

实时荧光 PCR 技术在手足口病检查中的应用

龙健灵, 叶俊琴, 李文瑞, 彭 琪, 何月敬, 程庆秋 (广东省东莞市石龙博爱医院儿科研究所 523325)

【摘要】 目的 采用实时荧光聚合酶链反应(PCR)法检测手足口病患者病原体。**方法** 收集 433 例疑似手足口病患儿的粪便标本进行肠道病毒通用型、肠道病毒 71 型(EV-71)和柯萨奇病毒 16 型(CA-16)鉴别与分析。**结果** 实时荧光 PCR 法检测 433 例患儿肛拭子标本使用通用型试剂盒检出 366 例阳性, 其中 66 例为 EV-71 感染, 151 例为 CA-16 感染。**结论** EV-71 和 CA-16 肠道病毒是手足口病的主要病原体, 该地区 2011 年以 CA-16 感染为主, 实时荧光 PCR 技术对手足口病的病原诊断具有重要价值。

【关键词】 手足口病; 肠道病毒; 实时荧光聚合酶链反应(PCR)

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 05. 005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)05-0522-02

Application of real-time fluorescence PCR in detection of HFM D LONG Jian-ling, YE Jun-qin, LI Wen-rui, PENG Qi, HE Yue-jing, CHENG Qing-qi (Pediatric Research Institute, Shilong Boai Hospital, Dongguan, Guangdong 523325, China)

【Abstract】 Objective To detect the pathogens of hand, foot and mouth disease (HFMD) by real-time fluorescence PCR. **Methods** The fecal samples in 433 children patients with suspected HFMD were collected for the identification and analysis of universal intestinal virus, EV-71 and CoxA-16. **Results** Among 433 rectal swab specimens detected by real-time fluorescence PCR, 366 specimens were positive, in which, 151 specimens were CA-16 infection and 66 specimens were EV-71 infection. **Conclusion** CoxA-16 and EV-71 viruses are the main pathogens in HFMD. CoxA-16 virus is the main pathogen of HFMD in the native area this year. Real-time fluorescence PCR technique has important value in the pathogen diagnosis of HFMD.

【Key words】 HFMD; intestinal virus; real-time fluorescence PCR

手足口病是肠道病毒引起的急性传染病,多在夏秋季节发生,具有流行性强、传染性强、传播途径复杂等特点,好发于儿童(5 岁以下)。手足口病较常见的病原体是柯萨奇病毒 A16 型(CoxA-16)和肠道病毒 71 型(EV-71)^[1]。特别是 EV-71 可出现无菌性脑膜炎、脑炎、脑脊髓炎等中枢神经系统病变,严重者致患者死亡^[2]。如何对手足口病的病原学进行快速检测,对手足口病的早期诊断、治疗和预后观察显得尤为重要。本文应用实时荧光逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测了 433 份手足口病患儿的粪便标本,分别测定肠道病毒通用型(EV)、柯萨奇病毒 A 组 16(CA-16)和 EV-71 核酸,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集本院 2011 年 5~12 月门诊及住院疑似手足口病患儿的标本 433 例,其中男 268 例,女 165 例,最大年龄为 14 岁,最小为 1 个月,平均年龄为 1 岁 10 个月,全部采集粪便标本,所收集标本均半小时内(冰敷)送至本实验室后放-20℃冰箱保存,集中检测。手足口病诊断标准参照卫生部颁布的《手足口病预防控制指南(2011 版)》^[3]。

1.2 仪器与试剂 采用中山大学达安基因股份有限公司提供的肠道病毒荧光 PCR 定性试剂,包括 EV-71、CA-16 和 EV 三种。采用美国 MX3000P 实时荧光定量 PCR 仪对标本进行检测。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 提取肠道病毒 RNA:用适量生理盐水把粪便标本重悬,取适量 1.5 mL 灭菌离心管,加入 Trizol 试剂 200 μ L 及氯仿 100 μ L,然后分别加入粪便重悬液、阴性质控品和阳性质控品 100 μ L,振荡器振荡 20 s 后静置 3 min。然后采用冷冻离心机 12 000 r/min 离心 2 min,将上清液(注意不能吸到中间的白膜)全部转移至新的 1.5 mL 灭菌离心管中,加 RNA 提取液 A 10 μ L,用振荡器充分混匀,冷冻离心机 8 000 r/min 离心 1 min 后,弃去上清液;加入 400 μ L 溶液 C(使用前需加无

水乙醇),振荡混匀,冷冻离心机 8 000 r/min 离心 1 min,弃去上清液,通风橱通风 15 min,待沉淀变白后,加入 DEPC 水 30 μ L,充分混匀后即成为白色悬浊液,待用于 PCR 扩增。

1.3.2 PCR 仪扩增 取适量 PCR 反应管,每管分别加入逆转录酶系 2 μ L、Taq 酶系 3 μ L 以及相应的 RT-PCR 反应液 15 μ L,然后向各管分别加入处理后的阴性质控、阳性质控和样本的 RNA 悬浊液 5 μ L,使总体积为 25 μ L,8 000 r/min 离心数秒,然后将 PCR 反应管放入实时荧光 PCR 仪,设置扩增条件:40℃ 25 min,1 个循环;94℃ 3 min,1 个循环;然后 93℃ 15 s→55℃ 45 s,在 55℃ 采集荧光信号,40 个循环。

1.3.3 结果判断 检测样本无典型 S 型曲线或 Ct>35 结果判断为阴性,样本呈典型 S 型曲线且 Ct≤35 结果判断为阳性。

1.3.4 统计学方法 使用 SPSS17.0 统计软件对所有数据进行分析,采用 χ^2 检验分析,检验水准为 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 433 份疑似手足口病患儿的粪便标本检测结果 EV 阳性 366 例,阳性率为 84.53%;EV、CA-16 双阳性 141 例,阳性率 32.57%;EV、EV-71 双阳性 66 例,阳性率为 15.24%,二者比较差异具有统计学意义($\chi^2=17.85, P<0.01$),表明本地区 2011 年手足口病患儿的 CA-16 和 EV-71 均有感染,但以 CA-16 为主。结果统计见表 1、表 2。

表 1 433 份粪便标本实时荧光 RT-PCR 检测 EV、CA-16 和 EV-71 阳性结果(n=433)

肠道病毒类型	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
EV	366	67	84.53
EV-71	66	367	15.24
CA-16	151	282	34.87

2.2 EV、CA-16 双阳性与 EV、EV-71 双阳性的年龄分布 3 岁以下患儿诊断为手足口病者 157 例,占 75.85%,表明手足口病的易感人群为 3 岁以下的婴幼儿。但各年龄段患儿 EV+CA-16 双阳性率与 EV+EV-71 双阳性率差异无统计学意义($\chi^2=2.60, P>0.05$)。见表 3。

肠道病毒类型	<i>n</i>	双阳性例数	非双阳性例数	阳性率(%)
EV+EV-71	433	66	367	15.24
EV+CA-16	433	141	292	32.56

表 3 EV、CA-16 双阳性与 EV、EV-71 双阳性的年龄分布[n(%)]

年龄(岁)	<i>n</i>	EV+CA-16 双阳性	EV+EV-71 双阳性
0.1~3	157	109(69.43)	48(30.57)
>3~5	42	27(64.29)	15(35.71)
>5	8	5(62.5)	3(37.5)

注:各年龄段患儿 EV+CA-16 双阳性率与 EV+EV-71 双阳性率的差异无统计学意义($\chi^2=2.60, P>0.05$)。

3 讨 论

手足口病是一种常见的肠道传染病,其常见病原体主要为 EV-71 和 CA-16,部分由肠道病毒 EV-71 型感染者的症状较严重,甚至出现少数患儿因中枢神经系统、循环系统、呼吸系统损害而导致死亡,引起社会广泛关注^[4]。然而此病是可预防、可控制、可治疗的,如果能够早期诊断、早期隔离、早期治疗,是可以治愈的,或者可以避免严重后果的发生。因此,如果能对手足口病病原学进行快速检测对该病的诊断、治疗以及预后极其重要。目前手足口病诊断以临床表现为主要手段,传统的实验室诊断方法有病毒分离、中和试验和 ELISA 等^[5]。病毒分离为诊断的金标准,但病毒分离时间长,要求高,需要特殊设备,而且操作繁琐,不利于快速诊断。血清中和试验和 ELISA 检测的是患者体内的抗体,然而抗体的产生较慢,并且其诊断灵敏度不高,故不适用于早期诊断。实时荧光 PCR 技术对手足口病的病原诊断具有重要价值,它操作简便,稳定性良好,重现性好^[6],可以在 3~4 h 内获得检测结果,可以作为手足口病肠道病毒的快速检测方法,为临床及时采取救治方案提供一种早期诊断依据^[7-8]。

本实验室采用实时荧光 RT-PCR 对本院 433 份疑似手足口病患儿粪便标本进行了检测,其中 EV 阳性 366 例,阳性率为 84.53%,CA-16 检出率为 34.87%,EV-71 的检出率为 15.24%;EV、CA-16 双阳性 141 例,阳性率 32.57%;EV、EV-

71 双阳性 66 例,阳性率为 15.24%,表明本地区 2011 年手足口病患者中 CA-16 和 EV-71 均有感染,但 CA-16 阳性率明显高于 EV-71,表明本地区今年以 CA-16 感染为主($P<0.01$)。然而有相当部分标本(约 40.71%)检出了 EV 病毒通用型,而 EV-71 和 CA-16 却均未检出,表明还存在除 EV-71 和 CA-16 以外的其他型别的肠道病毒所致的感染,究竟为何种肠道病毒感染还有待于进一步确认。

综上所述,作者认为实时荧光 RT-PCR 在手足口病的诊断应用中,因其检测标本类型范围广,既可采用大便或肛拭子标本,也可采用咽拭子、疱疹液等标本等进行检测,标本采集方便,家长易于接受;而且能够在 3~4 h 内获得检测结果,结果快速、准确,操作简便,可以作为手足口病肠道病毒的常规检测方法。并且还可以对手足口病病原学进行初步分型,对该病的早期诊断、治疗以及预后均有极其重要的作用。

参考文献

[1] 张畅斌,尹爱华,何天文,等.一种经济便捷的手足口病原 RNA 提取方法[J].中国现代药物应用,2010,4(21):81-82.

[2] Chen SC,Chang HL,Yan TR,et al. An eight-year study of epidemiologic features of enterovirus 71 infection in Taiwan[J]. Am J Trop Med Hyg,2007,77(1):188-191.

[3] 中华人民共和国卫生部.手足口病诊疗指南(2011 年版)[S].北京:中华人民共和国卫生部,2011.

[4] 田玲,汪楠,张宏梁,等.手足口病(EV71)防治[J].首都医科大学学报,2008,29(3):253-256.

[5] 吴海波,郭潮潭.肠道病毒 71 型检测方法研究概况[J].国际流行病学传染病学杂志,2008,35(3):188-190.

[6] 陈禄彪,张广铮,施巧素,等.手足口病病原的荧光 PCR 法检测及其临床特点——附 20 例分析[J].新医学,2009,40(7):464-466.

[7] 何雅青,何丽芸,姚相杰,等.荧光定量 RT-PCR 快速检测手足口病病原研究[J].中国热带医学,2008,8(10):1675-1677.

[8] 王七生,秦金勇,蒋立立.实时荧光 PCR 技术在手足口病原学检查中的应用[J].中国医药导报,2011,8(17):90-91.

(收稿日期:2012-08-28 修回日期:2012-11-07)

(上接第 521 页)

对深部真菌感染诊断的临床意义[J].中国真菌学杂志,2011,6(3):136-138.

[6] Hachem RY,Gontoyalli DP,Chemaly RF,et al. Utility of galac-tomannan enzyme inmunoassay and(1,3)- β -D-glucan in diagnosis of invasive fungal infection low sensitivity for Aspergillus fumigatus infection in hematologic malignancy patients [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(1): 129-133.

[7] 金欣,陈建魁,于农,等.真菌 D 葡聚糖检测对侵袭性肺部真菌感染的临床意义[J].河北医药,2011,33(3):378-379.

[8] 孟祥红,王冬,董梅,等.血浆 1,3- β -D 葡聚糖检测的临床意义[J].中国实验诊断学,2010,14(8):1298-1299.

[9] 闻平.血清内毒素和(1,3)- β -D 葡聚糖检测方法的探讨[J].上海医学检验杂志,2001,16(2):96-97.

[10] 李世荣,王红,文艳.血浆(1,3)- β -D 葡聚糖与抗深部白色念珠菌感染药物疗效关系的实验研究[J].临床和实验医学杂志,2007,6(6):20-22.

[11] 杨洁琼.深部真菌感染患者血浆(1,3)- β -D 葡聚糖检测的临床价值[J].现代检验医学杂志,2009,24(2):12-13.

(收稿日期:2012-08-23 修回日期:2012-11-17)