

· 临床论著 ·

2011年度288例儿童手足口病住院患者的病原学分析

梁金秋 庞琳 李洪杰 孟一星 曹金凤 何明 王琦 张锦前 刘顺爱 成军

【摘要】目的 了解2011年北京大学北京地坛医院教学医院儿童手足口病住院患者的病原体分布情况及变化趋势,为手足口病的预防、诊断及治疗等提供依据。**方法** 本研究共收集288例手足口病患者的咽拭子标本,使用肠道病毒通用型、肠道病毒71型和柯萨奇16型核酸检测试剂盒应用实时荧光逆转录-聚合酶链反应法(real-time PCR)进行检测。**结果** 2011年度本院肠道病毒阳性标本占51.74%(149/288)。病毒分型结果显示, EV71阳性标本占总标本例数的23.26%(67/288); CoxA16阳性标本占7.29%(21/288); 非EV71非CoxA16型阳性标本占21.18%(61/288)。2009至2011年北京地区的手足口病病原学分析结果显示,3年间EV71阳性率变化并不明显;CoxA16阳性率显著下降;非EV71非CoxA16型阳性率显著升高。**结论** 2011年度本院手足口病患儿在主要流行期以EV71和非EV71非CoxA16型肠道病毒感染为主;北京地区2011年手足口病病原学和前两年相比非EV71非CoxA16型感染比例继续升高。

【关键词】 手足口病; 逆转录聚合酶链反应; 肠道病毒

Etiology of 288 cases with hand, foot and mouth disease LIANG Jin-qi^{*}, PANG Lin, LI Hong-jie, MENG Yi-xing, CAO Jin-feng, HE Ming, WANG Qi, ZHANG Jin-qian, LIU Shun-ai, CHENG Jun. ^{*}Beijing Ditan Hospital, Pekin University Teaching Hospital, Beijing 100015, China
Corresponding author: LIU Shun-ai, Email: liusa1031@sina.com; CHENG Jun, Email: jun.cheng.ditan@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the pathogen distribution of patients with hand, foot and mouth diseases (HFMD) hospitalized in Division of Pediatrics, Beijing Ditan Hospital in 2011. **Methods** Real-time fluorescence quantitative RT-PCR kits with three reagents: universal enterovirus primer, coxsackievirus A16 (CoxA16) primers and enterovirus 71 (EV71) primers were used to detect the samples, respectively. **Results** The enterovirus-positive rate was 51.74% (149/288). Among this, the positive rate of EV71, CoxA16 and other types of enterovirus were 23.26% (67/288), 7.29% (21/288), 21.18% (61/288), respectively. And the study reveals that the positive rate of CoxA16 had significantly decreased, EV71 changed little, other types of enterovirus significantly increased, during 2009-2011. **Conclusions** In extensively epidemic-period of 2011, the etiology of children with hand, foot and mouth disease hospitalized in our hospital was dominated alternately by EV71 and non-EV71, non-CoxA16 virus. The positive rate of non-EV71, non-CA16 virus in Beijing area has been persistently increased during 2009-2011.

【Key words】 Hand, mouth and foot disease (HFMD); Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); Enterovirus

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.06.007

基金项目: 北京市科委科技项目 (No. D09050703560908); 国家科技部“十一五”专项课题 (No. 2009ZX10004-105)

作者单位: 100015 北京, 北京大学北京地坛医院教学医院 (梁金秋、孟一星、成军); 首都医科大学附属北京地坛医院儿科 (庞琳、何明); 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所 (李洪杰、曹金凤、王琦、张锦前、刘顺爱); 新发突发传染病研究北京市重点实验室 (梁金秋、李洪杰、孟一星、曹金凤、王琦、张锦前、刘顺爱、成军)

通讯作者: 刘顺爱, Email: liusa1031@sina.com; 成军, Email: jun.cheng.ditan@gmail.com

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)具有发热,手、足以及口腔等部位的斑丘疹或疱疹等显著的临床表现,是常见于5岁以下儿童的世界范围内流行的传染病。而近年来已成为我国的重大健康问题。2008年我国将该病纳入《中华人民共和国传染病防治法》规定报告的丙类传染病管理。根据中华人民共和国卫生部发布的数据,2010年和2011年我国大陆共报道3 394 375例手足口病病例,其中1 414例死亡(<http://www.moh.gov.cn/mohjbyfkzj/s3578/201202/54106.shtml>)^[1]。

多型肠道病毒均可引起手足口病^[2],其中最常见的是柯萨奇病毒A组16型(coxsackievirus A16, CoxA16)和肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)。早期的手足口病以CoxA16多见^[3],近年来EV71处于活跃状态,已超越CoxA16。而除CoxA16和EV71以外,也有其他型别的肠道病毒可引发手足口病。近年来,已有文章报道非EV71非CoxA16型肠道病毒引起的手足口病病例超过CoxA16^[1,3-5]。手足口病的主要病原体感染趋势,对手足口病的发病机理研究、早期诊断和治疗以及预后判定等均具有重要意义。本研究采用国家食品药品监督管理局(SFDA)认证的肠道病毒核酸检测系列试剂盒,采用卫生部《手足口病预防控制指南》推荐的技术对2011年于北京大学北京地坛医院教学医院儿科就诊的手足口病住院患者进行病原学检测,系统地分析和总结了本院2011年实验室监测数据及病毒病原构成,并结合患儿的临床和流行病学资料进行分析,为手足口病的预防和控制策略的制订提供科学依据。

资料及方法

一、研究对象

入组288例病例为2011年2~12月于本院儿科就诊的手足口病住院患者,临床诊断标准符合我国卫生部发布的《手足口病诊疗指南》(2010年版)。288例患者中,男177例,女111例;患者年龄1月龄~8岁,发病年龄集中在0~5岁(98.26%)。

二、研究方法

1. 标本采集:分别在手足口病患儿入院后第1、2、3、5、7天采集其咽拭子标本。用专用采样棉签,适度用力拭抹患儿咽后壁和两侧扁桃体部位,应避免触及舌部;迅速将棉签放入装有3 ml保存液的采样管中,在靠近顶端处折断棉签杆,旋紧管盖并密封。咽拭子液暂时保存于4℃,24 h内用

无RNA酶的冻存管分装,-80℃保存。

2. 肠道病毒检测方法:采用中山大学达安基因股份有限公司的系列肠道病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法),包括肠道病毒通用型核酸检测试剂盒、EV71型核酸检测试剂盒和CoxA16型核酸检测试剂盒。取100 μl手足口患儿的咽拭子标本,用Trizol试剂裂解沉淀法提取肠道病毒RNA,严格按照说明书进行操作。用以上提取的病毒核酸分别与通用型、EV71型和CoxA16型肠道病毒RT-PCR反应液、逆转录酶和Taq酶配制各自的反应体系,进行荧光定量RT-PCR肠道病毒核酸检测。RT-PCR循环反应条件为:40℃ 25 min,1个循环;94℃ 3 min,1个循环;93℃ 15 s、55℃ 45 s,50个循环。使用ABI Prism 7500荧光定量PCR仪。检测样本呈典型S型扩增曲线且Ct值≤39,则判断样本为肠道病毒阳性。

3. 结果判断:标本分别使用肠道病毒通用型、EV71型和CoxA16型核酸检测试剂盒检测肠道病毒,其中,肠道病毒通用型试剂盒和EV71型试剂盒检测阳性标本判为EV71型肠道病毒阳性;通用型试剂盒和CoxA16型试剂盒检测阳性标本判为CoxA16型肠道病毒阳性;肠道病毒通用型试剂盒检测阳性而使用EV71或CoxA16型核酸检测试剂盒检测阴性的标本判为其他血清型肠道病毒阳性,即非EV71非CoxA16型肠道病毒阳性。

三、统计学处理

采用SPSS 16.0软件对资料进行统计学分析,率或构成比的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、不同月份手足口病患者病例数和病原学分布变化

2011年2月1日至2011年12月31日共采集288例患者咽拭子标本,肠道病毒核酸检测结果显示,肠道病毒阳性患者占51.74%(149/288),其中,EV71阳性患者最多,占总标本数的23.26%(67/288),21例为CoxA16阳性患儿,占7.29%(21/288),而其他未分型肠道病毒阳性患者为61例,占21.18%(61/288)。2011年度不同月份手足口病病例变化趋势分析发现,5~7月份患者数量最多,之后逐渐下降,11月份出现较大反弹。病原学不同月份分布除CoxA16以外均与病例数分布类似,5~7月份最高,10~11月份有小的反弹。CoxA16型肠道病毒

和与其他肠道病毒阳性患者变化趋势差异较大: 出现3个高峰, 分别是5月份、8月份和11月份。2~8月份EV71阳性病例数量最多, 未分型肠道病毒次之, CoxA16最少; 而9月份以后不同型别病毒分布不断变化, 10月份未分型肠道病毒最多, 11月份CoxA16最多。提示2011年2~8月份手足口病仍以EV71和未分型肠道病毒为主, 以CoxA16为辅; 2011年9~12月份逐渐转变为各型肠道病毒交替流行。以上结果见图1。

二、不同年龄和性别组患者肠道病毒检测结果

不同年龄组手足口病病原学分布结果如表1。结果显示, 0~1岁组肠道病毒感染率和EV71阳性率最低, 其中总肠道病毒感染率与>1岁组相比差异具有统计学意义($\chi^2 = 5.278, P = 0.022$); CoxA16在≥3岁组阳性率最高, 与0~3岁组相比差异具有统计学意义($\chi^2 = 5.043, P = 0.025$); 非EV71非CoxA16阳性率在2~3岁组较高。149份病原学阳性标本中, 男性91份, 女性58份, 男女比例为1.57:1, 男女患者肠道病毒阳性检出率分别为51.41% (91/177) 和52.25% (58/111), 其中EV71、CoxA16和其他肠道病毒检出率分别为22.03% (39/177)、7.91% (14/177) 及21.47% (38/177) 和25.23% (28/111)、6.31% (7/111)、20.72% (23/111), 不同性别之间肠道阳性率差异无统计学意义。

三、手足口病肠道病毒阳性患者不同采样时间病原检测

131例肠道病毒阳性手足口病患者(18例患者因标本不全而排除)分别检测病后1、2、3、3~5、

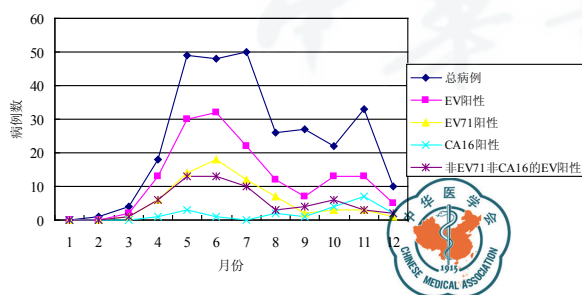


图1 2011年2~12月份不同发病时间和病毒分型手足口病病例数量变化趋势

5~7天标本阳性率情况, 见表2。可见, 从病后不同天次的肠道病毒检出率来看, 病后第1天肠道病毒检测阳性例数最多, 为102例, 之后随采样时间距发病时间间隔越长则检出肠道病毒阳性例数明显下降, 至第5~7天仅检测出8例肠道病毒阳性标本。

四、不同年度不同地区肠道病毒阳性率比较

本研究与2009及2010年北京市疾病预防控制中心的研究结果^[6]相比较(图2), 3年间CoxA16阳性率显著下降($\chi^2 = 291.6, P < 0.05$), 相反, 非EV71非CoxA16肠道病毒感染率阳性率显著升高($\chi^2 = 56.103, P < 0.05$), 而EV71阳性率变化不明显, 病原学感染率差异具有统计学意义($\chi^2 = 97.807, P < 0.05$)。本研究与2011年南京市^[7]及广州市^[8]的研究结果相比较(图3), 病原体感染率差异具有统计学意义($\chi^2 = 219.7, P < 0.05$)。本院CoxA16肠道病毒感染率显著低于广州市($\chi^2 = 31.014, P < 0.05$), 与南京市相比较无显著差异; 非EV71非CoxA16肠道病毒感染率显著高于南京市($\chi^2 = 43.313, P < 0.05$), 而与广州市相比无显著差异; EV71感染率与南京市、广州市相比差异无统计学意义。

表2 不同采样时间手足口病病原检测阳性结果

发病时间 (d)	总标本数 (例)	肠道病毒阳性率 [例 (%)]
0~1	288	102 (35.42)
1~2	288	68 (23.61)
2~3	288	50 (17.36)
3~5	288	12 (4.17)
5~7	288	8 (4.16)

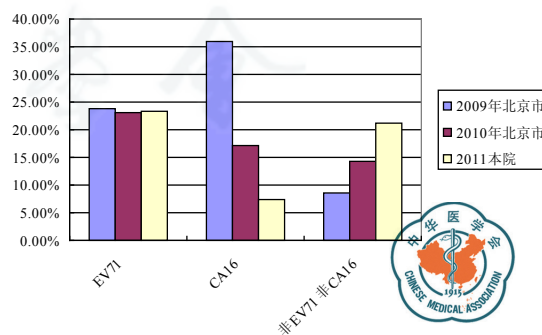


图2 北京地区不同时段HFMD患者病原体感染率的比较结果

表1 不同年龄组患者肠道病毒检测 [例 (%)]

组别	例数	EV71阳性	CA16阳性	非EV71非CA16阳性	肠道病毒阳性	肠道病毒阴性
0~1岁	31	2/31 (6.45)	2/31 (6.45)	6/31 (19.35)	10/31 (32.26) ^a	21/31 (67.74)
1~2岁	110	32/110 (29.09)	6/110 (5.45)	21/110 (19.09)	59/110 (53.64)	51/110 (46.36)
2~3岁	70	15/70 (21.43)	3/70 (4.29)	20/70 (28.57)	38/70 (54.29)	32/70 (45.71)
≥3岁	77	18/77 (23.38)	10/77 (12.99) ^b	14/77 (18.18)	42/77 (54.55)	35/77 (45.45)

注: ^a为0~1岁组肠道病毒阳性率显著低于>1岁组 ($P = 0.022$); ^b为≥3岁组CA16阳性率显著高于0~3岁组 ($P = 0.025$)

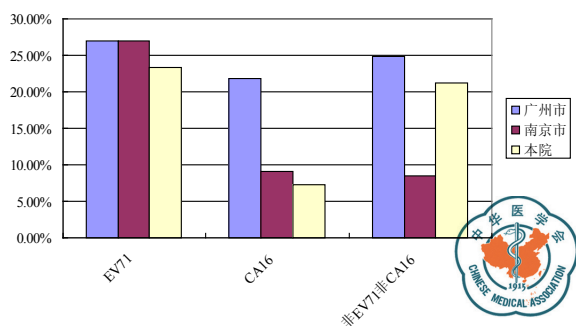


图3 2011年不同地区HFMD患者病原体感染率的比较结果

讨 论

1957年,新西兰首次报道了手足口病。肠道病毒属的柯萨奇病毒A组2、4、5、6、8、10、16型,B组ECHO 1、4、7、19、30型、CVB3、CVB5和CVA9,及肠道病毒71型均可引起手足口病^[2,9-10]。1958年,加拿大的Robinson分离出CoxA16,初步查明CoxA16为手足口病病原;1959年在英国城市伯明翰流行时,被正式命名为手足口病。此后,全世界很多国家和地区报道了EV71的流行情况。中国大陆地区自1981年上海市首次报道手足口病以来,很多地区出现过手足口病的局部暴发,基本上是由EV71和CoxA16引起。最近几年非EV71非CoxA16肠道病毒引起的手足口病在明显增加,例如本课题组对2010年度本院儿童手足口病住院患者病原学分析显示CoxA10的阳性率已高于CoxA16的阳性率(未发表数据);广州市2011年数据显示EV71、CoxA16、其他肠道病毒引起手足口病病例所占比例分别为26.96%、21.80%、24.79%^[8],均证实非CoxA16非EV71肠道病毒所占手足口病病例的比例已经超过传统的CoxA16型,其中CVA10和CVA6曾引起了世界上出现的多次散发或暴发的手足口病流行^[11-14]。

本研究收集了2011年2~12月份本院儿科288例手足口病患儿的咽拭子标本,一年中的手足口病发病高峰与钱海坤等^[15]报道的2011年北京市流行态势基本一致。从不同型别肠道病毒的感染情况看,2011年主要流行期以EV71和未分型肠道病毒交替流行为主。

从年龄来看,手足口病发病年龄集中在0~5岁。其中1~2岁组手足口病患者最多,0~1岁组最少。就肠道病毒感染率来看,0~1岁组总肠道病毒感染率和EV71阳性率最低,且该组总肠道病毒感染率显著低于>1岁组;CoxA16在≥3岁组阳性率

显著高于<3岁组;非EV71非CA16型阳性率在2~3组较高。故年龄因素对肠道病毒的易感性有着一定的影响。肠道病毒阳性患者标本的动态监测结果显示,采样与发病的时间间隔与肠道病毒阳性检出率总体呈负相关关系,发病当天采集标本检出阳性例数最高,随病程增加,则检出病毒阳性例数大大降低。故在发病后应及早进行病原检测,以增加病毒检出率,提高诊治效率。本研究数据显示有8例患者病后第7天咽拭子检测肠道病毒仍为阳性。考虑患者阳性咽拭子标本持续天数可能与病情轻重以及预后相关,故本课题组下一步打算收集临床资料对这8例患者结合病情进行分析。2011年本院手足口病患者肠道病毒感染率与李锡太等^[6]报道的2009年和2010年北京市疾病预防控制中心的研究结果相比较,病原学感染率差异具有统计学意义,其中3年间CoxA16型阳性率逐年显著下降,非EV71非CoxA16型肠道病毒阳性率显著升高,且2011年非EV71非CoxA16型肠道病毒阳性率已大大超过CoxA16型的阳性率。故本课题组之后将会把重心放在对非EV71非CoxA16型肠道病毒的研究上,目前正在对非EV71非CoxA16型肠道病毒进行具体分型及个别型别肠道病毒全序列的测定,从而得以对手足口病患者病原学进行进一步的分析研究。与乔梦凯等^[7]报道的南京市及关琳琳等^[8]报道的广州市手足口病患者病原学变化相比较,肠道病毒总感染率差异具有统计学意义。其中本院CoxA16肠道病毒感染率显著低于广州市,与南京市相比较差异无显著统计学意义;非EV71非CoxA16肠道病毒感染率显著高于南京市,而与广州市相比无显著差异;EV71感染率与南京市、广州市相比较无显著差异。以上提示近几年来CoxA16和非EV71非CoxA16肠道病毒感染率更易随地点的不同而产生极大变化,故应给予足够的重视。

手足口病病原体变异较快,且不同型别的肠道病毒常常轮流交替流行,流行态势较复杂。本研究对2011年本院手足口病住院患者病例的调查分析发现,手足口病病例的病原谱出现了新的变化。故应时时监测并准确把握及时的病原学流行信息,为手足口病的诊治提供参考依据。

参 考 文 献

- 1 Zhang T, Du J, Xue Y, et al. Epidemics and frequent recombination within species in outbreaks of human enterovirus B-associated hand, foot and mouth disease in Shandong China in 2010 and 2011. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67157.
- 2 Gopalkrishna V, Patil PR, Patil GP, et al. Circulation of multiple enterovirus serotypes causing hand, foot and mouth disease in

- India. *J Med Microbiol*, 2012, 61(pt3):420-425.
- 3 李洪杰, 刘顺爱, 成军, 等. 2010年度北京地区儿童手足口病住院患者病原学分布分析. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2012, 6(1):9-12.
- 4 黄威, 周帅锋, 张帆, 等. 2008-2010年湖南省哨点医院手足口病病原学检测结果及基因特征分析. *实用预防医学*, 2011, 18(5):779-784.
- 5 Puenpa J, Chieochansin T, Poovorawan Y, et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Thailand, 2012. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(4):641-643.
- 6 李锡太, 王全意, 黄芳, 等. 北京市2007-2010年手足口病流行特征分析. *国际病毒学杂志*, 2010, 18(1):5-10.
- 7 乔梦凯, 石利民, 雍玮, 等. 南京市2011年手足口病流行病学及病原学特征分析. *中国医学创新*, 2013, 10(1):89-91.
- 8 关琳琳, 张定梅, 曹开源, 等. 广州市及周边地区2011年手足口病病原学与分子流行病学调查. *热带医学杂志*, 2013, 13(4):419-423.
- 9 Han JF, Cao RY, Qin CF, et al. Echovirus 30 in EV71-associated hand, foot and mouth disease outbreak, Guangxi, China. *J Clin Virol*, 2011, 50(4):348-349.
- 10 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 Clin Virol*, 2010, 48(1):49-54.
- 11 Österback R, Vuorinen T, Linna M, et al. Coxsackievirus A6 and hand, foot, and mouth disease, Finland. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(9):1485-1488.
- 12 Bracho MA, Gonza'lez-Candelas F, Valero A, et al. Enterovirus co-infections and onychomadesis after hand, foot, and mouth disease, Spain, 2008. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(12):2223-2231.
- 13 Bracho MA, Gonza'lez-Candelas F, Valero A, et al. Onychomadesis outbreak in Valencia, Spain associated with hand, foot, and mouth disease caused by enteroviruses. *Pediatr Dermatol*, 2011, 28(1):1-5.
- 14 Wei SH, Huang YP, Liu MC, et al. An outbreak of coxsackievirus A6 hand, foot, and mouth disease associated with onychomadesis in Taiwan, 2010. *BMC Infect Dis*, 2011, 11:346.
- 15 钱海坤, 田祎, 王全意, 等. 2007-2012年北京市手足口病流行病学研究. *国际病毒学杂志*, 2013, 20(1):6-10.
- (收稿日期: 2013-10-30)
(本文编辑: 孙荣华)

梁金秋, 庞琳, 李洪杰, 等. 2011年度288例儿童手足口病住院患者的病原学分析[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2013, 7(6):825-829.

