

· 现场流行病学调查热点报告 ·

柯萨奇 A6 型手足口病耦合脊髓灰质炎疫苗衍生株感染一例调查

陈纯 谢华萍 崔敏 甄若楠 张颖 倪莉红 黄影怡 耿进妹
卢惠溪 狄飏 王鸣

【摘要】 目的 调查广州市 1 例柯萨奇 A6 型(CA6)手足口病合并脊髓灰质炎病毒(PV)Ⅱ型疫苗衍生株(VDPVⅡ)感染病例,明确其感染病原及特征。方法 通过现场调查获取病例相关流行病学资料,收集病例标本及其密切接触者粪便标本共 16 份进行肠道病毒(EV)分离鉴定。对病例就诊医院当月收集手足口病病例标本共 21 份,采用实时荧光 RT-PCR 检测手足口病相关病原,并用 RT-PCR 方法检测 PV, CA6 及 PV 阳性标本用 RT-PCR 方法扩增其 VP1 区基因片段进一步测序分析。结果 该病例临床仅表现为手足口病症状,无急性弛缓性麻痹(AFP)。16 份病例及其密切接触者粪便标本均未检出 EV,入户主动搜索调查未发现类似病例。在该病例当月就诊医院收集的手足口病病例标本中, EV71 阳性 4 例, CA16 阳性 2 例,包括该病例在内的其余 15 例均为 CA6 阳性,但仅该病例同时检出 VDPVⅡ。对包括该病例在内的 9 例 CA6 阳性标本的 VP1 区扩增测序并进行同源性分析, 9 株病毒核苷酸同源性为 98.9%~100.0%, 推导的氨基酸同源性为 96.0%~100.0%。遗传进化分析显示该 9 株属于同一分支。对该病例 VDPV 株 VP1 区扩增测序分析,与 SabinⅡ相比,有包括 U2909A 在内的 6 个位点发生突变,其中 2 个位点发生氨基酸突变。遗传进化分析显示,该病例 VDPV 分离株不同于以往发现的 VDPV。结论 该病例为 CA6 手足口病合并 VDPVⅡ感染,其手足口病症状由 CA6 感染引起,推测该病例无 AFP 症状可能是接种脊髓灰质炎疫苗所致。分离的 VDPV 为当地新发现毒株,但未造成 VDPV 循环。

【关键词】 手足口病;柯萨奇 A6 型;疫苗衍生株脊髓灰质炎病毒

An investigation on a case of hand-foot-mouth disease caused by coxsackie-virus A6 associated with a vaccine-derived poliovirus co-infection Chen Chun¹, Xie Huaping¹, Cui Min¹, Zhen Ruonan^{1,2}, Zhang Ying¹, Ni Lihong¹, Huang Yingyi³, Geng Jinmei¹, Lu Huixi³, Di Biao¹, Wang Ming¹. 1 Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440, China; 2 School of Public Health, Sun Yat-Sen University; 3 Huadu District Centers for Disease Control and Prevention, Guangzhou

Corresponding author: Xie Huaping, Email: paopaobox@163.com
This work was supported by grants from the Major Special Project of China's "Twelfth Five-Year Plan" for Science and Technology Development (No. 2012ZX10004213-005) and the Medical Science and Technology Research Projects of Guangzhou Municipality (No. 20131A011117, No. 20131A010022 and No. 20131A011110).

【Abstract】 **Objective** To identify the pathogen and characteristics on a case of hand-foot-mouth disease (HFMD) caused by coxsackie-virus A6 (CA6) associated with vaccine-derived poliovirus (VDPV) co-infection. **Methods** Field epidemiological study at the epidemic area was conducted and 16 stool samples including from the patient and close contacts were collected for isolation and identification of the enterovirus (EV). 21 stool samples from patients diagnosed as HFMD were collected in the same hospital at the same month to detect CA16, EV71, CA6 and PV by real-time RT-PCR or RT-PCR. The VP1 gene of the CA6 was amplified by RT-PCR and PCR products were sequenced and analyzed. **Results** The patient showed only HFMD symptoms, but no

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.01.015

基金项目: 国家“十二五”科技重大专项(2012ZX10004213-005); 广州市医药卫生科技项目(20131A011117, 20131A010022, 20131A011110)
作者单位: 510440 广州市疾病预防控制中心(陈纯、谢华萍、崔敏、甄若楠、张颖、倪莉红、耿进妹、狄飏、王鸣); 中山大学公共卫生学院(甄若楠); 广州市花都区疾病预防控制中心(黄影怡、卢惠溪)

陈纯、谢华萍、崔敏、甄若楠同为第一作者

通信作者: 谢华萍, Email: paopaobox@163.com

symptoms related to acute flaccid paralysis (AFP). No EVs were isolated from 16 samples collected from the patient and close contacts. And no AFP cases were found by an active search. A total of 21 samples from patients diagnosed as HFMD were collected in the same hospital at the same month and 4 were found to be EV71, 2 were CA16 and 15 (include the patient) were CA6. Only this patient was found to have had VDPV II infection. The CA6 VP1 gene was amplified from the HFMD patient and 9 other cases from the same hospital at the same month. Nucleotide sequences of the VP1 gene among the 9 strains shared 98.9%–100.0% in homology and 96.0%–100.0% in the deduced amino acid sequences. Phylogenetic analysis of the VP1 sequences categorized the 9 strains into the same branch. There were 6 nucleotides changes including U2909A between the VP1 region of the VDPV strain of the case and Sabin II. Results from phylogenetic analysis on the VP1 sequences indicated that the VDPV strain of the case was different from other VDPVs strains isolated in the world. **Conclusion** This case was a HFMD which caused by CA6 co-infection with VDPV II and the VDPV was newly discovered. HFMD symptoms of the case were caused by CA6. The reason why this case did not have AFP symptoms was probably due the protective effect of IPV vaccine. No AFP cases were found by the active search for AFP cases conducted in the area, which indicated that VDPV did not cause virus circulation in this area.

【Key words】 Hand-foot-mouth disease; Coxsackievirus A6; Vaccine-derived poliovirus

2013年8月中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所国家脊髓灰质炎实验室(国家脊灰实验室)在广州市花都区1例手足口病(HFMD)病例粪便标本(编号:GZ6685/GD/CHN/2013)中分离出脊髓灰质炎(脊灰)病毒(PV),经核苷酸序列测定和分析,为PV II型,与II型病毒疫苗株(Sabin)相比,有6个核苷酸差异,差异率为0.67%。依据WHO定义此株病毒属于II型疫苗衍生脊灰病毒(VDPV II)。该病例曾在2013年4月因发热、口腔疱疹及足部皮疹,并由广州市疾病预防控制中心在粪便标本中检测柯萨奇病毒A组6型(CA6)阳性,诊断为手足口病。为进一步明确该病例的病原及特征,本研究进行调查分析。

资料与方法

1. 资料来源:现场调查病例住所、就诊医疗机构及免疫接种情况,并检验病例粪便标本。通过“中国疾病预防控制中心信息系统——传染病报告信息管理”、“广州市免疫规划信息管理系统”获取手足口病报告及脊灰疫苗接种相关资料。

2. 调查方法:现场调查了解病例基本情况、免疫史、接触史、居住环境及手足口病发病等情况;统计近3年花都区手足口病报告病例数,同时分析该病例发病当月该区病原学监测情况;调查近3年花都区急性弛缓性麻痹(AFP)监测及脊灰疫苗接种情况,并进行AFP病例入户主动搜索和疫苗接种率快速评估。

3. 实验室检测:PV分离鉴定由国家脊灰实验室完成,手足口病病毒及PV核酸相关检测由广州市疾病预防控制中心完成。

(1)粪便标本处理及病毒核酸提取:方法参见文献[1]。

(2)实时荧光RT-PCR检测:方法见文献[1]。对于EV-U阳性、EV71且CA16核酸阴性的样本,进一步使用易瑞生物科技有限公司的CA6荧光PCR试剂盒检测,按说明书操作及判断结果。

(3)病毒VP1区RT-PCR扩增:VP1编码区基因序列RT-PCR扩增采用Invitrogen SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq试剂盒,反应液配置均按说明书。为获得CA6的VP1区序列,采用自行设计的引物CA6VP1-F1(上游引物,5'-CGC TGA CAC CAC GAT AT-3', nt2485~2501, AY421764)和CA6VP1-R(下游引物,5'-CTA CTC TGA AGT TAC CCA CAT-3', nt3387~3407, AY421764),引物CA6VP1-F1及CA6VP1-R的工作浓度为10 pmol,加入5 μl RNA模板。反应条件为50℃ 30 min, 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 42℃ 30 s, 72℃ 50 s, 35个循环, 72℃ 10 min。为获得PV的VP1区全长序列,采用引物UG1(上游引物,5'-TTT GTG TCA GCG TGT AAT GA-3', nt2404~2423, AY184220) UC11(下游引物,5'-AAG AGG TCT CTA TTC CAC AT-3', nt3484~3503, AY184220),具体方法见文献[2]。

(4)基因序列测定和分析:测序由上海英潍捷基公司完成。将双向测序结果采用DNASTar软件中的Seqman(Windows 32 SeqMan 5.00)程序进行拼接组装成完整的基因序列。核苷酸序列及其推导的氨基酸序列分析用DNASTar软件中的MegAlign软件,进化树构建使用Mega 5.0软件,采用Kimura双校正模型,和邻接法(Neighbor-joining, NJ),采用1000

bootstrap 值评估其可靠性。

结 果

1. 病例特征:该病例女性,2011年8月出生,为孕38周顺产,出生体重2.9 kg,非母乳喂养。病例发病前无医疗机构接触史,亦无手足口病及脊灰相关病例接触史,出生后至发病前未离开其出生地(花都区)。2013年4月4日该病例因“发热、抽搐1次”收入花都区妇幼保健院,代诉当天无明显诱因出现发热(39.1℃),并伴呕吐、抽搐。入院检查体温38.7℃,呼吸25次/分,脉搏110次/分,口唇红,咽充血明显,双扁桃体I度肿大,口腔可见散在疱疹,双肺呼吸音粗,未闻及明显干湿性罗音,四肢肌力、肌张力正常,神经系统检查未见阳性体征。入院次日,该病例双足可见少许红色斑疹,诊断为“手足口病及热性惊厥”,同时进行手足口病网络直报,并采集粪便标本。1周后病情好转出院。该病例出生后已按照免疫程序接种1剂次的卡介苗、流行性乙型脑炎疫苗、甲型肝炎疫苗、水痘疫苗和轮状病毒减毒活疫苗,2剂次含麻疹成分疫苗和流行性脑脊髓膜炎A疫苗,3剂次乙型肝炎疫苗和4剂次吸附无细胞百白破、灭活脊灰和b型流感嗜血杆菌联合疫苗(DTaP-IPV-Hib五联疫苗)。其中后者接种时间分别是2011年10月10日、11月11日、12月13日和2013年3月25日,疫苗生产厂家均为赛诺菲巴斯德公司。

2. 监测:

(1)手足口病:花都区2011年报告4635例,其中死亡和重症病例各1例,发病率和病死率分别为490.55/10万和0.11/10万;2012年报告6572例,其中死亡病例2例,重症病例1例,发病率和病死率分别为694.97/10万和0.21/10万;2013年1—6月报告3284例,无重症、死亡病例报告。花都区妇幼保健院作为广州市手足口病监测哨点医院,2013年4月将包括该病例粪便标本(GZ6685/GD/CHN/2013)在内的21例普通手足口病病例粪便标本(GZ6671~6691/GD/CHN/2013)送往广州市疾病预防控制中心检测。

(2)AFP:2011、2012年花都区15岁以下儿童非脊灰AFP报告发病率分别为2.69/10万、2.63/10万,报告后48 h调查率、合格便采集率、便标本7 d内送达率、随访表75 d送省级疾病预防控制中心率均为100%;近3年无高危AFP病例。对花都区妇幼保健院、花都区人民医院2012年1月至2013年7月所有住院、门诊病例进行AFP病例主动搜索均未发现漏报。2011—2013年花都区共开展4次2月龄至3周

岁儿童脊灰疫苗补充免疫(查漏补种),接种率分别为98.29%、98.58%、98.15%和98.00%。调查本病例居住地(花都区新华街横潭村和狮岭镇振兴村)58名0~4岁儿童疫苗接种情况,脊灰疫苗接种率为98.3%。

3. 实验室检测:

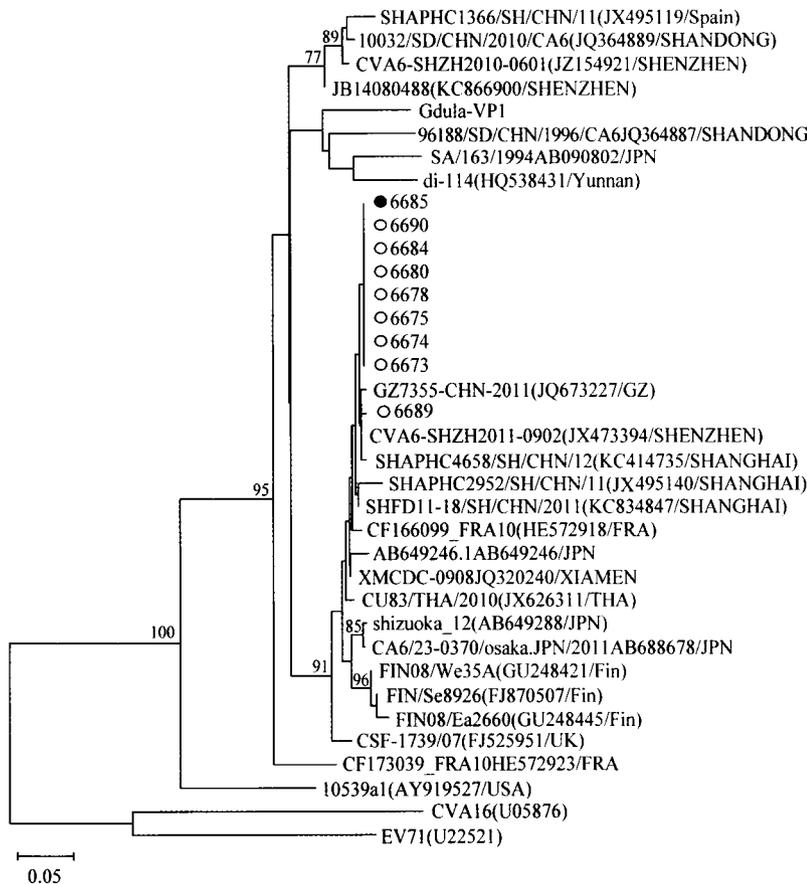
(1)病毒分离:病例粪便标本(GZ6685/GD/CHN/2013)经国家脊灰实验室分离出PV,经核苷酸序列分析确定为PV II型。现场调查时采集的16份(包括该病例及15名密切接触者)粪便标本未检出其他肠道病毒。

(2)EV型别鉴定:花都区妇幼保健院4月采集的21份普通手足口病病例标本经荧光RT-PCR检测均为EV阳性,其中EV71阳性4例,CA16阳性2例,非EV71、非CA16的其他肠道病毒阳性15例,该15例进一步采用CA6荧光PCR检测试剂盒检测,均为CA6阳性。广州市疾病预防控制中心对该21例普通手足口病病例标本采用PV VP1区特异性引物进行扩增,仅病例粪便标本(GZ6685/GD/CHN/2013)扩增出约1.1 kb的目的条带,测序结果经在线BLAST比对,确定为II型PV。因此判定该病例为CA6和PV双重感染。

(3)CA6 VP1区核苷酸和氨基酸序列同源性分析:采用针对CA6 VP1特异性引物对9份(含双重感染病例)其他肠道病毒阳性粪便标本的核酸进行扩增并测序,将双向测序结果进行拼接,并运用Mega 5.05软件进行核苷酸及氨基酸的同源性分析,双重感染病例标本(GZ6685/GD/CHN/2013)与同时期花都区妇幼保健院采集的症状相同的其他CA6株(6673、6674、6675、6678、6680、6684、6689、6690)同源性很高,核苷酸同源性为98.9%~100.0%,推导氨基酸同源性为96.0%~100.0%。

(4)基于CA6 VP1区的遗传进化分析:利用Mega 5.05软件中的NJ方法分析9株CA6广州分离株和GenBank中的25株CA6的遗传进化,并将EV71和CA16原型株作为组外对照(图1)。结果显示,花都区妇幼保健院4月采集的包括双重感染病例株(GZ6685/GD/CHN/2013)在内的9株CA6株均位于同一进化分支上,亲缘性较高。

(5)双重感染病例VDPV II株的VP1区基因序列分析:与Sabin II相比,从双重感染病例分离的VDPV II株(GZ6685/GD/CHN/2013)在VP1编码区有6个位点发生突变(表1),其中2个位点发生氨基酸突变,为U2909A(颠换)和U3142G(颠换),导致



注：○同批病例 ●双重感染病例株

图 1 CA6 基于部分 VP1 区核苷酸序列的种系进化分析

第 143 位和第 221 位编码氨基酸的改变。U2909A (Ile-Asn)、U3142G (Ala-Ser) 均由极性氨基酸取代了非极性氨基酸, 发生了不同性质氨基酸的替换。

表 1 双重感染病例 VDPV II 株 (GZ6685) VP1 核苷酸变异

病毒株	核苷酸位置变异					
	2608	2652	2909	3142	3348	3349
Sabin II	G	U	U	G	G	A
GZ6685	A	C	A	U	A	G

(6) 双重感染病例 VDPV II 株 VP1 区基因进化树分析: 为更好说明 VDPV II 株 (GZ6685/GD/CHN/2013) 与国内外发现的 II 型 VDPV 之间的基因进化关系, 对双重感染病例 VDPV II 株、中国 1997—2011 年分离的 6 株 II 型 VDPV、全球部分 II 型 VDPV 及 Sabin II 株的 VP1 编码区基因构建亲缘关系进化树 (图 2)。分析显示, VDPV II 株 (GZ6685/GD/CHN/2013) 与 2011 年云南玉溪分离的 VDPV 株基因进化距离较近, 位于同一分支上。

讨 论

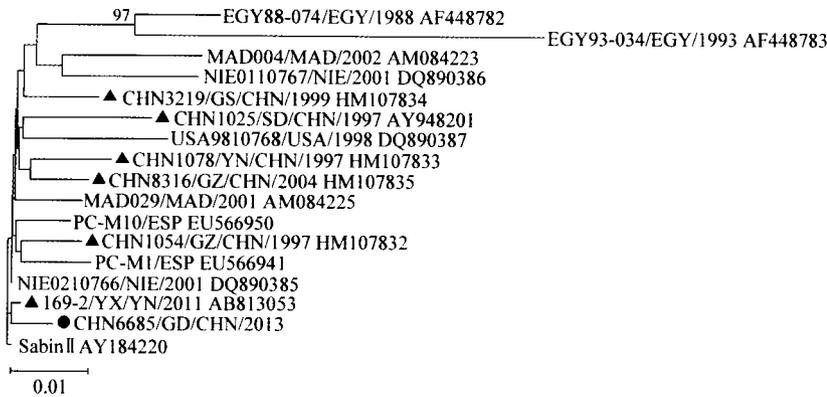
本例手足口病患儿为 VDPV II 和 CA6 双重感

染, 临床表现出 CA6 感染引起的手足口病症状 (急性起病、高热、口腔疱疹、足部皮疹等), 但未出现由 VDPV 感染引起的脊灰相关症状和体征。此前从 AFP 病例和免疫缺陷儿童标本中分离出 VDPV 较为常见^[2-4], 在健康儿童标本分离到 VDPV 也偶有报道^[5], 但尚未见手足口病例中检出 VDPV 的报道。

检测该病例就诊的花都区妇幼保健院当月采集的 21 份手足口病例粪便标本, EV71 阳性 4 份, CA16 阳性 2 份, 其余 15 份均为 CA6 阳性。对包括该病例在内的 9 株 CA6 进行 VP1 编码区序列分析, 核苷酸序列同源性为 98.9% ~ 100.0%, 由核苷酸序列推导的氨基酸序列同源性为 96.0% ~ 100.0%, 同源性较高。对 CA6 病毒株的 VP1 编码区构建亲缘关系进化树分析表明, 病例株 (GZ6685/GD/CHN/2013) 与当月流行的其他 CA6 株均处于同一分支, 证明与同期其他大多数手足口病病例一样, 该病例的手足口病症状是由 CA6 引起。

在该病例手足口病发病期间采集的粪便标本中, 除 CA6 外, 还检出 VDPV II, 但神经系统检查均未见异常, 说明该病例为 VDPV 感染, 但未发生 AFP。该病例于第 2、3、4 和 18 月龄按时全程接种 DTaP-IPV-Hib 五联疫苗, 临床上该病例未发生 AFP 症状和体征可认为是接种 IPV 疫苗起到保护作用, 因此为 CA6 感染引起的手足口病耦合 VDPV 感染。

PV 基因组 RNA 分子的每个核苷酸均可能发生突变, 其中有些位点的突变率较高, 成为突变热点^[6], 而突变热点的碱基改变可能导致编码氨基酸的变化产生不同性质的蛋白质, 影响 PV 的生物学特性。张勇等^[3]研究表明, PV 的突变热点与神经毒力决定位点有一定关系, 如 VDPV II 的 nt2909, 既是突变热点又是神经毒力决定位点。本文病例株 (GZ6685/GD/CHN/2013) 亦在此突变热点上发生了 U2909A (颠换), 导致第 143 位编码氨基酸的改变, U2909A (Ile-Asn), 由极性氨基酸取代了非极性氨基酸, 发生不同性质氨基酸的替换。该位点氨基酸位于病毒颗粒的外表面, 靠近 VP1 区 β 折叠的 DE 环, 与受体介导的病毒感染有关^[7]。但神经毒力位点不



注:●VDPV II株(GZ6685/GD/CHN/2013);▲1997—2011年中国分离的6株VDPV II

图2 VDPV II株(GZ6685/GD/CHN/2013)与国内外其他II型VDPV株VP1区同源进化树

是影响患儿预后的唯一因素,还可能受患儿自身条件等因素影响。本次对VDPV II的VP1编码区基因构建亲缘关系进化树分析提示,与既往我国及其他国家分离到的VDPV II有较大差异,虽与2011年云南玉溪分离株基因进化距离较近,位于同一分支上,但病毒不完全同源,可能为新发现的VDPV。

本研究连续采集该病例及其密切接触者粪便标本,未发现VDPV,亦未发现其他肠道病毒;经病例主动搜索,患儿居住地周围也未发现类似病例;现场OPV接种率快速评估,当地OPV接种率>95%,说明当地脊灰免疫水平能够限制VDPV的进一步传播,未形成VDPV循环。由于存在PV隐性感染,该病例感染的最初来源难以探究,但由于我国多年来常规使用OPV,推测当地可能存在VDPV感染人员。PV在感染者的粪便中会持续排毒数周,这意味着PV在人群中传播并产生临床症状之前,有可能在生活污水中检出PV野毒株或VDPV^[8-10],提示应加强环境VDPV监测预警。

(感谢广东省疾病预防控制中心微生物检验所郑焕英、曾汉日、郭雪给予的帮助)

参 考 文 献

[1] Xie HP, Geng JM, Zhang Y, et al. Genotyping analysis of enterovirus 71 isolated from severe and mild cases of hand-foot-mouth disease in Guangzhou, China [J]. Chin J Viral Dis, 2013, 3(2):96-101. (in Chinese)
谢华萍,耿进妹,张颖,等.广州市2011年肠道病毒71型VP1基因特征分析[J].中国病毒病杂志,2013,3(2):96-101.

[2] Jiang HF, Yan DM, Zhu SL, et al. Analysis of genetic characteristic of type II non-wild poliovirus in Mainland China, 2010 [J]. Chin J Virol, 2012, 28(2):130-135. (in Chinese)
蒋华芳,严冬梅,祝双利,等.中国大陆2010年非野毒II型脊髓灰质炎病毒基因特征分析[J].病毒学报,2012,28(2):130-135.

[3] Zhang Y, Yan DM, Wang DY, et al. The genetic characterization of type II immunodeficient vaccine-derived polioviruses firstly isolated in China [J]. Chin J Virol, 2007, 23(3):188-194. (in Chinese)
张勇,严冬梅,王东艳,等.我国首例iVDPV病例II型脊髓灰质炎病毒分离株的基因特征[J].病毒学报,2007,23(3):188-194.

[4] Zhang L, Yang YL, Luo SP, et al. Epidemiology investigation on vaccine-derived poliovirus discharged from the first primary immunodeficiency in Guizhou province [J]. Chin J Vaccine Immunol, 2013, 19(1):20-23. (in Chinese)

张丽,杨云亮,罗素萍,等.贵州省首例原发性免疫缺陷病患者排出疫苗衍生脊髓灰质炎病毒的流行病学调查分析[J].中国疫苗和免疫,2013,19(1):20-23.

[5] Liu X, He JX, Lu L. Epidemiology investigation and treatment on a health child case with vaccine-derived poliovirus type II [J]. Chin J Vaccine Immunol, 2011, 17(5):471. (in Chinese)
刘骁,何景雄,陆璐.一例健康儿童检出II型疫苗衍生脊髓灰质炎病毒的流行病学调查和处理[J].中国疫苗和免疫,2011,17(5):471.

[6] Zhang Y, Zhu SL, Zhao R, et al. Analyses of hot spots of mutation in VP1 region of vaccine related polioviruses in China [J]. Chin J Vaccine Immunol, 2006, 12(6):440-444. (in Chinese)
张勇,祝双利,赵蓉,等.中国脊髓灰质炎疫苗株病毒VP1区基因突变热点分析[J].中国计划免疫,2006,12(6):440-444.

[7] Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution [J]. Science, 1985, 229(4720):1358-1365.

[8] Roivainen M, Blomqvist S, Al-Hello H, et al. Highly divergent neurovirulent vaccine-derived polioviruses of all three serotypes are recurrently detected in Finnish sewage [J]. Euro Surveill, 2010, 15(19):65.

[9] Manor Y, Handsher R, Halmut T, et al. Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian Authority [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37:1670-1675.

[10] Blomqvist S, Savolainen C, Laine P, et al. Characterization of a highly evolved vaccine-derived poliovirus type 3 isolated from sewage in Estonia [J]. J Virol, 2004, 78(9):4876-4883.

(收稿日期:2013-11-06)

(本文编辑:张林东)