中文摘要

2016～2021 年哈尔滨地区监测病例手足口病流行状况及其基因特征研究

背景

手足口病（Hand-foot-mouth disease，HFMD）是肠道病毒（Enterovirus，EV）引起的急性发热性疾病，以手、足、口等部位出现特征性疱疹为典型症状，5 岁以下的儿童更加容易感染。虽然国内外不乏对手足口病的研究，对流行规律和趋势的系统研究不多。

黑龙江省是手足口病发病较重的地区之一，哈尔滨纬度较高，属于温带季风气候，同时地处松花江流域，夏季暖热多雨，有时昼夜温差现象明显，是手足口病流行的地域因素。近年来哈尔滨手足口病疫情暴发的频率超过黑龙江省的平均水平。因此，对哈尔滨地区手足口病临床特征、病原学特征、基因重组、分子流行病学特征等进行研究，能够为哈尔滨地区及时进行手足口病防控工作提供有效的实验室数据，为诊疗救治提供有力的预判。

方法

收集 2016-2021 年哈尔滨市哨点医院（儿童医院、哈尔滨市第六医院）及各区县疾控中心送检手足口病的口咽拭子、肛拭子和其他样品 2881 例，进行统计学描述与分析。通过实时荧光定量 PCR 法筛检肠道病毒 A71（enterovirus A71,EV-A71）、柯萨奇病毒 A10（CoxsackievirusA10,CV-A10）、柯萨奇病毒 A16（CoxsackievirusA16,CV-A16）和柯萨奇病毒 A6（CoxsackievirusA6,CV-A6）。挑选 CV-A6、CV-A16 和 EV-A71 阳性的部分样本，针对部分 VP1 基因进行 PCR 扩增测序，并从 GenBank 数据库中下载代表性的参考序列，构建 CV-A16、CV-A6 和 EV-A71 系统发育树分析。

结果

1. 2016 年-2021 年，收到送检 2881 份样本，手足口病阳性检出 2005 份，阳性检出率为 69.86%。2016-2019 年分别送检 487、582、861、826 份样品，阳性

（阳性率）分别检出 334（68.58%）、348（65.91%）、896（69.22%）、602（72.88%）份。2020 年因新冠病毒疫情，仅收到样品 11 例（均阴性）未纳入分析；2021 年送检 168 份样品，阳性检出 125 份，阳性检出率 74.40%；重症病例的病原以 EV-A71 为主；哨点医院与区县疾控送样的阳性病原谱不同，即 CV-A6 和 CV-A10 的构成比存在显著差异。

2. 哈尔滨地区手足口病的患病人群主要是 5 岁以下婴幼儿，占 80.35%；手足口病患儿在 EV-A71、CV-A6、CV-A10 和 CV-A16 病原检出中无显著的性别差异，而在其他 EV 型的病原检出中存在性别差异（$P<0.05$），男性多于女性；哈尔滨地区手足口病发病，存在明显的季节性，全年流行分布呈单峰状，1-4 月发病人数较少甚至没有，处于低流行阶段，自 5 月份起发病人数增加，7-8 月为发病高峰，9 月后下降；哈尔滨地区手足口病病例，主要集中在哈尔滨主城区。

3. CV-A16 和 CV-A6 为哈尔滨地区手足口病主要病原，分别占比 27.53%和 26.23%。2016-2021 年 CV-A6 属于 D3 亚型，CV-A16 为 B1a 亚型和 B1b 亚型，EV-A71 属于 C4 亚型，与近年来国内各基因型优势株流行趋势相符。多与各年北京流行株同源性高，整体上未发现核苷酸片段的缺失和插入现象。

关键词

手足口病，哈尔滨地区，病原监测，流行特征

Abstract

Epidemic status and genetic characteristics of hand-foot-mouth disease among sentinel surveillance cases in Harbin from 2016 to 2021

Background

Hand-foot-mouth disease (HFMD) is an acute febrile disease caused by enteroviruses (EV), characterized by herpes in the hands, feet, and mouth. Children under the age of 5 are more susceptible to infection. Although there were number of researches on HFMD around the world, there are still many key problems that cannot be solved. Heilongjiang Province is one of the regions with heavy HFMD in China. As the center of medical and health in the province, Harbin, the provincial capital, the HFMD sample probably collected from the whole province; Harbin has a high latitude and belongs to the temperate monsoon climate. At the same time, it is in the Songhua River basin. It is warm and rainy in summer, and sometimes the temperature between day and night is obvious. It is the regional factor of HFMD epidemic. In recent years, the frequency of HFMD outbreaks in Harbin is higher than the average level in Heilongjiang Province. Therefore, the study of clinical characteristics, pathogenic characteristics, gene recombination, molecular epidemiological characteristics of HFMD in Harbin can provide effective laboratory data for the timely arrangement of prevention and control of HFMD in Harbin, and provide a powerful prediction for diagnosis and treatment.It provides scientific basis for relieving the pressure of medical services, saving medical resources, and helping to improve the level and capacity of primary medical services.

Method

This study collected 2881 cases of oropharyngeal swabs, anal and other samples swab of HFMD submitted by the HFMD sentinel hospital (Harbin Children's Hospital and Harbin the Sixth Hospital) and various district and county CDC from 2016 to 2021, and carry out statistical description and analysis. The enterovirus A71 (EV-A71),

coxsackievirus A10 (CV-A10), coxsackievirus A16 (CV-A16) and coxsackievirus A6 (CV-A6) were screened by Real-time PCR. Carried some samples with positive CV-A6、CV-A16 and EV-A71, carried out PCR amplification and sequencing for some VP1 genes, downloaded representative reference sequences from GenBank database, and constructed phylogenetic tree to analyse CV-A16、CV-A6 and EV-A71.

Result

1. From 2016 to 2021, 2881 samples were received for inspection, and 2005 samples were positive, and the positive detection rate was 69.86%. The details are as follows: from January to December in 2016, the positive detection rate was 68.58% (334/487). CV-A16 and CV-A6 were the main epidemic pathogens, with the positive proportions of 38.33% and 25.15% respectively. From January to December in 2017, the positive detection rate was 65.91% (348/528). EV-A71 was the main epidemic pathogen, with a positive rate of 46.84%. From January to December in 2018, the positive detection rate was 69.22% (596/861). CV-A6 and CV-A16 were the main epidemic pathogens, with the positive rates of 32.21% and 30.03% respectively. From January to December in 2019, the positive detection rate was 72.88% (602/826). CV-A16 and CV-A6 were the main epidemic pathogens, with the positive rates of 30.73% and 29.73% respectively. In 2020, due to the COVID-19 epidemic, only 11 samples (all negative) were received and not included in the analysis. From January to December in 2021, the positive detection rate was 74.40% (125/168). Other EV unclassified viruses and CV-A16 were the main epidemic pathogens, with the positive rates of 47.20% and 31.20% respectively. There was no significant difference in the positive rate of HFMV in these years. EV-A71 was the main pathogen of severe cases. The positive pathogen spectrum of sentinel hospitals and district/county CDC samples was different, that is, the constituent ratio of CV-A6 and CV-A10 is significantly different.

2. In Harbin, 80.35% HFMD cases were infected by children who under 5 years old; There was no significant gender difference in the pathogenic typing of EV-A71, CV-A6, CV-A10 and CV-A16 in children with HFMD, but there was gender difference in the pathogenic typing of other EV types ($P<0.05$), which male infection cases was more

than females. The incidence of hand-foot-mouth disease in Harbin had obvious seasonality. The epidemic distribution throughout the year shows a single peak. The number of patients with hand-foot-mouth disease had increased since May, and the incidence peak was from July to August, and it decreases after September. The number of patients with hand-foot-mouth disease had increased significantly since May, and the incidence peak was from July to August, and then showed a downward trend.. HFMD cases in Harbin are mainly concentrated in the main urban area of Harbin.

3. CV-A16 and CV-A6 were the main pathogens of HFMD in Harbin, accounting for 27.53% and 26.23% respectively. From 2016 to 2021, CV-A6 belonged to D3 subtype, CV-A16 belonged to B1a subtype and B1b subtype, and EV-A71 belonged to C4 subtype, consistent with the trend of prevalence of dominant strains of various genotypes in China in recent years. Most of them have high homology with Beijing epidemic strains in various years, and no deletion or insertion of nucleotide fragments has been found overall.

Keywords

HFMD, Harbin, aetiological detection, epidemic characteristics

关于学位论文使用授权的声明

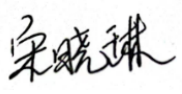
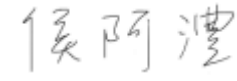
本人完全了解吉林大学有关保留、使用学位论文的规定，同意吉林大学保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅;本人授权吉林大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文级别：■硕士 □博士

学科专业：生物工程

论文题目：2016～2021 年哈尔滨地区监测病例手足口病流行状况及其基因特征研究

作者签名： 指导教师签名：

2023 年 3 月 15 日

目　录

中文摘要..... I
Abstract..... III
英文缩略词..... VIII
第 1 章 绪论..... 1
1.1 手足口病的流行概况..... 1
1.2 手足口病的病原学概况..... 2
1.3 临床常用的肠道病毒实验室诊断方法..... 5
1.3.1 Real-time RT-PCR..... 5
1.3.2 ELISA 法检测肠道病毒特异性 IgM 抗体..... 6
1.4 手足口病的预防和治疗..... 6
1.5 手足口病研究目的和意义..... 7
第 2 章 材料及方法..... 8
2.1 研究对象..... 8
2.1.1 样本及细胞来源..... 8
2.1.2 病例定义..... 8
2.1.3 样本采集与运输..... 8
2.2 主要试剂与仪器..... 9
2.2.1 主要实验仪器..... 9
2.2.2 主要试剂..... 9
2.2.3 主要溶液配制..... 10
2.3 实验方法..... 11
2.3.1 病例信息收集..... 11
2.3.2 标本处理..... 11
2.3.3 病毒核酸提取..... 11
2.3.4 实时荧光定量 PCR 筛查检测..... 12
2.3.5 病毒分离..... 13
2.3.6 病毒 VP1 基因扩增与测序分析..... 15
2.4 质量控制..... 17

2.5 统计分析.....18
第 3 章 结果.....19
3.1 哈尔滨地区手足口病的病原学监测结果.....19
3.1.1 手足口病的病原学分型结果.....19
3.1.2 手足口病的病毒接种分离鉴定.....20
3.2 基础流行病学分析.....21
3.2.1 哈尔滨市手足口病样本型别检出情况.....21
3.2.2 哈尔滨市分年龄和分性别手足口病病原分型情况.....23
3.2.3 哈尔滨市手足口病病例类型与病原分型相关情况.....29
3.2.4 哈尔滨市手足口病病例来源与病原分型相关情况.....29
3.2.5 哈尔滨市手足口病样本类型与病原分型相关情况.....31
3.2.6 哈尔滨市手足口病发病月份与病原分型相关情况.....33
3.2.7 哈尔滨市手足口病病例区域分布与病原分型相关情况.....34
3.3 手足口病的 VP1 基因分析.....40
3.3.1 CV-A6 的 VP1 全长基因组进化分析.....40
3.3.2 CV-A16 的 VP1 全长基因组进化分析.....42
3.3.3 EV-A71 的 VP1 全长基因组进化分析.....44
第 4 章 讨论.....47
4.1 哈尔滨市手足口病流行特征分析.....47
4.2 手足口病病原构成比分析.....50
4.3 手足口病病原体序列分析.....51
4.4 本研究的创新及展望.....53
4.4.1 创新处.....53
4.4.2 手足口病研究前景展望.....53
结论.....55
参考文献.....56
作者简介.....67
致谢.....68

英文缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
CV-A6	Coxsackievirus A6	柯萨奇病毒 A 组 6 型
CV-A16	Coxsackievirus A16	柯萨奇病毒 A 组 16 型
CV-A10	Coxsackievirus A10	柯萨奇病毒 A 组 10 型
CPE	Cytopathic effect	致细胞病变效应
TCID50	Median tissue culture infective dose	50%组织细胞感染量
ECHO	Enteric cytopathic human orphan virus	埃可病毒
EV-A71	Enterovirus A71	肠道病毒 A 组 71 型
EV	Enterovirus	肠道病毒
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附反应
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
HFMD	Hand food and mouth disease	手足口病
IgM	Immunoglobulin M	免疫球蛋白 M
NCBI	National Center for Biotechnology Information	国家生物技术中心
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
PCR	Polymerase chain reaction	多聚酶链式反应
PBS	Phosphate-buffered Saline	磷酸缓冲液
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链式反应
RD	Rhabdomyosarcoma	人横纹肌肉瘤细胞
VP1	Viral protein 1	VP1 蛋白
UTR	Untranslated Regions	非编码区
5'UTR	5'Untranslate Region	5'非编码区
3'UTR	3'Untranslate Region	3'非编码区
其他	Enterovirus U	其他类型肠道病毒

第 1 章 绪论

1.1 手足口病的流行概况

手足口病是一种由多种肠道病毒引起的常见传染病[1]，以手、足、口等部位出现特征性疱疹为典型症状的急性发热性疾病。发病的人群主要集中在儿童和青少年，5 岁以下的儿童更加容易感染。对于手足口病来说，一般有 3 到 5 天的潜伏期，一般重症主要是以肠道病毒 EV-A71 型为主，同时也有其他的类型，比如柯萨奇病毒 A16 型等[2]。目前部分感染病案仅表现为疱疹性咽峡炎或皮疹，大部分轻疾患者两周内可自愈，然而，少数患者仍然会出现脑炎、急性驰缓性麻痹、神经源性的肺水肿等症状。该病感染性强，传播途径繁杂，可短时间导致疫情。重症患者病情进展快，致死率高，容易引起社会恐慌[3]。2008-2017 年间，全国收到 18183889 例手足口病的报告，年均患病率为 134.75/10 万，累计报告死亡 3632 例，年平均报告死亡率为 0.027/10 万，而总死亡率则达到了 1.45/万[4]。

1957 年，英国学者 Seddon 首次描述了手足口病的症状[5]。1975 年在保加利亚暴发了由 EV-A71 造成的具备中枢系统病症的手足口病疫情，共有 705 名儿童感染，其中 149 人出现了急性驰缓性麻痹，而另外 44 名儿童因脑干脑炎而不幸去世，其中年龄小于 5 岁的儿童比例高达 93%[6]。1986 年荷兰暴发了主要由 EV-A71 感染造成的手足口病[7]。据资料显示，20 世纪 90 年代之前，CV-A16 是手足口病的关键病源，而在 20 世纪 90 年代以后 CV-A16 被 EV-A71 慢慢代替成为新的主要发病病原体[8]。手足口病真正在亚洲地区大规模暴发流行是在 20 世纪 90 年代以后，包括我国、越南、马来西亚、印度和柬埔寨等国家[9]。手足口病于 2005 年在越南胡志明市暴发，共有 764 名儿童，其中 52.1%为 CV-A16，42.1%为 EV-A71[10]。2006 年，主要由 CV-A16 病原体造成的手足口病在德国暴发[11]；2008 年，主要由 CV-A16 病原体造成的手足口病在新加坡暴发，此次暴发也是 2000 年以来手足口病最大规模的流行[12]，同年芬兰也暴发了以 CV-A6 病原体为主的手足口病，这也是 CV-A6 引起暴发的首次报道[13]。2009 年以后，亚洲多个国家及地区都先后发生了以 CV-A6 病原体为主的暴发流[14-17]，如 2009 年新加坡[12]、2011 年日本[18]、2009-2010 年台湾[19]、2012 年泰国[20]、2012 年底后我国的 CV-

A16 和 EV-A71 也逐步被 CV-A6 替代，CV-A6 早已正式变成手足口病暴发的关键病源[17]，我国的北京市[21]、广东省[22]和吉林省[23]于 2013 年均有 CV-A6 造成手足口病的报道。最近几年发表的文章中可以看出，中国及亚洲部分国家手足口病多发于夏季，哈尔滨市的 6、7 和 8 月为手足口病的高发期，但研究表明由 CV-A6 病原体为主的疾病可在冬季多发。2011 年-2013 年冬季美国、以色列、英国均有由 CV-A6 病原体为主的手足口病疫情[24-26]。而 CV-A6 暴发季节性特征尚不明确，有推测可能与全球气候变暖有关[27]。

1.2 手足口病的病原学概况

手足口病是由人肠道病毒引起的，包括了柯萨奇 A 组的 2-7 型、9-10 型和 16 型等，以 CV-A16、CV-A6 型较常见，柯萨奇 B 组的 1-5 型等，以 EV-A71 型较常见、埃可病毒（Echovirus，ECHO）等。肠道病毒对氧化剂、紫外线、热、干燥抵抗力较弱，对理化因素不敏感，抵抗力较强，耐低温和酸，容易变异。50℃时可迅速灭活，目前 EV-A71 分为 A、B、C 三种基因型，其中 A 型 BrCr 为原型株，B 型包涵 B1、B2、B3、B4、B5、B6 多种亚型，C 型则有 C1、C2、C3、C4、C5 多种亚型，十几年前我国就已经发现并分离出 C4 亚型，并延续流行至今[28, 29]。

肠道病毒的病毒的核衣壳为 20-30 纳米的二十面体对称球型结构（见图 1），无外膜。该病毒颗粒含有约 7.4Kb 的多肽链正链 RNA，只有一个开放阅读框（Open Reading Frame，ORF）。开放阅读框左边与 5′非编码区（5'Untranslate Region ，5′UTR）相接，带有多聚 A 与 3′非编码区（5'Untranslate Region，3′UTR）和另一边相接[30]。首先肠道病毒编码一个大概 2100 个氨基酸的多聚蛋白，并被进一步切割成三个蛋白质前体 P1、P2 和 P3。P1 被分裂成 VP1、VP2、VP3 和 VP4（Viral protein 4,VP4）四段病毒蛋白（见图 2）。另外，P2 和 P3 被切割产生 7 种非结构蛋白，其中 P2 被切割成 2A、2B 和 2C，P3 被切割成 3A、3B、3C 和 3D。这 7 种非结构蛋白的作用不同，大部分是具备酶活性的蛋白，如 2C 具备 ATP 酶活性，2A 和 3C 是蛋白酶，3D 是 RNA 依靠的 RNA 聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase，RdRp）[30]。肠道病毒的核衣壳由 60 种原聚体构成，每种原聚体由肠道病毒的 4 种结构蛋白构成。由 VP1、VP2 和 VP3 构成壳层表层，其中

VP4 位于壳层内部与体表的 VP2 和病毒基因组相连接，而 VP1-VP3 在二十面体的外表面[30]。

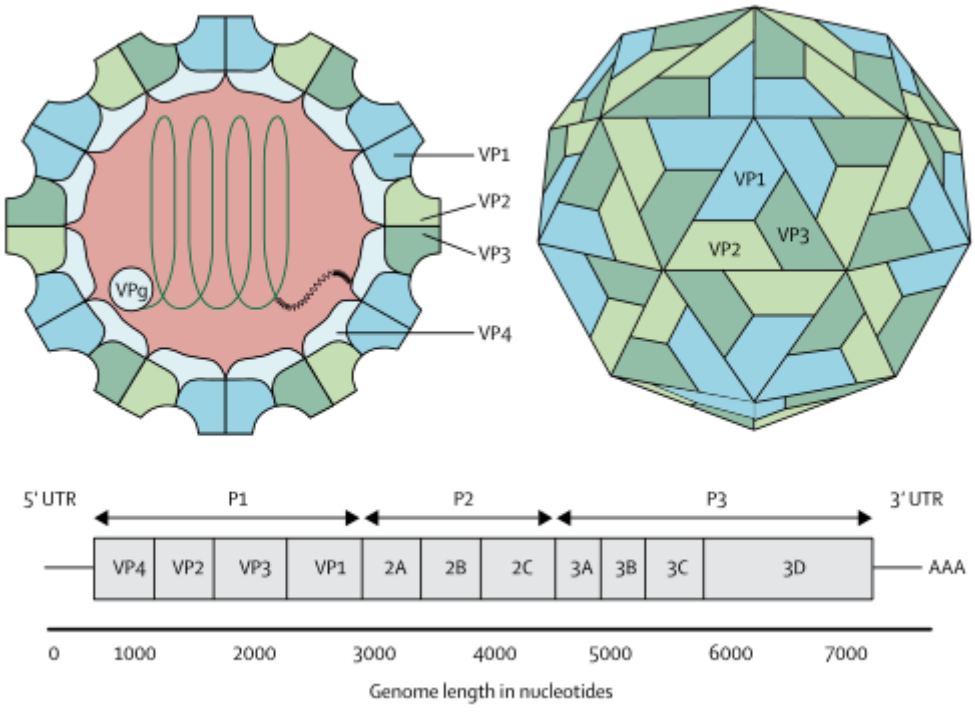


图 1　EV-A71 的基因组和结构蛋白[31]

Fig.1 Genome and structural protein of EV-A71[31].

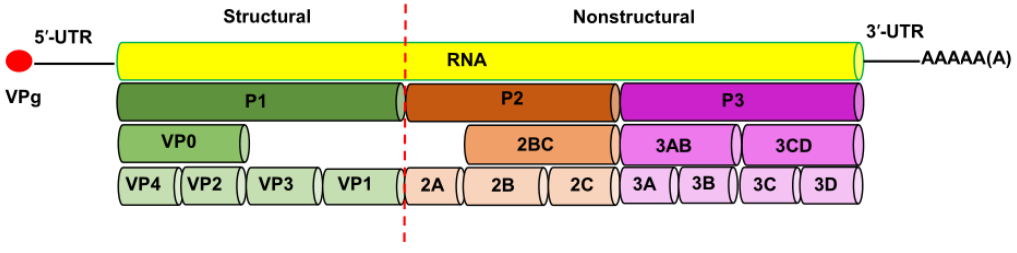


图 2　肠道病毒基因组结构[32]

Fig.2 Genome structure of enterovirus[32]

肠道病毒在安装过程中将产生五种可鉴别的病毒颗粒，包含确定的衣壳、前病毒颗粒、成熟并具有感染性病毒颗粒、A 病毒颗粒和病毒空壳[33]。病毒颗粒根据 VP0、VP1 和 VP3 组装成原聚体，五个原聚体组装产生五聚体亚模块，随后五聚

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：https://d.book118.com/628102104067006042