

## 肠道病毒 71 型分子流行病学研究进展

田 波, 段海生, 荣一兵, 周世力\*\*

(江汉大学医学与生命科学学院, 湖北武汉 430056)

Progress of Research on Molecular Epidemiology of *Enterovirus 71*

TIAN Bo, DUAN Hai-sheng, RONG Yi-bing, ZHOU Shi-li\*\*

(School of Medical &amp; life science, Jianghan University, Wuhan 430056, China)

关键词: 肠道病毒 71 型; 分子流行病学; 基因分型

中图分类号: R373.2

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0426-04

肠道病毒 71 型 (Enterovirus type 71, EV71), 自 1974 年首次报道以来, 在世界范围内引起多次爆发与流行<sup>[1]</sup>。EV71 感染主要引起患者手足口病 (hand, foot and mouth disease, HFMD), 在临床上与柯萨奇病毒 A16(Coxsackie A16, CA16)感染所引起的手足口病难以区别, 但 EV71 还能够引起多种与神经系统相关的疾病<sup>[2]</sup>。近年来, EV71 病毒的流行在亚太地区呈上升趋势<sup>[3-5]</sup>, 其中最令人关注的是在该地区的 EV71 感染引起越来越严重的中枢神经系统症状。

分子流行病学研究表明<sup>[6-8]</sup>, 根据病毒衣壳蛋白 VP1 核苷酸序列的差异, EV71 可分为 A、B、C 三个基因型, 其中, B 型和 C 型又分进一步为 B1、B2、B3、B4 以及 C1 和 C2 亚型。1970 年在加利福尼亚分离的 EV71 原型株 (BrCr-Ca-70) 属于 A 型; 1972-1988 年在澳大利亚和美国以及 1994 年在哥伦比亚分离的 EV71 毒株属于 B 型; 亚太地区近年来流行的 EV71 属于 B3、B4、C1 和 C2 型。

## 1 基因组结构特征

到目前为止, GenBank 中有关 EV71 基因组序列的记录共有 1016 条, 完整基因组序列记录 15 条, 其中 SHZH98(AF302996)<sup>[9]</sup>和 SHZH03(AY465356)序列是由我国病毒基因工程国家重点实验室测定的, 这两株 EV71 毒株分别是在 1998 年和 2003 年从深圳地区分离的。

EV71 基因组为 7408 个核苷酸 (BrCr) 的单股

正链 RNA, 仅有一个开放阅读框 (ORF), 编码含 2194 个氨基酸的多聚蛋白, 在其两侧为 5'和 3'-非编码区 (UTRs), 在 3'非编码区的末端含有一个长度可变的多聚腺苷酸尾巴 (poly-A)。病毒的单链 RNA 具有感染性, 如果去除 3'末端的多聚腺苷酸尾或基因组出现断裂, 感染性就会消失。多聚蛋白可进一步被水解成 P1、P2、P3 三个前体蛋白, P1 前体蛋白可降解成 VP1、VP2、VP3、VP4 四个病毒外壳蛋白; P2 和 P3 前体蛋白编码 7 个非结构蛋白, 包括 2A (特异性蛋白水解酶)、2B、2C、3A、VPg (5'末端结合蛋白)、3C (特异性蛋白水解酶)、3D (RNA 多聚酶组分)。

病毒 RNA 正链和负链的 5'和 3'-非编码区中分别含有多肽翻译的起始信号和 RNA 合成的起始信号, VPg 蛋白通过其酪氨酸残基的羟基基团与 RNA 的 5'末端的 pUpU 形成的磷酸二酯键与基因组 RNA 结合<sup>[2]</sup>。

## 2 流行病学研究

到目前为止, EV71 流行范围已遍布全球。病毒主要通过粪-口传播, 易出现爆发流行, 人类是 EV71 的唯一已知的自然宿主<sup>[2]</sup>。EV71 感染对象主要为 5 岁以下的幼儿。血清流行病学研究表明, 新生儿由于带有母亲血清抗体, 44%具有 EV71 抗体, 但 1 个月后会迅速下降; 1~23 月龄的儿童 EV71 抗体阳性率仅为 0.8%; 从 2~5 岁, 血清阳性率以每年 12%提高<sup>[10]</sup>; 我国深圳地区 2000 年 EV71 监

收稿日期: 2004-04-13, 回修日期: 2004-05-20

作者简介: 田 波 (1961-), 男, 山西孝义籍, 讲师。

\*\* 通讯作者: 周世力 (1966-), 男, 湖北武汉籍, 副教授, 博士, 研究方向为微生物学。

Corresponding author. Tel: 027-62655882, E-mail: z4lzjw@sohu.com

测结果表明, 5 岁以下的儿童是 EV71 的易感人群, 其中 1 岁以下的儿童感染率最高<sup>[11]</sup>。

1975 年保加利亚大流行, 此次流行中共有 705 名患儿受到感染, 其中 149 例发生了急性弛缓性瘫痪, 44 例死亡<sup>[6]</sup>。近年来, EV71 病毒的流行在亚太地区呈上升趋势, EV71 感染常引起患者发生严重的中枢神经系统症状, 死亡率较高<sup>[1, 3, 13]</sup>, 1997 马来西亚发生 EV71 大流行, 共有病例 2628 例, 39 例急性脊髓灰质炎麻痹或无菌性脑膜炎, 30 多例患儿死亡, 其平均年龄 1.5 岁; 1998 年我国台湾地区 EV71 大爆发, 病例达几十万, 死亡 78 例, 死亡原因主要为由中枢神经系统感染, 91% 的死亡患儿小于 5 岁; 1999 年在澳大利亚西部的佩思爆发 EV71, 从 3 月到 8 月的大约六个月的时间里, 可记录的病例有 6000 例, 其中严重中枢神经系统症状病例为 29 例, 包括脑干脑炎、急性弛缓性瘫痪、肺水肿等。2000~2003 年, EV71 继续在亚太地区流行, 如新加坡、韩国、中国台湾、中国香港、越南以及我国深圳地区, 其中 2000 年新加坡共有 3790 病例, 死亡 5 人; 2003 年, 越南爆发 EV71, 导致 26 名小于 3 岁的幼儿死亡。

### 3 病毒学的监测方法

#### 3.1 病毒的分离

肠道病毒引起的急性感染, 可用咽拭子、直肠拭子、疱疹液、粪便、体液及组织液等标本, 经青霉素 (1000IU/mL) 和链霉素 (1000 $\mu$ g/mL) 处理后, 接种单层 Vero 细胞, 培养 1-3 代, 待细胞出现典型的细胞病变 (CPE) 后, 收集细胞分离病毒。有中枢神经系统症状时, 可从脑脊液分离标本。分离的标本在 -80 $^{\circ}$ C 可长期保存。

#### 3.2 病毒的检测

由于肠道病毒属成员数量多, 在遗传学上密切相关, 有相似的结构和生物学特性, 存在临床诊断和分类鉴定困难的问题。而 EV71 和柯萨奇病毒 A 组和 B 组的一些病毒的主要症状都是手足口病, 在临床上难以区分, 而且柯萨奇 A16 往往伴随着 EV71 的流行<sup>[14]</sup>; 另外, EV71 可引起与脊髓灰质炎病毒同样的中枢神经系统症状。因此 EV71 是肠道病毒中最难鉴定的病毒之一。

EV71 的常规诊断方法为利用荧光标记的特异性单克隆抗体对细胞培养病毒进行鉴定, 由于需要对病毒进行分离和培养细胞, 该方法费时费力, 整个过程一般需要 5~10d 时间, 因此无法满足病毒流行期间同时处理大量标本的需要。

RT-PCR 技术克服了以上缺点, 已成为 EV71 快速诊断的重要手段。Betty 等<sup>[14]</sup> 和 Singh 等<sup>[15]</sup> 根据 Vp1 设计特异引物成功地对 EV71 进行了检测。Tsao 等<sup>[16]</sup> 设计两套分别针对 EV71 和柯萨奇 A16 的特异引物, 成功实现了对 EV71 和柯萨奇 A16 的鉴别诊断。Chiueh 等<sup>[17]</sup> 利用多重半巢式 PCR 技术成功地在一个反应体系中鉴别 EV71 和其它肠道病毒 (包括柯萨奇 A16 和脊髓灰质炎病毒)。

基因芯片技术 (Microchip array) 在微生物的感染诊断中的应用是近年来发展起来的一门技术。Shih 等<sup>[18]</sup> 首次报道了利用芯片技术诊断 EV71 的研究。该研究通过设计两对分别基于 5'UTR 和 VP2 的特异寡核苷酸探针, 对 100 个临床样品 (用细胞培养方法证实为肠道病毒, 其中 67 个样品为 EV71) 进行了检测, 结果表明, 该方法的灵敏度为 89.6%, 特异度为 90.9%, 检测每个样品所花费的时间仅为 6h。

ELISA 方法是一种常规的检测病原微生物方法。Shih 等<sup>[19]</sup> 曾用 EV71 的 VP1 基因的原核表达产物作为抗原诊断 EV71 的感染, 结果表明, 原核表达的 VP1 蛋白作为检测抗原, 既可检测急性感染期患儿血清中的 IgM, 也可检测曾感染 EV71 患者血清中的 IgG, 而且与 CA16 抗血清无交叉免疫反应。杨国威等<sup>[20]</sup> 2003 年报道了利用用巴斯德毕赤酵母表达的重组蛋白 VP1, 检测 98 份病人血清 (其中 IgM 阳性血清 51 份, IgG 阳性血清 47 份) 和 58 份非病人血清。结果显示, 对 IgM 阳性血清, 其灵敏度为 90.2%, 特异度为 93.1%; 对 IgG 阳性血清, 其灵敏度为 93.6%, 特异度为 93.1%, 初步证实重组蛋白 VP1 可用来制备 ELISA 诊断试剂盒, 检测 EV71 感染。

### 4 基因 (组) 分型

由于 VP1 蛋白是主要的病毒中和决定因子, 它直接决定病毒的抗原性<sup>[1]</sup>, Vp1 基因具有与病毒血清型完全对应遗传多样性<sup>[21]</sup>, 以及其变异快速 (其年进化率为  $1.35 \times 10^{-2}$ /核苷酸) 的特点<sup>[6]</sup>, Vp1 基因<sup>[6-8, 21]</sup> 成了 EV71 基因分型的最重要的对象。

1999 年, 美国疾病控制中心 (CDC)<sup>[6]</sup> 对来自美国和另外 5 个国家的 113 株 EV71 进行了分子流行病学研究, 根据 VP1 序列 (891bp) 的变异情况, 将其分为 A、B 和 C 三个基因型, 其中, B 型和 C 型又分成 B1 和 B2 以及 C1 和 C2 两个亚型。核苷酸序列同源性分析表明, 同一型内毒株间序列同源性大于 88%, 而不同型间毒株的同源性为 80.3%~83.5%, 三个基因型的所有毒株的氨基酸同源性

(Identities) 大于 94%。三个基因型中, 1970 年在加利福尼亚分离的 EV71 原型株 (BrCr-Ca-70) 属于 A 型; 1972-1988 年在澳大利亚和美国、1994 年在哥伦比亚和 1997 年在马来西亚分离的 EV71 毒株属于 B 型, 自 1988 年以后, 美国出现其主要流行毒株 B 型逐渐被 C 型所取代的趋势; 加拿大、澳大利亚以及我国台湾地区 EV71 的主要流行毒株属于 C 型。

McMinn 等<sup>[7]</sup> 根据 VP1 核苷酸序列, 分析了自 1997-2001 期间在亚太地区流行的 66 个分离株, 结果表明, 1997-2001 年东南亚地区的 EV71 流行期间分离到两个新亚型, 即 B3 和 B4 亚型, 其中 B3 亚型在 1997-1999 年间为东南亚地区的流行株, 但 1999 年以后就再也没有分离到该亚型, B4 亚型曾在新加坡 (1997)、马来西亚 (1997-1998) 和台湾 (1998) 小规模流行, 但 2000 年在马来西亚和新加坡大规模流行, 成为流行株; 台湾 EV71 流行株为 C2 亚型; 澳大利亚西部小规模流行的 EV71 与曾在美国北部流行的 EV71 流行株同属 C1 亚型; 1999 年澳大利亚西部的 EV71 流行株来源于亚洲, 因为其 B3 亚型与 1997 年马来西亚流行的 B3 亚型的同源性高于 99%, C2 亚型与 1998 年台湾流行株的同源性大于 98%。Herrero 等<sup>[22]</sup> 曾对 1997 年和 2000 年在马来西亚流行的 43 株 EV71 病毒株进行了基于 VP1 的基因分型的研究, 根据其研究结果, 可把 1997 年和 2000 年在马来西亚流行的 EV71 分为四个亚型 (B3、B4、C1 和 C2), 与 McMinn 等的研究结果基本一致。Jee 等<sup>[23]</sup> 对 2000 年韩国流行的 EV71 进行了基于 5'-UTR 和 437bp 的 VP3/VP1 区的基因分型研究, 结果表明 2000 年韩国的 EV71 分离株为 C 型。

EV71 的结构蛋白 VP4 的氨基酸序列是非常保守的, 但其核苷酸序列的变异幅度却达 17.5%~24.4%<sup>[24]</sup>, 可用于分子流行病学和基因分型的研究。Chu 等<sup>[24]</sup> 曾对 23 株来自台湾 EV71 病毒株和 GeneBank 中的来自世界各地的其它 21 株 EV7 毒株进行了基于 Vp4 基因分型的研究, 结果表明, 44 个病毒株分为三个基因型 (A 型、B 型和 C 型)。A 型仅一株, 为标准株 BrCr; B 型主要为美国、日本和台湾的分离株, 大多为 1990 年以前分离的; C 型主要是日本和台湾分离株, 大多是 1990 年以后分离的, 可细分为 C-1、C-2 和 C-3 三个亚型。来自台湾的 23 个分离株可分为一大一小两个簇 (genetic clusters), 大簇为 C-3 型, 小簇为 B 型。该研究结果与 Shih 等<sup>[25]</sup> 基于台湾 1998 年 EV71 流

行期间的毒株的 Vp1 基因的核苷酸序列的分型结果高度一致。Shih 等的研究工作表明, 1998 年台湾 EV71 流行期间 18 株从死亡病例中分离的毒株中, 有 17 株分离毒株为 C 亚型, 仅 1 株为 B 型。因此, EV71 基于 Vp4 和 Vp1 的基因分型高度相关。

## 5 毒力决定因子

脊髓灰质炎病毒的 5'UTR 和 Vp1 区存在对其神经毒性有决定作用的序列位点<sup>[1]</sup>。肠道病毒 71 型可导致多种临床症状, 中枢神经系统症状所占的比例约为 10%, 但长期以来没有找到与毒力直接相关的 5'UTR 和 Vp1 序列位点<sup>[25]</sup>。另外, Coxsackie A16 和 EV71 (prototype) 的核苷酸序列和氨基酸序列的同源性 (Identities) 分别为 77% 和 89%, 其主要临床症状也与 EV71 相同, 为手足口病, 但 Coxsackie A16 在临床上不表现中枢神经系统症状。是否存在神经毒性序列位点来决定 EV71 和 Coxsackie A16 不同的临床表现, 目前尚无证据。

McMinn 等<sup>[26]</sup> 从 1999 年澳大利亚的 EV71 流行的中分离到了表现手足口病的毒株和具神经毒性的毒株, 通过对 Vp1 基因的序列分析, 发现两种不同症状的毒株的主要区别在于第 170 位氨基酸的不同, 表现手足口病的毒株为丙氨酸 (alanine), 而具神经毒性的毒株是缬氨酸 (valine)。McMinn 推测 VP1 蛋白的第 170 位氨基酸的这种变化, 可能改变了 VP1 蛋白的空间结构, 导致病毒与受体结合能力下降, 从而使其毒力发生根本的改变。

Fujimoto 等<sup>[27]</sup> 报道了 2000 年 6~8 月在日本 Hyogo 地区分离到的表现为脑干脑炎症状和手足口病的 EV71 毒株, 通过对结构蛋白基因 VP4 的序列分析表明, 表现为脑干脑炎症状的毒株 (39 株, 13 株为粪便样品, 21 株为脑脊液样品, 5 株为血清样品) 的 VP4 基因序列 (除一株外) 都是一致的, 而与表现为手足口病的 EV71 毒株 (30 株咽拭子样品) 的 VP4 基因序列有较大的区别。

肠道病毒属病毒的 5'-UTR 区存在一个非常保守的区域, 又叫核糖体进入位点 (IRES), 该位点可通过形成二级结构来调节病毒多聚蛋白的翻译, 从而影响病毒的复制能力和毒力<sup>[2]</sup>。野生的脊髓灰质炎病毒的 IRES 序列中仅一个碱基的改变足以改变该病毒的毒力<sup>[1]</sup>。通过 IRES 替换实验<sup>[28]</sup> 表明, 把弱毒的人鼻病毒的 IRES 重组到野生型的脊髓灰质炎病毒的基因组中, 产生重组病毒的毒力大大下降。EV71 同样存在 IRES 位点, 并对病毒蛋白质的翻译起调控作用, IRES 序列中碱基的改变可直接影

响病毒蛋白的翻译<sup>[29]</sup>。

## 6 预防与控制

脊髓灰质炎病毒疫苗已在控制全球脊髓灰质炎病毒传播的实践中取得了巨大的成功, 但尚没有公认的十分有效的 EV71 的疫苗和治疗药物。因此, 根据 EV71 流行的特点, 其预防与控制主要是通过 (1) 开展卫生宣传教育工作, 提高公众的安全防范意识; (2) 加强对公共场所 (幼儿园、中小学、儿童经常参与的游乐场所等) 卫生监督、监测和管理力度; (3) 建立完善的 EV71 流行监测网络。

目前亚太地区一些国家, 包括马来西亚、新加坡和我国台湾地区等, 都制订一整套 EV71 的预防与控制的策略, 建立完善的 EV71 流行监测网络。台湾的 EV71 流行监测网络覆盖整个台湾地区, 由 850 名一线医生提供 EV71 临床监测信息。实践证明这些监测系统能有效的预测 EV71 的流行, 避免 EV71 的大规模流行。

## 参考文献

- [1] McMinn P C. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance[J]. *FEMS Microbiol Rev*. 2002, 26: 91-107.
- [2] 金 奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [3] Komatsu K. Outbreak of severe neurologic involvement associated with enterovirus 71 infection[J]. *Pediatr. Neurol*. 1999, 20: 17-23.
- [4] Ho M. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan[J]. *New Engl, J, Med*, 1999, 341: 929-935.
- [5] Lum L C S. Neurogenic pulmonary oedema and enterovirus 71 encephalomyelitis[J]. *Lancet*, 1998, 352: 1391
- [6] Brown B A. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998[J]. *J Virol*, 1999, 73: 9969-9975
- [7] McMinn P C. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore and Western Australia[J]. *J Virol*, 2001, 39: 7732-7738.
- [8] Shih S R. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non-fatal cases of hand, foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998[J]. *Virus Res*, 2000, 31: 127-136
- [9] 扬 帆, 金 奇, 何雅青, 等. 肠道病毒 71 型中国分离株全基因组核苷酸序列分析[J]. *中国科学 (C 辑)*, 2001, 31: 163-167.
- [10] Ooi E E, Phoon M C, Ishak B, *et al*. Seroepidemiology of human enterovirus 71[J]. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8: 995-997.
- [11] 何雅青, 杨 洪, 丰素娟, 等. 2000 年深圳市肠道病毒 71 型的监测[J]. *疾病控制杂志*, 2003, 7(2): 153-154.
- [12] Lum L C S. Neurogenic pulmonary oedema and enterovirus 71 encephalomyelitis[J]. *Lancet*, 1998, 352: 1391.
- [13] Wang J R. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998. II. Laboratory diagnosis and genetic analysis[J]. *J Clin Virol*, 2000, 17: 91-99.
- [14] Brown B A, Kilpatrick D R. Serotype-specific identification of enterovirus 71 by PCR[J]. *J Clin Virol*, 2000, 16: 107-112.
- [15] Singh S. RT-PCR, nucleotide, amino acid and phylogenetic analyses of enterovirus type 71 in Asia[J]. *J Virol Methods*, 2000, 88: 193-204.
- [16] Tsao K C, CHANG P Y, Ning, H C, *et al*. Use of molecular assay in diagnosis of hand, food and mouth disease caused by enterovirus 71 or coxsackievirus A 16 [J]. *J Virol Methods*, 2002, 102: 9-14.
- [17] Chiueh T S, Huang C P, Yen C T, *et al*. Multiplex Reverse Transcription-semi-nested PCR for Differentiating Enterovirus 71, Coxsackievirus A16, and Polioviruses from Other Enteroviruses[J]. *J Med Sci*, 2001, 21: 277-282.
- [18] Shih S R, Wang Y W, Chen G W, *et al*. Serotype-specific detection of enterovirus 71 in clinical specimens by DNA microchip array[J]. *J Virol Methods*, 2003, 111: 55-60.
- [19] Shih S R. Expression of capsid protein VP1 for use as an antigen for the diagnosis of enterovirus 71 infection[J]. *J Med Virol*, 2000, 61(2): 228-234.
- [20] 杨国威, 何雅青, 薛 颖, 等. 肠道病毒 71 型外壳蛋白 VP1 在 *Pichia pastoris* 酵母中的表达[J]. *病毒学报*, 2003, 19(2): 114-117.
- [21] Brown B A, Kilpatrick D R. Serotype-specific identification of enterovirus 71 by PCR[J]. *J Clin Virol*, 2000, 16: 107-112.
- [22] Herrero L J, Lee C S M, Hurrelbrink, R J, *et al*. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000[J]. *Arch Virol*, 2003, 148: 1369-1385.
- [23] Jee Y M, Cheon D S, Kim K, *et al*. Genetic analysis of the VP1 region of human enterovirus 71 strains isolated in Korea during 2000 [J]. *Archives of Virology*, 2003, 148: 1735-1746.
- [24] Chu P Y, Lin K H, Hwang K P, *et al*. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in Taiwan[J]. *Arch Virol*, 2001, 146(3): 589-600.
- [25] Shih S R. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non-fatal cases of hand, foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998[J]. *Virus Res*. 2000, 31: 127-136.
- [26] McMinn P C, Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during a hand, foot and mouth disease outbreak in Western Australia[J]. *Clin Infect Dis*. 2001, 32: 236-242.
- [27] Fujimoto T, Chikahira M, Yoshida S, *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.
- [28] Gromeier M. Dual stem loops within the poliovirus internal ribosome entry site control neurovirulence[J]. *J Virol*, 1999, 73: 958-964.
- [29] Sunnie R T, Peter S. Enterovirus 71 contains a type I IRES element that functions when eukaryotic initiation factor eIF4G is cleaved[J]. *Virology*, 2003, 315: 259-266.