

湖南省儿童医院手足口病住院 病例病原学检测结果分析

李梨平, 叶志纯, 陈梦施, 舒孝文, 易思思

湖南省儿童医院儿科研究所, 湖南 长沙 410007

摘要: **目的** 了解 2015–2016 年湖南省手足口病患儿的病原构成, 为手足口病临床救治提供依据。 **方法** 采集 2015 年 4 月–2016 年 4 月该院 0~5 岁手足口病住院患儿的咽拭子标本提取病毒 RNA, 用肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71)、柯萨奇病毒 A 组 16 型 (coxsackievirus A16, CA16) 及通用型肠道病毒 (EV) 核酸检测试剂盒进行病原学检测, 并对通用型肠道病毒核酸 (EV-RNA) 阳性的标本测序确定型别。 **结果** 共纳入患儿 1 226 名, 男 778 例, 女 448 例。CA16-RNA 阳性占 7.2%, EV71-RNA 阳性占 19.0%, EV-RNA 阳性占 73.8%。不同性别患儿各病毒构成差异无统计学意义 ($P>0.05$), 不同年龄组、轻重型病例患儿各病毒构成差异有统计学意义 ($P<0.05$)。0~岁组 EV71-RNA (9.7%) 构成比低于 4~岁组 (33.7%) 与 1~岁组 (18.9%), 而 EV-RNA 构成比 (84.5%) 高于 4~岁组 (58.6%) 与 1~岁组 (73.6%) ($P<0.0125$), 重型病例组患儿 EV71-RNA 构成 (28.8%) 高于轻型病例组 (13.3%), 而 EV-RNA (78.9%) 低于轻型病例组 (65.0%) ($P<0.05$)。春季 CA16-RNA 与 EV71-RNA 构成比明显高于其他季节, 而 EV-RNA 的构成比低于其他季节 ($P<0.05$)。对通用型肠道病毒阳性标本测序分型发现其亚型主要为 CA6 (69.4%)、CA10 (14.7%)、CA2 (8.5%), 同时检测到

作者简介: 李梨平 (1962–), 女, 湖南湘乡人, 学士, 主任技师, 研究方向: 儿童病毒性疾病。

Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白 β -catenin、cyclin D1 的蛋白表达, 结果显示, β -catenin、cyclin D1 的蛋白表达均显著下调。

综上所述, RNA 干扰 galectin-3 的表达可通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路降低宫颈癌细胞的增殖, 促进细胞的凋亡。该研究为宫颈癌的分子诊断及靶向治疗提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Barillari G, Palladino C, Bacigalupo I, et al. Entrance of the Tat protein of HIV-1 into human uterine cervical carcinoma cells causes upregulation of HPV-E6 expression and a decrease in p53 protein levels [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4):2389–2394.
- [2] Park AM, Hagiwara S, Hsu DK, et al. galectin-3 plays an important role in innate immunity to gastric infection by *Helicobacter pylori* [J]. *Infect Immun*, 2016, 84(4):1184–1193.
- [3] Nakajima K, Kho DH, Yanagawa T, et al. galectin-3 cleavage alters bone remodeling: Different outcomes in breast and prostate cancer skeletal metastasis [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(6):1391–1402.
- [4] Wang T, Chu Z, Lin H, et al. galectin-3 contributes to cisplatin-induced myeloid derived suppressor cells (MDSCs) recruitment in Lewis lung cancer-bearing mice [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(6):4069–4076.
- [5] Chung LY, Tang SJ, Wu YC, et al. galectin-3 augments tumor initiating property and tumorigenicity of lung cancer through interaction with β -catenin [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(7):4936–4952.
- [6] D'Alessandria C, Braesch-Andersen S, Bejo K, et al. Noninvasive *in vivo* imaging and biologic characterization of thyroid tumors by immunopET targeting of galectin-3 [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(12):3583–3592.
- [7] Sciacchitano S, Lavra L, Olivieri A, et al. Combined clinical and ultrasound follow-up assists in malignancy detection in galectin-3 negative Thy-3 thyroid nodules [J]. *Endocrine*, 2016, 54(1):139–147.
- [8] Shimura T, Shibata M, Gonda K, et al. Elevated serum galectin-3 is associated with poor prognosis in patients with colorectal carcinoma [J]. *Ann Cancer Res*, 2016, 24(1):12–16.
- [9] Subhash VV, Ho B. Galectin-3 acts as an enhancer of survival respon-

ses in *H. pylori*-infected gastric cancer cells [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2016, 32(1):23–35.

- [10] Shetty P, Bargale A, Patil B R, et al. Cell surface interaction of annexin A2 and galectin-3 modulates epidermal growth factor receptor signaling in Her-2 negative breast cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 411(1–2):221–233.
- [11] Liu YC, Ma WH, Ge YL, et al. RNAi-mediated gene silencing of vascular endothelial growth factor C suppresses growth and induces apoptosis in mouse breast cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5):3896–3904.
- [12] Abubakar M, Howat WJ, Daley F, et al. High - throughput automated scoring of Ki67 in breast cancer tissue microarrays from the Breast Cancer Association Consortium [J]. *J Pathol Clin Res*, 2016, 2(3):138–153.
- [13] Yoshizawa K, Yuki M, Kinoshita Y, et al. Characterization of mammary adenocarcinomas in male rats after N-methyl-N-nitrosourea exposure-potential for human male breast cancer model [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2016, 68(5):263–270.
- [14] 王灯亮, 余良宏, 林章雅, 等. 辛伐他汀体外对人 U251 脑胶质瘤细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(12):2837–2840.
- [15] Liu C, Vojnovic D, Kochevar I E, et al. UV-A irradiation activates Nrf2-regulated antioxidant defense and induces p53/caspase3-dependent apoptosis in corneal endothelial cells UV-A activates Nrf2 and induces p53 in corneal endothelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(4):2319–2327.
- [16] Ye S, Zhang D, Cheng F, et al. Wnt/ β -catenin and LIF - Stat3 signaling pathways converge on Sp5 to promote mouse embryonic stem cell self-renewal [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(2):269–276.
- [17] McCracken KW, Aihara E, Martin B, et al. Wnt/ β -catenin promotes gastric fundus specification in mice and humans [J]. *Nature*, 2017, 541(7636):182–187.
- [18] Xu R, Hu J, Zhang T, et al. TRIM29 overexpression is associated with poor prognosis and promotes tumor progression by activating Wnt/ β -catenin pathway in cervical cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19):28579–28591.
- [19] Chai S, Ng KY, Tong M, et al. Octamer 4/microRNA - 1246 signaling axis drives Wnt/ β -catenin activation in liver cancer stem cells [J]. *Hepatology*, 2016, 64(6):2062–2076.

收稿日期: 2017-04-13

了埃柯病毒、柯萨奇病毒 B 组等其它型别。 结论 2015-2016 年湖南省儿童医院不同季节、不同年龄组、轻重程度不同手足口患儿病原分布有差异,病原体以柯萨奇病毒 A 组的 CA6、CA10 为主。

关键词: 手足口病; 病毒分型; 构成比

中图分类号:R512.5 文献标识码:B 文章编号:1006-3110(2017)12-1529-03 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2017.12.035

手足口病是由肠道病毒引起的急性传染病,多发生于学龄前儿童,尤以 3 岁以下年龄组发病率最高。病人和隐性感染者均为传染源,主要通过消化道、呼吸道和密切接触等途径传播,主要症状表现为手、足、口腔等部位的斑丘疹、疱疹。引起手足口病的病原组成较为复杂,其中以 EV71 及 CA16 型最为常见,但近年来其它肠道病毒比例不断升高^[1-2],引起了研究者和临床的关注。从 2008-2014 年,柯萨奇病毒 6 型、10 型感染所致的手足口病在全球多个国家和地区暴发^[3-6]。因此有必要监测非 EV71 非 CA16 病毒型所致手足口病的流行状况。本文对 2015 年 4 月-2016 年 4 月湖南省儿童医院手足口病咽拭子标本的病原学检测结果进行分析,以了解导致手足口病的病原体分布情况,掌握变化趋势,对手足口病的诊疗、疫情的防控有积极作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2015 年 4 月-2016 年 4 月,在湖南省儿童医院住院治疗的 0~5 岁手足口患儿全部纳入本研究。该院是湖南省的三级甲等专科医院,也是长沙地区手足口病唯一的定点收治医院,接收来自长沙及周边地区的手足口病患者。手足口病患者的诊断符合卫生部 2010 版《手足口病诊疗指南》,采集 0~5 岁的患儿发病 3~5 d 内的咽拭子标本共 1 226 例进行病原学检测。1 226 名患儿中,男 778 例,女 448 例。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集 用专用棉签适度拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位,采集后迅速将棉签放于盛有生理盐水的采样管密封送检。

1.2.2 核酸抽提及检测 采用江苏默乐生物有限公司生产的 EV71、CA16 及通用型肠道病毒(EV)核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法),按说明书操作。用胍盐裂解的柱式离心法从样本中抽取病毒 RNA,然后按说明书要求加入各种试剂后放在 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪上检测。EV 通用型、EV71 型试剂盒检测阳性标本判为 EV71 阳性;EV 通用型、CoxA16 型试剂盒检测阳性标本判为 CoxA16 阳性;EV 通用型阳性而 EV71 和 CoxA16 型均阴性的标本判为非 EV71 非 CoxA16 型肠道病毒阳性。EV 通用型包括柯萨奇病毒 A

组 CA2、CA4-7、CA9、CA10、CA12,柯萨奇病毒 B 组 CB1-5,埃柯病毒 ECHO6、ECHO9-11、ECHO13-21、ECHO24-25、ECHO30、ECHO33,脊髓灰质炎病毒 poliovirus1-3 和人肠道病毒 Human enterovirus 90。

1.2.3 样本型别的确定 将判为非 EV71 非 CoxA16 型肠道病毒(EV 通用型、EV-DNA)阳性的标本 274 例进行核酸抽提后进行 PCR,将得到的 PCR 产物通过凝胶电泳电泳,证实 274 例扩增片段正确无误,且电泳图谱条带正确。送上海生物工程有限公司进行测序,将测序结果通过 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,以确定样本型别。其中有 16 例因标本量少或存放等原因没有测序结果。

1.2.4 统计分析 采用 SPSS 19.0 软件对资料进行统计学分析,各组构成比的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。不同年龄组患儿病毒构成比两两比较采用 χ^2 分割,检验水准调整为 0.0125。

2 结果

2.1 手足口病病原与患者年龄、性别的关系 本研究共纳入研究对象 1 226 人,CA16-RNA 阳性占 7.2%,EV71-RNA 阳性占 19.0%,EV-RNA 阳性占 73.8%。男、女性各病毒在男、女性别患儿中的分布情况见表 1,差异无统计学意义($P>0.05$)。不同病毒在不同年龄组的分布差异有统计学意义($P<0.05$),0~岁组 EV71-RNA 构成比低于 4~岁组与 1~岁组,而 EV-RNA 构成比高于 4~岁组与 1~岁组($P<0.0125$),患儿病毒构成比较差异有统计学意义($P<0.0125$)。

表 1 不同年龄、性别组手足口病患儿
肠道病毒检测情况(n,%)

特征	例数	CA16-RNA	EV71-RNA	EV-RNA	χ^2 值	P 值
性别	男	778	56(7.2)	143(18.4)	0.543	0.762
	女	448	32(7.1)	90(20.1)		
年龄(岁)	0~	264	15(5.8)	25(9.7)	23.306	<0.001
	1~	901	60(7.5)	151(18.9)		
	4~	61	13(7.7)	57(33.7)		
	合计	1 226	88(7.2)	233(19.0)		

注: * 经 χ^2 分割,与 0~岁组比较 $P<0.0125$ 。

2.2 手足口病病原与疾病严重程度的关系 见表 2。轻型病例与重型病例检出的病原构成差异有统计学意义($P<0.001$),重型病例组患儿 EV71-RNA 构成比高于轻型病例组。

表 2 不同严重程度手足口病类型的病原构成(n,%)

病例类型	例数	CA16-RNA	EV71-RNA	EV-RNA	χ^2 值	P 值
轻型病例	774	60(7.8)	103(13.3)	611(78.9)	44.287	<0.001
重型病例	452	28(6.2)	130(28.8)	294(65.0)		
合计	1 226	88(7.2)	233(19.0)	905(73.8)		

2.3 手足口病病原季节分布 不同季节的手足口病患儿的病原构成差异有统计学意义($P<0.001$),春季 CA16-RNA 与 EV71-RNA 的构成比明显高于其他季节,而 EV-RNA 的构成比低于其他季节,见表 3。

表 3 不同季节的手足口病病原构成(n,%)

季节	例数	CA16-RNA	EV71-RNA	EV-RNA	合计	χ^2 值	P 值
春	158	22(13.9)	67(42.4)	69(43.7)	158	128.808	0.000
夏	400	15(3.8)	80(20.0)	305(76.3)	400		
秋	412	32(7.8)	26(6.3)	354(85.9)	412		
冬	256	19(7.4)	60(23.4)	177(69.1)	256		

2.4 通用型肠道病毒测序分析 对检测出的 905 例通用型肠道病毒阳性的手足口病患儿标本中,随机选择了 274 例进行测序分析,检测分析出 258 例结果,16 例因标本量少等原因没有检测到结果。258 例中,柯萨奇病毒 A(CA6)组构成比最高,其次是 CA10、CA2;另外,检测出埃柯病毒、柯萨奇病毒 B 组等其它型别,见表 4。

表 4 258 例通用型肠道病毒检出阳性的手足口病病原型别分布

型别	例数	构成比(%)
CA6	179	69.4
CA10	38	14.7
CA2	22	8.5
CA5	6	2.3
CA12	1	0.39
CA16	2	0.78
CB3	1	0.39
CB6	2	0.78
EV12	1	0.39
EV17	1	0.39
EV17 亚型	1	0.39
ECHO9	1	0.39
ECHO13	1	0.39
ECHO18	2	0.79
合计	258	100.00

3 讨论

引起手足口病的肠道病毒有很多种,其中最常见的是柯萨奇病毒 A 组 16 型(Coxsachievirus A 16, Cox-A16)和肠道病毒 71 型(enteroviruses 71, EV71)。近年来,非 EV71 非 CoxA16 型肠道病毒感染率升高,具有超过 EV71 或 CoxA16 的趋势,其中 CoxA10 和 Cox-A6 曾引起了世界上出现多次散发或暴发的手足口病流行^[7-9]。在本研究纳入的 1 226 例研究对象中,检测出了 905 例非 EV71 非 CoxA16 型肠道病毒,占 73.8%;检测出 233 例 EV71,占 19%,检测出 88 例 CoxA16 型,占 7.2%。全国 2013 年 1-3 月手足口病病

原学分析,非 EV71 非 CoxA16 型肠道病毒占 44%,与 2012 年同期相比,其他肠道病毒所占比例显著上升(增加 26 个百分点)^[10];湖南省 2015 年手足口病原学分析,非 EV71 非 CoxA16 型肠道病毒占 47.15%^[11],非 EV71 非 CoxA16 型肠道病毒所占比例在逐年上升,并成为了主要的手足口病病原体,本研究进一步检测分析发现非 EV71 非 CoxA16 型肠道病毒中主要为 CA6、CA10。本研究也发现重型病例组患儿 EV71-RNA 构成比高于轻型病例组。

本研究同时揭示了不同性别的手足口病患儿病原构成无差异,但不同年龄组患儿的病原构成差异有统计学意义,与其它地区的检测结果一致^[12-15]。手足口病全年均可发病,但不同季节,手足口病患儿病原构成有差异,春季 CA16-RNA 与 EV71-RNA 构成比高于其他季节,而 EV-RNA 的构成比低于其他季节,与国内其它地方的报道基本一致^[15]。

综上所述,今后应加强对手足口病病原学监测,同时也应对 EV71 和 CoxA16 以外的其他肠道病毒分型的研究,重点关注<3 岁婴幼儿,发现病例及时治疗,减少重症病例的发生。

参考文献

[1] Xia Y, Shan J, Ji H, et al. Study of the epidemiology and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Suzhou City, East China, 2011-2014[J]. Arch Virol, 2016, 161(7):1933-1943.

[2] Fu Y, Sun Q, Liu B, et al. Epidemiological characteristics and pathogens attributable to hand, foot, and mouth disease in Shanghai, 2008-2013[J]. J Infect Dev Ctries, 2016, 10(6):612-618.

[3] Xu M, Su L, Cao L, et al. Genotypes of the enterovirus causing hand, foot and mouth disease in Shanghai, China, 2012-2013[J]. PLoS One, 2015, 10(9):e0138514.

[4] Huang X, Wei H, Wu S, et al. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Henan, China, 2008-2013[J]. Sci Rep, 2015, 5:342-348.

[5] Blomqvist S, Klemola P, Kaijalainen S, et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland[J]. J Clin Virol, 2010, 48(1):49-54.

[6] Flett K, Youngster I, Huang J, et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(10):1702-1704.

[7] Davia JL, Bel PH, Ninet VZ, et al. Onychomadesis outbreak in Valencia, Spain associated with hand, foot, and mouth disease caused by enteroviruses[J]. Pediatr Dermatol, 2011, 28(1):1-5.

[8] Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(2):337-339.

[9] Wei SH, Huang YP, Liu MC, et al. An outbreak of coxsackievirus A6 hand, foot, and mouth disease associated with onychomadesis in Taiwan, 2010[J]. BMC Infect Dis, 2011, 11(1):346-351.

[10] 孙军玲,常昭瑞,王丽萍,等. 2013 年 1-3 月全国手足口病疫情形势分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21(2):183-186.

[11] 罗垵炜,高立冬,胡世雄,等. 2015 年湖南省手足口病流行特征分析[J]. 热带病与寄生虫学, 2016, 14(1):6-9.

[12] 向伦辉,袁国平,杨兴堂,等. 2010-2014 年上海市宝山区手足口病流行病学特征分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(3):313-316.

[13] 黎祖秋,潘利花,李海燕,等. 南宁市 2008-2014 年手足口病流行病学及病原学特征[J]. 中国热带医学, 2015, 15(12):1460-1463.

[14] 霍达钱,海坤,李洁,等. 北京市 2014 年手足口病流行病学特征分析[J]. 国际病毒学杂志, 2016, 23(1):13-16.

[15] 唐荣,王晓敏,郑享梅. 抚州市 2014 年手足口病病原学监测结果分析[J]. 江苏预防医学, 2016, 27(2):208-209.