

手足口病病原体核酸在患者不同样本中的分布

王成勇 王建 高远征 张公文 马俊

【摘要】 目的 探讨手足口病患者不同样本病毒检出率差异,为手足口病检测样本的选择和疫情控制提供一定依据。**方法** 用实时荧光定量PCR技术,通过一步法RT-PCR扩增对55例临床确诊为手足口病住院患儿的咽拭、肛拭、血液和尿液样本进行肠道病毒71型(EV71)和柯萨奇病毒A16型(CoxA16)PCR-荧光探针核酸检测。**结果** 本组患者咽拭样本阳性37例(67.3%),肛拭样本阳性34例(61.8%),差异无统计学意义($\chi^2=0.8, P>0.05$);血液样本阳性13例(23.6%),尿液样本阳性9例(16.4%),差异无统计学意义($\chi^2=2.25, P>0.05$);血液、尿液样本阳性率同咽拭样本比较,差异均具有统计学意义(χ^2 分别为22.0和26.0, $P<0.005$);肛拭、咽拭均阳性的33例样本中有9例肛拭样本的循环阈值(CT)小于咽拭,占24.2%(9/33)。**结论** 为获得病原学依据,应对咽拭阴性的患者可进行肛拭样本检测。在疫情防控中,对手足口病患者血液、尿液可能造成的感染应引起重视。

【关键词】 手足口病; 肠道病毒; 分析

Distribution of pathogen nucleic acid of different samples hand, foot and mouth disease patients

WANG Cheng-yong*, WANG Jian, GAO Yuan-zheng, ZHANG Gong-wen, MA Jun. *Tuberculosis Prevention Hospital of Binzhou, Binzhou 251700, China

Corresponding author: WANG Cheng-yong, Email: bz23325@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the difference of detection rates among different samples which could provide scientific evidence for sample selection and epidemic situation handling. **Methods** Nucleic acids of enterovirus type 71 (EV71) and coxakie virus type A16 (CoxA16) from the specimens including blood, urine, throat and anal swab selected from 55 children diagnosed with HFMD, were amplified and detected by one step fluorescent quantitative reverse transcription-PCR. **Results** Pharyngeal specimens were positive in 37 cases (67.3%) and anal specimens were positive in 34 cases (61.8%), with no significant difference ($\chi^2=0.8, P>0.05$). Blood samples were positive in 13 cases (23.6%) and urine samples were positive in 9 cases (16.4%), with no significant difference ($\chi^2=2.25, P>0.05$). Compared with pharyngeal specimens the differences of positive detection in blood and urine specimens were both significant (χ^2 were 22.0 and 26.0, respectively; $P<0.005$). Among the 33 cases, with positive detection in both throat and anal swab specimens, 9 cases presented smaller cycle threshold (CT) in anal swab than throat specimens (24.2%). **Conclusions** Anal swab specimens should be selected in order to get the desired results when the detection of throat swab specimens show negative. Possible infections in blood or urine specimens should be taken seriously for epidemic prevention.

【Key words】 Hand, foot and mouth disease; Enterovirus; Analysis

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)是由多种肠道病毒引起的常见传染病,多发生于5岁以下的患儿,以发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹为主要特征;部分患儿可侵犯心、肺及中枢神经系统而引发重症^[1]。引发手足口病的肠道病毒有20多种(型),其中以肠道病毒71型

(EV71)和柯萨奇16型(CoxA16)最为常见。肠道病毒(CoxA16、EV71等)特异性核酸检测作为手足口病临床确诊病例的检测方法之一,已广泛应用于临床^[2-5];在样本检测方面,咽拭、肛拭和粪便标本报道较多,而患者不同样本病毒分布尤其是尿液中病毒核酸的检测鲜见报道。本文对手足口病临床诊断病例的咽拭、肛拭、血液和尿液样本中CoxA16和EV71病原核酸的分布进行了检测,以探讨患者不同样本间的差异,对检测样本的选择和疫情的防控提

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.03.026

作者单位: 251700 滨州市,滨州市结核病防治院检验科(王成勇、王建), 传染科(高远征、马俊), 传染病防治中心(张公文)
通讯作者: 王成勇, Email: bz23325@163.com

供科学数据。

资料与方法

一、临床资料

检测对象为2012年5月3日至6月29日在本院住院治疗的手足口病患者共55例。年龄1岁2个月~5岁;男性31例,女性24例。诊断标准参照卫生部颁发的《手足口病诊疗指南(2008年版)》^[6]。本研究为前瞻性,受试患儿均得到其监护人同意并签署知情同意书。

二、检测步骤与方法

1. 检测步骤:对55例临床诊断为手足口病患者均留取咽拭、肛拭、血液和尿液样本,同时进行EV71和CoxA16病毒核酸检测。

咽拭样本:采集患儿发病3 d内的咽拭子样本,用专用采样棉签,适度用力拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位,放入装有保存液的采样管中。

肛拭样本:采集后亦放入装有保存液的采样管中。

血液:取患者生化用血或抗凝血分离血清或血浆100 μ l于1.5 ml灭菌离心管中待检。

尿液:取1 ml尿液放入1.5 ml灭菌离心管中,12000 r/min离心5 min,吸去上液,留100 μ l;再加入1 ml尿液,重复离心1次,留100 μ l待检。样本当天不进行检测时,置-22℃冰箱保存备用。

2. 检测方法:应用实时荧光定量PCR技术,通过一步法RT-PCR扩增对病毒核酸进行定性检测。采用中山大学达安基因有限公司提供的EV71和CoxA16试剂盒,样本处理按说明书进行。结果判读:无典型S型扩增曲线或Ct值> 34.8为阴性,呈典型S型扩增曲线且Ct值 \leq 34.8为阳性。

三、统计学处理

采用SPSS13.0软件进行分析,计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、咽拭和肛拭样本手足口病病毒核酸检测情况

55例咽拭和肛拭样本中,咽拭样本阳性者37例(67.3%),其中CoxA16阳性者36例(65.3%)、EV71阳性者1例(1.8%);肛拭样本阳性者34例(61.8%),其中CoxA16阳性者33例(60.0%)、EV71阳性者1例(1.8%)。咽拭和肛拭样本病毒核酸阳性率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.80$, $P > 0.05$),见表1。

二、血液、尿液样本手足口病病毒核酸检测

55例血液和尿液样本中,血液样本阳性13例

(23.6%)、尿液样本阳性9例(16.4%),差异无统计学意义($\chi^2 = 2.25$, $P > 0.05$)。血液、尿液样本与咽拭样本差异具有统计学意义($\chi^2 = 22.0$ 、26.0, $P < 0.05$)。

三、咽拭、肛拭、血液和尿液阳性样本的循环阈值(CT)

样本的循环阈值CT值愈小,提示病毒核酸浓度愈大。本研究结果显示,咽拭、肛拭、血液和尿液样本中病毒核酸平均浓度由大到小依次为咽拭>肛拭>血液>尿液。在肛拭、咽拭均阳性的33例样本中,有9例肛拭样本的循环阈值(CT)小于咽拭,占24.2%(9/33),见表2。

表1 55例咽拭和肛拭样本手足口病病毒核酸检测

咽拭样本	肛拭样本		合计
	阳性	阴性	
阳性	33	4	37
阴性	1	17	18
合计	34	21	55
χ^2	0.80		
P	> 0.05		

表2 手足口病病毒核酸阳性样本的CT值检测

样本类别	阳性[例(%)]	CT值($\bar{x} \pm s$)
咽拭	37 (67.3)	26.3 \pm 3.45
肛拭	34 (61.8)	29.5 \pm 2.78
血液	13 (23.6)	30.6 \pm 2.24
尿液	9 (16.4)	33.4 \pm 1.46

讨 论

手足口病是全球性传染病,世界多地区均有此病流行的报道^[7-10],流行近年来呈上升趋势,已引起世界各国的高度重视。在我国手足口病已成为危害儿童健康的主要传染病之一,给社会、医疗机构和家庭带来了严重负担^[11-12]。通常认为,肠道病毒存在于感染者的粪便、咽喉分泌物和唾液以及疱疹液中,主要通过粪-口途径传播,易感者接触被病毒污染的日用品和玩具可致间接传播。肠道病毒特异性核酸检测,作为手足口病临床确诊病例的检测方法,已广泛应用于临床。从本研究结果证实咽拭样本阳性率最高,为67.3%;肛拭次之,为61.8%;但二者差异无统计学意义($P > 0.05$)。咽拭、肛拭、血液和尿液样本中病毒核酸平均浓度由高到低依次为咽拭>肛拭>血液>尿液。

曹三成等^[13]检测432例咽拭标本,其中EV71阳性率为25.93%,CoxA16阳性率为21.06%,二者总阳性

率为46.99%。徐道彦等^[5]报道了济南地区2009至2011年手足口病病原学检测, 2011年检测1000例咽拭样本, EV71阳性率为61.8%, CoxA16阳性率为27.1%, 二者总阳性率为88.9%。王七生等^[3]检测40例肛拭样本, 其中EV71阳性12例, CoxA16阳性9例, 二者总阳性率为52.5% (21/40)。杨洪等^[14]报道96例粪便样本检出11例EV71阳性样本 (11.46%)、18例CoxA16阳性样本 (18.75%); 侯佩强等^[15]报道437例粪便样本检出90例EV71阳性样本 (20.59%)和175例CoxA16阳性样本 (40.05%)。本研究选用肛拭取代粪便样本, 具有取材方便、即时等优点。在肛拭、咽拭均阳性的33例样本中有9例肛拭样本的循环阈值(CT)小于咽拭样本, 占24.2% (9/33); 即这部分样本的病毒核酸浓度高于咽拭样本。因此, 为获得病原学诊断依据, 对咽拭样本阴性的患者可进行肛拭样本的检测。本研究55例患儿病毒核酸检测, 血液样本阳性13例, 阳性率为23.6%, 而张清杰等^[16]报道为4.35%; 尿液样本阳性9例, 阳性率为16.4%, 而郑琪等^[17]检测25例尿液样本未检出病毒, 可能与处理方法等因素有关。

在手足口疾病防控中, 对患儿血液、尿液可能造成的感染亦应引起重视。

参 考 文 献

- 1 杜军保, 张清友. 进一步提高对重症手足口病的认识. 中华医学杂志, 2007, 87(33): 2307-2308.
- 2 胡兴文, 王维鹏. 荧光定量RT-PCR检测肠道病毒71型和柯萨奇病毒A组16型. 中国实验诊断学, 2009, 13(5): 664-665.
- 3 王七生, 秦金勇, 蒋立立等. 实时荧光PCR技术在手足口病原学检查中的应用. 中国医药导报, 2011, 8(17): 90-91.
- 4 伏瑾, 张艳玲, 孙春荣等. 实时RT-PCR检测159例手足口病患儿样本中肠道病毒的结果分析. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(6): 488-490.
- 5 徐道彦, 聂秀真, 林爱伟. 2009年至2011年济南地区儿童手足口病病原学分析. 中华传染病杂志, 2012, 30(4): 242-243.
- 6 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2008年版). 医药导报, 2009, 28(3): 404-405.
- 7 AbuBakar S, Chee HY, Al-Kobaisi MF, et al. Identification of enterovirus 71 isolates from an outbreak of hand, foot and mouth disease (HFMD) with fatal cases of encephalomyelitis in Malaysia. Virus Res, 1999, 61(1): 1-9.
- 8 Ahmad K. Hand, foot, and mouth disease outbreak reported in Singapore. Lancet, 2000, 356(9238): 1338-1338.
- 9 Tu PV, Thao NT, Perea D, et al. Epidemiologic and virologic investigation of hand foot and mouth disease, southern Vietnam, 2005. Emerg Infect Dis, 2007, 13(11): 1733-1741.
- 10 Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection, in Taiwan. New Engl J Med, 1999, 341(13): 929-935.
- 11 王连森, 毕振强, 房玉英, 等. 2008年山东省手足口病流行病学分析. 山东医药, 2009, 49(19): 45-47.
- 12 万俊峰, 朱理业, 刘红, 等. 阜阳市手足口病(EV71感染)疫情流行病学分析. 安徽医学, 2008, 29(4): 344-345.
- 13 曹三成, 祝擢英, 徐蓓, 等. 西安地区儿童手足口病病原学分析. 现代检验医学杂志, 2010, 25(4): 133-134.
- 14 杨洪, 何雅青, 周丽, 等. 深圳市2004年肠道病毒71型和柯萨奇病毒A16型的监测. 病毒控制杂志, 2006, 10(4): 389-391.
- 15 侯佩强, 张荣强, 倪楠. 2010年泰安市手足口病病原学检测分析. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(3): 209-211.
- 16 张清杰, 徐国峰, 王爱梅, 等. 濮阳市2008-2009年手足口病病原核酸检测及分析. 中国城乡企业卫生, 2010, 139(5): 84-87.
- 17 郑琪, 夏晓玲, 陆晓青, 等. 昆明市2008年儿童手足口病的病原学调查. 昆明医学院学报, 2009, 30(3): 76-78.

(收稿日期: 2012-08-08)

(本文编辑: 孙荣华)

王成勇, 王建, 高远征, 等. 手足口病病原核酸在患者不同样本中分布的检测分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(3): 434-436.