

· 疾病控制 ·

绍兴市手足口病病毒型别检测结果分析

蒋卓婧¹, 葛小萍², 陈金堃¹, 王吉玲¹

1.绍兴市疾病预防控制中心微生物检验科, 浙江 绍兴 312071; 2.萧山区疾病预防控制中心, 浙江 杭州 311200

摘要: **目的** 了解绍兴市手足口病病毒型别分布, 为手足口病防治工作提供参考。**方法** 收集2018—2020年绍兴市手足口病监测哨点医院14岁以下手足口病病例的肛拭子/咽拭子标本, 采用实时荧光定量PCR和BLAST序列比对测定肠道病毒型别, 描述性分析肠道病毒型别构成及流行时间分布。**结果** 2018—2020年收集肛拭子/咽拭子标本1 267份, 检出阳性661份, 阳性率为52.17%。其中肠道病毒71型(EV71)70份, 阳性率为5.52%; 柯萨奇病毒A组16型(CoxA16)208份, 阳性率为16.42%; CoxA6型239份, 阳性率为18.86%; CoxA10型23份, 阳性率为1.82%; 其他型别121份, 成功测序84份, 检出CoxA2、CoxA4和CoxA5等10种型别。2018—2020年EV71型阳性率分别为14.08%、0.72%和1.84%, 2018年4—7月为检出高峰; CoxA16型阳性率分别为10.98%、26.57%和11.98%, 2019年4—8月和11—12月为检出高峰; CoxA6型阳性率分别为10.50%、14.73%和30.88%, 2020年5—12月为检出高峰。**结论** 2018—2020年绍兴市手足口病的主要肠道病毒型别为EV71、CoxA16和CoxA6型, 且CoxA6型检出有上升趋势。

关键词: 手足口病; 肠道病毒; 基因型别

中图分类号: R725.1

文献标识码: A

文章编号: 2096-5087 (2022) 05-0507-04

Genotype analysis of enteroviruses causing hand, foot and mouth disease in Shaoxing City

JIANG Zhuojing¹, GE Xiaoping², CHEN Jinkun¹, WANG Jiling¹

1. Microbiological Laboratory, Shaoxing Center for Disease Control and Prevention, Shaoxing, Zhejiang 312071, China;

2. Xiaoshan Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 311200, China

Abstract: Objective To investigate the genotypes of enteroviruses causing hand, foot and mouth disease (HFMD) in Shaoxing City, so as to provide insights into HFMD control. **Methods** The anal and pharyngeal swab specimens were collected from HFMD cases under 14 years of age reported by sentinel hospitals of HFMD in Shaoxing City from 2018 to 2020. The enterovirus genotypes were determined by quantitative real-time PCR (qPCR) assay and sequenced by BLAST, and the constitution and temporal distribution of enterovirus genotypes were descriptively analyzed. **Results** A total of 1 267 anal and pharyngeal swab specimens were collected from children with HFMD, and 661 specimens were positive for enteroviruses, with a positive rate of 52.17%. Among the 661 enterovirus-positive specimens, 70 specimens were tested positive for EV71 (5.52%), 208 specimens tested positive for CoxA16 (16.42%), 239 specimens tested positive for CoxA6 (18.86%); 23 specimens tested positive for CoxA10 (1.82%), and 121 specimens tested positive for other 10 genotypes, including CoxA2, CoxA4, and CoxA5. The prevalence rates of EV71 were 14.08%, 0.72% and 1.84% from 2018 to 2020, and the detection of EV71 peaked during the period between April and July, 2018. The prevalence rates of CoxA16 were 10.98%, 26.57% and 11.98 from 2018 to 2020, and the detection of CoxA16 peaked during the period between April and August, and between November and December, 2019. The prevalence rates of CoxA6 were 10.50%, 14.73% and 30.88% from 2018 to 2020, and the detection of CoxA6 peaked during the period between May and December, 2020. **Conclusions** EV71, CoxA16 and CoxA6 were predominant enterovirus genotypes causing HFMD

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2022.05.017

作者简介: 蒋卓婧, 硕士, 主管技师, 主要从事病原微生物分子检测工作

通信作者: 蒋卓婧, E-mail: 526836824@qq.com

in Shaoxing City from 2018 to 2020, and the detection of CoxA6 appeared a tendency towards a rise.

Keywords: hand, foot and mouth disease; enteroviruses; genotype

手足口病是由多种肠道病毒引起的儿童急性传染病,具有传播快、流行性强的特点,多发生于5岁以下儿童^[1]。2016—2019年浙江省主要监测的手足口病病原体为肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒A组16型(Coxsackievirus A16, CoxA16)^[2],其中EV71易引起严重中枢神经系统并发症,可导致患儿死亡^[3]。但2010年以来,英国、法国和芬兰等地频繁报告CoxA6和CoxA16等型别肠道病毒暴发疫情^[4-6];北京、深圳和广州等国内一线城市CoxA6型阳性率也呈明显增长趋势^[7-9],逐渐成为手足口病肠道病毒的优势基因型。本研究对2018—2020年浙江省绍兴市手足口病病例标本进行病原学检测,分析相关肠道病毒的分布情况,为手足口病防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集2018—2021年绍兴市6家手足口病监测哨点医院(绍兴市妇幼保健院、绍兴市中心医院、诸暨市人民医院、上虞区人民医院、嵊州市人民医院和新昌县人民医院)14岁以下疑似手足口病病例的肛拭子/咽拭子标本。病例监护人均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 采用聚丙烯纤维拭子采集手足口病病例肛拭子/咽拭子标本,置于病毒采样管内,充分振荡混匀,4℃冷藏运送至绍兴市疾病预防控制中心实验室检测肠道病毒核酸。

1.2.2 EV71、CoxA6、CoxA10和CoxA16检测 采用TianGen磁珠法病毒DNA/RNA提取试剂盒(北京天根生化科技)提取标本总RNA。采用Takara One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Realtime) 扩增试剂盒(日本, Takara)以及EV通用、EV71、CoxA6、CoxA10和CoxA16引物探针扩增肠道病毒核酸并确定分型。引物由浙江省疾病预防控制中心微生物所提供。反应体积25 μL, 反应程序: 42℃ 30 min; 95℃ 2 min, 95℃ 5 s, 55℃ 35 s, 40个循环。样本Ct值≤35, 且扩增曲线呈典型的“S”形判为病毒核酸检测阳性; 无Ct值或Ct值≥40判为病毒核酸检测阴性; Ct值>35且<40需重复检测, 若Ct值<40判为病毒核酸检测阳性。分型判定标准: 若EV通用引物检测阴性, 则结果为阴性; 若EV通用引物检测阳性, 且EV71、CoxA6、CoxA10或CoxA16引

物检测阳性, 则判定为相应分型阳性; 若仅EV通用引物检测阳性, 则按照1.2.3测序。

1.2.3 其他肠道病毒分型检测 其他肠道病毒分型测序引物的5'非编码区设计参考文献[9], 引物EVtypeF1: 5'-A (C/T) C (T/C) TTGT (A/G) CGCCT-GTTTT-3'; 引物EVtypeR2: 5'-CCCAAAGTAGTCG-GTTCCGC-3'; 引物EVtypeF3: 5'-G (T/A/G) A (C/T) C (T/C) TTGT (A/G) CGCCTGTTT-3'; 引物EVtypeR4: 5'- (A/G) (G/A) GAAACACGGAC (A/G) CCCAAA-3'。采用HighPure Viral Nucleic Acid Kit (瑞士, Roche) 提取标本总RNA。采用One Step PrimerScript™ RT-PCR Kit (日本, Takara), 反转录总RNA获得cDNA。使用EVtypeF1与EVtypeR2组合引物对反转录产物进行扩增和电泳; 若扩增效果不佳, 则换用EVtypeF3与EVtypeR4组合。电泳片段符合预期大小的PCR产物送上海伯杰医疗科技有限公司测序列, 采用BLAST序列比对鉴定型别。描述性分析2018—2021年绍兴市手足口病肠道病毒型别构成和流行时间分布情况。

1.3 统计分析 采用Excel 2019软件整理和分析数据。

2 结果

2.1 肠道病毒检出情况 2018—2020年检测手足口病病例肛拭子/咽拭子标本1267份, 检出阳性661份, 阳性率为52.17%。其中检出EV71型70份, 阳性率为5.52%; CoxA16型208份, 阳性率为16.42%; CoxA6型239份, 阳性率为18.86%; CoxA10型23份, 阳性率为1.82%。见表1。检出其他肠道病毒型别121份, 成功测序84份, 包括CoxA2型22份、CoxA4型27份、CoxA5型12份、CoxA12型7份、CoxA9型1份、CoxB5型2份、CoxB2型3份、埃可病毒(echovirus, E) 1型1份、E2型2份和E18型7份。

2.2 EV71、CoxA16和CoxA6型流行时间分布 2018年EV71型阳性率较高, 为14.08%; 4—7月出现检出高峰, 其中5月阳性率最高, 为40.00%。2019年和2020年EV71型阳性率均较低, 分别为0.72%和1.84%。

2019年CoxA16型阳性率较高, 为26.57%; 4—8月出现检出高峰, 其中6月阳性率最高, 为

48.44%；11—12月出现小高峰，其中12月阳性率为38.89%。2018年和2020年CoxA16型阳性率分别为10.98%和11.98%，其中2018年3月和2020年11月阳性率较高，分别为36.84%和33.33%。

2020年CoxA6型阳性率较高，为30.88%；5—

12月出现检出高峰，其中10月阳性率最高，为61.54%。2018年和2019年CoxA6型阳性率分别为10.50%和14.73%，其中2018年8月和2019年7月阳性率较高，分别为29.03%和24.00%。见表1和图1。

表1 2018—2020年绍兴市手足口病病例主要肠道病毒检出情况

Table 1 The common enteroviruses isolated from hand, foot and mouth disease cases in Shaoxing City from 2018 to 2020

年份Year	EV71		CoxA16		CoxA6		CoxA10	
	例数Cases	阳性率Positive rate/%						
2018	59	14.08	46	10.98	44	10.50	9	2.15
2019	3	0.72	110	26.57	61	14.73	1	0.24
2020	8	1.84	52	11.98	134	30.88	13	3.00
合计Total	70	5.52	208	16.42	239	18.86	23	1.82

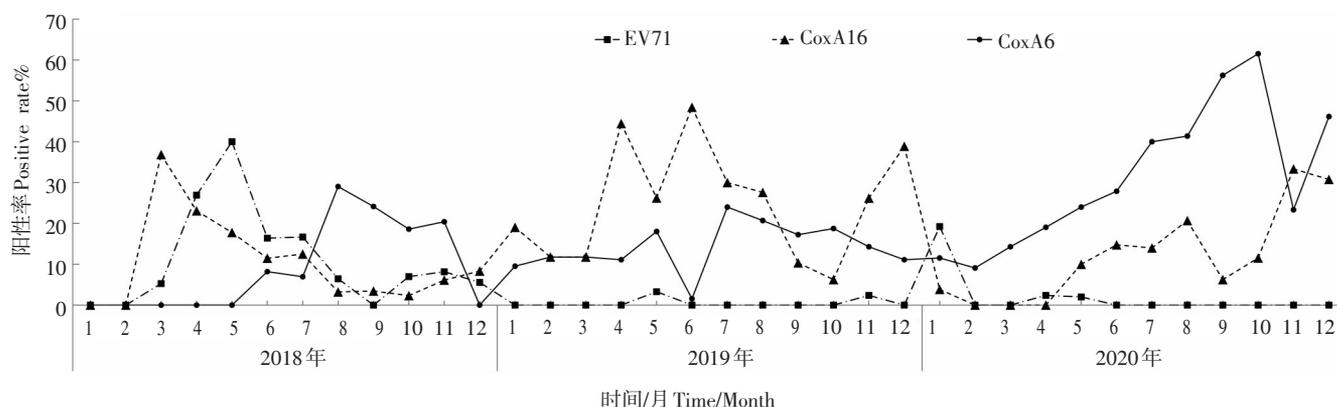


图1 2018—2020年绍兴市手足口病病例EV71、CoxA16和CoxA6型检出时间分布

Figure 1 Time distribution of EV71, CoxA16 and CoxA6 isolated from hand, foot and mouth disease cases in Shaoxing City from 2018 to 2020

3 讨论

本研究结果显示，2018—2020年绍兴市手足口病病例检出14种肠道病毒，以EV71、CoxA16和CoxA6型为主，其他肠道病毒包括CoxA10、CoxA4、CoxA2、CoxB型和E型等。YANG等^[9]从安阳市2011—2015年收集的1863份阳性标本中检测出23种其他肠道病毒。钟家禹等^[10]对广州市2016—2017年手足口病流行病学研究时发现其他肠道病毒阳性标本占45.96%，其中CoxA6型为主，占26.32%，其次是CoxA10型，占15.79%。武晶等^[11]发现北京市丰台区2015—2019年手足口病聚集性疫情主要病原体为CoxA6型，占37.71%。王浩权等^[12]分析上海市嘉定区2015—2020年手足口病流行特征时发现优势病原体为CoxA6型，占57.07%，其次为CoxA16

型，占25.93%，2018年后EV71型手足口病发病率呈下降趋势。本研究结果与同类报道类似。

本研究显示，EV71型2018年阳性率较高，为14.08%，2019年和2020年呈低水平流行；CoxA16型在2019年4—8月和11—12月阳性率较高；CoxA6型阳性率逐年递增，分别为10.50%、14.73%和30.88%，在2020年成为优势病原体。研究表明，在EV71型和CoxA16型长期流行后，人群可能积累了由EV71型和CoxA16型诱导的高滴度抗体，但这些抗体不能保护易感人群免受其他肠道病毒型别的感染^[13]。CHEN等^[14]对2009—2010年分离的CoxA6毒株分析发现3'-UTR中5个独特的核苷酸变化，以及主要位于3CD蛋白中的23个氨基酸存在差异，提示CoxA6型可能已成为一种高度重组的毒株，有效避开了人类的免疫反应。在后续工作中应加强对

CoxA6型的监测,关注变异毒株的流行状况,包括对毒株进行全基因组测序,以确定CoxA6型的变异对传播能力和致病效果的影响。

综上所述,2018—2020年绍兴市手足口病病例检出肠道病毒以CoxA6、CoxA16和EV71型为主,其中CoxA6为2020年优势病原体。随着EV71疫苗在国内成功应用,应加强对EV71和CoxA16以外型别肠道病毒的流行病学监测,为后续手足口病预防接种计划的制定提供参考。

参考文献

- [1] LI P, WANG N, MA W, et al. Hand, foot, and mouth disease in mainland China [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14 (4): 308-318.
- [2] 庞孟涛, 李傅冬, 林君芬, 等. 2016—2019年浙江省手足口病流行特征 [J]. *预防医学*, 2022, 34 (3): 307-310.
PANG M T, LI F D, LIN J F, et al. Epidemiological characteristics of hand, foot and mouth disease in Zhejiang Province from 2016 to 2019 [J]. *Prev Med*, 2022, 34 (3): 307-310.
- [3] ZHAO Y Y, JIN H, ZHANG X F, et al. Case-fatality of hand, foot and mouth disease associated with EV-A71: a systematic review and meta-analysis [J]. *Epidemiol Infect*, 2015, 143 (14): 3094-3102.
- [4] SIMMONDS P, SREENU V B, WARIS M, et al. Genetic characterization of human Coxsackievirus A6 variants associated with atypical hand, foot and mouth disease: a potential role of recombination in emergence and pathogenicity [J]. *J Gen Virol*, 2015, 96 (5): 1067-1079.
- [5] MIRAND A, LE SAGE F, PEREIRA B, et al. Ambulatory pediatric surveillance of hand, foot and mouth disease as signal of an outbreak of Coxsackievirus A6 infections, France, 2014-2015 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22 (11): 1884-1893.
- [6] BLOMQUIST S, KLEMOLA P, KAIJALAINEN S, et al. Co-circulation of Coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland [J]. *J Clin Virol*, 2010, 48 (1): 49-54.
- [7] LI J, SUN Y, DU Y, et al. Characterization of coxsackievirus A6- and enterovirus 71-associated hand foot and mouth disease in Beijing, China, from 2013 to 2015 [J/OL]. *Front Microbiol*, 2016, 7 [2022-03-21]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00391>.
- [8] 姚相杰, 陈龙, 王伟琪, 等. 2012—2015年深圳市重症手足口病患儿柯萨奇病毒A6型VP1~VP4基因特征分析 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2019, 39 (1): 24-29.
YAO X J, CHEN L, WANG W Q, et al. Sequence analysis of VP1-VP4 genes of coxsackievirus A6 strains isolated from children with severe hand, foot, and mouth disease in Shenzhen from 2012 to 2015 [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2019, 39 (1): 24-29.
- [9] YANG L, BAO H, ZHANG X, et al. Epidemiological and genetic analysis concerning the non-enterovirus 71 and non-coxsackievirus A16 causative agents related to hand, foot and mouth disease in Anyang City, Henan Province, China, from 2011 to 2015 [J]. *J Med Virol*, 2017, 89 (10): 1749-1758.
- [10] 钟家禹, 李柏生, 朱冰, 等. 2016年至2017年广州市手足口病流行病学及非肠道病毒A组71型非柯萨奇病毒A组16型肠道病毒型别分析 [J]. *中华传染病杂志*, 2018, 36 (12): 747-751.
ZHONG J Y, LI B S, ZHU B, et al. Hand, foot, and mouth disease in Guangzhou, 2016-2017: an epidemiological study and genotype analysis of non-enterovirus group A 71 non-coxsackievirus group A 16 enterovirus [J]. *Chin J Infect Dis*, 2018, 36 (12): 747-751.
- [11] 武晶, 张建军, 杨霄星, 等. 丰台区手足口病聚集性疫情病原体分析 [J]. *预防医学*, 2021, 33 (4): 404-405.
WU J, ZHANG J J, YANG X X, et al. Pathogen spectrum of hand-foot-and-mouth disease clusters in Fengtai District [J]. *Prev Med*, 2021, 33 (4): 404-405.
- [12] 王浩权, 马飞飞, 龚刚, 等. 2015—2020年嘉定区手足口病流行特征 [J]. *预防医学*, 2021, 33 (10): 1065-1067.
WANG H Q, MA F F, GONG G, et al. Epidemiological characteristics of hand-foot-and-mouth disease in Jiading District from 2015 to 2020 [J]. *Prev Med*, 2021, 33 (10): 1065-1067.
- [13] CHOU A H, LIU C C, CHANG J Y, et al. Immunological evaluation and comparison of different EV-A71 vaccine candidates [J/OL]. *Clin Dev Immunol*, 2012 [2022-03-21]. <https://doi.org/10.1155/2012/831282>.
- [14] CHEN Y J, CHANG S C, TSAO K C, et al. Comparative genomic analysis of coxsackievirus A6 strains of different clinical disease entities [J/OL]. *PLoS One*, 2013 [2022-03-21]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052432>.

收稿日期: 2021-10-18 修回日期: 2022-03-21 本文编辑: 吉兆洋