

2014-2017年玉林市手足口病监测结果分析

谭烈明^{1*} 邓艺燕²

【摘要】目的 分析玉林市手足口病发病情况及其病原谱的构成,为手足口病的诊断、治疗及其防控提供科学依据。**方法** 收集2014年1月至2017年12月玉林市红十字会医院临床诊断为手足口病患者的肛拭子标本32 077例,应用实时荧光定量-聚合酶链反应(qRT-PCR)技术对标本进行病毒核酸检测,并分析病毒类型与临床相关性。**结果** 肠道病毒阳性率为80.1%(25 870/32 077),其中EV71型、CA16型及非EV71/CA16型阳性检出率分别为12.4%(3 203/25 870)、5.4%(1 402/25 870)及82.2%(21 265/25 870),以非EV71/CA16型为主;非EV71/CA16组与CA16组、EV71组在各年龄组中分别比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$),在男性与女性之间的阳性率的比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。手足口病各月均可发病,具有明显的季节性,病例数主要集中在4~9月。**结论** 2014-2017年玉林市手足口病病原谱发生变化,非EV71/CA16的肠道病毒成为优势流行株,因此应加强未分型样本的监测工作。应重视儿童手足口的诊治、日常监测和防控工作。

【关键词】 手足口病;聚合酶链反应;肠道病毒

Analysis of the surveillance results of hand, foot and mouth disease in Yulin City in 2014-2017

TAN Lieming^{1*}, DENG Yiyan²

(1. Yulin Red Cross hospital clinical laboratory, Guangxi, Yulin, China, 53700; 2. Yulin Red Cross hospital Paediatrics, Guangxi, Yulin, China, 53700)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the incidence of hand-foot-mouth disease (HFMD) and its pathogen spectrum in Yulin city, and to provide a scientific basis for the diagnosis, treatment and prevention of HFMD. **Methods** A total of 32 077 anal swab specimens from patients with HFMD diagnosed in Yulin Red Cross Hospital from January 2014 to December 2017 were collected. The real-time fluorescence quantitative-polymerase chain reaction (qRT-PCR) technique was used to detect viral nucleic acid samples and analyze the virus type and clinical relevance. **Results** The positive rate of enterovirus was 80.1% (25 870/32 077). The positive detection rates of EV71, CA16 and non-EV71/CA16 were 12.4% (3 203/25 870), 5.4% (1 402/25 870) and 82.2% (21 265/25 870), respectively. Non-EV71/CA16 type was the main type. There was a significant difference between non-EV71/CA16 group and CA16 or EV71 ($P < 0.01$). The positive rate between male and female was not statistically significant difference ($P > 0.05$). The incidence of HFMD has obvious seasonality of HFMD and the number of cases is mainly concentrated from April to September. **Conclusion** The pathogen spectrum of HFMD in Yulin city has changed in 2014-2017, and the non-EV71/CA16 enterovirus became the dominant strain. Therefore, the monitoring of untyped samples should be strengthened. More attention should be paid to the diagnosis, treatment, daily monitoring and prevention and control of HFMD.

[KEY WORDS] Hand foot and mouth disease; Polymerase chain reaction; Enterovirus

作者单位:1. 广西玉林市红十字会医院检验科,广西,玉林 537000

2. 广西玉林市红十字会医院儿科,广西,玉林 537000

*通讯作者:谭烈明, E-mail: 52992891@qq.com

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)是儿童常见的传染性疾病,该病于5岁以下儿童多发,以手、足、口多发疱疹为主要特征,病情发展快,可导致个别重症患儿死亡^[1]。目前已有20多种肠道病毒可引发手足口病,最为常见的是肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒A16型(coxsackievirus A16, CA16)引起^[2-4],并且在全球多次大规模爆发流行。近年来, HFMD的病原除主要型别外,由其他型别所引起的HFMD,也逐渐被认识。为了解玉林市HFMD的主要病原谱构成,现对玉林市红十字会医院2014年1月至2017年12月共32 077例HFMD临床送检标本的病原学检测结果进行分析,为手足口病防治提供依据。

1 资料与方法

1.1 资料来源

采集2014年1月-2017年12月临床诊断为HFMD患者的肛拭子标本共32 077例,其中男性19 505例,女性12 572例,年龄10天至73岁,平均年龄(2.1±0.02)岁。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

由护士或医生采集标本,采集前由专业人员对采集规范进行培训。肛拭子:可用棉签由肛门插入直肠内采取,使拭子变成湿润并染有一些粪便颜色。将棉签放入内装有2 mL生理盐水的采样管中并保存于2-8℃冰箱。

1.2.2 病毒RNA提取

使用中山大学达安基因股份有限公司提取试剂盒(离心柱提法)提取RNA,充分混匀标本后,取100 μL加入50 μL的蛋白酶K和200 μL的裂解工作液,

72℃ 10 min,加入250 μL乙醇,混匀后,全部移入离心柱中,离心,纯化,洗脱。提取好的RNA可以直接用于检测,也可存于-20℃,24 h内完成检测。

1.2.3 荧光定量PCR核酸检测

使用中山大学达安基因股份有限公司提供的荧光定量PCR试剂盒(PCR-荧光探针法),反应体系:RT-PCR反应液15 μL、逆转录酶2 μL、Taq酶3 μL;上述PCR反应管中分别加入处理后的阴性质控品、待测样品混浊液、阳性质控品各5 μL,3 000 r/min离心30s,放入PCR扩增仪。在瑞士罗氏cobas480实时荧光PCR仪器上进行RNA检测,具体反应条件参照试剂盒说明书。

1.2.4 结果判断

阴性质控品:无典型S型扩增曲线或无Ct值;阳性质控品:呈典型S型扩增曲线且Ct值≤30;如果检测结果无典型S型扩增曲线或Ct值>34.9,则判断标本为阴性;如果检测结果呈典型S型扩增曲线且Ct值≤34.9,则判断标本为阳性。

1.3 统计学处理

采用SPSS 24.0软件进行数据分析处理,采用 χ^2 检验对结果进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病原谱构成

共检测32 077份标本,其中肠道病毒阳性率为80.1%(25 870/32 077),其中EV71型阳性检出率为12.4%(3 203/25 870),CA16型阳性检出率为5.4%(1 402/25 870),非EV71/CA16型阳性检出率为82.2%(21 265/25 870)。4年间,非EV71/CA16型的阳性与EV71型和CA16型的比较差异有统计学意义($\chi^2=2 851.99, P=0.000, P < 0.01$),见表1。

表1 2014-2017年玉林市各年手足口病核酸检测结果

Table 1 Results of nucleic acid detection of hand, foot and mouth disease in Yulin City, 2014-2017

年份	总检测例数 (n)	EV		CA16		EV71		非EV71/CA16	
		检出例数 (n)	总阳性率 (%)	检出例数 (n)	占总阳性率 (%)	检出例数 (n)	占总阳性率 (%)	检出例数 (n)	占总阳性率 (%)
2014	6 550	4 964	75.8	374	7.5	1 440	29.0	3 150*	63.5
2015	8 780	6 990	79.6	234	3.3	331	4.7	6 425*	91.9
2016	7 577	6 284	82.9	755	12.0	765	12.2	4 764*	75.8
2017	9 170	7 632	83.2	39	0.5	667	8.7	6 926*	90.7
合计	32 077	25 870	80.1	1 402	5.4	3 203	12.4	21 265	82.2

*表示在2014年-2017年非EV71/CA16与EV71、CA16阳性比较, $\chi^2=2 851.99, P=0.000, P < 0.01$ 。

2.2 实时荧光定量PCR检测结果

阳性检测结果的扩增曲线呈典型S型扩增曲线且Ct值≤34.9。阴性检测的结果无典型S型扩增曲线或Ct值>34.9(图1,图2)。

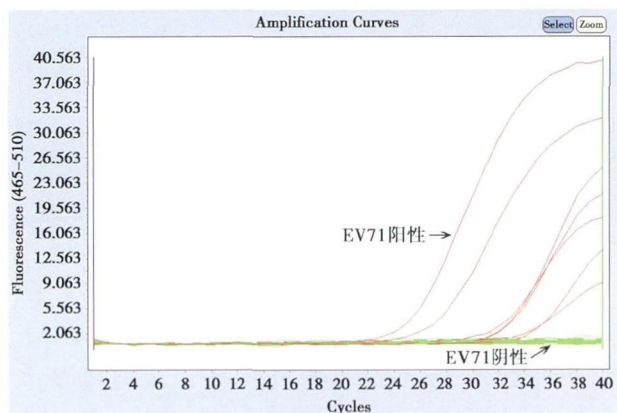


图1 荧光定量PCR检测曲线
Figure 1 The curve of RT-PCR

2.3 年龄分布特征

从年龄分布来看,玉林市2014至2017年发病年龄最小为10d,最大为73岁,发病的人群以5岁以下儿童为主,占97.97%(25 345/25 870)。其中0~3岁儿童发病最多,占总病例数的89.98%(23 278/25 870)。CA16型和EV71型的阳性率

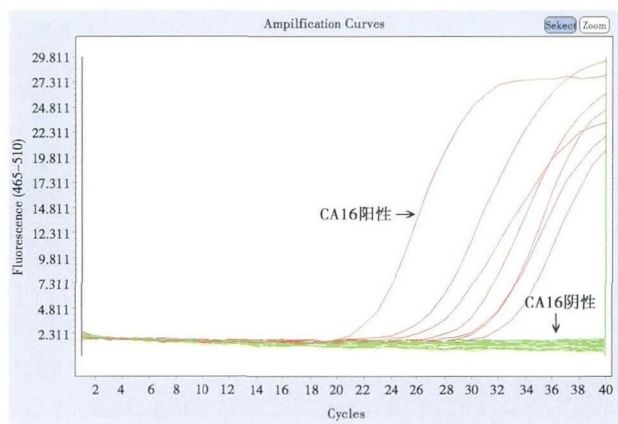


图2 荧光定量PCR检测曲线图
Figure 2 The curve of RT-PCR

在所有年龄组间比较,差异无统计学意义($\chi^2=5.48, P=0.48, P > 0.05$)。非EV71/CA16组与CA16组、EV71组在各年龄组中分别比较,差异具有统计学意义($\chi^2=424.35, P=0.000, P < 0.01$),见表2。

2.4 性别分布

手足口病病毒在男性与女性之间的阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.093, P=0.955, P > 0.05$),说明病毒感染在不同性别患者中的感染情况无差异,见表3。

表2 2014-2017年玉林市手足口病各年龄段分布情况

Table 2 Distribution of hand, foot and mouth Disease by age in Yulin City, 2014-2017

年龄(岁)	标本数(n)	EV总阳性 [n(%)]	CA16占总阳性 [n(%)]	EV71占总阳性 [n(%)]	非EV71/CA16占总阳性 [n(%)]
0~	4 782	3 876(81.1)	140(3.6)	230(5.9)	3 506(90.5)*
1~	11 868	9 906(83.5)	504(5.1)	1 017(10.3)	8 385(84.6)*
2~	7 343	6 013(81.9)	344(5.7)	855(14.2)	4 814(80.1)*
3~	4 378	3 483(79.6)	232(6.7)	657(18.9)	2 594(74.5)*
4~	1 962	1 492(76.0)	101(6.8)	248(16.6)	1 143(76.6)*
5~	832	575(69.1)	53(9.2)	110(19.1)	412(71.7)*
6及以上	912	525(57.6)	28(5.3)	86(16.4)	411(78.3)*
合计	32 077	25 870	1 402	3 203	21 265

“0~”表示年龄段未周岁,“1~”表示年龄段1周岁至未周岁,以此类推。“”表示在各年龄段中非EV71/CA16阳性组与CA16阳性组、EV71阳性组比较, $\chi^2=424.35, P=0.000, P < 0.01$ 。

2.5 月份分布特征

2014-2017年各月均有发病,发病具有明显的季节性,呈双峰型分布。4月开始上升,随后的5~7月持续处于高发水平,此为春夏高

峰,是发病的最高峰。自7月开始病例数逐渐递减,进入9月后病例数开始反弹上升,为发病的次高峰。春夏高峰的流行周期长于秋冬高峰(图3)。

表3 2014-2017年玉林市手足口病患者性别的分布情况

Table 3 Gender Distribution of hand, foot and mouth disease in Yulin City, 2014-2017

性别	标本数 (n)	EV 总阳性 [n (%)]	CA16 占总阳性 [n (%)]	EV71 占总阳性 [n (%)]	非 EV71/CA16 占总阳性 [n (%)]
男	19 505	15 656(80.3)	840(5.4)	1 927(12.3)	12 889(82.3)*
女	12 572	10 214(81.2)	562(5.5)	1 276(12.5)	8 376(82.0)*
合计	32 077	25 870	1 402	3 203	21 265
χ^2			0.461		
P 值			0.927		
P			> 0.05		

“*”表示在EV总阳性、CA16阳性、EV71阳性和非EV71/CA16阳性组中男与女比较, $\chi^2=0.461$, $P=0.927$, $P>0.05$, 差异无统计学意义。

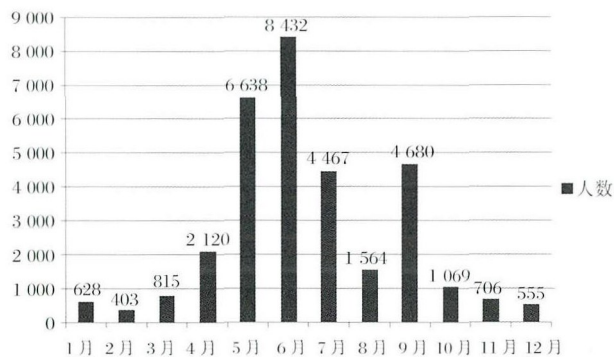


图3 2014-2017年不同月份手足口病发病人数分布
Figure 3 The incidence of HFMD in different months from 2014 to 2017

3 讨论

手足口病在我国流行强度较大,自2008年以来全国很多地方爆发过较大规模,已成为危害我国儿童健康的重要公共卫生问题^[5]。因此对于流行季节的实验室诊断,采用简便、快捷、准确的技术则是实验室诊断的关键。qPCR是将PCR技术和荧光检测技术结合起来实现了对核酸的自动化检测的技术,其原理是在PCR反应体系中加入荧光基团,利用PCR对DNA的高效扩增,运用高特异性的探针和高敏感性的光谱技术检测目的片段及定量。因此荧光定量基因检测方法可准确、灵敏地反映感染数量和治疗恢复情况,对手足口病早期诊断和疗效的观察具有重要的指导作用。

本文通过对玉林市2014-2017年手足口病病原体流行特征监测发现,玉林市手足口病全年均可发病,且发病存在季节性变化,病例主要集中在4~9月,这与胡跃华、孙军玲等^[6-7]报道的手足口病在夏、秋季均有明显流行高峰一致。玉林市2014-

2017年手足口病的发病人群为主要是5岁以下儿童,其中0~3岁儿童发病数最多,此结果与刘莹莹、杭惠等^[8-10]报道的结果相符,该现象可能与人群免疫水平及个人卫生习惯有关,5岁以下儿童免疫水平较低,卫生意识淡薄,容易受到各种细菌病毒入侵,疾病感染的风险增大。故儿童在0~3岁时发病最多,5岁后较少。从性别来看,男童发病例数高于女童,可能与男童好动,活动范围较女童广,个人卫生习惯不如女童有关。因此,在每年夏、秋季加强对5岁以下儿童,尤其是0~3岁男童的手足口病防控,可有效控制手足口病的蔓延。

叶瑞国等^[11]报道2012年玉林市手足口病主要以EV71型和CA16型为优势流行毒株。本研究发现2014年EV71型阳性率为29%,CA16型为7.5%,非EV71/CA16型阳性率为63.5%。并且2015-2017年非EV71/CA16型肠道病毒所占的比例逐渐增加,比率从63.5%升至90.7%。说明从2014年起玉林市流行季HFMD的肠道病毒感染已从EV71型和CA16型占主要,改变到非EV71/CA16型成为主要流行株,与朱俊萍、关恒云等^[12-13]报道的手足口病病原研究结果基本一致,和国内外有关报道相似^[14-15]。目前,国内有关HFMD致病机制和预防治疗关注的焦点主要集中于EV71型和CA16型2种病原,但是近年来国内很多地方报道EV71和CA16型感染比率已经减少,其它型别肠道病毒在HFMD流行中所占比例明显增加。从2010年起,陈前进、赵虹等^[16-18]陆续报非EV71/CA16型病毒株逐渐在国内HFMD中逐渐成为优势流行病毒株。廖琳虹、邱惠芳等^[19-23]也发现其他肠道病毒感染成为HFMD的重要组成部分。目前,玉林市手足口病常规的病原

学检测仅针对肠道病毒通用、EV71型和CA16型,而非EV71/CA16型病毒株逐渐成为引发手足口病暴发流行的优势菌株,为了预防和控制手足口病的暴发流行,下一步要对非EV71/CA16型病毒株进行基因分型,期待更多肠道病毒分型产品应用于临床。

因此,加强对玉林市手足口病其他型别病原体的监测,确立更为精确、全面的肠道病毒分型,建立并完善玉林市手足口病详细病原谱,把握手足口病病原体流行趋势,可为今后手足口病的诊治、日常监测和防控工作提供科学依据。

参考文献

- [1] ZHANG D, LI R, ZHANG W, et al. A case-control study on risk factors for severe hand, foot and mouth disease[J]. SciRep, 2017(7): 40282.
- [2] Zhu J, Luo Z, Wang J, et al. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 circulating in Beijing, China from 2007 to 2009[J/OL]. PLoS One, 2013,8(2):e56318.
- [3] Li W, Yi L, SU J, et al. Seroprevalence of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in Guangdong, China, in pre- and post-2010 HFMD epidemic period [J/OL]. PLoS One, 2013,8(12):e80515.
- [4] 郭青,张春曦,王晓风,等. 2008-2009年中国大陆手足口病流行特征分析[J]. 疾病监测, 2011,26(11): 852-856.
- [5] 张勇,郭彦艳,许学伟,等. 2008-2013年安徽省滁州市手足口病流行特征分析[J]. 职业与健康, 2015, 31(2):195-198.
- [6] 胡跃华,肖革新,郭莹,等. 2008-2011年中国大陆手足口病流行特征分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2014, 8(18):693-697,747.
- [7] 孙军玲,张静. 手足口病流行病学研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(9):973-975.
- [8] 刘莹莹,于秋丽,苏通,等. 2011-2015年河北省手足口病流行特征及病原特征分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2017, 21(2):151-155.
- [9] 蒋丽娜,谭毅,王晶,等. 2008-2015年广西手足口病流行病学特征及时空聚集性分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2017, 21(4):340-344.
- [10] 杭惠,夏瑜,陈立凌,等. 2011-2015年苏州市手足口病流行病学特征分析[J]. 现代预防医学, 2016, 43(21):3850-3854.
- [11] 叶瑞国,庞晓泸,蒋宁,等. 2010-2011年玉林市手足口病病原学检测结果分析[J]. 预防医学论坛, 2012, 18(9):697-698.
- [12] 朱俊萍,徐子刚,陈辉,等. 2007年北京地区儿童手足口病病原的初步筛查[J]. 病毒学报, 2009, 25(1):23-28.
- [13] 关恒云,杨梦婕,刘岚铮,等. GeXP多重基因表达遗传分析系统对2009-2012年济南市手足口病病原谱的研究[J]. 病毒学报, 2014, 30(5):567-571.
- [14] 葛艳玲,郑亚旭,潘浩,等. 2010至2014年上海地区儿童手足口病的流行病学监测[J]. 中华儿科杂志, 2015, 9(9):676-683.
- [15] Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011 [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(2):337-339.
- [16] 陈前进,严延生,何家鑫,等. 一起CoxA16引起某幼儿园手足口病暴发调查[J]. 海峡预防医学杂志, 2008, 14(1):45-47.
- [17] 廖琳虹,杨萍,廖亦红,等. 2012-2014年龙岩市手足口病病原学监测结果分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(6):536-538.
- [18] 赵虹,林鸿波,陈懿,等. 2012-2013年宁波市鄞州区手足口病病原分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(17):2543-2545.
- [19] Han J F, Xu S, Zhang Y, et al. Hand, foot, and mouth disease outbreak caused by coxsackievirus A6, China, 2013 [J]. J infect, 2014, 69(3):303-305.
- [20] 邱惠芳,潘丽峰,汤琰,等. 上海市浦东新区2013年手足口病检测结果分析[J]. 中国初级卫生保健, 2014, 28(9):97-99.
- [21] 廖琳虹,杨萍,曹春远,等. 2014-2015年龙岩市非EV71、非CoxA16手足口病肠道病毒病原谱分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(11):1549-1551.
- [22] Feng X, Guan W, Guo Y, et al. A novel recombinant lineage's contribution to the outbreak of Coxsackievirus A6 - associated hand, foot and mouth disease in Shanghai, China, 2012-2013 [J]. Sci Rep, 2015, 5: 11700.
- [23] HongYan G, ChengJie M, QiaoZhi Y, et al. Hand, foot and mouth disease caused by Coxsackievirus A6, Beijing, 2013 [J]. Pediatr Infect Dis J, 2014, 33(12): 1302-1303.