

2009–2016 年瑞安市非 EV71 和 CVA16 手足口病病原谱研究

林峰¹, 陈志雄¹, 洪万胜¹, 林宗泽²

1. 瑞安市疾病预防控制中心, 浙江 瑞安 325200; 2. 瑞安市人民医院

摘要: **目的** 对瑞安市非 EV71 和 CVA16 手足口病病原谱进行研究, 为临床诊断、治疗和疾病预防控制提供参考。 **方法** 回顾性分析瑞安市 2009 年 1 月–2016 年 12 月期间诊治的 2 100 份手足口病临床病例样本资料, 采用荧光定量 PCR 法对手足口病病毒核酸进行分型检测及序列测定, 采用 ClustalX 2 软件对 CVA6 和 CVA10 病毒基因 VP1 序列进行分析。

结果 2009–2016 年瑞安市手足口病患者 2 100 份样本检出 1 172 株 EV71、518 株 CVA16、191 株 CVA6、192 株 CVA10, 分别占 55.8%、24.7%、9.1%、9.1%。各年度手足口病患者感染 EV71、CVA16、CVA6、CVA10 及其他病原的相对比例差异无统计学意义 ($P>0.05$)。CVA6、CVA10 和其他病原体的构成在不同性别、不同年龄手足口病患者中差异有统计学意义 ($P<0.01$), 男性患者中 CVA10 感染的比例 (53.4%) 最高而女性患者中其他病原菌感染比例 (51.9%) 最高, 各病原菌主要感染 5 岁以下患者 (CVA6:93.7%, CVA10:96.4%, 其他病原体:74.1%); CVA6 和 CVA10 及其他类型病原感染导致重症和死亡的比例为 6.3% (12/191)、7.3% (14/192) 和 7.4% (2/27), 三者之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 Gdula 株相比, 52 株 CVA6 VP1 区基因核苷酸序列差异为 14.6%~17.7%, 氨基酸序列差异为 3.7%~5.4%, 67 株 CVA10 VP1 区核苷酸序列差异为 8.8%~12.7%, 氨基酸序列差异为 2.7%~6.5%。 **结论** 2009–2016 年瑞安市非 EV71 和 CVA16 手足口病病原谱以 CVA6 和 CVA10 为主, 主要感染 5 岁以下患儿, 且具有较高的重症和死亡病例比例。

关键词: 手足口病; 荧光定量 PCR; 病原谱; 基因多态性

中图分类号: R512.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)03-0302-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.03.013

Pathogenic spectrum of non-EV71, non-CVA16 virus strains of hand, foot and mouth disease in Ruian City, 2009–2016

LIN Feng*, CHEN Zhi-xiong, HONG Wan-sheng, LIN Zong-ze

* Ruian Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ruian, Zhejiang 325200, China

Abstract: **Objective** To analyze the pathogen spectrum of non-EV71, non-CVA16 virus strains of hand, foot and mouth disease (HFMD) in Ruian City, 2009–2016, so as to provide reference for its clinical diagnosis, treatment and prevention and control. **Methods** Totally, 2,100 clinical specimens of HFMD patients were collected in Ruian City from January 2009 to December 2016, and were subject to genotyping and sequencing by real-time PCR. The VP1 sequences of coxsackievirus A6 (CVA6) and CVA10 genes were assayed by ClustalX2 software. **Results** Among the 2,100 specimens, enterovirus 71 (EV71) were detected in 1,172 (55.8%), CVA16 in 518 (24.7%), CVA6 in 191 (9.1%) and CVA10 in 192 (9.1%). The constituent ratios of EV71, CVA16, CVA6, CVA10 and other pathogens showed no statistical differences among 2009–2016 ($P>0.05$). The constituent ratios of CVA6, CVA10 and other pathogens showed statistical differences between males and females and among patients with different age. The proportion of CVA10 was higher in male patients (53.4%) than in female ones (51.69%). The infected patients were mainly children under 5 years of age (CVA6:93.7%, CVA10:96.4%, other pathogens:74.1%). The severe infection and death due to CVA6, CVA10 and other pathogens accounted for 6.3% (12/191), 7.3% (14/192) and 7.4% (2/27), showing no statistical difference ($P>0.05$). The variances of nucleotide and amino acids in VP1 regions of 52 CVA6 strains were 14.6–17.7% and 3.7–5.4% while those in 67 strains of CVA10 VP1 were 8.8–12.7% and 2.7–6.5%. **Conclusions** CVA6 and CVA10 were the main pathogens of non-EV71, non-CVA16 virus strains of HFMD in Ruian City in 2009–2016. Both pathogens mainly infected children under 5 years of age, and led to high incidence of severe cases and deaths.

Key words: hand, foot and mouth disease; real-time PCR; pathogenic spectrum; gene polymorphism

基金项目: 瑞安市科技创新项目 (MS2016003)

作者简介: 林峰 (1979–), 男, 浙江瑞安人, 本科学历, 主管技师, 研究方向: 流行病预防和检测。

手足口病是由感染肠道病毒引起的, 多发生于 0~3 岁组儿童的临床以手、足、口腔等部位疱疹或疱疹性咽峡炎为主的传染病, 少数患儿可并发心肌炎和无菌

性脑膜脑炎^[1-2]。常见的感染病原体以肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A16 型(CoxA16)为主。有研究发现引起手足口病流行的非 CVA16、非 EV71 的病原体主要为 CVA10 和 CVA6^[3-4]。CVA10 和 CVA6 感染的症状相对较轻,引起手足口病症状通常不典型,但也有部分患者出现 38℃~39℃ 高烧,持续 2~3 d,甚者出现严重的皮肤损害和更广泛的皮疹,包括口咽部疼痛性水泡和手掌、足底、膝盖、肘部及或臀部水泡,特别是口唇周围出现的水泡,类似过敏且易形成溃疡脱皮^[5]。本研究分析了 2009 年 1 月-2016 年 12 月瑞安市非 EV71 和 CVA16 手足口病病原谱和基因多态性,供临床诊断、治疗和疾病预防控制参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源 回顾性分析瑞安市 2009 年 1 月-2016 年 12 月期间诊治的 2 100 份手足口病病例的血清标本资料。其中 2009-2016 年各年份分别为 243 份、260 份、233 份、250 份、277 份、280 份、289 份和 268 份。手足口病病例纳入标准:年龄 1 月~14 岁,符合卫生部制定的 HFMD 诊疗指南中关于 HFMD 的诊断标准,且患者病史资料完整。病例排除标准:入院前接受过免疫抑制剂或免疫增强剂治疗、先天性心脏病、脑发育不全及免疫缺陷疾病患者。所有患者或监护人均知情并签署知情同意书,该调查并经医院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 荧光定量 PCR(ABI,7500fast 型,USA);离心机(贝克曼库尔特, Microfuge 20R 型, USA);超低温冰箱(Thermo Fisher, TSE-240V 型, USA)。病毒 RNA 提取试剂盒(MagMX™-96 Viral RNA Isolation Kit,购自 Invitrogen,USA)。

1.3 核酸检测 采用热电自动核酸提取仪及配套核酸提取试剂对标本和培养分离毒株进行 RNA 提取,收集 50 μl 病毒 RNA 用于核酸扩增。所有标本利用实时 RT-PCR 技术检测人肠道病毒,肠道病毒 71 (EV71)和肠道病毒柯萨奇 16 型(CVA16)。然后所有肠道病毒阳性且 EV71 和 CVA16 阴性的标本利用实时 RT-PCR 技术检测其它肠道病毒亚型及以柯萨奇病毒 A 组为主的 CVA6 和 CVA10。

1.4 标本处理 所有标本尽量新鲜接种,避免反复冻融。疱疹液或脑脊液直接接种,粪便和肛拭子标本用氯仿和玻璃珠进行处理,咽拭子标本冻融一次,使细胞破裂,释放病毒颗粒,处理后的标本加入双抗,4℃ 条件下,10 000 rpm 离心 20 min,上清接种到细胞上。

1.5 病毒分离鉴定 体外培养密度适合的(约 70%~

80%)六孔板中的 RD 和 HEP-2 细胞,去除培养液,吸取处理好的标本 200 μl 接种到细胞上,每个标本接种 2 孔,设阴性对照,37℃ 吸附 1 h,加入 2%的 MEM 维持液,37℃、5%的 CO₂ 培养 5~7 d。观察细胞是否发生 CPE,在观察到 75%的细胞发生病变后收取培养液用于后续鉴定,第一代没有观察到病变再盲传 2 次。所有接种标本均为已鉴定为肠道病毒核酸检测阳性但 EV71 和 CVA16 阴性的标本。

1.6 统计分析 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。计数资料采用例和百分比表示,比较采用χ² 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病原谱分析 2009-2016 年瑞安市手足口病患者 2 100 份样本中检出 EV71 和 CVA16 分别为 1 172 株和 518 株,分别占 55.8%和 24.7%,非 EV71 和 CVA16 病原体 CVA6 和 CVA10 分别为 191 株和 192 株,占 9.1%和 9.1%;各年度手足口病患者感染 EV71、CVA16、CVA6、CVA10 及其他病原的相对比例差异无统计学意义(P>0.05),见表 1。

表 1 2009-2016 年瑞安市手足口病患者病原谱分析(n,%)

年份	例数	EV71	CVA16	CVA6	CVA10	其他
2009	243	153(63.0)	50(20.6)	20(8.2)	18(7.4)	2(0.8)
2010	260	160(61.5)	56(21.5)	17(6.5)	24(9.2)	3(1.2)
2011	233	134(57.5)	67(28.8)	15(6.4)	15(6.4)	2(0.9)
2012	250	143(57.2)	50(20.0)	26(10.4)	28(11.2)	3(1.2)
2013	277	154(55.6)	77(27.8)	24(8.7)	19(6.9)	3(1.1)
2014	280	156(55.7)	65(23.2)	32(11.4)	25(8.9)	2(0.7)
2015	289	135(46.7)	77(26.6)	32(11.1)	36(12.5)	9(3.1)
2016	268	137(47.6)	76(26.4)	25(8.7)	27(9.4)	3(1.0)
总计	2 100	1 172(55.8)	518(24.7)	191(9.1)	192(9.1)	27(1.3)

2.2 非 EV71 和 CVA16 病原体的人群分布 CVA6、CVA10 和其他病原体的构成在不同性别、不同年龄手足口病患者中差异有统计学意义(P<0.01),男性患者中 CVA10 感染的比例(53.4%)最高而女性患者中其他病原菌感染比例(51.9%)最高,各病原菌主要感染 5 岁以下患者(CVA6:93.7%,CVA10:96.4%,其他病原体:74.1%),见表 2。

表 2 2009-2016 年瑞安市手足口病患者非 EV71 和 CVA16 病原体人群分布(n,%)

特征		CVA6	CVA10	其他	合计
性别	男	102(53.4)	98(51.0)	13(48.1)	213(52.0)
	女	89(46.6)	94(49.0)	14(51.9)	197(48.0)
年龄(岁)	0~	102(53.4)	109(56.8)	15(55.6)	226(55.1)
	3~	77(40.3)	76(39.6)	5(18.5)	158(38.5)
	5~	7(3.7)	4(2.1)	4(14.8)	15(3.7)
	7~	2(1.0)	2(1.0)	1(3.7)	5(1.2)
	10~	2(1.0)	1(0.5)	1(3.7)	4(1.0)
	13~	1(0.5)	0(0.0)	1(3.7)	2(0.5)

2.3 非 EV71 和 CVA16 手足口病病例类型分析 与

手足口实验室监测系统统计的 EV71 感染导致重症和死亡的比例 16.7%^[3] 相比, CVA6 和 CVA10 及其他类型病原感染导致重症和死亡的比例为 6.3% (12/191)、7.3% (14/192) 和 7.4% (2/27), 三者差异无统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 2009–2016 年瑞安市手足口病患者非 EV71 和 CVA16 手足口病病例类型分析 ($n, \%$)

类别	CVA6 ($n=191$)	CVA10 ($n=192$)	其他 ($n=27$)
普通病例	179 (93.7)	178 (92.7)	25 (92.6)
重症病例	11 (5.7)	12 (6.3)	2 (7.4)
死亡病例	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)

2.4 CVA6 病毒基因 VP1 序列分析 对分离的 191 株 CVA6 病毒基因完整的 VP1 区进行测序分析, 共获得 52 株完整的 VP1 区基因序列, 序列全长 915 bp; 与 Gdula 株相比未发生碱基的缺失或插入, 核苷酸序列差异为 14.6% ~ 17.7%, 氨基酸序列差异为 3.7% ~ 5.4%。同时, 完成测序的 52 株序列之间的核苷酸序列差异为 0% ~ 10.4%, 氨基酸序列差异为 0% ~ 3.5%。

2.5 CVA10 病毒基因 VP1 序列分析 对分离的 192 株 CVA10 病毒基因完整的 VP1 区进行测序分析, 共获得 67 株完整的 VP1 区基因序列, 序列全长 915 bp; 与 Gdula 株相比未发生碱基的缺失或插入, 核苷酸序列差异为 8.8% ~ 12.7%, 氨基酸序列差异为 2.7% ~ 6.5%。同时, 完成测序的 67 株序列之间的核苷酸序列差异为 0% ~ 9.7%, 氨基酸序列差异为 0% ~ 3.1%。

3 讨论

引起手足口病的病原体以 EV71 和 CVA16 感染为主, 但是随着病毒在人群间的流行, 病原体的组成也发生了新的变化, 如 CVA6、CVA10 等以前仅散发流行, 现在发展到感染情况越来越复杂。CVA6 和 CVA10 是引起手足口病的最常见的非 EV71 和 CVA16 病原体^[6-7]。在对 2013 年北京市西城区手足口病聚集性疫情流行特征进行分析时发现聚集性疫情主要以 CVA6 感染为主^[8]。在对河源市 1 起 CVA6 型手足口病暴发疫情调查分析时也发现 30 例临床诊断病例中检出 24 例 CVA6 病毒核酸阳性, 阳性率为 80.0%, 应加强对肠道病毒的监测^[9]。谢国良等^[10] 也发现 2013–2014 年杭州地区儿童手足口病的主要病原体发生重大变化, CVA6 病毒成为最主要病原, CVA10 病毒也存在潜在威胁, 需加强对其他肠道病毒的持续监测和分子特征分析。以往的研究也发现安阳地区获得的 10 条 CVA6 序列中, 有 6 条属于 D1 亚分支, 4 条属于 D2 亚分支^[11], 而 CVA6 成为宁夏地区 2013 年和 2015 年其它肠道病毒中导致 HFMD 的主要病原体与国内流

行的 CVA6 具有较高的同源性, 流行趋势一致, 并且在宁夏地区存在多个传播链^[12]。冀天娇^[13] 也提出我国 CVA10 本土流行株有两个基因型 C 和 B, 这 2 个基因型在 3D 区存在不同的重组进化方式, 且 CVA6、CVA10 等导致 HFMD 的其他肠道病毒有增多趋势。本研究也发现 2 100 份样本中病原中 CVA6 为 191 株 (9.1%); CVA6 在男性中的发病比例高于女性, 在 3 岁以下及 3~5 岁儿童中的占比为 55.1%; CVA6 病原感染导致重症和死亡的比例为 6.26%; 与 Gdula 株相比, 52 株 CVA6 VP1 区基因核苷酸序列差异为 14.6% ~ 17.7%, 氨基酸序列差异为 3.7% ~ 5.4%。姚栩等^[14] 在分析福州市柯萨奇病毒 A10 型 VP1 区基因特征时也发现检测出的 1 951 份肠道病毒阳性样本中, 肠道病毒 71 型 (EV-A71)、柯萨奇病毒 A16 型 (CVA16)、CVA10 的阳性率分别为 24.1%、16.7%、9.4%, 即 CVA10 是引起福州地区手足口病的常见病原体之一。2 100 份样本中病原中 CVA10 为 192 株 (9.1%); CVA10 在男性中的发病比例高于女性, 在 3 岁以下及 3~5 岁儿童中的占比为 38.5%; CVA10 及其他类型病原感染导致重症和死亡的比例为 7.29%; 与 Gdula 株相比, 67 株 CVA10 VP1 区核苷酸序列差异为 8.8% ~ 12.7%, 氨基酸序列差异为 2.7% ~ 6.5%。因此, 非 EV71 和 CVA16 手足口病病原谱以 CVA6 和 CVA10 为主, 且二者之间存在一定的变异性。

参考文献

- [1] 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): 313–317.
- [2] 郑仕喜, 罗垲炜, 肖洪, 等. 2011–2014 年长沙市手足口病流行病学特征及其时空聚集性分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(8): 1014–1018.
- [3] 卞莲蓬, 姚昕, 毛群颖, 等. 江苏省 2012–2013 年柯萨奇病毒 A 组 6 型分子流行特征分析[J]. 中国病毒病杂志, 2015, 9(5): 361–367.
- [4] 李洋, 张相萍, 翟明强, 等. 柯萨奇病毒 A6 逆转录 PCR 检测方法的建立[J]. 现代预防医学, 2016, 15(13): 2419–2422.
- [5] 汪照国, 刘晓琳, 杨婷婷, 等. 2008–2009 年青岛地区手足口病原学调查分析[J]. 病毒学报, 2011, 8(5): 438–441.
- [6] 郑振喜, 张晓丽, 钟晓, 等. CVA6 型手足口病临床特征分析[J]. 临床医学工程, 2015, 9(7): 858–859.
- [7] 曾汉日, 李晖, 郑焕英, 等. 1 起由 CVA6 型肠道病毒引起的手足口病疫情的快速鉴定与分析[J]. 华南预防医学, 2015, 5(1): 16–20.
- [8] 刘潇潇, 刘国涛, 初艳慧, 等. 2013 年北京市西城区手足口病聚集性疫情流行特征[J]. 职业与健康, 2013, 10(10): 1334–1336.
- [9] 朱海城, 古素芬, 张秀莲, 等. 河源市 1 起柯萨奇病毒 A6 型手足口病暴发疫情的调查分析[J]. 华南预防医学, 2015, 9(4): 397–398.
- [10] 谢国良, 崔大伟, 郑书发, 等. 2013–2014 年杭州地区手足口病柯萨奇病毒 A6 型和 A10 型 VP1 基因特征分析[J]. 临床检验杂志, 2015, 11(12): 938–941.
- [11] 李洋, 张相萍, 翟明强, 等. 安阳地区 2013 年手足口病柯萨奇病毒 A6 VP1 基因特征研究[J]. 病毒学报, 2016, 7(3): 324–330.
- [12] 袁芳, 陈慧, 马江涛, 等. 2013–2015 年宁夏地区手足口病柯萨奇病毒 A 组 6 型基因特征分析[J]. 病毒学报, 2016, 10(6): 702–706.
- [13] 冀天娇. 引起手足口病的柯萨奇病毒 A 组 10 型在中国的流行及基因特征[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2014.
- [14] 姚栩, 蒋晓虹, 谢迺鸿, 等. 福州市柯萨奇病毒 A10 型 VP1 区基因特征分析[J]. 中国病毒病杂志, 2016, 8(3): 212–216.

收稿日期: 2017–03–17