

菏泽市 2013 年手足口病病毒核酸检测结果分析

李晓寒, 李一苇, 刘雅娟, 刘芳, 刘倩

菏泽市疾病预防控制中心, 山东菏泽, 274000

摘要:目的: 分析 2013 年菏泽市手足口病病原学检测结果, 为手足口病疫情研判和综合防治提供参考资料。

方法: 收集菏泽市九县区手足口病诊疗定点医院采集的手足口病临床确诊病例的粪便、肛拭子或咽拭子标本, 提取样本核酸, 用实时荧光定量 PCR 法检测新肠道病毒 71 型 (EV71)、柯萨奇病毒 A16 型 (CA16) 和非 EV71、CA16 的其他肠道病毒 (EV)。**结果:** 2013 年菏泽市全年都有 HFMD 病例报告, 病原以 EV71 为主, 在不同区域、年龄、月份有均明显统计学差异。

关键词: 手足口病, 新肠道病毒 71 型, 柯萨奇病毒 16 型

手足口病 (Hand, foot and mouth disease, HFMD) 是多种病毒引起的, 发病以手、足、口、臀部出现皮疹或疱疹等症状的传染病。该病为一种自限性疾病, 大多可在一周内痊愈, 但也有少数重症患儿出现脑膜炎、心肌炎等合并症, 病程进展迅速, 病死率较高^[1,2]。2008 年手足口病被纳入法定丙类传染病管理。研究证实, 新肠道病毒 71 型 (EV71)、柯萨奇病毒 A16 型 (CA16) 是引起手足口病的主要病原^[2,3]。近年来, 菏泽市手足口病病例不断上升, 为掌握 2013 年菏泽市手足口病病原学及特点, 对 2013 年菏泽市九县区手足口病诊疗定点医院及疾病预防控制中心采集的 575 例临床诊断病例标本进行新肠道病毒 71 型 (EV71)、柯萨奇病毒 A16 型 (CA16) 核酸检测, 现将检测结果整理如下。

1 材料与方法

1.1 标本 2013 年菏泽市九县区手足口病诊疗定点医院采集的手足口病临床诊断病例粪便、肛拭子或咽拭子标本 575 例。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集与处理 采集手足口病临床诊断病例发病 3 天内的粪便、**肛拭子或咽拭子**标本, 低温运至菏泽市疾病预防控制中心手足口病实验室, 立即处理或-70℃保存。根据《2009 年手足口病防控指南》^[4]中粪便标本处理方法对标本进行处理。具体方法为: 取粪便标本 5g 置于 10mL 含 10%氯仿和玻璃珠的 PBS 液中; 剧烈震荡 30min; 3000rpm 离心 30min, 取上清置于离心管中, 再 3000rpm 离心 30min; 处理好的上清立即提取核酸或-70℃保存。肛拭子、咽拭子标本剧烈震荡 10min, 弃去棉拭子, 3000rpm 离心 30min, 取上清直接提取核酸或-70℃保存。

中图分类号: R512.5 文献标识码: A

作者简介: 李晓寒, 1980 年, 女, 汉, 山东菏泽, 主管技师, 硕士, 从事专业: 微生物检验。E-mail: lihan2006036@163.com

1.2.2 主要试剂及仪器 RNA 提取试剂盒：Roche High Pure Viral RNA Kit (瑞士 Roche 公司)；荧光定量 PCR 试剂盒：Enterovirus type 71 real time RT-PCR kit, Coxsackievirus virus A16 real time RT-PCR kit（中国广州 中山达安基因股份有限公司）；SteponePlus™ Real-Time PCR System（美国 ABI）。

1.2.3 病毒核酸检测 病毒 RNA 提取按试剂盒说明操作；Real Time RT-PCR 扩增预混合试剂操作按试剂盒说明进行，反应如下：逆转录：40℃，25min；预扩增：90℃，3min；扩增：93℃，15s→55℃，45s，40cycles。结果分析实行扩增曲线和 Ct 值分析，待检样品 FAM 通道有明显扩增曲线且 Ct≤34.9 报告为阳性。

1.3 统计分析 Microsoft Excel 2003 建立数据库，SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析处理，检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 核酸检测结果分析

2013 年共采集手足口病病例标本 575 份。实时定量 PCR 核酸检测结果显示，575 份标本中核酸阳性标本 502 份，检出率 87.30% (502/575)。其中，EV71 阳性标本数 379 份，阳性率为 75.50% (379/502)；其次是非 EV71、CA16 的其他肠道病毒 (EV) 阳性数 115 例，阳性率为 22.91% (115/502)；与 EV71、EV 相比，2013 年 CA16 阳性率较低，只检出病例标本 8 例，阳性率仅为 1.59% (8/502)。

2.2 不同性别、年龄核酸检测结果分析

502 份阳性病例标本中，男性病例 332 例，女性病例 170 例，男女性别比例为 1.95:1，无统计学差异 ($\chi^2=0.03$, $P=0.868$)。从年龄上看，最小 2 个月，最大 7 岁。不同年龄组之间，EV71、EV、CA16 阳性数构成比有明显统计学差异 ($\chi^2=24.09$, $P=0.007$)。与其他年龄组相比，1~岁组，EV71 阳性数构成比、EV 阳性数构成比分别为 39.05%、44.35%，均为年龄组中最高。2~岁组，CA16 阳性数构成比为 100%，高于其他年龄组；其次是 EV 和 EV71，分别为 36.52%、30.87%，低于 1~岁组高于其他年龄组。3~5 岁及 ≥5 岁组，EV71、EV 阳性数构成比分别为 23.48%、20.52%，均低于 1~2 岁组 ($\chi^2=6.84$, $P=0.009$; $\chi^2=6.17$, $P=0.013$)。见表 1。

表 1 不同年龄阶段核酸检测结果分析

年龄(岁)	EV71		CA16		EV		合计	
	阳性数	构成比%	阳性数	构成比%	阳性数	构成比%	总阳性数	构成比%
0~	25	6.60	0	0	8	6.96	33	6.57
1~	148	39.05	0	0	51	44.35	199	39.64
2~	117	30.87	8	100	42	36.52	167	33.27
3~	51	13.46	0	0	10	8.70	61	12.15
4~	24	6.33	0	0	2	1.74	26	5.18
≥5	14	3.69	0	0	2	1.74	16	3.19

合计	379	100	8	100	115	100	502	100
----	-----	-----	---	-----	-----	-----	-----	-----

2.3 不同地域核酸检测结果分析

2013 年菏泽市九县区均有手足口病病例出现，但核酸阳性检出率各县区有显著的统计学差异（ $\chi^2=41.31$ ， $P=0.000$ ）；从检测结果看，鄄城县阳性标本检出率最高达 96.67%，郓城县检出率最低 77.05%。EV71 病例分布在各县区，单县阳性率最高 88.14%，其次是牡丹区 87.30%，东明最低 50.00%。CA16 发病率在九县区均较低，仅在定陶（1 例）、巨野（6 例）、东明（1 例）出现散发病例。EV 阳性率在九县区各有不同，东明最高（47.73%），其次是曹县（32.73%），单县最低（11.86%）。见表 2。

表 2 不同地域核酸检测结果分析

县区	病例标本数	总阳性病例数		EV71		CA16		EV	
		阳性数	检出率%	阳性数	阳性率%	阳性数	阳性率%	阳性数	阳性率%
牡丹区	74	63	85.14	55	87.30	0	0	8	12.70
曹县	61	55	90.16	37	67.27	0	0	18	32.73
定陶	67	63	94.03	47	74.60	1	1.59	15	23.81
单县	64	59	92.19	52	88.14	0	0	7	11.86
郓城	61	47	77.05	32	68.09	0	0	15	31.91
成武	60	57	95.00	48	84.21	0	0	9	15.79
巨野	63	56	88.89	41	73.21	6	10.71	9	16.07
鄄城	60	58	96.67	45	77.59	0	0	13	22.41
东明	65	44	67.69	22	50.00	1	1.59	21	47.73
合计	575	502	87.30	379	75.50	8	1.59	115	22.91

2.4 不同月份核酸检测结果分析

2013 年菏泽市全年皆有手足口病患者出现。由图 1 可以看出，3~5 月份，病例数急剧增加，5 月份达高峰（139 例）；6 月~12 月份病例数呈逐渐下降趋势。3~5 月份依然为手足口病的发病高峰期；如图 1 显示，3~5 月份共检出阳性病例 271 份，占总阳性数的 53.98%(271/502)；5 月份，EV71、EV 阳性数分别为 99 例和 23 例，均为年度高峰点；6~12 月份，EV71 阳性数逐渐下降；EV 阳性数 9 月~11 月份稍有升高，但总体呈下降趋势。。

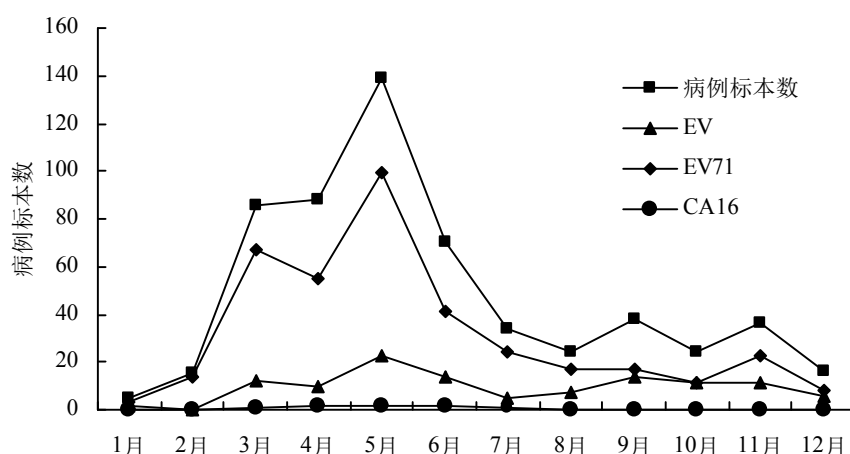


图 1 2013 年菏泽市不同月份手足口病病例数及阳性病例数

3 讨论

自 2009 年手足口病在菏泽市大面积流行后，之后几年仍有零星的散发病例出现。仅靠临床症状及体征很难判断手足口病的病原，目前，实时荧光定量 PCR 依然是快速检测手足口病病原的主要手段^[5,6]。通过实验室检测结果看，2009 年至 2012 年引起菏泽市手足口病的肠道病毒以 EV71、CA16 为主^[7,8]。

2013 年本实验室共接受并检测手足口病病例标本 575 例，定量 PCR 核酸检测结果显示：2013 年菏泽市全年都有手足口病病例出现，3~5 月份为发病高峰期，病例数急剧增加，7 月份发病逐渐下降；在发病高峰期依然以 EV71 引起的感染为主，其次是非 EV71、CA16 的其他肠道病病毒（EV）。全市九县区都有手足口病患者出现，就地域分布上看，EV71 感染病例在九县区都存在，其中单县感染率（88.14%）最高；CA16 发病率普遍较低，仅巨野 6 例，定陶、东明各 1 例；EV 的检出率各县区均不同，东明较其他县区检出率较高（47.73%）。男女性别比例为 1.95:1，**无明显统计学差异**。肠道病毒总阳性数构成比在 1~2 岁年龄段最高（72.91%），EV71 阳性数构成比也较高(69.92%)，CA16 感染患者也均在此年龄段；由此看出 **1~2 岁** 仍然是手足口病的高发年龄段，与其他研究相同^[3,9,10]。

本研究提示，2013 年菏泽市手足口病全年都有病例发生，病原微生物依然以 EV71 引起的感染为主，全市九县区发病率各不相同，主要发病人群分布于 **1~2 岁** 年龄段。手足口病发病率依然较高，患儿感染后不能得到终身免疫，二次患病的几率较大。针对目前手足口病尚无有效疫苗的情况，加强手足口病的预防与治疗仍是重点。提高实验室病毒检出率，加大从临床标本中鉴别诊断 EV71 感染病例，有助于选择手足口病的临床治疗措施，减少重症和死亡病例的发生。

参考文献

- [1] McMinn P, Stratov I, Nagarajan L, et al. Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in western Australia. Clin Infect Dis, 2001, 32:236–242.

- [2] Iwai M, Masaki A, Hasegawa S, Obara M, et al. Genetic changes of coxsackievirus A16, enterovirus 71 isolated from hand, foot, mouth disease patients in Toyama, Japan between 1981 and 2007. *Jpn J Infect Dis*, 2009, 62(4):254-259.
- [3] 骆玲飞, 王小光, 刘继倩等. 疑似重症手足口病病原学检测及流行病学分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(4): 971-972.
- [4] 卫生部. 手足口病预防控制指南 (2009 版) .
- [5] Anderson KM, Cheung PH, Kell MD. Rapid of homologous internal standards and evaluation of data for quantitation of messenger RNA by competitive polymerase chain reaction[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1997, 38: 133-140.
- [6] 严菊英, 卢亦愚, 徐昌平等. TaqMan 荧光定量 PCR 法快速检测肠道病毒 EV71[J]. *浙江预防医学*, 2008, 23(9): 1-4.
- [7] 刘芳, 李一苇, 李晓寒等. 菏泽市 2011 年手足口病病原学检测分析[J]. *国际病毒学杂志*, 2012, 19(1): 24-26.
- [8] 刘启林, 陈仲全, 李晓寒 等. 大便标本的采集条件对 EV71 病毒核酸检测结果的影响因素分析[J]. *现代预防医学*. 2012, 39(7): 1736-1737.
- [9] 周帅锋, 张 帆, 黄 威等. 2009 年湖南省哨点医院手足口病病原学检测与分析[J]. *南华大学学报 (医学版)* , 2010,38(4): 479-483.
- [10] 周爱华, 罗燕, 黎冠, 等. 邵阳市 2010 年手足口病病原学检测结果分析[J]. *实用预防医学*, 2011,18(3): 541-543.