

# 北京市2010年手足口重症病例EV71 检出情况及病原学分析

李洁 曲梅 贾蕾 张新 刘白薇 黄芳 黎新宇 王全意

**【摘要】** 目的 了解2010年北京市手足口重症病例肠道病毒(EV)检出情况及EV71病原学特征。方法 荧光定量RT-PCR检测EV71和柯萨奇病毒A组16型(CoxA16)。采用RD细胞对检测阳性的咽拭子进行病毒分离培养和鉴定,对EV71分离株的VP1基因序列进行种系发生分析。结果 2010年北京市手足口重症病例442例荧光定量RT-PCR检测阳性253例,阳性检出率为57.24%,其中EV71为54.55%(138/253),CoxA16为5.93%(15/253),其他肠道病毒为39.53%(100/253)。VP1基因序列分析表明2010年北京市手足口重症病例的12株EV71分离株均属于C4a基因型,核苷酸同源性为97.2%~100.0%;与2007—2010年北京EV71分离株、2007年山东手足口重症病例、2008年安徽阜阳及2008年广东手足口重症及死亡病例EV71分离株VP1基因序列核苷酸同源性为94.0%~99.9%。结论 北京市2010年手足口重症病例由C4a基因型EV71引起,其中至少有4个病毒链在重症病例发病中起作用。分离的12株EV71与安徽阜阳地区2008年手足口重症病例分离株亲缘关系较近。

**【关键词】** 手足口病; 肠道病毒71型; 序列分析

**Etiological detection of severe hand-food-mouth disease and related genetic characteristics of enterovirus type 71 infection in Beijing, 2010** Li Jie, Qu Mei, Jia Lei, Zhang Xin, Liu Bai-wei, Huang Fang, Li Xin-yu, Wang Quan-yi. Institute for Infectious Disease and Endemic Disease Control, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China  
Corresponding author: WANG Quan-yi. Email: bjcdcxm@126.com

**【Abstract】** Objective To study the etiological detection on samples from severe hand-foot-mouth disease (HFMD) cases and the genetic characteristics of enterovirus type 71 (EV71) isolates from severe patients in Beijing, 2010. Methods Real-time RT-PCR was used to detect EV71 and Coxsackievirus A16 (CoxA16) and RD cells were used to separate virus strains from samples. Homogeneity of EV71 isolated strains were also analyzed. Results Four hundred and forty-two severe cases were detected and 253 were positive, taking up 57.24% of the total (253/442). The overall positive detection rate on EV71 was 54.55% (138/253), with CoxA16 as 5.93% (15/253), and with other enterovirus group was 39.53% (100/253). The nucleotide homogeneity of VP1 within these 12 strains was 97.2%~100.0%, and with Beijing strains in 2007-2010, Shandong strains in 2007 and Anhui Fuyang strains in 2008 and the Guangdong strains in 2008 as 94.0%~99.9%. Conclusion Severe HFMD cases were most oftenly caused by EV71 but less caused by CoxA16 or other enterovirus. The HFMD in 2010 in Beijing was mainly caused by EV71 subgenotype C4a with 4 transmission chains. Twelve isolated EV71 strains had high homogeneity with strains isolated from severe cases in Anhui Fuyang in 2007.

**【Key words】** Hand-food-mouth disease; Enterovirus type 71; Sequence analysis

手足口病(HFMD)是由多种人肠道病毒引起的一种儿童常见传染病,是我国法定报告管理的丙类传染病。手足口病最常见为柯萨奇病毒A组16型(CoxA16)及肠道病毒71型(EV71)引起。该病通常症状较轻,表现为发热、口腔黏膜溃疡、皮肤疱疹等

皮肤黏膜损害为主的症状。但一部分患儿会出现中枢神经系统的症状,如无菌性脑膜炎、脑干脑炎和脊髓灰质炎样麻痹等。本研究对北京市2010年手足口病重症病例病原学检出情况进行了分析。

## 资料与方法

1. 资料来源:2010年北京市16个区县开展手足口病监测,均按照相关规定对符合病例定义的手

足口病病例进行报告。各区县疾病预防控制中心 (CDC) 各设 1~2 个监测点, 所有住院、重症及死亡病例均需开展流行病学调查并采集标本。本研究的手足口重症病例资料均来源于北京市 16 个区县 CDC 上报数据。按卫生部手足口病诊疗指南 (2010 版) 对手足口重症病例定义。

2. 样本检测及病毒分离: 用专用采样棉签, 采集手足口重症病例的咽拭子标本立即运送至实验室检测, 采用德国 QIAGEN 公司病毒核酸提取试剂盒 (QIAamp Viral RNA Mini Kit) 进行核酸提取; 用达安基因股份有限公司的手足口病毒核酸荧光定量检测试剂盒检测。将检测阳性的标本液接种于 RD 细胞, 出现细胞病变的细胞采用德国 QIAGEN 公司病毒核酸提取试剂盒提取核酸, 使用德国 QIAGEN 公司的 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit 扩增病毒核酸的全长 VP1, 引物序列参考文献 [1], QIAxcel 全自动实时毛细管电泳系统进行 PCR 产物的分析, QIAquick Gel Extraction Kit 对 PCR 产物进行纯化, PCR 产物纯化后送北京六合通经贸有限公司测序。

3. 基因序列测定和分析: 从 PubMed 下载 EV71 病毒 VP1 全长基因序列, 应用 BioEdit 软件对测序结果进行编辑, 获得 891 bp 的 EV71 病毒 VP1 全长基因。将这些 DNA 序列基因与下载序列进行比对, 采用 Mega 软件的邻位连接法构建系统发生树, 并进行核苷酸同源性和氨基酸同源性的分析。

4. 统计学分析: 应用 Excel 软件建数据库, SPSS 11.5 软件进行统计学分析, 率的比较采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 一般情况: 2010 年北京市共报告临床诊断手足口重症病例 610 例, 男性 378 例 (61.97%), 女性 232 例 (38.03%); 经荧光定量 RT-PCR 检测 442 例 (男性 274 例、女性 168 例), 其中阳性 253 例 (男性 158 例、女性 95 例), 占 57.24%; 阴性 189 例, 占 42.76%。阳性病例中, EV71 为 138 例, 占 54.55%; CoxA16 为 15 例, 占 5.93%; 其他肠道病毒感染 100 例, 占 39.53%。男女性间阳性检出率差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.094, P = 0.760$ )。手足口病发病年龄范围为 0~32 岁, 平均年龄为 2.8 岁 (表 1)。各年龄组间阳性检出率差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 10.646, P = 0.059$ )。

2010 年北京市手足口重症病例从 4 月报告数开始上升, 5~7 月一直维持在较高水平, 自 8 月中旬开

表 1 2010 年北京市手足口重症病例肠道病毒检出情况

项目	检测例数	病毒检测			合计
		EV	EV71	CoxA16	
性别					
男	274	60(37.97)	87(55.06)	11(6.96)	158(57.66)
女	168	40(42.11)	51(53.68)	4(4.21)	95(56.55)
年龄(岁)					
0~	32	7(53.85)	6(46.15)	0	13(40.63)
1~	143	40(46.51)	41(47.67)	5(5.81)	86(60.14)
2~	107	22(42.31)	30(57.69)	0	52(48.60)
3~	72	16(33.33)	26(54.17)	6(12.50)	48(66.67)
4~	40	7(29.17)	16(66.67)	1(4.17)	24(60.00)
5~32	48	8(26.67)	19(63.33)	3(10.00)	30(62.50)
合计	442	100(39.53)	138(54.55)	15(5.93)	253(57.24)

注: 括号外数据为检出阳性例数, 括号内数据为阳性检出率(%)

始出现下降趋势。2010 年检测阳性的手足口重症病例主要集中在 5~7 月, EV71 和其他肠道病毒引起的重症病例所占构成比最大 (图 1)。但各月份之间阳性检出率差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 13.852, P = 0.086$ )。

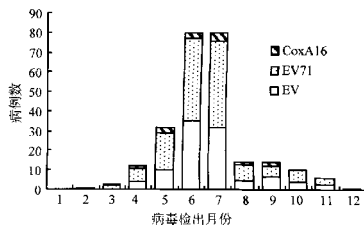


图 1 2010 年北京市手足口重症病例肠道病毒检出情况

2. 序列及系统进化树分析: 本研究下载了 2008 年安徽阜阳重症死亡病例 EV71 毒株 5 个、2008 年广东重症死亡病例毒株 7 个、2007 年山东重症病例毒株 4 个, 并对这些序列和 2010 年北京市手足口重症病例的 12 个 EV71 毒株进行序列分析。12 株 EV71 VP1 基因序列与 C4 基因型代表株核苷酸同源性 > 92.0%; 与 C4b 基因型代表株核苷酸同源性为 92.4%~93.7%; 与 C4a 基因型代表株核苷酸同源性为 94.2%~96.9%。12 株病例标本分离病毒 VP1 基因序列组内核苷酸同源性为 97.2%~100.0%。氨基酸同源性为 99.7%~100.0%。将其与 2006~2010 年北京市手足口病例分离株序列比对, 核苷酸序列同源性为 94.0%~99.9%, 氨基酸序列同源性为 98.3%~100.0%。与 2007 年山东地区手足口重症病例分离株比较, 核苷酸同源性为 97.2%~98.4%, 氨基酸的同源性为 98.6%~100.0%。与 2008 年安徽阜阳地区

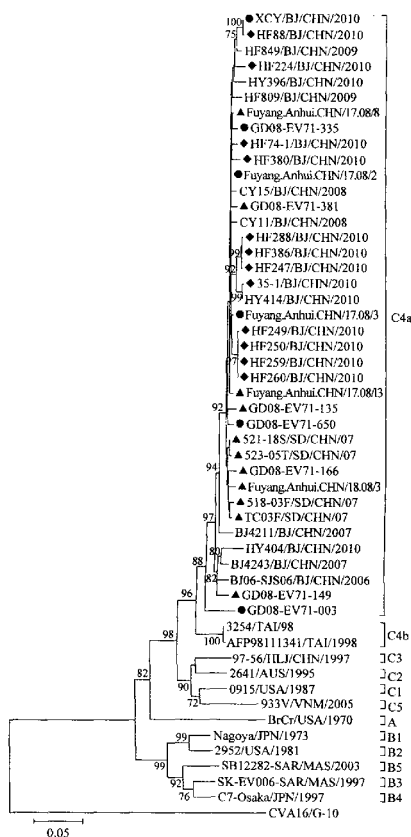
手足口重症死亡病例EV71分离株序列比对,核苷酸序列同源性为97.7%~99.2%;氨基酸序列同源性为99.0%~100.0%。与2008年广东地区重症病例及死亡病例EV71分离株序列比对,核苷酸序列同源性为92.9%~98.6%,氨基酸序列同源性为99.6%~100.0%。

应用Clustal W软件进行核苷酸多序列比对,使用Mega软件构建系统进化树(NJ法),见图2。进化树显示:2010年北京手足口重症病例分离株在进化树上聚于4簇,其中HF249/BJ/CHN/2010、HF250/BJ/CHN/2010、HF259/BJ/CHN/2010、HF260/BJ/CHN/2010聚于一簇,同源性非常高。HF247/BJ/CHN/2010、HF288/BJ/CHN/2010、HF386/BJ/CHN/2010也在进化树上聚于一簇,说明有共同的来源。HF74-1/BJ/CHN/2010与HF380/BJ/CHN/2010位于一个小分支上,同源性高、亲缘关系很近。HF88/BJ/CHN/2010与HF224/BJ/CHN/2010及2010年北京手足口死亡病例分离株XCY/BJ/CHN/2010位于一小支上,同源性高、亲缘关系很近。2010年北京手足口重症病例分离株、2007年山东重症分离株、2008年安徽阜阳手足口重症、死亡病例分离株,以及2006—2010年北京流行的EV71均为C4a基因型。

## 讨论

2007年北京市将手足口病纳入全市传染病常规报告系统,2008年5月2日手足口病纳入国家法定传染病丙类传染病管理。自2007年以来北京市手足口病报告轻症病例、重症病例、死亡病例逐年增加,特别是2010年手足口病报告病例出现大幅度的增加,同时北京市手足口病病原学监测数据显示2007—2010年非EV71、非CoxA16肠道病毒感染人数呈逐年递增趋势<sup>[2]</sup>,为此本研究对2010年北京市手足口重症病例的病原学检出情况进行了分析;在检测出的阳性手足口重症病例中,EV71所占构成比最大(54.55%),其他肠道病毒次之(39.53%),CoxA16构成比最小(5.93%)。有研究显示<sup>[3]</sup>,北京市引起手足口病的病原中CoxA10占其他肠道病毒的44.0%,CoxA5次之,但引起重症病例的非EV71、非CoxA16病原谱情况未见报道,这是本研究的不足之处。另外本研究还发现不同人群、不同月份采集的标本病原阳性检出率差异无统计学意义。

本研究对最易引起手足口重症病例的EV71也进行了病原学分析。根据病毒衣壳蛋白VP1核苷酸序列的差异,可将EV71分为A、B、C 3个基因型,其



注:◆为北京市2010年分离的手足口重症病例分离株;●为手足口病死死亡病例分离株;▲为2008年安徽阜阳、2008年广东省、2007年山东省手足口重症病例分离株

图2 2010年北京市分离的EV71病毒全长VP1区核苷酸序列基因进化树

中B型和C型又进一步分为B1~B5以及C1~C5亚型<sup>[4,5]</sup>。我国近年流行的毒株都属于C4亚型<sup>[1]</sup>。本研究将来自手足口重症患儿的12株EV71毒株进行VP1全长基因序列分析,12株病毒分离株与C4基因型代表株的核苷酸同源性>92.0%,故属于C4基因型<sup>[6]</sup>,与C4a代表株的核苷酸同源性最高(94.2%~96.9%),故属于C4a基因型。进化树分析显示:分离的12个EV71毒株在进化树上分别位于4个分支上,这说明2010年北京由EV71引起的手足口重症病

例至少有 4 个以上的病毒传播链。2008 年安徽阜阳部分手足口重症及死亡病例分离株与北京市 2010 年手足口重症病毒分离株在进化树上呈现聚集现象,说明这些毒株有共同的进化来源,亲缘关系很近,进化树显示 2010 年北京手足口重症病例分离株与 2007 年山东重症病例分离株及 2007 年广东重症及死亡病例分离株位于不同的分支上,亲缘关系较远。但 2007 年山东重症病例部分分离株及 2007 年广东重症及死亡病例部分分离株与 2008 年安徽阜阳重症部分分离株亲缘关系近,有共同来源,说明手足口病毒毒株可由一个区域向另一个区域传播。

肠道病毒的感染可引起轻症的手足口病也可引起重症的手足口病,有报道依据 EV71 的 VP1 区划分的不同基因型毒株引起手足口重症病例的能力可能有差异,如某些 B 基因型 EV71 引起重症及死亡病例占 EV71 感染儿童的 10% 以上<sup>[7]</sup>,C1 基因型 EV71 引起的手足口重症要少一些,而 C2 基因型的 EV71 在 1999 年西澳大利亚手足口病暴发中与手足口重症病例的发病关系密切<sup>[8]</sup>。C4 基因型 EV71 引起的手足口病例症状较其他基因型轻一些<sup>[9]</sup>。2006—2010 年北京市重症病例样本分离获得的 EV71 毒株均属于 C4a 型,北京市 2010 年由 EV71 引起的手足口重症及死亡病例占总发病数的构成比为 1.34% (610/45 409),远低于某些国家的 10% 以上<sup>[7]</sup>,这说明 VP1 基因型可能和病情的进展和转归有某种联系。本研究的另一个不足是仅对 EV71 的 VP1 单一抗原决定因子进行了分析,没有考虑到病毒整个基因组的情况及患者个体差异的存在,要解释清楚手足口重症和轻症病例的发病机制还需要在致病因子、宿主因子以及病毒流行株基因序列等方面做更深入、全面的研究。

### 参 考 文 献

[1] Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, et al. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human

enterovirus 71 in Shandong, China. *J Clin Virol*, 2009, 44 (4): 262-267.

- [2] Li XT, Wang QY, Huang F, et al. Analysis on the hand-food-mouth disease characteristics in Beijing, 2007-2010. *Intern J Virol*, 2011, 18(1):5-10. (in Chinese)  
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*, 2011, 18(1):5-10.
- [3] Wang YQ, Ji YL, Qu M. Analysis on the hand-food-mouth disease and related genetic characteristics of non-EV71 and non-CoxA16 type in Beijing, 2010. *Intern J Virol*, 2011, 18(3):75-79. (in Chinese)  
王永全,吉彦莉,曲梅.北京地区与手足口病相关的非 EV71、非 CoxA16 型肠道病毒的分子特征分析. *国际病毒学杂志*, 2011, 18(3):75-79.
- [4] Zhang HJ, Qian Y. Advance in research on enterovirus type 71. *Intern J Virol*, 2009, 17(6):170-174. (in Chinese)  
张慧娟,钱渊.肠道病毒 71 型的分子病毒学研究进展. *国际病毒学杂志*, 2009, 17(6):170-174.
- [5] Guo HJ, Wang XX, Li XL. Human enterovirus 71 (EV71) research progress. *Intern J Virol*, 2010, 17(4):97-101. (in Chinese)  
郭会杰,王潇潇,李秀玲.人类肠道病毒 71 型的研究进展. *国际病毒学杂志*, 2010, 17(4):97-101.
- [6] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol*, 1999, 73(12):9969-9975.
- [7] Ooi MA, 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.
- [8] McMinn P, Lindsay K, Perera D, et al. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in malaysia, singapore, and western australia. *J Virol*, 2001, 75 (16): 7732-7738.
- [9] Ryu WS, Kang B, Hong J, et al. Enterovirus 71 infection with central nervous system involvement, South Korea. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(11):1764-1766.

(收稿日期:2011-08-16)

(本文编辑:尹廉)