

• 经验交流 •

实时荧光定量 PCR 技术检测患儿手足口病病原体

荆成宝, 刘 婕, 赵 斌

(安康市中心医院, 陕西安康 725000)

摘要: 目的 采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)技术检测患儿手足口病原体, 以了解本地该病病毒流行特征, 为防治手足口病提供病原学诊断依据。方法 收集手足口病疑似病例 65 例(按年龄组分为小于 3 岁组 39 例, 3~6 岁组 26 例)患儿的咽拭子、疱疹液, 用 FQ-PCR 技术检测标本中肠道病毒通用型(EV)、肠道病毒 71 型(EV71)及柯萨奇病毒 A 组 16 型(CoxA16), 并与 ELISA 法进行比较。结果 65 例手足口病患儿疑似组 FQ-PCR 检出 EV 阳性 51 例, 阳性率为 78.5%, 其中小于 3 岁 34 例, 3~6 岁阳性 17 例, 小于 3 岁组 EV 检出率明显高于 3~6 岁组($P < 0.05$); EV71 阳性 45 例, COXA16 阳性 16 例; 咽拭子标本阳性率为 72.3%(47/65); 疱疹液标本阳性率为 81.25%(13/16); ELISA 法检测 EV 阳性 29 例, 阳性率为 44.6%(29/65), CoxA16 阳性 22 例, 阳性率为 33.8%(22/65)。结论 采用 FQ-PCR 技术进行手足口病病原体检测有助于早期、快速的对手足口病做出病原学诊断。2012 年安康地区手足口病病原体以 EV71 为主, CoxA16 次之。

关键词: 聚合酶链反应; 手足口病; 肠道病毒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.053

文献标识码:B

文章编号: 1673-4130(2013)18-2458-02

手足口病(HFMD)是一种由肠道病毒(EV)引起的急性传染病, 具有流行性强、传染性强、传播途径复杂等特点, 多发于 6 岁以下婴幼儿, 可引起手、足、口腔等部位的疱疹, 有的患者还可以引起心肌炎、肺水肿和无菌性脑膜炎^[1]。现已证实有 20 余种肠道病毒可引起 HFMD, 其中以肠病毒 EV71(EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(CoxA16)最为常见。肠道病毒感染实验室诊断的金标准是病毒培养法, 但此法不但繁琐复杂而且费时, 不适合临床检查。本文采用广州达安基因生物技术有限公司生产的实时荧光定量 PCR 试剂, 对本院住院的 0~6 岁疑似手足口病患儿进行检测, 以评估此法在手足口病原体检测上的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院 2012 年 5 月至 7 月初诊为 HFMD 的患儿 65 例, 来自安康城区和周边县, 初诊标准为患儿出现手、足、口、皮肤黏膜斑疹或疱疹, 伴或不伴发热及其他症状, 其中男 42 例, 女 23 例, 年龄 7 月至 6 岁, 平均 26.4 个月, 小于 3 岁组 39 例, 3~6 岁组 26 例, 其中咽拭子标本 65 份, 疱疹液标本 16 份, 用无菌棉拭子采集, 标本采集后立即置于病毒保养液中, 冷藏送检, 不能及时检测的置 -20 ℃ 保存。

1.2 仪器与试剂 美国 ABI-7300 实时荧光定量 PCR 分析仪。肠道病毒 EV 核酸检测试剂盒, 肠道病毒 71 核酸检测试剂盒, 肠道病毒柯萨奇 A16 核酸检测试剂盒购于广州达安基因生物技术有限公司。酶联免疫吸附试验(ELISA 法)EV71 IgG 及 COXA16 IgG 检测试剂盒购自北京万泰生物技术有限公司。

1.3 方法 FQ-PCR 法: 取 200 μL 上清液, 使用 Trizol 法提取标本 RNA, 再在 PCR 扩增仪上扩增, 按说明书进行反应液配置和循环参数设置, 并同时设置梯度模板及阴、阳性对照。ELISA 法严格按照试剂盒操作说明进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计学软件进行处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

65 例手足口病疑似患儿 FQ-PCR 法检测 EV 阳性 51 例, 阳性率 78.5%; 其中小于 3 岁组阳性 34 例, 阳性率 87.2%, 3~6 岁组阳性 17 例, 阳性率 65.4%; 小于 3 岁组 EV 阳性率明显高于 3~6 岁组($P < 0.05$)。在 65 份患儿标本中 EV71 阳性 45 例, 阳性率为 69.2%, CoxA16 阳性 23 例, 阳性率为

35.4%。咽拭子标本阳性率为 72.3%(47/65)疱疹组标本阳性率为 81.25%(13/16)。ELISA 法检测 EV71 阳性 29 例的阳性率为 44.6%(29/65), CoxA16 阳性 22 例阳性率为 33.8%(22/65)。在 42 例男患儿中 EV 阳性 32 例阳性率为 76.2%(32/42), 23 例女患儿中 EV 阳性 19 例阳性率 82.6%(19/23), 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

手足口病是由多种人肠道病毒引起的一种儿童常见传染病, 其传染性强、传播途径复杂、传播速度快, 短时间内可造成本土范围内的流行, 一旦流行疫情难以控制。该病原体为肠道病毒, 主要是 EV71 及 CoxA16。肠病毒可引起手足口病, EV71 感染常有严重的神经系统并发症发生, CoxA16 感染则可引起自限性的手足口病, 极少发生严重的并发症和死亡^[2]。

传统的诊断手足口病仍以临床表现为主要手段, 住院后实验室诊断分离病毒, 然后再进行血清中和试验来定型, 但是分离培养病毒平均需要 7 d, 这不仅耗时, 同时延误病情。近年血清学检查也有了新的进展, 主要包括补体固定实验(CF), 中和试验等^[3]。这些实验耗时、费用高、同时再感染早期常为阴性。RT-PCR 存在操作复杂易污染等缺点, 且对 CoxA16 不够敏感^[4]。

本研究应用实时荧光定量 PCR 技术(FQ-PCR)对 65 例临床诊断为手足口病的患儿咽拭子和部分患儿疱疹液进行 EV71 及 CoxA16 检测, 发现在 65 例患儿咽拭子标本中, 肠道病毒通用性检出率为 78.5%, 具有很好的检测敏感度, 检出率与陈禄彪等^[5]、张群等^[6]相近, 明显低于高寨等^[7]的报道, 这可能与检测标本不同有关。有研究显示, 患儿发病一周内的传染性最强, 1~2 周自咽部排出病毒, 3~5 周从粪便中排出病毒, 疱疹液中含有大量病毒, 破溃时病毒即溢出, 部分痊愈患儿粪便内病毒可存活数月^[8]。

本试验 51 例肠道病毒通用型阳性标本中, 手足口病相关 EV71 感染阳性 45 例, CoxA16 阳性 23 例, 说明本地在手足口病发病以 EV71 感染为主, 这与本省流行病学特征一致^[9]。疱疹液标本阳性率 81.25%(13/16), 可见疱疹液的阳性率比咽拭子高, 但疱疹液采集困难, 而咽拭子标本较易采集, 无需抽血, 无创伤性, 儿童及家长易于接受, 因此推荐使用咽拭子标本采集法。

通过对 EV71 和 CoxA16 两组感染病例的对比研究发现,

2 组病例的临床表现基本相同,严重程度并无很大差别,这与其他有关 EV71 感染的临床报道有所不同,EV71 感染可导致神经性肺水肿、心肌炎和脑膜炎等神经系统疾病,可危及生命^[10],而本研究中的 45 例 EV71 感染者并无此表现,这可能与患儿个体差异有关。

由于手足口病传染性强,传播途径复杂,流行强度大,传播快,且今尚无疫苗预防和特效的抗病毒治疗药物,建议在每年 3~8 月份加强对手足口病的病原学监测,以便预测本地区 HFMD 病原学构成的变化,为其防治提供科学依据。

参考文献

- [1] 雷永良,陈秀英,叶碧峰,等.实时荧光定量 PCR 在手足口病肠道病毒快速检测中的应用[J].中国病原生物学杂志,2008,3(10):738-739.
- [2] 何雅青,肖性龙,杨洪,等.实时荧光 RT-PCR 及 RT-PCR 快速检测肠道病毒 71 型和柯萨奇 A16 病毒[J].中国卫生检验杂志,2008,18(12):2780-2781.
- [3] Craig ME, Robertson P, Howard NJ, et al. Diagnosis of enterovirus-

· 经验交流 ·

B 群链球菌感染与胎膜早破

王建红

(天津市中心妇产科医院检验科,天津 300100)

摘要:目的 观察胎膜早破(PROM)的孕妇感染 B 群链球菌(GBS)的情况并分析药物敏感实验的结果。**方法** 收集胎膜早破孕妇的阴道分泌物进行细菌培养、分离鉴定和药物敏感试验,并对药敏结果进行统计分析。**结果** 875 例标本共检出 GBS60 株,GBS 带菌率为 6.9%。常用抗菌药物中敏感度最高的是青霉素 G、氨苄西林和万古霉素,最低的是四环素和红霉素。**结论** B 群链球菌感染所引起的胎膜早破威胁母婴安全,应重视 GBS 筛查,降低母婴风险。

关键词:胎膜早破; B 群链球菌; 药物敏感试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.054

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2013)18-2459-02

胎膜破裂发生于产程正式开始之前称为胎膜早破(PROM),占分娩总数的 2.7%~17%,是产科的常见并发症^[1]。大量研究表明 B 群链球菌(GBS)感染是胎膜早破的重要原因之一,近年来逐渐成为研究热点。本文对 875 例胎膜早破孕妇的阴道分泌物标本进行细菌培养和药敏试验,以期为临床提供安全合理的用药方案。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本取自 2011 年 1 月至 2012 年 12 月本院产科接诊的胎膜早破孕妇的阴道分泌物共 875 例,孕周 17~36 周,年龄 19~41 岁,平均 27.4 岁。

1.2 试验方法

1.2.1 标本采集 常规消毒外阴,用无菌棉拭子采取阴道下 1/3 处黏膜分泌物,取材后立即送检。

1.2.2 GBS 培养 无菌棉拭子迅速接种于血平皿,在 35 °C,5% 二氧化碳培养箱孵育 18~24 h。GBS 菌落在血平板上呈现 β 溶血,革兰阳性链球菌,触酶试验阴性,环磷酸腺苷(CAMP)试验阳性。

1.2.3 鉴定及药物敏感试验 采用法国生物梅里埃公司 VITEK-2 compact 全自动细菌分析系统对 GBS 进行鉴定和药敏试验,GP 鉴定卡和 AST-GP67 药敏卡为梅里埃公司配套产品。实验方法与结果判定标准,按照美国临床实验室标准化委员会(CLSI) 2008 年版规定执行。

1.2.4 质控菌株 金黄色葡萄球菌(ATCC29213)、粪肠球菌

usin 感染 by genus-specific PCR and enzyme-linked immunosorbent assays[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(2):841-844.

- [4] 王七生,秦金勇,蒋立立. 定量荧光 PCR 技术在手足口病原学检测中的应用[J]. 中国医药学报,2011,8(17):90-91.
- [5] 陈禄彪,张广,铮旋巧,等. 手足口病原学荧光 PCR 法检测及其临床特点[J]. 新医学,2009,40(7):464-466.
- [6] 张群,杨蕾,曹伟峰. 定时荧光聚合酶链检测患儿手足口病原体[J]. 检验医学,2012,27(5):416-418.
- [7] 商骞,刘文恩,刘元元,等. 荧光 PCR 检测手足口病原体及其临床意义[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(24):5323-5325.
- [8] 陈宏,苏俐. 手足口病的研究现状[J]. 现代中西结合杂志,2012,21(2):224-226.
- [9] 邓勇,周体操,张仪. 2010 年陕西省重症手足口病例资料分析[J]. 预防医学论坛,2010,16(11):1058-1059.
- [10] 吴旭耀,沈彩燕,李成,等. 手足口病患儿 EV71 的检测与其临床分析[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(24):3894-3896.

(收稿日期:2013-02-28)

(ATCC29212)、肺炎链球菌(ATCC49619)由卫生部临床检验中心提供。

1.3 统计学处理 数据采用 WHONET 5.4 软件进行分析。

2 结 果

875 例标本共检出 GBS 60 株,带菌率为 6.9%。药敏实验结果见表 1。

表 1 GBS 对常用抗菌药物的药敏试验结果

抗菌药物	敏感菌株数(n)	敏感率(%)
青霉素 G	60	100.0
氨苄西林	60	100.0
万古霉素	60	100.0
利奈唑胺	60	100.0
替加环素	60	100.0
喹努普汀/达福普汀	60	100.0
呋喃妥因	54	90.0
莫西沙星	33	55.0
环丙沙星	31	51.7
左氧氟沙星	31	51.7
克林霉素	20	33.3
红霉素	19	31.7
四环素	16	26.7