

手足口病患儿的肠道病毒核酸转阴时间探讨

陈健明 陈胜棣 黄绮云 孔卫乾

【摘要】 目的 探讨手足口病患儿的肠道病毒核酸转阴时间, 寻找手足口病的传播规律。**方法** 收集临床确诊手足口病患儿, 采集患儿的咽拭子、唾液及粪便样本, 采用荧光定量 PCR 技术筛选出肠道病毒 71 (EV71)、柯萨奇病毒 A 组 16 型 (CoxA16) 核酸阳性的 58 例患儿, 随后根据病毒类型及疾病严重程度, 将研究对象分为 EV71 轻症组、EV71 重症组、CoxA16 轻症组、CoxA16 重症组, 分析 4 组患儿 3 种样本的肠道病毒核酸转阴情况。**结果** 58 例手足患儿中, EV71 阳性 38 例 (66%), CoxA16 阳性 20 例 (34%)。EV71 阳性者中, 轻症 20 例、重症 18 例; CoxA16 阳性者中, 轻症 11 例、重症 9 例。EV71 患儿的粪便样本最长排毒时间为 63 d, CoxA16 患儿的粪便样本最长排毒时间为 42 d。EV71 及 CoxA16 重症组患儿的粪便样本在起病后的肠道病毒核酸转阴时间均长于同组的咽拭子和唾液样本 (P 均 < 0.05)。EV71 及 CoxA16 轻症组的粪便、咽拭子、唾液样本肠道病毒核酸转阴时间均短于重症组对应的样本 (P 均 < 0.05)。**结论** 手足口病患儿排毒时间与疾病严重程度相关, 病情越严重其排毒时间越长。疾病早期应采集 3 类样本同时进行检测, 疾病后期应重点对粪便样本进行检测。

【关键词】 手足口病; 咽拭子; 唾液; 粪便; 病毒核酸; 转阴时间

Study of negative-conversion time of enterovirus nucleic acids in children with hand-foot-mouth disease

Chen Jianming, Chen Shengdi, Huang Qiyun, Kong Weiqian. Department of Pediatrics, Panyu Central Hospital, Guangzhou 511400, China

Corresponding author, Chen Jianming, E-mail: 13662378012@163.com

【Abstract】 Objective To explore the time of negative conversion of enterovirus nucleic acids in children with hand-foot-mouth disease and to investigate the transmission pattern of hand-foot-mouth disease (HFMD). **Methods** Fifty-eight children clinically diagnosed with HFMD were enrolled. Throat swabs, saliva and fecal samples collected from all participants were positive for enterovirus 71 (EV71) or coxsackievirus A16 (CoxA16) by fluorescent quantitative PCR. According to the virus type and disease severity, all patients were divided into mild EV71, severe EV71, mild CoxA16 and severe CoxA16 groups. The negative conversion of enterovirus nucleic acids in three types of samples was analyzed among four groups. **Results** In 58 children with HFMD, 38 cases (66%) were positive for EV71 (including 20 mild and 18 severe EV71) and 20 (34%) positive for CoxA16 (including 11 mild and 9 severe CoxA16). The longest time of virus shedding in the fecal samples from EV71-infected children was 63 d, and 42 d for those infected with CoxA16. For children with severe EV71 and CoxA16, the time of negative conversion of enterovirus nucleic acids in the fecal samples was significantly longer than that in the throat swabs and saliva samples (both $P < 0.05$). For children with mild EV71 and CoxA16, the time of negative conversion of enterovirus nucleic acids in the fecal, throat swabs and saliva samples was significantly shorter than that in their counterparts with severe EV71 and CoxA16 (all $P < 0.05$). **Conclusions** The time of virus shedding is correlated with the disease severity in children with hand-foot-mouth disease. The time of virus shedding is prolonged in children with more serious disease. Three types of samples should be collected during the early stage of hand-foot-mouth disease, whereas the fecal samples should be emphasized in the advanced stage of the disease.

【Key words】 Hand-foot-mouth disease; Throat swabs; Saliva; Fecal; Viral nucleic acid; Negative-conversion time

手足口病是一种由肠道病毒感染所引起的具有传染性的疾病, 其主要的病原体包括肠道病毒 71 型 (EV71) 和柯萨奇病毒 A16 型 (CoxA16), 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, 早期临床症状不典型、病情常突然急转直下, 往往在发病早期突然出现预后不良的情况, 并因此引发医患矛盾^[3]。对手足口病患儿实施隔离可切断手足口病的传染源, 是防止手足口病流行的重要措施, 而患儿的排泄物中病毒的排毒时间是制定隔离期的重要参考。荧光定量 PCR 技术是检测手足口病肠道病毒的有效手段^[4]。本研究对手足口病患儿不同来源样本的病毒核酸存在时间进行比较, 并分析不同病情、不同病原体患儿持续排毒时间的差异, 探讨手足口病的传播规律, 现报告如下。

对象与方法

一、研究对象

2017 年 1~12 月在我院儿科就诊的 80 例手足口病患儿中, 临床诊断符合 2010 年国家卫生部制定的《手足口病诊疗指南(2010 年版)》标准^[5]。选择经实时定量 PCR 技术检出咽拭子、粪便和唾液中任一样本的 EV71 或 CoxA16 病毒核酸阳性共 58 例患儿纳入研究。58 例手足口病患儿男 30 例、女 28 例, 年龄 1~13 岁、中位年龄 3 岁, 其中 6~11 月龄 7 例、1~2 岁 28 例、3~5 岁 21 例、6~13 岁 2 例, 5 岁以下患儿占 97%; 来源于托幼机构 49 例 (85%), 有明确手足口病患儿接触史 41 例 (71%)。发病月份 1~3 月 9 例 (16%)、4~6 月 30 例 (52%)、7~9 月 15 例 (26%)、10~12 月 4 例 (7%)。排除标准: ①家长不合作或失访的患儿; ②确诊患有严重免疫缺陷的患儿; ③首诊时病毒核酸样本检测阴性的患儿。本研究经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。

二、诊断标准

根据 2010 年国家卫生部制定的《手足口病诊疗指南(2010 年版)》标准, 重症病例指神经系统、循环系统或呼吸系统受累, 并出现下列情况之一者: ①精神差、嗜睡、易惊、肢体抖动, 无力或急性弛缓性麻痹; ②呼吸困难、紫绀、血性泡沫痰; ③低血压、肢端循环不良等。无重症表现的患儿归入普通病例。

三、方法

1. 分组

58 例患儿根据病原体及病情分为 4 组: EV71 重症组、EV71 轻症组、CoxA16 重症组、CoxA16 轻症组。4 组患儿的性别构成、年龄比较差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。

2. 样本收集

收集手足口病临床确诊患儿的咽拭子、粪便和唾液样本, 从起病当日进行样本采集, 之后按起病后第 7 日、第 14 日……的顺序每隔 7 日采集 1 次样本, 样本病毒核酸检测转为阴性的时间记录为病毒核酸转阴时间。其中咽拭子及唾液样本的采集均在上午 8~10 时进行, 采集前 2 h 无进食或刷牙, 咽拭子采集时让患儿张口, 以咽后壁发红部位的中心及上下, 以棉签各按压 3 次, 棉签放于灭菌管, 样本加入 2 ml 病毒保护液, -20°C 保存; 唾液采集时让患儿在安静状态下口含 3 根棉签并停留 2 min, 棉签放回唾液采集管, 标本分别加入 2 ml 病毒保护液 (含 100 U/ml 青霉素, 100 U/ml 链霉素, 2 000 U/ml 两性霉素 B), 4°C 暂存, 12 h 内送达实验室, -20°C 保存。患儿排大便后立即取粪便样本, 置于无菌管内待测。收集样本后, 所有样本均在 48 h 内完成实验室检测工作。

3. 主要试剂及仪器

仪器包括德国 Eppendorf 5415D 型台式离心机、罗氏 480 PCR 仪、美国 Cary50Probe 紫外光度计。试剂包括台湾 Geneaid EV71 和 CoxA16 RNA 检测试剂盒, 上海辉睿手足口肠道病毒 RNA 检测 (荧光 PCR 法) 试剂盒。阳性质控品为灭活的肠道病毒, 阴性质控品为生理盐水。

4. 实验室检测

经前处理的样本, 选用 EV71 和 CoxA16 RNA 检测试剂盒进行核酸提取, 提取后使用手足口肠道病毒 RNA 检测试剂盒, 在 PCR 仪上进行 EV71、CoxA16 病毒核酸检测。

四、统计学处理

应用 SPSS 19.0 对数据进行统计学分析。不符合正态分布的定量资料采用中位数 (四分位数间距) 表示, 2 组间比较用 Wilcoxon 秩和检验, 组内不同样本间比较采用随机区组设计资料的秩和检验; 计数资料采用百分比表示, 组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、58例手足口病患儿的病情分组及肠道病毒检出情况

首诊时检测出EV71或CoxA16病毒核酸阳性的58例患儿中，EV71阳性38例(66%)，CoxA16阳性20例(34%)。EV71阳性者中，轻症20例、重症18例；CoxA16阳性者中，轻症11例、重症9例。其首诊粪便、咽拭子、唾液样本的病毒核酸阳性率组间比较差异均无统计学意义(P 均 >0.05)，见表1。

表1 不同病情及病原体的手足口病 患儿肠道病毒核酸检出情况					例(%)
组 别	例数	粪便	咽拭子	唾液	
EV71轻症组	20	20(100)	19(95)	18(90)	
EV71重症组	18	18(100)	17(94)	17(94)	
CoxA16轻症组	11	11(100)	10(91)	10(91)	
CoxA16重症组	9	9(9/9)	9(9/9)	8(8/9)	
χ^2 值		-	0.842	0.337	
P 值		-	0.839	0.953	

表2 不同病情及病原体手足口病患儿的肠道病毒核酸转阴时间											例(%)
组 别	例数	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d	63 d	
EV71轻症组	20	9 (45)	15 (75)	18 (90)	19 (95)	20 (100)					
EV71重症组	18	0 (0)	0 (0)	3 (17)	5 (28)	9 (50)	14 (78)	16 (89)	17 (94)	18 (100)	
CoxA16轻症组	11	6 (55)	9 (82)	10 (91)	11 (100)						
CoxA16重症组	9	0 (0)	1 (1/9)	3 (3/9)	6 (6/9)	8 (8/9)	9 (9/9)				

表3 EV71轻症组与重症组不同样本间的病毒核酸转阴时间比较 [中位数 (四分位数间距)]							d
组 别	例数	粪便	咽拭子	唾液	χ^2 值	P 值	
EV71轻症组	20	14.0 (12.3)	7.0 (7.0)	7.0 (7.0)	3.016	0.221	
EV71重症组	18	35.0 (21.0)	21.0 (8.8)	21.0 (8.8)	12.730	0.002	
Z 值		-4.408	-4.212	-4.353			
P 值		<0.001	<0.001	<0.001			

2. CoxA16的检出情况比较

CoxA16重症组患儿的粪便样本在起病后的病毒核酸转阴时间长于同组的咽拭子和唾液样本($P<0.05$)。CoxA16轻症组的粪便、咽拭子、唾液3类样本分别与重症组对应的粪便、咽拭子、唾液样本进行比较，其核酸转阴的时间均较短(P 均 <0.05)。CoxA16轻症组的粪便、咽拭子、唾液3类样本的转阴时间比较差异无统计学意义($P>$

二、不同病情及病原体手足口病患儿的肠道病毒核酸转阴时间分析

各组随着时间的延长，病毒核酸的转阴率呈上升趋势。EV71轻症患儿约75%在起病后14 d病毒检测转阴，35 d全部样本病毒检测转阴。EV71重症病例起病14 d内病毒核酸检测均阳性，至49 d大部分(89%)患儿转为阴性，至63 d全部重症病例转为阴性。CoxA16轻症组约有半数(55%)患儿起病7 d内病毒检测转阴，至28 d全部转阴。CoxA16重症病例起病后的14 d内仅有1例病毒核酸检测转阴性，起病35 d后大部分(8/9)患儿转为阴性，至42 d后全部转为阴性，见表2。

三、不同样本的肠道病毒核酸检测情况比较

1. EV71的检出情况比较

EV71重症组患儿的粪便样本在起病后的病毒核酸转阴时间长于同组的咽拭子和唾液样本($P<0.05$)。EV71轻症组的粪便、咽拭子、唾液3类样本分别与重症组对应的粪便、咽拭子、唾液样本进行比较，其核酸转阴的时间均较短(P 均 <0.05)。EV71轻症组的粪便、咽拭子、唾液3类样本的转阴时间比较差异无统计学意义($P>0.05$)，见表3。

0.05)，见表4。

讨 论

我国全年均有发生手足口病的的报道，发病率达37/100 000~205/100 000，病死率也较高，且近年来其发病率有逐步增长的趋势。手足口病是一种由肠道病毒引起的传染病，引起手足口病的肠道病毒可达20多种，其中以EV71和CoxA16最为常

表 4 CoxA16 轻症组与重症组不同样本间的病毒核酸转阴时间比较 [中位数 (四分位数间距)]						d
组 别	例数	粪便	咽拭子	唾液	χ^2 值	P 值
CoxA16 轻症组	11	7.0 (7.0)	7.0 (7.0)	7.0 (1.8)	1.540	0.463
CoxA16 重症组	9	21 (14.0)	14.0 (10.5)	14.0 (7.0)	6.868	0.032
Z 值		-3.137	-2.898	-3.346		
P 值		0.001	0.004	0.001		

见。手足口病的主要临床表现为发热(以低热为主),手、足、口腔等部位出现小疱疹或小溃疡^[2-3,6]。手足口病具有自限性,临床症状大多数在 7 d 左右自愈,也有少数患者出现心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜脑炎等严重并发症,甚至可导致死亡^[7]。手足口病能通过粪口途径、呼吸道飞沫等途径传播。2008 年手足口病纳入国家丙类传染病管理,2012 年有超过 200 万例手足口病患者^[8]。手足口病常发生在学龄前儿童,婴幼儿尤为多见。当处于手足口病流行季节,周围儿童有手足口病流行,在发病前曾与手足口病患儿有直接或间接接触史,且出现发热,手、足、口腔等部位出现小疱疹等临床表现,临床诊断为手足口病。在临床诊断手足口病的基础上,具有以下 3 项的任意一项即可确诊手足口病:①CoxA16、EV71 等肠道病毒特异性核酸阳性;②分离出肠道病毒,并鉴定为 CoxA16、EV71 等可导致手足口病的肠道病毒;③急性期与恢复期血清相关肠道病毒的中和抗体有 4 倍及以上升高^[5]。目前对手足口病病原体无特效药治疗,一般是对症支持治疗。针对手足口病的 EV71 疫苗已经在我国上市,但对传染源进行隔离仍然是防止手足口病流行的工作重点^[9]。研究并明确不同类型手足口病患儿的排毒时间规律,对防治手足口病有重要意义。

本研究中, EV71 及 CoxA16 轻症组的病毒核酸转阴时间均短于重症组,提示手足口病患儿的病毒核酸转阴时间与疾病严重程度密切相关,这与 Li 等^[10]及滕淑等^[11]的研究结果一致。本研究对不同病原体进行比较,结果显示 EV71 重症组的病毒核酸转阴时间也长于 CoxA16 重症组,其最长的病毒核酸转阴时间可达 63 d。在起病 14 d 后,大多数患儿的临床症状已经消失,但仍有部分患儿存在经粪便持续排毒的情况,仍可能造成疾病的传播,提示有症状的患儿和无症状的康复患儿均可能是传染源,与常树丽等^[12]的报道相一致。重症患儿症状缓解后出院回家,如长期排出带病毒的排泄物,则会成为病毒的传染源,有可能导致所在社区、学

校的手足口病流行。因此,建议手足口病患儿至少隔离 2~4 周,重症病例的隔离时间可适当延长,此外还要注意手足口病患儿分泌物及排泄物的处理,尽可能切断粪口、呼吸道飞沫等的传播途径。

肠道病毒侵入人体后,首先与宿主黏膜上皮细胞膜蛋白受体结合,植入细胞并脱去衣壳,释放 RNA 基因进行转录、复制和增殖,随后经淋巴通道逐步转移到局部淋巴组织(如口腔唾液腺体、扁桃体和肠道集合淋巴结)增殖^[13-14]。理论上随着病程的发展,不同器官的样本病毒检测会有差异^[15-16]。本研究对 3 类样本的检测结果进行对比分析, EV71 感染患儿在首诊时粪便、咽拭子、唾液样本的阳性率均较高,随着时间的延长其检测阳性率逐步下降,起病 42 d 全部咽拭子、唾液样本的病毒核酸已转阴,仍有 4 例患儿在粪便中检测到病毒核酸。对 CoxA16 患儿样本进行检测也有类似情况,起病 28 d 全部咽拭子、唾液样本的病毒核酸已转阴,仍有 3 例患儿在粪便中检测到病毒核酸。因此,建议在疾病早期对可疑病例采集多种样本同时进行检测,提高病毒核酸检出率,避免漏诊;在疾病排毒期应重点对患儿粪便样本进行采集检验,能提高检出率,对手足口病的防控有一定意义。

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. 中国实验诊断学, 2016, 20 (5): 808-810.

[2] Ling BP, Jalilian FA, Harmal NS, Yubbu P, Sekawi Z. Detection and characterization of viruses causing hand, foot and mouth disease from children in Seri Kembangan, Malaysia. Trop Biomed, 2014, 31 (4): 654-662.

[3] 谷芬. 重症手足口病并发心肺衰竭 321 例临床分析. 临床儿科杂志, 2017, 35 (4): 264-267.

[4] 王利花, 李军. 手足口病的流行病学及病原学研究进展. 中国卫生事业管理, 2010, 27 (6): 419-421.

[5] 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2010 年版). 国际呼吸杂志, 2010, 30 (24): 1473-1475.

[6] 李庆彦, 汤昔康, 刘春华. 重症手足口病脑干听觉诱发电位变化及随访结果分析. 新医学, 2016, 47 (7): 477-480.

- [7] Li P, Yu J, Hao F, He H, Shi X, Hu J, Wang L, Du C, Zhang X, Sun Y, Lin F, Gu Z, Xu D, Chen X, Shen L, Hu G, Li J, Chen S, Xiao W, Wang Z, Guo Q, Chang X, Tian X, Lin T. Discovery of potent EV71 capsid inhibitors for treatment of HFMD. *ACS Med Chem Lett*, 2017, 8 (8): 841-846.
- [8] Wang Y, Zou G, Xia A, Wang X, Cai J, Gao Q, Yuan S, He G, Zhang S, Zeng M, Altmeyer R. Enterovirus 71 infection in children with hand, foot, and mouth disease in Shanghai, China: epidemiology, clinical feature and diagnosis. *Virology*, 2015, 12: 83.
- [9] Zhu FC, Meng FY, Li JX, Li XL, Mao QY, Tao H, Zhang YT, Yao X, Chu K, Chen QH, Hu YM, Wu X, Liu P, Zhu LY, Gao F, Jin H, Chen YJ, Dong YY, Liang YC, Shi NM, Ge HM, Liu L, Chen SG, Ai X, Zhang ZY, Ji YG, Luo FJ, Chen XQ, Zhang Y, Zhu LW, Liang ZL, Shen XL. Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjuvant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 2013, 381 (9882): 2024-2032.
- [10] Li J, Lin C, Qu M, Li X, Gao Z, Zhang X, Liu Y, Huang Y, Wang X, Jia L, Li X, Liu G, Yan H, Chen L, Wang Q. Excretion of enterovirus 71 in persons infected with hand, foot and mouth disease. *Virology*, 2013, 10: 31.
- [11] 滕淑, 赵仕勇, 韦翊, 邵启民, 蒋茂莹, 崔大伟, 谢国良. 手足口病患儿大便中病毒核酸检出时间观察. *中华儿科杂志*, 2013, 51 (10): 787-792.
- [12] 常树丽, 张鑫, 杨寅秋. 深圳市 450 例手足口病患儿患病后排毒情况及排毒时间生存分析. *中华预防医学杂志*, 2014, 48 (12): 1110-1111.
- [13] 王亚亭. 手足口病的病原及流行病学. *实用儿科临床杂志*, 2009, 24 (22): 1705-1706.
- [14] 王凌航, 陈志海, 李兴旺. 肠道病毒 71 型与其他肠道病毒所致的手足口病临床特点差异研究——附 37 例分析. *新医学*, 2009, 40 (2): 86-88.
- [15] 谢扑松, 陈良. EV71 型重症手足口病患儿免疫学特点及与预后相关性研究. *医学理论与实践*, 2016, 29 (18): 3172-3174.
- [16] 马永涛, 赵虹, 许惠敏, 李玉萍. 重症手足口病患儿合并心肺功能衰竭的危险因素及疗效观察. *中国中西医结合儿科学*, 2017, 9 (4): 304-307.

(收稿日期: 2018-03-20)

(本文编辑: 林燕薇)

