技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)04-0594-03

2009 年重庆地区手足口病病毒分离鉴定

蔡丽君[1],王 均[1],常国辉[2],许红梅[1]

(1. 重庆医科大学附属儿童医院感染消化科,重庆 400014;2. 军事医学科学院病原微生物流行病研究所、病原微生物生物安全国家重点实验室,北京 100071)

【摘 要】目的:对 2009 年 2~4 月重庆地区流行的手足口病(Hand-food-and-mouth disease,HFMD)病原进行分离鉴定,以调查本地区 HFMD 流行病原学情况。方法:采集 47 例手足口患儿脑脊液、疱疹液、粪便、咽拭子、肛拭子共 100 份标本,分别接种于人横纹肌肉瘤细胞(Human rhabdomyosarcoma,RD)中进行病毒分离培养,对出现细胞病变(Cytopathic effect,CPE)的细胞上清,分别用肠道病毒通用引物、EV71 属特异性引物和柯萨奇 A16 属特异性引物进行 RT-PCR 检测,并对 PCR 产物进行回收克隆测序鉴定,以确定本次疫情中肠道病毒(Enteroviruses,EV)的病原,将测序结果用生物学软件 Bioedit 同国际代表 BrCr 株进行序列比对及同源性相关分析,以鉴定此毒株遗传变异情况。结果:在处理后的 100 份 HFMD 患儿临床标本的细胞培养中,有 7 份观察到明显的细胞病变,通过 RT-PCR 检测有 7 份呈肠道通用引物阳性,EV71 特异性引物检测有 3 份呈阳性结果,而 CA16 特异性引物检测结果均为阴性,这 3 份 EV71 阳性临床标本来自 2 例门诊患儿和 1 例临床诊断疑似病例患儿,其 PCR 产物测序结果也证实为 EV71 病毒。结论:重庆地区 2~4 月发生的 HFMD 疫情主要是由 EV71 型引起的。

【关键词】手足口病;肠道病毒 71 型;分离鉴定

【中国图书分类法分类号】R72 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-02

Isolation and identification of viruses from patient with hand, foot and mouth disease in Chongqing area in 2009

CAI Li-jun, et al

(*Department of Infection and Degestion, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the etiological agents of the outbreak of hand-foot-mouth disease (HFMD) in ChongQing area from April to September in 2009. *Methods*: 100 specimens (including cerebral spinal fluid, vesicle fluid, stool, throat swabs, anal swab) were collected from 47 patients with HFMD during the epidemic season. The specimens were inoculated into RD cells for isolation of enteroviruses (EV), The supernatant of cytopathic effect (CPE) were detected by RT-PCR with universal primers of enterovirus, genus-specific primers of EV71 and genus-specific primers of Coxsackie A16, and the amplified products were sequenced to determine the outbreak of the pathogen enteroviruses (EV), The sequencing results will be compared with international representatives BrCr strain to identify the enteroviruses (EV) by Bioedit biological software. *Results*: In the 100 cell cultures of clinical specimens of children HFMD, apparent Cytopathic were observed in 7. The results of RT-PCR showed that seven specimens were positive with intestinal universal primers, and three were positive results with EV71-specific primers, which were from two cases of out-patient children and one with clinical diagnosis of suspected case, while the negative results were obtained with CA16-specific primers for all the samples. The recovery of the PCR products were cloned and the sequencing identification confirmed as EV71 virus, while sequencing analysis of homology-related in the results. *Conclusion*: EV71 were the major etiological agents of the HFMD outbreak in Chongqing from February to April in 2009.

【Key words】Hand-foot-and-mouth disease; Enterovirus type 71; Viruses isolation and identification

手足口病(Hand-foot-and-mouth disease,HFMD)是由多种肠道病毒(Enteroviruses,EV)引起的一种常见传染病,多发于 5 岁以下婴幼儿,其病原主要为 EV71、A 组柯萨奇病毒和埃可病毒等肠道病毒。其临床症状主要表现为发热和手、足、口腔等部位的皮疹、溃疡,病情严重者可引起心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜脑炎等致命性并发症。目前该病已呈全球性流行趋势,我国部分地区,如北京、上海、浙江、广东和深圳等地均有 HFMD 的发病报道[1]。2009 年 4 月在重庆地区部分幼托机构发生了 HFMD 的局部流行,我们对此进行了临床观察,同时对患儿标本进行病毒分离,以确定该病的病原,并对

作者介绍:蔡丽君(1983-)女,硕士,
研究方向:小儿感染消化性疾病。
通讯作者:许红梅,女,教授,E-mail:xuhongmei0095@sina.com。
常国辉,男,副研究员,E-mail:changguohui999@yahoo.com.cn。

基金项目:病原微生物生物安全国家重点实验室开放基金(编号:SKLPBS0919)。

分离毒株进行了部分核苷酸序列比对分析,证实这 3 株病毒应属于 EV71。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 2009 年 2~4 月间在重庆医科大学附属儿童医院门诊和住院部诊断为 HFMD,同时征得家长同意的 47 例患儿,诊断标准参照第 7 版实用儿科学[2]。粪便标本,用无菌方法采集急性期病人(病后 3~7 d 内)3~5 g 粪便,置于灭菌的带盖玻璃瓶中;疱疹标本,常规消毒后选取患儿手掌、足底或臀部较明显的疱疹,刺破表皮用消毒棉签采集;咽拭子标本,以消毒棉棒进行深部咽拭子采集;对于门诊上不能配合排便的患儿采集肛拭子,用棉签适度用力拭抹直肠四周部位,迅速将采集棉签放入装有 1~2 ml 保存液的无菌试管中,共获得 35 份患儿粪便标本,30 份咽拭子标本,13 份疱疹标本,20 份肛拭子标本,2 份脑脊液,计 100 份临床标本。以上标本均放入 -70℃冰箱保存,-20℃下运输。

1.1.2 细胞及试剂 人横纹肌肉瘤细胞(Human rhabdomyosarcoma,RD),由军事医学科学院微生物流行病研究所提供;RNA 提取试剂盒(Qiagen Viral RNA Mini Kit)和胶回收试剂盒(Quick Gel Extration Kit)(Qiagen 公司);2.5 mmol/L dNTP Mixture、TaqDNA 聚合酶及 Maker DL2000、pMDl8-T 载体(日本 TaKaRa 公司);AMV 逆转录酶、RNasin inhibitor 均购自美国 Promega 公司。

1.1.3 检测引物 本研究所用的人肠道病毒核酸通用引物(EV)、EV71 核酸引物(EV71)及柯萨奇 A 组 16 号病毒核酸引物(CoxA16)序列均参考国家脊灰实验室(具体序列见表 1)[3],引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 病毒分离

将咽拭子,肛拭子以及粪便标本经研磨、过滤处理后,接种到形态良好,单层的 RD 细胞中,对于疱疹液,脑脊液标本可直接过滤接种到 RD 细胞,进行病毒分离,每份标本接种 0.2 ml,复 3 孔,37℃吸附,2 h 后换维持液,置 37℃培养,同时设正常细胞对照,每日观察细胞病变(Cytopathic effect,CPE)。当细胞病变达 ++++ 时即可判为阳性分离株。收获后置 -70℃保存备用,如第 1 代接种 7 d 无 CPE 出现,则盲传 3 代,连续观察 7 d 仍无 CPE 出现,则判为阴性。

1.3 病毒 RNA 提取

将病变细胞反复冻融,离心后取上清,采用 Qiagen Viral RNA Mini Kit(Qiagen, German)进行病毒 RNA 提取,提取步骤参照 Qiagen Mini kit Handbook 所提供的方法,提取纯化后的 RNA 保存在 -80℃冰箱中备用。

1.4 RT-PCR 检测

以提取的病毒 RNA 为模板,分别用表 1 中 3 种肠道病毒特异性下游引物(EV-R、EV71-R 和 CoxA16-R)在 AMV 逆转录酶的作用下逆转录获得病毒 cDNA。反应条件为:病毒 RNA 5 μl,下游引物 1 μl(20 μmol/L),65℃变性 10 min,冰浴 5 min,5 × AMV Buffer 4 μl,dNTPs(2.5 mmol/L)2 μl,RNasin inhibitor 0.5 μl,AMV 逆转录酶 1 μl,补 H_2O 至 20 μl 体系。42℃逆转录 1 h,70℃孵育 15 min、灭活 AMV 逆转录酶。然后以病毒 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:cDNA 5 μl,上下游引物各 1 μl,Taq DNA 聚合酶 0.5 μl,10 × PCR Buffer 5 μl,dNTPs(2.5 mmol/L)4 μl,补 H_2O 至 50 μl。95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,共 30 个循环;72℃再延伸 10 min,4℃保温,同时设阴阳性对照。PCR 结束后,取 5 μl PCR 产物,与 1%琼脂糖凝胶进行凝胶电泳鉴定。

1.5 基因克隆、测序及序列分析

阳性 PCR 产物采用 Quick Gel Extraction Kit 回收后克隆于质粒 pMDl8-T 载体,转化大肠埃希氏菌 DH5α 感受态细胞,通过蓝白斑筛选与菌落 PCR 鉴定,PCR 扩增阳性的克隆至上海英骏生物技术公司测序。将测序所获得的基因序列与 NCBI 网站进行 Blast 分析,以最终确定该病原。

2 结 果

2.1 EV 分离鉴定

采用 RD 细胞传代,对 47 例患儿临床标本进行 EV 分离,其中 7 例患儿的临床标本出现了明显的 CPE,特点为细胞变圆脱落,经传代后细胞病变依然出现,提示为分离到病毒(见图 1)。

2.2 EV71 病毒的 RT-PCR 特异性核酸检测

通过对 7 株阳性毒株采用特异性引物作 RT-PCR 扩增,其中从 3 株阳性毒株检测出 EV71 病毒的 226 bp 特异核酸片段(见图 A),另外 4 株阳性毒株检出 116 bp EV 特异性核酸片段(见图 B)。

2.3 PCR 产物克隆鉴定结果

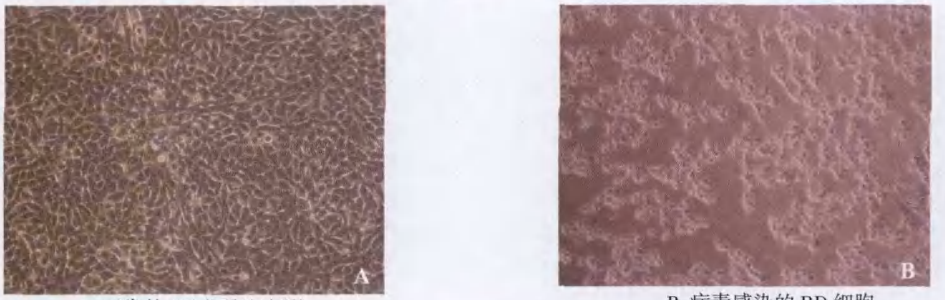
将挑取的阳性克隆经扩增培养后,常规取 1 μl 克隆后菌液进行 PCR 鉴定,琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 条带为 226 bp,为 EV71 特异性片段的长度,证实 PCR 产物转入感受态细胞成功(见图 3)。

表 1 筛选用肠道病毒通用引物及 CA16、EV71 特异性引物

引物名称	引物序列(5'-3')	PCR 产物扩增长度(bp)
EV-F	TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCC	116
EV-R	ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTCC	
EV71-F	GCAGCCCAAAAGAACTTCAC	226
EV71-R	ATTTCAGCAGCTTGGAGTGC	
CoxA16-F	ATTGGTGCTCCCACTACAGC	208
CoxA16-R	TCAGTGTTGGCAGCTGTAGG	

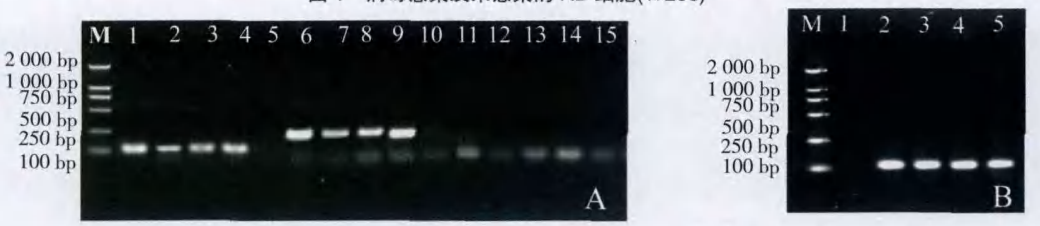
2.4　EV71 病毒保守区核苷酸分析

分别将从标本中扩增得到的 PCR 产物及克隆产物菌液进行序列测定，并将测序结果于 NCBI 网站中进行序列比对，结果显示与 GenBank 中的 EV71 序列同源性达 98%，证实新分离的病毒为 EV71。同时将此次分离的 3 株 EV71 病毒的保守区序列与 Genbank 检索到部分国际代表 BrCr 株进行核苷酸同源性比较，核苷酸序列的同源性达到 81%和 84%、80%。



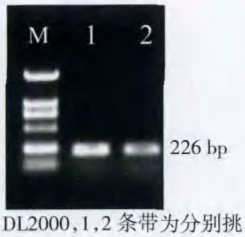
A. 正常的 RD 细胞（对照）　　B. 病毒感染的 RD 细胞

图 1　病毒感染及未感染的 RD 细胞（×200）



M. DL2000 Marker；A、B. 中 1~5 分别为 EV 扩增结果，A 图中 1 为已分离 EV71 阳性对照，2~4 为本次分离阳性 EV71 株；5 为水对照；6~10 依次为本次分离阳性样本 EV71 扩增结果，11~15 为 CA16 引物扩增结果，B 图中 2~5 为本次分离 EV 阳性株扩增结果，1 为水对照

图 2　EV 和 EV71 目的基因片段扩增结果



M 为 DL2000，1，2 条带为分别挑出的克隆菌落电泳条带

图 3　PCR 筛选阳性菌落

3　讨　论

肠道病毒 71 型（Enterovirus71，EV71）属于小 RNA 病毒科肠道病毒属成员，1974 年 Schmidt 等人首次报道[4]从美国加利福尼亚爆发的表现为神经症状疾病（1969~1973 年）的患者中分离到 EV71 病毒，随后，世界上许多国家相继报道了 EV71 病毒在不同地区的流行情况[5-7]。2009 年重庆春夏季手足口病在婴幼儿及学龄儿童中出现了流行趋势，我院手足口病专家门诊共接诊患儿近 200 例，在 47 例病例中分离到 3 株 EV71，4 株肠道病毒，显示 EV71 与 2009 年重庆地区流行的 HFMD 相关，患儿多以发热，咽部、手掌、足底皮疹为主要症状而就诊，且发热以中低热为主，部分患儿无发热，仅以皮疹为首发症状，依据皮疹的性状及特征，临床上容易诊断。在本次 47 例标本采集病例分析，托幼机构儿童 45 例，占 73.7%，有 6 例出自同一所幼儿园，有临床资料表明，病毒主要通过人群间的密切接触进行传播，人群密集处易发生病毒的流行，托幼机构内的学龄前儿童是感染的高危人群，男童较多，可能与男童好动，感染几率增高有关。就本次流行情况分析，以 4~5 月为高发期，因此有必要在手足口病流行时采取必要的隔离措施，防止疾病蔓延。

本研究通过病毒的分离培养与鉴定，获得了重庆地区 EV71 流行株，通过 RT-PCR、特异性 PCR 扩增片段的核苷酸序列测定，证明其为 EV71。本次分离的患儿均来自门诊，细胞病变并没有在第一代接种细胞时出现，都是在盲传第 2 代 24~36 h 出现，其中一株病毒来源于本院疑似病例，可见有些患儿可能在临床症状上并不明显，提示实验室检查在确诊临床病例上有很大帮助，但是实验室检测方面花费和时间在大部分情况下不是病人家属能承受。粪便标本在分离的过程中往往会因为自身的毒性很难和细胞病变区分，接种标本 3 h 内出现细胞病变可能和标本毒性有关，宜把标本处理液 10 倍稀释，重新接种细胞[3]。在本次分离中，来自住院部患儿临床标本均未分离出病毒，可能与住院患儿经药物治疗后病毒滴度下降，不易分离，或者现存的方法并不知道病毒的确切分型有关，此处有待进一步研究。同时本次收集的 2 例脑脊液也均未分离到病毒，可能与脑脊液标本并不易检测到病毒有关[8]。而且我们在进行病毒分离及 RT-PCR 鉴定时发现：不同采集部位的标本阳性率存在差异，其中粪便标本中病毒检出率较高。本次分离的 3 株 EV71，2 株来源于不同患儿的粪便标本，1 株来源于患儿的肛拭子标本，但是在其对应患儿其他临床标本并未分离出 EV71 病毒，在一定程度上证明粪便标本中分离的阳性率高，另外 4 株肠道病毒（暂未分型）分别来源于 1

临床研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0579-03

血液灌流 1 次与 2 次治疗慢性肝炎高胆红素患者的疗效比较

郎 清[1],张丽旦[2],戚敬虎[1],钱克莉[1],石小枫[1]
(1.重庆医科大学附属第二医院感染科,重庆 400010;2.杭州市第六人民医院感染科,杭州 360000)

【摘 要】目的:探讨利用血液灌流(Hemoperfusion ,HP)1 次和 2 次治疗慢性肝炎高胆红素患者的临床疗效。方法:采用回顾性分析方法,收集 27 例血液灌流 1 次和 41 例血液灌流 2 次的慢性肝炎高胆红素患者的临床资料,观察并对比分析组之间治疗前后肝功能、凝血酶原时间、生化等指标。结果:HP2 组与 HP1 组对比分析得出,HP2 组较 HP1 组患者胆红素和转氨酶有明显的降低($P<0.05$),但红细胞和血红蛋白也有显著降低($P<0.05$),其余各指标两组间无明显差异($P>0.05$);2 组的血钾均有明显的升高。结论:2 次 HP 更能有效吸附和降低慢性肝炎患者体内的胆红素和转氨酶,是治疗高胆红素血症患者的有效手段。

【关键词】血液灌流;慢性肝炎;高胆红素血症;疗效
【中国图书分类法分类号】R512.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-04

The therapeutic effects comparison between one and two hemoperfusion in treatment of chronic hepatitis with hyperbilirubinemia

LANG Qing, et al
(*Department of Infection, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the clinical efficacy between one and two hemoperfusion in treatment of chronic hepatitis with hyperbilirubinemia. *Methods*: The clinical data of 68 chronic hepatitis patients with hyperbilirubinemia were reviewed restropectively.27 patients were treated with one hemoperfusion (HP1)and 41 patients were treated with two hemoperfusion (HP2).The liver function, prothrombin time activity, biochemical indicators before and after hemoperfusion in the two groups were compared and

作者介绍:郎 清(1978-),女,硕士,
研究方向:病毒性肝炎的免疫发病机理及治疗。
通讯作者:石小枫,男,教授,E-mail:sxff2003@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金项目(编号:30671867)。

名患儿咽拭子标本,2 名患儿大便标本,1 名患儿肛拭子标本,其病毒类型有待方法技术提高从而进一步鉴定。

有研究称 RT-PCR 结果阳性率高于病毒分离,灵敏度高,特异性好,检测速度快,但是也存在缺点,主要是易于出现假阳性,单使用 RT-PCR 结果判断病原体是不准确的,病毒分离是“金标准”,所以 RT-PCR 和病毒分离相结合更能准确判断病原体。上述特异性 PCR 扩增片段的核苷酸序列分析表明:它们分别同 EV 71 病毒 BrCr 株基因组第 2 364位和 2 589 位的核苷酸序列同源性达到 81%、84%和 80%,而且碱基的缺失和插入较少,最终证实我们所分离的病毒为 EV 71。关于本次分离的重庆毒株亚型特点,有待进行全基因测序及相关序列分析。

EV71 病毒主要侵犯机体的神经系统,引起多种麻痹性疾病和中枢神经系统疾病,严重危害人体的健康。此次调查患儿均未发现严重并发症,可能与病毒基因型的不同,导致致病性强弱的不同有关,需要进一步研究。当患儿主诉口腔疼痛等不适时,临床医师应注意检查手足以及臀部等皮疹的情况,必要时做病原学及病毒基因型别的检测,以防漏诊。目前对 EV71 感染尚无特异高效的抗病毒药物,而 EV71 常能导致严重的并发症,应引起临床医师的重视。总之,了解 HFMD 的病原有利于掌握 CA16、EV71 的流行情况,为临床用药治疗提供相应参考,为重庆地区提供合理有效的流行病监控资料。

参 考 文 献

[1] 朱汝南,钱 渊,邓 洁,等.北京市儿童手足口病与肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型感染有关[J].中华流行病学杂志,2007,28(10):1004-1008.
[2] 刘湘云.肠道病毒感染.见:胡亚美,江载芳,主编.实用儿科学[M].第 7 版.北京:人民卫生出版社,2002.802-810.
[3] 中国疾病控制中心.手足口病实验室检测方案[M].北京:中华人民共和国卫生部出版社,2008.13-14.
[4] Schmidt N J.An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system[J].J Infect Dis,1974,129(3):304-309.
[5] Komatsu K.Outbreak of severe neurologic involvement associated with enterovirus 71 infection[J].Pediatr Neurol,1999,20(1):17-23.
[6] Ho M,Chen E R,Hsu K H,et al.An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan[J].N Engl J Med,1999,341(13):929-935.
[7] Brown B A,Oberste M S,Alexander J P,et al.Molecular epidemiology and evolution of enterovirus71 strains isolated from 1970 to 1998[J].J Virol,1999,73(12):9969-9975.
[8] Yang J J,Wang J R, Liu C C, et al. An out break of enterovirus 71 infection in Taiwan 1998: a comprehensive pathological, virological, and molecular study on a case of fulminant encephalitis[J].J Clin Virol, 2000,17:13-22.

(责任编辑:冉明会)