

实时荧光 PCR 技术检测手足口病 EV71 与 CA16 病毒核酸

乔凤娟, 刘红, 刘汉芬 (长春市疾病预防控制中心, 吉林 长春 130033)

【关键词】 荧光 PCR; 手足口病; 肠道病毒

【中图分类号】 R373.2 【文献标识码】 B 【文章编号】 1671-4199(2011)03-0253-01

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,多见于儿童。引起手足口病原的病体主要为小 RNA 病毒科; 肠道病毒属的柯萨奇病毒(Coxsackie virus) A 组 16、4、5、7、9、10 型, B 组 2、5 型; 埃可病毒(ECHO viruses)和肠道病毒 71 型(EV 71)。其中以 EV 71 及 Cox. A16 型为主要病原体^[1], 常相伴造成手足口病的暴发或流行。为了解手足口病流行期间 EV71 和 Cox. A16 的感染情况, 笔者采用实时荧光 PCR 法对 2010 年 1 月 1 日-8 月 1 日在本市住院的手足口病患者标本进行了检测。

1 材料与方法

1.1 材料 2010 年 1 月 1 日-2010 年 8 月 1 日本市各大医院传染科住院的 433 名手足口病患者的咽拭子标本。仪器: 高速微型离心机(杭州汇尔仪器设备有限公司)、小型漩涡振荡器(北京华尔博科技有限公司)、全自动荧光定量 PCR 检测仪(广州市炳阳生物科技有限公司-美国), Class II Type A2 生物安全柜(北京东联哈尔仪器制造有限公司)。试剂: 北京金豪制药股份有限公司的核酸分离试剂盒(硅胶膜吸附法)。

1.2 方法 标本保存: 取患者的咽拭子标本和大便标本立即放 -20℃ 保存。RNA 提取: 采用北京金豪制药股份有限公司的核酸分离试剂盒(硅胶膜吸附法)。反应体系: RT-PCR 反应液 19 μl、聚合酶 1 μl、逆转录酶 0.35 μl、标本 RNA 5 μl。设置循环条件: 逆转录及变性 50℃ 30 min; 95℃ 3 min; 预扩增 95℃ 15 s, 50℃ 30 s; 72℃ 1 min。扩增及荧光收集 95℃ 10 s, 55℃ 40 s。

1.3 结果判断 阴性质控品: 扩增曲线无对数增长期或无 Ct 值显示; 阳性质控品: 扩增曲线有明显对数增长期, 且 Ct < 30; 表示实验有效。如果检测样品的扩增曲线无对数增长期或 Ct > 37, 判断样品为阴性; 如果检测样品 Ct ≤ 37, 且曲线有明显的对数

增长期, 判断样品为阳性。

2 结果与讨论

用荧光 PCR 法对 433 份咽拭子标本进行肠道病毒核酸检测, 结果有 253 例呈肠道病毒核酸阳性, 阳性率为 58.4% (253/433)。在 253 肠道病毒核酸阳性病例中经分型检测, EV71 型为 146 例, Cox. A16 型为 107 例, 未见有混合感染。手足口病是以手掌、脚掌、口腔黏膜上发生疱疹和溃疡为特征的一种病毒感染性疾病, 但有些患者没有典型病症, 病情发展很快。因此及时检出和发现患者是否感染 EV71 和 Cox. A16, 可为临床提供实验诊断依据。而常规诊断方法存在一些弊端, 如病毒分离培养对技术要求较高, 费用较昂贵, 耗时需要 4~15 d, 而且各实验室分离的阳性率各不相同, 无法满足病毒流行期间同时处理大量样本的需要; 中和抗体检测常需比较患者急性期血清与恢复期血清的中和抗体滴度, 有时仅靠检测单份血清的中和抗体滴度很难做出诊断; RT-PCR 技术虽然克服了以上缺点^[2], 已成为快速诊断的重要手段, 但 PCR 后需要进行凝胶电泳分析, 操作也较繁琐。今年年初本市手足口病又有抬头趋势, 为了及时控制疫情笔者采用实时荧光定量 PCR 法对 433 例可疑患者做了 EV71 和 CA16 检测, 为及时控制疫情发挥了作用。本文使用的实时荧光定量 PCR 法操作简单快速, 整个操作只需两步, 不到 3 h, 即可获得高质量的数据; 具有灵敏度和特异性高、能实现多重反应、自动化程度高、无污染、实时和准确等特点, 该技术在医学临床检验及临床医学研究方面有着重要的意义。

4 参考文献

- [1] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 606-613.
- [2] Yan JJ, Su JJ, Chen PF, et al. Complete genome analysis of enterovirus 71 isolated from an outbreak in Taiwan and rapid identification of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 by RT-PCR[J]. J Med Virol, 2001, 65(2): 331-339.

【收稿日期】 2010-08-23

(编校 唐旭)