

不同标本及组合对荧光探针法诊断儿童手足口病的价值评估

秦 涛(重庆市九龙坡区妇幼保健院检验科 400051)

【摘要】 目的 评估不同临床标本及组合在实验室采用荧光探针法诊断儿童手足口病的价值。**方法** 收集 680 例临床诊断为手足口病的咽拭子和肛拭子标本,其中有溃疡表征的标本 223 例,有疱疹液的标本 522 例,有脑膜炎症状的血清和脑脊液标本 76 例,采用荧光探针法检测肠道病毒肠道病毒 71 型(EV71)、柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)及通用型。**结果** 单一标本肠道病毒通用型咽拭子阳性检出率(70.29%)最高,其余依次为肛拭子(65.15%),疱疹拭子(63.03%),溃疡拭子(43.95%),脑脊液(2.63%),血清(1.32%);对于有全套标本的患儿咽拭子确诊率达 74.15%,咽拭子与疱疹拭子组合确诊率达 91.7%,咽拭子与肛拭子组合确诊率为 89.26%,全套标本组合将诊断率提升至 95.61%;单独一个的疱疹拭子与溃疡拭子诊断率分别为 63.03%和 43.95%,当疱疹拭子与溃疡拭子为 2 个诊断率分别为 66.67%和 47.09%,当疱疹拭子与溃疡拭子为 3 个诊断率分别为 67.24%和 47.98%,大于等于 4 个时诊断率将不再提升。**结论** 对手足口病标本进行实验室检测时,首选咽拭子标本,将咽拭子与其他标本组合将明显提升诊断率;血清和脑脊液标本对临床诊断是否感染手足口病不是必须的选择;对于暴发手足口病采集全套咽拭子、肛拭子、疱疹拭子、溃疡拭子标本十分必要;采集疱疹拭子与溃疡拭子标本时同时采集 2~3 个拭子是较为可靠的做法。

【关键词】 手足口病; 标本; 荧光探针法

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.16.052 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)16-2425-03

Evaluation on value of different samples and their combination in diagnosis of hand-foot-mouth disease by fluorescence probe method QIN Tao (Department of Clinical Laboratory, Jiulongpo District Maternal and Child Health Care Hospital, Chongqing 400051, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the value of different clinical samples and their combination in the diagnosis of hand-foot-mouth disease (HFMD) by adopting fluorescence probe method. **Methods** 680 throat swabs and rectal swabs of clinically diagnosed HFMD were collected, in which 223 cases had ulcer symptom, 522 cases had herpes liquid and 76 cases of serum and cerebrospinal fluid had meningitis symptoms. Then enterovirus EV71, CA16 and universal enterovirus were detected by adopting the fluorescence probe method. **Results** The positive rate of universal enterovirus in single throat swabs was 70.29%, showing the highest detection rate, followed by the rectal swab (65.15%), herpes swab (63.05%), ulcer swab (43.95%), cerebrospinal fluid (2.63%) and serum (1.32%); the definite diagnosis rate of throat swab with whole set of samples reached 74.15%, which of the combination of throat swab plus herpes swabs reached 91.7%, which of the combination of throat swab and rectal swab reached 89.26%, while which of whole set of samples was increased to 95.61%; the diagnosis rates of single herpes swab and ulcer swab were 63.03% and 43.95% respectively, while which of two herpes swabs and two ulcer swabs were 66.67% and 47.09% respectively, which of three herpes swabs and three ulcer swabs were 67.24% and 47.98% respectively, while which of 4 or more swabs each was not upgraded. **Conclusion** In conducting the laboratory detection of HFMD samples, the throat swab is the first choice, the combination of throat swab with other samples would significantly increase the diagnosis rate; serum and cerebrospinal fluid samples are not necessary choice for clinically diagnosing whether HFMD infection. It is very necessary to collect the whole set of throat swab, rectal swab, herpes swab and ulcer swab for the outbreak of HFMD, simultaneously collecting 2-3 herpes swabs and ulcer swabs is a relatively reliable way.

【Key words】 HFMD; samples; fluorescence probe method

手足口病(HFMD)是近年一种常见的发热性疾病;多发于婴幼儿中,表现为皮肤与口腔黏膜病变、斑丘疹或疱疹,通常出现在手掌或脚掌上,也可波及臀部、肘部及膝盖。口腔溃疡是最为常见的黏膜疹,某些患者还会出现疱疹性咽峡炎。2008 年 5 月我国卫生部将手足口病纳入法定报告的丙类传染病,而且已成为我国各类传染病中发病数最高的丙类传染病^[1]。肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)均为引

发 HFMD 的主要病原体。为了评估不同标本及组合使用荧光探针法检测 HFMD 的价值,本实验室对临床诊断为 HFMD 的患儿根据表征不同采集了咽拭子、肛拭子、溃疡面拭子、疱疹拭子及血清、脑脊液进行检测,以期发现更优化的标本组合,从而为临床 HFMD 的诊断及日常病原学监测提供准确有效依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1 月至 2014 年 3 月本院收治的

HFMD 患儿 680 例,其中男 399 例,女 281 例,年龄 3~125 个月,平均年龄(30±8)个月。当儿童出现以下(至少 1 种)发病征象时,即被临床诊断为 HFMD:手掌和(或)脚掌出现斑丘疹和(或)水疱疹;口腔出现小水泡或溃疡,或疱疹性咽峡炎(又称为多发性口腔溃疡,以口腔后部为主)^[2]。

1.2 标本采集 采集咽拭子时,需配合使用压舌器;取样时,用轻柔而灵敏的动作擦拭咽后部及两侧(不能触碰舌头与峡黏膜)。采集直肠拭子标本时,先将拭子插入肛门,然后旋转擦拭肛门周围及直肠壁。仔细检查患儿的皮肤上是否有水泡,口腔内是否有溃疡;若有,则用棉签擦拭至少 1 个(最大或最容易接触的)病变部位,以采集疱疹拭子和(或)溃疡拭子标本。在采集疱疹拭子时,需先用 0.9% 的无菌生理盐水轻柔地擦拭取样部位;禁止使用酒精,有可能会杀灭病毒。使用一根无菌针刺破水泡,然后再用拭子吸取水泡液;也可用拭子轻柔地在水泡上翻滚挤压,以挤出水泡液。若疑似中枢神经系统(CNS)损伤的患儿伴有发热史、发热症状(体温大于或等于 38 ℃)或以下症状(至少 1 个)时,采集其脑脊液和血清标本。(1)外观呈现毒性或病变;(2)再发性呕吐(至少两次);(3)心跳过速(心率大于 150 次/分);(4)呼吸急促;(5)神志衰减(易怒、嗜睡、精神欠佳、昏迷);(6)四肢无力、假性脑膜炎(颈强直或克氏征)或癫痫。

表 1 不同类型标本的肠道病毒阳性检出率

标本类型	EV71			CA16			通用型		
	阳例数(n)	总例数(n)	阳性率(%)	阳例数(n)	总例数(n)	阳性率(%)	阳例数(n)	总例数(n)	阳性率(%)
肛拭子	165	680	24.26	188	680	27.65	443	680	65.15
咽拭子	197	680	28.97	209	680	30.74	478	680	70.29
疱疹拭子	108	522	20.69	136	522	26.05	329	522	63.03
溃疡拭子	36	223	16.14	41	223	18.39	98	223	43.95
血清	0	76	0.00	1	76	1.32	1	76	1.32
脑脊液	2	76	2.63	0	76	0.00	2	76	2.63

表 2 疱疹拭子和溃疡拭子的采样数量与阳性数量之间的关系

标本类型	每例患儿拭子数(n)	至少有一个拭子呈阳性的患儿人数(n)	阳性率(%)
疱疹	1	329	63.03
	2	348	66.67
	3	351	67.24
	≥4	351	67.24
溃疡	1	98	43.95
	2	105	47.09
	3	107	47.98
	≥4	107	47.98

2.2 标本组合分析 680 例受测患儿中,同时具备疱疹与溃疡表征的患儿为 205 例,这一分析的研究对象仅为具备全套标本的患儿(血清和脑脊液阳性检出率非常低,不进一步作为本分析标本)。单独使用咽拭子确诊了 152 例(74.15%);单独使用疱疹拭子确诊了 138 例;单独使用直肠拭子确诊了 134 例;单独使用溃疡拭子确诊了 92 例,咽拭子的阳性检测率仍是最高,故将咽拭子作为第 1 标本。若同时加入疱疹拭子进行检测,则肠道病毒通用型阳性增至 179 例;若同时加入直肠拭子进行检测,肠道病毒通用型阳性为 174 例;若同时加入溃疡拭子进行检测,肠道病毒通用型阳性为 155 例。在此基础上,可

将疱疹拭子作为第 2 标本,此时加入直肠拭子结果通用型阳性数为 188 例;加入溃疡拭子结果则为 183 例。以此类推,加入直肠拭子作为第 3 标本,加入溃疡拭子作为第 4 标本。得到通用型肠道病毒阳性数为 196 例,诊断率将升至 95.61%(196/205)。

1.3 荧光探针法检测 EV71 型、CA16 型和肠道病毒通用型核酸检测试剂盒为中山大学达安基因股份有限公司产品,标本处理与一步法荧光探针法 RT-PCR 检测具体操作参考说明书执行。

2 结 果

2.1 不同标本的肠道病毒阳性检出率 肠道病毒通用型荧光探针法的核酸扩增体系包含了 EV71 和 CA16 的扩增引物,因此通用型的阳性率可作为不同标本的阳性检出率指标,通用型咽拭子(70.29%)>肛拭子(65.12%)>疱疹拭子(63.03%)>溃疡拭子(43.95%),其中咽拭子阳性检出率最高。680 例患儿咽拭子标本中 197 例(28.97%)为 EV71 阳性,209 例(30.74%)为 CA16 阳性,其中有 23 例 EV71 合并 CA16 阳性。本次研究根据患儿的临床表征进行了血清和脑脊液检查,受测患儿共计 76 例;荧光探针法血清检出病毒的仅为 1 例,脑脊液检出病毒仅 2 例。见表 1。

将疱疹拭子作为第 2 标本,此时加入直肠拭子结果通用型阳性数为 188 例;加入溃疡拭子结果则为 183 例。以此类推,加入直肠拭子作为第 3 标本,加入溃疡拭子作为第 4 标本。得到通用型肠道病毒阳性数为 196 例,诊断率将升至 95.61%(196/205)。

2.3 疱疹拭子和溃疡拭子的采样数量与阳性数量之间的关系 检测中为 522 例出现水疱疹的 HFMD 患儿采集了至少 1 个(平均值为 2 个,范围 1~10 个)疱疹拭子;为 223 例出现溃疡的 HFMD 患儿采集了至少 1 个(平均值为 2 个,范围 1~6 个)溃疡拭子。检测结果显示,63.03% 的单次疱疹拭子检测呈阳性,43.95% 的单次溃疡拭子检测呈阳性。见表 2。

3 讨 论

自 1997 年以来,HFMD 在亚太地区的多次爆发,带来了巨大的经济损失与社会负担^[3-5]。部分患儿可能并发病毒性脑炎、脑脊髓炎,个别患儿病情发展迅猛,继发脑干脑炎、神经源性脑水肿、肺出血,严重者甚至发生死亡^[6]。为了明确 HFMD 病原体感染源,临床检验需面对各种不同的标本,并从中选出最为有效的检测方案。

近年来,大部分关于 HFMD 感染的研究手段大多为粪便培养与咽拭子分析^[5-7]。结果显示,后者的灵敏度更高,咽拭子检测结果呈阳性的比例为受测患儿的 90%~95%;而粪便培养结果呈阳性的比例则仅为受测患儿的 40%~65%,且少见针对 HFMD 大标本进行系统性研究^[7-8]。2000 年,新加坡爆发了大规模的 HFMD;当时有人对 175 例 HFMD 患者进行了

调查研究,其研究报告指出,病毒诊断率由高到低依次为:直肠拭子、粪便标本、疱疹拭子、咽拭子。但是,本研究结果却发现,对于大部分患儿而言,咽拭子是阳性诊断率最高的单一标本:在 205 例具备全套标本的患儿中,其阳性诊断率为 152 例(74.15%);在 680 例受测患儿中,其阳性诊断率为 478 例(70.29%)。

HFDM 患儿的疱疹一般出现在起病初期,通常几天后消失,应提示临床选择最佳的检测时机。有学者曾从 4 例患儿的疱疹拭子中分离出了病毒^[8]。在本实验室检测的病例中,有近一半患儿出现了皮肤疱疹,研究结果证明,疱疹拭子检测有较高的阳性检出率。在出现疱疹表征的患儿中,疱疹拭子的诊断率列第 2 位,205 例接受检测患儿的阳性检出率为 138 例(67.31%),相对无菌的疱疹液在病原学诊断上也更有价值。

为了找出标本组合的最优数量,在采集疱疹拭子时,可试着采集多个单独的疱疹拭子并进行叠加。研究发现,当为每位受测患儿采集 1 个疱疹拭子时,阳性检出率为 63.03%;当该数量增至 2 个时,阳性检出率达到 66.07%;当该数量增至 3 个时,阳性检出率升至 67.04%,当大于等于 4 个时阳性率不再增加。因此建议,在采集疱疹液时,1 个疱疹拭子应同时擦拭吸取 2~3 个水疱的疱疹液。这种做法可以使病毒检出率最大化,而无需增大标本处理量。

本研究报告显示,血清和脑脊液的病毒检出率较低,76 例合并无菌性脑膜炎的 HFMD 患儿中仅发现血清检出 1 例,脑脊液检出 2 例,这一发现与有关报道相吻合^[9]。

此外,本研究还逐一一对单个标本进行了检查,以期发现最有效的标本组合。具体方法为:确定一种首选标本,再根据不同临床表现组合其他类型的标本,从而提高诊断阳性率。在 HFMD 的大规模流行期,在为患儿诊断时最好同时采集(至少)2 个标本——咽拭子与另一其他类型拭子。若患儿未出现疱疹表征,则第 2 标本应为直肠拭子;若患儿出现了疱疹表征,

则第 2 标本应为疱疹拭子(采集至少 2 个水疱的水疱液)。为患儿采集全套标本,在检测中根据阶梯分析法,从最有效的标本着手,进行合理的组合检测,可以更加准确地为重症病例提供病原学诊断依据。

参考文献

- [1] 朱启谔,曾玫.手足口病的流行现状及挑战[J].微生物与感染,2012,7(2):82-88.
- [2] 卫生部.手足口病预防控制指南(2009 版)[J].全科医学临床与教育,2010,8(2):125-127.
- [3] 何颜霞,付丹,操德智,等.重症手足口病分组监护治疗 80 例分析[J].中华儿科杂志,2009,47(5):338-343.
- [4] 毛国顺,罗玲,刘晓琳,等.手足口病轻症与重症患者临床特征比较[J].中华传染病杂志,2008,26(7):387-390.
- [5] 初艳慧,刘潇潇,孙小宇,等.重症手足口病例的临床特征和流行病学分析[J].实用预防医学,2014,21(9):38-39.
- [6] 李丽.手足口病普通和重症病例临床特征及病原学研究[J].实用医学杂志,2011,27(14):2660-2662.
- [7] 杨晓红,吴茜,温柏平,等.2010 年昆明地区儿童手足口病病原分子流行病学调查研究[J].中国当代儿科杂志,2012,14(3):163-166.
- [8] Chan LG,Parashar UD,Lye FG,et al. Deaths of children during an outbreak of hand,foot,and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group[J]. Clin Infect Dis,2000,31(3):678-683.
- [9] 李娟娟,苏明,王玉肖.不同标本及其组合在手足口病诊断中的意义[J].实用预防医学,2014,21(1):1006-1009.

(收稿日期:2015-02-22 修回日期:2015-05-08)

(上接第 2424 页)

关系密切,也提示 Ang II 介导的炎性反应与高血压晨峰之间存在一定的相关性。临床上为降低 MCP-1、CCR2 等炎症因子的损伤,有必要对高血压患者血压晨峰异常者加以干预,通过各种方式减少血压晨峰的出现,从而减少心血管事件的发生,这对维护患者的健康有积极意义。

参考文献

- [1] 黄红,周燕,李惠仙,等.老年高血压患者血压晨峰与颈动脉粥样硬化及缺血性脑卒中发病的相关性[J].中国老年学杂志,2012,32(22):4885-4887.
- [2] 曹琳,倪琦,陈芳,等.老年人高血压晨峰现象对颈动脉粥样硬化的影响[J].中国基层医药,2010,17(24):3337-3339.
- [3] 孔繁荣,郭红梅,丁秀萍,等.老年原发性高血压患者晨峰现象与靶器官损害[J].实用老年医学,2009,23(5):376-378.
- [4] 周国良,冯瑞儿,廖娅玲.高血压患者昼夜血压变化类型及降压治疗的影响[J].广州医学院学报,2007,35(5):24-26.
- [5] 刘芳超,康金锁,黄辰,等.血压晨峰与血糖、血脂的关系初步探讨[J].中国循环杂志,2013,28(8):586-589.
- [6] 胡小亮,路方红,刘振东,等.原发性高血压患者血压晨峰

与心血管疾病危险因素相关性分析[J].中华高血压杂志,2012,27(8):800.

- [7] 宋越红,李建英,黄国秀.老年原发性高血压患者血压晨峰与心血管疾病危险因素相关性研究[J].临床心血管病杂志,2008,24(5):366-368.
- [8] 裴志勇,姚依群.血压晨峰现象的研究现状[J].中华老年心脑血管病杂志,2012,14(7):767-769.
- [9] 李雅丽,张巧俊,袁海峰,等.自发性高血压大鼠海马区 MCP-1、COX-2、NF- κ B 表达及神经元损伤的增龄性变化[J].西安交通大学学报:医学版,2014,35(4):437-441.
- [10] 蔡智刚,唐新征,张毅. MCP-1/CCR2 在老年高血压不同证型中的表达[J].临床合理用药杂志,2013,6(23):88-89.
- [11] 朱飞云,刘卫红,王小晓,等.瞬时受体电位香草酸亚型 1 受体及 C-C 趋化因子受体 2 在盐敏感性高血压所致肾脏损害中的作用[J].中国医学科学院学报,2014,36(5):488-495.
- [12] 孙邈,崔琳,刘卫红,等.C-C 趋化因子受体 2 在盐敏感性高血压所致肾脏损害中的作用[J].中国医学科学院学报,2013,35(1):29-35.

(收稿日期:2015-02-20 修回日期:2015-04-20)