

· 临床论著 ·

2013年北京地区手足口病的流行趋势

顾红岩 詹永婧 李辉 华文浩 魏红山 李兴旺

【摘要】目的 了解2013年北京地区手足口病的流行病学特点,为手足口病的防控工作提供一定的科学依据。**方法** 收集2013年北京地区手足口病患者的咽拭子和(或)便标本,应用实时荧光逆转录PCR(RT-PCR)法进行病原体的检测,同时收集和整理相关临床资料。**结果** 2013年北京地区手足口病多见于≤3岁年龄组儿童(占88.84%);5~8月份为手足口病发病高峰;非EV71非CoxA16肠道病毒为手足口病的主要病原体(占43.72%);6例EV71和3例CoxA16分别属于C4a和B1b亚型,并存在多个传播链。**结论** 2013年北京地区手足口病高峰时间延长,非EV71非CoxA16型肠道病毒成为引起手足口病的主要病原体。

【关键词】 手足口病; 肠道病毒; EV71

Prevalent tendency of hand, foot and mouth disease in Beijing during 2013 GU Hongyan*, ZHAN Yongjing, LI Hui, HUA Wenhao, WEI Hongshan, LI Xingwang. *Beijing Ditan Hospital, Peking University Teaching Hospital, Beijing 100015, China
Corresponding author: LI Xingwang, Email: ditanlxw@163.com

【Abstract】Objectives To investigate the epidemic characteristics of hand, foot and mouth diseases (HFMD) in Beijing during 2013, and provide scientific basis for the prevention and control of HFMD. **Methods** Pharyngeal swab and/or stool samples of patients clinically diagnosed as HFMD developed in Beijing during 2013 were collected. The pathogen were detected by real-time fluorescence reverse transcription PCR (RT-PCR) method, while the clinical data of the patients were collected and sorted at the same time. **Results** HFMD was mainly (88.84%) occurred in children under 3 years old in Beijing during 2013. And HFMD occurred mainly from May to August. Non-enterovirus 71 (EV71) and non-Coxsackievirus A16 (CoxA16) enterovirus was the main causative pathogens, with a positive rate of 43.72%. There were 6 strains of EV71 and 3 strains of CoxA16 belonged to C4a and B1b subtype, respectively, with several transmission chains. **Conclusions** In Beijing during 2013, the peak duration of HFMD was one month longer than before, non-EV71 and non-CoxA16 enterovirus became the main causative pathogen.

【Key words】 Hand, foot and mouth disease; Enterovirus; Enterovirus 71

手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)是婴幼儿常见传染病,由多种肠道病毒感染引起,柯萨奇病毒A16(Coxsackievirus, CoxA16)和人肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)感染尤为常见^[1],主要表现为发热,手、足、口腔和(或)肛周、臀部以及四肢等部位的丘疱疹,少数病例出现脑炎、神经源性肺水肿和急性迟缓性麻痹等严重并发症,由EV71感染导致的手足口病患儿可伴有严重并发症甚至死亡^[2]。

EV71和CoxA16已在全国范围内引起多次暴发,如山东临沂(2007年)^[3]和安徽阜阳(2008年)^[4]。我国卫生部已于2008年5月2日将手足口病纳入国家丙类法定传染病。2007年以来,各地报道的手足口病病原体呈现以EV71感染为主,CoxA16为辅的特征,但病原体也存在一定的地区和时间差异^[5]。本实验室所报道的2010年北京地区儿童手足口病住院患者的病原体,以EV71为主,而非EV71非CoxA16型肠道病毒的感染率显著高于CoxA16的感染率^[6]。为进一步监测北京地区手足口病病原体的变化趋势,为手足口病的防控工作提供依据,本研究以北京地区的手足口病患者为研究对象,了解2013年北京地区手足口病的流行病学和病原学情况,并对EV71和CoxA16的分子生物学特

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.06.006

基金项目: 新发呼吸道传染病快速分子检测方法的比较和筛查
作者单位: 100015 北京, 北京大学地坛医院教学医院
(顾红岩、魏红山、李兴旺); 首都医科大学附属北京地坛医院感染中心(詹永婧、李辉); 首都医科大学附属北京地坛医院检验科(华文浩)

通讯作者: 李兴旺, Email: ditanlxw@163.com

征进行分析,报道如下。

资料与方法

一、研究对象

2013年患病地点为北京地区的临床诊断为手足口病的患者,临床诊断标准参照我国卫生部颁发的《手足口病诊疗指南》(2010年版)^[7]和《肠道病毒71型(EV71)感染重症病例临床救治专家共识(2011年版)》^[8]的分期分型标准。

二、研究方法

1. 临床资料的收集和整理:对2013年就诊于北京地坛医院的手足口病患者的临床资料进行收集和整理,筛选患病地点为北京地区的手足口病患者,收集并整理其人口学、病史、临床表现、治疗和预后等临床资料。

2. 标本采集:使用专用无菌拭子,适度用力涂抹患者咽后壁,迅速将拭子放入装有3 ml病毒保存液的病毒采样管中(北京友康基业生物科技有限公司产品),暂时保存于4℃冰箱;便标本放入专用无菌便盒,暂存于4℃冰箱。

3. 标本处理:咽拭子适当涡旋混匀,静置后取上清直接用于病毒检测。取约0.5 g便标本,加入5 ml生理盐水,配制10%的混悬液,充分震荡混匀后,2 990 r/min,离心20 min(离心半径 $r=15$ cm),取上清用于病毒检测。

4. 病毒RNA的提取和实时荧光逆转录PCR(RT-PCR):按照通用型肠道病毒、EV71及CoxA16核酸检测试剂盒(荧光PCR法)(上海科华生物工程股份有限公司产品)说明,提取咽拭子和便标本上清中的病毒RNA,并进行肠道病毒、EV71和CoxA16的鉴定。

5. EV71和CoxA16 VP1全长核苷酸序列的扩增:使用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法,扩增筛选出的EV71和CoxA16 VP1全长序列。根据参考文献^[3,9]合成引物,序列如下:EV71-VP1-S: 5'-GCAGCCCAAAAGAACTTCAC-3', EV71-VP1-A: 5'-AAGTCGCGAGAGCTGTCTTC-3'; CVA16-VP1-S: 5'-ATTGGTGCTCCCACTACAGC-3', CVA16-VP1-A: 5'-GCTGTCCTCCACACAAGAT-3'。PCR产物片段分别为1 082 bp和1 110 bp。将上述引物稀释至工作浓度20 μ mol/L,按照TaKaRa One Step RT PCR Kit(TaKaRa)操作说明行RT-PCR。反应条件均为:50℃ 30 min, 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 80 s, 40个循环; 72℃ 10 min。

PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定分析。

6. 核苷酸序列测定及分析:扩增后的阳性产物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司纯化回收并双向测序。Conting Express软件进行序列的拼接整理。

7. 生物信息学分析:MEGA 5.0软件进行多序列比对分析,并使用邻接法(Neighbor-Joining)、K2P模型,分别以CoxA16原型株(G-10)和EV71原型株(BrCr)作为组外对照,将EV71和CoxA16 VP1全长核苷酸序列与EV71和CoxA16各基因型和基因亚型代表株构建亲缘进化树,建树的可靠性通过1 000 bootstrap评估。

三、统计学处理

SPSS 13.0软件进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、入组患者的一般资料

2013年,共收集231例手足口病患者,共采集44份粪便标本和210份咽拭子标本。231例患者中男性145例,女性86例,男女比例约为1.7:1,年龄最小为2月龄,最大为20岁,平均年龄约为1.77岁,年龄 <5 岁患儿占96.97%(224/231),其中以年龄 ≤ 3 岁患儿为主,占88.84%(199/224);轻症185例,重症46例,重症患者中年龄 ≤ 3 岁患儿占86.96%(40/46)。

二、入组患者的空间分布

207例手足口病患者(除24例患者家庭住址不详外)主要分布在北京市朝阳区、顺义、海淀、通州和昌平区,其他地区散在分布,见图1。

三、病原鉴定和不同样本检测阳性率的比较

本研究收集的210份咽拭子样本中,肠道病毒通用阳性94份,阳性率为44.76%(94/210);44份粪便标本中,肠道病毒通用阳性35份,占79.55%(35/44),便标本检测的阳性率显著高于咽拭子样本($\chi^2=17.61$, $P<0.001$),差异具有显著统计学意义;231例患者肠道病毒的总阳性率为51.52%(119/231),其中EV71的阳性率为4.33%(10/231),CoxA16阳性率为3.46%(8/231),非EV71非CoxA16型肠道病毒占43.72%(101/231)。提示2013年北京地区手足口病病原体以非EV71非CoxA16型肠道病毒(其他肠道病毒)为主。

四、手足口病发病的时间分布

如图2所示,2013年北京地区手足口病几乎全年均有发病,发病高峰为5~8月份,非EV71

非 CoxA16 的其他肠道病毒感染患者显著多于 EV71 和 CoxA16 感染者。

五、EV71 和 CoxA16 感染者的临床资料分析

本研究中10例EV71阳性患者,年龄为11月龄~8岁,7例轻症(2例伴有轻度心肌损伤),3例重症(均伴有病毒性脑炎)。10例患者均伴有高热、手、足和(或)口腔、肛周皮疹,3例重症患者均伴有不同程度的病毒性脑炎症状,如头痛、恶心、呕吐、易惊和(或)肢体抖动等。8例CoxA16阳性患者,年龄为1~20岁,其中6例轻症(2例伴有轻度心肌损害),2例重症(均伴有病毒性脑炎),重症患者易惊、肢体抖动等临床表现较轻。18例患者经对症支持治疗和(或)丙种球蛋白及甲强龙治疗后均治愈,无后遗症。

六、EV71 VP1 全长核苷酸和氨基酸相似性分析

对本研究中获得10例EV71样本的VP1全长核苷酸进行RT-PCR扩增,6例样本得到目的片段,部分电泳结果如图3所示(目的条带约1.1 kb)。对其VP1核苷酸序列分析显示,6例EV71的VP1核苷酸序列均为891 bp,无缺失和插入,编码297个氨基酸。将6例EV71的VP1核苷酸序列与从GenBank下载的EV71各基因型和基因亚型代表株的VP1全长核苷酸序列进行相似性分析。结果显示,这6例EV71与C4基因亚型的代表株相似性最高,核苷酸相似性为90.6%~98.9%,氨基酸相似性为96.9%~100%,与A、B基因型的差别较大,核苷酸相似性为78%~82.9%,氨基酸相似性为94.1%~98.3%。

七、CoxA16 VP1 全长核苷酸和氨基酸相似性分析

对获得的8例CoxA16样本的VP1全长核苷酸序列进行RT-PCR扩增,3例样本得到目的片段,部分电泳结果如图4所示(目的条带约1.1 kb)。对其VP1序列分析显示,3例CoxA16 VP1核苷酸序列均为891 bp,无缺失和插入,编码297个氨基酸。NCBI blast显示此3例CoxA16的VP1核苷酸序列均与CoxA16病毒株BJ08/07(GenBank: JX068833.1)的相似性最高,相似性均为99%。将其与从GenBank下载的CoxA16各基因型和基因亚型代表株的VP1序列进行相似性分析,结果显示,这3例CoxA16与B1基因亚型的代表株相似性最高,核苷酸相似性为90.4%~99.0%,氨基酸相似性为98%~100%,与A、B2基因型的差异较大,核苷酸相似性为70.4%~92.7%,氨基酸相似性为91.2%~97.0%。

八、EV71 和 CoxA16 亲缘进化树分析

分别将6例EV71和3例CoxA16 VP1核苷酸序列与EV71和CoxA16各基因型和基因亚型代表株构建亲缘进化树(图5~6)。可见,6例EV71与C4a基因亚型代表株处于同一分支,3例CoxA16与B1b基因亚型代表株处于同一分支,表明北京地区流行的EV71和CoxA16分别为C4a和B1b基因亚型。进一步分析发现,6例EV71和3例CoxA16分别位于C4a和B1b进化支的不同簇中,提示本地EV71和CoxA16的流行存在多个传播链。

讨 论

手足口病可由多种肠道病毒感染引起, EV71 和 CoxA16 是其主要病原体, 自2007年以来, 二者共同循环, 在国内引起手足口病的多次暴发^[3]。EV71感染可导致重症手足口病, 并伴有多种严重并发症甚至死亡。2008年, 手足口病在安徽阜阳大范围暴发, 共导致23人死亡, 主要病原体为EV71^[4]。本研究中北京地区EV71感染引起的手足口病, 其人群分布、临床表现等与1998年台湾^[10]、2007年山东临沂^[3]、2008年安徽阜阳^[4]发生的EV71引起的手足口病病例相符。根据病毒衣壳蛋白VP1核苷酸序列的差异, 可将EV71病毒分为A、B和C共3种基因型^[11], B、C基因型又可进一步分为B1~B5和C1~C5^[12], 其中C4基因型又可分为C4a和C4b两种基因亚型。自1998年以来, 中国大陆EV71的流行株以C4基因型为主, C4基因型的亚型在中国大陆的演进大致可分为3个阶段: 1998至2001年, 所有EV71分离株均为C4b基因亚型; 2002至2004年, C4a和C4b亚型共同存在; 2005年以来, 仅为C4a亚型^[13]。本研究中北京地区的6例EV71也均为C4a亚型, 并且同时存在多个传播链, 与以往报道相符^[3]。CoxA16感染者常表现为单纯性手足口病, 临床症状相对较轻, 常无并发症, 预后较好。CoxA16 VP1全长核苷酸序列差异>15%, 可认为是不同的基因型^[14], 从而将CoxA16分为A、B基因型, B基因型又分为B1和B2, B1又包括B1a、B1b和B1c基因亚型。1999至2008年, 中国的CoxA16分离株均属于B1a和B1b亚型^[9]。本研究中北京地区CoxA16引起的手足口病临床症状相对较轻, 均治愈, 无后遗症。3例CoxA16均为B1b亚型, 并且存在多个传播链。

钱海坤等^[15]报道, 2007至2012年, 北京市中心城区和远郊区病例数较少, 近郊区和城区结

合部报告病例较多,发病高峰集中在5~7月份。本研究结果显示,2013年北京地区的手足口病患者主要来自北京市朝阳区、顺义、海淀、通州和昌平区,与上述报道相符,然而发病高峰主要集中在5~8月份,高峰时间较上述报道延长了1个月,分析发现这与近几年北京市的气候变化存在密切关系,根据中国气象台发布的气象信息,本研究发现北京市2013年8月份的平均气温比往年高1~2℃,这可能导致了手足口病高峰时间的延长。本研究入组的231例患者,男女比例约为1.7:1,以年龄≤3岁患儿为主,且重症患者中也以年龄≤3岁患儿为主(占86.96%),这与1998年中国台湾^[2]和2008年安徽阜阳^[16]手足口病流行结果一致。EV71和CoxA16一直是引起手足口病的主要病原体,本实验室研究表明2010年引起北京地区手足口病的主要病原体仍然是EV71(40.36%)^[6],但非EV71非CoxA16型肠道病毒的比例(17.21%)超过了CoxA16(5.64%)。本研究中非EV71非CoxA16型肠道病毒的比例(84.87%)已显著超过EV71和CoxA16的比例(8.40%和6.72%),成为引起2013年北京地区手足口病的主要病原体,而且手足口病的严重程度与其病原体密切相关^[17],因此,这次病原体的变化趋势需引起人们的重视。此外,本研究同时检测了咽拭子和便标本中肠道病毒的检出情况,结果表明便标本肠道病毒的检出率显著高于咽拭子中病毒的检出率($P < 0.001$),提示便标本更有助于手足口病病原体的检出。

总之,本研究结果显示2013年北京地区手足口病的人群分布、主要临床特点等与往年相仿,时间分布略有差异,但病原体谱出现了较大的变化,需进一步加强监测,以便更有效地防控该病的暴发流行。

(本文图1~6见光盘)

参考文献

- Li L, He Y, Yang H, 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.
- Chang LY, Lin TY, Hsu KH, et al. Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease[J]. Lancet, 1999, 354(9191):1682-1686.
- Zhang Y, Tan XJ, Wang H, et al. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China[J]. J Clin Virol, 2009, 44(4):262-267.
- 万俊峰, 朱理业, 刘红, 等. 阜阳市手足口病(EV71感染)疫情流行病学分析[J]. 安徽医学, 2008, 29(4):344-345.
- 高勇, 韩明锋, 李秀勇, 等. 阜阳市2011年手足口病实验室检测结果分析[J]. 检验医学, 2013, 28(9):796-800.
- 李洪杰, 庞琳, 王琦, 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[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2012, 6(1):10-14.
- 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2010年版)[J]. 国际呼吸杂志, 2010, 30(24):1473-1475.
- 中华人民共和国卫生部手足口病临床专家组. 肠道病毒71型(EV71)感染重症病例临床救治专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2011, 49(9):675-678.
- Zhang Y, Wang D, Yan D, et al. Molecular evidence of persistent epidemic and evolution of subgenotype B1 Coxsackievirus A16-associated hand, foot, and mouth disease in China[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2):619-622.
- Chang LY, Lin TY, Huang YC, et al. Comparison of enterovirus 71 and Coxsackie-virus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998[J]. Pediatr Infect Dis J, 1999, 18(12):1092-1096.
- Brown BA, Oberste MS, Alexander JJ, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998[J]. J Virol, 1999, 73(12):9969-9975.
- Huang SW, Wang YF, Yu CK, et al. Mutations in VP2 and VP1 capsid proteins increase infectivity and mouse lethality of enterovirus 71 by virus binding and RNA accumulation enhancement[J]. Virology, 2012, 422(1):132-143.
- Tan X, Huang X, Zhu S, et al. The persistent circulation of enterovirus 71 in People's Republic of China: causing emerging nationwide epidemics since 2008[J]. PLoS One, 2011, 6(9):e25662.
- Perera D, Yusof MA, Podin Y, et al. Molecular phylogeny of modern Coxsackievirus A16[J]. Arch Virol, 2007, 152(6):1201-1208.
- 钱海坤, 田祎, 李锡太, 等. 2007-2012年北京市手足口病流行病学研究[J]. 国际病毒学杂志, 2013, 20(1):6-10.
- 毛国顺, 罗玲, 刘晓琳, 等. 手足口病轻症与重症患者临床特征比较[J]. 中华传染病杂志, 2008, 26(7):387-390.
- AbuBakar S, Chee HY, Al-Kobaisi MF, et al. Identification of enterovirus 71 isolates from an outbreak of hand, foot and mouth disease (HFMD) with fatal cases of encephalomyelitis in Malaysia[J]. Virus Res, 1999, 61(1):1-9.

(收稿日期: 2014-05-21)

(本文编辑: 孙荣华)

顾红岩, 詹永靖, 李辉, 等. 2013年北京地区手足口病的流行趋势[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(6): 768-773.