

• 论 著 •

手足口病病毒核酸及抗体检测的比较研究及应用*

赵 云¹, 蔡晶娟^{1△}, 彭 程², 王紫荆¹, 尹清金¹, 孙照华¹,
牟 杨¹, 卢亚陵¹, 蒋 燕³, 宋晓燕¹

(1. 成都儿童专科医院, 四川成都 610015; 2. 四川省广安市人民医院, 四川广安 638001;
3. 成都市妇女儿童中心医院, 四川成都 610091)

摘 要:目的 评价核酸与血清学抗体检测在手足口病诊断及防控中的应用价值。方法 对 2017 年 5 月至 2019 年 2 月成都儿童专科医院收治的手足口病患儿进行肠道病毒 71 型(EV71)及柯萨奇病毒 A16 型(CA16)核酸及抗体检测, 选取任意一项结果阳性的患儿(290 例)作为后续研究对象。治疗 2 周复诊时再次进行 CA16、EV71 核酸和抗体检测, 分别计算患儿在初诊和病程 2 周复诊时两种检测方法的检出率。结果 初诊患儿 EV71 与 CA16 核酸检出率为 33.8%(98 例), EV71 与 CA16 血清学抗体检出率为 84.5%(245 例), 两种检测方法检出率比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。两种方法联合检测在初诊患儿中的检出率为 98.6%。两种检测方法在不同年龄初诊患儿中的检出率比较, 1~5 岁年龄段差异有统计学意义($P<0.05$); 两种检测方法在不同年龄复诊患儿(病程 2 周)中的检出率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。初诊患儿与复诊患儿的核酸检出率比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 初诊患儿与复诊患儿的血清学抗体检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 核酸检测有助于了解患儿恢复期病毒复制情况, 对确定手足口病患儿在病程 2 周后是否需要延长隔离时间以及准确制订隔离期具有较大意义。病毒核酸与抗体联合检测可显著提高检出率, 具有较高的临床应用价值。

关键词:手足口病; 核酸检测; 血清学抗体检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.14.004

中图法分类号:R725.1; R512.5

文章编号:1673-4130(2020)14-1678-04

文献标识码:A

Comparison study and application of nucleic acid and antibody detection in hand-foot-mouth disease*

ZHAO Yun¹, CAI Jingjuan^{1△}, PENG Cheng², WANG Zijing¹, YIN Qingjin¹, SUN Zhaohua¹,
MOU Yang¹, LU Yaling¹, JIANG Yan³, SONG Xiaoyan¹

(1. Chengdu Children's Specialized Hospital, Chengdu, Sichuan 610015, China; 2. Guang'an Municipal People's Hospital, Guang'an, Sichuan 638001, China; 3. Chengdu Municipal Women's and Children's Central Hospital, Chengdu, Sichuan 610091, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the application values of nucleic acid and serological antibody detection in the diagnosis, prevention and control of hand-foot-mouth disease (HFMD). **Methods** The nucleic acid and antibodies of enterovirus 71 (EV71) and coxsackievirus A16 (CA16) were detected among the children patients with HFMD in Chengdu Children's Specialized Hospital. Then 290 cases of single result positive were selected as the follow up study subjects. The nucleic acid and antibodies of EV71 and CA16 were re-detected in subsequent visiting after 2-week disease course. The detection rate by the two detection methods was calculated in the initial diagnosis and in subsequent visiting after 2-week disease course respectively. **Results** The detection rate of EV71 and CA16 in the children patients with initial diagnosis was 33.8%(98 cases), and the detection rate of serological antibodies of EV71 and CA16 was 84.5%(245 cases). The detection rate had statistical difference between the two detection methods ($P<0.05$). the detection rate in the combined detection of the two methods among the children patients with initial diagnosis was 98.6%. The detection rate comparison among different ages of children patients with initial diagnosis showed that the difference in the age period of 1—5 years old was statistically significant ($P<0.05$); the detection rates of the two detection methods had no

* 基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ267)。

作者简介:赵云,女,副主任医师,主要从事小儿呼吸道疾病诊疗研究。△ 通信作者, E-mail:caijingjuan@163.com。

本文引用格式:赵云,蔡晶娟,彭程,等.手足口病病毒核酸及抗体检测的比较研究及应用[J].国际检验医学杂志,2020,41(14):1678-

statistical difference among different ages of subsequent visiting (2 weeks of disease course) ($P>0.05$). The nucleic acid detection rate had statistical difference between the children patients with initial diagnosis and the children patients with subsequent visiting ($P<0.05$). There was no statistically significant difference in serological antibody detection rate between the initially diagnosed children and revisited children ($P>0.05$). **Conclusion** The nucleic acid detection is helpful to understand the replication situation of the virus in children's convalescence, which has the greater significance for determining whether needing to prolong the isolation time after 2 weeks in the children patients with HFMD and accurately formulate the isolation period. The combined detection and viral nucleic acid and antibodies can significantly increase the detection rate and has the higher clinical application value.

Key words: hand-foot-mouth disease; nucleic acid detection; serological antibody detection

手足口病是一种由肠道病毒感染所引起的传染性疾病,其主要的病原体包括肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A16 型(CA16),好发于 5 岁以下的儿童^[1-2]。重症病例可并发中枢神经系统炎症、心肌炎、神经源性肺水肿等,患儿早期临床症状不典型、病情常急转直下,往往在发病早期突然出现预后不良的情况,并由此引发医患矛盾^[3-4]。对手足口病患儿实施隔离可切断手足口病的传染源,是预防手足口病流行的重要措施,而患儿的排毒时间是制订隔离期的重要参考。极少数重症患儿皮疹不典型,临床诊断困难。因此,对手足口病患儿进行实验室早期诊断以及对 EV71 与 CA16 等肠道病毒的感染进行准确鉴别就显得非常重要^[5-6]。本研究采用肠道病毒核酸检测联合血清学抗体检测方法,探讨该方法在手足口病诊断及防控中的临床应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 5 月至 2019 年 2 月在成都儿童专科医院就诊的手足口病患儿,临床诊断均符合 2018 年国家卫生健康委员会制定的《手足口病诊疗指南(2018 年版)》标准,使用 RNA 恒温扩增检测技术(SAT)对手足口病患儿进行 EV71 及 CA16 核酸检测,同时采用胶体金法(金标法)对患儿血清中的 EV71、CA16 特异性 IgM 抗体进行联合检测。将上述检测方法中任意一项出现阳性的患儿纳入研究。纳入 290 例手足口病患儿,其中男 170 例,女 120 例;年龄 4 个月至 11 岁,中位年龄 2.9 岁,<1 岁患儿 28 例,1~5 岁患儿 225 例,>5 岁的患儿 37 例。排除标准:(1)家长不合作或失访的患儿;(2)初诊时病毒核酸及抗体标本检测均为阴性的患儿。本研究经成都儿童专科医院医学伦理委员会批准,入组患儿的监护人均已签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 实时荧光定量 PCR 仪由西安天隆科技有限公司生产,型号为 TL988;试剂采用北京万泰生物药业股份有限公司生产的 CA16 和 EV71 IgM 抗体检测试剂盒(胶体金法)。

1.3 方法

1.3.1 核酸检测方法 通过 SAT,以病原体特异的 16s rRNA 为靶标,在 M-MLV 反转录酶和 T7 RNA

多聚酶的作用下进行恒温扩增,产生的大量 RNA 与带有荧光标记的优化探针特异性结合,扩增信号和荧光信号的检测同步进行,从而实现了病原体的快速检测。

1.3.2 血清学抗体检测方法 将采集的全血标本立即进行离心,取上清液,血清标本严格按照试剂盒说明书上的操作流程进行检测。

1.4 观察指标 比较初诊及病程 2 周的复诊患儿 CA16、EV71 核酸和 CA16、EV71 抗体检测结果。

1.5 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行统计处理和分析。计数资料以百分率或例数表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,等级资料比较采用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种检测方法在不同年龄初诊患儿中的检出率比较 初诊患儿中 EV71 核酸检测阳性 17 例(5.9%),CA16 核酸检测阳性 81 例(27.9%),核酸检出率为 33.8%(98 例);EV71 血清学抗体检测阳性 153 例(52.8%),CA16 血清学抗体检测阳性 183 例(63.1%),血清学抗体检出率为 84.5%(245 例,其中双抗体阳性 91 例)。两种检测方法检出率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。两种方法联合检测阳性 286 例(98.6%)。<1 岁初诊患儿核酸检测阳性 5 例,抗体检测阳性 24 例,两种检测方法检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);1~5 岁初诊患儿两种检测方法检出率比较,差异有统计学意义($P<0.05$);>5 岁初诊患儿两种检测方法检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 不同年龄初诊患儿两种检测方法结果比较(n)

年龄段	n	核酸检测			血清学抗体检测		
		阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
<1 岁	28	5	23	28	24	4	28
1~5 岁	225	75	150	225	191	34	225
>5 岁	37	18	19	37	30	7	37
合计		98	192	290	245	45	290

2.2 两种检测方法在不同年龄复诊患儿中的检出率

比较 复诊患儿中核酸检测阳性 49 例(16.9%),其中 EV71 核酸检测阳性 11 例(3.8%),CA16 核酸检测阳性 38 例(13.1%)。抗体检测阳性 240 例(82.8%),其中 EV71 血清学抗体检测阳性 177 例(61.0%),CA16 血清学抗体检测阳性 207 例(71.4%)。两种检测方法检出率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。 <1 岁复诊患儿核酸检测阳性 2 例(0.69%),抗体检测阳性 23 例(7.93%),两种检测方法检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);1~5 岁复诊患儿两种检测方法检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);5 岁以上复诊患儿两种检测方法检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 不同年龄复诊患儿两种检测方法结果比较(<i>n</i>)							
年龄段	<i>n</i>	核酸检测			血清学抗体检测		
		阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
<1 岁	28	2	26	28	23	5	28
1~5 岁	225	42	183	225	188	37	225
>5 岁	37	5	32	37	29	8	37
合计		49	241	290	240	50	290

2.3 初诊与复诊患儿两种检测方法检出率的差异 初诊患儿的核酸检测阳性率为 33.8%,复诊患儿的核酸检测阳性率为 16.9%,不同病程时期核酸检出率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。初诊患儿的抗体检测阳性率为 84.5%,复诊患儿的抗体检测阳性率为 82.8%,不同病程时期血清学抗体检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3~4。

表 3 初诊与复诊患儿的核酸检测结果比较(<i>n</i>)			
初诊	复诊		合计
	阳性	阴性	
阳性	32	66	98
阴性	17	175	192
合计	49	241	290

表 4 初诊与复诊患儿的血清学抗体检测结果比较(<i>n</i>)			
初诊	复诊		合计
	阳性	阴性	
阳性	211	34	245
阴性	29	16	45
合计	240	50	290

3 讨 论

手足口病发病率为 37/100 000~205/100 000,病死率也较高,且近年来其发病率有逐年增长的趋势。手足口病能通过粪口途径、呼吸道飞沫、接触途径传播^[5-6]。引发手足口病的肠道病毒有 20 余种,以 EV71 和 CA16 最为常见,EV71 感染更被认为是导致

手足口病患儿死亡的最主要原因,其传染性较强,能在短时间内造成较大范围的流行^[7-8],严重威胁儿童的生命健康。

采用胶体金法进行血清学抗体检测,具有操作简便易行、标本可批量处理等优点,在临床上应用较为广泛,但其缺点在于检测过程中会因存在抗体交叉反应而出现较高的假阳性率,也可能受胶体金硝酸纤维素膜检测线上包被的抗原种类限制以及体内抗体滴度因素影响而出现假阴性。而 SAT 的优点为检测快速敏感,可早期诊断,并且可同时检测 EV71、CA16 和肠道病毒通用型,对手足口病肠道病毒病原体各种常见亚型实现全覆盖,是目前临床实验室的主要检测方法^[9-10]。本研究对比两种检测方法的检出率,差异有统计学意义($P<0.05$),且病毒血清学抗体检出率显著高于肠道病毒核酸,二者吻合度和一致性不高。造成该现象的可能原因有以下 3 点:(1)患儿感染后血清抗体为非特异性的。(2)患儿感染其他亚型肠道病毒后,抗体在体内存在时间较长,会对结果造成影响。(3)胶体金法假阳性率较高。在进行血清学抗体检测时,两种病毒血清学抗体初诊检出情况为 CA16 阳性 183 例,EV71 阳性 153 例,2 周复诊时,CA16 阳性 207 例,EV71 阳性 177 例,复诊阳性数均高于初诊。一方面反映出抗体在体内持续时间长,另一方面也提示初、复诊均有部分标本出现了 EV71-IgM 和 CA16-IgM 双抗体阳性结果。这是由于 EV71 与 CA16 基因水平的同源性为 77%,而氨基酸水平的同源性为 86%^[3,5],因此笔者认为此类标本需要核实核酸检测结果,才能明确具体病原体,以及是否为合并感染。由于实验室检查的局限性和研究设计上的缺陷,本研究未对该类标本检测结果进行鉴别。两次检测结果提示,病毒血清学抗体在体内持续时间更长,提示病毒血清学抗体检测不利于判断疾病恢复期病毒复制情况,也不利于判断是否需要延长隔离时间。

考虑到不同病程、不同标本采集方法、病毒复制、排毒周期以及个体免疫差异等因素,单一的检测方法均存在一定的局限性和漏检情况。因此,在患儿患病早期或者免疫功能比较低下时,采用核酸与抗体联合检测的方式有助于提高早期检出率^[7,11],最终实现预防感染和控制疾病流行的目的,为患儿的后续治疗提供可靠依据。

重症患儿症状缓解出院后或多数患儿在起病 2 周后,临床症状已经消失,但仍有部分患儿存在排毒的情况,提示有症状的患儿和无症状的康复期患儿均可能成为传染源^[12-14],导致所在社区、学校的手足口病传播与流行。因此,明确手足口病患儿的排毒时间,对防治手足口病具有重要意义。由于核酸检测可以更加准确地判断疾病恢复情况,因此建议在恢复期进行病毒的核酸检测,有助于该病的防控工作。

4 结 论

EV71 与 CA16 核酸与抗体检测结果的一致性不高。抗体检测存在交叉反应阳性。核酸检测有助于了解患儿恢复期病毒复制情况,对确定手足口病患儿在病程 2 周后是否仍需要延长隔离时间以及准确制订隔离期具有较大意义。核酸与抗体联合检测可一定程度上避免单一方法检测的局限性,有助于提高早期检出率,为患儿的后续治疗提供可靠依据。

参考文献

[1] 徐继勋,徐维利. 2015 年度鄂东地区手足口病流行病学监测分析[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(5): 808-810.

[2] 郭慧娟,莫莉,黄炳坤. 肠道病毒核酸与抗体联合检测在 手足口病诊断中的应用价值研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(11): 1488-1489.

[3] 吴双双,陈东,周俊,等. 手足口病肠道病毒核酸与血清学检测的临床诊断价值分析[J]. 浙江临床医学, 2018, 20(5): 842-843.

[4] 沈伟锋,邵平扬,殷新光,等. 手足口病患者病原学快速诊断方法的比较研究[J]. 浙江医学, 2017, 39(14): 1179-1182.

[5] 陈士伟,王洁,周仁希,等. 2015 年杭州市手足口病肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型构成变化与联合检测方法分析[J]. 疾病监测, 2017, 32(2): 102-105.

[6] 朱耀武,王春玉,潘莹莹,等. EB 病毒核酸及血清学检测

在 EB 病毒相关疾病中的应用研究[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(3): 195-200.

[7] 叶淦康,张应洪,彭琪,等. 手足口病诊断中肠道病毒 71 型核酸与抗体检测的应用意义探究[J]. 白求恩医学杂志, 2016, 14(3): 311-312.

[8] 吴亦栋,周俊,陈东,等. 肠道病毒核酸与抗体联合检测在 手足口病病原体早期诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(6): 397-401.

[9] 代芳芳,何茜,李润青,等. 2010 至 2012 年手足口病病原学检测变化与分析[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(12): 1140-1142.

[10] 陈倩,胡正,张其华,等. 多重 Taqman 探针实时 RT-PCR 检测手足口病病原体方法的建立及临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(9): 845-849.

[11] 杜潘艳,王晓波,王宝林,等. 肠道病毒 71 感染病毒载量与细胞因子和免疫球蛋白水平的相关性[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2015, 29(6): 479-482.

[12] 张艳艳. IL-12/IFN- γ 轴基因多态性与 EV71 感染手足口病易感性相关研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2016: 1-77.

[13] 陈健明,陈胜捷,黄绮云,等. 手足口病患儿的肠道病毒核酸转阴时间探讨[J]. 新医学, 2018, 49(9): 651-655.

[14] 袁翊,王娅梅,万小涛,等. 内江地区手足口病肠道病毒核酸检测及流行特征分析[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(12): 1717-1719.

(收稿日期: 2019-08-18 修回日期: 2020-03-25)

(上接第 1677 页)

214(11): 1892-1897.

[7] MA Y J, DENG X L, LI H Q, et al. Correlation between BRAF (V600E) mutation and clinicopathological features in pediatric papillary thyroid carcinoma[J]. Sci China Life Sci, 2017, 60(7): 729-738.

[8] LIU L H, CHANG J W, JUNG S N, et al. Clinical implications of the extent of BRAF (V600E) alleles in patients with papillary thyroid carcinoma[J]. Oral Oncol, 2016, 62(11): 72-77.

[9] KIM J K, SEONG C Y, BAE I E, et al. Comparison of immunohistochemistry and direct sequencing methods for identification of the BRAF (V600E) mutation in papillary thyroid carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2018, 25(6): 1775-1781.

[10] TEIXEIRA A C, FREIRE DE CARVALHO C C, MORO RÓ G P, et al. Evaluation of frozen and paraffin sections using the Maryland aggregate pathology index score in donor kidney biopsy specimens of a Brazilian cohort[J]. Transplant Proc, 2017, 49(10): 2247-2250.

[11] CHO M, AKIBA C, LAU C, et al. Impact of RAS and

BRAF mutations on carcinoembryonic antigen production and pattern of colorectal metastases[J]. World J Gastrointest Oncol, 2016, 8(1): 128-135.

[12] CHANG Y S, HUANG H D, YE H K T, et al. Evaluation of whole exome sequencing by targeted gene sequencing and Sanger sequencing[J]. Clin Chim Acta, 2017, 471(8): 222-232.

[13] TIAN H X, ZHAO X C, WANG Z, et al. Establishment and application of a multiplex genetic mutation-detection method of lung cancer based on MassARRAY platform[J]. Cancer Biol Med, 2016, 13(1): 68-76.

[14] ANTHONY Y H, BUDD M, DENG D, et al. A monochrome multiplex qPCR assay for the measurement of mitochondrial DNA content[J]. J Molec Diag, 2018, 20(5): 612-620.

[15] FORTHUN R B, HOVLAND R, SCHUSTER C, et al. ctDNA detected by ddPCR reveals changes in tumour load in metastatic malignant melanoma treated with bevacizumab[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 17471-17485.

(收稿日期: 2019-11-29 修回日期: 2020-02-28)