

• 论 著 •

七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 在儿童肺炎支原体肺炎中的诊断价值

张玲玲, 李永玲, 裴启慧

(青海省西宁市第二人民医院儿科, 青海西宁 810003)

摘要:目的 探讨七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 在儿童肺炎支原体肺炎中的诊断价值。方法 选取 2016 年 5 月至 2019 年 5 月该院收治的儿童肺炎支原体肺炎患儿 120 例为支原体组、非儿童肺炎支原体肺炎患儿 120 例为非支原体组和体检健康儿童 120 例为对照组。酶联免疫吸附测定试验检测各组血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 水平。采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)的曲线下面积(AUC)分析七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 检测在儿童肺炎支原体肺炎中的诊断意义。结果 儿童肺炎支原体肺炎患儿血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 水平高于非儿童肺炎支原体肺炎患儿和体检健康儿童, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 单向诊断儿童肺炎支原体肺炎的灵敏度分别为 95.00% 和 92.50%, 特异度分别为 87.08% 和 90.42%, 准确度分别为 89.72% 和 91.11%。血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 联合对儿童肺炎支原体肺炎的诊断的灵敏度为 92.50%, 特异度为 90.83%, 准确度为 91.39%。结论 血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 水平检测可作为诊断儿童肺炎支原体肺炎的潜在标志。

关键词:七肽 TVNFKLY; 七肽 LPQRLRT; 儿童肺炎支原体肺炎; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.08.020

中图法分类号:R725.6

文章编号:1673-4130(2020)08-0974-04

文献标识码:A

Diagnostic value of heptapeptide TVNFKLY and LPQRLRT in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia

ZHANG Lingling, LI Yongling, PEI Qihui

(Department of Pediatrics, Second People's Hospital of Xining City, Xining, Qinghai 810003, China)

Abstract: **Objective** To investigate the diagnostic value of heptapeptide TVNFKLY and LPQRLRT in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia. **Methods** A total of 120 children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia admitted to a hospital from May 2016 to May 2019 were enrolled in the Mycoplasma group, 120 children with non-Mycoplasma pneumoniae pneumonia were non-Mycoplasma group and 120 healthy children were used as control group. The levels of heptapeptide TVNFKLY and LPQRLRT in the serum of three groups of subjects were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The diagnostic significance of heptapeptide TVNFKLY and LPQRLRT in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia was analyzed by AUC of receiver operating characteristic curve(ROC curve). **Results** The levels of heptapeptide TVNFKLY and LPQRLRT in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia were higher than those in children with non-Mycoplasma pneumoniae pneumonia and healthy children, the difference was statistically significant($P < 0.05$). The sensitivity of the seven-peptide TVNFKLY and LPQRLRT in the diagnosis of children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia was 95.00% and 92.50%, the specificity was 87.08% and 90.42%, respectively, and the accuracy was 89.72% and 91.11%, respectively. The sensitivity of the combination of heptapeptide TVNFKLY and LPQRLRT in the diagnosis of children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia was 92.50%, the specificity was 90.83%, and the accuracy was 91.39%. **Conclusion** The detection of the levels of heptapeptide TVNFKLY and LPQRLRT in serum can be used as a potential marker for the diagnosis of children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia.

Key words: heptapeptide TVNFKLY; heptapeptide LPQRLRT; children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia; diagnosis

作者简介:张玲玲,女,主治医师,主要从事儿童支原体感染疾病研究。

本文引用格式:张玲玲,李永玲,裴启慧. 七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 在儿童肺炎支原体肺炎中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(8):974-977.

肺炎支原体在儿童中可引起高达 40% 的社区获得性肺炎^[1]。但到目前为止,因为它有一些不寻常的症状^[2],导致肺炎支原体感染的早期诊断成为一个难点。肺炎支原体感染的实验室诊断基于血清学、培养和聚合酶链反应,但是它们各自都有特定的局限性^[3]。SHI 等^[4]通过噬菌体展示随机肽文库筛选了肺炎支原体的优势表位并获得两种七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT。然而,噬菌体展示随机肽文库筛选的模拟表位可能不是病原体特异性,尽管它们具有各种肺炎支原体抗原同源性。因此,迫切需要对基于血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 水平的儿童肺炎支原体肺炎患儿诊断效能进行有效评估。基于此,本研究旨在探讨七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 在儿童肺炎支原体肺炎中的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 5 月至 2019 年 5 月本院收治的儿童肺炎支原体肺炎患儿 120 例为支原体组;其中男 66 例,女 54 例,年龄 2~10 岁;平均(5.60±2.19)岁。非儿童肺炎支原体肺炎患儿 120 例为非支原体组;其中男 63 例,女 57 例,年龄 2~11 岁;平均(4.90±2.54)岁。儿童肺炎支原体肺炎患儿 120 例、非儿童肺炎支原体肺炎患儿 120 例均经本院病理科依据《实用儿科学》确诊。排除标准:(1)严重心、肝、肾功能损害者;(2)长期使用皮质类固醇激素及免疫抑制剂者;(3)患有癌症者。另选取同期本院体检健康儿童 120 例为对照组;其中男 64 例,女 56 例,年龄 2~11 岁;平均(5.30±2.40)岁。各组一般资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),可纳入此次分析。受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 酶联免疫吸附测定试验法(ELISA) 七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 的抗体由 Ontorespeptide 公司合成。合成的 anti-TVNFKLY 和 anti-LPQRLRT 均为兔源,且能适用于 ELISA 法和蛋白质免疫印迹法。采取儿童肺炎支原体肺炎患儿 120 例、非儿童肺炎支原体肺炎患儿 120 例和体检健康儿童 120 例的肘前静脉血 5 mL,进行 ELISA 检测(anti-TVNFKLY 和 anti-LPQRLRT)。

1.2.2 蛋白质免疫印迹法 使用 anti-TVNFKLY 和 anti-LPQRLRT 抗体作为一抗、抗兔 IgG 为二抗(购自天津泰泽兴业生物科技有限公司,货号:656120)。使用电化学发光系统检测相应蛋白质^[5]。

1.3 统计学处理 采用 PRISM 7.0 软件进行统计分析,组间比较采用 t 检验。ImageJ 软件定量分析免疫印迹条带。应用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)的曲线下面积(AUC)分析七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 检测儿童肺炎支原体肺炎的临床诊断价

值。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组受试人员基础临床资料比较 儿童肺炎支原体肺炎患儿在年龄、男性比例、体质量指数与非儿童肺炎支原体肺炎患儿比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。支原体组患儿在年龄、男性比例、体质量指数与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组受试人员基础临床资料				
组别	n	年龄 (岁, $\bar{x}\pm s$)	男性比例 [$n(\%)$]	体质量指数 (kg/m^2 , $\bar{x}\pm s$)
支原体组	120	5.6±2.19	66(55.00)	20.1±4.69
非支原体组	120	4.9±2.54	63(52.50)	21.5±4.88
对照组	120	5.3±2.40	64(53.33)	20.6±6.02

2.2 各组受试人员血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 水平比较 支原体组血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 的水平高于非支原体组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。非支原体组和对照组儿童血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 水平比较($\mu\text{g}/\text{mL}$, $\bar{x}\pm s$)				
组别	n	TVNFKLY	LPQRLRT	
支原体组	120	16.39±4.58* [#]	14.69±3.99* [#]	
非支原体组	120	4.51±2.81	2.98±2.04	
对照组	120	4.33±2.48	3.26±2.73	

注:与非支原体组比较,* $P<0.05$;与对照组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.3 各组血清中含七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 的蛋白条带比较 图 1、2 中使用七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 的抗体再采用蛋白质免疫印迹法检测各组血清中的七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 蛋白水平,支原体组蛋白条带的灰度值明显高于非支原体组与对照组,而非支原体组与对照组的蛋白条带的灰度值比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。因此,支原体组血清中含七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 的整体蛋白水平高于非支原体组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。非支原体组和对照组血清中含七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 蛋白水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1、2。

2.4 支原体组与对照组血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 的 ROC 曲线、AUC、灵敏度、特异度和截断值 为了评估血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 在支原体组与对照组诊断价值,绘制 ROC 曲线,见图 3。七肽 TVNFKLY 的 AUC 为[(0.92±0.02),95%CI 0.890 3~0.963 6],以七肽 TVNFK-

LY 的阳性临界值为 12.12 $\mu\text{g/mL}$, 其诊断灵敏度为 93%, 特异度为 90%; 七肽 LPQRLRT 的 AUC 为 $[(0.91 \pm 0.01), 95\%CI\ 0.873\ 2 \sim 0.953\ 3]$, 以七肽 LPQRLRT 的阳性临界值为 7.987 $\mu\text{g/mL}$, 其诊断灵敏度为 89%, 特异度为 92%。见表 3。

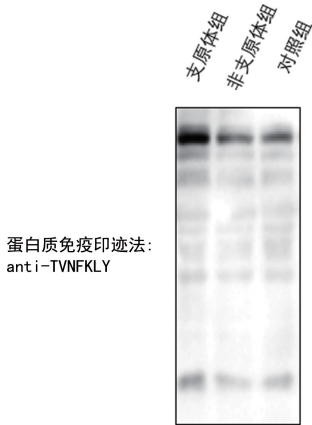


图 1 各组血清中含七肽 TVNFKLY 蛋白条带

2.5 七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 联合诊断儿童肺炎支原体肺炎 患有儿童肺炎支原体肺炎为真阳性, 未患有儿童肺炎支原体肺炎为真阴性, 以七肽 TVNFKLY 的阳性临界值 12.12 $\mu\text{g/mL}$, 七肽 LPQRLRT 的阳性临界值 7.987 $\mu\text{g/mL}$ 为诊断界限, 两者均满足则为联合诊断阳性, 反之则为联合诊断阴性。血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 单向诊断儿童肺炎支原体肺炎的灵敏度分别为 95.00% (114/120) 和 92.50% (111/120), 特异度分别为 87.08% (209/240) 和 90.42% (217/240), 准确度分别

为 89.72% (323/360) 和 91.11% (328/360)。血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 联合对儿童肺炎支原体肺炎的诊断的灵敏度为 92.50% (111/120), 特异度为 90.83% (218/240), 准确度为 91.39% (329/360)。见表 4。



图 2 各组血清中含七肽 LPQRLRT 的蛋白条带

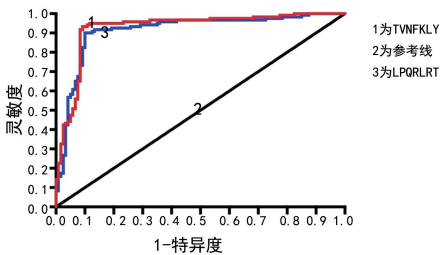


图 3 支原体组与对照组血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 的 ROC 曲线

表 3 支原体组与对照组血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 的各指标比较

检测变量	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数	AUC($\bar{x} \pm s$)	P	95%CI
TVNFKLY	93.00	90.00	0.84	0.92 $\pm$ 0.02	<0.05	0.890 3~0.963 6
LPQRLRT	89.00	92.00	0.81	0.91 $\pm$ 0.01	<0.05	0.873 2~0.953 3

表 4 七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 诊断儿童肺炎支原体肺炎(n)

诊断方法	类型	病理结果		合计
		阳性	阴性	
七肽 TVNFKLY 单向诊断	阳性	114	31	145
	阴性	6	209	215
七肽 LPQRLRT 单向诊断	阳性	111	23	134
	阴性	9	217	226
联合诊断	阳性	111	22	133
	阴性	9	218	227

3 讨 论

肺炎支原体是导致儿童社区获得性肺炎的最常见病原体之一^[6-10]。虽然儿童肺炎支原体肺炎通常被

认为是一种自限性疾病, 但有时它可能引起各种肺和肺外并发症, 如闭塞性细支气管炎、坏死性肺炎、脑炎、关节炎、心包炎、溶血性贫血, 并发展成严重的危及生命的肺炎。对于儿童, 大环内酯类抗菌药物是儿童肺炎支原体感染的首选抗菌药物。然而, 尽管大环内酯类抗菌药物治疗 7 d 或更长时间, 仍有一些病例显示为难治性儿童肺炎支原体肺炎。因此, 临床医生必须更早地识别儿童肺炎支原体肺炎并抓住合理治疗的适当机会。

本研究通过比较一般资料后通过 ELISA 检测儿童肺炎支原体肺炎患儿、非儿童肺炎支原体肺炎患儿和体检健康儿童血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 水平并评价其联合诊断儿童肺炎支原体肺炎的价值, 发现血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 联合

对儿童肺炎支原体肺炎的诊断的灵敏度为 92.50%，特异度为 90.83%，准确度为 91.39%。

使用噬菌体展示肽文库技术筛选的模拟表位可以模拟线性表位和构象表位，并且已经广泛用于许多疾病的诊断抗原或疫苗的开发，例如利什曼原虫，戊型肝炎病毒，狂犬病病毒^[11-15]。七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 是由噬菌体展示肽文库技术筛选的模拟表位。在本研究中，发现支原体肺炎患儿血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 水平高于非支原体组 and 对照组，差异有统计学意义($P < 0.05$)，并且血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 单向诊断儿童肺炎支原体肺炎的灵敏度分别为 95.00% 和 92.50%，特异度分别为 87.08% 和 90.42%，准确度分别为 89.72% 和 91.11%。七肽 TVNFKLY 与肺炎支原体的 21 种蛋白质具有高度同源性^[4]，包括腺嘌呤特异性甲基转移酶、 α/β 水解酶、ATP 依赖性伴侣 ClpB、金属依赖性磷酸水解酶。同时，七肽 LPQRLRT 与 8 种肺炎支原体蛋白具有高度同源性，包括苏氨酸-tRNA 连接酶、ABC 转运蛋白、ATP 结合蛋白。提示七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 具有较高的灵敏度和特异度，对肺炎支原体感染的血清学诊断均具有临床价值。

在本研究中，支原体组血清中含七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 的蛋白水平高于非支原体组 and 对照组，差异有统计学意义($P < 0.05$)。非支原体组 and 对照组血清中含七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 的蛋白水平比较，差异无统计学意义($P > 0.05$)。尽管儿童肺炎支原体肺炎患儿血清中用 anti-TVNFKLY 和 anti-LPQRLRT 检测到的蛋白质水平远远高于非支原体组 and 对照组，但是非支原体组 and 对照组的免疫印迹结果依旧有少许其他蛋白的存在。引起这现象的原因可能有两点：(1) 本研究所使用的抗体可能特异性不高；(2) 人类血清中可能含有 TVNFKLY 和 LPQRLRT 表位的非肺炎支原体蛋白质。

4 结 论

综上所述，血清中七肽 TVNFKLY 和 LPQRLRT 水平检测可作为诊断儿童肺炎支原体肺炎的潜在标志。

参考文献

[1] 武荣, 张巧丽, 徐霞. 儿童肺炎支原体肺炎治疗效果的超声评价[J]. 临床超声医学杂志, 2018, 229(5): 75-76.
[2] 朱美君, 徐明, 宋磊, 等. 2013—2015 年南通市第一人民医院儿童肺炎支原体感染病原菌的分布及耐药性分析[J]. 现代药物与临床, 2016, 31(5): 709-712.

[3] 李丹丹, 郎艳美, 石艳玺, 等. 儿童肺炎支原体肺炎继发细菌感染病原分析[J]. 临床儿科杂志, 2018, 36(4): 317-318.
[4] SHI W, ZHAO L, LI S, et al. Serological diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection by using the mimic epitopes[J]. World J Microbiol, 2018, 34(6): 82.
[5] DING C, HE J, ZHAO J, et al. β -catenin regulates IRF3-mediated innate immune signalling in colorectal cancer[J]. Cell Prolif, 2018, 51(5): e12464.
[6] 景霞, 鹿育萨. 肺炎支原体检测在社区获得性肺炎合并急性心肌梗死中的应用[J]. 中国药物与临床, 2017, 17(5): 688-690.
[7] 郭彩丽, 宋春兰, 成怡冰. 血液培养联合血液微生物抗体检测在社区获得性肺炎住院儿童诊断中的应用分析[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(5): 86-89.
[8] YANG H J, SONG D J, SHIM J Y. Mechanism of resistance acquisition and treatment of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children[J]. Korean J Pediatr, 2017, 60(6): 167-174.
[9] YANG M, MENG F, WANG K, et al. Interleukin 17A as a good predictor of the severity of Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 12934.
[10] DAI W, WANG H, ZHOU Q, et al. The concordance between upper and lower respiratory microbiota in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 92.
[11] LEDSGAARD L, KILSTRUP M, KARATTVELLATT A, et al. Basics of antibody phage display technology[J]. Toxins, 2018, 10(6): 236.
[12] ZHANG Y, ZHANG P, HE A, et al. Prokaryotic expression of MLAA-34 and generation of a novel human ScFv against MLAA-34 by phage display technology[J]. Oncotarget, 2017, 8(24): 39077.
[13] ZANGANEH S, NEJAD H R, MEHRABADI J F, et al. Rapid and sensitive detection of staphylococcal enterotoxin B by recombinant nanobody using phage display technology[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 187(2): 493-505.
[14] NIE H, LIU L, YANG H, et al. A novel heptapeptide with tyrosinase inhibitory activity identified from a phage display library[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2017, 181(1): 219-232.
[15] SAKAMOTO K, KAMADA Y, SAMESHIMA T, et al. K-Ras(G12D)-selective inhibitory peptides generated by random peptide T7 phage display technology[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484(3): 605-611.