

手足口病和疱疹性咽峡炎加强监测方案

为顺利推进全国手足口病监测工作的开展，进一步优化手足口病、疱疹性咽峡炎等肠道病毒感染相关疾病的监测策略，特制订本方案。选定省份设定的哨点医院按照本方案开展手足口病重症与死亡病例、普通病例和疱疹性咽峡炎病例监测，全省面上仍按照《手足口病预防控制指南（2009）》的相关要求开展工作。

一、监测目的

（一）监测手足口病不同肠道病毒血清型构成、季节性动态变化，以及基因变异特征。

（二）掌握手足口病重症病例分布特征和临床严重程度；比较不同肠道病毒血清型引起重症病例临床表现及严重程度差异。

（三）了解疱疹性咽峡炎流行趋势和病原学特征。

二、病例定义与分类

（一）手足口病

1.临床诊断病例

符合以下临床表现，并排除其他相关疾病。

潜伏期一般为2~10天，平均3~5天。

急性起病，发热，手、足和臀部出现斑丘疹、疱疹，口腔黏膜或咽峡部出现散在疱疹。可伴有咳嗽、流涕、食欲不振、腹泻等症状。

部分病例仅表现为手、足和臀部皮疹和/或咽峡部疱疹。少数病例皮疹不典型，表现为细小沙粒状皮疹、单部位皮疹或无皮疹。

少数病例可累及中枢神经系统，表现为脑膜炎、脑炎、脑脊髓炎，甚至出现肺水肿、肺出血和/或循环功能障碍等，病情进展迅速，可致死亡。

2.确诊病例

临床诊断病例，并具有下列条件之一者。

(1) 用 RT-PCR、荧光定量 RT-PCR 等方法从患者鼻咽拭子、肛拭子、粪便、疱疹液、脑脊液或尸检标本中检测到 EV-A71 或 CVA16 等肠道病毒特异性核酸。

(2) 用 RD、HEp-2 或 Vero 等细胞系对患者鼻咽拭子、肛拭子、粪便、疱疹液、脑脊液或尸检标本进行病毒培养，可分离到 EV-A71 或 CVA16 等肠道病毒。

(3) 用 ELISA 或中和试验等方法检测患者血清中 EV-A71 或 CVA16 等肠道病毒 IgG 抗体，恢复期血清比急性期有 ≥ 4 倍升高或急性期抗体阴性而恢复期抗体阳转。

(4) 用 ELISA 等方法在患者血清或脑脊液中检测到抗 EV-A71 或 CVA16 等肠道病毒 IgM 抗体。

3.临床分型

根据疾病进程、临床严重程度和结局，分为普通病例、重症病例和死亡病例,相关病例定义具体如下。

(1) 普通病例（普通型）

手、足、臀部皮疹，或口腔黏膜疱疹，伴或不伴发热。

(2) 重症病例

根据临床分期分为重型和危重型：

1) 重型

出现中枢神经系统受累表现，如：精神差、嗜睡、易惊、谵妄；头痛、呕吐；肢体抖动、肌阵挛、眼球震颤、共济失调、眼球运动障碍；无力或急性弛缓性麻痹；惊厥。可见脑膜刺激征，腱反射减弱或消失。实验室血液检查可有白细胞和血糖升高。

2) 危重型

重型病例出现下列情况之一者：

- a) 频繁抽搐、昏迷、脑疝等严重中枢神经系统受损表现；
- b) 呼吸困难、血性泡沫痰、紫绀等呼吸功能障碍表现；
- c) 皮肤花斑、四肢冰凉、心率明显加快、血压明显上升或下降等循环功能障碍表现。

(二) 疱疹性咽峡炎

1. 临床诊断病例

急性起病，发热伴咽痛，咽部有充血，可见散在灰白色疱疹，直径约 1-2mm，四周绕有红晕，2-3 日后红晕加剧扩大，疱疹破溃形成黄色溃疡，数目多少不等。

2. 确诊病例

临床诊断病例符合下列条件之一者，即可诊断为实验室确诊病例：

(1) 用 RT-PCR、荧光定量 RT-PCR 等方法自咽拭子、粪便或肛拭子，及脑脊液、疱疹液、血清以及脑、肺、脾、淋巴结等组织标本中检测到人肠道病毒的特异性核酸。

(2) 用 RD、HEp-2 或 Vero 等细胞系对咽拭子、粪便或肛拭子，及脑脊液、疱疹液、血清以及脑、肺、脾、淋巴结等组织标本进行分离培养，分离到人肠道病毒。

(3) 恢复期血清标本中肠道病毒特异性中和抗体比急性期有 4 倍或 4 倍以上升高。

(4) 急性期血清肠道病毒 IgM 抗体阳性。

三、监测内容和要求

(一) 手足口病重症和死亡病例监测

1. 监测病例

所有诊断为手足口病重症和死亡的病例。

2. 病例报告和调查

全国各级各类医疗机构发现手足口病重症或死亡病例，应及时通过“中国疾病预防控制中心信息系统的监测报告管理模块”进行网络报告。由病例所属辖区疾控中心负责对监测病例进行流行病学调查，填写《手足口病重症或死亡病例个案调查表》（附表 1-1,1-2）。对于跨区域诊治的病例，由诊断重症或死亡的医疗机构所属辖区的疾控中心负责，必要时，可请上级疾控中心协调。省级疾控中心应负责个案调查的质量控制。

3. 标本的采集、检测和上送

所有重症与死亡病例均应采集标本进行肠道病毒检测。病例的采样由病例就诊的医疗机构指定专人（护士或医生）负责完成，并填写《手足口病/疱疹性咽峡炎病原学检测登记表》（附表 2）基本信息部分，填写过程中应进行信息核对，确保附表 2 中病例唯一识别码与样本标签一致。

（1）标本采集类型和采集时间

每例病例至少采集 1 份标本，优先采集粪便标本，其次是咽拭子或肛拭子，如未采集到上述标本，也可采集疱疹液、脑脊液或尸检标本进行检测。标本采集要求详见《手足口病/疱疹性咽峡炎标本采集及检测技术方案》（附件 1）。自行开展肠道病毒相关检测的医疗机构，仍需按要求留存病例样本，并送疾控机构检测。为保证检测结果的准确性和有效性，最好在病例发现当天和抗病毒药物使用前采集相关标本。

（2）核酸检测和信息录入

病例所属辖区疾控中心应在标本采集后 48 小时内将标本运送至对应的实验室开展核酸检测。实验室接到标本后应在 4 个工作日内完成 EV-A71、CVA16、CVA6 和 CVA10 以及其他肠道病毒的核酸检测，并填写附表 2 检测结果信息。鼓励有条件省份对重症和死亡病例开展 EV-A71、CVA16、CVA6 和 CVA10 之外的其他肠道病毒进一步分型鉴定。同时将检测结果反馈哨点医院，如检测结果为 EV-A71、CVA16、CVA6、CVA10 或其他肠道病毒阳性，由医疗机构负责及时在“中国疾病预防控制中心信息系统的监测报告管理模块”中将病例订正为确诊病例。

(3) 标本上送要求

重症、死亡病例标本由承担核酸检测任务的疾控中心实验室参照标本采集与检测技术方案（附件 1），对临床样本进行处理和分装，处理后的临床标本应进行一式三份分装。其中一份标本开展肠道病毒核酸检测，阳性标本全部上送省级疾控中心实验室进行病毒分离；一份标本上送省级疾控中心留存；一份标本根据需要上送中国疾控中心。

(二) 手足口病普通病例监测

1. 监测病例

15 岁以下（不含 15 周岁）临床诊断为手足口病普通病例的门急诊和住院病例。

2. 哨点医院的设置

根据儿童（0-14 周岁）人口数、既往手足口病发病水平、地理位置、医疗机构就诊情况、实验室检测能力，每省选择 1-2 家哨点医院，选择的哨点医院应至少涵盖本辖区 60% 以上手足口病就诊病例。哨点医院名单详见附件 2。

3. 监测内容和要求

(1) 监测任务量

哨点医院在手足口病流行季节每周至少采集 8 例普通病例标本，非流行季节每周至少采集 3 例普通病例标本。若病例数达不到采集量要求，则全部采样，标本采集要求同重症、死亡病例监测。各省流行季节分布和标本采集量初步测算详见《各省哨点医院手足口病/疱疹性咽峡炎标本采集数测算表》（附件 3）。因手足口病季节性流行规律存在地域差异，

各省可根据近年手足口病流行季节性特征，适当调整采样月份。

（2）病例报告和调查

哨点医院对发现的手足口病普通病例，应及时通过“中国疾病预防控制中心信息系统的监测报告管理模块”进行网络报告。对纳入监测的病例，同时由病例所属辖区疾控中心负责对监测病例进行流行病学调查，填写《手足口病普通病例个案调查表》（附表 1-3）。哨点医院负责按周填报该医院所有诊断为手足口病病例的就诊信息，相关信息按照门急诊病例和住院病例分开收集，填写《手足口病/疱疹性咽峡炎门急诊/住院登记表》（附表 1-5）。

（3）标本采集、运送和处理

1) 哨点医院对纳入监测的病例进行标本采集，填写附表 2 的标本采集信息，在采样瓶/管贴上病例唯一识别码和姓名后，立即由专人送至标本储存冰箱， -20°C 以下低温冷冻保存。哨点医院或辖区疾控中心每周定期送取标本及附表 2 病原学检测登记表。送取标本时应对每 1 份标本进行核对，确保附表 2 病原学检测登记表和采样瓶/管标本编号信息一一对应，验收合格后将标本运送至对应的实验室开展核酸检测。

2) 疾控中心实验室收到标本后，首先核对每 1 份标本的附表 2 病原学检测登记表和采样瓶/管标签，确保信息准确无误后，将标本制作成悬液，根据需要分装留存，并进行肠道病毒核酸检测。

3) 标本转运时间间隔一般不得超过 48 小时，运送中采用干冰或多排冰块保证冷链运送，避免反复冻融和日光照射。

4) 留存标本需在-20℃以下低温冷冻保藏至少 1 年。需长期保存的标本存于-70℃冰箱。

(4) 核酸检测和信息录入

疾控中心实验室接到标本后 7 个工作日内完成 EV-A71、CVA16、CVA6 和 CVA10 以及其他肠道病毒的核酸检测，并填写附表 2 检测结果信息。同时将检测结果反馈给哨点医院，如检测结果为 EV-A71、CVA16、CVA6、CVA10 或其他肠道病毒阳性，由医疗机构负责及时在“中国疾病预防控制中心信息系统的监测报告管理模块”中将病例订正为确诊病例。

(三) 疱疹性咽峡炎监测

1. 监测病例

15 岁以下（不含 15 周岁）临床诊断为疱疹性咽峡炎的门急诊和住院病例。

2. 监测内容和要求

(1) 监测任务量

选定的哨点医院在高发季节（同手足口病流行季）每周采集 5 份疱疹性咽峡炎普通病例标本，低发季节每周采集 3 份标本，若病例数达不到采集量要求，则全部采样。

(2) 病例报告和调查

哨点医院对纳入监测的疱疹性咽峡炎普通病例，应及时通过“中国疾病预防控制中心信息系统的监测报告管理模块”进行

网络报告。同时由病例所属辖区疾控中心负责对监测病例进行流行病学调查，填写《疱疹性咽峡炎个案调查表》（附表 1-4）。

（3）标本采集、运送和处理

标本采集要求同手足口病重症、死亡病例监测，同时填写附表 2 标本采集和检测信息。标本运送、处理、核酸检测等相关要求同手足口病普通病例监测要求。

（4）信息收集

哨点医院负责按周填报该医院所有诊断为疱疹性咽峡炎病例的就诊信息，相关信息按照门急诊病例和住院病例分开收集，填写《手足口病/疱疹性咽峡炎门急诊/住院登记表》（附表 1-5）。

（四）病毒分离和测序

负责核酸检测的实验室每月按要求填写核酸检测阳性标本信息，并将其随同标本一起送至省级疾控中心实验室进行病毒分离。省级疾控中心应在收到标本后 40 个工作日内完成病毒分离，填写《手足口病/疱疹性咽峡炎病毒分离结果登记表》（附表 3）。对分离的病毒开展全基因组测序，将测序结果通过邮箱上报中国疾控中心。

开展病毒分离的阳性标本选择要求为：所有手足口病重症与死亡病例的阳性标本均应开展病毒分离；手足口病普通病例、疱疹性咽峡炎门急诊和住院病例阳性标本的选择应考虑标本采集时间和地区的代表性，应涵盖不同肠道病毒血清型及未进一步分型的肠道病毒血清型。对手足口病普通病例

每年分离病毒株 30 株，如不足 30 株全部分离；对疱疹性咽峡炎门诊急诊和住院病例每年分离病毒株 5 株。

四、数据管理和反馈

（一）数据录入和关联

1.手足口病重症、死亡病例个案调查信息、手足口病普通病例和疱疹性咽峡炎的门诊急诊和住院病例个案调查信息采用双录入方式每周由专人录入相应的 epidata 数据库。在数据录入过程中，录入人员应对数据的完整性、准确性和逻辑性等进行核查，发现问题及时核实和修正。

2.个案调查信息与实验室检测结果通过“病例唯一识别码”可进行关联。“病例唯一识别码”编码规则为年份（2 位）+省代码（2 位）+市代码（2 位）+县代码（2 位）+标本类型（1 位）+3 位连续的数字（从 001 开始），共 12 位数字组成。其中标本类型“1”代表手足口病轻症病例、“2”代表手足口病重症病例、“3”代表手足口病死亡病例，“4”代表疱疹性咽峡炎病例。例如：2019 年河南省郑州市中原区第 1 例手足口病轻症病例编号：194101021001。

（二）数据存储、审核和上报

1.病例个案调查表和病原学检测登记表等原始记录数据由省级疾控中心代为保管，保存期限暂定 1 年。

2.手足口病重症和死亡病例、纳入哨点监测的手足口病和疱疹性咽峡炎病例的个案调查表信息和实验室检测结果等上报信息应由上级疾控中心进行逐级审核。省级疾控中心负责对本省监测数据的完整性和准确性进行审核。

3. 个案调查表epidata库、实验室核酸检测结果（附表2）以及《手足口病/疱疹性咽峡炎门诊急诊/住院登记表》（附表1-5），每月15号前通过邮件将上月录入信息和检测结果上报中国疾控中心。病毒分离结果（附表3）和测序结果每3个月通过邮件报送中国疾控中心。

4. 联系人：中国疾控中心传染病管理处 刘凤凤 宋杨
电话/传真：010-58900549/010-58900510

Email: liuff@chinacdc.cn songyang@chinacdc.cn

（三）数据反馈和共享

1. 负责检测的疾控机构将检测结果反馈相关医疗机构。如检测结果为EV-A71、CVA16、CVA6、CVA10或其他肠道病毒阳性，由医疗机构负责在“中国疾病预防控制中心信息系统的监测报告管理模块”中将病例订正为确诊病例，并注明检测结果。

2. 中国疾控中心对上报数据进行清理后反馈各省使用；每半年进行一次阶段性总结分析，在高发季节以监测简报的形式反馈各监测省份。

五、质量控制

（一）培训

中国疾控中心对监测省份监测工作要求和实验室检测技术进行培训。各省对本省哨点监测成员单位专业技术人员开展培训。

（二）实验室质量控制

1. 盲样考核

中国疾控中心每年对承担该监测工作的疾控机构实验室进行一次核酸检测盲样考核。根据监测工作开展情况，必要时开展病毒分离盲样考核。

2. 核酸检测结果复核

省级疾控中心对本省承担监测工作的实验室核酸检测结果进行随机抽查复核，每年抽取阳性标本 10% 及阴性标本 1%，标本应覆盖不同肠道病毒血清型阳性标本。市级实验室需根据省级疾控中心要求及时上送标本，填写附表 4 标本复核结果登记表的前半部分标本信息，并将附表与标本一起上送。省级疾控中心在收到标本 7 个工作日内完成复核并填写附表 4 中复核结果部分。

（三）监测过程评估

国家和省级疾控中心根据《手足口病/疱疹性咽峡炎监测过程评估表》（附表 5），定期对监测工作开展情况进行评估，评估指标包括工作完成情况、个案调查完整性、准确性和工作开展及时性等。

1. 工作完成情况

通过个案调查完成率、标本采样完成率和核酸检测完成率等指标进行工作完成情况评估。

个案调查完成率（%）=完成个案调查人数/纳入监测病例数*100；

标本采样完成率（%）=采集标本人数/应采样病例数*100；

核酸检测完成率（%）=检测标本人数/标本采集人数

*100;

毒株分离完成率(%)=完成分离毒株数/应分离毒株数

*100

2.及时性

通过标本采集后标本检测及时性、数据上报及时性等指标进行评估。

标本检测及时性=接收到标本后按规定时间内完成标本检测数/同期实际检测标本数*100

数据上报及时性=个案调查/实验室检测结果/病毒分离、测序等数据按照规定时间内完成报送数/同期应报送数据数*100

标本(毒株)上送及时性=规定时间内上送标本(毒株)数/同期应上送标本(毒株)数*100

3.完整性和准确性

对个案调查表中关键变量的完整性和准确性进行评估。关键变量包括病例姓名、性别、出生日期、疫苗接种信息、临床诊断及重症并发症相关信息。关键变量任何一项空缺或不准确的,均认为个案调查不完整或不准确。

(四)督导

根据工作运行情况,中国疾病预防控制中心对监测省份开展督导,对监测工作各环节运行的规范性进行现场评估,同时提供相关技术指导。省级疾病预防控制中心应对本省承担手足口病/疱疹性咽峡炎监测工作的地市级疾病预防控制中心实验室及医疗机构进行督导。

六、组织管理与职责分工

（一）中国疾控中心

1.负责全国手足口病/疱疹性咽峡炎监测工作的协调和管理，制订相关技术文件。

2.组织开展监测督导、考核、评估工作，及时反馈相关工作开展情况。

3.对监测数据定期进行清理、分析，形成分析报告，反馈各监测点成员单位。

4.负责肠道病毒实验室检测方法的建立、评估和监测省份实验室质量控制。

5.定期组织开展培训，对省级实验室提供相应的技术支持。

（二）省级疾控中心

1.负责本省手足口病/疱疹性咽峡炎监测工作的具体组织实施和管理、相关检测信息填报和信息审核；负责开展本省监测工作的督导、考核和评估。

2.负责本省肠道病毒检测阳性标本的病毒分离、测序和检测质量控制等工作；为地市级实验室和县（区）级实验室提供技术支持和培训。

3.根据防控需要，定期对监测数据进行分析和反馈，并报中国疾控中心。

4.负责本省监测数据审核、标本和毒株的统一报送。

（三）地市级疾控中心

1.负责本辖区内手足口病/疱疹性咽峡炎监测工作的具

体组织实施和管理；协助开展本辖区监测工作的督导、考核和评估。

2.负责本辖区肠道病毒核酸检测工作，按要求填报检测结果信息，保存和上送病例标本。

3.负责个案调查信息填报、审核，定期对本辖区的监测数据进行分析 and 反馈，并上报省级疾控中心。

（四）县（区）级疾控中心

1.负责本辖区监测工作的具体组织实施，按要求开展流行病学调查和处置，及标本收集、保存和运送等工作。

2.对手足口病重症、死亡病例进行追踪调查，并填写和录入个案调查信息；对纳入监测的手足口病和疱疹性咽峡炎病例开展个案调查，完成信息录入。

3.承担核酸检测任务实验室负责监测病例标本的核酸检测工作。

（五）医疗机构

各级各类医疗机构按照监测方案要求及时发现和报告病例，负责手足口病实验室诊断病例的订正；负责重症、死亡病例临床标本的采集和保存。哨点医院负责纳入病原监测的手足口病普通病例和疱疹性咽峡炎病例临床标本的采集、保存或运送，并协助疾控机构做好流行病学调查工作。

七、附表与附件

（一）附表

1-1 手足口病重症病例个案调查表

1-2 手足口病死亡病例个案调查表

1-3 手足口病普通病例个案调查表

1-4 疱疹性咽峡炎个案调查表

1-5 手足口病/疱疹性咽峡炎门急诊/住院登记表

2.手足口病/疱疹性咽峡炎标本病原学检测登记表

3.手足口病/疱疹性咽峡炎病毒分离结果登记表

4.手足口病/疱疹性咽峡炎标本复核结果登记表

5.手足口病/疱疹性咽峡炎监测过程评估表

(二) 附件

1.手足口病/疱疹性咽峡炎标本采集及检测技术方案

2.哨点医院一览表

3.各省哨点医院手足口病/疱疹性咽峡炎标本采集数测算表

附表 1-1

手足口病重症病例个案调查表

唯一识别码:	传染病报告卡卡片编号:	
基本人口学信息		
患者姓名: _____	患者性别: <input type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女	
患者身份证号: □□□□□□□□□□□□□□□□		
家长姓名: _____	患者家长联系电话: □□□□□□□□□□	
患者出生日期: ____年____月____日 (如生日不详, 则实足年龄为____岁或____月)		
现居住地址: ____省____市____县/区____乡____镇(街道)____村(社区)		
住址类型: <input type="checkbox"/> 城镇 <input type="checkbox"/> 农村 (注: 现居住地址指本次病程最初发病时的居住地址。)		
健康信息和既往病史		
1. 体重: ____公斤	2. 身高: ____厘米	3. 早产: <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 不清楚
4. 先天性疾病或慢性基础性疾病? <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无 <input type="checkbox"/> 不清楚		
4.1 如果有先天性疾病或慢性基础性疾病, 请详述 (可多选):		
<input type="checkbox"/> 先天性心脏病	<input type="checkbox"/> 食道闭锁	<input type="checkbox"/> 先天性肥厚性幽门狭窄症
<input type="checkbox"/> 先天性巨结肠症	<input type="checkbox"/> 先天性食管气管瘘	<input type="checkbox"/> 先天性肺囊肿
<input type="checkbox"/> 肺隔离症	<input type="checkbox"/> 小头畸形	<input type="checkbox"/> 大头畸形
<input type="checkbox"/> 脊髓膨出	<input type="checkbox"/> 脊柱裂	<input type="checkbox"/> 免疫系统缺陷性疾病
<input type="checkbox"/> 肠闭锁	<input type="checkbox"/> 支气管肺发育不全	<input type="checkbox"/> 脑积水
<input type="checkbox"/> 其他_____		
5. 是否接种过 EV-A71 疫苗? <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 不清楚 (如接种过, 填写下列信息)		
5.1 第 1 针: <input type="checkbox"/> 已接种, 接种日期: ____年____月____日, 疫苗接种单位: _____ <input type="checkbox"/> 未接种 <input type="checkbox"/> 不清楚		
5.2 第 2 针: <input type="checkbox"/> 已接种, 接种日期: ____年____月____日, 疫苗接种单位: _____ <input type="checkbox"/> 未接种 <input type="checkbox"/> 不清楚		
5.3 接种疫苗厂家: <input type="checkbox"/> 中国医学科学院昆明医学生物学研究所 <input type="checkbox"/> 北京科兴生物制品有限公司 <input type="checkbox"/> 国药中生生物技术研究院有限公司		
5.4 以上疫苗接种信息是如何获得的: <input type="checkbox"/> 接种本 <input type="checkbox"/> 家长回忆 <input type="checkbox"/> 查阅接种信息登记系统 (注: 接种信息证明附在个案登记表后)		
临床信息收集		
一、发病就诊信息		
1. 是否第一次患手足口病? <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 不清楚		
2. 本次患病最初发病日期: ____年____月____日	3. 本次患病首次就诊日期: ____年____月____日	
4. 本次患病首次就诊机构级别: <input type="checkbox"/> 村/社区 <input type="checkbox"/> 乡镇级 <input type="checkbox"/> 县/区级 <input type="checkbox"/> 市级及以上		
5. 发病以来有无以下临床症状:		
5.1 发热: <input type="checkbox"/> 是, 出现时间: ____年____月____日; 最高温度: ____℃ <input type="checkbox"/> 否		
5.2 皮疹/疱疹: <input type="checkbox"/> 是 (请回答 5.3-5.4) <input type="checkbox"/> 否		
5.3 皮疹/疱疹出现时间: ____年____月____日		
5.4 皮疹/疱疹部位: <input type="checkbox"/> 手 <input type="checkbox"/> 足 <input type="checkbox"/> 口 <input type="checkbox"/> 臀 <input type="checkbox"/> 躯干 <input type="checkbox"/> 肘部 <input type="checkbox"/> 膝关节 <input type="checkbox"/> 面部 <input type="checkbox"/> 其它部位:		
6. 首次诊断为手足口病的日期: ____年____月____日		

7.是否住院： <input type="checkbox"/> 是(请回答 7.1) <input type="checkbox"/> 否 7.1 本次入院日期：____年____月____日 7.2 入院医疗机构名称：_____	
8.诊断为重症手足口病的日期：____年____月____日	
9.是否出现以下临床症状：	
9.1 重型病例： <input type="checkbox"/> 精神差 <input type="checkbox"/> 嗜睡 <input type="checkbox"/> 吸吮无力 <input type="checkbox"/> 易惊 <input type="checkbox"/> 头痛 <input type="checkbox"/> 呕吐 <input type="checkbox"/> 烦躁 <input type="checkbox"/> 肢体抖动、眼球震颤等共济失调表现 <input type="checkbox"/> 肌无力、弛缓性麻痹 <input type="checkbox"/> 颈项强直	9.2 危重型病例： <input type="checkbox"/> 出冷汗 <input type="checkbox"/> 四肢末梢发凉 <input type="checkbox"/> 皮肤发花 <input type="checkbox"/> 呼吸急促，呼吸频率最高____次/分 <input type="checkbox"/> 血压升高,最高值： 低压____mmHg,高压____mmHg <input type="checkbox"/> 心率增快，心率最高____次/分 <input type="checkbox"/> 口唇紫绀 <input type="checkbox"/> 咳粉红色泡沫痰或血性液体 <input type="checkbox"/> 血压降低或休克 <input type="checkbox"/> 抽搐 <input type="checkbox"/> 严重意识障碍
二、治疗信息	
1.是否使用血管活性药物？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否；若选是，使用药物：_____（填写药品通用名称）	
2.入院后是否收住 ICU 或 PICU？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否	
3.是否机械通气？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否；若有机械通气，机械通气方式： <input type="checkbox"/> 无创 <input type="checkbox"/> 有创	
三、实验室检测结果	
1.脑脊液检查： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否；若选是： 1.1 检查时间：____年____月____日 1.2 颜色： <input type="checkbox"/> 无色 <input type="checkbox"/> 红色 <input type="checkbox"/> 黄色 <input type="checkbox"/> 乳白色 <input type="checkbox"/> 绿色 <input type="checkbox"/> 棕色/黑色 1.3 透明度： <input type="checkbox"/> 清晰透明 <input type="checkbox"/> 微浊 <input type="checkbox"/> 毛玻璃样浑浊 <input type="checkbox"/> 乳白色浑浊 1.4 白细胞：_____×10 ⁶ /L,白细胞分类：_____	
2.脑部核磁检查： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否；若选是， 2.1 检查时间：____年____月____日 2.2 检查结果： <input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 异常，若选“异常”，则检查单中印象为：_____	
3.脑电图检查： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否；若选是， 3.1 检查时间：____年____月____日 3.2 检查结果： <input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 异常；若选“异常”，则检查单中印象为：_____	
4.血糖是否升高： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 无测量；若选是，最高值为_____	
5.血乳酸是否出现升高： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 无测量；若选是，最高值为_____	
6.外周血白细胞计数是否异常： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 无测量；若选是，最高值为_____×10 ⁹ /L	
四、转归情况	
1.出院日期：____年____月____日	
2.疾病转归： <input type="checkbox"/> 治愈 <input type="checkbox"/> 转院 <input type="checkbox"/> 死亡 <input type="checkbox"/> 放弃治疗 如放弃治疗，是否死亡： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否（通过随访获得） 若死亡，则死亡日期：____年____月____日；根本死亡原因：_____	
五、病原学检测	
1. 是否采集标本进行实验室检测？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否（结束作答）	
2. 标本采集类型： <input type="checkbox"/> 粪便 <input type="checkbox"/> 咽拭子 <input type="checkbox"/> 肛拭子 <input type="checkbox"/> 疱疹拭子 <input type="checkbox"/> 其他（请具体写明标本类型）：	
3. 标本采集日期：____年____月____日	
4. 医院标本编号：_____	

调查人（签字）：____；联系方式：____ 填报单位：____ 填报日期：____年____月____日

附表 1-2

手足口病死亡病例个案调查表

唯一识别码:	传染病报告卡卡片编号:	
基本人口学信息		
患者姓名: _____	患者性别: <input type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女	
患者身份证号: □□□□□□□□□□□□□□□□		
家长姓名: _____	患者家长联系电话: □□□□□□□□□□	
患者出生日期: ____年____月____日 (如生日不详, 则实足年龄为____岁或____月)。		
现居住地址: ____省____市____县/区____乡____镇(街道)____村(社区)		
住址类型: <input type="checkbox"/> 城镇 <input type="checkbox"/> 农村 (注: 现居住地址指本次病程最初发病时的居住地址。)		
健康信息和既往病史		
1. 体重: ____公斤	2. 身高: ____厘米	3. 早产: <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 不清楚
4. 先天性疾病或慢性基础性疾病? <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无 <input type="checkbox"/> 不清楚		
4.1 如果有先天性疾病或慢性基础性疾病, 请详述 (可多选):		
<input type="checkbox"/> 先天性心脏病	<input type="checkbox"/> 食道闭锁	<input type="checkbox"/> 先天性肥厚性幽门狭窄症
<input type="checkbox"/> 先天性巨结肠症	<input type="checkbox"/> 先天性食管气管瘘	<input type="checkbox"/> 先天性肺囊肿
<input type="checkbox"/> 肺隔离症	<input type="checkbox"/> 小头畸形	<input type="checkbox"/> 大头畸形
<input type="checkbox"/> 脊髓膨出	<input type="checkbox"/> 脊柱裂	<input type="checkbox"/> 免疫系统缺陷性疾病
		<input type="checkbox"/> 肠闭锁
		<input type="checkbox"/> 支气管肺发育不全
		<input type="checkbox"/> 脑积水
		<input type="checkbox"/> 其他_____
5. 是否接种过 EV-A71 疫苗? <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 不清楚 (如接种过, 填写下列信息)		
5.1 第 1 针: <input type="checkbox"/> 已接种, 接种日期: ____年____月____日, 疫苗接种单位: _____		
<input type="checkbox"/> 未接种 <input type="checkbox"/> 不清楚		
5.2 第 2 针: <input type="checkbox"/> 已接种, 接种日期: ____年____月____日, 疫苗接种单位: _____		
<input type="checkbox"/> 未接种 <input type="checkbox"/> 不清楚		
5.3 接种疫苗厂家: <input type="checkbox"/> 中国医学科学院昆明医学生物学研究所		
<input type="checkbox"/> 北京科兴生物制品有限公司		
<input type="checkbox"/> 国药中生生物技术研究院有限公司		
5.4 以上疫苗接种信息是如何获得的: <input type="checkbox"/> 接种本 <input type="checkbox"/> 家长回忆 <input type="checkbox"/> 查阅接种信息登记系统		
(注: 接种信息证明附在个案登记表后)		
临床信息收集		
一、发病就诊信息		
1. 是否第一次患手足口病? <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 不清楚		
2. 本次患病最初发病日期: ____年____月____日	3. 本次患病首次就诊日期: ____年____月____日	
4. 本次患病首次就诊机构级别: <input type="checkbox"/> 村/社区 <input type="checkbox"/> 乡镇级 <input type="checkbox"/> 县/区级 <input type="checkbox"/> 市级及以上		
5. 发病以来有无以下临床症状:		
5.1 发热: <input type="checkbox"/> 是, 出现时间: ____年____月____日; 最高温度: ____℃ <input type="checkbox"/> 否		
5.2 皮疹/疱疹: <input type="checkbox"/> 是 (请回答 5.3-5.4) <input type="checkbox"/> 否		
5.3 皮疹/疱疹出现时间: ____年____月____日		
5.4 皮疹/疱疹部位: <input type="checkbox"/> 手 <input type="checkbox"/> 足 <input type="checkbox"/> 口 <input type="checkbox"/> 臀 <input type="checkbox"/> 躯干 <input type="checkbox"/> 肘部 <input type="checkbox"/> 膝关节 <input type="checkbox"/> 面部 <input type="checkbox"/> 其它部位:		

6.首次诊断为手足口病的日期：____年____月____日	
7.是否住院： <input type="checkbox"/> 是(请回答 7.1、7.2) <input type="checkbox"/> 否 7.1 本次入院日期：____年____月____日 7.2 入院医疗机构名称：_____	
8.诊断为重症手足口病的日期：____年____月____日	
9.是否出现以下临床症状：	
9.1 重型病例： <input type="checkbox"/> 精神差 <input type="checkbox"/> 嗜睡 <input type="checkbox"/> 吸吮无力 <input type="checkbox"/> 易惊 <input type="checkbox"/> 头痛 <input type="checkbox"/> 呕吐 <input type="checkbox"/> 烦躁 <input type="checkbox"/> 肢体抖动、眼球震颤等共济失调表现 <input type="checkbox"/> 肌无力、弛缓性麻痹 <input type="checkbox"/> 颈项强直	9.2 危重型病例： <input type="checkbox"/> 出冷汗 <input type="checkbox"/> 四肢末梢发凉 <input type="checkbox"/> 皮肤发花 <input type="checkbox"/> 呼吸急促，呼吸频率最高____次/分 <input type="checkbox"/> 血压升高,最高值： 低压____mmHg,高压____mmHg <input type="checkbox"/> 心率增快，心率最高____次/分 <input type="checkbox"/> 口唇紫绀 <input type="checkbox"/> 咳粉红色泡沫痰或血性液体 <input type="checkbox"/> 血压降低或休克 <input type="checkbox"/> 抽搐 <input type="checkbox"/> 严重意识障碍
二、治疗信息	
1.是否使用血管活性药物？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否；若选是，使用药物：_____（填写药品通用名称）	
2.入院后是否收住 ICU 或 PICU？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否	
3.是否机械通气？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否；若有机械通气，机械通气方式： <input type="checkbox"/> 无创 <input type="checkbox"/> 有创	
三、实验室检测结果	
1.脑脊液检查： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否；若选是： 1.1 检查时间：____年____月____日 1.2 颜色： <input type="checkbox"/> 无色 <input type="checkbox"/> 红色 <input type="checkbox"/> 黄色 <input type="checkbox"/> 乳白色 <input type="checkbox"/> 绿色 <input type="checkbox"/> 棕色/黑色 1.3 透明度： <input type="checkbox"/> 清晰透明 <input type="checkbox"/> 微浊 <input type="checkbox"/> 毛玻璃样浑浊 <input type="checkbox"/> 乳白色浑浊 1.4 白细胞：_____×10 ⁶ /L,白细胞分类：_____	
2.脑部核磁检查： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否；若选是， 2.1 检查时间：____年____月____日 2.2 检查结果： <input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 异常，若选“异常”，则检查单中印象为：_____	
3.脑电图检查： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否；若选是， 3.1 检查时间：____年____月____日 3.2 检查结果： <input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 异常；若选“异常”，则检查单中印象为：_____	
4.血糖是否升高： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 无测量；若选是，最高值为_____	
5.血乳酸是否出现升高： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 无测量；若选是，最高值为_____	
6.外周血白细胞计数是否异常： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 无测量；若选是，最高值为_____×10 ⁹ /	
四、转归情况	
1.出院日期：____年____月____日	
2.死亡日期：____年____月____日；根本死亡原因：_____	
五、病原学检测	
1. 是否采集标本进行实验室检测？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否（结束作答）	
2. 标本采集类型： <input type="checkbox"/> 粪便 <input type="checkbox"/> 咽拭子 <input type="checkbox"/> 肛拭子 <input type="checkbox"/> 疱疹拭子 <input type="checkbox"/> 其他（请具体写明标本类型）：	
3. 标本采集日期：____年____月____日	
4. 医院标本编号：_____	

调查人（签字）：____；联系方式：____ 填报单位：____ 填报日期：____年____

月____日

附表 1-3

手足口病普通病例个案调查表

病例唯一识别码:

传染病报告卡卡片编号: _____

一、基本人口学信息

1. 患者姓名: _____ 患者家长姓名: _____
2. 性别: 男 女
3. 出生日期(阳历): _____年____月____日, 如生日不详, 填实足年龄____岁
4. 现居住地址: _____省____市____县/区____乡镇(街道) _____村(社区)

二、健康信息和既往病史

1. 目前体重: _____千克, 身高____厘米;
2. 是否患有免疫缺陷病: 是 否 不清楚
3. 是否接种过 EV-A71 灭活疫苗? 是 否 不清楚

三、发病就诊信息

1. 本次发病日期: _____年____月____日
2. 本次就诊日期: _____年____月____日
3. 是否初次感染: 是 否 不清楚
4. 发病以来有无以下临床症状:
 - 4.1 发热: 是, 发热出现日期: _____年____月____日; 最高温度: _____℃ 否
 - 4.2 皮疹: 是, 回答 4.3-4.4 否
 - 4.3 皮疹出现日期: _____年____月____日
 - 4.4 皮疹部位: 手 足 口 臀 其它部位: _____
5. 病例来源: 门诊病例 住院病例
6. 是否采集标本进行实验室检测? 是 否 (结束作答)
 - 6.1 标本采集类型: 粪便 咽拭子 肛拭子 疱疹拭子 其他 (请具体写明标本类型): _____
 - 6.2 标本采集日期: _____年____月____日
 - 6.3 医院标本编号: _____

调查员签名: _____

日期: _____年____月____日

附表 1-4

疱疹性咽峡炎个案调查表

唯一识别码:		
基本人口学信息		
患者姓名: _____	患者性别: <input type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女	
患者身份证号: □□□□□□□□□□□□□□□□		
家长姓名: _____	患者家长联系电话: □□□□□□□□□□	
患者出生日期: ____年____月____日 (如生日不详, 则实足年龄为____岁或____月)		
现居住地址: ____省____市____县/区____乡____镇(街道)____村(社区)		
住址类型: <input type="checkbox"/> 城镇 <input type="checkbox"/> 农村 (注: 现居住地址指本次病程最初发病时的居住地址。)		
健康信息和既往病史		
1. 体重: ____公斤	2. 身高: ____厘米	3. 早产: <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 不清楚
4. 先天性疾病或慢性基础性疾病? <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无 <input type="checkbox"/> 不清楚		
4.1 如果有先天性疾病或慢性基础性疾病, 请详述 (可多选):		
<input type="checkbox"/> 先天性心脏病	<input type="checkbox"/> 食道闭锁	<input type="checkbox"/> 先天性肥厚性幽门狭窄症
<input type="checkbox"/> 先天性巨结肠症	<input type="checkbox"/> 先天性食管气管瘘	<input type="checkbox"/> 先天性肺囊肿
<input type="checkbox"/> 肺隔离症	<input type="checkbox"/> 小头畸形	<input type="checkbox"/> 大头畸形
<input type="checkbox"/> 脊髓膨出	<input type="checkbox"/> 脊柱裂	<input type="checkbox"/> 免疫系统缺陷性疾病
		<input type="checkbox"/> 肠闭锁
		<input type="checkbox"/> 支气管肺发育不全
		<input type="checkbox"/> 脑积水
		<input type="checkbox"/> 其他_____
5. 是否接种过 EV-A71 疫苗? <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 不清楚		
临床信息收集		
一、发病就诊信息		
1. 最初发病日期: ____年____月____日	2. 首次就诊日期: ____年____月____日	
3. 首次就诊机构级别: <input type="checkbox"/> 村/社区 <input type="checkbox"/> 乡镇级 <input type="checkbox"/> 县/区级 <input type="checkbox"/> 市级及以上		
4. 发病以来有无以下临床症状:		
4.1 发热: <input type="checkbox"/> 是, 出现时间: ____年____月____日; 最高温度: ____℃ <input type="checkbox"/> 否		
4.2 溃疡: <input type="checkbox"/> 是 (请回答 4.3-4.4) <input type="checkbox"/> 否		
4.3 溃疡出现时间: ____年____月____日		
4.4 溃疡部位: <input type="checkbox"/> 舌 <input type="checkbox"/> 咽喉 <input type="checkbox"/> 口腔 <input type="checkbox"/> 其它部位:		
5. 首次诊断为疱疹性咽峡炎日期: ____年____月____日		
6. 是否诊断出以下并发症: <input type="checkbox"/> 脑干脑炎 <input type="checkbox"/> 急性迟缓性麻痹 <input type="checkbox"/> 无菌性脑膜炎 <input type="checkbox"/> 心肌炎; <input type="checkbox"/> 否		
7. 是否出现以下临床症状:		
<input type="checkbox"/> 精神差 <input type="checkbox"/> 嗜睡 <input type="checkbox"/> 头痛 <input type="checkbox"/> 呕吐 <input type="checkbox"/> 烦躁 <input type="checkbox"/> 吸吮无力 <input type="checkbox"/> 惊厥 <input type="checkbox"/> 持续发热且不易退		
<input type="checkbox"/> 拒食 <input type="checkbox"/> 流口水 <input type="checkbox"/> 呼吸急促, 呼吸频率最高 ____ 次/分		
<input type="checkbox"/> 血压升高, 最高值: 低压____mmHg, 高压____mmHg		

<input type="checkbox"/> 心率增快，心率最高 _____ 次/分
二、治疗信息
1. 是否使用抗病毒药物？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否；若选是，使用药物：_____（填写药品通用名称）
2. 是否合并细菌感染？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否；若选是，是否使用抗菌药物 <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否； 若选是，使用药物：_____（填写药品通用名称）
3. 预后：痊愈/好转/未愈/死亡/其他 _____；后遗症（有， _____；无）
三、病原学检测
1. 是否采集标本进行实验室检测？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否（结束作答）
2. 标本采集类型： <input type="checkbox"/> 粪便 <input type="checkbox"/> 咽拭子 <input type="checkbox"/> 肛拭子 <input type="checkbox"/> 疱疹拭子 <input type="checkbox"/> 其他（请具体写明标本类型）：
3. 标本采集日期：_____年_____月_____日
4. 医院标本编号：_____

调查员（签字）：_____

联系方式：

日期：_____年_____月_____日

附表1-5

手足口病/疱疹性咽峡炎门急诊/住院登记表

_____年_____省_____市_____医院

周	总门诊就诊人数			总住院人数			手足口病门诊 就诊人数			手足口病住院 人数			疱疹性咽峡炎门急诊 就诊人数			疱疹性咽峡炎住院人 数		
	0-	3-	6-14	0-	3-	6-14	0-	3-	6-14	0-	3-	6-14	0-	3-	6-14	0-	3-	6-14
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
.....																		
.....																		
52																		

注：0-代表0-2岁年龄组；3-代表3-5岁年龄组；6-14代表6-14岁年龄组。

附表 2

____省手足口病/疱疹性咽峡炎病原学检测登记表

疾病名称: 手足口病 疱疹性咽峡炎

序号	病例唯一识别码	姓名	性别	出生日期 [#]	发病日期 [#]	病例类型 ^{\$}	采样日期 [#]	标本类型 ^{&}	是否检测 [†]	检测日期 [#]	检测方法 [*]	是否肠道病毒阳性 [§]	常规检测结果（阳性填“+”，阴性填“-”）					
													EV-A71	CVA16	CVA6	CVA10	其他 [@]	

注：# 务必统一采用日期格式（年-月-日）。\$ 病例类型：1 轻型 2 重症非死亡 3 死亡，填写数字序号。& 标本类型：1 粪便 2 肛拭子 3 咽拭子 4 疱疹拭子 5 其他（请具体写明标本类型），填写数字序号。† 是否检测：1 是 2 否，填写数字序号。* 检测方法：1 RT-PCR 2 Realtime-RT-PCR 3 病毒分离 4 其他（请具体写明检测方法），填写数字序号。§ 是否肠道病毒阳性：1 是 2 否，填写数字序号。@ 其他：若鉴定为 EV-A71, CVA16, CVA6 和 CVA10 之外的肠道病毒血清型，请进一步标注具体血清型；如为混合感染，注明混合感染型别。

附表3

____省手足口病/疱疹性咽峡炎病毒分离结果登记表

疾病名称: 手足口病 疱疹性咽峡炎

病例唯一识别码 (1)	性别 (2)	出生日期# (3)	发病日期# (5)	采样日期# (6)	标本类型 (7)	核酸检测结果 (8)	是否进行病毒分离§	分离日期#	鉴定结果®

注: 1-8 同附表 2 填写结果; # 务必统一采用日期格式 (年-月-日)。 §是否病毒分离: 1 是 2 否, 填写数字序号。

@ 鉴定结果: 标注 EV-A71,CVA16,CVA6 和 CVA10 等肠道病毒血清型。

附表4

____省手足口病/疱疹性咽峡炎标本复核结果登记表

疾病名称：手足口病 疱疹性咽峡炎

病例唯一识别码 (1)	采样日期 [#] (2)	标本类型 (3)	核酸检测结果 (4)	是否复核 [§]	复核日期 [#]	复核方法 [*]	复核结果 [@]

注：1-4 同附表 2 填写结果。[#] 务必统一采用日期格式（年-月-日）。[§]是否复核：1 是 2 否，填写数字序号。^{*} 复核方法：1 RT-PCR 2 Realtime-RT-PCR 3 病毒分离 4 其他（请具体写明检测方法），填写数字序号。[@]复核结果：标注 EV-A71,CVA16,CVA6 和 CVA10 等肠道病毒血清型。

附表5

手足口病/疱疹性咽峡炎监测过程评估表

疾病名称: 手足口病 疱疹性咽峡炎

评估内容	评估指标	实际开展调查/采样/检测病例数	应开展相关工作数(例)	比例(%)
工作完成情况	重症、死亡病例个案调查完成率			
	轻症病例个案调查完成率			
	标本采集完成率			
	核酸检测完成率			
及时性	评估指标	抽查病例数(例)	规定期限完成检测/上报/上送数(例)	比例(%)
	标本检测及时性			
	数据报送及时性			
	标本(毒株)上送及时性			
关键变量完整性	关键变量	抽查个案数(例)	完整数(例)	比例(%)
	姓名			
	出生日期			
	疫苗接种史			
	临床诊断			
	重症并发症			

附件1

手足口病/疱疹性咽峡炎标本采集 及检测技术方案

一、标本采集种类及保存

1.咽拭子：尽量采集病人发病3日内的咽拭子标本，用专用采样棉签，适度用力拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位，应避免触及舌部；迅速将棉签放入装有3-5mL保存液（含5%牛血清细胞维持液）的15mL外螺旋盖采样管中（**注意：非灭活管**），在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖并密封，外表贴上相应条形识别码，并用透明胶带粘贴在条形码上，以避免冷冻后条形码脱落。

2.粪便：尽量采集病人发病7日内的粪便标本，采集量5-8g/份（至少蚕豆大小的粪便量），立即放入无菌非灭活螺旋采便管内，采便管贴上相应编码，并用透明胶带粘贴在编码上，以避免冷冻后编码脱落。

3.肛拭子：采集病人发病7日内的肛拭子标本，用消毒棉拭子轻轻插入肛门3~5cm，再轻轻旋转拔出，立即放入含有3~5mL保存液（含5%牛血清细胞维持液）的15mL外螺旋盖采样管中，弃去尾部，旋紧管盖并密封，采样管贴上相应编码，并用透明胶带粘贴在编码上，以避免冷冻后编码脱落。

4.疱疹液：在手足口病的实验室诊断中，从疱疹液中分离到病毒即可确诊该病毒为病因，可同时采集多个疱疹作为一份标本。先用75%的酒精对疱疹周围的皮肤进行消毒，然后用消毒针将疱疹挑破用棉签蘸取疱疹液，迅速将棉签放入内装有3-5mL保存液（含5%牛血清维持液或生理盐水，推荐使用维持液）的采样管中，在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖并密封，采样管外表贴上带有唯一识别号码的标签。

所采集标本 4°C 暂存立即 (12h 内) 送达实验室, -20°C 以下低温冷冻保藏, 需长期保存的标本存于 -70°C 冰箱。

5. 血清标本: 采集急性期 (发病 0~7d) 和恢复期 (发病 14~30d) 双份配对血清, 比较两份血清的中和抗体滴度, 可作为肠道病毒感染的血清学诊断方法。静脉采集 3~5mL 全血, 置于真空无菌采血管中, 自凝后, 分离血清, 将血清移到 2mL 外螺旋的血清保存管中, 外表贴上带有唯一识别号码的标签。将血清置于 -20°C 以下冰箱中冷冻保存。

6. 尸检标本: 采集脑、肺和肠淋巴结等重要组织标本, 每一采集部位分别使用单独的消毒器械。每种组织应多部位取材, 每部位应取 2~3 份约 5~10g 的组织, 淋巴结 2 个, 分别置于 15mL~50mL 无菌的有外螺旋盖的冻存管中, 采样管外表贴上带有唯一识别号码的标签。

7. 脑脊液标本: 出现神经系统症状的病例, 可采集脑脊液标本, 进行病毒分离或核酸检测。采集时间为出现神经系统症状后 3 天内, 采集量为 2~3mL。采集后立即装入无菌带垫圈的冻存管中, 4°C 暂存立即 (12h 内) 送达实验室, -20°C 以下低温冷冻保藏, 需长期保存的标本存于 -70°C 冰箱。但 EV-A71 感染神经系统时, 很难在脑脊液中检测到 EV-A71 病原。

二、标本的处理及分装方法

1. 咽拭子标本的处理及分装

咽拭子要在标本运输 (保存) 液中充分搅动 (至少 40 下), 以洗下拭子上粘附的病毒及含有病毒的细胞等。然后在 4°C 条件下, 1500rpm 离心 20min, 保留上清液。如果发现有细菌污染, 须用滤器过滤除菌。处理完的上清液, 一式三份分装于 2mL 外螺旋的标本保

存管中，每份 1-1.5mL/管，管外表分别标识病例唯一识别码，编码规则见方案正文。

2. 粪便标本和肛拭子的处理

2.1 标本处理液的配置

完全 PBS 液中加入青、链霉素溶液，终浓度为青霉素 100 单位/mL，链霉素为 100 μ g/mL。

完全 PBS 液的配置：取以下 1 份 B 液和 1 份 C 液加到 8 份 A 液中即为完全 PBS 工作液。

A 液：

试剂品名	加入量
NaCl	8.00g
KCl	0.20g
Na ₂ HPO ₄ (无水)	0.91g
KH ₂ PO ₄	0.12g

用 600~800mL 蒸馏水溶解以上盐类，加蒸馏水补至 1000mL，10psi (70Kpa) 15 分钟高压灭菌，即为不完全 PBS 工作液（不含钙、镁离子）。

B 液：

试剂品名	加入量
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.10g

溶解于 100mL 蒸馏水中，10psi (70Kpa) 15 分钟高压灭菌。

C 液：

试剂品名	加入量
CaCl ₂	0.10g

溶解于 100mL 蒸馏水中，10psi (70Kpa) 15 分钟高压灭菌。

2.2 标本的处理及分装

在生物安全柜中将每一份粪便标本取大约 2g 加入标记好的 50mL 离心管中，每管中加入 10mL 完全 PBS（配置方法见上表）、1g

玻璃珠和 1mL 氯仿中，用机械振荡器剧烈振荡 20min 后，用冷冻离心机在 1500g 条件下离心 20min，在生物安全柜中将上清液分别吸入 3 个有外螺旋盖的冻存管中，每份 1.5mL/管，管外标识病例唯一识别码，编码规则见方案正文。

3. 疱疹液标本的处理及分装

疱疹液标本置于旋涡振荡器混匀，室温静置 10 min，在生物安全柜中将上清液分别吸入 3 个有外螺旋盖的冻存管中，每份 1.5mL/管，管外标识病例唯一识别码，编码规则见方案正文。

4. 脑脊液标本的处理及分装

脑脊液标本通常直接用于核酸的提取及病毒分离，在生物安全柜中将脑脊液分别吸入 3 个有外螺旋盖的冻存管中，每份 1~1.5mL/管，管外标识病例唯一识别码，编码规则见方案正文。

5. 组织样本的处理及分装

用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品 2g 于研钵或组织器中充分研磨，再加 10mLPBS(含牛血清白蛋白青霉素和链霉素)混匀，3000 rpm 离心 5 min 后，在生物安全柜中将上清液分别吸入 3 个有外螺旋盖的冻存管中，每份 1.5mL/管，管外标识病例唯一识别码，编码规则见方案正文。

三、核酸检测检测技术标准操作流程

采用荧光定量逆转录-聚合酶链反应（Real time RT-PCR）的方法进行肠道病毒核酸的检测。

1. 病毒核酸提取

可使用多种商业化试剂盒来提取 RNA，针对临床标本应选择质量较高的“用于临床标本病毒 RNA 提取的试剂盒”，也可使用全自动

RNA 提取仪进行提取。针对病毒分离物，核酸提取比较容易，大部分商业化 RNA 提取试剂盒都可有效的提取到 RNA。RNA 提取依据使用的试剂不同，严格按说明书进行操作。

2. Real time RT-PCR 检测

各实验室可依据不同厂家的试剂盒，并严格按相应说明书操作和判断结果。也可自行设计引物探针，在质量有保证的公司合成，并通过做预实验保证引物及探针没有质量问题后，开展相关实验。以下为国家实验室自行设计的三对引物探针，供参考使用。

类型	名称	引物探针序列 (5'-3')
引物	EV(YG)-F	GGCTGCGYTGGCGGCC
引物	EV(YG)-R	CCAAAGTAGTCGGTTCCGC
探针	EV(YG)-P	FAM-CTCCGGCCCCTGAATGCGG-BHQ1
引物	EV-A71-F	TGATTGAGACACGCTGTGTTCTTA
引物	EV-A71-R	CCCGCYCTGCTGAAGAAACT
探针	EV-A71-P	VIC-TCGCACAGYACAGCTGAGACCACTC-BHQ1
引物	CVA16-F	GGGAATTTCTTTAGCCGTGC
引物	CVA16-R	CCCATCAARTCAATGTCCC
探针	CVA16-P	FAM-ACAATGCCACCACGGGTACACA-BHQ1

以下举例说明单通道检测和双通道检测的操作规程和注意事项。

(1) One Step Real-time PCR 法检测 EV-A71 病毒核酸 (单通道检测)

①反应体系配置：反应体系共 25 μ l，模板量可根据样本情况自行决定 (临床标本通常使用 5 μ l 的 RNA 模板量)，不够部分以水补足。

如选用另外试剂盒，反应体系及条件随之变化。

a.从试剂盒中取出相应的试剂，反应液在室温融化后，瞬时离心，按 $n+1$ 配置反应体系 (n =样本数+1 管阳性对照+1 管阴性对照)，每个测量反应体系配置如下表：

试剂组成	1 份样品的量
荧光 RT-PCR 反应液	12.5 μ L
逆转录酶	0.5 μ L
Taq 酶	0.5 μ L
引物和探针	1.5 μ L
H ₂ O	5 μ L

b.将上述反应液混匀离心后，按照每管 20 μ L 分装于各荧光 PCR 仪适用的 PCR 管中。

c.加样：将提取好的样本 RNA，分别加入上述分装好的 PCR 反应管中，模板量可根据样本情况自行决定（临床标本通常使用 5 μ L 模板量），不够部分以水补足。总反应体积 25 μ L。

② 荧光 RT-PCR 循环条件设置

程序	循环数	温度（摄氏度）	反应时间（分钟：秒）
1	1	42 $^{\circ}$ C	30min
2	1	95 $^{\circ}$ C	2min
3	40	95 $^{\circ}$ C	10sec
		60 $^{\circ}$ C	35sec
		60 $^{\circ}$ C时收集荧光信号	

③ 对照设置

阴性对照：核酸提取时以灭菌双蒸水代替标本，每次实验应设立。

阳性对照：由省级实验室提供 EV-A71 阳性核酸（只在评价试剂时使用）

④ 结果分析条件设定和结果判断

阈值设定

原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点，结果显

示阴性为准，或可根据仪器噪音情况进行调整。

Ct 值 \leq 35.0 的样本为阳性。

38.0 $>$ Ct 值 $>$ 35.0 的样本为临界值。

Ct 值 \geq 38.0 的样本或无数值的标本为阴性。

(2) One Step Real-time PCR 法同时检测 EV-A71 和 CVA16 核酸（双通道检测）

双通道可以同时检测 EV-A71 和 CVA16 核酸,在提取核酸后短时间(2.5 小时)内检测到标本中是否含 EV-A71 或 CVA16 核酸。

①反应体系配置

反应体系共 25 μ L，模板量可根据样本情况自行决定（临床标本通常使用 5 μ L 模板量），不够部分以水补足。如选用另外试剂盒，反应体系及条件随之变化。

a.先将试剂解冻，从试剂盒中取出相应的试剂，反应液在室温融化后，瞬时离心，按 n+1 配置 25 μ L 反应体系（n=样本数+1 管阳性对照+1 管阴性对照），每个测量反应体系配置如下表：

b.将下述反应液混匀离心后，按照每管 20 μ L 分装于适用的 PCR 管中。

试剂组成	1 份样品的量
荧光 RT-PCR 反应液	12.5 μ L
逆转录酶	0.5 μ L
Taq 酶	0.5 μ L
引物和探针	3 μ L
H ₂ O	3.5 μ L

c.加样：将提取好的样本 RNA，分别加入上述分装好的 PCR 反应管中，模板量可根据样本情况自行决定（临床标本通常使用 5 μ L 模

板量), 不够部分以水补足。总反应体积 25 μ L。

② 荧光 RT-PCR 循环条件设置

程序	循环数	温度 (摄氏度)	反应时间 (分钟: 秒)
1	1	42 $^{\circ}$ C	30min
2	1	95 $^{\circ}$ C	2min
3	40	95 $^{\circ}$ C	10sec
		60 $^{\circ}$ C	35sec
		60 $^{\circ}$ C时收集荧光信号	

③ 结果分析条件设定和结果判断

阴性对照: 核酸提取时以灭菌双蒸水代替标本。

阳性对照: 提取好的阳性核酸作为模板 RNA。

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点, 结果显示阴性为准, 或可根据仪器噪音情况进行调整。

Ct 值 \leq 35.0 的样本为阳性。

Ct 值无数值的标本和 Ct 值 \geq 38.0 的样本为阴性样本。

38.0 $>$ Ct 值 $>$ 35.0 的样本为临界值。

四、病毒分离操作流程

1. 通常使用 8 mL 的斜面试管培养细胞, 传细胞时, 每管加细胞培养液 1.5mL。显微镜下观察单层细胞, 以确保细胞是健康、无污染的。一个健康的单层细胞会在传代后 48 小时左右形成;

2. 倒掉生长液 (GM), 换上 1-1.2mL 的维持液 (MM);

3. 每一份标本需要同时接种 2 支 RD 细胞和 2 支 HEp-2 细胞, 正确标记每支细胞培养管 (包括标本的编号、日期、传代数);

4. 每一种细胞至少标记一管作为阴性对照;

5. 每支试管接种 0.2mL 的标本悬液, 培养温度要求 36 $^{\circ}$ C。

或使用吸附的方法接种病毒：接种标本前，倒掉生长液（GM），每支试管接种 0.2mL 的标本悬液，培养温度为 36°C；吸附 1 小时后，换上 1.5mL 的维持液（MM）。同样每份标本需同时接种 2 支 RD 细胞和 2 支 HEp-2 细胞。

6.使用倒置显微镜每天观察细胞培养管，以观察有特征性的肠道病毒致细胞病变效应（CPE）的出现（如细胞变圆，折光增强并脱离管壁等）；

7.记录接种管和对照管细胞所发生的变化至少一周，记录 CPE（1+—4+）、提示细胞受毒性反应、老化或污染的影响而发生的变化（1+，<25%；2+，25%-50%；3+，50%-75%；4+，75%-100%）；

8.如果有特征性的肠道病毒 CPE 出现，要如实记录，并观察直到 75%的细胞发生变化（3+ CPE），然后储藏在 -20°C 以备二次传代；

9.第一代培养见可疑细胞病变时应继续传代，待细胞病变稳定出现后 -20°C 或 -70°C 冻存；

10.一代阳性分离物再传二代，如果又有明显的 CPE 出现，将病毒保存在 -20°C 冰箱（二代病毒）。因二代病毒滴度高于二代病毒，所以选用二代病毒进行鉴定；

11.如果 7d 之后没有 CPE 出现，那么盲传 1 代继续观察 7d。（注意：同一病例标本的细胞培养物不能混在一起再传代，例如：不同细胞的培养物应单独传代）；

12.盲传两代后，仍然没有出现 CPE 的，则判定为阴性；

13.注意：如果接种后 24h 内出现 CPE，很可能是标本中的非特异性成分导致的毒性反应。取 100μl 阳性分离物传二代，继续观察；或者在接种标本吸附 1h 后用维持液清洗细胞层，可能会降低毒性反

应；

14.相关概念：

(1) 毒性反应：如果在接种后 1-2d 内细胞快速凋亡，这可能是由于标本中含有毒性物质而导致的非特异性毒性反应。这些已接种标本的试管应在-20℃冻存，融化后取 0.2mL 接种到同一类型细胞中(此时是第二代)。如果又出现了毒性反应，那么应该取原始标本用 PBS 稀释 10 倍，再次接种到同种细胞中。这时应被认为是第一代。

(2) 微生物污染：由于细菌污染而造成培养液混浊或细胞死亡经常使病毒造成的 CPE 无法确定或根本无法出现。重新取原始标本，用氯仿或抗生素处理，按上述步骤重新接种到新鲜细胞上。

(3) 盲传：有时一周之后传代细胞会老化，甚至细胞对照也出现了病变。这时已接种标本的试管应在-20℃冻存，融化后取 0.2mL 接种到同一类型的新鲜单层细胞中，再观察 7-10d。如盲传两代后仍未产生 CPE，可判定标本为阴性。

五、病毒分离结果解释

RD 细胞支持 HFMD 的主要病原体——EV-A71、CVA16、CVA6、CVA10 等多种肠道病毒的复制，能在 RD 细胞培养中引起特殊的肠道病毒致细胞病变效应 (CPE)，表现为细胞圆缩、分散、胞浆内颗粒增加，最后细胞自管壁脱落。若在使用 RD 细胞分离的同时再增加 HEp-2 细胞，可提高肠道病毒的分离率 (分离出其他可能致 HFMD 的病原体，如一些柯萨奇 B 组病毒)。

附件 2

哨点医院一览表

序号	省份	哨点医院名称	所在地	医院类型*		
				综合医院	儿童医院	传染病医院
1	安徽	安徽省立儿童医院	合肥		√	
2	安徽	马鞍山市妇幼保健院	马鞍山市		√	
3	河南	焦作市妇幼保健院	焦作市		√	
4	湖南	湖南省儿童医院	长沙市		√	
5	重庆	重庆医科大学附属儿童医院	重庆市		√	
6	重庆	重庆市巫山县中医院	巫山县	√		
7	云南	昆明市儿童医院	昆明市		√	
8	云南	玉溪市儿童医院	玉溪市		√	

附件3

各省哨点医院手足口病/疱疹性咽峡炎 标本采集数测算表

省份	流行期（月）	非流行期（月）	流行期时长（个月）	非流行期时长（个月）	哨点医院手足口普通病例采集量*	哨点医院疱疹性咽峡炎病例采集量@	每省每年标本采集量（例）
湖南	4-11	1-3,12	8	4	304	208	512
安徽	3-7,10-12	1-2,8-9	8	4	304	208	512
河南	3-7,10-12	1-2,8-9	8	4	304	208	512
云南	3-7,10-12	1-2,8-9	8	4	304	208	512
重庆	3-7,10-12	1-2,8-9	8	4	304	208	512

*手足口流行期每周采集 8 例病例标本，非流行期每周采集 3 例病例标本。

@疱疹性咽峡炎流行期每周采集 5 例病例标本，非流行期每周采集 3 例病例标本。