

DOI: 10.16505/j.2095-0136.2019.0082

• 论 著 •

手足口病患者 3 种肠道病毒咽拭子病毒载量与病毒分离结果关系研究

崔海洋^{1,2}, 王永全², 吉彦莉², 靳博², 何燕¹

1. 首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069; 2. 北京市西城区疾病预防控制中心, 北京 100120

摘要: 目的 了解手足口病患者 EV-A71、CV-A16 与 CV-A6 三种肠道病毒咽拭子病毒载量与病毒分离结果之间的关系。方法 克隆含肠道病毒特异核酸片段质粒, 使用 real-time PCR 建立标准曲线, 记录阳性咽拭子 CT 值, 计算 EV-A71、CV-A16 与 CV-A6 三种肠道病毒患者咽拭子病毒载量。使用人横纹肌瘤细胞分离培养这 3 种肠道病毒, 比较病毒分离阳性和阴性咽拭子病毒载量间的差异。结果 3 种肠道病毒分离阳性咽拭子 CT 值的平均值和中位数都小于 29, 明显低于分离阴性咽拭子。患者咽拭子中, EV-A71、CV-A16 和 CV-A6 的每毫升病毒载量平均值分别为 $10^{8.27}$ 、 $10^{8.42}$ 和 $10^{8.69}$, CV-A16 与 CV-A6 分离阳性咽拭子病毒载量显著高于分离阴性咽拭子的病毒载量 ($P < 0.05$)。结论 手足口病患者咽拭子经 real-time PCR 检测后, 选择 CT 值较低标本分离肠道病毒能提高病毒分离阳性率, 从而为基层实验室常规工作节约人力物力成本。

关键词: 肠道病毒; EV-A71; CV-A16; CV-A6; 病毒载量; 病毒分离培养

中图分类号: R373.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 2095-0136 (2019) 06-0467-04

Association between the amount of human enterovirus in swabs and the positive rate of isolates

CUI Hai-yang*, WANG Yong-quan, JI Yan-li, JIN Bo, HE Yan

* School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

Center for Disease Control and Prevention, Xicheng District, Beijing 100120, China

Corresponding author: HE Yan, E-mail: yanhe118@sina.com

Abstract: Objective To study the association between the amount of human enterovirus in swabs and the positive rate of isolates. **Methods** First, the standard curve with real-time PCR was established, the CT values were recorded and the amount of viruses in swabs from cases infected by EV-A71, CV-A16 and CV-A6 was calculated. Next, virus strains in rhabdomyoma (RD) cells were isolated. Then, the amount of viruses in swabs that were positively and negatively isolated were compared. **Results** The average and median CT values of positively isolated swabs were below 29 which was significantly less than negatively isolated ones. The average amount of viruses in swabs from cases infected by EV-A71, CV-A16 and CV-A6 were $10^{8.27}$, $10^{8.42}$ and $10^{8.69}$, respectively. There were no significant difference among them. For CV-A16 and CV-A6, the positively isolated swabs showed higher amount of viruses than that from the negatively isolated ones ($P < 0.05$). **Conclusions**

The positive rate of isolates can be increased using swabs with less CT values and it can improve the efficiency of virus isolation and reduce the cost.

Key words: Enterovirus; EV-A71; CV-A16; CV-A6; The amount of viruses; Isolation and culture of virus

手足口病是一种常见的儿童肠道传染病, 多感染 5 岁以下幼儿, 可由多种肠道病毒引起, 自 2008 年全国范围内的手足口病疫情暴发以来, 手

足口病的感染率急剧上升, 已经累计感染 700 多万人^[1], 2010—2012 年, 北京市累计报告 11 万多例手足口病患者^[2]。由我国研发的 EV-A71 疫苗已于 2016 年上市, 有报道显示, 随着 EV-A71 疫苗的上市和各项防控措施的实施, 手足口病并没有销声匿迹, 病原谱出现了新的变化^[3]。因此, 继续开展手足口病病原体研究, 有利于深入了解手足口病,

作者简介: 崔海洋, 主管技师, 主要从事病原微生物监测工作

通讯作者: 何燕, E-mail: yanhe118@sina.com

为制定相应防控措施提供依据。

real-time PCR 和病毒分离培养是手足口病实验室检测的 2 种常用方法^[4]。real-time PCR 灵敏度高, 并且能快速检测患者咽拭子内的病毒载量, 是开展病原体监测的主要使用方法。病毒分离培养主要用于分离病毒毒株, 以便进一步分析病毒流行及遗传变异情况, 该方法用时较长, 人力物力消耗较大^[5]。开展手足口病监测及病原检测以来, 基层疾病预防控制中心实验室积累了大量数据, 挖掘这 2 种不同实验方法数据的关联性, 探索咽拭子病毒载量与病毒分离阳性率间的关系, 有助于提高病毒分离培养效率, 节省实验室人力物力成本。

1 材料与方法

1.1 标准曲线建立 使用引物 5'-CCGGCCCCT-GAATGCGGCTAATC-3', 5'-GAACATGTGAG-CAAAAGGCCAGC-3', 扩增肠道病毒 VP1 特异性核酸片段 (517 bp, 50~566), 由北京诺赛基因组研究中心有限公司克隆 PMD18-T 载体, 制备质粒, 质粒经测序验证特异核酸片段的存在。采用美国 Invitrogen 公司 Qubit 2.0 测定质粒浓度, 按照以下公式计算质粒浓度:

$$\text{DNA 模板浓度 (拷贝}/\mu\text{l}) = \frac{C \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{M \times 660}$$

式中, C 为质粒 DNA 的质量浓度 12.9 mg/L, M 为质粒 DNA 的碱基对数 3 209 (空载体碱基对数+插入目的片段碱基对数, 本试验 pMD18-T 为 2 692 bp, 插入目的片段为 517 bp), 6.02×10^{23} 为阿佛加德罗常数计算个数。

连续 10 倍稀释质粒提取液, 制备 $1 \sim 10^{-6}$ 倍梯度标准品, 使用江苏硕世生物科技有限公司肠道病毒通用病毒核酸检测试剂盒检测。实时荧光定量 PCR 仪采用 ABI 公司 ABI7500, 使用 7500fast system software 软件, 手动设定基线和阈值, 自动生成标准曲线。扩增效率 = $10^{-1/\text{斜率}} - 1$ 。

1.2 标本及资料来源 依据《手足口病诊疗指南 (2018 年版)》^[6], 以北京儿童医院为哨点医院, 2015—2017 年每年 3—5 月开展监测, 选择发病 48 h 内手足口病患者, 由接受统一培训专业人员采集患者咽拭子, 咽拭子于 4~8 °C 冷藏, 24 h 内送北京市西城区疾病预防控制中心检测, 咽拭子检测后于 -80 °C 保存。

1.3 核酸检测与病毒载量测定 吸取咽拭子液 140 μl , 使用德国 QIAGEN 公司 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒按照说明书提取 RNA, 80 μl

洗脱提取产物。real-time PCR 检测使用江苏硕世生物科技有限公司通用肠道病毒核酸检测试剂盒、EV-A71/CV-A16 分型试剂盒和 CV-A6 试剂盒, 每个体系上样 5 μl 。咽拭子先经通用肠道病毒核酸检测试剂盒检测, 阳性者经 EV-A71/CV-A16 分型试剂盒和 CV-A6 试剂盒分型。经检测共收集轻症手足口病患者 EV-A71 阳性咽拭子 63 份, CV-A16 阳性咽拭子 63 份, CV-A6 阳性咽拭子 68 份, 记录这些咽拭子通用肠道病毒核酸检测 CT 值, CT 值代入标准曲线, 计算扩增体系中 DNA 模板浓度, 每毫升咽拭子病毒载量 = 扩增体系中 DNA 模板浓度 $\times 10\ 000 \times 140/80$ 。

1.4 病毒分离 选择指数生长期的 RD 细胞, 将 1.3 选择的咽拭子悬液与 RD 细胞 37 °C 作用 20 min 后, 把染毒的细胞置于含 5%CO₂ 的恒温箱中, 37 °C 培养 7 d, 连续接种 3 代。培养过程中观察细胞形态变化, 若细胞染毒 48 h 后开始出现圆缩脱落, 经 real-time PCR 方法确认, 即为病毒分离阳性。

1.5 统计学分析 采用 Excel 2007 软件建立数据库, CT 值采用均数、中位数、四分位数表示。用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 核酸载量比较采用对数转换后进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标准曲线的建立 $Y = -3.37 \log X + 56.987\ 083$, 决定系数 R^2 为 0.994, 斜率为 -3.371, 扩增效率 E 为 98.0%。质粒标准品原液浓度为 3.7×10^9 拷贝/ μl 。

2.2 EV-A71、CV-A16 和 CV-A6 病毒细胞分离阳性与阴性咽拭子 CT 值分布情况 3 种肠道病毒分离阳性咽拭子 CT 值的平均值和中位数都小于 29, 明显低于分离阴性咽拭子。CV-A6 病毒分离阳性咽拭子 CT 值的平均值和中位数最小, 分别为 26.54 和 26.83, EV-A71 病毒分离阳性咽拭子 CT 值的平均值和中位数最大, 分别为 28.53 和 28.69。EV-A71 和 CV-A16 病毒分离阴性咽拭子 CT 值的平均值和中位数都大于 30 (表 1)。

2.3 EV-A71、CV-A16 和 CV-A6 病毒细胞分离阳性与阴性咽拭子病毒载量比较 EV-A71、CV-A16 和 CV-A6 病毒咽拭子每毫升病毒载量平均值分别为 $10^{8.27}$ 、 $10^{8.42}$ 和 $10^{8.69}$, 3 种病毒咽拭子病毒载量差异无统计学意义 ($F = 2.33$, $P = 0.1$)。3 种病毒分离阳性咽拭子每毫升病毒载量的平均值分

别为 $10^{8.44}$ 、 $10^{8.82}$ 和 $10^{9.04}$ ，CV-A16 与 CV-A6 分离阳性咽拭子病毒载量显著高于分离阴性咽拭子病毒载量 ($P < 0.05$)，EV-A71 分离阳性咽拭子与分离阴性咽拭子病毒载量比较， $P = 0.074$ (表 2)。

表 1 3 种肠道病毒病毒分离阳性和阴性咽拭子 CT 值

病毒分离结果	咽拭子份数	CT 值		
		均值	中位数	四分位数($P_{25} \sim P_{75}$)
EV-A71				
阴性	20	30.38	31.53	25.34~34.83
阳性	43	28.53	28.69	25.88~30.71
CV-A16				
阴性	31	30.01	30.73	28.00~32.39
阳性	32	27.25	26.91	25.25~29.75
CV-A6				
阴性	39	28.59	28.48	26.02~30.27
阳性	29	26.54	26.83	23.55~29.39

表 2 3 种肠道病毒细胞分离阳性与阴性咽拭子病毒载量比较

病毒分离结果	咽拭子份数	病毒载量 (lg 拷贝/ml)	P 值
EV-A71			
阴性	20	7.89 ± 1.53	0.07 ^a
阳性	43	8.44 ± 0.87	
均值	63	8.27 ± 1.14	
CV-A16			
阴性	31	8.01 ± 1.25	<0.05 ^a
阳性	32	8.82 ± 0.75	
均值	63	8.42 ± 1.10	
CV-A6			
阴性	39	8.43 ± 0.99	<0.05 ^a
阳性	32	9.04 ± 1.22	
均值	68	8.69 ± 1.13	

注：表中的 P 值为同种病毒分离阳性和阴性咽拭子的病毒载量比较；表中三种病毒分离阴性咽拭子病毒载量比较， $P = 0.19$ ；三种病毒分离阳性咽拭子病毒载量比较， $P = 0.03$ ；三种病毒咽拭子平均病毒载量比较， $P = 0.01$ 。

2.4 3 种病毒分离阳性咽拭子核酸载量比较 EV-A71、CV-A16 和 CV-A6 病毒细胞分离阳性咽拭子病毒载量差异有统计学意义 ($P = 0.03$)，见表 2。两两比较，EV-A71 病毒分离阳性咽拭子核酸载量低于 CV-A6 ($P = 0.01$)，而 CV-A16 与 CV-A6 病毒分离阳性咽拭子核酸载量差异无统计学意义 ($P = 0.39$)。

3 讨论

肠道病毒属于微小核糖核酸病毒科的肠道病毒属，目前已发现 70 多种型别，其中 20 多种型别可以引起手足口病，CV-A16 和 EV-A71 最为常见^[7-8]。有报道显示，近年来，手足口病病原谱发生了新的变化，CV-A6 的感染率逐渐升高，在有

些地区已成为引起手足口病的主要病原体^[9]。另外，感染 CV-A6 的非典型手足口病病例也有报道^[10]。手足口病的高患病率和病原体的多样性为手足口病防控工作带来了很大挑战。

本研究发现，3 种肠道病毒分离阳性咽拭子 CT 值的平均值和中位数都小于 29，明显低于分离阴性咽拭子。CV-A16 与 CV-A6 病毒分离阳性咽拭子病毒载量显著高于分离阴性咽拭子病毒载量，EV-A71 病毒分离阳性咽拭子与分离阴性咽拭子病毒载量差异无统计学意义，这可能受到样本数量的影响。手足口病年平均发病率为 (54~318)/10 万人，80% 以上患者经 real-time PCR 方法检测阳性^[11]。通过细胞培养分离病毒毒株是深入了解肠道病毒流行与变异情况的重要前提，但该方法实验周期较长，本研究结果显示手足口病患者咽拭子经 real-time PCR 检测后，选择 CT 值较小标本分离肠道病毒能提高病毒分离阳性率。

另外，本研究给出了患者感染 EV-A71、CV-A16 和 CV-A6 后发病 48 h 内咽拭子病毒载量的平均值： $10^{8.27}$ 、 $10^{8.42}$ 和 $10^{8.69}$ ，高于黎梅花等^[12]的报道，这可能是由于该报道中患者采样部位和核酸提取试剂盒与本研究不同引起。对 3 种病毒分离阳性咽拭子核酸载量比较发现，EV-A71 病毒分离阳性咽拭子核酸载量低于 CV-A6，而 CV-A16 与 CV-A6 病毒分离阳性咽拭子核酸载量差异无统计学意义，其具体原因仍需要深入研究。

总之，本研究收集 EV-A71、CV-A16 和 CV-A6 病毒患者咽拭子，咽拭子经 real-time PCR 检测后分离培养肠道病毒，通过分析 2 种实验方法结果，为“选择 CT 值较小标本分离肠道病毒能提高病毒分离阳性率”这一推论提供了具体数据支持。

参考文献

- [1] Koh WM, Bogich T, Siegel K, *et al.* The epidemiology of hand, foot and mouth disease in Asia: a systematic review and analysis [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2016, 35 (10): 285-300.
- [2] Tian L, Liang FC, Xu MM, *et al.* Spatio-temporal analysis of the relationship between meteorological factors and hand-foot-mouth disease in Beijing, China [J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18: 158.
- [3] Li J, Sun Y, Du YW, *et al.* Characterization of coxsackievirus A6-and enterovirus 71-associated hand, foot and mouth disease in Beijing, China, from 2013 to 2015 [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 391.
- [4] Luo KW, Gao LD, Hu SX, *et al.* Hand, foot, and mouth disease in Hunan province, China, 2009-2014: epidemiol-

- gy and death risk factors [J]. Plos One, 2016, 11 (11): e0167269.
- [5] Li ZL, Liu X, Wang SH, *et al.* Identification of a nucleotide in 5' untranslated region contributing to virus replication and virulence of coxsackievirus A16 [J]. Sci Rep, 2016, 10 (6): 20839.
- [6] National Health Commission of the People's Republic of China. Guidelines for diagnosis and treatment of hand, foot and mouth disease (2018 edition) [J]. Zhongguo Bingdubing Zazhi, 2018, 8 (5): 347-352. (in Chinese)
国家卫生健康委员会. 手足口病诊疗指南 (2018 年版) [J]. 中国病毒病杂志, 2018, 8 (5): 347-352.
- [7] David MK, Peter MH. Fields virology [M]. 6th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 490-530.
- [8] Liu WL, Huang YD, Ma HL, *et al.* Epidemiological characteristics of hand foot and mouth disease in Xinjiang, 2011—2015 [J]. Xinjiang Yike Daxue Xuebao, 2018, 41 (3): 357-361. (in Chinese)
刘万里, 黄永迪, 马会来, 等. 2011—2015 年新疆手足口病流行病学特征分析 [J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41 (3): 357-361.
- [9] Lü BJ, Cheng H, Yang XB, *et al.* Epidemiological features of hand, foot and mouth disease from 2010 to 2015 in Liuzhou city of China [J]. Zhongguo Bingdubing Zazhi, 2018, 8 (2): 124-129. (in Chinese)
吕榜军, 程红, 杨晓波, 等. 2010-2015 年柳州市手足口病流行病学及病原学特征分析 [J]. 中国病毒病杂志, 2018, 8 (2): 124-129.
- [10] Jason PL, Kristina L, Marie-Louise L, *et al.* Atypical hand-foot-mouth disease associated with coxsackievirus A6 infection [J]. J Am Acad Dermatol, 2013, 69 (5): 736-741.
- [11] Wu XR, Hu SX, Kwaku AB, *et al.* Spatio-temporal clustering analysis and its determinants of hand, foot and mouth disease in Hunan, China, 2009-2015 [J]. BMC Infect Dis, 2017, 17 (1): 645.
- [12] Li MH, Huang YF, Zhu CM, *et al.* Viral load and the duration of virus shedding of enterovirus 71 in stool samples of children with hand, foot and mouth disease and its related factors [J]. Chongqing Yike Daxue Xuebao, 2015, 40 (12): 1582-1586. (in Chinese)
黎梅花, 黄延凤, 朱朝敏, 等. 感染肠道病毒 71 型手足口病患者粪便排毒时间及病毒载量的相关因素研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40 (12): 1582-1586.

收稿日期:2019-01-17 修回日期:2019-08-02 责任编辑:刘磊

论文撰写规范

“四舍五入”是在科学研究中常常遇到的对有效数值的取舍问题。在选定有效数字位数之后遇 4 则舍，遇 6 则进，这已是人所共知的事，在此不再赘述，但遇 5 是舍，还是进，目前尚不统一。我们查阅了多种国内著名的学术期刊的稿约，他们提出在 5 前遇奇数则进，遇偶数（包括零）则舍的原则来处理有效数值的取舍。本刊将采用此原则。举例：如 1.235，若取有效数值为小数点后两位数，则 5 应进，为 1.24，属 5 前遇奇则进原则；又如 1.225 或 1.205，则 5 应舍，为 1.22 或 1.20，属 5 前遇偶则舍的原则。本刊希望作者来稿中对有效数值的取舍按此原则作数据处理。