

· 现场调查 ·

江苏省 2008 年某福利院手足口病暴发的流行病学和病原学特征研究

潘浩 朱叶飞 祁贤 张永杰 李亮 邓斐 吴斌 王慎骄 朱凤才 汪华

【摘要】 目的 了解2008年江苏省某福利院手足口病(HFMD)暴发疫情的流行病学和病原学特征。方法 对该福利院首起暴发疫情开展流行病学调查,并进行3个月的跟踪随访。实验方法采用荧光定量 RT-PCR 法检测肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)病毒,并用 RD、Vero 细胞分离病毒,间接免疫荧光法鉴定分离株,并对 EV71 分离株的 VP1 基因序列进行种系发生分析。结果 该福利院首起暴发疫情发病数为 21 例,罹患率为 20.0%;10 份粪便标本分离出 3 株 EV71 病毒,其 VP1 基因序列分析表明为 C4 基因亚型,与安徽省阜阳地区 08 株的同源性在 97.9%~100.0% 之间。随访研究发现 EV71 病毒在疫情第 1 周即可通过粪便排毒,最长排毒期近 10 周。首起疫情发生 2 个月后,该福利院又暴发产生 6 例 CA16 病毒感染的病例,两起疫情均有 3 例发生潜伏期排毒,7 名婴幼儿被发现机体同时存在两种病毒。结论 该福利院先后两起疫情分别由 EV71 和 CA16 病毒引起。EV71 分离株为 C4 基因亚型,同安徽省阜阳地区 08 株有较高的同源性。两种病毒在机体中存在潜伏期排毒、混合感染(或携带)和超长排毒期现象。

【关键词】 手足口病; 肠道病毒 71 型; 柯萨奇病毒 A 组 16 型; 序列分析

Analysis on the epidemiological and genetic characteristics of enterovirus type 71 and Coxsackie A16 virus infection in Jiangsu, China, 2008 PAN Hao, ZHU Ye-fei, QI Xian, ZHANG Yong-jie, LI Liang, DENG Fei, WU Bin, WANG Shen-jiao, ZHU Feng-cai, WANG Hua. Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China
Corresponding author: WANG Hua, Email: hua@jscdc.cn

【Abstract】 Objective To determine the epidemiological features of hand-foot-and-mouth disease (HFMD) outbreaks and the genetic characteristics of enterovirus type 71 (EV71) isolates from patients in Lianyungang, Jiangsu province in May, 2008. **Methods** Epidemiological, microbiological, cellular and molecular methods were performed to investigate pathogens and to describe the homogeneity of isolated strains. **Results** 21 cases were reported in this HFMD outbreak with the attack rate as 20.0%. 3 EV71 virus strains were isolated from 10 stool samples. The nucleotide and amino acid homogeneity of these 3 Jiangsu strain with Anhui Fuyang strains were 97.9%–100.0% and 99.7%–100.0%, respectively. These 4 Jiangsu strains were within genotype C sub-genotype C4 in phylogenetic tree. Data from the follow-up study showed that shedding of EV71 and Coxsackie A16 virus (CA16) in the latent period appeared in the outbreak of HFMD. Human beings could be infected by both EV71 virus and CA16 at the same time and could also carry the two viruses. We also discovered that EV71 virus could be expelled out of the human body through stool in the first week and last for 10 weeks. **Conclusion** The recently identified EV71 isolates from this HFMD outbreak belonged to sub-genotype C4. Facts as: the release of viruses in the latent period, co-infection or coexisting of two viruses at the same time and super long period of expulsion of toxin exist in EV71 and CA16 did exist.

【Key words】 Hand-foot-and-mouth disease; Enterovirus type 71; Coxsackie A16 virus; Sequence analysis

手足口病(HFMD)是一种侵犯婴幼儿为主的传

染病,肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)是引起该病的主要病原。EV71 在世界范围内曾造成十多次大暴发和流行^[1,2],2008 年 5 月 8—15 日江苏省连云港市某社会福利院突发 21 例以发热、手、足、口等部位出现丘疹和疱疹为主要症状的病例,经调查证实为一起由 EV71 病毒引起的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.04.008

作者单位: 210009 南京,江苏省疾病预防控制中心急性传染病防制科

第一作者现工作单位: 200338 上海市疾病预防控制中心

通信作者: 汪华, Email: hua@jscdc.cn

HFMD 暴发疫情。为进一步了解该病的发病特点,我们进行了近 3 个月的跟踪随访(此期间该福利院又发生了以 CA16 病毒感染的暴发疫情),对 EV71 病毒的排毒规律、基因特点进行研究。

对象与方法

一、流行病学调查

1. 个案调查:依据《手足口病预防控制指南(2008 年版)》统一一个案调查表,对该福利院病例和密切接触者进行一般情况、发病就诊情况、临床表现、流行病学接触史、餐饮情况和生活环境进行流行病学调查。对暴发病例进行描述性研究,用 Microsoft Excel 软件建立数据库,将相关调查数据录入后使用 SPSS 12.0 软件进行统计分析。

2. 病例诊断:临床诊断病例包括发热或不发热,手、足、口腔等部位出现斑丘疹、疱疹,皮疹周围有炎性红晕,疱内液较少,少量病例可发展成重症病例。临床诊断病例的咽拭子、疱疹液、粪便等标本中如分离出肠道病毒或检出肠道病毒核酸,或者血清特异性 IgM 抗体阳性及双份血清 IgG 抗体呈 4 倍以上增长,则定义为实验室诊断病例。

3. 随访研究:选择 HFMD 临床病例和带病毒者各 14 名,进行 3 个月的随访研究,每周采集咽拭子、粪便(肛拭子)和疱疹液标本,进行 EV71 和 CA16 病毒检测,观察排毒情况及病毒的分布。

二、实验室检测

1. 标本来源:临床病例和所有病例密切接触者(包括婴幼儿、护理员、医生等)采集发病后 3 天内咽拭子、泡内渗出液和 7 天内粪便(肛拭子)标本,并采集血清标本。同时对食品、婴儿床护栏和玩具表面等进行采样,所有标本置 -70°C 保存备用。

2. 核酸提取:采用 Qiagen 公司 QIAamp Viral RNA 试剂盒提取 RNA, -70°C 保存备用。

3. 肠道病毒通用型荧光定量 RT-PCR 检测:肠道病毒通用引物和探针序列设计见参考文献[3],检测试剂采用 Qiagen 公司的 QuantiTect probe 试剂盒。PCR 反应为 25 μl 混合反应体系,包括:5.75 μl H_2O , 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 探针, 12.5 μl 2 \times RT-PCR Master Mix, 0.25 μl QuantiTect RT Mix, 5 μl RNA。反应条件为:50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min (94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min)共 45 循环,使用 ABI 7500 型 PCR 热循环仪。

4. 肠道病毒分型 RT-PCR 检测:EV71 和 CA16 病毒的分型检测引物依据《手足口病预防控制指南

(2008 年版)》提供的序列,由大连宝生物工程有限合成。检测试剂采用 Qiagen 公司的 Ones step RT-PCR 试剂盒,PCR 检测反应体系及循环条件按照试剂盒说明书进行操作,1.5% 琼脂糖电泳。

5. 病毒分离与鉴定:方法按参考文献[4],检测细胞系为 RD(rhabdomyosarcoma)和 Vero 细胞,阴性标本盲传一代,病毒鉴定采用间接免疫荧光法(IFA),利用单克隆抗体(Chemicon International Inc)进行肠道病毒的分型。

6. 核苷酸序列测定:测定 EV71 病毒 VP1 基因,全长 891 bp。采用 primer premier 5 软件设计扩增引物,VP1-F:5'-GCA GCC TAG AAG AAC TTC AC-3', VP1-R:5'-ACC ACT CTG AAG TTG CCC AC-3'。PCR 扩增产物用 QIA quick Gel Extraction 试剂盒进行纯化,送上海生物工程公司进行序列测序。

7. EV71 病毒 VP1 基因的分析:针对 VP1 全基因的编码区构建进化树,选取有代表性的 EV71 病毒的 VP1 基因序列作为参照,使用 Clustal X1.83 软件进行序列比对,MEGA4.0 软件构建进化树,构建采用邻-接(N-J)算法,Bootstrap 重复值为 1000。采用 DNASTAR MegAlign 软件包进行 EV71 病毒 VP1 区核苷酸和氨基酸序列的同源性分析。

结 果

一、首起疫情调查

1. 流行病学调查:

(1)一般情况:该社会福利院共收养儿童 105 人(男孩 63 人,女孩 42 人),另保育员、教师等共 43 人。收养儿童按不同年龄分别居住于儿童楼的二、三、四层,住宿、就餐及日常活动地点均在各自层面,楼层相对独立互不串联,但居住二、三层儿童多无自主意识,饮水、就餐和大小便由保育员负责。该福利院制定了有关的卫生制度和消毒隔离制度,每天早晨进行晨检和日常消毒。

(2)流行强度:2008 年 5 月 8 日,该福利院发生首例 HFMD 患儿。检查腋下体温 38.3 $^{\circ}\text{C}$,伴有手足皮疹,口腔及咽部疱疹,无其他临床症状。至 5 月 15 日,先后发病 21 例,均符合病例定义要求,未发现合并症及死亡,罹患率 20.0%。保育员、教师等成年人均未发病。

(3)流行特征:①时间分布:本次暴发疫情时间为 5 月 8—15 日,历时 8 天。首发病例出现于 5 月 8 日,12 日达流行高峰,发病人数 16 例,占病例总数的 76.19%。13 日后病例逐渐减少(5 月 13 日 1 例,14

日 1 例, 15 日 2 例), 末例病例发病于 5 月 15 日。②性别、年龄分布: 21 例中男性 15 例 (罹患率 23.81%), 女性 6 例 (罹患率为 14.29%), 男女性别比为 2.5:1。病例的年龄最小 2 月龄, 最大接近 4 岁, 其中 3 岁以下儿童发病最多 (19 例), 占发病总数的 90.48%。③居住楼层分布: 疫情主要发生在儿童楼的二层, 均为 3 岁以下儿童, 包括首发病例共有 19 例, 罹患率为 34.55%; 三层主要为 5 岁以上儿童, 其中仅有 1 名 3 岁以下儿童发病, 罹患率为 3.57%; 四层人员年龄多为 5 ~ 22 岁, 仅出现 1 名 3 岁以下儿童 (末例病例), 罹患率为 6.25%。

(4) 临床特征: 病例的主要临床特征表现为发热、手足臀部皮疹及口腔疱疹等, 其中 4 例病例诊断过程中未保留临床资料。在有临床资料的 17 例中, 有发热症状 3 例 (17.65%), 手部皮疹 12 例 (70.59%), 足部皮疹 2 例 (11.76%), 口腔疱疹 4 例 (23.53%)。

2. 实验室检测:

(1) EV71 病毒核酸检测: ①病例检测: 21 例中有 14 例 (66.67%) EV71 病毒核酸检测阳性。其中咽拭子、粪便 (肛拭子) 双份标本均为阳性的有 6 例 (42.86%); 疱疹液仅采集 1 份, 经检测为阳性。所有标本均未检测出 CA16 病毒。②密切接触者检测: 73 名婴幼儿密切接触者的咽拭子和肛拭子标本, 经检测 34 例 EV71 病毒阳性, 带病毒率 46.58%, 未发

现 CA16 病毒。其中居住二层 28 名密切接触者, 带病毒率为 64.29%; 三层和四层密切接触者带病毒率为 52.00% 和 20.00%。48 名成年工作人员均未检测出 EV71 和 CA16 病毒。③食品和环境标本检测: 14 份婴儿床护栏、4 份玩具、1 份活动房地面和 1 份门把手的表面擦拭标本及 1 份牛奶、1 份米粉标本, 均未检测出 EV71 和 CA16 病毒。

(2) EV71 病毒的分离: 挑选 EV71 核酸阳性的 10 份粪便 (肛拭子) 标本 (5 份为病例标本, 5 份为带病毒者标本), 进行 EV71 病毒分离, 共分离到 3 株肠道病毒, 其中 Jiangsu08-LYG47、Jiangsu08-LYG59 株来源于病例标本, Jiangsu08-LYG258 株来源于携带者标本, 经鉴定均为 EV71 型。

(3) EV71 病毒 VP1 基因分子分析: ①与国际代表株的同源性分析: 从 GenBank 检索到 EV71 病毒 A、B、C 各基因型国际代表株序列, 将江苏株与之进行核苷酸和氨基酸序列的同源性比较, 发现江苏 3 株病毒同 C 基因型比较接近, 核苷酸序列的同源性在 88.6% ~ 92.5% 之间, 氨基酸为 98.7% ~ 99.3%。而与 A、B 基因型代表株比较差异较大, 核苷酸同源性只在 82.3% ~ 84.3% 之间, 氨基酸为 94.6% ~ 97.3%。表明 2008 年江苏 EV71 分离株属于 C 基因型 (表 1)。②江苏、安徽病毒株的同源性分析: 江苏和安徽两省 2008 年 EV71 分离株, 核苷酸序列的同源性在 97.9% ~ 100.0% 之间, 氨基酸为 99.7% ~

表 1 江苏省 3 株 EV71 与国际代表株的同源性比较

病毒株	GenBank 和基因型 (亚型)								
	U22521 A	AB059813 B1	U22522 B2	AF376077 B3	AB059818 B4	AF009549 C1	AB059817 C2	DQ341356 C3	AF302996 C4
核苷酸序列比对 (%)									
Jiangsu08-LYG47	82.4	84.0	84.3	84.0	83.3	89.8	89.5	88.7	92.5
Jiangsu08-LYG59	82.3	83.8	84.2	84.1	83.4	89.7	89.3	88.6	92.4
Jiangsu08-LYG258	82.4	84.0	84.3	84.0	83.3	89.8	89.5	88.7	92.5
氨基酸序列同源性 (%)									
Jiangsu08-LYG47	94.6	96.6	97.3	97.0	97.0	99.0	99.3	99.0	97.3
Jiangsu08-LYG59	94.9	96.3	97.0	96.6	96.6	98.7	99.0	98.7	97.0
Jiangsu08-LYG258	94.6	96.6	97.3	97.0	97.0	99.0	99.3	99.0	97.3

表 2 江苏、安徽省 EV71 分离株同源性比较 (%)

病毒株	Anhui08-FY1	Anhui08-FY2	Anhui08-FY3	Jiangsu08-LYG47	Jiangsu08-LYG59	Jiangsu08-LYG258
Anhui08-FY1		100.0	99.7	99.7	99.7	100.0
Anhui08-FY2	99.4		99.7	99.7	99.7	100.0
Anhui08-FY3	99.9	99.6		100.0	100.0	100.0
Jiangsu08-LYG47*	98.1	98.2	98.0		100.0	100.0
Jiangsu08-LYG59*	98.0	98.1	97.9	99.9		100.0
Jiangsu08-LYG258*	98.1	98.2	98.0	100.0	99.9	

注: 黑体数据为核苷酸序列比对百分率 (%), 其他为氨基酸序列同源性百分率 (%); *带病毒者来源的 EV71 分离株, †病例来源的 EV71 分离株

100.0%，可见两省的 EV71 病毒高度同源。比较不同来源的江苏分离株发现，病例来源和携带者来源的 VP1 基因核苷酸同源性在 99.9% ~ 100.0%，而其 VP1 蛋白氨基酸序列完全相同（表 2）。③系统发生树分析：从 GenBank 中检索到 41 株 EV71 病毒（含代表株），用其 VP1 基因序列构建系统发生树。从图 1 可以发现，江苏和安徽、上海、深圳、浙江分离株相同，均为 C4 基因型。从进化分支来看，江苏和安徽阜阳 08 株最为接近，位于同一分支上，为 C4.3 基因亚群。

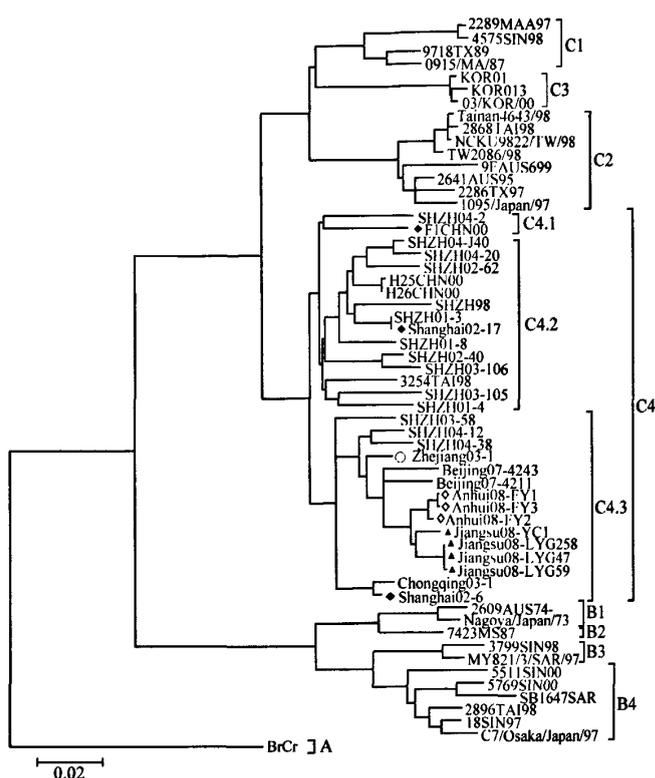
二、随访调查

1. EV71 检测情况：在首起疫情发生后的第 1 周内，临床病例和病毒携带者在咽部和粪便中均能检出 EV71 病毒，且检出率最高（表 3）。其中临床病例在咽部和通过粪便排病毒时间最长可达 8 周，而病毒携带者最长可达 10 周。

2. CA16 病毒引起的第二次暴发疫情：2008 年 7 月 6—9 日，该福利院又新增 6 例 HFMD 病例，实验室检测均为 CA16 病毒感染，标本中未发现 EV71 病毒，确认为第二起 HFMD 暴发。6 例中有 3 例在第一次暴发疫情中曾感染过 EV71 病毒。临床病例和病毒携带者的排病毒期多分布在第 2 周内，粪便为主要的排病毒途径（表 4）。

3. EV71 和 CA16 病毒感染的潜伏期排病毒情况：两起暴发疫情均发现病例在潜伏期排病毒现象，其中 3 例 EV71 病毒感染病例在发病前 1~3 天均能够在咽部和粪便中检测出病毒，而 3 例 CA16 病毒感染病例在发病前 2~3 天可在粪便中检测出病毒。

4. EV71 和 CA16 病毒的同时感染（或携带）情况：本研究发现机体可同时感染（或携带）两种病毒



注：江苏 2008 株：LYG59 为临床病例来源的毒株，LYG47、LYG258 为带病毒者来源的毒株

图 1 基于 EV71 的 VP1 基因核苷酸全长序列 (891 bp) 所做的系统发生树

的现象，随访的 14 例 EV71 感染病例，有 4 例在发病后第 8 周又发现 CA16 病毒感染；14 例 EV71 病毒携带者中有 3 例在疫情发生后的第 8、10 周又携带了 CA16 病毒。此多发于粪便标本。

讨 论

HFMD 为全球性传染病，日常接触、呼吸道或粪-口途径均可传播，造成散发或局部流行。我国自 1981 年在上海地区首次报道以来，已在许多省市相继流行^[5,6]，2008 年 3—5 月安徽省阜阳地区 HFMD 的流行，造成近 5000 人发病，22 病例死亡^[7]。本次报告由 EV71 病毒引起的该福利院首起暴发疫情，

表 3 EV71 病毒感染的临床病例和病毒携带者排病毒周期分布

分 组		时 间 (周)									
		1	3	4	5	6	7	8	9	10	11
临床病例	咽部	9/14	6/14	0/14	0/14	5/14	1/14	4/14	0/14	0/14	0/14
	粪便	10/14	4/14	1/14	2/14	4/14	3/14	8/14	0/14	0/14	0/14
病毒携带者	咽部	9/14	1/14	0/14	0/14	4/14	0/14	1/14	0/14	1/14	0/14
	粪便	13/14	2/14	0/14	2/14	0/14	2/14	3/14	0/14	1/14	0/14

注：表中数据分母表示检测例数，分子表示检测阳性例数；第 2 周没有采集标本

表4 CA16病毒引起的第二次暴发疫情中临床病例和病毒携带者的排病毒周期分布

分 组		时 间 (周)				
		1	2	3	4	5
临床病例	咽部	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	粪便	6/6	5/5*	0/6	0/6	0/6
病毒携带者	咽部	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	粪便	6/6	4/6	0/6	1/6	0/6

注:同表3; *有1例在发病的第2周内未采集样本

同安徽省阜阳地区疫情分离病毒株相同,均为EV71病毒的C4基因亚型;在首起疫情结束后的随访期间,该福利院又发生由CA16病毒引起的第二起暴发疫情。

对EV71病毒暴发疫情的流行病学调查发现,90%病例均为3岁以下婴幼儿,保育员在哺喂婴幼儿时均存在共用餐(饮)具现象,分析认为可能是造成本次疫情的原因。密切接触者EV71病毒携带情况调查表明,成年密切接触者中均未发现EV71病毒,而婴幼儿带病毒率高达46.58%;由此推断婴幼儿携带病毒传播是造成本次疫情发生的传播模式。对患儿EV71病毒检测发现,临床病例和病毒携带者均可在疫情第1周内通过咽部和粪便排病毒,临床病例排病毒时间最长可达8周,病毒携带者可达10周,是否与该类婴幼儿免疫状况有关还有待探讨。随访研究的第2个月,在同楼层、同人群中又发生了CA16病毒感染的第二起暴发疫情,有一半病例曾感染过EV71病毒,显示不同病原体引起的HFMD之间没有交叉保护作用。本次研究也发现了两次疫情均存在患儿潜伏期排病毒的现象,CA16病毒暴发疫情中累及多达一半病例,与参考文献[8]报道相同。本次研究也发现EV71和CA16病毒有同时感染或携带现象。

VP1基因是EV71病毒研究的热点,Brown等^[9]依据该基因将病毒分成A、B、C三个基因型,我国崔爱利等^[10]于2004年发现了C4亚型,且我国大陆分离株多为C4亚型。本研究发现江苏省3株EV71分离株为基因C型,核苷酸序列同国际代表株的同源性在88.6%~92.5%之间,氨基酸同源性在98.7%~99.3%之间;系统发生树研究进一步表明,江苏分离株与1998—2003年上海、浙江等大陆分离株均位于

C4分支,同属C4基因亚型。研究也发现江苏和安徽两省EV71病毒VP1基因高度同源,核苷酸序列的同源性在97.9%~100.0%之间,氨基酸为99.7%~100.0%,系统发生树分析显示位于同一分支,为C4.3基因亚群,从而提示2008年EV71病毒在安徽和江苏两地有较为密切传播关系。对江苏省内不同来源的EV71分离株研究发现,感染病例和健康携带者来源的VP1基因特征几乎相同,这表明EV71病毒致病及毒力特征有可能与其他基因相关,有必要开展病毒全基因分析。

(感谢连云港市疾病预防控制中心对本次调查的支持)

参 考 文 献

- [1] 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. *Virus Res*, 1999, 61(1):1-9.
- [2] 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(2):236-242.
- [3] Li CC, Yang MY, Chen RF, et al. Clinical manifestations and laboratory assessment in an enterovirus 71 outbreak in southern Taiwan. *Scand J Infect Dis*, 2002, 34(2):104-109.
- [4] Wang JR, Tuan YC, Tsai HP, et al. Change of major genotype of enterovirus 71 in outbreaks of hand-foot-and-mouth disease in Taiwan between 1998 and 2000. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(1):10-15.
- [5] 何雅青, 杨帆, 李良成, 等. 我国深圳地区手足口病患者肠道病毒71型的分离与鉴定. *中华实验与临床病毒学杂志*, 1999, 13(1):83-84.
- [6] 张爱香, 李燕婷, 张家琪, 等. 一起由肠道病毒71型引起手足口病暴发的调查. *上海预防医学杂志*, 2001, 13(12):587-588.
- [7] http://www.ah.xinhuanet.com/news/2008-05/07/content_13187526.htm.
- [8] 何家鑫, 沈晓娜. 手足口病流行特点及其防治. *海峡预防医学杂志*, 2001, 7(3):22-24.
- [9] 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.
- [10] 崔爱利, 许文波, 李秀珠, 等. 肠道病毒71型的RT-PCR诊断及基因特征. *病毒学报*, 2004, 20(2):160-165.

(收稿日期:2008-10-29)

(本文编辑:张林东)