距较大，这可能与地域和流行季的差异性有关。A 亚型感染均能引起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，而 B 亚型感染仅在急性支气管炎中出现，且混合感染并未明显加重临床症状，其发病机制有待进一步研究。

目前国内外对于 RSV 早期特异性抗体 IgM、IgG 和 IgA 产生的时间，没有很明确的结论，国内吴桂玲等^[7]报道 IgM 为感染后 7~10 d 产生，但其

研究未做相应的 RSV 抗原检测,存在一定的假阳性。由表 2 可以看出 RSV 阳性患儿血清中 IgM、IgG 和 IgA 阳性率分别为 24.0%、60.0% 和 22.0%,这与赵瑞卿等^[8]报道的 IgM 阳性率 27.9%较一致,与陈桂冰等^[9]报道的 IgA 阳性率 80.95%有一定差距,这可能与选择的研究对象和检测方法不同有关。此次研究课题组选择的是已确诊为 RSV 感染且有明显临床呼吸道症状的儿童,在 IgM 检测前血清样本已经过处理,排除干扰因

素造成的假阳性。由表 2 也可以看出男女不同性别组阳性率无明显差异,这说明 IgM、IgG 和 IgA 的产生不受性别影响。此次研究并未发现 IgA 和 IgM 同时出现的情况,且 IgA 不单独出现,常与 IgG 同时检出或三者同时出现。IgA 和 IgG 出现最早的时间段是 RSV 感染出现临床症状的第 2 天,由于 IgG 受母婴垂直传播和继往感染等多重因素影响,由此推断 IgA 是最早产生的抗体。

表 3 不同年龄段产生 RSV 特异性抗体 IgM、IgG 和 IgA 的时间与 A、B 亚型的关系(%)

年 龄	抗体时间	总例数	A 亚型		B 亚型		A+B 混合型	
			例数(n)	阳性率	例数(n)	阳性率	例数(n)	阳性率
≤ 0.5 岁	IgM ≤ 7 d	0	0	0	0	0	0	0
	IgM ≤ 21 d		0	0	0	0	0	0
	IgG ≤ 7 d	13	13	100	0	0	0	0
	IgG ≤ 21 d		0	0	0	0	0	0
	IgA ≤ 7 d	0	0	0	0	0	0	0
	IgA ≤ 21 d		0	0	0	0	0	0
0.5~1 岁	IgM ≤ 7 d	6	3	50.0	2	33.3	1	16.7
	IgM ≤ 21 d		0	0	0	0	0	0
	IgG ≤ 7 d	6	5	83.3	1	16.7	0	0
	IgG ≤ 21 d		0	0	0	0	0	0
	IgA ≤ 7 d	5	3	60.0	1	20.0	1	20.0
	IgA ≤ 21 d		0	0	0	0	0	0
1~5 岁	IgM ≤ 7 d	5	3	60.0	0	0	0	0
	IgM ≤ 21 d		1	20.0	1	20.0	0	0
	IgG ≤ 7 d	7	5	71.4	0	0	0	0
	IgG ≤ 21 d		1	14.3	1	14.3	0	0
	IgA ≤ 7 d	3	1	33.3	0	0	0	0
	IgA ≤ 21 d		1	33.3	1	33.3	0	0
5~10 岁	IgM ≤ 7 d	1	1	100	0	0	0	0
	IgM ≤ 21 d		0	0	0	0	0	0
	IgG ≤ 7 d	2	2	100	0	0	0	0
	IgG ≤ 21 d		0	0	0	0	0	0
	IgA ≤ 7 d	2	2	100	0	0	0	0
	IgA ≤ 21 d		0	0	0	0	0	0

由表 3 可以看出 ≤ 0.5 岁的患儿感染 A 亚型仅 IgG 在 7 d 内检出阳性, IgM 和 IgA 在 3 周内均未产生,这说明年龄越小,在机体免疫系统功能不完善的情况下,产生相应特异性抗体所需的时间越

久,而检测出来的 IgG 很可能是由母婴垂直传播产生的(此研究成果另文发表)。耿学辉等^[10]研究发现 IgG 属母传抗体,初生婴儿脐血与产妇静脉血中的抗体水平一致,婴幼儿感染 RSV 后,机体

产生的抗 RSV 的 G 蛋白特异性 IgG 抗体反应受年龄因素影响最大。0.5~1 岁的患儿感染 A、B 亚型在 7 d 内均能产生各种抗体。1~5 岁的患儿感染 B 亚型产生各种抗体的时间比 A 亚型稍慢, A 亚型在 7 d 内大多数均能产生相应抗体, 说明机体对 B 亚型的免疫应答比较慢, 其原因有可能是其致病力决定的。5~10 岁的患儿感染 A 亚型同样在 7 d 内均能产生各种抗体。由表 3 可以发现, B 亚型在 ≤ 0.5 岁和 5~10 岁这两个年龄段未出现过抗体, 这有可能是由于本次实验收集的病例数过少, 也有可能是由于母婴垂直传播的高滴度 IgG 对 B 亚型有一定的抵抗力, 对机体有一定的保护作用, 这与刘玉华等^[11] 研究结果显示 IgG 水平的高低与年龄及病情的严重程度有相关性, 在 RSV 感染过程中可能起到一定保护作用的观点较符合; 而随着年龄的增长, 机体免疫系统功能逐步完善, 对 B 亚型的抵抗力增强, 同时也说明 B 亚型的致病力可能比 A 亚型弱, AB 亚型混合感染并未加重患儿的临床症状这一特征更加证实了这一观点。这与 Jafri 等^[12] 提出的 A 亚型临床感染程度比 B 亚型严重的观点不谋而合。近年来, 国内许多学者都在研究 RSV 疫苗, 李宏勇等^[13] 研究不同佐剂对疫苗增强免疫的机制, 为病毒疫苗研制开拓了思路。RSV 感染后, 免疫力不强, 再感染很常见, 但临床症状大多越来越轻。RSV 感染出现临床症状越久, 3 种抗体同时出现的概率越大。

徐淑屏等^[14] 以急性期和恢复期 IgG 血清效价升高 4 倍作为 RSV 近期感染的确诊依据。冷红春等^[15] 和吴桂玲等^[7] 以 RSV 的 IgM 作为早期诊断依据, 同时发现对照组健康献血员血清中 IgM 也有一定的阳性率。陈桂冰等^[9] 以 RSV-Ag 和 RSV-IgA 同时检测作为 RSV 感染早期诊断的依据。由表 3 可以看出 RSV A、B 亚型产生特异性抗体 IgM、IgG 和 IgA 并没有在某个年龄段或感染后一定时间段内有特别显著性差异, 因此可以推测 RSV 与其无明显相关性。A、B 亚型及混合感染最快产生 IgM 的时间较一致, 均为 3 d。IgA 产生最早为 2 d, 且不存在。IgM 和 IgA 阳性率偏低, 容易导致误诊和漏诊, IgG 受母婴胎传和继往感染因素影响, 故三者均不适合作为 RSV 感染早期辅助诊断的特异性指标。

参考文献

[1] Shi T, Mclean K, Campbell H, *et al.* Aetiological role of

common respiratory viruses in acute lower respiratory infections in children under five years: A systematic review and meta-analysis[J]. *J Glob Health*, 2015, 5(1): 010408.

- [2] Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaecker N, *et al.* Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(9): 3022-3030.
- [3] Cui GL, Zhu RN, Qian Y, *et al.* Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups A and B in children in recent five consecutive years[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75020.
- [4] Agoti CN, Mayieka LM, Otieno JR, *et al.* Examining strain diversity and phylogeography in relation to an unusual epidemic pattern of respiratory syncytial virus (RSV) in a long-term refugee camp in Kenya[J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14: 178.
- [5] 靳庆娥, 乌姍娜, 刘玉华, 等. 探讨婴幼儿呼吸道合胞病毒感染及与白介素 4 的相关性[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2016, 30(6): 570-572.
- [6] 董琳, 歹丽红, 樊节敏, 等. 浙南地区下呼吸道感染儿童呼吸道合胞病毒基因型流行病学特征及与病情的关系[J]. *中华儿科杂志*, 2015, 53(7): 537-541.
- [7] 吴桂玲, 王丽. 呼吸道合胞病毒检测在下呼吸道感染中的应用[J]. *医药世界*, 2009, 11(9): 497-498.
- [8] 赵瑞卿, 王新科, 胡海珍, 等. 急性下呼吸道感染患儿抗体变化的研究[J]. *中华医学感染学杂志*, 2015, 25(16): 3808-3810.
- [9] 陈桂冰, 刘心亮, 徐淑屏. 呼吸道合胞病毒抗原、抗体检测对早期感染诊断的意义[J]. *现代检验医学杂志*, 2007, 22(1): 99-100.
- [10] 耿学辉, 王之梁, 钱渊, 等. 北京地区正常人群血清中呼吸道合胞病毒 F 和 G 蛋白特异性 IgG 抗体水平的观察[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1996, 16(6): 442-446.
- [11] 刘玉华, 龚明敏, 宋燕燕, 等. 呼吸道合胞病毒(RSV)F 和 G 糖蛋白抗体反应与 RSV 肺炎的临床关系[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1996, 10(2): 110-113.
- [12] Jafri HS, Wu X, Makari D, *et al.* Distribution of respiratory syncytial virus subtypes A and B among infants presenting to the emergency department with lower respiratory tract infection or apnea[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2013, 32(4): 335-340.
- [13] 李宏勇, 韩艳娟, 曾瑞红, 等. 佐剂 Al(OH)₃ 和 CpG2216 对福尔马林灭活呼吸道合胞病毒疫苗免疫增强的作用研究[J]. *现代免疫学*, 2016, 37(1): 50-54.
- [14] 徐淑屏, 余燕, 高雪, 等. ELISA 法检测呼吸道合胞病毒抗原、抗体方法学评价[J]. *中华临床医学研究杂志*, 2005, 11(10): 1458-1460.
- [15] 冷红春, 颜云盈. 呼吸道病毒特异性 IgM 抗体检测在儿童 ALRI 诊断中的临床应用价值[J]. *海南医学院学报*, 2014, 20(1): 120-122.

Study on the relationship between respiratory syncytial virus subgroups A and B and specific IgM, IgG and IgA in hospitalized children

WU Yi, JIN Xian, FAN Chun-hui, LU Xue-dong, ZHAO Yi (1. *Shenzhen Seven People's Hospital, Shenzhen 518081, China*; 2. *The Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen 518033, China*)

Abstract: To explore the correlation between respiratory syncytial virus (RSV) A, B subgroups and specific antibodies IgM, IgG and IgA in hospitalized children, we screened 50 cases of RSV-RNA positive patients through throat swab among hospitalized children by means of fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). The genotyping was performed according to the nucleotide sequence of the gene encoding G protein of RSV, and a single tube multiplex semi nested PCR primers was designed for A, B subgroups. RSV specific antibodies IgM, IgG and IgA in the serum were detected by ELISA. This study found that there is no relationship between any subgroups of the virus and the three isotypes tested of the specific antibody. The time took for the onset of IgM was the same for infection by subgroup A and B alone or in combination. IgA was produced earliest and did not exist alone; the longer the clinical symptoms persist, the greater the probability of coexistence of the three isotypic antibodies.

Key words: hospitalized children; RSV; subgroup; specific antibody; auxiliary diagnosis

~~~~~  
(上接第 275 页)

and HOMA- $\beta$ . 150 healthy controls and 100 T2DM patients in Yixing area were enrolled in this study. Peripheral blood T-lymphocyte subsets were measured by flow cytometry. Correlation analysis was employed to analyze the relationship among  $CD4^+/CD8^+$  to FPG, 2 h PG, HbA1C, HOMA-IR, HOMA- $\beta$ . ELISA was used to test the serum IL-2 and IL-17 levels. The results showed that the percentages of  $CD3^+$  T,  $CD4^+$  T,  $CD4^+/CD8^+$  T and NK of T2DM patients were lower than those of the healthy controls and  $CD4^+/CD8^+$  T cells were negatively correlated with FPG, 2 h PG, HbA1C, HOMA-IR and HOMA- $\beta$ . The percentages of  $CD8^+$  T, Tfh and IL-17 were higher than those of the healthy controls. These findings suggest that decrease of  $CD4^+/CD8^+$  T level in peripheral blood and the disorder of cellular and humoral immune regulation may be involved in the pathogenesis of elder type 2 diabetes mellitus.

**Key words:** Tfh; IL-17; T lymphocyte subsets; elder type 2 diabetes mellitus; blood glucose