ICS 11.020
C 59

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 588—2018

手足口病诊断

Diagnosis for hand, foot and mouth disease

2018-03-06 发布　　2018-08-01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会　发布

目　　次

前言 II
1　范围 1
2　术语和定义 1
3　缩略语 1
4　诊断依据 1
5　诊断原则 2
6　诊断 3
7　鉴别诊断 3
附录A（规范性附录）　手足口病相关肠道病毒特异性抗体检测 5
附录B（规范性附录）　手足口病相关肠道病毒核酸检测 10
附录C（规范性附录）　手足口病相关肠道病毒的分离和鉴定 14

前　言

本标准第6章为强制性条款，其余为推荐性条款。

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准起草单位：首都医科大学附属北京地坛医院、中国疾病预防控制中心、首都医科大学附属北京儿童医院、中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所。

本标准主要起草人：李兴旺、杨维中、王子军、钱素云、陈志海、许文波、张静、卢联合。

手足口病诊断

1 范围

本标准规定了手足口病的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。

本标准适用于全国各级各类医疗卫生机构及其医务人员对手足口病的诊断。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

手足口病 hand,foot and mouth disease

由人肠道病毒71型(EV-A71)和柯萨奇病毒A组16型（CV-A16）等肠道病毒引起的急性传染病，多见于学龄前儿童。重症病例多由EV-A71感染所致。

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPE：细胞病变效应（cytopathic effect）

CV-A16：柯萨奇病毒A组16型（coxsackievirus A16）

cDNA：互补DNA

dNTP：脱氧核糖核苷三磷酸（deoxy-ribonucleotide triphosphate）

EDTA:乙二胺四乙酸

ELISA：酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay）

EV-A71:人肠道病毒71型（human enterovirus A71）

HEPES：4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液

Hep-2：人喉癌上皮细胞

IgG：免疫球蛋白G（immunoglobulin G）

IgM：免疫球蛋白M（immunoglobulin M）

MEM：Eagle’s 培养液（eagle’s minimum essential medium）

OPD：邻苯二胺

RD：人横纹肌肉瘤细胞

RT-PCR：逆转录-聚合酶链反应（reverse transcription-polymerase chain reaction）

TMB：3,3’,5,5’-四甲基联苯胺

Vero：非洲绿猴肾细胞

4 诊断依据

4.1 流行病学特点

一年四季均可发病，具有季节性分布特点，南方可出现春夏季主高峰和秋冬季次高峰，北方主要出现夏秋流行，尤其是夏季。肠道病毒传染性强、隐性感染比例大、传播途径复杂、传播速度快，在短时间内可造成较大范围的流行，流行期间，可在幼儿园、托幼机构、家庭等地出现聚集性或暴发疫情。

4.2 临床表现

潜伏期一般为2 d～10 d，平均3 d～5 d。

急性起病，发热，手、足和臀部出现斑丘疹、疱疹，口腔黏膜或咽峡部出现散在疱疹。可伴有咳嗽、流涕、食欲不振、腹泻等症状。

部分病例仅表现为手、足和臀部皮疹和/或咽峡部疱疹。少数病例皮疹不典型，表现为细小沙粒状皮疹、单部位皮疹或无皮疹。

少数病例可累及中枢神经系统，表现为脑膜炎、脑炎、脑脊髓炎，甚至出现肺水肿、肺出血和/或循环功能障碍等，病情进展迅速，可致死亡。

4.3 实验室检查

4.3.1 一般检查

4.3.1.1 血常规

白细胞计数正常或降低，重型和危重型病例白细胞计数可升高。

4.3.1.2 血糖

危重型病例可升高。

4.3.1.3 脑脊液

中枢神经系统受累时常表现为：外观清亮，压力增高，白细胞计数增多，多以单核细胞为主，蛋白正常或轻度增多，糖和氯化物正常。

4.3.2 血清学及病原学检查

4.3.2.1 用ELISA等方法在患者血清或脑脊液中检测到抗EV-A71或CV-A16等肠道病毒IgM抗体（见附录A）。

4.3.2.2 用ELISA或中和试验等方法检测患者血清中EV-A71或CV-A16等肠道病毒IgG抗体，恢复期血清比急性期有≥4倍升高或急性期抗体阴性而恢复期抗体阳转。

4.3.2.3 用RT-PCR、荧光定量RT-PCR等方法从患者鼻咽拭子、肛拭子、粪便、疱疹液、脑脊液或尸检标本中检测到EV-A71或CV-A16等肠道病毒特异性核酸（见附录B）。

4.3.2.4 用RD、HEp-2或Vero等细胞系对患者鼻咽拭子、肛拭子、粪便、疱疹液、脑脊液或尸检标本进行病毒培养，可分离到EV-A71或CV-A16等肠道病毒（见附录C）。

5 诊断原则

5.1 根据临床表现及一般实验室检查结果可做出临床诊断和分型。流行病学资料可作为参考。

5.2 确诊需要手足口病相关病原学和血清学检测的阳性结果。

6 诊断

6.1 临床诊断病例

符合4.2，并排除其他相关疾病。

6.2 确诊病例

临床诊断病例，并具有4.3.2之一者。

6.3 临床分型

6.3.1 普通型

手、足、臀部皮疹，口腔黏膜疱疹，伴或不伴发热。

6.3.2 重型

出现中枢神经系统受累表现，如：精神差、嗜睡、易惊、谵妄；头痛、呕吐；肢体抖动、肌阵挛、眼球震颤、共济失调、眼球运动障碍；无力或急性弛缓性麻痹；惊厥。可见脑膜刺激征，腱反射减弱或消失。实验室检查可有白细胞和血糖升高。

6.3.3 危重型

重型病例出现下列情况之一者：

a) 频繁抽搐、昏迷、脑疝等严重中枢神经系统受损表现；
b) 呼吸困难、血性泡沫痰、紫绀等呼吸功能障碍表现；
c) 皮肤花斑、四肢冰凉、心率明显加快、血压明显上升或下降等循环功能障碍表现。

7 鉴别诊断

7.1 其他出疹性疾病

手足口病普通型应与丘疹性荨麻疹、水痘、不典型麻疹、幼儿急疹、带状疱疹以及风疹等疾病鉴别。可根据流行病学、皮疹形态、部位、出疹时间及顺序、有无淋巴结肿大以及伴随症状等进行鉴别，以皮疹的形态及部位最为重要。最终可依据病原学和血清学检测结果进行鉴别。

7.2 其他病毒所致脑膜炎或脑炎

由其他病毒引起的脑膜炎或脑炎，如单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、EB病毒、流行性乙型脑炎病毒等，临床表现与手足口病出现的中枢神经系统损害表现相近。对皮疹不典型者，根据流行病学史、病原学或血清学检查结果做出诊断。

7.3 脊髓灰质炎

手足口病出现急性弛缓性麻痹（AFP）时应与脊髓灰质炎鉴别。后者主要表现为双峰热，病程第2周退热前或退热过程中出现弛缓性麻痹，且无皮疹。最终依据病原学检测结果鉴别。

7.4 肺炎

手足口病危重型病例可发生肺水肿，应与肺炎鉴别。肺炎主要表现为发热、咳嗽、呼吸急促等呼吸道症状，一般无皮疹；病情进展相对缓慢，胸片加重或减轻均呈逐渐演变，可见肺实变病灶、肺不张及胸腔积液等。

附 录 A
（规范性附录）
手足口病相关肠道病毒特异性抗体检测

A.1 ELISA检测EV-A71 IgM抗体

A.1.1 试验材料

试验材料如下：

a) 微孔板：包被抗人 IgM；
b) 抗原试剂：含 EV-A71 抗原；
c) 酶标试剂：辣根过氧化物酶标记的 EV-A71 抗体；
d) 阳性对照：含抗 EV-A71 IgM 抗体阳性血清；
e) 阴性对照：不含抗 EV-A71 IgM 抗体血清；
f) 标本稀释液：含蛋白缓冲液；
g) 浓缩洗涤液：含不低于 2.5%的表面活性剂；
h) 底物：TMB 或 OPD；
i) 终止液：含硫酸，浓度 2 mol/L。

A.1.2 标本

标本如下：

a) 血清或血浆，含或不含 EDTA、柠檬酸钠或肝素等抗凝剂的标本。无悬浮纤维蛋白或聚合物、重度溶血、细菌污染。
b) 脑脊液。

A.1.3 步骤

因不同试剂盒操作方法及流程不同，具体操作按照其试剂说明书进行，本文以ELISA通用操作为例，检测步骤如下：

a) 试剂室温平衡 30 min 以上；
b) 配液：将浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水 20 倍稀释；
c) 编号：将标本对应微孔板按序编号，每板应设阴性对照 3 孔，阳性对照 2 孔和空白对照 1 孔；
d) 加稀释液：每孔加入标本稀释液 100 μL，空白孔除外；
e) 加样：分别在相应孔中加入待测标本或阴性、阳性对照 10 μL，轻轻振荡混匀（脑脊液可以 1∶2 稀释）；
f) 孵育：用封板膜封板后，37℃孵育 30 min；
g) 洗板：小心揭掉封板膜，用洗板机洗涤 5 遍，最后一次扣干；
h) 加抗原：每孔加入抗原试剂 50 μL，空白孔除外；
i) 加酶：每孔加入酶标试剂 50 μL，空白孔除外，轻轻振荡混匀；
j) 孵育：用封板膜封板后，37℃孵育 30 min；
k) 洗板：小心揭掉封板膜，用洗板机洗涤 5 遍，最后一次扣干；
l) 显色：每孔加入显色剂 A、B 液各 50 μL，轻轻振荡混匀，37℃避光显色 15 min；

m） 测定：每孔加入终止液 50 μL，轻轻振荡混匀，10 min 内测定结果，设定酶标仪波长于 450 nm，用空白孔调零后测定各孔 OD 值。

A.1.4 试剂对照范围

A.1.4.1 阴性对照OD值≤0.1。若1孔阴性对照OD值>0.1应舍弃，若2孔或3孔阴性对照OD值>0.1，应重复试验。

A.1.4.2 阳性对照OD值≥0.8。

A.1.5 结果判断

A.1.5.1 临界值（cutoff）计算：临界值=0.1+阴性对照OD均值。（阴性对照孔OD值低于0.05按0.05计算）。

A.1.5.2 阴性判定：标本OD值＜临界值，为EV-A71 IgM抗体阴性。

A.1.5.3 阳性判定：标本OD值≥临界值，为EV-A71 IgM抗体阳性。

A.2 手足口病肠道病毒中和抗体检测

A.2.1 液体配制

A.2.1.1 血清处理液(A液)

100 mL中含下列液体：

a） MEM，85 mL；
b） 3% L-谷氨酰胺，1 mL；
c） 7.5%碳酸氢钠，2 mL；
d） 胎牛血清，2 mL；
e） 青、链霉素（各 10 000 U/mL），10 mL。

A.2.1.2 细胞营养液（B液）

按生长液配方配制，100 mL中含下列液体：

a） MEM，85 mL；
b） 3% L-谷氨酰胺，1 mL；
c） 7.5%碳酸氢钠，2 mL；
d） HEPES，1 mL；
e） 胎牛血清，10 mL；
f） 青霉素、链霉素（各 10 000 U/mL），1 mL。

A.2.1.3 病毒（血清）稀释液（C液）

按维持液配方配制，100 mL中含下列液体：

a） MEM，93 mL；
b） 3% L-谷氨酰胺，1 mL；
c） 7.5%碳酸氢钠，2 mL；
d） HEPES，1 mL；

e) 胎牛血清，2 mL；
f) 青霉素、链霉素（各 10 000 U/mL），1 mL。

A.2.2 攻击病毒CCID$_{50}$滴定和滴度梯度制备（EV-A71或CV-A16）

A.2.2.1 将增殖后的病毒悬液冻融3次，然后在4℃、12 000 r/min条件下离心10 min，取上清液分装于 20支冻存管中，每管0.5 mL，保存在－70℃冰箱长期保存。每次中和试验取一管，每管应在一次试验中用完，有剩余者应灭活后废弃。

A.2.2.2 加Eagle液10倍系列稀释为10^{-8}～10^{-1}病毒液，各加入细胞板内，每孔50μL，每稀释度4孔细胞。

A.2.2.3 每孔加细胞悬液50μL，同时设细胞对照（50μL稀释液+50μL细胞悬液），36℃培养7 d，观察细胞病变。

A.2.2.4 按Behrens-Kärber公式计算出分离病毒株的CCID$_{50}$。

A.2.2.5 正式试验前应先滴定攻击病毒2次～3次，取其平均值，求出每0.05 mL中含100 CCID$_{50}$的病毒载量。

A.2.2.6 按照计算好的稀释比例配制攻击病毒，求出试验所需的病毒总量（即100 CCID$_{50}$/0.05 mL）。

A.2.2.7 取3支小试管，每支加病毒稀释液（液体配制中的C液）0.9 mL。

A.2.2.8 用带滤芯的吸尖（ART吸尖）吸0.1 mL已经稀释好的攻击病毒液（即100 CCID$_{50}$/0.05 mL）到第一支小试管中，换另一支ART吸尖，轻轻并彻底地混匀，避免产生大量气溶胶，按照此方法依次稀释至0.1 CCID$_{50}$/0.05 mL。

A.2.3 稀释血清

A.2.3.1 发病1 d～7 d内采集的患者急性期血清，发病后3周～4周采集的恢复期血清，分别-20℃冻存备检。

A.2.3.2 取无菌小试管若干支（每份血清使用一支）置试管架上，每管加血清处理液（A.2.1.1液体配制中的A液）0.3 mL，加待测血清0.1 mL，盖紧塞子，振摇混匀，放4℃冰箱过夜，即为1:4稀释血清。次日56℃、30 min灭活。

A.2.3.3 打开独立无菌包装48孔组织培养板，纵向使用，每孔加血清稀释液（A.2.1.3液体配制中的C液）0.3 mL，每份血清使用一排，每排4孔。使用移液器取处理过的血清0.1 mL加入第一孔（即为1:16），吹吸8次～10次，吸0.1 mL加入第二孔（即为1:64），依次至1:1 024，血清稀释的过程中不必换吸尖。即每份血清标本进行4倍倍比稀释，即1:4、1:16、1:64、1:256、1:1 024。

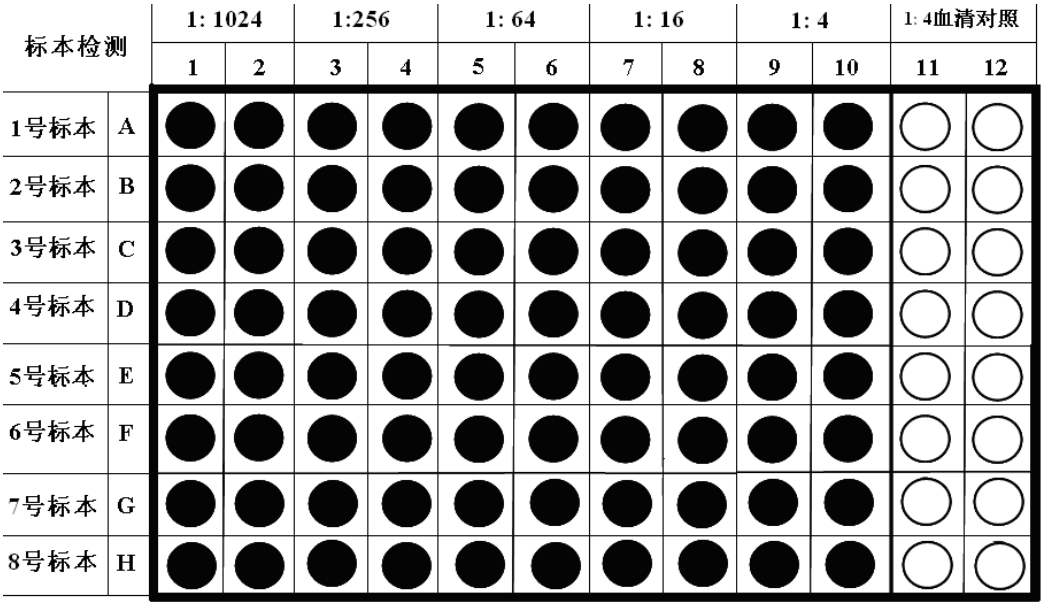
A.2.3.4 每份血清标本的每个稀释度都要平行做两孔。

A.2.4 病毒中和抗体测定的操作步骤

具体操作步骤如下：

a) 取一块 96 孔板横向使用，每块板可以做 8 份（4 对）待测血清，版面设计见图 A.1。
   1) A1-A2 孔（B1-B2、C1-C2、D1-D2、E1-E2、F1-F2、G1-G2、H1-H2）中每孔加入 1:1 024 稀释度的待测血清 0.05 mL，不必换吸尖；

2) 在 A3-A4 孔（B3-B4、C3-C4、D3-D4、E3-E4、F3-F4、G3-G4、H3-H4）中每孔加入 1:256 稀释度的待测血清 0.05 mL；
3) A5-A6 孔（B5-B6、C5-C6、D5-D6、E5-E6、F5-F6、G5-G6、H5-H6）中每孔加入 1:64 稀释度的待测血清 0.05 mL；
4) A7-A8 孔（B7-B8、C7-C8、D7-D8、E7-E8、F7-F8、G17-G8、H7-H8）中每孔加入 1:16 稀释度的待测血清 0.05 mL；
5) A9-A10 孔（B9-B10、C9-C10、D9-D10、E9-E10、F9-F10、G9-G10、H9-H10）中每孔加入 1:4 稀释度的待测血清 0.05 mL；
6) A11-A12 孔（B11-B12、C11-C12、D11-D12、E11-E12、F11-F12、G11-G12、H11-H12）为每份待测血清对照孔，每孔中补加稀释液 0.05 mL。



图A.1 病毒中和抗体测定 96 孔板版面设计图

b) 上述孔中分别加入病毒 0.05 mL（病毒滴度事先已经稀释为 100 $CCID_{50}$/0.05 mL）。
c) 盖好盖子后用微量板混匀器混匀，放入 36℃ CO_2孵箱中孵育 2 h。
d) 另取一块 96 孔板纵向使用，做 100 $CCID_{50}$/0.05 mL 病毒滴度的核实（每次实验都必须做）。每孔先加病毒稀释液（试剂配制中的 C 液）0.05 mL，然后从 0.1 $CCID_{50}$/0.05 mL 加起，每孔 0.05 mL，每个稀释度 8 孔，不必更换吸尖，一直加至 100 $CCID_{50}$/0.05 mL；同时留出 4 孔做为细胞对照孔，每孔加入 0.1 mL 病毒稀释液，然后放入 4℃冰箱中暂存。
e) 在孵育期间，用消化液消化细胞，准备细胞悬液，细胞悬液的浓度为 2×10^5 个/mL，每块 96 孔板至少需要准备 10 mL。
f) 孵育结束后每个待测血清孔、血清对照孔（待检标本板）和病毒回滴孔和细胞对照孔（病毒回滴板）分别加入 0.1 mL 细胞悬液，然后用微量板混匀器混匀，放入 36℃ CO_2孵箱中孵育培养；
g) 使用倒置显微镜每天观察 CPE，并记录病毒滴定结果，以不产生细胞病变的血清最高稀释度的倒数为终点效价。当 100 $CCID_{50}$/0.05 mL 的病毒对照孔出现完全病变时，判定最终结果（5 d～7 d）。
h) 注意：如果病毒对照结果（病毒回滴）不在 32 $CCID_{50}$/0.05 mL～320 $CCID_{50}$/0.05 mL 的范围内，实验无效，就要重复实验。

A.2.5 结果判定

A.2.5.1 当最高稀释度血清的2孔中有1孔出现细胞病变，另一孔不出现细胞病变，该稀释度的倒数计即为该血清标本的中和抗体效价。

A.2.5.2 当高稀释度2孔完全病变，相邻低稀释度2孔完全不病变，则两者平均稀释度的倒数即为该血清标本的中和抗体效价。

A.2.5.3 当两个相邻稀释度血清均出现1孔细胞病变，另1孔不出现细胞病变，则两者平均稀释度的倒数即为该血清标本的中和抗体效价。

A.2.5.4 对于HFMD患者的双份血清中和实验结果来说，如果恢复期血清较急性期血清EV-A71或CV-A16中和抗体滴度出现4倍或4倍以上增高即可确诊。

A.2.5.5 如恢复期血清较急性期血清其他肠道病毒中和抗体滴度出现4倍或4倍以上增高可证实该肠道病毒感染，是否为病因还应结合临床和流行病学判断。

附 录 B
（规范性附录）
手足口病相关肠道病毒核酸检测

B.1 RT-PCR法检测肠道病毒核酸

B.1.1 试验材料

B.1.1.1 可用于手足口病肠道病毒检测的临床标本：鼻咽拭子、肛拭子、粪便、疱疹液、脑脊液或尸检标本，或其病毒分离培养物。

B.1.1.2 扩增引物设计如下：

a) 人肠道病毒核酸检测通用引物序列（产物长度116bp）：PE2（上游）：5′-TCC GGC CCC TGA ATG CGG CTA ATC C-3′；PE1（下游）：5′-ACA CGG ACA CCC AAA GTA GTC GGT CC-3′；
b) EV-A71核酸检测引物序列（产物长度226bp）：EV-A71-S（上游）：5′-GCA GCC CAA AAG AAC TTC AC-3′；EV-A71-A（下游）：5′-ATT TCA GCA GCT TGG AGT GC-3′；
c) CV-A16核酸检测引物序列（产物长度208bp）：CV-A16-S（上游）：5′-ATT GGT GCT CCC ACT ACA GC-3′；CV-A16-A（下游）；5′-TCA GTG TTG GCA GCT GTA GG-3′。

B.1.1.3 总RNA提取试剂：可使用商业化试剂盒提取RNA。

B.1.1.4 AMV逆转录酶、耐热DNA聚合酶和dNTP等。

B.1.2 操作步骤：不同试剂盒RT-PCR操作及反应流程不同，具体操作以说明书为准，本文以两步法RT-PCR为例。

B.1.2.1 总RNA提取：按试剂说明提取细胞总RNA，制备模板RNA。

B.1.2.2 设计对照，A：阳性对照：灭活病毒对照。B：正常细胞对照。C：试剂对照：用去离子水代替标本。

B.1.2.3 逆转录合成cDNA：根据AMV逆转录酶生产厂说明书，通过逆转录合成与目的基因RNA序列互补的cDNA

B.1.2.4 配置反应体系：不同试剂盒配置体系不同，本文以一般通用方法为例。具体配置见表B.1。

表B.1 PCR反应体系配置（50 μL体系）

试剂名称	体积
10×PCR Buffer	5 μL
50 mM $MgCl_2$	1.5 μL
10 mM dNTP Mix	1 μL
上游引物（0.1 μg/μL）	1 μL
下游引物（0.1 μg/μL）	1 μL

Taq DNA 聚合酶（5 U/μL）	0.5 μL
cDNA（逆转录产物）	5 μL
RNase Free dH_2O ·	35 μL

B.1.2.5 PCR扩增：PCR循环特异性扩增目的基因片度，反应条件：95℃预变性3 min；95℃变性30 s，50℃退火30 s，72℃延伸40 s，共扩增30个～35个循环；最后72℃延伸10 min。

B.1.2.6 用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物。

B.1.3 结果判断

如果PCR扩增产物电泳条带分子量与预期产物片段大小相同，表明为阳性。标本的实验室诊断结果根据表B.2进行判断。

表 B.2 PCR 产物结果判断参照表

待检标本 RT-PCR 结果	实验室诊断结果
EV（－），EV-A71（－），CV-A16（－）	肠道病毒阴性
EV（＋），EV-A71（－），CV-A16（－）	非 EV-A71、CV-A16 的其他肠道病毒
EV（＋），EV-A71（＋），CV-A16（－）	EV-A71
EV（＋），EV-A71（－），CV-A16（＋）	CV-A16

B.1.4 意义

阳性结果表明有手足口病相关肠道病毒感染。

B.2 荧光定量RT-PCR法检测肠道病毒核酸

B.2.1 方法

单通道检测EV-A71，单通道检测CV-A16，单通道检测肠道病毒；或采用双通道同时检测EV-A71和CV-A16；或采用三通道同时检测EV-A71和CV-A16和肠道病毒。

B.2.2 试验材料

B.2.2.1 检测标本：见B.1.1.1。

B.2.2.2 扩增引物和荧光探针设计如下：

a) CAV16 荧光引物探针:上游引物:CAV16YGF:5′-GGGAATTTCTTTAGCCGTGC-3’;下游引物:CAV16YGR:5′-CCCATCAARTCAATGTCCC-3′；探针（FAM 荧光素标记）：CAV16YGPB：5′-(FAM)-ACAATGCCCACCACGGGTACACA-(BHQ1)-3′。

b) EV71 荧光引物探针：上游引物：EV71YGF：5′-TGATTGAGACACGCTGTGTTCTTA-3′’；下游引物：EV71YGR:5′-CCCGCYCTGCTGAAGAAACT-3′；探针（HEX 荧光素标记）：EV71YGPB： 5′-HEX-TCGCACAGYACAGCTGAGACCACTC--(TAMARA)-3′。

c) 肠道病毒荧光引物探针：上游引物:EV(YG)F：5′-GGCTGCGYTGGCGGCC-3′；下游引物:EV(YG)R：5′-CCAAAGTAGTCGGTTCCGC-3′；探针（FAM荧光素标记）：EVTY(YG)PB：5′-(FAM)—CTCCGGCCCCTGAATGCGG—(BHQ1)-3′。

B.2.2.3 总RNA提取试剂：可使用商业化试剂盒提取RNA。

B.2.2.4 AMV逆转录酶、DNA聚合酶和dNTP等；可用一步法荧光定量RT-PCR试剂。

B.2.3 步骤

B.2.3.1 总RNA提取：按试剂说明提取细胞总RNA，制备模板RNA。

B.2.3.2 设计对照，A：阳性对照：灭活病毒对照。B：正常细胞对照。C：试剂对照：用去离子水代替标本。

B.2.3.3 一步法荧光定量反应体系：不同试剂盒、不同荧光定量仪器的反应体系及试剂名称不同，本文以一步法单通道检测EV-A71反应体系为例，具体配置见表B.3。

表B.3 RT-PCR检测EV-A71反应体系配置（25 μL体系）

试剂名称	体积
2×one step RT-PCR buffer	12.5 μL
Ex Taq HS	0.5 μL
RT-Enzyme Mix II	0.5 μL
EV-A71上游引物:（20 μM）	0.8 μL
EV-A71下游引物:（20 μM）	0.8 μL
EV-A71探针（20 μM）	0.4 μL
RNase Free dH_2O	5.5 μL
RNA模板	4 μL

B.2.3.4 一步法荧光定量RT-PCR扩增：每管加入相应的标本或对照核酸、引物和探针（依据单通道，双通道或三通道加入相应的探针）和荧光定量RT-PCR试剂。特异性扩增目的基因片段，反应条件（依据使用的试剂盒有所不同）：42℃逆转录30 min；95℃变性2 min；94℃ 10 s，5℃ 35 s，共扩增40个循环。

B.2.4 结果判断

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点，或可根据仪器噪音情况进行调整。标本的实验室诊断结果与普通RT-PCR法相同，详见B.1.3。阈值设定原则以不同商业化试剂盒设置的阈值线为准，通常试剂盒结果判断如下：

a) Ct 值≥38.0 或无数值的标本为阴性；
b) Ct 值≤35.0 的样本为阳性；
c) Ct 值 35.0～38.0 的样本建议重做。

附 录 C
（规范性附录）
手足口病相关肠道病毒的分离和鉴定

C.1 肠道病毒分离

C.1.1 标本处理

C.1.1.1 粪便标本的处理：在生物安全柜中，取约2 g粪便标本、10 mL含有抗生素的完全PBS、1 mL三氯甲烷加入50 mL耐三氯甲烷的离心管中。使用机械振荡器剧烈混匀20 min，制成粪便悬液。然后3 000 r/min离心20 min。在生物安全柜中吸上清至一新冻存管中，以备接种。

C.1.1.2 脑脊液标本的处理：脑脊液标本通常直接用于病毒分离。

C.1.1.3 疱疹液标本的处理：疱疹液标本通常直接用于病毒分离。

C.1.1.4 咽拭子标本的处理：咽拭子要在标本运输（保存）液中充分振荡10 s～15 s，以洗下拭子上粘附的病毒及含有病毒的细胞等，然后在4℃条件下，10 000 r/min离心20 min，用上清接种到细胞上，如果发现有细菌污染，应用滤器过滤除菌。

C.1.2 所需材料

RD、Vero或HEp-2等细胞；使用8mL斜面细胞培养管。

C.1.3 操作步骤

C.1.3.1 显微镜下观察单层细胞，以确保细胞是健康的。传代后48 h～72 h接种。

C.1.3.2 倒掉生长液（GM），换上1 mL～1.2 mL的维持液（MM）。

C.1.3.3 每一份标本至少需要同时接种2种细胞，2支RD细胞和2支HEp-2细胞；必要时增加Vero细胞。正确标记每支细胞培养管（包括标本的编号、日期、传代数）。

C.1.3.4 每一种细胞至少标记一管作为阴性对照。

C.1.3.5 每支试管接种0.2 mL的标本悬液，培养温度要求36℃。

C.1.3.6 使用倒置显微镜每天观察细胞培养管，以观察有特征性的肠道病毒致细胞病变效应（CPE）的出现（如细胞变圆，折光增强并脱离管壁等）。

C.1.3.7 记录接种管和对照管细胞所发生的变化至少一周，每天观察细胞有无毒性反应、老化或污染，记录CPE动态变化（1+，＜25%；2+，25%～50%；3+， 50%～75%；4+，75%～100%）。

C.1.3.8 如果有特征性的肠道病毒CPE出现要如实记录，并观察直到75%的细胞出现CPE时，将分离物储藏在－30℃低温冰箱以备二次传代。

C.1.3.9 第1代培养见可疑细胞病变时继续传1代～2代，待细胞病变稳定出现后，－30℃低温冰箱保存。

C.1.3.10　一代阳性分离物再传二代，如果又有明显的CPE出现，将病毒保存在－70℃冰箱（二代病毒）。因二代病毒滴度高于用一代病毒，所以选用二代病毒进行鉴定。

C.2　结果判断

C.2.1　有CPE出现，判定为病毒分离阳性。

C.2.2　如果7 d之后没有CPE出现，盲传1代继续观察7 d。盲传2代后，仍然没有出现CPE的，则判定为病毒分离阴性。

C.2.3　病毒分离物的鉴定可以采用附录B方法进行。