

·经验交流·

# 手足口病肠道病毒 EV71 和 CoxA16 感染的检测分析

黄建国<sup>1</sup>, 吴立文<sup>2</sup>, 骆志辉<sup>2</sup>, 黄碧梅<sup>3</sup>, 刘菊花<sup>1</sup>, 刘彩珍<sup>1</sup>

(1、广东省龙川县妇幼保健院检验科;2、儿科;3、广东省龙川县人民医院儿科,广东 龙川 517300)

中图分类号 R446.6,R512.5,Q522\*.3 文献标识码 B 文章编号 1674-1129(2011)03-0328-03

doi:10.3969/j.issn.1674-1129.2011.03.063

关键词:手足口病; EV71;CoxA16;PCR

手足口病(Hand-foot-mouth disease, HFMD)是由多种肠道病毒引起的常见传染病,以婴幼儿发病为主。大多数患者症状轻微,以发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹为主要特征。引起手足口病的病原体主要为肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(CoxA16),其中 EV71 不仅引起 HFMD,而且可引起脑膜炎、脑炎、急性迟缓性瘫痪等严重中枢神经系统并发症<sup>[1]</sup>。从 1996 年来,在东南亚、中国台湾、香港等地不断有 HFMD 暴发流行<sup>[2-3]</sup>。2008 年在我国安徽和河南部分县市发生 EV71 感染引起的 HFMD 流行,并造成患儿死亡。近年,地处广东东北部山区的龙川县也出现 HFMD 散发病例,以每年 4~6 月间为发病高峰。我们收集了部分在本院和龙川县人民医院住院和门诊就诊的临床疑似手足口病的患儿标本,应用分子生物学方法对这些标本进行了肠道病毒基因检测,现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 临床病例 所有病例均来自本院和龙川县人民医院 2009 至 2010 年住院和门诊病人,按照卫生部《手足口病预防控制指南(2008 年版)》标准<sup>[4]</sup>,共收集临床诊断手足口病病例 56 例,其中男 32 例,女 25 例,年龄 5 月~12 岁。

1.2 标本的采集 用无菌方法采集急性期病人的粪便 1~2g,置于灭菌的带盖玻璃瓶中,同时用干棉签准确地擦拭患儿的鼻咽部后,立即浸泡于含 2~3ml Hank's 液的灭菌试管,以上标本均立即-70℃冻存。

1.3 实验试剂 10×PCR 缓冲液、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、随机引物、RNAsin 酶和 AMV 逆转录酶为 Promega 公司产品,病毒核酸提取试剂为美国 GIBCOL 公司的 TRIZOL-LS Reagent RNA 提取试剂盒。

1.4 引物序列<sup>[5]</sup> 引物由南方医科大学附属深圳宝安医院儿科张寿斌主任提供。所用的引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 检测 EV 所用的引物及序列

引物类别	位置	引物名称	序列(5'→3')	片段大小
EV 通用引物	5'UTR	外: EVP160+	CAAGCACTT/ATTC/ACCC CGG	312bp
		EVP580~	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	
EV71 引物	Vp1	内: EVP250~	TACTTCGAG/ACCTAGTA	
		EVP500~	ACACCCAAAGTAGTCGGTFCGCG	
		外: EV-K1+	ACC/TATGAAAC/TTGTGC/TAAGGA	193bp
		EV-K2-	CCG/AGTAGGG/TGTC/ACACGCAAC	
CoxA16 引物	Vp1	内: EV71F+	AGGGG/AGAC/TAGG/AGTGGCAGATG	
		EV71R-	TCAATCATACTCTCG/ATCACTAG	
		外: CA16P1+	ATTGCAGACATGATTGACCAG	275bp
		CA16P4~	GGA/CGGC/GACATACATGTACTGC	
		内: CA16P2+	TGTGTGTTGAACCATCACTCCAC	
		CA16P4~	GGA/CGGC/GACATACATGTACTGC	

1.5 EV 核酸提取 采用 TRIZOL-LS Reagent 提取总 EV RNA。取 0.5~1g 粪便溶解于 0.5~2ml 生理盐水中,充分振荡混匀,5000r/min 离心 5min,取 150μl 上清液(或咽拭子液),加 TRIZOL-LS Reagent 450μl,混匀,加 120μl 氯仿,2~8℃ 12000g 离心 15min,取上清液加 300μl 异丙醇,2~8℃ 12 000g 离

心 10min,沉淀物用 75%乙醇 200μl 洗脱,2~8℃ 7500g 离心 5min 后去离子水溶解,冻存于-70℃。

1.6 EV 通用引物的 RT-PCR 检测 逆转录合成 cDNA 反应:取 5×AMV buffer 3.0μl,20mmol/L dNTPs 0.15μl,随机六聚体引物 1.0μl,EV 模板 10μl,cDNA 反应液总体积为 15μl,反应参数:42℃,

45min。采用套式 PCR 检测 EV RNA, 第一轮 PCR 反应条件: cDNA 模板 5 $\mu$ l, 10 $\times$ PCR buffer 3.0 $\mu$ l, 20mmol/L dNTPs 0.15 $\mu$ l, 50 $\mu$ mol/L EVP160/EVP580 各 0.15 $\mu$ l, Taq 酶 1U, 反应液总体积共 30 $\mu$ l, 在 PE6000 型 DNA 扩增仪上扩增, 扩增参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 180s, 94 $^{\circ}$ C 40s, 55 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 40s, 扩增 30 个循环。第二轮 PCR 反应条件: 取第一次 PCR 产物 3 $\mu$ l 作模板, 用 50 $\mu$ mol/L EVP250/EVP 500 引物各 0.15 $\mu$ l 进行第二次扩增, 扩增条件同第一轮。取第二轮 PCR 产物 10 $\mu$ l 用 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色 (含 EB 0.5 $\mu$ g/ml), 100V 电泳 30min, 紫外灯下观察, 约于 312bp 位置见清晰条带为阳性。每次均设肠道病毒标准 IYW 作阳性对照和 PBS 液阴性对照, 标本处理 RNA 提取、PCR 扩增和凝胶电泳 PCR 产物检测均在不同实验室进行。

1.7 RT-PCR 特异检测 EV71 和 CoxA16 采用 RT-nPCR 检测 EV71 和 CoxA16 引物见表 1, 第一轮 PCR 扩增反应条件基本同上述通用引物检测 EV, 只是检测 EV71 第二轮 PCR 退火温度为 58 $^{\circ}$ C, 检测 CoxA16 第二轮 PCR 退火温度为 56 $^{\circ}$ C, 片段大小分别为 193bp 和 275bp。

1.8 统计学方法 配对计数资料采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$ , 差别有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 手足口肠道病毒 RT-nPCR 检测结果

用通用引物 RT-nPCR 检测共 56 例病人的标本, 结果 37 例病人呈现总肠道病毒阳性, 阳性率 66.1%。再用 RT-nPCR 方法进行分型检测, 检出 EV71 阳性 15 份, 占标本总数的 26.8%; CoxA16 阳性 13 份, 占标本总数的 23.2%; EV71 和 CA16 均阴性 9 例, 占标本总数的 16.1%。RT-nPCR 分型检测结果见图 1。

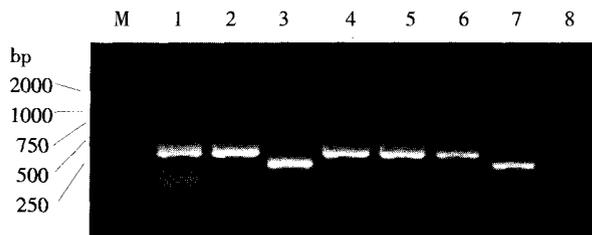


图 1 RT-nPCR 分型检测电泳结果

注: 3 和 7 是 EV71 阳性; 1, 2, 4, 5, 6 是 COXA16 阳性; 8 是空白对照

### 2.2 不同性别婴幼儿 EV71 和 CoxA16 检出情况

对 56 份临床诊断手足口病病例中, 其中男 32 例, 女 25 例, 男女阳性率分别为 62.5% (20/32) 和

68% (17/25); EV71 男女阳性率分别为 31.3% (10/32) 和 20% (5/25); CoxA16 男女阳性率分别为 18.8% (6/32) 和 28% (7/25)。经统计学处理 ( $\chi^2=0.6575, P>0.05$ ), 不同性别间 EV71 及 CoxA16 的发病率差别无统计学意义 (见表 2)。

表 2 手足口病病原体检测结果的性别分布 (%)

病例	EV	EV71	CoxA16	EV71+CoxA16	
男	32	20(62.5)	10(31.3)	6(18.8)	16(50.0)
女	25	17(68.0)	5(20.0)	7(28.0)	12(48.0) <sup>#</sup>
合计	56	37(66.1)	15(26.8)	13(23.2)	28(50.0)

#: 女 vs 男,  $P > 0.05$

### 2.3 不同年龄儿童 EV71 和 CoxA16 检出情况

将病例分为 6 个年龄组, 5 岁以下儿童是 EV 感染的高危人群, 占 85.7% (48/56)。EV71 感染者中最小年龄 11 个月, 最大 8 岁 (见表 3)。

表 3 不同年龄段手足口病病原体检测结果 (%)

年龄	病例数	EV	EV71	CoxA16
<1	4	1(62.5)	1(62.5)	0(62.5)
1~<2	8	4(62.5)	1(62.5)	2(62.5)
2~<3	12	8(62.5)	5(62.5)	4(62.5)
3~<4	10	10(62.5)	4(62.5)	3(62.5)
4~5	14	11(62.5)	5(62.5)	3(62.5)
>5	8	3(62.5)	0(62.5)	1(62.5)
合计	56	37(62.5)	15(62.5)	13(62.5)

## 3 讨论

人类肠道病毒 (EV) 属于小 RNA 病毒科, 有近 70 个血清型, 包括脊髓灰质炎病毒, 柯萨奇病毒 A 组和 B 组, 埃可病毒以及新型肠道病毒 EV68-72 型。EV 感染较为常见, 临床表现复杂多样, 手足口病 (HFMD) 是其常见的临床表现之一。EV71 是 1972 年美国学者从一脑炎病人中分离出一种新型肠道病毒, 是上世纪九十年代末在东南亚部分地区爆发流行的主要病原体<sup>[3]</sup>。EV71 感染以手足口病为主, 部分出现严重的中枢神经系统感染, 导致肺水肿和肺出血而死亡。2008 年在我国的山东临沂和安徽阜阳河南等地区出现手足口病疫情, 也主要由 EV71 型为主。我省的深圳和广州近年均有手足口病散发流行<sup>[6-7]</sup>, 我县地处广东东北部山区, 近年也出现 HFMD 散发病例, 以每年 4~6 月间为发病高峰, 为了了解在本地区出现的手足口病的血清型, 我们收集了 56 例在我院住院和门诊就诊的手足口病病例, 先采用肠道病毒 5' 端保守的非编码区通用引物 RT-nPCR 检测, 并根据 EV71 和 CoxA16 病毒特异性引物, 对通用引物阳性的病例进行 EV71 和 CoxA16 病毒的快速 RT-nPCR 分型检测, 结果显示, 56 例临床诊断

手足口病病例,37 例肠道病毒通用引物 RT-nPCR 检测呈阳性,阳性率为 66.1%,敏感性略低于实时荧光定量 RT-PCR 检出率<sup>[9]</sup>。分型检测显示,在我县流行的手足口病原体也主要是肠道病毒 EV71 和 CoxA16 血清型,占 75.7%(28/37),与在我省的深圳和广州流行情况相似,发病以婴幼儿为主(年龄<5 岁以下儿童),不同性别之间无明显差别。

EV 的临床检测方法主要有血清学方法和分子生物学方法。血清学方法包括补体结合试验、中和试验或 ELISA 法,但由于 EV 血清型繁多,并且许多血清型抗体间有交叉反应,特异性较差,加之抗体滴度感染 2 周后才能达到检出水平,EV 特异性血清学检测方法目前还不成熟,临床应用存在诸多限制。近年发展的检测 EV 感染的分子生物学方法主要有 RT-nPCR 和实时荧光定量 PCR,具有较高的敏感性和特异性<sup>[5,9]</sup>。我们采用的是套式 RT-nPCR 技术,进行两次特异性引物 PCR 扩增,提高了检测结果的特异性,也避免一次 PCR 扩增出现的假阴性,增加了检测的敏感性,RT-nPCR 检测当天即可完成,是一种快速、敏感和特异的方法,适合应用于对 EV 感染的检测和早期诊断。我们检测的 56 例病人中,检测的标本包括粪便和呼吸道分泌物,采用 RT-nPCR 均检测出 EV,有报道该方法适用于呼吸道分泌物、粪便、脑脊液和组织中 EV RNA 的检测,是诊断 EV 感染的有效方法<sup>[6]</sup>。

手足口病虽然是一种自限性疾病,但 EV71 型感染部分侵犯脑组织,可造成患儿死亡,对 EV71 至今尚无疫苗预防,一旦发病没有特异性药物治疗,因此对 EV71 等 EV 采取有效的预防控制措施至关重要。包括加强对公共场所及托幼机构卫生的监测力度,实行早发现、早诊断、早报告、早隔离治疗、早处理疫点等措施。

### 参考文献

- [1] 陆一涵,姜庆五.人肠道病毒 71 型与手足口病[J].疾病控制杂志, 2008,12(3): 183-188.
- [2] Ho M. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan[J]. New Engl J Med, 1999,341(13):929-935.
- [3] Cardoso MJ, Perera D, Brown BA, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes[J]. Emerg Infect Dis, 2003,9:461-468.
- [4] 中华人民共和国卫生部.2008 年手足口病预防控制指南[J].中华实验和临床感染病杂志, 2008,2(3):210-213.
- [5] 张寿斌,廖华,黄呈辉,等.应用通用引物建立巢式逆转录聚合酶链反应检测肠道病毒[J].中国医师杂志, 2006,8(7):971-973.
- [6] 张寿斌,廖华,黄呈辉,等.深圳 237 例手足口病肠道病毒血清型基因及临床特征[J].中国当代儿科杂志, 2008,10(1):38-41.
- [7] 吴新伟,蒋力云,伍业健.广州地区 2008 年手足口病病原体检测分析[J].广东医学, 2009,30(5):788-790.
- [8] 严菊英,卢亦愚,徐昌平,等.肠道病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 法快速检测[J].中国公共卫生, 2007,23(7):818-8201.
- [9] 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):1675-1671.

## ·经验交流·

# 鲍曼不动杆菌临床分布特征及耐药分析

何祖光

(萍乡市二医院检验科,江西 萍乡 337000)

中图分类号 R378.99,R446.5,Q939.92 文献标识码 B 文章编号 1674-1129(2011)03-0330-02

doi:10.3969/j.issn.1674-1129.2011.03.064

**关键词:**鲍曼不动杆菌;耐药性

鲍曼不动杆菌是一种不发酵糖类的革兰阴性杆菌,广泛分布于自然界,属条件致病菌,近年来,随着广谱抗菌药物、免疫抑制剂、侵入性医疗操作的广泛开展,使该菌已成为医院感染的主要病原菌,且常发展为多耐药或泛耐药菌<sup>[1,2]</sup>。为了解鲍曼不动杆菌感

染在我院临床分布特征及耐药性,笔者对我院 2008 年 6 月至 2010 年 6 月分离的鲍曼不动杆菌进行统计和分析,现报告如下。

### 1 材料与方法

1.1 临床资料 患者基础疾病、侵入性操作、抗菌药物、营养物质使用、症状转归通过与临床沟通和查阅