

· 临床经验 ·

荧光定量 PCR 检测手足口病患儿童肠道病毒 RNA

钟天鹰¹ 陈倩² 胡正²

(南京医科大学附属南京儿童医院 1. 检验科; 2. 儿科研究所, 江苏 南京 210008)

[中图分类号] R446.1;725.1 [文献标识码] D [文章编号] 1008-8830(2010)02-0145-02

近年手足口病(hand-foot-mouth disease)在儿童中流行情况较为严重,由肠道病毒感染引起,可经消化道、呼吸道传播,易造成流行^[1]。主要表现为口腔黏膜溃疡性疱疹及四肢末端水疱样皮疹,主要病原为柯萨奇病毒 A 组 16 型(Cox A16)和肠道病毒 71 型(EV71)^[2]。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2009 年南京儿童医院确诊为手足口病,持续发热并出现嗜睡、易惊、烦躁不安、抽搐等神经、呼吸系统症状,住院隔离治疗的患儿 161 例。男 95 例,女 66 例。年龄最小 7 个月,最大 11 岁。手足口病诊断标准参照卫生部办公厅《手足口病诊疗指南(2008 年版)》^[3]。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集 征得患儿家长同意,采集咽拭子、粪便、血液及脑脊液标本共 161 份,其中咽拭子标本 155 份。咽拭子及粪便标本采集后放入 2 mL 生理盐水的无菌采样管中,立即送实验室检测;血标本及脑脊液标本直接送检。

1.2.2 检测试剂和方法 使用美国伯乐 iCycler IQ 全自动 PCR 仪,用荧光定量 PCR 对肠道病毒通用型 EV71 及 Cox A16 RNA 进行检测,试剂为广州中山医科大学达安基因股份有限公司研制开发的 PCR-荧光探针核酸检测试剂盒。

1.2.3 操作步骤 首先对肠道病毒通用型进行实时荧光定量 RT-PCR 检测,对肠道病毒阳性标本再进行 Cox A16 及 EV71 的检测,了解具体型别。

肠道病毒通用型 PCR 检测:取阴性质控品和咽拭子液(或脑脊液、粪便上清液、血清)各 100 μ L,放

置于 1.5 mL 灭菌离心管,加入 200 μ L Trizol 试剂及 100 μ L 氯仿,用振荡器强力振荡 20 s 后静置 3 min,12 000 rpm 离心 2 min;取无色上层液体移至新灭菌的 1.5 mL 离心管,加 10 μ L RNA 提取液 A,用振荡器充分混匀,8 000 rpm 离心 1 min 后,弃去液体;加入溶液 C 400 μ L,振荡混匀,8 000 rpm 离心 1 min,尽可能抽干液体;将离心管风干后加入 30 μ L DEPC H₂O,用移液器重悬,静置 1 min 后 8 000 rpm 离心 1 min,将上清液转移至新的 1.5 mL 灭菌离心管用于 PCR 检测。将 PCR 样本及阴阳性质控品各取 5 μ L 分别加入反应管中,每管加入肠道病毒通用型荧光定量 PCR 检测试剂,包括 EV RT-PCR 反应液 15 μ L,逆转录酶系 2 μ L,Taq 酶系 3 μ L,8 000 rpm 离心数秒,40℃ 25 min,1 个循环,94℃ 3 min,1 个循环;然后 93℃ 15 sec, $\rightarrow$ 55℃ 45 sec,循环 40 次。

对阳性标本再进行 Cox A16 和 EV71 的检测:提取核酸及实时荧光 RT-PCR 操作方法结果判定同上,引物改为 Cox A16 和 EV71 特异性引物。

1.2.4 评价标准 检测样本的扩增曲线无对数增长期或 Ct 值 >35 为阴性,样本 Ct 值 $\leq$ 33,且曲线有明显的对数增长期为阳性。可疑标本重新提取核酸进行检测。分析感染手足口病且在南京儿童医院住院的患儿感染病原体的类型。

1.2.5 统计学处理 所有数据使用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,全部采用 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肠道病毒阳性检出率

在 161 例患儿中,肠道病毒检出 91 例,总阳性检出率为 56.5%。其中 EV71 阳性 59 例(64.8%),

[收稿日期]2009-08-28;[修回日期]2009-09-18
[作者简介]钟天鹰,女,硕士,副主任技师。

Cox A16 阳性 12 例 (13.2%) , 20 例 (22.0%) 为其他肠道病毒感染。

161 例患儿中, 送检脑脊液标本 3 份, 未检出肠道病毒阳性; 血液标本 2 份, 1 例 EV71 阳性; 粪便标本 1 份, EV71 阳性; 咽拭子标本 155 份, 肠道病毒阳性 89 例, 其中 EV71 阳性 57 例, 占阳性标本的 64.0% , Cox A16 阳性 12 例, 占阳性标本的 13.5% , 20 例 (22.5%) 为其他肠道病毒阳性。

2.2 EV71 和 Cox A16 检测阳性率的年龄分布

不同年龄段患儿感染 EV71 的阳性检出率差异有显著性, 年龄小的婴幼儿更易感染 EV71。不同年龄段患儿 Cox A16 的阳性检出率差异无统计学意义。见表 1。

表 1 不同年龄段患儿 EV71 和 Cox A16 感染情况 [例(%)]

年龄(岁)	例数	EV71 阳性	Cox A16 阳性
0~2	82	26(31.7)	5(6.1)
~3	43	24(55.8)	2(4.7)
~5	26	7(26.9)	4(15.4)
>5	10	2(20.0)	1(10.0)
χ^2 值		9.89	3.18
P 值		<0.05	>0.05

3 讨论

手足口病是由肠道病毒引起的传染病, 多发于婴幼儿, 可引起手、足和口腔等部位疱疹, 严重会导致其他脏器并发症。引发手足口病的肠道病毒有 20 多种(型), 柯萨奇病毒 A 组的 16、4、5、9、10 型, B 组的 2、5 型以及 EV71 均为手足口病较常见的病原体, 其中以 Cox A16 和 EV71 型最常见。感染多发于春夏季节, 主要通过飞沫、被污染的玩具及手经粪-口传播。

手足口病的病原最早发现是 Cox A16, 以后发现柯萨奇病毒其他部分组型也可引起手足口病。自 1969 EV71 首次在美国被报道后, 人们逐渐认识到 EV71 病毒是手足口病的主要病原, 近年来在亚太地区, 其感染呈上升趋势^[4-5]。1998 年台湾有 13 万手足口病患者, EV71 和 Cox A16 是主要病原, 二者比例为 5:2^[6]。1985 年以前 Cox A16 是国内手足口病的唯一病原^[7]。2007 年张寿斌等^[2]检测 237 例手足口病患儿, 发现 EV71 阳性病例有 38 例, Cox A16 阳性病例 64 例。本研究检测 161 例临床标本, 肠道病毒阳性检出率为 56.5% , EV71 为主, 占肠道病毒的 64.8% , Cox A16 占肠道病毒的 13.2% 。本研究

显示 EV71 感染与年龄密切相关, 感染主要集中在 3 岁以内, 占 EV71 阳性的 84.8% , 而 Cox A16 及其他病毒感染与年龄无明显相关性。

人是 EV71 已知的唯一宿主及感染源, 患者和隐性感染者均为本病的传染源, 潜伏期 2~7 d^[8]。对肠道病毒的检测, 经典方法有病毒分离、中和抗体检测和免疫组织化学法^[9]。病毒分离检测时间长, 操作繁琐, ELISA 法检测抗体经济快速, 但由于从病毒感染到抗体出现需要一定时间, 用于疾病早期诊断灵敏度不高。分子生物学的飞速发展, 提供了快速、准确的检测手段。由于肠道病毒各型间的遗传相似性, 可应用肠道病毒 RNA 通用型引物进行检测, 同时对 EV71 和 Cox A16 根据其保守区特异性设计引物, 进行实时荧光 RT-PCR, 灵敏度高, 特异性强, 反应和分析完全在闭管的条件下完成, 防止 PCR 污染, 整个检测时间只需 4~5 h, 而且标本来源不受限制, 可以及时确定病原体。本研究用实时荧光 RT-PCR 法, 采集不同种类标本, 除脑脊液未检出病原体 RNA, 其他标本都有阳性结果。对于儿童, 用实时荧光定量 RT-PCR 法检测咽拭子标本, 采集方便, 阳性率高, 结果快速准确, 家长易于接受, 适合做为手足口的常规检测方法。

[参 考 文 献]

[1] 谢静, 李太生. 肠道病毒 71 型免疫学研究进展[J]. 中华传染病杂志, 2008, 26(7): 399-400.

[2] 张寿斌, 廖华, 黄呈辉, 谭玉瑜, 张炜灵, 黄艳, 等. 深圳 237 例手足口病肠道病毒血清型基因及临床特征[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(1): 38-41.

[3] 《手足口病诊疗指南(2008 年版)》. 卫办医政发(2008) 197 号. 2008-11-19.

[4] Lin TY, Chang LY, Hsia SH. The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management[J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(Suppl 2): S52-57.

[5] McMinn P, Lindsay K, Perera D. Phylogenetic 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia[J]. J Virol, 2001, 75(16): 7732-7738.

[6] Ho M, Chen ER, Hsu KH. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan[J]. N Engl J Med, 1999, 341(13): 929-935.

[7] 林思恩, 章青, 谢华萍, 谢健萍, 何家鑫, 董巧丽, 等. 我国广东、福建地区 2000~2001 年手足口病肠道病毒 71 型分离株的种系进化分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(3): 227-229.

[8] 高子芬, 陆敏. 肠道病毒 EV71 感染重症儿童的病理学特点[J]. 临床与实验病理学杂志, 2008, 24(5): 518-519.

[9] 龚黎明, 葛琼, 严菊英, 卢亦愚, 冯燕, 茅海燕, 等. 浙江省肠道病毒 71 型的分离与 VP1 区域序列分析[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(12): 971-974.

(本文编辑: 邓芳明)