

手足口病患者柯萨奇病毒核酸检测结果分析*

王武琦¹, 苏国生^{2△}, 韦善求² (1. 广西壮族自治区玉林市中医医院检验科 537000; 2. 广西壮族自治区南宁市第四人民医院/广西医科大学附属南宁市传染病医院/广西艾滋病临床治疗中心, 南宁 530023)

【摘要】 目的 探讨手足口病患者柯萨奇病毒核酸检测的临床应用价值。**方法** 利用实时荧光聚合酶链反应技术, 以 EV71/CA16 基因组编码区的高度保守区为靶区域, 设定特异性引物及荧光探针, 通过一步法 RT-PCR 扩增对 EV71 RNA/CA16 RNA 进行检测。**结果** 在 428 份患者标本中, EV71-RNA 阳性 136 份, CA16-RNA 阳性 6 份, 其中有 1 例患者既是 EV71-RNA 咽拭子和肛拭子均阳性又是 CA16-RNA 咽拭子阳性。而有 40 例 (80 份标本) 患者 EV71-RNA 咽拭子和肛拭子均阳性, 46 份 EV71-RNA 单独肛拭子阳性, 10 份 EV71-RNA 单独咽拭子阳性。在 6 份 CA16-RNA 阳性患者标本中, 4 份为肛拭子阳性, 2 份为咽拭子阳性。**结论** 手足口病患者柯萨奇核酸检测对重症患者判断预后有重要的指导意义, 对指导临床合理制订治疗方案有重要的参考价值, 值得推广应用。

【关键词】 手足口病; 柯萨奇病毒; 核酸检测; 基因

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 18. 016 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)18-2688-02

Analysis on results of Coxsackie virus nucleic acid detection in HFMD patients* WANG Wu-qi¹, SU Guo-sheng^{2△}, WEI Shan-qiu² (1. Department of Clinical Laboratory, Yulin Municipal Hospital of Chinese Medicine, Yulin, Guangxi 537000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Nanning Municipal Fourth People's Hospital/Guangxi AIDS Clinical Treatment Center, Nanning, Guangxi 530023, China)

【Abstract】 Objective To investigate the clinical application value of Coxsackie virus nucleic acid detection in the patients with hand-foot-mouth disease (HFMD). **Methods** The real-time fluorescent PCR technology was adopted, with a highly conserved region of EV71/CA16 genomic coding regions as the target area, the specific primers and fluorescent probes were set, EV71 RNA/CA16 RNA was detected by the one-step method of RT-PCR amplification.

Results In 428 patients samples, 136 cases were EV71-RNA positive, 6 cases were CA16-RNA positive, including 1 case of EV71-RNA positive in throat swabs and anal swabs and CA16-RNA positive in throat swab. And there were 40 cases (80 specimens) of EV71-RNA positive in swabs and anal swabs, 46 cases of single EV71-RNA positive in anal swab, 10 cases of single EV71-RNA positive in throat swabs. In 6 cases of CA16-RNA positive specimens, 4 cases were positive in anal swab, two cases were positive in throat swab. **Conclusion** The Coxsackie nucleic acid testing in HFMD patients has an important guiding significance for judging the severe patients and their prognosis and has an important reference value for guiding clinic to formulate the treatment plan.

【Key words】 foot and mouth disease; coxsackie virus; nucleic acid detection; gene

近几年来, 玉林市手足口病的暴发流行有着逐年上升的趋势, 并且已经成为当前玉林市儿童急性传染病的重要疾病, 防控工作非常严峻。发病范围由点到面, 迅猛增长, 患病儿童病死率也呈逐年增高的发展趋势。由于手足口病的传播途径非常复杂, 病原体种类繁多, 且目前没有相应的疫苗可以预防, 因此至今没有较好的预防控制措施^[1-3]。手足口病是由多种肠道病毒感染引起的一种常见传染病, 在核酸分型中主要以 EV71 型和 CA16 型最多见。多以婴幼儿发病最高, 随着疾病的发展, 10~18 岁的儿童感染的概率也屡见不鲜, 大多数患者发病症状较轻, 以发热和口腔、手、足、臀部等部位的皮疹或疱疹为主要特征, 部分患儿有咳嗽、恶心、呕吐、食欲不振、流涕和头疼等症状, 少数患者可并发严重的心肌炎, 无菌性脑膜炎以及肺水肿等致命性并发症^[4-5]。广西医科大学附属南宁市传染病医院作为南宁市唯一一家综合性三级传染病医院, 一直是本市手

足口病的定点治疗医院。为了解 2012 年广西医科大学附属南宁市传染病医院柯萨奇病毒核酸检测的结果及临床应用, 现将检测相关情况报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年在本院住院治疗的 214 例手足口病患儿咽拭子和肛拭子共计 428 份标本进行核酸检测, 患儿年龄 4 个月至 10 岁, 平均年龄 1 岁零 8 个月, 男性多于女性, 本年度感染高发期在 4~8 月。感染患儿以散居儿童为主, 其次为幼儿, 最后为学生。

1.2 核酸检测方法 利用实时荧光聚合酶链反应 (PCR) 技术, 以 EV71/CA16 基因组编码区的高度保守区为靶区域, 设定特异性引物及荧光探针, 通过一步法逆转录 PCR 扩增对 EV71 RNA/CA16 RNA 进行检测。

1.2.1 标本采集 (1) 咽拭子样本: 采集患者发病 3 d 内的咽

* 基金项目: 广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题 (Z2010483)。

作者简介: 王武琦, 女, 本科, 主管技师, 主要从事临床医学检验研究。 △ 通讯作者, E-mail: suguoshengv@sina.com。

拭子样本,用专用采样棉签,适度用力拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位,应避免触及舌部;迅速将棉签放入装有 3~5 mL 保存液(维持液或生理盐水,推荐使用维持液)的采样管中,在靠近顶端处折断棉签杆,旋紧管盖并密封,以防干燥。(2)肛拭子样本:采集患者发病 7 d 内的肛拭子样本,采样方法同咽拭子。(3)疱疹液:可同时采集多个疱疹作为 1 份样本。先用 75%乙醇对疱疹周围的皮肤进行消毒,然后用消毒针将疱疹挑破用棉签蘸取疱疹液,迅速将棉签放入内装有 3~5 mL 保存液(维持液或生理盐水,推荐使用维持液)的采样管中,在靠近顶端处折断棉签杆,旋紧管盖并密封。(4)标本保存和运送:标本可立即用于测试,也可保存于-40℃待测,保存期为 4 个月。长期保存,请置于-70℃。标本运送时应采用 0℃冰壶。

1.2.2 样本处理及 RNA 提取 (1)拭子样本强烈振荡 1 min,取 100 μ L(待测样本不足 100 μ L 时请补加适量生理盐水重悬),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,然后 12 000 r/min 离心 2 min。(2)小心取出无色上层液体(注意不可触及中间絮状层),转移至新灭菌的 1.5 mL 离心管,然后加入 10 μ L RNA 提取液 A(充分混匀后吸取),再用振荡器充分混匀,8 000 r/min 离心 1 min 后,小心弃去所有液体。(3)加入溶液 C(确认已加入无水乙醇)400 μ L,充分振荡混匀,8 000 r/min 离心 1 min,尽可能将液体去除干净(避免触及沉淀颗粒)。(4)将装有沉淀的离心管摆在通风橱中风干 15 min(也可使用开放式加热器于 60℃干燥 5 min,需防止样本交叉污染),然后加入 30 μ L DEPC H₂O,吸打混匀管中沉淀,得到白色的悬浊液,可直接用于检测,也可存于-70℃待用。

1.2.3 注意事项 PCR 荧光定量检测法比较容易受污染,所以试验过程中应尽量避免反复开盖,所用耗材均需高压灭菌;RNA 提取步骤建议冰上操作;吸取血清/血浆时注意勿带入红细胞;试剂使用前要完全解冻,但应避免反复冻融;RNA 提取液 A 必须充分混匀后吸取,RNA 提取液 B 需溶解混匀后使用;逆转录成 cDNA 后,需马上进行下一步试验,否则请转移上清至灭菌 EP 管,保存于-20℃待用;试验完毕应用有效氯浓度为 1 000 mg/L 的健之素消毒液擦拭桌面,打开紫外线灯消毒 30 min 以上。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 版统计软件进行统计分析,计数单位采用 χ^2 检验进行分析,计量单位采用 *t* 检验进行分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

在 428 份患者标本中, EV71-RNA 阳性 136 份, CA16-RNA 阳性 6 份,其中有 1 例患者既是 EV71-RNA 咽拭子和肛拭子均阳性又是 CA16-RNA 咽拭子阳性。而有 40 例(80 份标本)患者 EV71-RNA 咽拭子和肛拭子均阳性, 46 份 EV71-RNA 单独肛拭子阳性, 10 份 EV71-RNA 单独咽拭子阳性。在 6 份 CA16-RNA 阳性患者标本中, 4 份为肛拭子阳性, 2 份为咽拭子阳性。在 214 例患者中有 6 例由于病情严重送入 ICU 进行治疗,有 3 例患者 EV71-RNA 咽拭子和肛拭子均阳性并有 1 例包含了 CA16-RNA 咽拭子阳性。此 3 例患者由于转入 ICU 后病情继续加重, 医治无效病死, 其余单纯 1 份标本 EV71-RNA 阳性患者病情好转救治成功。

3 讨 论

由柯萨奇病毒引起的手足口病是一种风险较高的传染病,其预防控制措施多以控制传染源为主,切断传播途径并进行广

泛深入的手足口病防治健康教育,提高广大群众的自我保护意识^[6]。当前本地区手足口病的防控工作主要还是切断传播途径、保护易感人群。在以往经验和防控措施的基础上,进一步完善各项防控措施,坚持不懈抓落实。加大传染源归口管理,严格按照规定隔离患者和疑似患者,减少接触传播,减少第 2 代患者发生;加强区域小学及托幼机构的管理,坚持晨检和消毒工作,发现可疑病患需及时报告并隔离;加强手足口病的防治宣教工作,将防控措施及方法传达给每位儿童家长;做好调查研究及科研工作,寻求更好的防控方法。

柯萨奇病毒作为一种单股正链小 RNA 病毒,其基因长度为 7.4 kb,碱基对(G+C)的浓度大约为 47%。两端为保守的非编码区,中间为编码区^[7]。5'端以共价键结合 1 个小分子蛋白质 Vpg(约 7×10^3),其作用与病毒 RNA 的合成和基因的组装配有关;3'端则带有 polyA 尾。编码区编码的病毒结构蛋白 VP1~VP4 与 CoxV、EV71 一样,VP1、VP2 和 VP3 均暴露在病毒衣壳的表面,具有中和抗原位点;VP4 位于衣壳内部,病毒 VP1 一旦与受体结合后,VP4 即被释出,衣壳松动,病毒基因组脱壳穿入^[8]。5'非编码区没有多聚嘧啶区和多聚 C 区。柯萨奇病毒在气候变暖的季节里,容易污染环境,适合生存在湿、热的环境下并疯狂地传播;病毒比较耐热,失活温度在 50℃以上,在 4℃下可存活 1 年以上,而在-20℃下可长期保存,因此,在常规环境下可长期存活^[9]。柯萨奇病毒存在核苷酸多态性或毒力位点的变异性。免疫功能不全的婴幼儿易感染,只要接触被病毒污染的外环境,就有可能被感染^[10]。由于婴幼儿皮肤肤质较嫩,暴露部位较多,防护能力差,病原极易侵入机体而感染。

本研究结果显示,手足口病患者柯萨奇病毒核酸检测结果发现基因型 EV71-RNA 感染率较高,而 CA16-RNA 感染率较低,但从病情发展情况看,CA16-RNA 感染的严重程度较高,很难进行救治,往往病情加重并发心肌炎而病死。另外, EV71-RNA 咽拭子和肛拭子同时阳性的患者,其病情也较单一标本阳性者严重,更难医治,病死的危险率增高。由此可见,可疑手足口病患者,入院后及时进行柯萨奇病毒核酸检测,了解核酸的多态性和变异性,更有利于病患的救治。

综上所述,手足口病患者柯萨奇核酸检测在临床上具有重要的临床意义,对重症患者而言,病原学的诊断对判断预后和指导临床合理制订治疗方案有重要的参考价值,值得推广应用。

参考文献

- [1] 海岩,王文瑞,郭卫东,等. 内蒙古地区 2010 年柯萨奇病毒 A 组 16 型 VP1 区序列测定及系统进化分析[J]. 中华流行病学杂志,2013,34(5):539-540.
- [2] 梅玉发,王喜云,崔龙,等. 湖北省十堰市 59 例柯萨奇病毒 A 组 6 型手足口病流行病学特征与临床特点分析[J]. 疾病监测,2013,28(12):981-983.
- [3] 张建华,江炳福,程险峰,等. 肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A16 型分离株的 VP1 基因特征分析[J]. 东南大学学报:医学版,2013,32(2):173-179.
- [4] 杨国梁,马超锋,陈海龙,等. 2013 年西安地区柯萨奇病毒 A6 流行情况及基因特征[J]. 西安交通大学学报:医学版,2014,35(4):486-489.
- [5] 高勇,韩明锋,李秀勇,等. 阜阳市 2011(下转第 2693 页)

化,因此阿奇霉素的 MICs 更易受到 pH 值的影响。由于 pH 值降低导致了 MIC 的显著增加,耐药表型也随之增加。在酸性环境中,所有细菌显示出耐药表型。其可能的作用机制为在酸性 pH 值条件下大环内酯类药物抗菌活性丢失。研究发现,大环内酯类抗菌药物不仅可通过 5 位上的氨基去氧糖与 A2058 靶点结合,其 C-11、C-12 氨基甲酸酯侧链还能与第 2 靶点 A752 结合,且结合力更强,从而发挥抗耐药菌活性^[11]。方向群和刘又宁^[12]研究表明罗红霉素能提高亚胺培南对生物被膜的渗透,从而增强其对生物被膜上铜绿假单胞菌的抑菌活性。体外诱导耐药突变试验表明,在 pH 值为 6.0 时所有细菌都诱导发展为中敏或耐药菌。这一现象与其他学者报道的数据相一致^[13-15]。此外,酸性条件下细菌对大环内酯类的耐药性具有明显增加趋势。本研究表明,如果酸性环境能诱导体外细菌产生耐药性,那么也可能诱导呼吸道感染患者体内细菌的耐药性发展。因此,本研究评价酸性或碱性 pH 值对大环内酯类抗菌活性的影响对临床具有重要的指导意义。

人体血液 pH 为 7.35~7.45,体外金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌生长的最适 pH 值为 7.8~8.0,大环内酯类 MIC 最小的 pH 为 8.0,三者差异较大。而 pH 值对大环内酯类药物抗金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌活性影响较大,所以体外药敏试验选择金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌生长的最适 pH 值时,既要保证肺炎金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌生长又要尽量模仿体内条件以检测到药物真实的抗菌效果,同时还要考虑药物在体内的抗菌活性和代谢产物对酸碱度的影响。故认为金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌体外药敏试验的液体培养基 pH 值 7.5 较为合适,金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌在肉汤中生长不形成浑浊,对营养要求苛刻,难于定量对药敏试验的准确性影响较大。最适 pH 值的确定或许可为金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌体外药敏试验的标准化提供了 1 项参考指标。

参考文献

- [1] 刘娟娟,宋毅斐,刘健.生物被膜在临床感染性疾病中的研究进展[J].中华医院感染学杂志,2010,20(4):598-600.
- [2] 王睿.细菌生物被膜的产生与临床意义[J].中华医学杂志,2004,84(22):1915-1918.
- [3] Marea J, Peczu MW. Positioning and configuration of key atoms influence the topology of [13]-macrolidides [J]. J Org Chem, 2013, 78(15): 7414-7422.
- [4] 尹永芹,孔令义.树脂糖苷-大环内酯类化合物的结构解析研究[J].时珍国医国药,2009,20(3):517-520.

- [5] Mallegol J, Fernandes P, Seah C, et al. Determination of in vitro activity of solithromycin at different pH and its intracellular activity tested against clinical isolates of Neisseria gonorrhoeae from a laboratory collection[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(9): 4322-4328.
- [6] Desmond RT, Magpusao AN, Lorenc C, et al. Denovo macrolide-glycolipid macrolactone hybrids: Synthesis, structure and antibiotic activity of carbohydrate-fused macrocycles[J]. Beilstein J Org Chem, 2014, 10(1): 2215-2221.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twelfth informational supplement [S]. M100-S12. Pennsylvania: NCCLS, 2002; 1-33.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2 部)[Z]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 XI, 83.
- [9] 李中兴, 郑家齐, 李家宏. 临床细菌学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 364.
- [10] 龙燕, 陈万宁. 不同 pH 值对大环内酯类药物抗肺炎支原体活性的影响[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(1): 63-64.
- [11] 李赞, 徐进宜, 顾觉奋. 酮内酯类抗菌药物的结构修饰研究进展[J]. 今日药学, 2010, 5(20): 1.
- [12] 方向群, 刘又宁. 亚胺培南联合罗红霉素对铜绿假单胞菌生物被膜的作用[J]. 中国抗菌药物杂志, 2009, 34(11): 688-690.
- [13] Batard E, Juvin ME, Jacqueline C, et al. Influence of carbon dioxide on the MIC of telithromycin for Streptococcus pneumoniae: an in vitro-in vivo study[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(1): 464-466.
- [14] Banche G, Roana J, Allizond V, et al. In vitro compared activity of telithromycin and azithromycin against north-west Italian isolates of Streptococcus pyogenes and Streptococcus pneumoniae with different erythromycin susceptibility[J]. Lett Appl Microbiol, 2008, 47(4): 309-314.
- [15] Seral C, Van Bambeke F, Tulkens PM. Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and oritavancin (LY333328) activities against intracellular Staphylococcus aureus in mouse J774 macrophages[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(1): 2283-2292.

(收稿日期: 2015-03-25 修回日期: 2015-04-18)

(上接第 2689 页)

- 年手足口病实验室检测结果分析[J]. 检验医学, 2013, 28(9): 796-800.
- [6] 宋建, 都鹏飞, 程邦宁, 等. 合肥市 0~14 岁人群柯萨奇病毒 A 组 16 型和肠道病毒 71 型的感染状况调查[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 21(7): 1013-1015.
- [7] 殷继东, 伍仕敏, 项杰, 等. 2011 年武汉及周边城市手足口病病原学及流行病学研究[J]. 军事医学, 2013, 37(6): 435-438.
- [8] 许国章, 倪红霞, 易波, 等. 浙江省宁波市 2008~2011 年

- 手足口病流行病学及病原学特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(4): 361-365.
- [9] 谭徽, 谢群, 何清懿, 等. 湖南省郴州市 2009~2011 年手足口病流行病学特征研究[J]. 现代预防医学, 2014, 41(2): 329-332.
- [10] 梁勇彪, 屈雅川, 曹荣, 等. 手足口病感染病毒分布及感染趋势评估[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(22): 5485-5487.

(收稿日期: 2015-04-15 修回日期: 2015-05-25)