

· 临床研究 ·

深圳 237 例手足口病肠道病毒血清型基因及临床特征

张寿斌¹, 廖华¹, 黄呈辉², 谭庆瑜¹, 张炜灵¹, 黄艳¹, 陈侃¹, 邱素清¹, 林静¹, 幸思忠³, 廖月红¹

(1. 深圳市第八人民医院海富社康中心, 广东 深圳 518101; 2. 深圳市宝安区血站分子生物研究室, 广东 深圳 518101; 3. 深圳市宝安区卫生局, 广东 深圳 518101)

[摘要] 目的 了解该地区手足口病临床和流行病学特征, 明确其肠道病毒血清型分布。方法 分别在肠道病毒基因组 5'端非编码区, CAV16 和 EV71 VP1 区设计通用引物和特异性引物, 建立 RT-nPCR 检测方法, 对手足口病病人进行肠道病毒基因检测, 鉴别其血清型, 根据血清型不同比较其临床特征。结果 237 例手足口病均有口腔黏膜疹和手足皮疹, 发热 141 例(59.5%), 低热为主, 6 岁以下占 94.5%, 以春夏季节为多(67.9%)。肠道病毒通用引物 RT-nPCR 检测阳性 133 例(56.1%), 其中 EV71 38 例, CAV16 64 例, 二者均阴性 31 例。12 株肠道病毒 PCR 阳性产物基因克隆、测序, 证实分别为 EV71 5 株、CAV16 5 株、ECHO13 1 株、CAV5 1 株。结论 手足口病病原体以 EV71 和 CAV16 为主, 另有 CAV5, ECHO13, 临床症状与肠道病毒血清型关系不大。

[中国当代儿科杂志, 2008, 10(1): 38-41]

[关键词] 手足口病; 肠道病毒; 血清型; 临床特征; 儿童

[中图分类号] R373.2 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2008)01-0038-04

Serum types of enterovirus and clinical characteristics of 237 children with hand, foot and mouth disease in Shenzhen

ZHANG Shou-Bin, LIAO Hua, HUANG Cheng-Hui, TAN Qing-Yu, ZHANG Wei-Ling, HUANG Yan, CHEN Kan, QIU Su-Qing, XING Si-Zhong, LIAO Yue-Hong. Haifu Community Health Service Center, Eighth People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518101, China (Email: bahfsk@126.com)

Abstract: Objective To study the clinical and epidemiologic characteristics and the serum types of enterovirus of hand, foot and mouth disease (HFMD) in children. **Methods** The RT-nPCR method was established with universal primers within 5'untranslated region of enterovirus and VP1 region of Coxsackievirus A16 (CAV16) and enterovirus 71 (EV 71). Enteroviruses were detected with RT-nPCR in 237 children with HFMD. Clinical and epidemiologic characteristics and serum types of enterovirus of the patients with HFMD were studied. **Results** The patients' age ranged from 7 months to 11 years (mean 4.2 ± 0.5 years). The majority (94.5%) were less than 6 years old. HFMD was mostly seen in spring and winter (67.9%). Oral mucosal pox or ulcer as well as hand and foot rashes were observed in all 237 patients. Fever occurred in 141 patients (59.5%). Of the 237 patients, 133 (56.1%) were RT-nPCR positive. Of the 133 cases, 38 were positive for EV71, 64 were positive for CAV16, and 31 were negative for both EV71 and CAV16. The patients infected by different types of enteroviruses had similar clinical characteristics. Gene clone and sequence analysis for 12 strains of enteroviruses PCR positive products presented as EV71 (n=5), CAV16 (n=5), ECHO13 (n=1), and CAV5 (n=1). **Conclusions** HFMD tends to occur in younger children less than 6 years old. The majority are affected in spring and winter. EV71 and CAV16 are common pathogens of HFMD. There is no relationship between clinical characteristics and serum types of enteroviruses in HFMD patients. [Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(1): 38-41]

Key words: Hand, foot and mouth disease; Enterovirus; Serum type; Clinical characteristics; Child

自 1959 年由人类肠道病毒 (enterovirus, EV) 导致手足口病 (hand, foot and mouth disease, HFMD) 报道以来, HFMD 已经在全球多次暴发。早期 HFMD 主要由肠道病毒柯萨奇 A16 (Coxsackie A16, CAV16) 引起, 1974 年美国发现肠道病毒 71 型 (EV71) 也常致 HFMD 流行, 此外柯萨奇 A9 (CAV9)、柯萨奇 A5

(CAV5) 致 HFMD 也有报道。导致 1997 ~ 1998 年东南亚和我国台湾省、香港地区大规模手足口病流行的主要是 EV71。由于 HFMD 常常由多种 EV 共同引起, 而 EV71 和 CAV16 往往是手足口病暴发流行的最主要病原, 二者在遗传学上密切相关。通常情况下, EV71 与 CAV16 引起的 HFMD 在临床症状

[收稿日期] 2007-05-08; [修回日期] 2007-07-04

[基金项目] 深圳市科技计划项目 (卫生局) 资助 (编号: 200104148)。

[作者简介] 张寿斌, 男, 硕士, 副主任医师, 中心主任。主攻方向: 感染学, 小儿急救医学。

上难以区别,但EV71感染除了引起HFMD以外,还能引起无菌性脑膜炎、脑干脑炎和脊髓灰质炎样麻痹,易致严重的神经系统疾病,甚至危及生命,因而具有更大的危害性。本文采用EV 5'端非编码区通用引物和EV71、CAV16 VP1区特异性引物对237例手足口病病人进行RT-PCR肠道病毒RNA检测,以了解手足口病病原及流行特征。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

237例为我院2001~2004年住院和门诊临床诊断手足口病病人,手足口病诊断标准:①有或无发热;②口腔黏膜疹,可形成溃疡;③皮疹,部分有水泡,以手掌、足底为多;④伴或不伴中枢神经系统症状。

1.2 标本采集与储存

用无菌方法采集急性期病人(病后3~7d内)的粪便1~2g,置于灭菌的带盖玻璃瓶中。同时用干棉签准确地擦拭患儿的鼻咽部后,立即浸泡于含2~3mL Hanks液的灭菌试管,必要时留取脑脊液2~3mL,以上标本均立即-70℃冻存。

1.3 引物的设计

根据GenBank中收录的常见EV 5'端非编码区(UTR)保守的基因序列,采用OLIGO5.0软件辅助设计两对肠道病毒5'UTR通用引物,引物序列分别为: EVP160: 5'-CAA GCA CTT/A TTC/A CCC CGG-3'; EVP250: 5'-TAC TTC GAG/A CCT AGT A -3'; EVP500: 5'-ACA CCC AAA GTA GTC GGT TCC GC-3'; EVP580: 5'-ATT GTA CCA TAA GCA GCC A-3'。其中EVP160、EVP580为外引物, EVP250、EVP500为内引物,可以产生312bp大小的扩增产物。EV71特异性引物序列为: EV71-1: 5'-ACY ATG AAA YTG TGY AAG GA-3', EV71-2: 5'-CCR GTA GGK GTR CAC GCA AC-3', Y = C/T, R = G/A, K = G/T; EV71-3: 5'-CAG GGR GAY AGR GTG GCA GAT G-3', EV71-4: 5'-TCA ATC ATA CTC TCR TCA CTA G-3', 其中Y = T/C, R = A/G; 其中EV71-1, EV71-2为外引物, EV71-3, EV71-4为内引物,可以产生434bp大小的扩增产物。CA16特异性引物序列为: CA16P1S: 5'-ATT GCA GAC ATG ATT GAC CAG -3', CA16P2S: 5'-TGT GTG TTG AAC CAT CAC TC CAC-3', CA16P476: 5'-GGK GGP ACA ACA TGT ACT GC-3', 其中P = C/G, K = A/C, R = A/G, 可以产生230bp大小的扩增产物。引物由上海生工生物工程公司合成。

1.4 标本总RNA提取

采用TRIZOL-LS Reagent提取总EV RNA。

1.5 RT-n-PCR扩增和检测

逆转录合成cDNA反应: 取5×AMV缓冲液3.0μL, 20mMol/L dNTPs 0.15μL, 随机六聚体引物1.0μL, 加去离子水0.85μL, AMV逆转录酶, RNA模板10μL, cDNA反应液总体积为15μL, 反应参数: 42℃, 45min, 然后72℃, 10min。第1轮PCR反应条件: 取cDNA模板5μL, EVP160、EVP580引物各0.15μL, 其余条件参考文献^[8]。第2轮PCR反应条件: 取第1轮PCR产物3μL作模板, 用50μmol/L EVP250引物、EVP500引物各0.15μL进行第2次扩增, 其余扩增条件同第1轮。特异性EV71和CAV16扩增条件同, 但CAV16半巢式扩增第2次引物为CAV16P476和CAV16P2S。取第2轮PCR产物10μL用2%琼脂糖凝胶电泳, EB染色(含EB 0.5μg/mL), 100V电泳30min, 紫外灯下观察, 在相应位置可见清晰条带为阳性。

1.6 PCR产物的克隆

将PCR产物经产物回收试剂盒进行回收, 使用T-Vector试剂盒, 将片段与pGEM-T easy载体质粒进行连接反应, 4℃过夜, 转化感受态DH5, 蓝白筛选, 挑取白色菌落进行鉴定, 确定阳性克隆(pGEM-EV-5'UTR、pGEM-EV71-VP1、pGEM-CAV16-VP1)。PCR产物经低熔点胶回收纯化后, 连接到pBluescript-T载体上, 转化感受态菌XLI-Blue, 经蓝白斑筛选, PCR及酶切鉴定阳性克隆后, 对阳性菌落接种培养, 提取质粒。

1.7 核苷酸序列测定及分析

将阳性克隆送北京赛百胜生物有限公司进行测序, 测序采用ABI377型自动测序仪进行。所得基因序列输入www.ncbi.nlm.nih.gov, 通过BLAST软件程序与最近发表的EV 5'UTR、EV71-VP1、CAV16-VP1独特区相关序列比较, 并向国际GenBank提交核酸序列并注册。

2 结果

2.1 手足口病年龄与性别分布

237例手足口病患儿年龄范围7月至11岁, 平均年龄4.2±0.5岁, 其中0~11月45例(19.0%), 1~3岁76例(32.0%), 4~6岁103例(43.5%), 7~11岁13例(5.5%), 6岁以下占94.5%; 男132例, 女105例, 男女比例1.26。其中有153人次来源于托幼机构(64.6%), 23人次系同胞关系。

2.2 手足口病发病与季节、年度关系

手足口病全年都有发病,多呈局部小暴发流行,112例有明显接触史,占47.3%;散发87例为散发,占36.7%。发病季节3~5月64例(27.0%),6~8月97例(40.9%),9~11月32例(13.5%),12~2月44例(18.6%);2001年67例,2002年119例,2003年23例,2004年30例;以春夏季节为多。

2.3 手足口病临床特征

237例手足口病,发热141例(59.5%),热程1~7 d,发热多发生在出疹之前1~2 d,年龄越小越呈高热趋势。237例均有口腔黏膜疹,粟粒至绿豆大小,初为深红色,破溃形成小溃疡,周围有红晕,疼痛明显致使进食困难及流涎,约5~10 d愈合。皮疹见于所有病例,分布于手、足部,以手掌、足底两侧和足跖为多,为玫瑰红色充血性斑丘疹或疱疹,呈圆形或椭圆形,丘疹直径1~2 mm,疱疹直径在2~4 mm,呈灰白色,周围绕以红晕;臀部皮疹112例,部分小儿皮疹先由双侧臀部开始,另有膝部皮疹54例,躯干部皮疹21例。流涎152例(64.1%),拒食122例(51.5%),部分出现流涕,咳嗽,腹泻,皮肤瘙痒。并发症:病毒性心肌炎7例,病毒性脑膜脑炎2例,肺炎3例。

2.4 RT-PCR检测手足口病肠道病毒血清型比较及基因序列分析

237例手足口病均进行肠道病毒通用引物 RT-nPCR检测,其中阳性133例,阳性率56.1%。为进

一步明确手足口病肠道病毒血清型,133例肠道病毒通用引物阳性病例均进行EV71特异性引物 RT-PCR(巢式)和CAV16特异性引物 RT-PCR(半巢式)检测,结果EV71阳性38例(28.6%),CAV16阳性64例(48.1%),无交叉阳性,二者均阴性31例(23.3%)。12株肠道病毒PCR阳性产物(5株5'UTR,3株EV71VP1,4株CAV16VP1)经基因克隆纯化后自动基因测序,基因序列(另文发表)已提交至国际核酸与蛋白GenBank数据库。证实5株EV5'UTR基因序列片段分别为EV71 2株、CAV16 1株、ECHO13 1株、CAV5 1株,其中EV71、CAV16与VP1特异性引物检测结果相符合,而3株EV71VP1序列片段,4株CAV16 VP1序列片段,均证实分别为EV71和CAV16,具体如表1所示。

2.5 EV71、CAV16所致手足口病临床特征比较

通用引物PCR检测阳性者133例,其中经EV71 VP1特异性PCR检测阳性38例,CAV16阳性64例,二者均阴性31例,三者临床表现之间无差别,结果见表2。

3 讨论

手足口病是全球性传染病,最早于1957年由新西兰Seddon加以描述,1958年加拿大Robinson^[1]从HFMD患者中分离出CAV16,以后数年内的报告几乎都是由该病毒所致。自1974年美国学者从一脑

表1 12株国际GenBank注册肠道病毒血清型与RT-PCR检测结果比较

编号	性别	RT-PCR 检测结果			PCR 阳性产物位置	国际 GenBank 注册号	肠道病毒血清型
		5'UTR 引物(巢式)	EV71 特异引物(巢式)	CAV16 特异引物(半巢式)			
1	男	+	+	-	5'UTR	AY935539	EV71
2	女	+	-	-	5'UTR	AY935540	CAV5
3	男	+	-	+	5'UTR	AY935541	CAV16
4	女	+	-	-	5'UTR	AY935542	ECHO13
5	男	+	-	+	5'UTR	AY935543	EV71
6	女	+	+	-	VP1	AY899277	EV71
7	男	+	+	-	VP1	AY899278	EV71
8	男	+	+	-	VP1	AY899279	EV71
9	男	+	-	+	VP1	AY775308	CAV16
10	女	+	-	+	VP1	AY775309	CAV16
11	女	+	-	+	VP1	AY775310	CAV16
12	男	+	-	+	VP1	AY775311	CAV16

表2 EV71、CAV16所致手足口病临床特征比较

EV 种类	例数	年龄	发热程度(℃)	发热持续时间(d)	白细胞数($\times 10^9/L$)	皮疹愈合时间(d)	口腔黏膜疹例数	手足皮疹例数	并发症例数	死亡例数
EV71	38	4.2±0.4	37.6±0.5	2.2±0.6	5.6±0.6	7.1±1.6	38	38	3	0
CAV16	64	4.2±0.3	37.7±0.3	2.1±0.7	6.6±0.7	6.6±0.9	64	64	3	0
非EV71非CAV16	31	4.3±0.4	37.6±0.4	2.1±0.4	6.2±0.4	7.2±1.1	31	31	2	0

炎病人的标本中分离出 EV71 肠道病毒后,手足口病与 EV71 感染的关系得到广泛的重视。此后, EV71 感染与 CAV16 感染交替出现,成为手足口病的主要病原体。1997 年马来西亚发生了主要由 EV71 引起的手足口病流行^[2],仅 4~6 月就有 29 例病人死亡。1998 年^[3] EV71 感染在我国台湾省引发大量手足口病和疱疹性咽峡炎,在 6 月和 10 月两波流行中,共监测到 129 106 例病例,重症病人 405 例,死亡 78 例,大多为 5 岁以下的儿童,并发症包括脑炎、无菌性脑膜炎、肺水肿或肺出血、急性软瘫和心肌炎,分离出病毒的病人中, EV71 分离率为 48.7%,同时发现有相当数量病人为 CAV16 感染。目前世界上几起严重的手足口病暴发流行均由 EV71 引起,而 CAV16 则极少导致手足口病的大规模暴发流行。我国于 1980 年由上海首先报道本病^[4],以后各地均有报道。病毒分离和血清学实验研究表明,1985 年以前 CAV16 是该病的唯一病原,最近的研究结果显示尽管病原仍然以 CAV16 为主,但 EV71 在手足口病的病原学中占有越来越重要的地位。1989 年湖北医学院病毒所^[4]从成人手足口病患者分离出 EV71,1998~1999 年深圳市卫生防疫站^[5]从手足口病患者疱疹液中检出 EV71,此后,在我国上海^[6]、广州、福建^[7]均分离出 EV71。广州、深圳、武汉和上海地区的 EV71 流行株在核苷酸组成上有很大相似性,结合遗传进化分析结果推断,我国大陆地区流行的 EV71 株在进化上属于同一组,我国手足口病流行,其病原主要为 CAV16 和 EV71 型。

本研究中 237 例手足口病病人检出肠道病毒 133 例 (56.1%),其中 EV71 特异性检测 38 例 (28.6%),CAV16 特异性检测 64 例 (48.1%),且无交叉阳性。12 例克隆基因序列片段经国际 GenBank 证实 10 例血清型与特异性 PCR 检测结果相符合,另有 2 例为 CAV5 和 ECHO13,提示特异性引物检测特异性高,本地区 HFMD 仍然以 EV71,CAV16 为主,同时 CAV5 和 ECHO13 感染也是可能原因之一。2000 年,国内李秀珠等^[6]在对手足口病的研究中也曾发现一株 ECHO13。

通常情况下, EV71 与 CAV16 引起的手足口病在临床症状等方面难以区别,但 EV71 易致无菌性脑膜炎、脑干脑炎和脊髓灰质炎样麻痹等多种神经系统相关性疾病,可危及生命;流行病学研究表明二者常常伴随流行引起手足口病暴发。CAV16 往往是主要的病原,常常超过感染总人数的 60%。EV71 感染

的临床症状在不同地区、不同时间表现不尽相同,有的表现手足口病为主,中枢神经系统症状较少,有的则相反^[8,9]。

尽管大量国内外研究认为, EV71, CAV16 所致 HFMD 临床表现大致相同, EV71 更多伴发中枢神经系统症状,但本研究 EV71, CAV16 所致手足口病临床表现在发病年龄,发热程度,发热持续时间,皮疹,以及合并症方面均无明显差别,而且临床症状普遍较轻微,经过良好。

Ho 等报道^[3], EV 感染有明显的季节性,夏秋季节感染率较高,但本研究病例以春夏季为多,全年均发,冬季比例并不低,可能与本地区冬春气温较高有关。

[参 考 文 献]

- [1] Robinson CR, Doanc FW, Rhodes AJ. Report of an outbreak of febrile illness with pharyngeal lesion and exanthem: Toronto, 1957 Isolation of group A Coxsackie virus [J]. Canad Med Assoc J, 1958, 79(3):615-621.
- [2] Chan LG, Parashar UD, Lye MS, Ong FG, Zaki SR, Alexander JP, et al. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in sarawak, malaysia; clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group [J]. Clin Infect Dis, 2000, 31(3):678-683.
- [3] Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan [J]. N Engl J Med, 1999, 341(13):929-935.
- [4] Zheng ZM, He PJ, Caueffield D, Neumann M, Specter S, Baker CC, et al. Enterovirus 71 isolated from China is serologically similar to the prototype EV71 BrCr strain but differs in the 5'-noncoding region [J]. J Med Virol, 1995, 47(2):161-167.
- [5] 何雅青, 杨帆, 李良成, 杨洪, 陈淑霞, 金奇. 我国深圳地区手足口病患者肠道病毒 71 型的分离与鉴定 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13(1):83-84.
- [6] 李秀珠, 胡家瑜, 丁晓光, 张家琪. 上海市手足口病患者肠道病毒 71 型的分离 [J]. 中国计划免疫, 2003, 9(1):35-37.
- [7] 林思恩, 章青, 谢华萍, 谢健萍, 何家鑫, 董巧丽, 等. 我国广东、福建地区 2000-2001 年手足口病肠道病毒 71 型分离株的种系进化分析 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(3):327-329.
- [8] Fujimoto T, Chikahira M, Yoshida S, Ebara H, Hasegawa A, Tot-suka A, et al. Outbreak of central nervous system disease associated with hand, foot, and mouth disease in Japan during the summer of 2000: detection and molecular epidemiology of enterovirus 71 [J]. Microbiol Immunol, 2002, 46(9):621-627.
- [9] Chong CY, Chan KP, Shah VA, Ng WY, Lau G, Teo TE, et al. Hand, foot and mouth disease in Singapore: a comparison of fatal and non-fatal cases [J]. Acta Paediatr, 2003, 92(10):1163-1169.

(本文编辑:吉耕中)