

· 临床论著 ·

2010 年泰安市手足口病病原学检测分析

侯佩强 张荣强 倪楠

【摘要】 目的 对 2010 年泰安市手足口病病例进行病原体检测和分析。**方法** 对临床收集的手足口病病例的粪便标本 437 份、咽拭子标本 25 份,采用实时荧光 PCR 筛选出肠道病毒通用引物阳性标本,分别用 CA16 和 EV71 型的特异引物进行分类检测。**结果** 肠道病毒总阳性率为 82.47% (381/462),其中 CA16 阳性率为 38.31% (177/462),EV71 阳性率为 19.48% (90/462),CA16 的阳性率显著高于 EV71。粪便标本的阳性率为 84.67% (370/437),显著高于咽拭子的 44% (11/25) ($\chi^2 = 27.05, P < 0.01$)。本研究病例发病年龄多为 1~5 岁,男性略多于女性。**结论** 2010 年度泰安市手足口病疫情以 CA16 感染为主,粪便标本的阳性率较高,采用分子生物学方法检测手足口病病原体对手足口病的监测及防控具有重要意义。

【关键词】 手足口病;肠道病毒;EV71;CA16;实时荧光 PCR

Analysis on the pathogenic diagnosis of the hand-foot-mouth diseases in Taian in 2010 HOU Pei-qiang, ZHANG Rong-qiang, NI Nan. Taian Center for Diseases Control and Prevention, Taian 271000, China
Corresponding author: HOU Pei-qiang, Email: peiqh@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the pathogenic diagnosis of hand-foot-mouth diseases (HFMD) in Taian in 2010. **Methods** Total of 437 feces specimens and 25 throat swabs specimens from clinical-diagnosed HFMD patients were collected. Pan-enterovirus was detected by real-time fluorescent PCR, and Coxsackie A16 (CA16) and Enterovirus 71 (EV71) were determined by species-special primers. **Results** Positive rate of Pan-enterovirus, CA16 and EV71 were 82.47% (381/462), 38.31% (177/462) and 19.48% (90/462), respectively. The positive rate of CA16 was significantly higher than that of EV71. positive rate of feces specimens (84.67%, 370/437) was significantly higher than that of throat swabs specimens (44%, 11/25) ($\chi^2 = 27.05, P < 0.01$). The age of onset was mostly from 1 to 5 years. The prevalence rate of male was higher than that of female. **Conclusions** CA16 was the dominant pathogen of the HFMD in Taian in 2010. The feces specimens have a higher positive rate. Molecular biological methods on pathogenic diagnosis plays an important role in the surveillance and control of HFMD.

【Key words】 Hand-foot-mouth disease; Pan-enterovirus; EV71; CA16; Real-time fluorescence PCR

手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD)临床主要表现为口腔黏膜溃疡性疱疹及四肢末端水疱样皮疹,病原体以肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒组 16 型(Coxsackie A 16, CA16)为主,其中 EV71 可引起严重的中枢神经系统并发症,如脑膜炎、脑炎、急性迟缓性瘫痪等^[1-2]。手足口病是全球性传染病,世界大部分地区有此病流行的报道,2008 年 5 月 2 日我国卫生部将其纳入丙类法定传染病管理^[3-5]。2010 年本市出现多起该病疫情,本市疾控中心病毒学实验室收到本地区多家医院送检的粪便和咽拭子标本共 462 份,本研究采用分子生物学方法对这些标本进行肠道病毒检测,

同时进行了 EV71 和 CA16 的型别分析,现将检测结果报道如下。

资料与方法

一、标本来源

本地医院临床诊断为 HFMD 患者的粪便标本 437 份、咽拭子标本 25 份,低温送检至本病毒学实验室,当日不能检测标本置于 -70℃ 保存。

二、主要仪器和试剂

荧光定量 PCR 仪 (ABI 7500 型,美国 AB 公司),低温高速离心机 3-18K (德国 Sigma 公司),台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司),检测试剂为肠道病毒实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence PCR) 专用试剂盒 (上海硕世生物科技公司)。

三、标本处理

于生物安全柜内取约 5 g 粪便标本,置于 50 ml 离心管,分别标记标本号,每管中加入 10 ml PBS、1 g

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.03.008

基金项目:泰安市科学技术发展计划项目 (No. 20103020)

作者单位:271000 泰安市,山东省泰安市疾病预防控制中心

通讯作者:侯佩强,Email:peiqh@163.com

细玻璃珠和 1 ml 氯仿;剧烈振荡 40 min;经冷冻离心机 6 000 rpm 离心 20 min;将每份标本的上清液分别吸入 2 个带螺旋盖的冻存管中;一管标本悬液冻存于 -70℃ 备份,另一管用于病毒学检测。

四、病毒 RNA 的提取及逆转录反应

核酸提取采用 High pure Viral RNA kit(瑞士罗氏公司),操作按照试剂说明书进行。实时荧光定量 PCR 的反应体系和反应参数严格依据试剂说明书操作。

五、统计学处理

本研究中不同阳性率之间的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、病例发病时间的分布

2010 年度泰安市手足口病主要为春末至盛夏季节集中发病,本实验室 1 月和 12 月份未接受到标本,所接收标本中以 4~8 月份的发病标本最多,为 400 例,占全年收集标本总数的 86.58%。标本的收检时间详见表 1。

表 1 收检标本发病的时间分布

发病时间	病例数[例(%)]
2 月	1(0.22)
3 月	15(3.25)
4 月	47(10.17)
5 月	99(21.43)
6 月	113(24.46)
7 月	76(16.45)
8 月	65(14.07)
9 月	20(4.33)
10 月	18(3.90)
11 月	7(1.52)
合计	462(100)

二、病例发病年龄的分布

本研究收检的手足口病标本病例中男性 282 例,女性 180 例,性别比例为 1.57:1;发病年龄为 6 个月~19 岁。5 岁及以下病例为 412 例,占 89.39%。病例的年龄分布情况详见表 2。

表 2 收检标本病例发病的年龄分布

年龄组	病例数[例(%)]
0~1	89(19.26)
1~2	95(20.56)
2~3	106(22.94)
3~4	78(16.88)
4~5	45(9.74)
5 岁以上	49(10.61)
合计	462(100.00)

三、收检标本病例的地区分布及检测结果

泰安市有 6 个县市区,各县市区均有疫情发生,其中宁阳县和东平县疫情较重,所采集的标本最多。对本年度所采集的大便标本 437 例进行分析,其中 EV71 的阳性率为 20.59%,低于 CA16 (40.04%),二者比较具有统计学意义($\chi^2 = 96.91, P < 0.005$)。提示本地区本年度的手足口病病原体以 CA16 为优势病原。在各县市区中,宁阳县 EV71 感染率最高(37.93%),岱岳区 CA16 感染率最高(59.09%)。对 6 个县市区之间 EV71 的感染率进行分析,差异具有统计学意义($\chi^2 = 39.187, P = 0.000$)。CA16 感染率在 6 个县市区中比较同样具有统计学意义($\chi^2 = 16.857, P = 0.005$)。2010 年泰安市各县市区手足口病大便标本阳性率的分布情况详见表 3。

表 3 各县市区所收检大便标本的阳性率[例(%)]

地区	标本数	通用引物	EV71	CA16
宁阳县	116	106(91.38)	44(37.93)	38(32.76)
东平县	127	109(85.83)	21(16.54)	49(38.58)
肥城市	70	55(78.57)	7(10.00)	37(52.86)
岱岳区	44	39(88.64)	2(4.55)	26(59.09)
泰山区	57	44(77.19)	15(26.32)	17(29.82)
新泰市	23	17(73.91)	1(4.35)	8(34.78)
合计	437	370(84.67)	90(20.59)	175(40.04)

四、两类标本之间检测结果

2010 年,本研究所采集的标本主要有粪便标本和咽拭子标本两类,两类标本肠道病毒的阳性率分别为 84.67% 和 44%,差异具有统计学意义($\chi^2 = 27.05, P < 0.01$)。不同标本中肠道病毒的阳性率比较见表 4。

表 4 所收检的不同类型标本手足口病的阳性率

标本类型	标本数	通用引物	EV71	CA16
粪便	437	370(84.67)	90(20.59)	175(40.05)
咽拭子	25	11(44.00)	0(0)	2(8.00)
合计	462	381(82.47)	90(19.46)	177(38.31)

讨 论

手足口病(HFMD)属自限性疾病,大多数患者预后良好,但部分引起 HFMD 的病毒还可侵犯呼吸系统、中枢神经系统和心血管系统,引起脑炎、心肌炎、肺水肿、弛缓性麻痹等,个别危重患儿可因多种

原因死亡^[6]。本病全年均可发生,多发于夏秋季,常见于 5 岁以下儿童。引起 HFMD 的病原体主要为小 RNA 病毒科肠道病毒属的柯萨奇 A 组的 4、5、7、9、10、16 型,B 组的 2、5、13 型,部分埃可病毒和肠道病毒 71 型^[7]。最常见的为柯萨奇 A 组 16 型和肠道病毒 71 型^[8]。1997 ~ 1999 年,东南亚地区相继出现了 EV71 引起的 HFMD 大规模暴发流行^[9-10],特别在台湾地区,患者达 10 多万人,其中 78 例患者死亡^[11]。

2010 年,泰安市手足口病疫情主要发生春末至盛夏季节,本实验室所收检的也以 4 ~ 8 月份发病的标本最多,共 400 例,占全年总数的 86.58%。所采集的标本主要有粪便标本和咽拭子标本两类,两类标本的肠道病毒阳性率分别为 84.67% 和 44%,粪便标本作为肠道病毒集中的地方,其阳性率显著高于咽拭子标本。

本年度手足口病患者的发病年龄为 6 个月 ~ 19 岁,其中 5 岁及以下最多(412 例,89.39%)。本市 6 个县市区均有疫情发生,其中宁阳县和东平县疫情较重,分析不同地区的病原体感染情况,宁阳县 EV71 感染率最高(37.93%),岱岳区 CA16 感染率最高(59.09%)。从全年度分析,本市整个地区的病原感染情况:EV71 为 20.59%,CA16 为 40.04%,二者比较差异具有统计学意义,提示 2010 年度本市手足口病病原体以 CA16 为主。

2010 年本市所收集的 462 例手足口病标本中,肠道病毒阳性标本数为 381 例,其中 EV71 和 CA16 阳性者分别是 90 例和 177 例,尚有 114 例肠道病毒阳性的标本非 EV71 和 CA16,由于尚无特异性的检测方法,因此尚无法了解这部分病原体的具体病毒型别。故加强手足口病其他病原体构成的研究将对

该病的防控具有重大意义。

近年手足口病疫情暴发频繁,病原体的感染范围也异常广泛,因此要坚持对其进行长期监测,并深入开展分子流行病学的相关研究和探讨,对该病疫情做到早发现、早治疗,以减少其对人类特别是对儿童的危害。

参 考 文 献

- 1 周世力,杨帆,金奇,等. 肠道病毒 71 型的研究进展. 病毒学报,2003,19(3):284-286.
- 2 陆一涵,姜庆五. 人肠道病毒 71 型与手足口病. 疾病控制杂志,2008,12(3):183-188.
- 3 李文先,叶冬青. EV71 病毒感染并发神经源性肺水肿研究进展. 疾病控制杂志,2008,12(3):188-192.
- 4 卜戈,郭玲,李治悦,等. 阜阳市手足口病病例巢式 RT-PCR 诊断与结果分析. 中华疾病控制杂志,2009,13(2):111-114.
- 5 杨洪,姚相杰,何雅青,等. 2008 年深圳市 36 起手足口病疫情的病原学检测. 中国卫生检验杂志,2009,19(10):2328-2329.
- 6 马超锋,郑海潮,邓惠玲,等. 2009 年西安地区手足口病病原血清型分析及肠道病毒 71 型基因特征. 西安交通大学学报(医学版),2010,31(5):603-607.
- 7 王松,许诚,张红梅,等. RT-PCR 检测手足口病病原体 EV71. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2008,2(4):18-19.
- 8 杨秀惠,何家鑫,严延生,等. 一起手足口病暴发的病原学诊断与分析. 中国人兽共患病学报,2007,23(4):323-325.
- 9 Ooi MH, Wong SC, Podin Y, et al. Human enterovirus 71 disease in Sarawak, Malaysia a prospective clinical virological and molecular epidemiological study. Clin Infect Dis,2007,44(5):646-656.
- 10 Tu PV, Thao NT, Perera D, et al. Epidemiologic and virologic investigation of hand foot and mouth disease, southern Vietnam, 2005. Emerg Infect Dis,2007,13(11):1733-1741.
- 11 Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. New Engl J Med,1999,341(13):929-935.

(收稿日期:2011-06-11)

(本文编辑:孙荣华)

侯佩强,张荣强,倪楠. 2010 年泰安市手足口病病原学检测分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(3):209-211.