

手足口病实验室检测方法的研究进展

欧晓燕 许彬*

[摘要] 手足口病(hand-foot-and-mouth disease, HFMD)是由多种人肠道病毒引起的儿童常见传染病,以发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹为主要症状,少数患者出现严重的神经后遗症,个别重症患儿病情进展快可导致死亡。了解手足口病病毒和可能与疾病发展相关病毒的病原学检测方法有利于进一步了解手足口病的传播模式和分子流行病学研究进展,有助于临床的对症治疗及预防控制该疾病的蔓延。本文就手足口病实验室检测方法的研究进展进行综述,为一线工作人员在临床实践过程中选择合适的 HFMD 检测方法提供参考。

[关键词] 手足口病; 肠道病毒 71 型; 柯萨奇病毒 A16 型; 病毒核酸检测方法

Research advances of laboratory detection methods for hand, foot and mouth disease

OU Xiaoyan, XU Bin*

(Clinical Laboratory of Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650100)

[ABSTRACT] Hand-foot-and-mouth disease (HFMD) is an infectious disease common in children which is caused by various human enteroviruses. HFMD presents with a fever and rash or herpes on the hands, feet and mouth. A small number of patients have severe neurological sequelae, with a few severe cases of speedy development leading to death. Therefore, understanding detection methods for HFMD will not only help to understand further the modes of transmission and the molecular epidemiology of HFMD, but also will improve precise clinical treatment, prevention and control of the disease. In this paper, the research progress of research into laboratory testing methods for hand-foot-and-mouth disease will be reviewed, to provide a reference for frontline staff to select appropriate HFMD detection methods in clinical practice.

[KEY WORDS] Hand foot mouth disease; Enterovirus 71; Coxsackie virus A16; Viral nucleic acid detection methods

手足口病(hand-foot-and-mouth disease, HFMD)是由多种肠道病毒(enterovirus, EVs)引起的一种流行性疾病,它可以通过各种传播途径进行传播,包括直接接触、胃肠道和呼吸道。根据世界卫生组织的报告,2010年内西太平洋多个地区已经报告了广泛的手足口病流行^[1-2]。在中国,每年有100多万人感染手足口病,这对儿童的健康构成了严重的威胁^[3-4]。

目前现有的EV71疫苗也尚未能为导致HFMD的所有EVs类型提供交叉保护^[5],因此选择合适的EVs检测方法明确患者感染类型对诊断HFMD进而采取最佳预防措施,对于有效控制HFMD的传播并有效控制其暴发至关重要。HFMD的临床诊断参照《手足口病诊疗指南(2018年版)》执行^[6],临床工作者常常通过采集患者的临床标本,进行病毒分离与鉴

作者单位:昆明市儿童医院检验科,云南,昆明 650100

*通讯作者:许彬, E-mail: 13708477759@163.com

定。目前临床上常用的实验室检测方法包括病毒分离培养法、血清学分析法、病毒核酸检测方法等。

本文拟对 HFMD 实验室检测方法进行综述,旨在为一线科研工作者在临床实践过程中选择合适的 HFMD 检测方法提供参考。

1 病毒分离培养法

病毒分离培养法是鉴定病毒感染性疾病的金标准^[7],其关键在于根据不同时期、不同地区流行株的不同选择对病毒敏感性不同的细胞系进行病毒培养。常用的实验室培养细胞有对柯萨奇病毒 A16 型(coxsackie virus A16, CVA16)和肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)敏感的人横纹肌肉瘤细胞(rhabdomyosarcoma cell, RD cell)、对柯萨奇 B 组病毒敏感的人喉癌上皮细胞(human Laryngeal carcinoma Hep-2 cell)、对 EV71 敏感的非非洲绿猴肾细胞(kidney epithelial cells from African green monkey, Vero cell)等^[8-13]。病毒分离培养法通过采集患者粪便、肛拭子、咽拭子、咽喉洗液或疱疹液等制成悬液后接种于敏感细胞中进行培养,一般需要 7~14 天^[8, 13]。病毒分离培养在诊断 HFMD 上虽然精确,但该方法在诊断某些 EV 血清型的敏感性不足,且该方法所需的分离培养时间长,不利于 HFMD 的早期诊断^[7]。此外,该方法病毒培养过程繁琐,对病毒分离培养人员的操作技能要求较高,需要耗费大量的人力物力,无法满足流行地区大样本的检测,限制了它的临床应用。

2 血清学分析法

血清学分析法常用的包括中和抗体检测法、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、补体结合试验(complement fixation test, CF)等。

EV 入侵机体后可诱导机体产生免疫应答并在机体内产生较高水平的 IgG,抗体水平可保持 2 个月^[14]。中和抗体检测法通过对急性期和恢复期血清标本的病毒特异性抗体进行检测以作出诊断。Yang 和 Mao 等^[15-16]的研究证实,患者在感染 EV71 及 CVA16 后可通过中和试验检测到特异性中和抗体水平均有不同程度的明显增长,这就表明通过测定特异性抗体水平可以进行不

同病原体的鉴别诊断。但该方法存在观察时间较长、抗原漂移、出现交叉免疫反应等造成结果的不确定性,而且患者感染病毒后免疫应答产生抗体尚需一定时间,不适用于 HFMD 的早期诊断。

ELISA 也是通过抗原抗体的特异性结合反应进行不同病原的鉴别诊断。ELISA 可检测患者血清中的 IgM 和 IgG 抗体。该方法主要应用于快速诊断,操作简便、对实验操作人员无特殊要求,而且对于检测设备的要求也不高,普通的酶标仪即可满足需求,非常适合在基层医院的推广应用^[17-18]。然而,有研究显示,ELISA 检测 EV71-IgM、CVA16-IgM 抗体存在交叉反应,假阳性率可达 31.1%和 27.5%^[11],且 IgM 特异性抗体在患者体内持续时间长,根据 ELISA 的阳性检测结果也无法判断疾病是既往感染还是近期感染。

CF 通过感染期检测补体结合抗体可以区分既往感染和新近感染。然而该方法的特异性不高,常在不同肠道病毒的抗原之间存在交叉反应,使得检测结果假阳性率过高,不利于对 HFMD 的准确诊断^[19]。

3 病毒核酸检测方法

鉴于病毒培养法及血清学检测方法都存在一定的局限性,随着分子生物学技术的迅猛发展,核酸检测逐渐发展成为 EV 病原学检测新的“金标准”。核酸检测相较于传统的血清学检测方法具有快速、特异、敏感的优点。目前,常用的 HFMD 病原鉴定的核酸检测技术主要包括基于聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)原理的逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)、实时定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative RT-PCR, qRT-PCR)及以核酸杂交技术为基础的基因芯片技术(microarray)等分子诊断方法^[20]。

常规 RT-PCR 即在扩增时需首先进行逆转录将 RNA 转录成 cDNA,然后再进行特异 DNA 序列的扩增和检测的方法。引起 HFMD 的病毒主要为小 RNA 病毒科 EV 属成员^[21],其病毒核酸为 RNA,因此,RT-PCR 方法常用于 HFMD 的检测。RT-PCR 法通常针对高度保守的 5'非编码区(5'-un-

translated region, 5'-UTR)设计特异性引物进行扩增。引起 HFMD 的常见病毒之一 EV71,其衣壳蛋白由 VP1、VP2、VP3、VP4 4种外壳蛋白构成,其中 VP1 为主要的抗原决定簇,其核苷酸序列信息是 EV71 病毒分型的主要依据。有研究显示采用 EV71 和 CVA16 的 VP1 区的保守序列设计的引物对 101 份 HFMD 临床分离物进行检测,检出率均达到 100%^[22],表明 RT-PCR 用于检测 HFMD 的灵敏度非常高。然而后续有研究显示 VP1 也是病毒变异最大的结构片断,可以导致 EV71 的鉴定失败,这也促进了更多改良的 RT-PCR 检测技术的诞生。Jiang 等^[12]即针对 VP1 区多变的特性,选择了多个保守区域进行引物设计建立了多重 RT-PCR 技术,取得了良好的结果,但是多重 RT-PCR 容易存在交叉反应,且各对引物之间存在扩增效率不一致等问题。综合以上研究结果表明,RT-PCR 技术相较于传统的病毒分离培养法及血清学分析方法确实取得了里程碑式的进展,因为其不仅简化了实验操作流程,更重要的是在灵敏度和特异性上有了极大的提高,已成为 EV 感染快速诊断的重要手段。但由于病毒变异速度快,需要针对不同的片段设计引物,多重 RT-PCR 的交叉反应、扩增效率不一致问题,也成在一定程度上限制了其临床应用,qRT-PCR 检测技术应运而生。

qRT-PCR 在普通 RT-PCR 的基础上增加了荧光标记的特异性探针,可通过 PCR 循环阈值 (cycle threshold, CT) 和标准曲线对样本进行定性和定量分析。引起 HFMD 的病毒种类中最常见的为 EV71 和 CVA16^[23],因此,有研究首先针对 EV71 和 CVA16 VP1 基因设计了相应的引物和探针进行 EV71、CVA16 的检测,检测结果显示未有 2 种病毒以外的其他病毒被检测到^[24],表明该检测方法的特异性良好;而另一研究其检出阳性率达到 69.48% (148/213),远高于病毒分离培养法 34.74% (74/213) 和常规 RT-PCR 方法 47.42% (101/213)^[25],则表明 qRT-PCR 方法的灵敏度高于传统的检测方法。qRT-PCR 具有灵敏度高、特异性好的优点,常用于 EV71、CVA16 及 EV 的检测,有研究还发现选取咽拭子和疱疹液类型样本进行检测,可提高检出率^[26]。由于 HFMD 为全球性流行病,不同时期、不同地区其病毒株或许存在差异,因此,研究

者们还建立了相应的特异性检测技术,如巢式逆转录聚合酶链式反应 (nest RT-PCR)、逆转录环介导等温扩增 (reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) 技术等^[19]。有研究对常用的几种 RT-PCR 方法进行了对比分析^[27-28],结果显示常规 RT-PCR 适用于检测病毒载量高的样本;巢式 RT-PCR 及 qRT-PCR 则适用于病毒载量低的临床样本;且常规 RT-PCR、巢式 RT-PCR 后续还需要进行电泳鉴定,操作繁琐,易污染;而 qRT-PCR 不需要后续步骤,结果直观,不易出现假阳性,临床上可以根据不同的需求来选择不同的检测方法。不可否认的是,这些技术的建立与优化使得 HFMD 的检测方法更加全面、准确,为 HFMD 的诊断提供了便利。

随着近几年 HFMD 的大规模暴发流行,临床病原学检测技术也在逐步向高通量、精准化发展。基因组测序的完成、数据的增长,基因芯片作为一种能够获得大量基因表达图谱的高通量技术迅速得到广泛应用。基因芯片技术是通过将特异的 DNA 片段高密度固化到特殊载体表面,与特殊荧光标记的样品分子进行杂交后通过扫描技术收集信号,并利用专门的生物信息软件进行分析,从而获得样品的信息情况^[29]。该法同时采用多组探针联合检测,规模大、通量高,尤其适用于暴发流行的 HFMD 病原检测,但是基因芯片相对血清学检测、PCR 方法对实验室仪器、人员都有较高要求,且该检测方法所使用的仪器、试剂均比较昂贵,这些硬性条件限制了其在临床上的推广应用。

由于非 EV71 型和非 CVA16 型肠道病毒的频繁出现,以及某些 HFMD 相关病原体检测呈阴性的病例的增加,使得 HFMD 监管困难,给 HFMD 的诊疗带来了新的挑战。随着分子诊断技术的飞跃,下一代测序技术 (next-generation sequencing, NGS) 从一种新兴技术变成了主流检测技术并被逐渐应用于临床诊断。与基因芯片技术不同,它不依赖于已知的序列信息,能对某一生境中的所有微生物的核酸序列进行并行测序与深入细致全基因组分析,具有通量高、速度快、效率高等优势,尤其适用于 HFMD 暴发流行的复杂病原检测分析,为疫情控制的提供了有效手段,也给病原生物诊断研究带来了重大变革。Wang 等^[30-32]的研究表

明 NGS 技术不仅能够为 HFMD 患者感染的病毒变异和进化提供序列依据、全面分析 HFMD 样本中的病原构成,也具有 HFMD 临床检测的可行性,且自 2008 年以来,随着 NGS 技术的不断革新,全基因组测序费用呈指数级下降,测序时间也降至 3 天,都为 NGS 在病原学临床检测的迅速推广应用创造了有利条件。

4 展望

近年来, HFMD 在我国呈现持续性的广泛散发或暴发流行状态,且越来越多患者感染非 EV71、非 CVA16 等以往不常见的其他肠道病毒,使得 HFMD 的监管越加艰难。快速地诊断 HFMD,明确感染病毒类型显得越加重要。传统的病毒分离培养、血清学分析法对人员、设备要求低,可在社区基层医院实现;基于 PCR 原理的病毒核酸检测方法则具有简便快捷且具有一定的灵敏度、特异度能够为 HFMD 的快速诊断提供依据;基因芯片及 NGS 技术则具有通量大、信息全面的优势,能够为新发病例提供全面的基因信息。

自 2015 年奥巴马提出了“精准医学计划”(precision medicine initiative)之后,“精准医疗”便成为全球健康领域的热门话题,这直接推动了基因测序以及建立在其基础上的分子诊断领域的发展。尤其是在 2015 年 10 月份 Pacific Biosciences 推出小型化的三代单分子测序仪 Sequel 更是标志三代测序时代的来临。但目前三代测序尚处于实验室研究阶段,临床应用尚不成熟,在三代基因测序技术突破之前,NGS 较现行技术有高通量、高准确性、成本适应当前消费端的优势,在中短期内,NGS 将成为临床基因测序领域的主力军。

分子生物学检测技术的不断发展, HFMD 的检测方法也日渐丰富,且不同的检测方法有不同的优、缺点。临床实验室应该具体情况具体分析,选择合适的检测方法,在必要的时候进行联合检测,为 HFMD 的全面、准确诊断提供可靠依据,为 HFMD 的个体化防治发挥作用。

参考文献

[1] Esposito S, Principi N. Hand, foot and mouth disease: current knowledge on clinical manifestations, epidemiology, aetiology and prevention [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(3):391-398.

[2] Koh W M, 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):e285-e300.

[3] 王春荣. 多种肠道病毒在手足口病流行中扮演的角色及演变趋势 [J]. *世界华人消化杂志*, 2016(29):4029-4039.

[4] Wang C, Li X, Zhang Y, et al. Spatiotemporal Cluster Patterns of Hand, Foot, and Mouth Disease at the County Level in Mainland China, 2008-2012 [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e147532.

[5] Chan J H, Law C K, Hamblion E, et al. Best practices to prevent transmission and control outbreaks of hand, foot, and mouth disease in childcare facilities: a systematic review [J]. *Hong Kong Med J*, 2017, 23(2):177-190.

[6] 《临床医学研究与实践》编辑部. 手足口病诊疗指南 (2018 年版) [J]. *临床医学研究与实践*, 2018(17):201.

[7] 李斌, 欧维琳. 手足口病病原学及检测方法研究进展 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2016(6):477-480.

[8] Luo S T, Chiang P S, Chung W Y, et al. Reemergence of enterovirus 71 epidemic in northern Taiwan, 2012 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e116322.

[9] Chiang P S, Huang M L, Luo S T, et al. Comparing molecular methods for early detection and serotyping of enteroviruses in throat swabs of pediatric patients [J]. *Plos One*, 2012, 7(10):e48269.

[10] Hyeon J Y, Hwang S, Kim H, et al. Accuracy of diagnostic methods and surveillance sensitivity for human enterovirus, South Korea, 1999-2011 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(8):1268-1275.

[11] Yu N, Guo M, He S J, et al. Evaluation of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 specific immunoglobulin M antibodies for diagnosis of hand-foot-and-mouth disease [J]. *Virology*, 2012, 9:12.

[12] Jiang B, Zhang J, You X, et al. Diagnosis of hand, foot, and mouth disease caused by EV71 and other enteroviruses by a one-step, single tube, duplex RT-PCR [J]. *J Med Virol*, 2012, 84(11):1803-1808.

[13] Wang C, You A, Tian X, et al. Analysis and solution of false-positives when testing CVA16 sera using an antibody assay against the EV71 virus [J]. *Virus Res*, 2013, 176(1-2):33-36.

[14] Gao F, Wang Y P, Mao Q Y, et al. Enterovirus 71 viral capsid protein linear epitopes: identification and characterization [J]. *Virology*, 2012, 9:26.

- [15] Yang C, Deng C, Wan J, et al. Neutralizing antibody response in the patients with hand, foot and mouth disease to enterovirus 71 and its clinical implications [J]. *Virology*, 2011, 8:306.
- [16] Mao Q, Wang Y, Yao X, et al. Coxsackievirus A16: epidemiology, diagnosis, and vaccine [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(2):360-367.
- [17] Sarma N. Hand, foot, and mouth disease: current scenario and Indian perspective [J]. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2013, 79(2):165-175.
- [18] 潘锦华, 罗建辉, 杨国清, 等. 肠道病毒 71 型 IgM 抗体在手足口病诊断中的临床应用价值研究 [J]. *实验与检验医学*, 2015(1):72-74.
- [19] 王春花. 二代测序技术应用于手足口病病原谱的研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2017.
- [20] 王晓. 手足口病常见病原体的核酸检测技术研究进展 [J]. *华夏医学*, 2014(6):162-165.
- [21] Harvala H, Broberg E, Benschop K, et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe [J]. *J Clin Virol*, 2018, 101:11-17.
- [22] Yan J J, Su I J, Chen P F, et al. Complete genome analysis of enterovirus 71 isolated from an outbreak in Taiwan and rapid identification of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 by RT-PCR [J]. *J Med Virol*, 2001, 65(2):331-339.
- [23] Wang B, Li J, Wang Y, et al. Understanding the epidemiological characteristics of EV71 and CVA16 infection to aid the diagnosis and treatment of hand, foot, and mouth disease [J]. *J Med Virol*, 2018. [Epub ahead of print]
- [24] Tan E L, Chow V T, Quak S H, et al. Development of multiplex real-time hybridization probe reverse transcriptase polymerase chain reaction for specific detection and differentiation of Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 61(3):294-301.
- [25] Cui A, Xu C, Tan X, et al. The development and application of the two real-time RT-PCR assays to detect the pathogen of HFMD [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e61451.
- [26] 张桂花. 荧光定量 PCR 法对手足口病病原学诊断价值 [J]. *辽宁医学杂志*, 2015(3):202-203.
- [27] 张龙, 袁青, 郑雅萍. 不同分子生物学方法在手足口病标本检测中的应用 [J]. *智慧健康*, 2017(12):102-103.
- [28] 关桂英, 王凤朝. 不同分子生物学方法检测手足口病标本的应用分析 [J]. *当代医学*, 2014(22):133-134.
- [29] 郭根柱. 手足口病的实验室检测及辅助诊断方法 [J]. *中国社区医师*, 2015(25):114-115.
- [30] Wang C, Zhou S, Xue W, et al. Comprehensive virome analysis reveals the complexity and diversity of the viral spectrum in pediatric patients diagnosed with severe and mild hand-foot-and-mouth disease [J]. *Virology*, 2018, 518:116-125.
- [31] Xu Y, Sun Y, Ma J, et al. A novel Enterovirus 96 circulating in China causes hand, foot, and mouth disease [J]. *Virus Genes*, 2017, 53(3):352-356.
- [32] Wang C H, Nie K, Zhang Y, et al. An Improved Bar-coded Oligonucleotide Primers-based Next-generation Sequencing Approach for Direct Identification of Viral Pathogens in Clinical Specimens [J]. *Biomed Environ Sci*, 2017, 30(1):22-34.