2 例 EV71 死亡病例的病理特征及 EV71 宁波分离株全基因组序列分析

方仲年 胡爱荣 张岳灿 顾文珍 蒋素文 胡耀仁 陆传统 朱德东

摘 要 目的 探讨 2 例感染 EV71 手足口病(HFMD)死亡病例的病理特征及其病原体的分子生物学特征。**方法** 系统分析 2 例 HFMD 病例的临床资料及尸检病理结果,并对 EV71 的 PCR 结果进行序列分析。**结果** 死者年龄均 <3 岁,病情进展快,最终出现肺水肿和肺出血死亡。尸检显示:病变主要在中枢神经系统、肺脏以及肠道。大脑及脑干可见明显充血、水肿、炎症、坏死及软化灶等,脑脊膜炎症明显;肺脏显著充血,主要为水肿和出血,肺间质及小血管周围少量炎细胞浸润;肠黏膜充血,空肠及回肠部分区域肠黏膜、黏膜下层、平滑肌层、浆膜均坏死,细胞核消失,胞质及间质溶解,肠壁变薄,肠系膜淋巴结肿大,肠系膜及肠黏膜下淋巴滤泡增生,生发中心坏死;心肌纤维细胞结构正常,心肌间质充血,心肌细胞水肿,心外膜少量炎性细胞浸润;肝、脾、肾、胰腺病理改变不明显。肠内容物及总肠道组织 EV 71 病毒核酸检测均为阳性。EV 71 病毒全基因共 7414 个碱基,该 2 株 EV71 均为 C4 亚型。**结论** 危重型 HFMD(EV 71 感染)患者神经系统、呼吸系统病变明显,严重的脑干脑炎、脑膜炎和神经源性肺水肿、肺出血是死亡的主要原因;C4 亚型 EV71 感染的重症 HFMD 患儿肠道的损害亦极为显著,肠道功能保护不容忽视。

关键词 手足口病 尸体解剖 肠道病毒 71 基因型

Pathological Features of Two Deaths Caused by Enterovirus 71(EV71) Infection and Whole – genome Sequence Analysis of EV71 Isolated in Ningbo City. *Fang Zhongnian, Hu Airong, Zhang Yuecan, Gu Wenzhen, Jiang Suwen, Hu Yaoren, Lu Chuantong, Zhu Dedong. The Second People's Hospital of Cixi City, Zhejiang 315315, China*

Abstract Objective To understand pathological features of fatal hand, foot and mouth disease(HFMD) caused by EV71 infection and to analyze whole – genome sequence of EV71 isolated in Ningbo city. **Methods** The clinical and autopsy data of two deaths caused by EV71 infection were analyzed, and whole – genome sequence of EV71 was analyzed by RT – PCR and sequencing. **Results** The patients were both younger than 3 years old. Their rapid progression to death was preceded by the development of pulmonary edema and hemorrhage. Results of the autopsy showed that the central nervous system, lung and intestinal were most severely. Changes of the brain and brain stem were congestive, edema, inflammation, necrosis and malacia. The inflammation in meningeal was also significant. There were significant congestion edema and hemorrhage in lung, with small amount of inflammatory cells infiltrated in interstitial lung and around the small blood vessels. There was congestion in intestinal mucosa. Necrosis, nucleus disappears and cytoplasmic solution in mucosa, submucosa, lamina muscularis and serosa were seen in part of the jejunum and ileum. The intestinal wall became meager, with mesenteric lymph nodes enlargement, follicular hyperplasia and germinal center necrosis. Although the structure of myocardial cells were normal, there were congestion in cardiac interstitial, myocardial edema and small amount of inflammatory cells infiltrated in epicardium. No significant pathological changes were seen in other organs such as liver, spleen, kidney and pancreas. Viral nucleic acids of EV71 were detected in intestinal contents and in totalintestinal tissues. The amplified whole – genome sequence of EV71 consists of 7414 base pairs of RNA and the EV71 strains were classified as subgenogroup C4. **Conclusion** Critical HFMD with EV71 infection often affects central nervous system and lung. Rapid progression to death is preceded by the development of brain stem encephalitis, meningitis, neurogenic pulmonary edema and pulmonary hemorrhage. Severe intestinal damages may relate to EV71 subgenogroup C4 infection and the protection of intestinal function can not be ignored.

Key words Hand, foot and mouth disease; Autopsy; Enterovirus 71; Genotype

作者单位:315016 浙江省慈溪市第二人民医院(方仲年);宁波市第二医院/宁波市传染病医院(胡爱荣、蒋素文、胡耀仁、陆传统、朱德东);宁波天一职业技术学院(张岳灿);宁波市疾病预防控制中心(顾文珍)

通讯作者:胡爱荣,电子信箱: har1224@126.com

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)是一种主要由柯萨奇病毒 A16(coxsakie virus A16, CV Al6)和肠道病毒 71(enterovirus71, EV71)等引发的传染病,临床上以发热和手、足、口部出现皮疹、疱疹等为主要特征。该病是一种自限性疾病,绝大多数病例 1 周内可以痊愈,但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,如不及时治疗,可能致命[1]。为了加强对本病的重视和认识,现将 2 例 HFMD 死亡患儿的临床特点、尸体解剖结果及病原学检测结果报告如下。

资料与方法

1. 临床资料:(1)病例 1:男患儿,15 个月,本地户籍。发热 2 天,流涎、手部皮疹 1 天。患儿于 2010 年 7 月 16 日出现发热(体温最高 39℃),食欲不振,无咳嗽。在当地医院予以输液治疗(具体用药不详),第 2 天体温恢复至正常。继而出现流涎,左手指间出现小水疱疹,夜间有哭闹。晨起烦躁不安,恶心、呕吐 4 次。于 2010 年 7 月 17 日下午 2 时来宁波市第二医院就诊。查体:神志清楚,精神疲软,上唇内侧黏膜处 1 处溃疡,颈项不抵抗,心肺听诊无异常,生理反射存在,病理反射无异常,左手指间有小水疱疹。查血常规:WBC 9.5×10^9/L,中性粒细胞 66.4%,淋巴细胞 23.5%,RBC 3.61×10^{12}/L,Hb 96g/L,PLT 113×10^9/L。门诊建议住院治疗,但是患儿家属拒绝住院。门诊医生予以"清开灵颗粒、抗病毒口服液、康复新液以及头孢克肟"治疗。患儿于 2010 年 7 月 17 日夜间 8 时许病情恶化,出现呼吸困难,急送当地医院,但患儿已经死亡。(2)病例 2:男患儿,14 个月,外来人口(贵州籍)。发热,头颈部及躯干红色皮疹 2 天。发热体温最高 39.1℃,无咳嗽、恶心、呕吐及腹泻。于 2010 年 5 月 6~9 日在当地医院门诊就诊。临床怀疑为"手足口病",并在门诊输液治疗(具体用药不详),未在医院留观。于 2010 年 5 月 10 日下午 4 时 30 分患儿突然无心跳、呼吸,急送上级医院,但患儿已经死亡。

2. 尸体解剖及组织病理学:患儿均于第 2 天下午依法在宁波天一职业技术学院尸检室进行尸体解剖,尸检标本经中性甲醛固定,石蜡包埋,4μm 厚切片,HE 染色,进行常规组织病理学观察。并取患儿肠内容物及肠道组织送宁波市疾病预防控制中心(CDC)进行病毒检测,经 real-time PCR 检测均为 EV71 感染。

3. EV71 的提取与扩增:患儿肠道内容物经超声破碎离心后,应用 Qiagen 试剂盒(美国)提取病毒 RNA,随后进行反转录扩增得到 cDNA(一步法 RT-PCR 试剂盒,日本 TaKaRa 公司,严格按照说明书操作),扩增引物及片段长度见表 1。反应条件为 94℃ 4min,随后 94℃ 45s,58℃ 45s,72℃ 2min,共计 34 个循环,72℃ 10min。3′末端快速扩增(3′RACE)及 5′末端快速扩增(5′RACE)采用日本 TaKaRa 公司 5′- and 3′-Full RACE 试剂盒,严格按照说明书操作,扩增引物及片段长度见表 1。反应条件为 94℃ 3min,随后 94℃ 45s,55℃ 45s,72℃ 1min,共计 25 个循环,72℃ 10min。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶上样孔,另设空白对照和 DNA 标志物,直流 80V 电泳 45min,紫外检测仪下观察结果并用凝胶成像系统保存。

表 1　PCR 引物、位置及目的片段

上游引物	下游引物	位置	目的片段大小(bp)
F1: TTAAAACAGCTGTGGGTTG	R1: ACTTCCAGTACCATCCCTTG	1~1194	1194
F2: ATAGTCGGCTATGGTGAGTG	R2: AGTGAGTGTTGCTGATCCATGGT	1044~2241	1198
F3: TGTTCACTGGGTCCTTTATGGC	R3: ACCAGCATAATTTGGGTTGGCT	2071~3281	1211
F4: TACCATTCATGTCACCTGCGA	R4: CTAGATACGACACATTCCCAAA	3013~4326	1314
5F: GTTTTCAGAGCACAGTTTAGCGG	5R: GTCGGCATAGTGTCTACTGGTG	3689~4897	1210
6F:GTCTTCCAGTTTCTTTATTGGGCTT	R6: TGTCAAATGGTATCCACCGTAG	4646~5978	1333
7F: TTCATTCTACTCACGTCCCT	7R: ATCGCTTAGCAGTCCTCCCA	5481~6360	880
8F: GATCTTGAGTGTTTCGTGCGTC	8R: CGGTACTGAGAATCTTGAGGCT	6241~7175	935
3′末端	GACCTATTGTGTGCTTGGTGGGATG	6772~6796	634
5′末端	GGTATGTGCTCCGCAGTTAGG	510~532	532

4. 分子克隆、测序及同源性比较:PCR 产物的纯化 DNA 回收后,制备感受态细胞,将 PCR 产物连接入 pMD18-T 载体,按照载体说明书进行操作,挑选克隆经过酶切鉴定后,终止法测定插入片段的核苷酸序列。采用 DNAMAN 软件和 Blast software (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)对系列进行拼接和比对。

结　　果

1. 大体解剖所见:2 例患儿均发育营养良好。手部有小泡疹,口腔黏膜小溃疡,角膜混浊。额部、下颌、上颈、肩胛、上胸部及会阴、臀部均可见粉红色丘疹,上唇及下唇均见口腔溃疡。体表淋巴结未肿大。口唇、指甲发绀。气管内见泡沫状物质;气胸试验阴性,胸腔内无明显渗出液,两肺组织体积增大,显著暗红色,质地实,放入水中下沉;肺外膜、纵隔见少量出血点。心脏外观正常,心包腔内少量淡黄色液体渗

出。腹腔内无渗出液,肠系膜充血,部分空肠及回肠坏死呈灰褐色,肠系膜淋巴结肿大;腹腔其余器官未见明显异常。颅腔内无出血,颅内少量淡红色液体,脑膜充血,脑水肿显著。

2. 心脏镜下所见:2 例患儿心肌纤维细胞结构正常,心肌间质充血,心肌细胞水肿,心外膜少量炎性细胞浸润。心脏结构正常(图 1)。

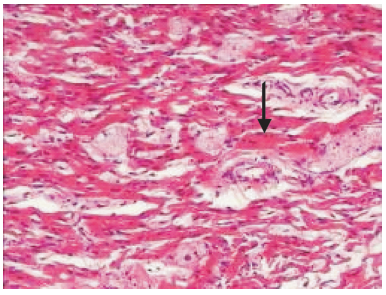

图 1　心肌细胞水肿(HE, ×200)

3. 肺脏镜下所见:2 例患儿两肺显著充血,肺泡壁毛细血管和肺小静脉高度扩张淤血,肺泡腔内充满水肿液,部分区域肺出血,使肺组织显著实变,肺间质及小血管周围见少量炎细胞浸润,以淋巴细胞为主(图 2、图 3)。病例 2 除上述表现外,两肺散在区域性炎性细胞浸润,以中性粒细胞及淋巴细胞为主。

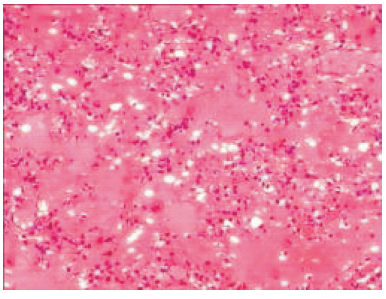

图 2　肺充血、出血、炎性细胞浸润(HE, ×200)

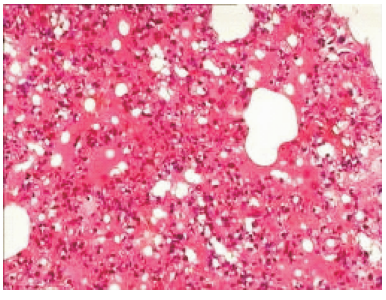

图 3　肺充血、出血、炎性细胞浸润(HE, ×400)

4. 肠道镜下所见:2 例患儿肠黏膜充血,肠黏膜下淋巴滤泡增生,空肠及回肠部分区域肠黏膜、黏膜下层、平滑肌层、浆膜均坏死,细胞核消失,胞质及间质溶解,肠壁变得菲薄。肠系膜淋巴结肿大,淋巴滤泡反应性增生,生发中心坏死(图 4、图 5)。

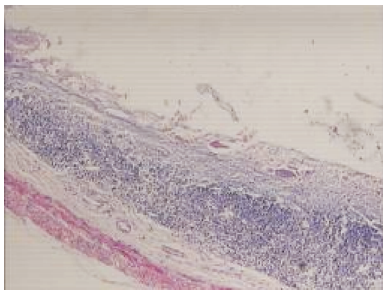

图 4　肠道组织坏死,肠壁变薄(HE, ×200)

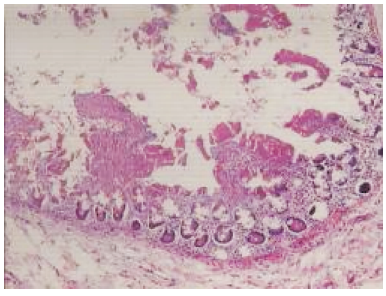

图 5　肠黏膜充血,肠黏膜下淋巴滤泡增生(HE, ×400)

5. 大脑镜下所见:2 例患儿大脑膜血管高度扩张充血,间质水肿,软脑膜及蛛网膜下腔炎性细胞浸润,以淋巴细胞、巨噬细胞为主,病变累及大脑、颅底、小脑、脊髓等脑脊膜。脊髓、延脑、脑桥等脑干部位的实质血管扩张、充血,血管间隙增宽,淋巴细胞、巨噬细胞等炎性细胞围绕血管壁周围浸润,脑实质散在片状坏死,中性粒细胞浸润,软化灶形成(图 6 ~ 图 8)。

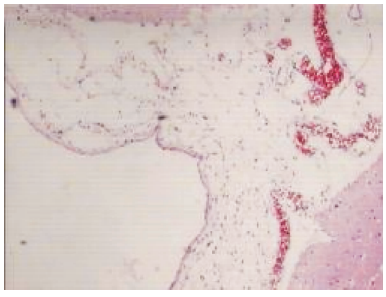

图 6　脑膜炎(脑膜炎性细胞浸润)(HE, ×200)

6. 其他脏器镜下所见:2 例患儿肝血窦及中央静脉淤血,肝细胞高度水肿,肝小叶结构正常;肾间质充血,肾小管上皮细胞水肿,肾近曲小管上皮细胞自溶;肾上腺髓质充血;脾窦显著淤血;胰腺组织结构及胰腺细胞未见明显异常;胸腺结构正常,胸腺细胞增生,

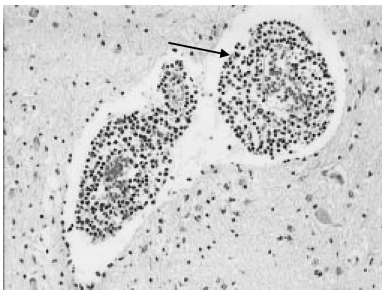

图 7　脑炎，脑血管周围炎性细胞浸润（箭头示）（HE，×200）

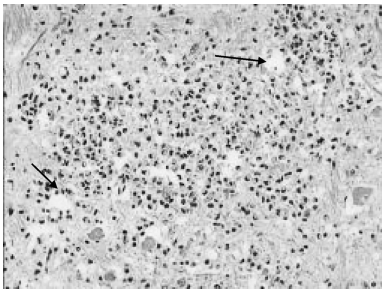

图 8　脑组织坏死（软化灶）（箭头示）（HE，×200）

胸腺间质充血。

7. 病原学检测：肠内容物及总肠道组织病毒检测（PCR）均为 EV 71 阳性（Ct 值分别为 19 及 17）。EV 71 宁波分离株的全基因长度为 7414 个碱基，为 C4 亚型，命名为 NBChina01，在 GenBank 的注册登记号为 HQ828086。通过 ncbi nucleotide blast（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/）系统并与 GeneBank 中 EV71 其他的序列（EU812515.1）进行比较，同源性为 98%[2]。

讨　论

此 2 例患儿年龄均 <3 岁，以发热开始，但体温恢复快，外周血白细胞计数增高不明显，导致临床医师及患儿家属轻视；然而该患儿精神较疲软，夜间有哭闹，烦躁不安，伴恶心、呕吐。符合《手足口病诊疗指南（2010 年版）》重症病例早期识别的标准[3]。

EV71 感染主要病理改变在中枢神经系统、肺以及肠道。以显著脑水肿为主要大体改变。文献报道 EV71 感染的中枢神经系统病变以病毒性脑干脑炎为主要病理学特点，表现为以淋巴单核细胞为主的炎性细胞围绕脑血管形成血管轴套、神经元坏死及软化灶形成、小胶质细胞增生并吞噬神经元、形成胶质结节等[4]。但该患儿除上述表现外，脑膜炎亦比较突出，软脑膜及蛛网膜下腔炎性细胞浸润，以淋巴细胞、巨噬细胞为主，病变累及大脑、颅底、小脑、脊髓等脑脊膜。因此，EV71 重症感染患者的中枢神经系统病变应包括脑膜炎及脑炎。

肺脏亦是明显受损的器官，两肺充血及出血显著，伴有肺间质及小血管周围炎细胞浸润，与文献报道一致[5]。众多研究也证明 EV71 引起的肺部的病变是神经源性的而非由病毒直接侵犯造成的，可能是基于肺组织病毒学检测阴性，无弥漫性肺损伤及炎性浸润的原因[6~8]。但本患儿肺间质及小血管周围均见以淋巴细胞为主的炎细胞浸润，是否能作为病毒侵犯的间接依据？遗憾的是，本研究未对患儿的肺组织进行病毒学检测。

关于 EV71 重症患者肠道改变的报道较少。本患儿的肠道病变显著，且肠内容物及总肠道组织 EV71 病毒核酸检测均为阳性，与韦丹及杨郁等[5,8]报道不一致。因此，对于重症 HFMD 患儿，除密切关注神经系统、呼吸系统及循环系统表现外，肠道功能的保护亦不容忽视。

目前关于 HFMD 导致循环系统损害的机制观点尚不一致，有认为是心肌损害或心肌炎所致；也有观点认为其表现为神经源性，是脑干脑炎引起的中枢性交感兴奋所致，而非心源性[9]。依据本患儿的病理改变，作者认为以神经源性损害为主，同时存在心肌损害及心包膜炎症。患儿其他脏器亦有不同程度的损害及改变，但其器官组织的结构基本正常，考虑为重症病例组织器官充血、淤血引起的继发性改变。

根据 VP1 区核苷酸序列，可将 EV 71 分为 A、B、C 3 个基因型，其中 B 型和 C 型又进一步分为 B1 ~ B5 和 C1 ~ C5 亚型，EV71 宁波分离株为 C4 亚型，与其他的报道一致[3,10]。有研究认为，感染某些基因亚型 EV71 是导致重症 HFMD 的因素之一，而中国内地 HFMD 重症患儿主要为 C4 亚型 EV71 感染[3,11]。笔者认为，HFMD 患儿严重的肠道损害可能与 C4 亚型 EV71 感染相关。

总之，EV71 感染的 HFMD 病情进展快，中枢神经系统、肺脏以及肠道为主要受损脏器，严重的脑膜炎、脑干脑炎和神经源性肺水肿、肺出血是死亡主要原因，除密切关注神经系统、呼吸系统及循环系统表现外，肠道功能的保护亦需要重视。2011 年 4 ~ 5 月全国共上报 HFMD 病例 330279 例，死亡 116 例，发病率和病死率均居丙类传染病的首位[12,13]。因此，临床医生特别是门急诊医生应该高度重视 HFMD 患儿的早期诊断和治疗，尤其是那些症状不典型的婴幼儿；同时，积极开展对 EV71 的全基因序列分析研究，

可为阐明 EV71 的起源、致病机制及疫苗的研制提供线索。

参考文献

1 慎强，胡爱荣，施凯舜，等. 重症手足口病危险因素及临床特点分析[J]. 医学研究杂志，2011，40(2)：93－95

2 Wang LC，Tang S Q，Li YM，*et al*. A comparison of the biological characteristics of EV71 C4 subtypes from different epidemic strains [J]. Virol Sin，2010，25 (2)：98－106

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

4 Hsueh C，Jung SM，Shih SR，*et al*. Acute encephalomyelitis during an outbreak of enterovirus type 71 infection in Taiwan：report of an autopsy case with pathologic，immunofluorescence，and molecular studies [J]. Mod Pathol，2000，13(11)：1200－1205

5 韦丹，李坤雄，陈娥. 肠道病毒 71 型脑干脑炎二例尸检报道及文献复习[J]. 中华儿科杂志，2010，48(3)：220－223

6 Prager P，Nolan M，Andrews IP，*et al*. Neurogenic pulmonary edema in enterovirus 71 encephalitis is not uniformly fatal but causes severe morbidity in survivors[J]. Pediatr Crit Care Med，2003，4(3)：377－381

7 Kao SJ，Yang FL，Hsu YH，*et al*. Mechanism of fulminant pulmonary edema caused by enterovirus 71[J]. Clin Infect Dis，2004，38(12)：1784－1788

8 杨郁，王华，杜鹃，等. 感染肠道病毒 71 型尸检病例的分子病原学诊断[J]. 中华病理学杂志，2009，38(4)：258－262

9 马沛然，王伟. 手足口病并发心肌炎的诊治[J]. 山东医药，2008，48(17)：112

10 Brown BA，Oberste MS，Alexander JP Jr，*et al*. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998 [J]. J Virol，1999，73(12)：9969－9975

11 Ooi MH，Wong SC，Podin Y，*et al*. Human enterovirus 71 disease in Sarawak，Malaysia：a prospective clinical，virological，and molecular epidemiological study[J]. Clin Infect Dis，2007，44(5)：646－656

12 中国疾病预防控制中心公共卫生监测和信息服务中心. 2011 年 4 月中国甲乙丙类传染病疫情动态简介[J]. 疾病监测，2011，26(4)：337

13 中国疾病预防控制中心公共卫生监测和信息服务中心. 2011 年 5 月中国甲乙丙类传染病疫情动态简介[J]. 疾病监测，2011，26(5)：421

(收稿：2011－07－18)
(修回：2011－07－27)

多层螺旋 CT 灌注成像在肾脏良恶性肿瘤鉴别诊断中的临床应用

赵 红 夏文平 李 培

摘 要 目的 探讨多层螺旋 CT(MSCTPI)灌注成像在肾脏良恶性肿瘤鉴别诊断中的应用价值。**方法** 采用多层螺旋 CT 机对正常健康志愿者 20 例(对照组)及经手术病理证实的肾透明细胞癌患者 22 例(肾癌组)、肾错构瘤患者 18 例(肾错构瘤组)的肾皮质 CT 灌注参数进行检测，分别计算：灌注(perfusion)；相对组织血容量(rBV)；峰值时间(TTP)；峰值增强影像(PEI)。**结果** ①肾癌组的 Perfusion、PEI 值明显低于对照组，而 rBV、TTP 值明显高于对照组；②肾错构瘤组的 Perfusion、PEI 值明显低于对照组，而 rBV、TTP 值明显高于对照组；③肾癌组的 perfusion、PEI 值明显高于肾错构瘤组，而 rBV、TTP 值明显低于肾错构瘤组。**结论** 多层螺旋 CT 灌注扫描技术能够较好地反映正常肾组织及肾脏良恶性肿瘤的血流动力学变化，为肾脏良恶性肿瘤的诊断与鉴别诊断提供可靠的依据，具有重要的临床应用价值。

关键词 肾脏肿瘤 肾透明细胞癌 肾错构瘤 多层螺旋 CT CT 灌注成像

Clinical Application of Multi－slice Spiral CT Perfusion Imaging in the Differential Diagnosis of Benign and Malignant Renal Tumors.

Zhao Hong，Xia Wenping，Li Pei. Department of Radiology，The Second Hospital of Yinzhou，Zhejiang 315100，China

Abstract Objective To discuss the clinical practice value of multi－slice spiral CT perfusion imaging in the differential diagnosis of benign and malignant renal tumors. **Methods** Using multi－slice spiral CT machine，we detected the CT perfusion parameters of 20 cases of normal healthy volunteers(the control group)，22 cases of renal clear cell carcinoma proved by operation (the renal carcinoma group) and 18 cases of renal hamartoma(the renal hamartoma group). Perfusion (perfusion)，relative blood volume (rBV)，time to peak (TTP) and peak enhancementimage (PEI) were obtained and calaculated. **Results** ①The perfusion，PEI of the renal carcinoma group

作者单位：315100 宁波市鄞州第二医院放射科
通讯作者：赵红，电子信箱：zhaohongningbo@163.com