

# 人肠道病毒 71 型与手足口病的分子流行病学及其分子进化

刘志芳, 桂娟娟, 华启航, 董长征

宁波大学医学院预防医学系, 宁波 315211

**摘要:** 人肠道病毒 71 血清型(Enterovirus 71, EV71)是手足口病(Hand, foot and mouth disease, HFMD)的主要病原体之一, 除了引起手、足和口腔等部位出现疱疹的手足口病典型症状, 还能引起无菌性脑膜炎和急性迟缓性麻痹等神经系统并发症并致死亡。EV71 在历史上曾经造成多起手足口病疫情, 尤其是 1997 年之后, 在亚太地区发生了大规模的手足口病疫情, 造成了大量的手足口病病例和死亡病例。手足口病尚无上市疫苗和抗病毒药物, 主要依赖对症治疗, 因此对 EV71 的分子流行病学和分子进化研究对手足口病的监测和防控具有重要意义。文章对 EV71 基因型的分类、时空分布、进化特征和模式以及所造成的代表性疫情进行了综述, 为 EV71 致病机制、抗病毒药物和疫苗的研究以及对手足口病疫情的监测和防控提供启发。

**关键词:** 手足口病; 肠道病毒 71 型; 基因型; 疫情; 时空分布

## Molecular epidemiology and evolution of human enterovirus 71 and hand, foot and mouth disease

Zhifang Liu, Juanjuan Gui, Qihang Hua, Changzheng Dong

Department of Preventive Medicine, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China

**Abstract:** Human enterovirus 71(EV71), one of the major pathogens of the hand, foot and mouth disease (HFMD), causes skin rashes in palms, feet and mouth ulcers and complications in the central nervous system such as aseptic meningitis and acute flaccid paralysis that may lead to death. EV71 infection has been reported to be associated with many outbreaks of HFMD worldwide, especially the great outbreaks that occurred in the Asia-Pacific region and caused numerous death since 1997. The studies of molecular epidemiology and evolution of EV71 are important for the prevention and control of HFMD since no vaccines and antiviral drugs have been developed except symptomatic treatment for HFMD. In this review, we summarize genotype classification, temporal and spatial distribution, evolutionary characteristics and modes of EV71 as well as typical EV71 epidemics. Further studies on EV71 and HFMD may lead to better understanding of patho-

收稿日期: 2014-07-30; 修回日期: 2015-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31000594)和宁波大学学科项目(编号: XKL141060)资助

作者简介: 刘志芳, 在读硕士研究生, 专业方向: 生物信息学和统计遗传学。E-mail: 812314988@qq.com

桂娟娟, 在读硕士研究生, 专业方向: 生物信息学和统计遗传学。E-mail: 852042146@qq.com

刘志芳和桂娟娟并列第一作者。

通讯作者: 华启航, 讲师, 研究方向: 生物信息学和统计遗传学。E-mail: huaqihang@nbu.edu.cn

董长征, 博士, 副教授, 研究方向: 生物信息学和统计遗传学。E-mail: dongchangzheng@nbu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.14-255

网络出版时间: 2015-2-4 10:47:37

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150204.1047.001.html>

logical mechanisms of EV71, development of antiviral drugs and vaccines, and prevention and control of HFMD.

**Keywords:** hand, foot and mouth disease (HFMD); enterovirus 71(EV71); genotype; epidemic; temporal and spatial distribution

手足口病(Hand, foot and mouth disease, HFMD)是一种由多种肠道病毒引起的、主要表现为发热和手、足和口腔等部位出现疱疹的儿童常见传染病。手足口病临床以轻症患者(症状较轻,一般只需对症治疗,预后良好)为主,少数急性重症患者会出现神经系统(无菌性脑膜炎、脑炎和急性迟缓性麻痹等)和心肺(心肌炎和神经源性肺水肿等)等严重并发症,易致死亡<sup>[1,2]</sup>。

根据国际病毒分类委员会(International committee on taxonomy of viruses, ICTV)的最新分类(www.ictvonline.org),手足口病的病原体主要为肠道病毒属A种和B种的部分人肠道病毒血清型,其中最常见病原体为人肠道病毒 71 血清型(Enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒 16 血清型(Coxsackie virus 16, CV16)<sup>[1,2]</sup>。人肠道病毒由于感染人体部位的差异,可引起手足口病的轻症或重症表现。CV16 感染通常只造成轻症病例,危害较小,而 EV71 感染不仅造成轻症病例,还能造成重症和死亡病例,因此研究者主要关注 EV71 的致病机制和进化趋势。

本文结合手足口病近 60 年来在全球范围内的重大疫情,对 EV71 的分子流行病学和分子进化等领域的研究进展进行综述,帮助了解 EV71 基因型的分类、时空分布、进化特征和模式以及所造成的代表性疫情。

## 1 EV71 基因组结构

EV71、脊髓灰质炎病毒以及其他人类肠道病毒同属小RNA病毒科肠道病毒属,病毒颗粒均为二十面立体对称的球形结构,无包膜和突起,直径约 30

nm。病毒颗粒的衣壳由 60 个亚单位构成,每个亚单位包含 4 种结构蛋白(Viral protein, VP),分别是 VP1~VP4。其中 VP4 位于衣壳的内侧与病毒RNA相连接,VP1~VP3 组成病毒衣壳并暴露在病毒颗粒的表面,因此病毒的抗原决定簇主要位于 VP1~VP3 上<sup>[2]</sup>。EV71 基因组为单股正链RNA,长度约为 7.4 kb。基因组两端为 5' 和 3' 非编码区(Untranslated region, UTR),中间为连续的开放阅读框(Open reading frame, ORF),编码含有约 2194 个氨基酸的多聚蛋白(图 1)。该多聚蛋白可被 EV71 自身的蛋白酶裂解成 P1、P2 和 P3 三个前体蛋白;P1 前体蛋白又可进一步裂解成结构蛋白 VP1、VP2、VP3 和 VP4, P2 和 P3 裂解成 7 个非结构蛋白即 2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D<sup>[1,2]</sup>。

## 2 EV71 分子流行病学研究

### 2.1 EV71 基因型(Clade 或 subgenogroup)分类

VP1 蛋白暴露在病毒衣壳的表面,是宿主中和抗体的主要靶标之一<sup>[3]</sup>,而且根据 Oberste 等<sup>[4]</sup>的研究,VP1 序列和肠道病毒的血清型之间高度相关,因此最常被用于肠道病毒的血清学鉴定、分子流行病学和分子进化研究。根据 Brown(1999 年, A、B1、B2、C1 和 C2 基因型)<sup>[5]</sup>、McMinn(2001 年, B3 和 B4 基因型)<sup>[6]</sup>、Cardosa(2003 年, C3 基因型)<sup>[7]</sup>、Shimizu(2004 年, C4 基因型)<sup>[8]</sup>、Mizuta(2005 年, B5 基因型)<sup>[9]</sup>、Tu(2007 年, C5 基因型)<sup>[10]</sup>和 van der Sanden(2009 年, B0 基因型,为 B1 和 B2 基因型的可能前体)<sup>[11]</sup>等利用 VP1 序列对 EV71 基因型鉴定的研究成果,形成目前国际通用的基因型分类<sup>[12]</sup>(图 2): A、B(B1~B5)和 C(C1~C5)。

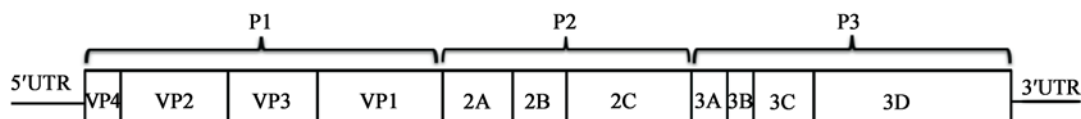


图 1 EV71 基因组结构

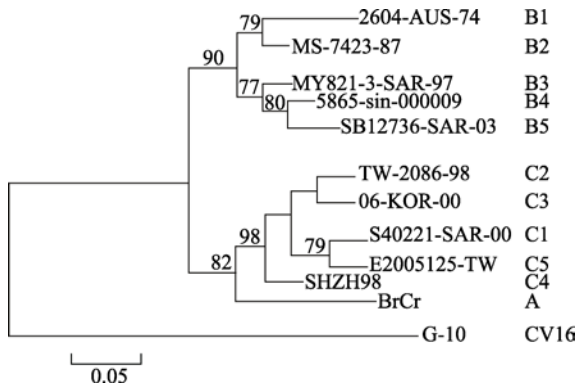


图 2 EV71 基因型分类

VP4 构建的进化树与VP1 较为相似,均能与柯萨奇病毒A组(Coxsackie virus A, CVA)各血清型病毒区分开,只是序列更加保守;3D构建的进化树则有较大差异, EV71 不同基因型病毒株与CVA各血清型病毒混合在一起<sup>[13]</sup>。Chan等<sup>[13]</sup>通过对 60 株EV71 和 16 株CVA全基因组序列的分子进化分析发现,它们构建的进化树与VP1 大体相似,而C4 和B5 在进化树上和单纯利用VP1 构建的进化树相比具有不同的拓扑结构, C4 应该成为独立的基因型“D”,而B5 应该归并入B4;Cardosa等<sup>[7]</sup>研究也有类似发现。Yip等<sup>[14]</sup>通过全基因组测序和进化分析发现了两株C4 和B型以及CV16 的双重重组体,将其命名为“D”。但由于对EV71 的分子流行病学和分子进化研究主要集中于VP1,因此这些利用全基因组或其他基因的基因型分类标准目前难以成为现实。Deshpande等<sup>[15]</sup>报道了几株散发的在VP1 进化树上介于B型和C型之间的孤立基因型,命名为“D型”,但并未得到公认。

## 2.2 手足口病疫情和 EV71 基因型的时空分布

全球手足口病的流行状况可以粗略的以 1997 年分界为两个阶段:1957~1997 阶段和 1997 至今阶段。自 1957 年首次报告手足口病疫情<sup>[16,17]</sup>、1960 年正式命名手足口病<sup>[18]</sup>、1974 年首次发现EV71 是手足口病病原体<sup>[19]</sup>以来,手足口病疫情在 1997 年之前主要发生在欧美地区(根据已有文献报道),但都属于中小规模暴发(尤其是相对于 1997 年之后亚太地区的疫情),重症病例较少,极少有死亡病例, EV71 的基因型也先后以B1、B2 和C1、C2 为主。1997 年之后,手足口病主要在亚太地区流行,马来西

亚<sup>[20,21]</sup>、新加坡<sup>[22,23]</sup>、中国台湾<sup>[24]</sup>、中国大陆<sup>[25,26]</sup>、越南<sup>[10]</sup>等多个国家和地区都先后暴发了大规模的手足口病疫情,出现了大量的重症和死亡病例,不到 20 年先后出现了B3~B5 和C3~C5 等多种基因型。

本文在前人的研究基础上<sup>[2,11]</sup>,收集了大量的文献资料,整理和绘制了EV71 基因型的全球时空分布图(图 3)。NCBI的核酸数据库中还有一些VP1 序列,由于没有文献佐证,缺乏详尽和可靠的时空分布证据,因此未被纳入该图的绘制。

### 2.2.1 A 基因型

Schmidt等<sup>[19]</sup>从 1969~1972 年间美国加利福尼亚州 20 例中枢神经系统疾病患者(其中 18 例为脑炎或无菌性脑膜炎)的粪便标本中分离出新型肠道病毒EV71。1995 年,美国疾病预防控制中心的Brown等<sup>[27]</sup>测序了Schmidt于 1970 年分离的EV71 病毒株 BrCr/CA/70,并在 1999 年首次鉴定EV71 基因型时将其划分为A基因型<sup>[5]</sup>。BrCr/CA/70 在历史上长期被认为是唯一被测序的A型病毒株,直至 40 年之后,中国大陆于 2009~2011 年间分别在安徽六安<sup>[28]</sup>、北京<sup>[26]</sup>和湖北武汉<sup>[25]</sup>发现了多株A型EV71,且与 BrCr/CA/70 高度同源。至今研究者仍未给出合理解释,为何A基因型相隔 40 年后又重新出现,且序列同源性并未随着进化而出现较大变化(与 BrCr/CA/70 的核酸同源性超过 97.2%)。但在流感病毒的流行中,也曾出现过类似现象:甲型H1N1 流感病毒在 1958 年被H2N2 流感病毒替代后,直至 1977 年又重新出现并流行<sup>[29]</sup>;这提示某些基因型病毒可能一直在小范围流行,只是由于缺乏足够的监测而未被发现。另外一种猜测是,由于BrCr/CA/70 一直在部分病毒实验室中通过反向遗传学进行研究(例如基因组突变位点功能研究<sup>[30,31]</sup>),存在人工病毒外流的风险。

### 2.2.2 B 基因型

根据Brown等<sup>[5]</sup>、van der Sanden等<sup>[11]</sup>、Bible等<sup>[32]</sup>、Diedrich等<sup>[33]</sup>和Schuffenecker等<sup>[34]</sup>的回顾性研究,B0 基因型(B1 和B1 基因型的可能前体)在 60 年代出现并和A基因型一起流行,B1 基因型主要于 70 年代在欧美地区流行并伴随散发的B2 基因型,B2 则主要在 80 年代流行,只在德国于 1997、1998 年

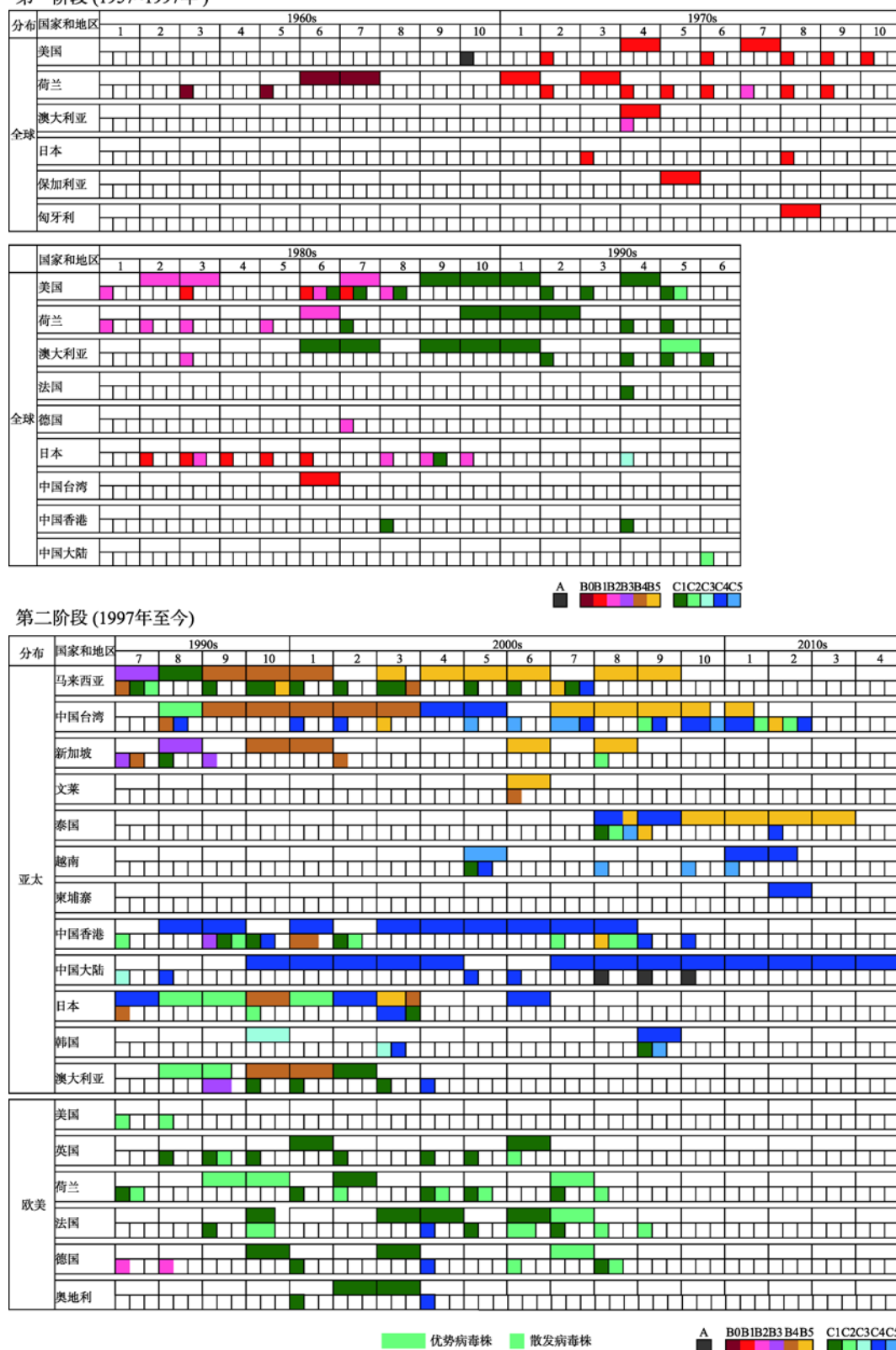


图 3 EV71 基因型的时空分布

出现散发病毒株<sup>[33]</sup>。对于亚太地区来说,澳大利亚<sup>[6]</sup>和日本<sup>[35]</sup>与欧美地区流行的基因型基本一致,分离到大量B1和B2基因型病毒株,其他地区只有在中国台湾等有零星报道<sup>[36]</sup>。B3、B4和B5基因型都是在马来西亚的疫情中出现的。1997年4~8月,马来西亚沙捞越地区首次发生EV71流行(部分伴发B型腺病毒感染<sup>[37]</sup>),造成至少31例6岁以下儿童死于手足口病重症表现—病毒性心肌炎<sup>[6, 38]</sup>,也成为亚太地区首次大规模暴发的手足口病疫情。此次疫情中EV71的基因型以B3为主,伴有B4、C1和C2,这也是历史上首次发现B3和B4基因型。在1999~2001年马来西亚疫情中,B4成为优势基因型伴发C1<sup>[6, 38]</sup>,并首次发现了B5基因型;此后,B5成为马来西亚的优势基因型,并造成了2003、2005年末至2006年初两次较大规模疫情<sup>[20]</sup>。B3在引起马来西亚1997年大规模疫情之后,又引起了新加坡(地理上紧邻马来西亚)1998年大规模疫情,紧接着于1999年在澳大利亚和中国香港出现,短暂流行后便在亚太消失。B4在90年代末一直是亚太地区的主要基因型,在1999~2003年间一直是中国台湾的优势基因型并造成了2000年和2001年两次大规模疫情,分别造成291例和389例重症病例、41例和55例死亡病例<sup>[39]</sup>。B5则从2003年起成为亚太最重要的基因型之一流行至今。

### 2.2.3 C 基因型

C1基因型在80年代末开始流行并在1995年之前都是欧美地区的优势病毒株,1995年之后C2基因型开始出现并和C1基因型交替在欧美流行直至当今。C1和C2基因型在马来西亚的1997、1999到2001等多次疫情中出现,但并非优势基因型。在1998年中国台湾地区广泛出现主要由EV71和CV16引起的大规模手足口病疫情中,C2是EV71的优势基因型;此次疫情共报道129 106例手足口病和疱疹性咽峡炎病例,其中405例重症病例(包括78例死亡病例),重症病例和死亡病例EV71感染率分别为75%和92%<sup>[40, 41]</sup>。

C3是亚太地区最早出现的C类新基因型,但只在日本、中国大陆和韩国散发。C4最早在日本分离到,但主要以中国大陆为核心在亚太地区广泛流行,并和B5一起成为亚太目前最主要的基因型。C4首次大规模疫情于2007年出现在中国山东,导致405

例重症病例和78例死亡病例<sup>[42]</sup>,但C4真正震撼全世界的是中国安徽省阜阳市的2008年疫情。2008年安徽阜阳暴发了C4基因型EV71为主伴发CV16感染导致的手足口病疫情,3~5月份共报告6049例病例<sup>[43]</sup>。由于疫情早期患者主要表现为中枢神经系统症状而不是典型的手足口病症状,病情进展迅速,疫情迅猛扩散,造成入院3023例、重症353例和死亡22例病例。其后,C4基因型引起的手足口病疫情在全国大规模流行,发病率至今居高不下,发病率和死亡率位于丙类传染病首位<sup>[44]</sup>。令人困惑的是,回顾性研究发现导致此次疫情的C4基因型早在1998年就已经存在于中国大陆并在此后广泛传播,且与日本、中国台湾和中国香港等国家和地区的C4具有相近的亲缘关系<sup>[45, 46]</sup>,为何此前没有引起较大规模的手足口病疫情?虽然有研究认为,在中国大陆流行的C4可以再细分为两个亚型:1998~2004年主要流行C4b,而2004年之后主要流行C4a<sup>[45~47]</sup>,但无法证明C4a的出现是产生大规模疫情的主要原因<sup>[48]</sup>。另外,相对周边国家和地区的EV71基因型多样性,为何中国大陆分离的EV71几乎都是C4?C5在越南出现并曾成为优势基因型后主要在中国台湾散发。在欧美地区,仅于2004年在德国<sup>[33]</sup>、法国<sup>[34]</sup>和奥地利<sup>[49]</sup>同时出现了C4个案报道。

## 3 EV71 分子进化研究

### 3.1 EV71 基因组进化特征

EV71的进化速率约为 $4.2\sim 4.6 \times 10^{-3}$ 替换/位置/年(Substitutions per site per year),相当于每年整个EV71基因组约有30个新突变<sup>[50]</sup>。对VP1核酸序列进行一致性分析发现,EV71和CVA各血清型病毒之间的一致性约为51%~65%,A、B、C3种基因型之间的一致性约为80%~85%,B1~B5和C1~C5各个基因亚型之间一致性约为86%~96%,而各个基因亚型内部的一致性约为91%~99%<sup>[13]</sup>。正因为如此,为何A基因型在40年后重现仍然保持着与BrCr/CA/70高度同源(核酸同源性超过97.2%)实在令人费解。Brown等<sup>[27]</sup>对两株病毒(一株为A型的BrCr/CA/70,另一株为B2型的神经毒性病毒株7423/MS/87)进行了全基因组测序,发现它们的核酸序列同源性约为81%,而氨基酸序列同源性却高达95%,这说明7423/MS/87主要的突变为同义突变;Brown等<sup>[51]</sup>



对 113 株病毒 VP1 的研究,发现 EV71 大约 93% 的替换发生在密码子第三位,98% 的替换为同义突变;EV71 除了 B3 基因型的 dN/dS 略高(0.172),其他基因型的 dN/dS 均介于 0.029~0.075,说明基因组经历了强烈的负选择(纯化选择),尽管个别 VP1 的氨基酸位点如 145、237 和 241 等仍表现为正选择<sup>[50]</sup>。

Tee 等<sup>[50]</sup>利用贝叶斯 MCMC 算法和 VP1 序列对最近共同祖先出现时间(Time for most recent common ancestor, TMRCA)的估算,推断 B1~B5 分别出现在大约 1967、1978、1994、1993 和 2001 年,C1~C5 分别出现在 1983、1992、1998、1992 和 2002 年,比分离到的首株对应基因型病毒早 2~6 年。Mirand 等<sup>[51]</sup>在几乎所有基因型(除了 C3)的 TMRCA 推断上也得到相近的结果。由于 C3 基因型分离的病毒株比较罕见,TMRCA 估计时误差较大;Mirand 等<sup>[51]</sup>估计时使用的 C3 病毒株最早分离时间比 Tee 等更早,因此推断 C3 的 TMRCA 为 1989 年,比 Tee 等提早了将近 10 年。

### 3.2 EV71 基因组重组

EV71 基因组为单股正链 RNA,因此重组是 EV71 基因组进化的重要方式。由于常常有多种血清型或基因型的肠道病毒同时流行(图 3)、同时感染宿主,因此病毒 RNA 合成时聚合酶上的部分 RNA 模板在不同血清型或基因型之间发生了切换,造成了基因组重组。根据重组的来源,可以分为血清型之间(Intertypic recombination)和基因型之间(Intratypic recombination)的重组。重组分析主要利用各个基因分别构建进化树、绘制序列相似性图谱、bootscan 分析等方法来综合判定是否发生重组事件,再利用 blast 扫描和联配(Align)确定具体重组位置<sup>[52]</sup>。由于肠道病毒中与 EV71 最近的血清型是 CV16,因此它们之间的重组也最常见。Chan 等<sup>[13]</sup>根据全基因组序列和 P1(或 VP1)的进化分析,发现 EV71 所有基因型病毒株都聚集在一起形成单独一簇,最近缘的肠道病毒为 CV16,但 EV71 和 CV16 之间的同源性不到 50%;对 5' UTR、P2 和 P3 单独进化分析,BrCr/CA/70 都与 CVA3 和 CVA2 聚集在一起,C2 基因型则与 CVA8 聚集在一起,它们之间的同源性都超过 80%。Huang 等<sup>[36]</sup>在中国台湾 1998 年疫情中分离的 C2 基因型也观察到了相同现象。Zhang 等<sup>[43]</sup>发现 C4 基因型代表株之一的安徽阜阳病毒株

Fuyang.Anhui.CHN/17.08/1 的 3D 基因与 CV16 之间的核酸序列一致性达到 85%,而氨基酸序列一致性达到 97%;当使用某些基因(如 3D 基因)进行进化分析,一些 EV71 病毒株与 CV16 的同源性甚至高于其他 EV71 基因型之间的同源性<sup>[14]</sup>。Zhang 等<sup>[53]</sup>发现在中国大陆流行的 C4 基因型可能起源于 C 基因型与 CV16、CV14 和 CV4 的重组体。这些都说明 EV71 和 CVA 病毒之间存在着血清型之间的重组,也暗示着 EV71 新基因型的可能来源。

EV71 不同基因型之间的重组也有多篇报道。Bible 等<sup>[32]</sup>发现一株中国台湾 1998 年疫情中分离的病毒株 TW/2272/98 是 EV71 基因型 B2 和 C2 的重组体,其 VP1 可能来源于 B2 基因型,而其他基因都来源于 C2。Huang 等<sup>[54]</sup>在中国台湾 2004~2005 年疫情中发现了基因型 B 和 C 之间在 2A、3C 等位置发生的重组。van der Sanden 等<sup>[55]</sup>对荷兰 1963~2008 年间的 EV71 病毒株的大规模重组分析,发现了多起重组事件,例如一株 1986 年荷兰疫情分离的 B2 基因型病毒株的 5' UTR 和亚洲的 B3/B4 基因型的同源性超过 90%。Leitch 等<sup>[56]</sup>发现 EV71 不同基因型之间的遗传距离呈现明显的跳跃性,这提供了 EV71 基因型在进化过程中广泛存在重组的间接证据,他们甚至依此断言几乎所有 EV71 的基因型都是通过重组而产生的,但他们并未探讨重组的可能来源和方式。Chen 等<sup>[52]</sup>通过多种重组检测算法确认了基因型间重组的广泛存在,但同样未追踪到重组的确切来源。Liu 等<sup>[57]</sup>还发现 C4 基因型内部也存在重组事件。

毫无疑问,EV71 和多种血清型的 CVA 病毒共同流行以及 EV71 多种基因型的共同流行(尤其是在疫情期)促进了重组的发生,但是否重组促进了疫情的发生仍不明确,重组和患者病情程度之间的关联也不明确。另外,对 EV71 基因组点突变的研究已有近 20 年的历史,研究主要集中在寻找能够区别轻症和重症手足口病患者的点突变<sup>[16, 58]</sup>,但迄今尚无显著进展。

## 4 展望

由于历史上对手足口病及其病原体不够重视,因此 EV71 缺乏充足的监测资料。例如,根据对流感病毒的研究,流感病毒基因型在分子进化树上呈现连续变化的(抗原性则呈现跳跃性),即基因型之间的

遗传距离并没有显著跳跃<sup>[29, 59]</sup>；然而从已有的研究来看，EV71 基因型之间的遗传距离呈现明显的跳跃性，基因型之间缺少必要的中间过渡<sup>[56]</sup>。van der Sanden 等<sup>[11]</sup>对荷兰 EV71 的大规模回顾性研究发现了基因型 B1\*，其在进化树上处于此前发现的 B1 和 B2 之间，过渡了两者之间遗传距离上的跳跃性，使得 B1 到 B2 的遗传变化更加连续。这强烈暗示着 EV71 基因型之间的这种遗传跳跃性很可能是由于缺乏对 EV71 的长期监测，使得分离的病毒具有明显的采样偏倚。近年来在经受了大规模疫情之后，亚洲许多国家都建立了手足口病监测系统，增加了对病原体的采样和测序，而且不少测序还覆盖到了全基因组，逐渐弥补了采样和仅测序 VP1 对监测和研究的限制。无论如何，对手足口病病原体的分子流行病学和分子进化监测和研究仍将是防控手足口病的重要措施。

虽然目前手足口病还没有上市的抗病毒药物和疫苗，但是对它们的研发正在进行中。鼻病毒与肠道病毒同属小 RNA 病毒科，原本多个抑制鼻病毒 VP1 和 3C 蛋白酶的小分子化合物如 Pleconaril 和 Rupintrivir 正用于 EV71 的抗病毒试验，但取得的效果不一<sup>[60]</sup>。我国研发的两款 EV71 灭活疫苗分别在 10 007 和 12 000 名健康婴幼儿身上进行了三期临床试验，发现疫苗对手足口病的保护率达 95% 以上，取得了很好的免疫保护效果，相信在不久的将来就能用于保护儿童<sup>[61-63]</sup>。

## 参考文献

- [1] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardosa MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11): 778–790. [\[DOI\]](#)
- [2] McMinn PC. Recent advances in the molecular epidemiology and control of human enterovirus 71 infection. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(2): 199–205. [\[DOI\]](#)
- [3] Zhou SL, Ying XL, Han X, Sun XX, Jin Q, Yang F. Characterization of the enterovirus 71 VP1 protein as a vaccine candidate. *J Med Virol*, 2015, 87(2): 256–262. [\[DOI\]](#)
- [4] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*, 1999, 73(3): 1941–1948. [\[DOI\]](#)
- [5] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, Kennett ML, Pallansch MA. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol*, 1999, 73(12): 9969–9975. [\[DOI\]](#)
- [6] McMinn P, Lindsay K, Perera D, Chan HM, Chan KP, Cardosa MJ. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia. *J Virol*, 2001, 75(16): 7732–7738. [\[DOI\]](#)
- [7] Cardosa MJ, Perera D, Brown BA, Cheon D, Chan HM, Chan KP, Cho H, McMinn P. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(4): 461–468. [\[DOI\]](#)
- [8] Shimizu H, Utama A, Onnimala N, Chen L, Zhang LB, Ma YJ, Pongsuwanna Y, Miyamura T. Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatr Int*, 2004, 46(2): 231–235. [\[DOI\]](#)
- [9] Mizuta K, Abiko C, Murata T, Matsuzaki Y, Itagaki T, Sanjoh K, Sakamoto M, Hongo S, Murayama S, Hayasaka K. Frequent importation of enterovirus 71 from surrounding countries into the local community of Yamagata, Japan, between 1998 and 2003. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(12): 6171–6175. [\[DOI\]](#)
- [10] Tu PV, Thao NT, Perera D, Huu TK, Tien NT, Thuong TC, How OM, Cardosa MJ, McMinn PC. Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(11): 1733–1741. [\[DOI\]](#)
- [11] van der Sanden S, Koopmans M, Uslu G, van der Avoort H. Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963 to 2008. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(9): 2826–2833. [\[DOI\]](#)
- [12] Yip CCY, Lau SKP, Woo PCY, Yuen KY. Human enterovirus 71 epidemics: what's next? *Emerg Health Threats J*, 2013, 6: 19780. [\[DOI\]](#)
- [13] Chan YF, Sam IC, AbuBakar S. Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences. *Infect Genet Evol*, 2010, 10(3): 404–412. [\[DOI\]](#)
- [14] Yip CCY, Lau SKP, Lo JYC, Chan KH, Woo PCY, Yuen KY. Genetic characterization of EV71 isolates from 2004 to 2010 reveals predominance and persistent circulation of the newly proposed genotype D and recent emergence of a distinct lineage of subgenotype C2 in Hong Kong. *Viol J*,

- 2013, 10: 222. [\[DOI\]](#)
- [15] Deshpande JM, Nadkarni SS, Francis PP. Enterovirus 71 isolated from a case of acute flaccid paralysis in India represents a new genotype. *Curr Sci*, 2003, 84(10): 1350–1353. [\[DOI\]](#)
- [16] Robinson CR, Doane FW, Rhodes AJ. Report of an outbreak of febrile illness with pharyngeal lesions and exanthem: Toronto, summer 1957—isolation of group A coxsackie virus. *Can Med Assoc J*, 1958, 79(8): 615–621. [\[DOI\]](#)
- [17] Seddon JH. Research newsletter No. 2: Research committee of New Zealand council. College of General Practitioners, 1961. [\[DOI\]](#)
- [18] Alsop J, Flewett TH, Foster JR. "Hand-foot-and-mouth disease" in Birmingham in 1959. *Br Med J*, 1960, 2(5214): 1708–1711. [\[DOI\]](#)
- [19] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis*, 1974, 129(3): 304–309. [\[DOI\]](#)
- [20] Yusof MA, Rais F, Abdullah MA, Zamri LA, Ali HM, Kassim FM, Saat Z. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 (HEV71) strains isolated in Peninsular Malaysia and Sabah from year 2001 to 2009. *J Gen Mol Virol*, 2011, 3(1): 18–26. [\[DOI\]](#)
- [21] Chan YF, Wee KL, Chiam CW, Khor CS, Chan SY, Amalina WM, Sam IC. Comparative genetic analysis of VP4, VP1 and 3D gene regions of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating in Malaysia between 1997–2008. *Trop Biomed*, 2012, 29(3): 451–466. [\[DOI\]](#)
- [22] Wu Y, Yeo A, Phoon MC, Tan EL, Poh CL, Quak SH, Chow VT. The largest outbreak of hand; foot and mouth disease in Singapore in 2008: The role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains. *Int J Infect Dis*, 2010, 14(12): e1076–e1081. [\[DOI\]](#)
- [23] Ang LW, Phoon MC, Wu Y, Cutter J, James L, Chow V. The changing seroepidemiology of enterovirus 71 infection among children and adolescents in Singapore. *BMC Infect Dis*, 2011, 11(1): 270. [\[DOI\]](#)
- [24] Chia MY, Chiang PS, Chung WY, Luo ST, Lee MS. Epidemiology of enterovirus 71 infections in Taiwan. *Pediatr Neonatol*, 2014, 55(4): 243–249. [\[DOI\]](#)
- [25] Yang Z, Lu SY, Xian JC, Ye J, Xiao L, Luo J, Zen K, Liu FY. Complete genome sequence of a human enterovirus 71 strain isolated in Wuhan, China, in 2010. *Genome Announc*, 2013, 1(6): e01112–e01113. [\[DOI\]](#)
- [26] Zhu JP, Luo Z, Wang J, Xu ZG, Chen H, Fan DY, Gao N, Ping GL, Zhou Z, Zhang Y, An J. Phylogenetic analysis of Enterovirus 71 circulating in Beijing, China from 2007 to 2009. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56318. [\[DOI\]](#)
- [27] Brown BA, Pallansch MA. Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus. *Virus Res*, 1995, 39(2–3): 195–205. [\[DOI\]](#)
- [28] Yu HY, Chen W, Chang HW, Tang RS, Zhao J, Gan L, Liu BY, Chen J, Wang ML. Genetic analysis of the VP1 region of enterovirus 71 reveals the emergence of genotype A in central China in 2008. *Virus Genes*, 2010, 41(1): 1–4. [\[DOI\]](#)
- [29] 董长征. 流感病毒基因组进化研究进展. *遗传*, 2011, 33(3): 189–197. [\[DOI\]](#)
- [30] Arita M, Shimizu H, Nagata N, Ami Y, Suzaki Y, Sata T, Iwasaki T, Miyamura T. Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *J Gen Virol*, 2005, 86(5): 1391–1401. [\[DOI\]](#)
- [31] Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzaki Y, Mizuta K, Iwasaki T, Sata T, Wakita T, Shimizu H. An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype a showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol*, 2007, 81(17): 9386–9395. [\[DOI\]](#)
- [32] Bible JM, Iturriza-Gomara M, Megson B, Brown D, Pantelidis P, Earl P, Bendig J, Tong CY. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(10): 3192–3200. [\[DOI\]](#)
- [33] Diedrich S, Weinbrecht A, Schreier E. Seroprevalence and molecular epidemiology of enterovirus 71 in Germany. *Arch Virol*, 2009, 154(7): 1139–1142. [\[DOI\]](#)
- [34] Schuffenecker I, Mirand A, Antona D, Henquell C, Chomel JJ, Archimbaud C, Billaud G, Peigue-Lafeuille H, Lina B, Bailly JL. Epidemiology of human enterovirus 71 infections in France, 2000–2009. *J Clin Virol*, 2011, 50(1): 50–56. [\[DOI\]](#)
- [35] Iwai M, Masaki A, Hasegawa S, Obara M, Horimoto E, Nakamura K, Tanaka Y, Endo K, Tanaka K, Ueda J, Shiraki K, Kurata T, Takizawa T. Genetic changes of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 isolated from hand, foot, and mouth disease patients in Toyama, Japan between 1981 and 2007. *Jpn J Infect Dis*, 2009, 62(4): 254–259. [\[DOI\]](#)
- [36] Huang SW, Hsu YW, Smith DJ, Kiang D, Tsai HP, Lin KH, Wang SM, Liu CC, Su IJ, Wang JR. Reemergence of enterovirus 71 in 2008 in Taiwan: dynamics of genetic and antigenic evolution from 1998 to 2008. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(11): 3653–3662. [\[DOI\]](#)
- [37] Cardoso MJ, Krishnan S, Tio PH, Perera D, Wong SC. Isolation of subgenus B adenovirus during a fatal outbreak



- of enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease in Sibul, Sarawak. *Lancet*, 1999, 354(9183): 987–991. [\[DOI\]](#)
- [38] Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, Chua BH, Chua KB, McMinn PC. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997–2000. *Arch Virol*, 2003, 148(7): 1369–1385. [\[DOI\]](#)
- [39] Lin TY, Twu SJ, Ho MS, Chang LY, Lee CY. Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: occurrence and recognition. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(3): 291–293. [\[DOI\]](#)
- [40] Wu TN, Tsai SF, Li SF, Lee TF, Huang TM, Wang ML, Hsu KH, Shen CY. Sentinel surveillance for enterovirus 71, Taiwan, 1998. *Emerg Infect Dis*, 1999, 5(3): 458–460. [\[DOI\]](#)
- [41] Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF, Wang JR, Shih SR. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Engl J Med*, 1999, 341(13): 929–935. [\[DOI\]](#)
- [42] Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, Yan DM, Zhu SL, Wang DY, Ji F, Wang XJ, Gao YJ, Chen L, An HQ, Li DX, Wang SW, Xu AQ, Wang ZJ, Xu WB. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. *J Clin Virol*, 2009, 44(4): 262–267. [\[DOI\]](#)
- [43] Zhang Y, Zhu Z, Yang WZ, Ren J, Tan XJ, Wang Y, Mao NY, Xu ST, Zhu SL, Cui AL, Zhang Y, Yan DM, Li Q, Dong XP, Zhang J, Zhao YP, Wan JF, Feng ZJ, Sun JL, Wang SW, Li DX, Xu WB. An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand foot and mouth disease in Fuyang city of China. *Virol J*, 2010, 7: 94. [\[DOI\]](#)
- [44] Xing WJ, Liao QH, Viboud C, Zhang J, Sun JL, Wu JT, Chang ZR, Liu FF, Fang VJ, Zheng YD, Cowling BJ, Varma JK, Farrar JJ, Leung GM, Yu HJ. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008–12: an epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(4): 308–318. [\[DOI\]](#)
- [45] Tan XJ, Huang XY, Zhu SL, Chen H, Yu QL, Wang HY, Huo XX, Zhou JH, Wu Y, Yan DM, Zhang Y, Wang DY, Cui AL, An HQ, Xu WB. The persistent circulation of enterovirus 71 in People's Republic of China: causing emerging nationwide epidemics since 2008. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25662. [\[DOI\]](#)
- [46] Tao ZX, Wang HY, Xu AQ. Identification of a C2 subgenogroup strain of enterovirus 71 in a retrospective study in Shandong Province, China, from 1990 to 2010. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(5): 1823–1824. [\[DOI\]](#)
- [47] Tao ZX, Wang HY, Li Y, Liu GF, Xu AQ, Lin XJ, Song LZ, Ji F, Wang ST, Cui N, Song YY. Molecular epidemiology of human enterovirus associated with aseptic meningitis in Shandong Province, China, 2006–2012. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89766. [\[DOI\]](#)
- [48] Guan DW, van der Sanden S, Zeng HR, Li W, Zheng HY, Ma C, Su J, Liu Z, Guo X, Zhang X, Liu L, Koopmans M, Ke CW. Population dynamics and genetic diversity of C4 strains of human enterovirus 71 in mainland China, 1998–2010. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44386. [\[DOI\]](#)
- [49] Huemer H, Ortner B, Huang C, Schmid D, Mutz I, Wewalka G, Yang J, Allerberger F. Isolating Asian enterovirus 71 subgenogroup C4 in two Austrian Clinical samples from 2004. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(11): 1733–1741. [\[DOI\]](#)
- [50] Tee KK, Lam TTY, Chan YF, Bible JM, Kamarulzaman A, Tong CW, Takebe Y, Pybus OG. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene. *J Virol*, 2010, 84(7): 3339–3350. [\[DOI\]](#)
- [51] Mirand A, Schuffenecker I, Henquell C, Billaud G, Jugie G, Falcon D, Mahul A, Archimbaud C, Terletskaia-Ladwig E, Diedrich S, Huemer HP, Enders M, Lina B, Peigue-Lafeuille H, Bailly JL. Phylogenetic evidence for a recent spread of two populations of human enterovirus 71 in European countries. *J Gen Virol*, 2010, 91(9): 2263–2277. [\[DOI\]](#)
- [52] Chen XM, Zhang Q, Li JH, Cao W, Zhang JX, Zhang L, Zhang WL, Shao ZJ, Yan YP. Analysis of recombination and natural selection in human enterovirus 71. *Virology*, 2010, 398(2): 251–261. [\[DOI\]](#)
- [53] Zhang Y, Tan XJ, Cui AL, Mao NY, Xu ST, Zhu Z, Zhou JH, Shi J, Zhao YP, Wang XJ, Huang XY, Zhu SL, Zhang Y, Tang W, Ling H, Xu WB. Complete genome analysis of the C4 subgenotype strains of enterovirus 71: predominant recombination C4 viruses persistently circulating in China for 14 years. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56341. [\[DOI\]](#)
- [54] Huang SC, Hsu YW, Wang HC, Huang SW, Kiang D, Tsai HP, Wang SM, Liu CC, Lin KH, Su IJ, Wang JR. Appearance of intratypic recombination of enterovirus 71 in Taiwan from 2002 to 2005. *Virus Res*, 2008, 131(2): 250–259. [\[DOI\]](#)
- [55] van der Sanden S, van Eek J, Martin DP, van der Avoort H, Vennema H, Koopmans M. Detection of recombination breakpoints in the genomes of human enterovirus 71 strains isolated in the Netherlands in epidemic and non-epidemic years, 1963–2010. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(5): 886–894. [\[DOI\]](#)
- [56] McWilliam Leitch EC, Cabrero M, Cardoso J, Harvala H, Ivanova OE, Koike S, Kroes ACM, Lukashev A, Perera D, Roivainen M, Susi P, Trallero G, Evans DJ, Simmonds P.

- The association of recombination events in the founding and emergence of subgenogroup evolutionary lineages of human enterovirus 71. *J Virol*, 2012, 86(5): 2676–2685. [\[DOI\]](#)
- [57] Liu WY, Wu SM, Xiong Y, Li TY, Wen Z, Yan MZ, Qin K, Liu YL, Wu JG. Co-circulation and genomic recombination of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 during a large outbreak of hand, foot, and mouth disease in central China. *PLoS One*, 2014, 9(4): e96051. [\[DOI\]](#)
- [58] Shih SR, Ho MS, Lin KH, Wu SL, Chen YT, Wu CN, Lin TY, Chang LY, Tsao KC, Ning HC, Chang PY, Jung SM, Hsueh C, Chang KS. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non-fatal cases of hand, foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998. *Virus Res*, 2000, 68(2): 127–136. [\[DOI\]](#)
- [59] Smith DJ, Lapedes AS, de Jong JC, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*, 2004, 305(5682): 371–376. [\[DOI\]](#)
- [60] Kuo RL, Shih SR. Strategies to develop antivirals against enterovirus 71. *Virol J*, 2013, 10: 28. [\[DOI\]](#)
- [61] Zhu FC, Xu WB, Xia JL, Liang ZL, Liu Y, Zhang XF, Tan XJ, Wang L, Mao QY, Wu JY, Hu YM, Ji TJ, Song LF, Liang Q, Zhang BM, Gao Q, Li JX, Wang SY, Hu YS, Gu SR, Zhang JH, Yao GH, Gu JX, Wang XS, Zhou YC, Chen CB, Zhang ML, Cao MQ, Wang JZ, Wang H, Wang N. Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China. *N Engl J Med*, 2014, 370(9): 818–828. [\[DOI\]](#)
- [62] Li RC, Liu LD, Mo ZJ, Wang XY, Xia JL, Liang ZL, Zhang Y, Li YP, Mao QY, Wang JJ, Jiang L, Dong CH, Che YC, Huang T, Jiang ZW, Xie ZP, Wang LC, Liao Y, Liang Y, Nong Y, Liu JS, Zhao HL, Na RX, Guo L, Pu J, Yang EX, Sun L, Cui PF, Shi HJ, Wang JZ, Li QH. An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children. *N Engl J Med*, 2014, 370(9): 829–837. [\[DOI\]](#)
- [63] Lu S. EV71 vaccines: a milestone in the history of global vaccine development. *Emerg Microbes Infect*, 2014, 3(4): e27. [\[DOI\]](#)

(责任编辑: 岑山)