

2014 年湖南省郴州市手足口病病原谱及 CVA16 基因特征分析

刘爱平, 谢群, 谭徽, 陈白鹭, 陈柏塘, 朱韩武

湖南省郴州市疾病预防控制中心, 湖南 郴州 423000

摘要: **目的** 了解 2014 年湖南省郴州市手足口病病原谱和优势毒株的基因特征, 为郴州市手足口病的防治提供科学依据。**方法** 采集 2014 年郴州市手足口病监测病例标本, 应用荧光 PCR 方法检测 HEV71、CVA16、CVA6、CVA10 和其他肠道病毒。未能分型的其他 HEV 阳性标本进行 RT-PCR 扩增, 通过基因测序鉴定病原体型别。**结果** 共检测 854 份标本, 阳性检出率为 55.62%。病原谱中已知型别的前 5 位分别为 CVA16 (28.00%)、HEV71 (25.05%)、CVA6 (13.89%)、CVA10 (12.42%)、CVB5 (0.84%), 仍有 20.63% 的其他 HEV 未分型。不同月份、不同年龄组、不同病例类型的病原体型别的构成比差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 男女性别的病原体型别的构成比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。郴州市的 6 株 CVA16 分离株均为 B1 基因亚型。**结论** 2014 年郴州市的手足口病流行毒株显示了一定的季节性分布特征, 主要的几种优势毒株相互交替流行, 与人群的免疫基础相互作用体现在月份和年龄组的分布上。郴州市的 CVA16 分离株与国内流行株的基因型别一致。

关键词: 手足口病; 病原学; CVA16; 基因特征

中图分类号: R512.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2016)07-0816-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.07.014

Pathogen spectrum of hand, foot and mouth disease and genetic characteristics of Coxsackievirus A16 in Chenzhou City, Hunan Province, 2014

LIU Ai-ping, XIE Qun, TAN Hui, CHEN Bai-lu, CHEN Bai-tang, ZHU Han-wu

Chenzhou Center for Disease Control and Prevention, Chenzhou, Hunan 423000, China

Corresponding author: TAN Hui, E-mail: tanhui2006@163.com

Abstract: **Objective** To study the etiology spectrum of hand, foot and mouth disease (HFMD) and genetic characteristics of coxsackievirus A16 in Chenzhou City, Hunan Province, 2014, and provide scientific data for HFMD control and prevention.

Methods Clinical specimens of HFMD cases were collected from the sentinel hospitals of Chenzhou City in 2014. Viral RNA of human enterovirus type A71 (HEV71), coxsackievirus A16 (CVA16), A6 (CVA6), A10 (CVA10) and other enterovirus (HEV) were detected by fluorescent PCR. The genotyping of HEV were performed by sequencing of the VP1 regions. Phylogenetic analysis was performed by MEGA6. **Results** A total of 854 samples were detected, and 55.62% were enterovirus-positive, with the most frequent serotypes of CVA16 (28.00%), HEV71 (25.05%), CVA6 (13.89%), CVA10 (12.42%) and CVB5 (0.84%) 20.63% enterovirus had unknown genotypes. Significant differences were found in the constituent ratios of various pathogens among different months, age and patients, but not between genders ($P > 0.05$). Gene sequencing of 6 CVA16 isolates illustrated that the genotyp were all subtype B1. **Conclusions** The occurrence of HFMD in Chenzhou City in 2014 has obvious seasonal features. The main dominant pathogens are prevalent alternately. Their interaction with human immune is reflected in their distribution in months and age. The CVA16 isolates in Chenzhou City are homologous to strains circulating in other areas of mainland China.

Key words: HFMD; Etiology; CVA16; Genetic characteristic

手足口病(hand, foot, mouth disease, HFMD)是肠道病毒属 A 组肠道病毒引起的发热出疹综合征, 主要发生于 5 岁及以下儿童。大多数患者症状轻微, 主要出现发热, 口腔疱疹或溃疡和/或手掌、足底等部位

出现皮疹。然而, 少数患者可出现无菌性脑膜炎、脑干脑炎、急性弛缓性麻痹、脑脊髓炎、神经源性肺出血或肺水肿、心肺功能衰竭等重症表现, 且病情进展迅速, 部分重症患儿可引发死亡。引起手足口病的主要感染病原体是人肠道病毒 71 型(human enterovirus 71, HEV71)和柯萨奇病毒 A16 型(coxsackievirus A16, CVA16), 近年来 CVA6 和 CVA10 感染也呈现上升趋势^[1]。本文对 2014 年郴州市手足口病病原谱进行分

基金项目: 郴州市科技计划项目(CZ2013108)

作者简介: 刘爱平(1984-), 男, 硕士, 主管技师, 主要从事分子生物学和流行病学工作。

通讯作者: 谭徽, E-mail: tanhui2006@163.com。

析,并研究当年优势毒株的基因进化特征。

1 材料与方法

1.1 标本来源 按照《湖南省手足口病预防控制工作方案(2013 年版)》^[2]的要求,采集郴州市手足口病的临床诊断病例标本。

1.2 核酸检测与基因分型 核酸抽提采用西安天隆的磁珠法全自动核酸抽提仪提取。人肠道病毒通用型、HEV71 和 CVA16 的检测,采用江苏硕世生物技术有限公司的荧光 PCR 法试剂盒检测;CVA6 和 CVA10 采用深圳易瑞生物技术有限公司的荧光 PCR 法试剂盒检测;荧光 PCR 法未能分型的其他 HEV 阳性标本,采用大连宝生物技术有限公司的 RT-PCR 试剂盒扩增核酸,引物参照文献^[3],PCR 产物送大连宝生物进行双向测序,基因序列采用 NCBI 的在线 Blast 比对工具鉴定型别。

1.3 CVA16 基因序列分析 从 GenBank 数据库中选择 22 个不同年份不同地区的 CVA16 的 VP1 序列作参比序列,并以 EV71 的原始株 BrCr(U22521)为组外对照。采用 ClustalX 2.1 软件将检索下载的序列与测序所得的 VP1 区核苷酸序列做多序列比对分析,然后导入 MEGA 6 软件进行手工整理,剔除目标区不完整或缺失序列。进化树图的建立采用最邻近法(Neighbor-joining),并作 Bootstrap 检验,步长值 1 000。

1.4 统计学处理 运用 SPSS 17.0 进行统计分析。构成比的比较采用卡方检验(取 Fisher 的精确概率 P 值), $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HFMD 病原谱构成 全年共检测手足口病标本 854 份,阳性标本 475 份,阳性检出率为 55.62%;3 例手足口病死亡病例,其中 2 例为 HEV71,另 1 例为 CVA24。病原谱构成见表 1,全年以 CVA16 和 HEV71 为主,其构成比分别为 28.00%和 25.05%。

表 1 郴州市 2014 年手足口病病原谱构成

病原体	阳性数	构成比(%)
CVA16	133	28.00
HEV71	119	25.05
其他 HEV	98	20.63
CVA6	66	13.89
CVA10	59	12.42
CVB5	4	0.84
CVA24	2	0.42
CVA5	1	0.21
Echo11	1	0.21
Echo16	1	0.21
合计	475	100.00

2.2 不同月份的病原体型别检测结果 郴州市 2014

年不同月份的病原体型别构成见表 2,其构成比差异有统计学意义(Fisher 确切概率 $P<0.01$)。全年以 CVA16 为主,其次为 HEV71;1-2 月和 10-11 月份以 CVA6 为主;3-4 月和 8 月份以 CVA16 为主;5-7 月份以 HEV71 为主;9、12 月份以其他 HEV 为主。

表 2 2014 年郴州市不同月份手足口病病原学检测结果

月份	检测数	阳性率 (n,%)	病原体型别构成[n(构成比,%)]				
			CVA6	CVA10	CVA16	HEV71	其他 HEV
1	56	28.57	5(31.25)	2(12.50)	2(12.50)	4(25.00)	3(18.75)
2	51	29.41	5(33.33)	3(20.00)	4(26.67)	1(6.67)	2(13.33)
3	57	50.88	8(27.58)	3(10.34)	13(44.83)	3(10.34)	2(6.90)
4	97	64.95	4(6.35)	6(9.52)	26(41.27)	17(26.98)	10(15.87)
5	111	70.27	3(3.85)	9(11.54)	27(34.62)	34(43.59)	5(6.41)
6	134	58.21	2(2.56)	5(6.41)	24(30.77)	34(43.59)	13(16.67)
7	78	64.10	3(6.00)	13(26.00)	8(16.00)	14(28.00)	12(24.00)
8	51	35.29	3(16.67)	5(27.78)	8(44.44)	1(5.56)	1(5.56)
9	63	60.32	0(0.00)	4(10.53)	9(23.68)	3(7.89)	22(57.89)
10	50	74.00	17(45.95)	0(0.00)	7(18.92)	4(10.81)	9(24.32)
11	49	55.10	15(55.56)	1(3.70)	4(14.81)	5(18.52)	2(7.41)
12	57	33.33	1(3.45)	8(27.59)	1(3.45)	2(6.90)	17(58.62)

2.3 不同人群的病原体型别检测结果 各年龄组和男女性别病原体的检测结果见表 3。按年龄组分类对病原体型别的构成比进行比较,其差异有统计学意义(Fisher 确切概率 $P<0.01$)。其中 0~岁组和 1~岁组以其他 HEV 为主,2~岁组和 4~岁组以 CVA16 为主,3~岁组以 HEV71 为主;另外,CVA6 在 0~岁组构成比较高。按男女性别分类对病原体型别的构成比进行 R×C 列联表卡方检验,其差异无统计学意义($\chi^2=5.22$, $P=0.26$)。

表 3 2014 年郴州市不同人群手足口病病原学检测结果

人口学特征	检测数	阳性检出率(%)	病原体型别[<i>n</i> (构成比,%)]				
			CVA6	CVA10	CVA16	HEV71	其他 HEV
年龄(岁)							
0~	82	52.44	14(32.56)	6(13.95)	5(11.63)	2(4.65)	16(37.21)
1~	325	53.54	24(13.79)	25(14.37)	37(21.26)	42(24.14)	46(26.44)
2~	220	57.73	14(11.02)	16(12.60)	41(32.28)	33(25.98)	23(18.11)
3~	123	62.60	5(6.49)	7(9.09)	21(27.27)	28(36.36)	16(20.78)
4~	49	61.22	5(16.67)	2(6.67)	12(40.00)	8(26.67)	3(10.00)
5~	55	50.91	2(7.14)	4(14.29)	12(42.86)	6(21.43)	4(14.29)
性别							
男	529	57.09	43(14.24)	38(12.58)	77(25.50)	83(27.48)	61(20.20)
女	325	54.46	21(11.86)	22(12.43)	51(28.81)	36(20.34)	47(26.55)

2.4 不同类型病例的病原体型别检测结果 按病例类型对 2014 年郴州市的手足口病检测样本进行统计分析,结果见表 4。不同病例类型的病原体型别的构成比,其差异有统计学意义(Fisher 确切概率 $P<0.01$);其中,普通病例和聚集性病例以 CVA16 为主,

重症 / 死亡病例以 HEV71 为主。

表 4 2014 年郴州市不同类型病例的核酸检测结果

病例类型	检测数	阳性率 (%)	病原体类型[n(构成比, %)]				
			CVA6	CVA10	CVA16	HEV71	其他 HEV
普通	761	53.35	61(15.02)	57(14.04)	104(25.62)	91(22.41)	93(22.91)
重症 / 死亡	41	75.61	1(3.23)	1(3.23)	3(9.68)	17(54.84)	9(29.03)
聚集	52	80.76	2(4.76)	2(4.76)	21(50.00)	11(26.19)	6(14.29)

2.5 CVA16 基因序列特征分析 采用 RT - PCR 和测序的方法共鉴定出 CVA16 6 份。图 1 为基于 VP1 基因序列构建的系统进化树,以 BrCr 株为根,CVA16 原始株 G - 10(U05876) 和 2008 年安徽阜阳株(EU812514) 单独成簇,为 A 基因型;其余毒株另成一簇,均为 B 基因型。郴州市 2014 年的 6 株分离株均为 B1 基因亚型。

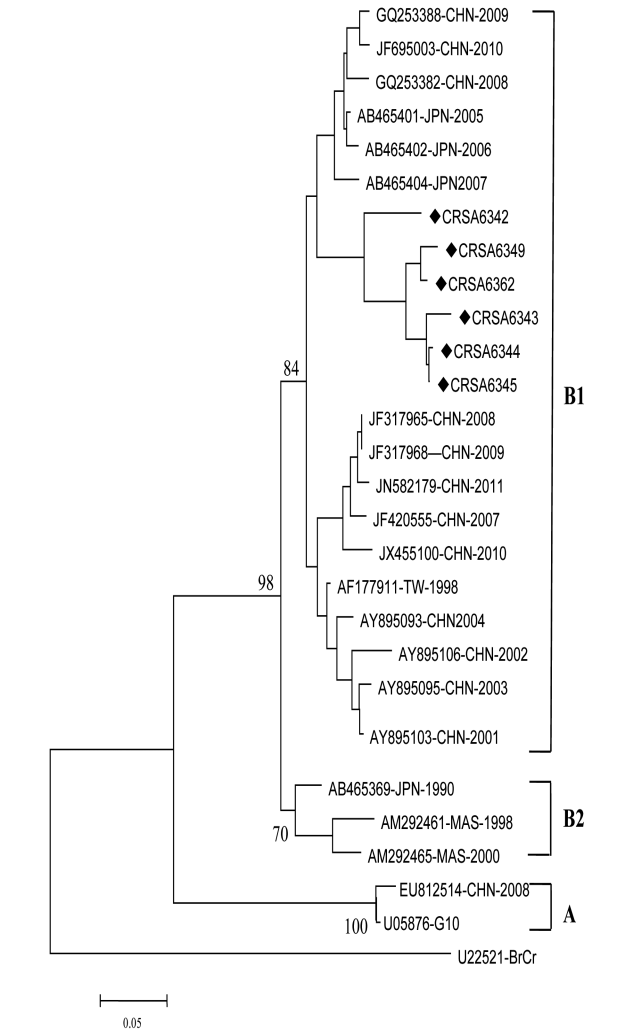


图 1 基于 VP1(363nt) 核酸序列的 CVA16 亲缘关系进化树图

3 讨 论

手足口病是由肠道病毒感染引起的常见的婴幼儿

感染性疾病,近几年国内外报道的主要病原体以 HEV71 和 CVA16 为主,国内手足口病的监测项目也主要针对这两大病原体。本课题前期研究结果显示:2010 - 2012 年郴州市手足口病流行的优势毒株以 HEV71 和 CVA16 为主^[4-6],2013 年以 CVA6(41.55%) 为主,其次为 CVA10(15.92%) 和 CVA16(13.01%),HEV71(5.63%) 较少^[7],而 2014 年以 CVA16 为主,其次为 HEV71。进一步对 2014 年的数据按月分布进行分析发现:3 - 4 月份以 CVA16 的流行为主,5 - 6 月份以 HEV71 为主,9、12 月份以其他 HEV 为主,10 - 11 月份以 CVA6 为主,显示了一定的季节性分布特征。纵观近几年的情况来看,郴州市手足口病的优势毒株变化频繁,主要的几种优势毒株相互交替流行。

人群分布特征方面:不同年龄组的病原体型别的构成比差异有统计学意义,进一步对每个年龄组内的病原体型别的构成比作统计分析,其中 0 ~ 岁组和 1 ~ 岁组以其他 HEV 为主,2 ~ 岁组和 4 ~ 岁组以 CVA16 为主,3 ~ 岁组以 HEV71 为主;另外,CVA6 在 0 ~ 岁组构成比较高。这种分布的不均一性,究其原因,0 ~ 岁组和 1 ~ 岁组可能与母传抗体有关;成人(母亲)接触各种肠道病毒几率高,机体建立了成熟的免疫系统,可分泌不同类型肠道病毒的特异性抗体并传给婴幼儿,特别是对于流行毒株(如 HEV71 和 CVA16)一般均有抗体,因此这一年龄阶段的病原体型别较多样,以其他 HEV 为主;其他年龄组可能由于不同肠道病毒间无或低交叉免疫,某种型别的肠道病毒的流行在人群中建立的特异性的免疫屏障只针对该种病毒,而且有一定时效性,即前一年龄组的某个优势毒株在后一年龄组又换成另一优势毒株,相互交替。男女性别方面,其构成比差异无统计学意义。不同病例类型的病原体型别构成比差异有统计学意义,重症 / 死亡病例以 HEV71 为主,与往年的研究结果基本一致。此外,本文还对 2014 年流行的优势毒株进行了基因进化特征分析。目前,CAV16 的基因分型尚无统一标准,文献报道的基本以 VP1 区或 VP4 区的基因序列作为进化分析的指标。Li 等^[8] 和 Hosoya 等^[9] 基于 VP4 区基因序列,将 CVA16 分为 A、B、C 三个基因型。2007 年,Perea 等^[10] 对 1997 - 2006 年来自于 5 个不同国家或地区的 52 株 CVA16 分离株,分别基于 VP1 区和 VP4 区基因序列进行进化分析获得了较一致的分型结果:即 CVA16 分为 A、B 两个基因型,而 B 基因型又可进一步细分为 B1、B2 两个基因亚型,他还建议将 Li 等^[8] 基于 VP4 区的 C 基因型并入 B 基因型,为 B2 基因亚型。由于 VP1 区基因序列比 VP4 区长,(转 878 页)

果来看不是所有的甲亢甲减患者 5 项 TH 血清浓度水平都同时发生改变。其原因可能与患者的病情轻重,病史长短,初诊还是复诊,是否治疗过,或是正在治疗等因素的影响有关;Chopra^[5]报道,观察有 19.0% 甲减患者 TT4、FT4 血清浓度低于正常,TSH 血清浓度升高,而 TT3、FT3 血清浓度正常;FT4 诊断甲减患者为最灵敏的指标,其不受甲状腺结合球蛋白的影响,能真实地反映甲状腺激素水平,对于伴有血清 TBG 的变化疑甲减的早期患者尤有显著的诊断价值^[6],而 FT3 变化相对迟缓,因此,本文甲减组 FT3 血清浓度水平降低不明显,与正常对照组比较差异无统计学意义,符合部分患者表现。本组资料甲亢患者 5 项血清指标都同时改变只占 38.8%,甲减患者 5 项血清浓度水平都同时改变只占 14.7%,说明甲亢甲减患者 5 项 TH 水平不同时改变,虽同时检测 5 项 TH 浓度,可全面反映其血清水平,对确诊甲亢甲减患者不难,但检查费用较高,一些病人不易接受。如果选择项目检查,甲亢患者首选 sTSH,灵敏度最高,阳性率为 100.0%,其次是 FT4>FT3>TT4>TT3,阳性率分别为 87.1%>84.6%>79.1%>44.0%;甲减患者首选 sTSH,也是灵敏度最高,阳性率为 100.0%,其次是 FT4>TT4>TT3>FT3,阳性率分别为 93.3%>67.3%>38.8%>19.2%。TT3、TT4、FT3、FT4 血清浓度水平对 TSH 的分泌具有敏感的负反馈作用,

且主要依赖 FT3、FT4 血清浓度水平,当甲亢患者轻度增高其分泌受抑制而降低,甲减患者轻度降低其分泌增强而升高^[7-8],据此对于亚临床甲亢甲减患者可作出诊断。

综上所述,对甲状腺功能异常患者进行血清甲状腺激素的检测,可帮助临床医生诊断疾病,并对患者的临床诊断和预后判断均具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] 黄家驷. 外科学[M]. 第 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:349-354.
- [2] 戴自英. 实用内科学(下册)[M]. 第 8 版. 北京:人民卫生出版社,1973:1894-1910.
- [3] 董建立,蒋艳珍,范秀芳. 甲亢患者血清生化指标改变和临床意义[J]. 新疆医学,2014, 12(1):28-29.
- [4] 中山医学院《内科疾病鉴别诊断学》编写组. 内科疾病鉴别诊断学[M]. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社,2014:634-642.
- [5] Chopra IJ. An assessment of daily production and significance of 3, 3', 5, -triiodothyronine (reverse T3) in man[J]. J Clin Invest, 1976, 58(1):32-40.
- [6] 薛振涛,彭文莎. 浅论影响用放射免疫分析技术检测甲状腺激素准确性的因素和解决对策[J]. 当代医药论坛,2014,12(1):50-51.
- [7] 李江宁. 全自动化发光免疫分析与放射免疫法测定血清促甲状腺激素的对比观察[J]. 中国医药指南,2014,12(36):148-149.
- [8] 于晓会,刘爱华,朱帅俊,等. 孕期亚临床甲减大鼠模型的建立[J]. 实用预防医学,2015,22(6):686-689.

收稿日期:2015-11-30

(接 818 页)

包含的遗传信息量大,更能体现病毒变异的进化特征,因此本研究选用 VP1 区作为进化分析的参考指标。本文从 GenBank 数据库中选取了不同年份不同地区的 CVA16 的 VP1 序列作参比序列,并以 EV71 的原始株 BrCr(U22521)为组外对照,对 2014 年郴州市的 CVA16 分离株进行基因分析,结果显示郴州市的 6 株分离株均为 B1 基因亚型,与国内目前流行的基因亚型一致。虽然 CVA16 在致死率上不如 HEV71 高,但是从最近几年手足口病发病率居高不下的形势来看,由 CVA16 而引起的疾病负担并不比 HEV71 小,仍然需要对它进行重点关注。另外,本文中发现的一例 CVA24 感染的死亡病例,将在后续的研究中作深入分析。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 手足口病预防控制指南[Z]. 2009 版.
- [2] 湖南省卫生厅. 湖南省手足口病预防控制工作方案[Z]. 2013 版.
- [3] Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA, et al. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8):2698-2704.

- [4] 谭徽,刘爱平,谢群,等. 2010 年湖南省郴州市手足口病病原学和肠道病毒 71 型基因特征分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(12):2870-2874.
- [5] 谢群,谭徽,刘爱平,等. 2011 年郴州市手足口病病原学及 EV71 型分离株基因特性分析[J]. 实用预防医学, 2013, 20(2):287-291.
- [6] 陈柏塘,刘爱平,谢群,等. 湖南省郴州市 2012 年手足口病病原学和 EV71 型分离株基因特征分析[J]. 现代预防医学, 2014, 41(10):1881-1884.
- [7] 谢群,刘爱平,谭徽,等. 2013 年湖南省郴州市手足口病病原学及柯萨奇 A6 和 A10 基因特征分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(14):2370-2376.
- [8] Li L, He Y, Yang H, Zhu J, et al. Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8):3835-3839.
- [9] Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, et al. Genetic diversity of coxsackievirus A16 associated with hand, foot, and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(1):112-120.
- [10] Perea D, Yusof MA, Podin Y, et al. Molecular phylogeny of modern coxsackievirus A16[J]. Arch Virol, 2007, 152(6):1201-1208.

收稿日期:2015-11-28