

河南省2014年手足口病重症病例病原学分析

李幸乐 李懿 张白帆 隋美丽 潘静静 陈志娟 程宁宁 杜燕华 卫海燕
许汴利 黄学勇

450016 郑州, 河南省疾病预防控制中心传染病预防控制所(李幸乐、李懿、张白帆、潘静静、杜燕华、卫海燕、许汴利、黄学勇); 450052 郑州大学公共卫生学院(隋美丽、陈志娟、程宁宁)

通信作者: 黄学勇, Email: huangxyzzu@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.04.026

【摘要】 目的 分析2014年河南省手足口病(HFMD)重症病例病原学特征。**方法** 整群抽取郑州市某儿童医院2014年4—6月244例HFMD住院病例作为研究对象,采集粪便标本,病原学检测采用荧光定量RT-PCR、病毒分离、VP1测序比对等方法。病原学特征统计分析采用SPSS 17.0软件。**结果** 244例手足口病病例中,重症组109例,轻症组135例,肠道病毒(EV)通用引物RT-PCR阳性229例,阳性率为93.85%。肠道病毒71型(EV71)、柯萨奇病毒A组16型(Cox A16)和Cox A10的感染构成比分别为83.84%、5.68%和8.30%。EV71感染致8例心肺功能衰竭,2例死亡;Cox A10感染致1例心肺功能衰竭、死亡。重症组与轻症组之间肠道病毒感染率差异有统计学意义($\chi^2=5.312, P=0.021$)。采用Fisher精确概率法对重症组和轻症组EV71、Cox A16和其他EV感染构成比进行统计学比较, $P=0.048$ 。EV71和Cox A10感染致心肺功能衰竭发生率和致死率的差异无统计学意义(分别为 $\chi^2=0.051, P=0.821$ 和 $\chi^2=2.198, P=0.138$)。2014年河南省Cox A10分离株属于基因6型,VP1区段核苷酸和氨基酸同源性分别为94.3%~99.7%和96.3%~100.0%。**结论** EV71仍然是河南省HFMD的主要病原。Cox A10在感染病原谱中所占比加大,且感染后可致心肺功能衰竭,应加强对其他EV的监测。

【关键词】 手足口病; 重症病例; 肠道病毒71型; 柯萨奇病毒A组16型

Etiology study on severe cases caused by hand-foot-mouth disease in children from Henan province, 2014 Li Xingle, Li Yi, Zhang Baifan, Sui Meili, Pan Jingjing, Chen Zhijuan, Cheng Ningning, Du Yanhua, Wei Haiyan, Xu Bianli, Huang Xueyong

Institute of Infectious Disease Prevention and Control, Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China (Li XL, Li Y, Zhang BF, Pan JJ, Du YH, Wei HY, Xu BL, Huang XY); College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Sui ML, Chen ZJ, Cheng NN)

Corresponding author: Huang Xueyong, Email: huangxyzzu@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the etiology of severe hand-foot-mouth disease (HFMD) in children in Henan province. **Methods** A total of 244 HFMD cases admitted to a hospital in Zhengzhou from April to June of 2014 were recruited for research sampling, Real-time RT-PCR, virus isolation, VP1 sequencing and alignment methods were used to test the enterovirus-related etiology. SPSS 17.0 was used in performing statistical analysis. **Results** There were 109 severe and 135 mild cases among all the 244 HFMD cases. The number of enterovirus positive stool samples was 229, with positive rate as 93.85%. EV71, Cox A16 and Cox A10 made up 83.84%, 5.68% and 8.30% of the enterovirus etiologicity, strains, respectively. EV71 infection caused 8 HFMD cases with heart-lung failure and 2 death, Cox A10 infection led to 1 HFMD case with heart-lung failure and death. There were statistically differences seen regarding the enterovirus infection rates between severe and the mild HFMD cases ($\chi^2=5.312, P=0.021$). Statistically significant difference was seen in the constituent ratio of EV71, Cox A16 and the others by Fisher's exact test ($P=0.048$). There was statistically significant difference seen between the cardiorespiratory failure rate and the fatality rate by EV71 and

Cox A10 infection ($\chi^2=0.051, P=0.821; \chi^2=2.198, P=0.138$). Cox A10 strains identified in Henan in 2014 belonged to genotype 6. The rates on homology of nucleotide and amino acid among the Cox A10 strains in Henan in 2014 were 94.3%–99.7% and 96.3%–100.0% respectively. **Conclusions** EV71 still remained the most common pathogen that causing severe HFMD in children, with the increasing Cox A10 percentage in the pathogens spectrum of HFMD infection. Cox A10 strains in Henan in 2014 belonged to genotype 6. Genotype 6 Cox A10 had appeared and widely distributed in Henan for long time, but not yet variated or reconstructed. Cox A10 infection could lead to cardio-respiratory failure thus called for the monitoring program on non-EV71 and non-Cox A16 enterovirus, especially Cox A10 to be strenthened.

【Key words】 Hand-foot-mouth disease; Severe case; Enterovirus 71; Coxsackievirus A16

手足口病(HFMD)是以肠道病毒(EV)71型(EV71)、柯萨奇病毒A组16型(Cox A16)为主的多种肠道病毒引起的全球性常见传染病。自2008年以来在我国内陆地区呈现不同程度的流行态势,近年研究显示HFMD的病原谱结构已然改变,柯萨奇病毒A组6型(Cox A6)和A组10型(Cox A10)感染导致的HFMD在某些地区呈现上升趋势^[1-4]。河南省是我国HFMD影响最为严重的省份之一。为准确掌握河南省HFMD病原谱结构与HFMD间的关系,开展本此研究,结果报告如下。

材料与方法

1. 样本采集:以郑州市某儿童医院作为监测点,采集2014年4—6月诊断为HFMD病例的粪便标本,于24 h内-20℃或以下冻存保存,冷链运送至河南省CDC。HFMD诊断标准以国家卫生和计划生育委员会制定的“手足口病诊疗指南(2010年版)”及《全国手足口病监测方案(2014年版)》作为依据。纳入标准:①临床诊断HFMD病例;②年龄≤5岁;③发病时间≤21 d。排除标准:①先天性疾病患儿;②急、慢性肝炎患儿;③其他疾病引起的心脏损害;④合并其他肠道疾病的患儿。

2. 样本处理和病原学检测:采用含2%青、链霉素,1%氯仿的PBS将粪便标本制成20%的混悬液,825×g离心20 min,吸取上清液用于病原学检测。病毒核酸提取采用德国Qiagen公司的QIAamp Viral mini试剂盒,反转录采用宝生物工程(大连)有限公司的PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒,核酸检测采用江苏默乐三重荧光PCR检测试剂盒。病毒培养采用RD、Hep-2、Vero细胞,阳性分离物经核酸提取、反转录后采用VP1区特异性引物222~292扩增^[5],扩增产物送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

3. 统计学分析:采用DNASar 7.0软件拼接、校正测序结果,同时采用Clustal 1.81和Mega 4.1软件进行序列分析;采用Excel表格整理数据,SPSS 17.0

软件进行相关统计学分析,采用 χ^2 检验对HFMD病例病原感染率和构成比进行比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 病例概况:2014年4—6月共收治244例HFMD。其中重症组109例,死亡3例;轻症组135例。重症组和轻症组病例在发病年龄上的差异有统计学意义($P=0.036$),重症组病例的发病年龄(1.69岁±0.78岁)小于轻症组病例(2.10岁±1.62岁)。两组在性别上的差异无统计学意义($\chi^2=2.009, P=0.156$),男性155例,女性89例,性别比为1.74:1。

2. 病原学检测:244例中有229例为EV,通用引物RT-PCR阳性。其中EV71阳性者192例,Cox A16阳性者13例,其他EV阳性者31例,其中Cox A10感染19例(表1)。EV71感染致8例发生心肺功能衰竭,2例死亡;Cox A10感染致1例发生心肺功能衰竭、死亡。重症组和轻症组EV感染率统计学分析结果为 $\chi^2=5.312, P=0.021$,重症组EV感染率低于轻症组。采用Fisher精确概率法对两组EV71、Cox A16和其他EV感染构成比进行统计学比较, $P=0.048$,表明两组病例3种病原构成的差异有统计学意义。EV71与Cox A10感染致心肺功能衰竭发生率的差异无统计学意义($\chi^2=0.051, P=0.821$),EV71与Cox A10感染致死率的差异无统计学意义($\chi^2=2.198, P=0.138$)。EV71感染致心肺功能衰竭发生率与EV71感染致死率的差异也无统计学意义($\chi^2=3.696, P=0.055$)。

表1 2014年河南省HFMD病原学检测

检测结果	重症组	轻症组	合计
PE+	98(89.91)	131(97.04)	229(93.85)
PE+、EV71+	87(88.78)	105(80.15)	192(83.84)
PE+、CA16+	2(2.04)	11(8.40)	13(5.68)
PE+、EV71-、CA16-	11(11.22)	20(15.27)	31(13.54)
PE+、EV71+、CA16+	2(-)	5(-)	7(-)
合 计	109(44.67)	135(55.33)	244(100.00)

注:括号外数据为例数,括号内数据为构成比(%)

3. Cox A10 分离株遗传进化分析:经 NCBI 网站筛选有代表性的 Cox A10 VP1 基因同源区段核苷酸序列和本研究中病例感染的 Cox A10 VP1 基因核苷酸序列共同进行系统进化分析,以 Cox A6(GenBank 序列号:JN797598)作为外部组。进化分析结果显示(图 1):Cox A10 病毒可以划分为至少 6 个基因组。河南省 2014 年分离株位于同一分支,同属于基因 6 型 Cox A10 病毒。

2014 年河南省 Cox A10 分离株来自全省,各地均有不同程度的分布,核苷酸和氨基酸同源性分别为 94.3%~99.7%和 96.3%~100.0%,与 2010 年河南省 Cox A10 分离株的核苷酸和氨基酸同源性分别为 93.0%~96.9%和 96.3%~100.0%。与基因 6 型其他 Cox A10 毒株的核苷酸和氨基酸同源性分别为 92.3%~100.0%和 97.2%~100.0%。

讨 论

本文显示重症组病例 EV 感染率低于轻症组,提示该医疗机构在 HFMD 临床诊断方面执行标准相对宽松。这种现象的出现是由于 HFMD 对社会影响大、医疗机构病原学和血清学检测相对临床诊断滞后所致。河南省 HFMD 以 2—7 月高发,4—5 月发病达全年峰值^[6]。该医疗机构在此期间采用的这种执行方式对 HFMD 病例的诊治具有一定的积极作用。

2014 年 4—6 月 HFMD 病原学分析显示:EV71 感染构成比超过 80%,重症组 EV71 感染构成比达到 88.78%,EV71 感染致心肺功能衰竭发生率与病死率的差异无统计学意义。既往研究显示:EV71 感染的病死率显著下降,而其基因亚型和毒力并未发生改

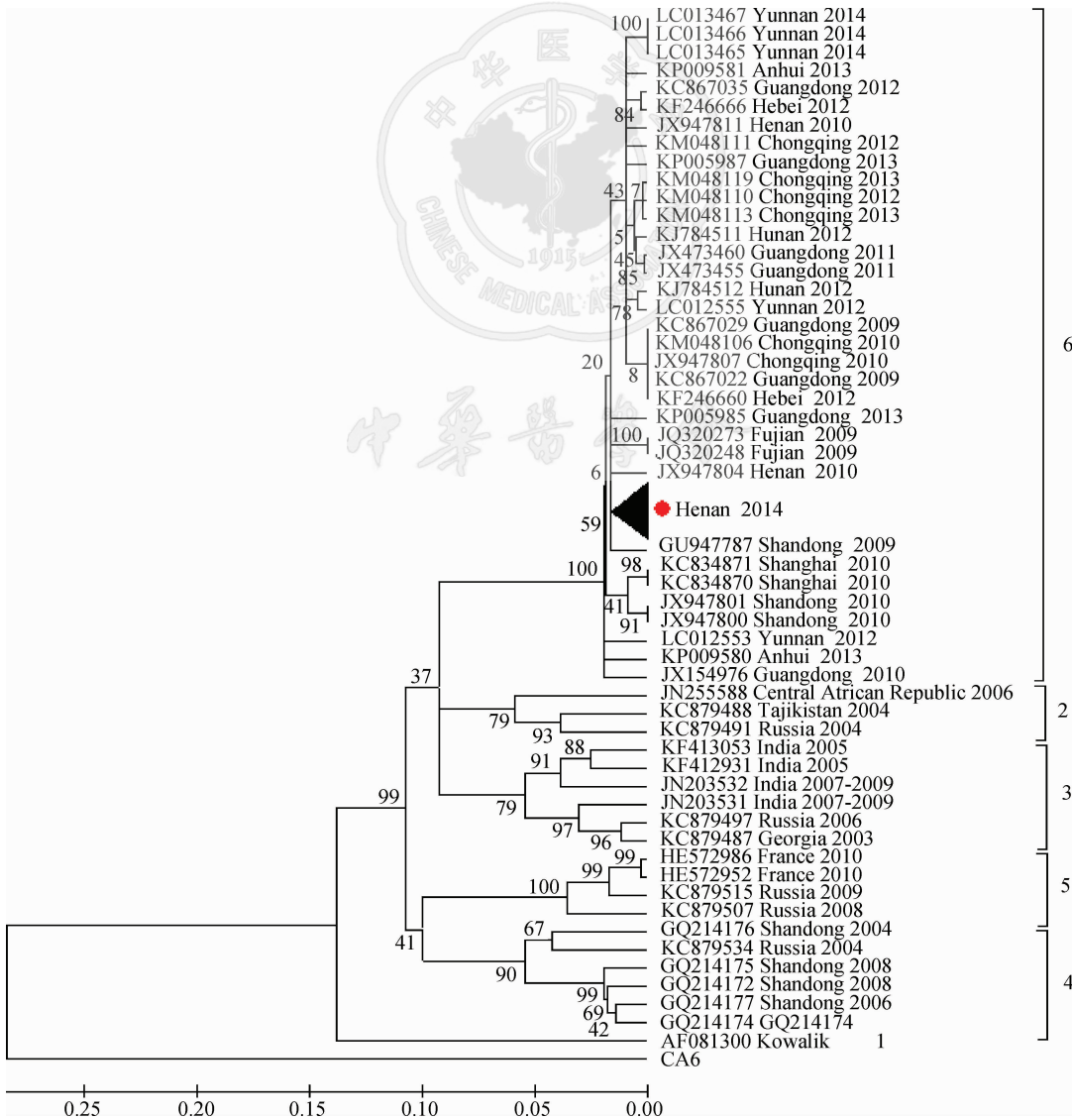


图 1 2014 年河南省 Cox A10 分离株与各型代表株的 VP1 基因(336 nt)系统发生树

变^[1-4,6],这是医疗机构诊治水平提高的结果。本文中EV71感染致心肺功能衰竭发生率与病死率的差异无统计学意义与实际情况存在偏差,可能是样本量少统计误差所致。EV71仍然是HFMD尤其是重症病例最主要的病原,且EV71感染致心肺功能衰竭发生率高,因此加快EV71疫苗的生产具有重要的社会价值^[7-8]。

与既往研究相似,现阶段EV71是HFMD病原谱中最为主要的病原,其次为非EV71非Cox A16的其他EV,而Cox A16所占比例减少^[9-10]。本文非EV71非Cox A16的其他EV基因型按感染比依次为Cox A10、Cox A6、Cox A4、Cox B2、Cox B5、ECHO6和EV75。其中,Cox A10的感染构成比仅次于EV71,成为HFMD病原谱中的第二位。Cox A10感染导致1例重症HFMD患儿死亡。对Cox A10 VP1区段的遗传进化分析显示:2014年河南省Cox A10分离株处于同一进化分支,与2010年河南省Cox A10分离株高度同源,与我国内陆大部分地区流行的Cox A10病毒株同属于基因6型。表明基因6型Cox A10病毒在河南省长期存在,广泛分布,与国内其他省份的Cox A10处于共循环状态,未发生大的变异及重组。鉴于Cox A10感染构成比显著升高,且可以导致心肺功能衰竭甚至死亡,对非EV71非Cox A16的其他EV尤其是Cox A10的监测有必要再加强。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] 王英,何小周,赵俊伟,等. 2008—2010年全国报告手足口病死亡水平及死亡病例分析[J]. 疾病监测, 2011, 26(6): 424-426. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2011.06.003.
- Wang Y, He XZ, Zhao JW, et al. Mortality and death cases of hand foot and mouth disease reported in China, 2008-2010[J]. Dis Surveill, 2011, 26(6): 424-426. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2011.06.003.
- [2] Lu QB, Zhang XA, Wo Y, et al. Circulation of coxsackievirus A10 and A6 in hand-foot-mouth disease in China, 2009-2011[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52073. DOI: 10.1371/journal.pone.0052073.
- [3] 查杰,封琦,马智龙. 2010—2013年江苏省泰州市非EV71和非Cox A16型手足口病肠道病毒病原谱及Cox A6 VP1基因特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(10): 1181-1182. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.10.024.
- Zha J, Feng Q, Ma ZL. The pathogenic spectrum of the enteroviruses for non-EV71 and Cox A16 for HFMD in Taizhou between 2010 and 2013 and the VP1 gene character analysis for coxsackievirus A6[J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35(10): 1181-1182. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.10.024.
- [4] Tian HF, Zhang Y, Sun Q, et al. Prevalence of Multiple enteroviruses associated with hand, foot, and mouth disease in Shijiazhuang city, Hebei Province, China: outbreaks of coxsackieviruses A10 and B3[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84233. DOI: 10.1371/journal.pone.0084233.
- [5] Oberste MS, Nix WA, Maher K, et al. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing[J]. J Clin Virol, 2003, 26(3): 375-377. DOI: 10.1016/S1386-6532(03)00004-0.
- [6] 黄学勇,康锴,许玉玲,等. 2008—2011年河南省手足口病患儿病原学监测结果[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(10): 883-887. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2012.10.005.
- Huang XY, Kang K, Xu YL, et al. Etiology surveillance of hand-foot-mouth disease in Henan province between 2008 and 2011[J]. Chin J Prev Med, 2012, 46(10): 883-887. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2012.10.005.
- [7] Li JX, Mao QY, Liang ZL, et al. Development of enterovirus 71 vaccines: from the lab bench to Phase III clinical trials[J]. Expert Rev Vaccines, 2014, 13(5): 609-618. DOI: 10.1586/14760584.2014.897617.
- [8] Zhu FC, Meng FY, Li JX, et al. Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjuvant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. Lancet, 2013, 381(9882): 2024-2032. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61049-1.
- [9] 杨赫,陶泽新,王海岩,等. 手足口病患儿柯萨奇病毒A10型山东地方株VP1区基因特征分析[J]. 中华传染病杂志, 2010, 28(7): 385-389. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2010.07.001.
- Yang H, Tao ZX, Wang HY, et al. The genetic characterization of VP1 region of Coxsackie virus A10 isolated from hand, foot and mouth disease cases in Shandong Province of China[J]. Chin J Infect Dis, 2010, 28(7): 385-389. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2010.07.001.
- [10] 甄若楠,张颖,谢华萍,等. 2010—2012年广州市柯萨奇病毒A4、A10型VP1基因特征分析[J]. 中华预防医学杂志, 2014, 48(6): 445-450. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.06.005.
- Zhen RN, Zhang Y, Xie HP, et al. Sequence analysis of VP1 region of coxsackievirus A4 and coxsackievirus A10 in Guangzhou city, 2010-2012[J]. Chin J Prev Med, 2014, 48(6): 445-450. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.06.005.

(收稿日期:2015-08-20)

(本文编辑:张林东)