

· 基础论著 ·

## RT-PCR 检测手足口病病原体 EV71

王松 许诚 张红梅 刘勇军 刘威龙 徐六妹 谭艳 谢靖婧 陈心春

**【摘要】 目的** 应用分子生物学技术检测手足口病病原体 EV71, 为临床诊断提供依据。**方法** 根据卫生部发布的《手足口病预防控制指南》(2008 年版), 收集 2008 年 5 月深圳市东湖医院收治的临床诊断为手足口病患儿的大便标本 265 份。应用 RT-PCR 技术检测手足口病病原体 EV71, 将 RT-PCR 产物测序并在 GenBank 进行比对分析以检测该方法的准确度。**结果** RT-PCR 扩增到特异性 EV71 VP1 区 DNA 片段, 大便阳性率为 24%。测序验证所得 DNA 片段是 EV71 VP1 区基因, 同时也验证 RT-PCR 准确度达 70% (14/21)。**结论** RT-PCR 检测手足口病病原体 EV71 可以应用于临床辅助诊断。

**【关键词】** 手足口病; EV71; RT-PCR

**Detection of EV71 as the pathogen of HFMD by RT-PCR** WANG Song, XU Cheng, ZHANG Hong-mei, LIU Yong-jun, LIU Wei-long, XU Liu-mei, TAN Yan, XIE Jing-jing, CHEN Xin-chun. Shenzhen Donghu Hospital, Shenzhen 518020, China  
Corresponding author: ZHANG Hong-mei, Email: gzzhmei@163.com

**【Abstract】 Objective** To detect the pathogen EV71 of HFMD by molecular biological techniques and offer the foundation to clinical diagnosis. **Methods** According to the Ministry of Health "issued by the Hand, Foot and Mouth Disease Control and Prevention Guide" (2008), 265 dejecta of HFMD in May 2008 in Shenzhen Donghu Hospital were collected. RT-PCR was applied to detect the pathogen EV71 of HFMD and the products were sequenced and analyzed in GenBank to verify the accuracy. **Results** Specific DNA fragments of EV71 VP1 district were detected by RT-PCR, 24 percent of the dejecta were positive. DNA fragments sequencing verified it was EV71 VP1 gene and the accuracy of RT-PCR was up to 70 percent (14/21). **Conclusions** RT-PCR can be used to detect pathogen EV71 of HFMD in clinical diagnosis.

**【Key words】** Hand-foot-mouth diseases; EV71; RT-PCR

手足口病是由肠道病毒引起的出疹发热性急性传染病。主要由小 RNA 病毒科、肠道病毒属的柯萨奇病毒 (Coxsackie virus) A 组的 4、5、7、9、10、16 型以及 B 组的 2、5、13 型、埃可病毒 (ECHO virus) 和肠道病毒 71 型 (EV71) 引起, 其中以

作者单位: 518020 深圳市, 深圳市东湖医院  
通讯作者: 张红梅 Email: gzzhmei@163.com

EV71 及 Cox A16 型最为常见。理论上,从细胞分离病毒以及特异性血清中和实验是“EV71 临床鉴定的金标准”。但细胞生长需要 1~2 周,聚集反应、抗原漂移或样品中存在多种病毒等影响特异性血清的中和,这些方法不适用于 EV71 的临床鉴定<sup>[1]</sup>。因此,本文采用 RT-PCR 法检测 EV71,为 EV71 的实验室诊断提供依据。

## 材料和方法

### 一、材料

Viral RNA Mini Extraction Kit(QIAGEN); One Step RNA PCR Kit(TaKaRa); Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0(TaKaRa); 100 bp DNA Ladder Marker(宝生物工程大连有限公司); 据 EV71 VP1 区设计引物,RT-PCR 产物约 500 bp,引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成。

### 二、方法

1. 标本采集:按卫生部发布的《手足口病预防控制指南》(2008 年版)附件手足口病实验室检测方案(试行)操作。

2. 病毒 RNA 提取:同上。

3. RT-PCR:EV71 反应体系如表 1。反应条件:50℃ 30 min,94℃ 2 min,94℃ 30 s,48℃ 30 s,72℃ 40 s,30 个循环。

4. 琼脂糖凝胶回收:按 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 说明书操作。

5. 测序:基因测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

表 1 RT-PCR 反应体系(μl)

试剂	10 × One Step RNA PCR Buffer	MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	dNTPs (10 mmol/L)	RNase 抑制 剂(40 U/μl)	模板 RNA
体积	2.5	5.0	1.0	0.5	2.0
上游引物 (100 μmol/L)	下游引物 (100 μmol/L)	AMV RTase XL (5 U/μl)	AMV-Optimized Taq (5 U/μl)	去 RNA 酶 ddH <sub>2</sub> O	
0.5	0.5	1.0	1.0	加至总体积 25 μl	

## 结 果

### 一、标本收集

根据卫生部发布的《手足口病预防控制指南》(2008 年版),收集 2008 年 5 月深圳市东湖医院收治的临床诊断为手足口病患儿的大便标本 265 份。

### 二、RT-PCR 检测 EV71

以患者标本 RNA 为模板,应用 EV71 VP1 区特异引物,进行 RT-PCR,结果如图 1 所示。RT-PCR 产物位置正确、条带明亮清晰的标本判断为阳性,如图中 a~e 泳道的条带。根据该结果分析计算大便标本 EV71 阳性率为 24%。



图1 RT-PCR 检测 EV71 电泳图  
M:100 bp DNA marker; a ~ e: RT-PCR 扩增产物

### 三、测序并分析 EV71 序列

将 EV71 VP1 的 RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳回收后测序。将所测得序列在 GenBank 上进行 BLAST, 结果证实为 EV71 VP1 序列, 同时证实 RT-PCR 检测的准确度可达 70% (14/21), 如图 2。

## 讨 论

近 10 年来, 亚太地区曾发生大规模手足口病的流行, 其中肠道病毒 EV71 引起的流行明显增多, 以婴幼儿发病为主。大多数患者症状轻微, 以发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹为主要特征。少数患者可并发无菌性脑膜炎、脑炎、急性弛缓性麻痹、呼吸道感染和心肌炎等, 个别重症患儿病情进展快, 易发生死亡<sup>[2]</sup>。

手足口病起病急骤, 病程第 7 天即进入恢复期, 临床上可以依据流行病学资料和临床表现作出诊断。实验室诊断包括病毒分离、血清学实验和病原体核酸检测, 其中病毒分离虽然是确定手足口病病原体的金标准, 但观察细胞病变至少需一周, 耗时较长; 血清学实验需取发病早期和恢复期双份血清进行检测分析才有意义, 不仅时间长且易受抗原漂移和样品中其他病原体的影响; 病原体核酸检测所应用的 RT-PCR 法不仅快速、简便, 而且有较高的灵敏度和特异性。

本文根据卫生部发布的《手足口病预防控制指南》(2008 年版), 收集了 2008 年 5 月深圳市东湖医院收治的临床诊断为手足口病患儿的 265 份大便标本, 应用 RT-PCR 技术检测病原体 EV71。结果显示大便标本 EV71 阳性率为 24%。Singh 等<sup>[3]</sup>曾设计肠道病毒通用引物和 EV71 特异引物, 应用 RT-PCR 技术检测 2000 年新加坡暴发的手足口病患儿多种标本的病原体 EV71, 并应用细胞分离培养和测序验证 RT-PCR 的准确度达 71%。本研究应用测序验证 RT-PCR 准确度达 70% (14/21), 表明 RT-PCR 技术可为手足口病病原体的实验室诊断提供依据。

## 参 考 文 献

- 1 Tan EL, Chow VT, Kumarasinghe G, et al. Specific detection of enterovirus 71 directly from clinical specimens using real-time RT-PCR hybridization probe assay. *Mol Cell Probes*, 2006, 20: 135-140.
- 2 张占卿. 手足口病. *世界感染杂志*, 2007, 7: 446-450.

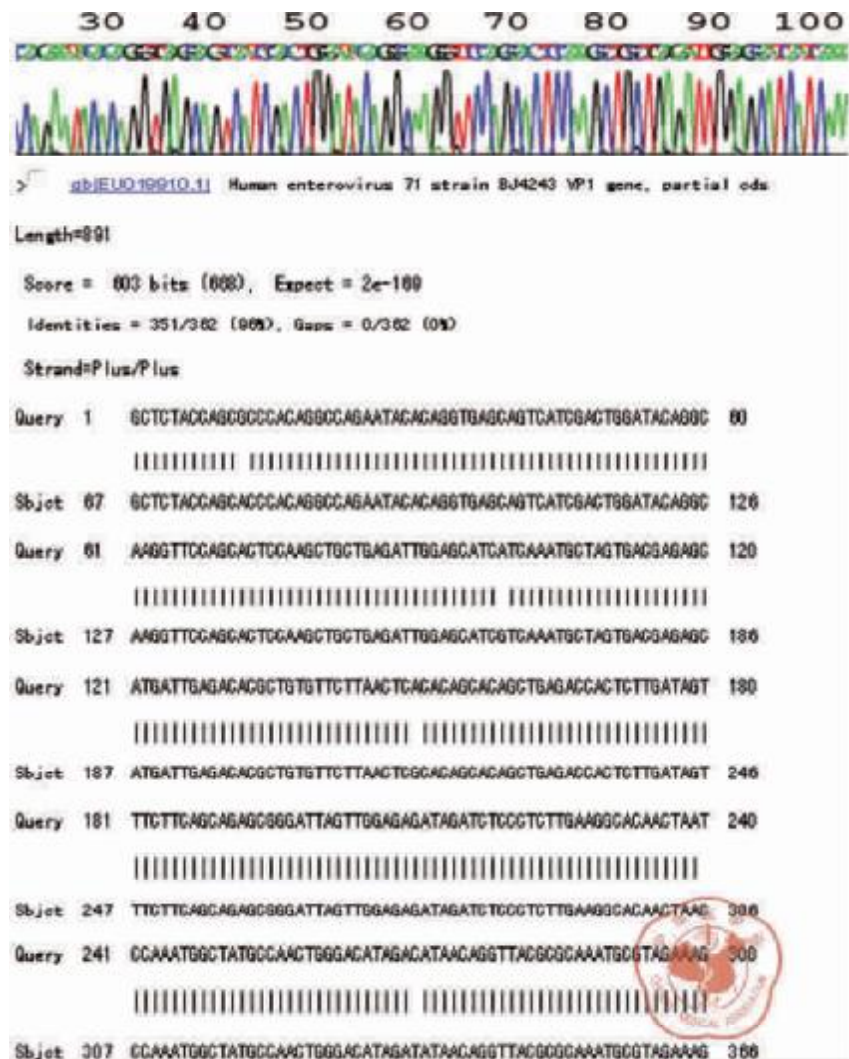


图2 EV71 序列及其分析

- 3 Singh S, Chow VT, Phoon MC, et al. Direct detection of enterovirus 71 (EV71) in clinical specimens from a hand, foot, and mouth disease outbreak in Singapore by reverse transcription-PCR with universal enterovirus and EV71-specific primers. J Clin Microbiol, 2002, 40: 2823-2827.

(收稿日期: 2008-06-20)

(本文编辑: 温少芳)

王松, 许诚, 张红梅, 等. RT-PCR 检测手足口病病原体 EV71 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(4): 282-285.