

- 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11):1123-1132.
- [19] Guo Y, MacIsaac KD, Chen Y, et al. Inhibition of ROR $\gamma$ T skews TCR $\alpha$  gene rearrangement and limits T cell repertoire diversity[J]. Cell Reports, 2016, 17(12):3206-3218.
- [20] Xiao S, Yosef N, Yang J, et al. Small-molecule ROR $\gamma$ T antagonists inhibit T helper 17 cell transcriptional network by divergent mechanisms[J]. Immunity, 2014, 40(4):477-489.
- [21] Lissauer D, Goodyear O, Khanum R, et al. Profile of maternal CD4 T-cell effector function during normal pregnancy and in women with a history of recurrent miscarriage[J]. Clin Sci, 2014, 126(5):347-354.
- [22] Okoye IS, Coomes SM, Pelly VS, et al. MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells[J]. Immunity, 2014, 41(1):89-103.

## · 综述 ·

# 肠道病毒 71 型致病机制及检测方法研究进展\*

马东礼<sup>1</sup>, 刘必忱<sup>1</sup> 综述, 钟山<sup>2△</sup> 审校

(深圳市儿童医院:1. 检验科; 2. 内科, 广东深圳 518038)

**关键词:** 肠道病毒 71 型; 手足口病; 致病

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)22-3159-03

肠道病毒 71 型(EV71)是引起婴幼儿手足口病的主要病原体之一<sup>[1]</sup>。受 EV71 病毒感染的患者因免疫反应不同会有不同的表现症状, 主要为手、足、口、咽峡等处疱疹和发热、皮疹等轻微症状, 但部分婴幼儿可能出现中枢神经系统感染及心肌炎等, 严重威胁到婴幼儿的健康。因此对 EV71 致病机制和早期检测的研究十分必要。目前, 学者们对 EV71 的发病机制有一定的认识, 但仍然需要进一步探索。EV71 感染检测的主要途径有分子生物学检测和血清学检测, 各具特色。本文主要对 EV71 的致病机制和检测方法研究进展作一综述。

## 1 EV71 的致病机制

EV71 是小 RNA 病毒, 入侵人体后会先在小肠形成原发病灶, 并在淋巴结中大量复制, 其表面的核仁素能促进病毒与宿主组织结合, 衣壳上的特殊脂筏能协助其进入组织细胞。EV71 表达的半乳糖凝集素 1 蛋白保护病毒体在宿主中复制不受影响, 从而促进其感染<sup>[2-4]</sup>。EV71 感染后 3 d 左右会有少量病毒入侵血流, 主要播散到网状内皮组织和其他靶组织。由于免疫系统的差异, 感染者表现出不同的临床症状: 部分感染者由于其免疫力较强, 可以控制病毒感染和播散而无临床表现, 称为无症状感染者; 部分感染者由于免疫力较弱, 大约 2 d 后会出现持续性重度菌血症, 同时大量病毒播散至脑、脑膜、脊髓、心脏、黏膜和皮肤等靶组织引起炎症性病变。多数患者也

能在自身免疫防御的作用下使病毒的复制停止, 临床表现为轻症手足口病; 仅有极少数患者会出现病毒在靶器官大量复制而导致的重症感染症状, 临床表现为脊髓灰质炎、脑炎、无菌性脑膜炎、神经源性肺水肿、急性弛缓性麻痹或心肌炎等<sup>[5-6]</sup>。有研究发现 IL-4-589c/T 基因的多态性与中国患儿 EV71 感染严重程度相关<sup>[7]</sup>。临床表现的严重程度是影响手足口病患儿 EV71 肠道病毒排出时间的重要因素, EV71 感染重症手足口病患儿有一个较长的肠道排毒时间<sup>[8]</sup>。重症手足口病患儿病情进展迅速, 甚至发生死亡。大部分成人感染 EV71 病毒后只有轻微的临床症状, 但可以通过接触将病毒传染给学龄前儿童而使其致病<sup>[9]</sup>。

### 1.1 EV71 感染对中枢系统的损害

EV71 是一种高度嗜神经病毒, 可导致神经性并发症。大约 20% 的 EV71 感染住院患儿可能伴有不同程度的中枢神经系统并发症, 其原因是 EV71 的 VP1 衣壳蛋白与人脑组织内表达的鸟氨酸脱羧酶、基因捕捉锚蛋白重复序列和 KIAA0697 这 3 种蛋白具有高度亲和力<sup>[10]</sup>。患者感染 EV71 病毒后, 大量合成的 VP1 衣壳蛋白作用于上述 3 种蛋白而引起神经系统病变, 产生急性弛缓性麻痹或脑炎等症状<sup>[11]</sup>。另外, 脑干是最容易被 EV71 感染的部位。脑干被感染后会致使神经元受损伤, 引起神经发育迟缓, 影响患儿的认知功能。当 2 岁以下婴幼儿感染 EV71 并累及中枢

\* 基金项目: 深圳市 2015 年基础研究知识创新计划项目(JCYJ20150403100317052); 深圳市未来产业发展专项资金资助项目[深发改(2014)1712 号]。

△ 通信作者, E-mail: NGS2016@126.com。

(收稿日期:2017-04-12 修回日期:2017-07-11)

神经系统时,神经元损伤更为明显,并将引起更严重的神经系统后遗症,严重者可致死亡。当 EV71 感染患儿出现呕吐、肢端湿冷抖动、嗜睡或睡眠不安、心率大于 150 次/分钟等症状中的任意一项时,这意味着患儿有中枢神经系统感染的危险,临床需要严密监视这类患儿,及时采取措施,对症治疗,防止病情进一步恶化,提高患儿的治愈率<sup>[12-13]</sup>。

**1.2 EV71 感染对心肌的损害** EV71 感染引起心肌炎的发病机制与病毒复制和机体的免疫反应性等多个因素相关。由于 EV71 病毒衣壳糖蛋白与心肌细胞膜的糖蛋白具有相似的分子结构,感染 EV71 后会刺激机体产生特异性抗体和多种细胞因子。T 淋巴细胞被致敏后,可通过丝氨酸磷脂酶和孔道蛋白等引起心肌细胞凋亡<sup>[14]</sup>。机体感染 EV71 后产生的细胞因子  $\gamma$ -干扰素可诱导 CD40 的表达,CD40 与其配体结合又可诱导白细胞介素-6、白细胞介素-12、肿瘤坏死因子- $\alpha$  等多种细胞因子的生成,这些细胞因子促进了心肌细胞的炎症浸润。同时,吞噬细胞在免疫反应过程中产生的抗原-抗体复合物和补体等刺激下产生超氧阴离子自由基,导致心肌细胞内核酸断裂和多糖聚解增多而损伤心肌<sup>[5]</sup>。肌酸激酶同工酶是心肌特异性酶,可敏感而特异地判断心肌损害。当 EV71 感染引起心肌炎时,心肌细胞受损,肌酸激酶同工酶释放入血。因此应在早期观测手足口病患儿心肌酶及心电图的改变,及时治疗,从而可避免发展为严重的心肌病<sup>[15]</sup>。

**1.3 EV71 感染对呼吸系统的损害** 神经源性肺水肿是手足口病患儿死亡的主要原因。EV71 感染使中枢神经系统受损,引起突发性颅内压增高;机体的应激反应促使交感神经兴奋,引起血中肾上腺素和去甲肾上腺素等激素水平明显升高,导致全身血管收缩、动脉血压急剧增高、肺组织间隙滞留大量血液,从而形成神经源性肺水肿。同时,由于血压升高和血流加快,血流冲击使血管内皮细胞出现损伤,大量缓激肽和组胺等血管活性物质释放入血,使得血管通透性增加,大量血浆蛋白向肺组织渗透,使肺组织渗透压升高,导致急性肺水肿进一步加重,甚至引起肺大面积出血<sup>[16]</sup>。临幊上应密切注意出现神经系统损害的手足口病患儿的病情变化,以便及早地发现神经源性肺水肿体征,及时地进行药物治疗和机械通气,从而减少病死率<sup>[17]</sup>。

## 2 EV71 的临床检测

**2.1 分子生物学检测** 对 EV71 进行分子诊断的主要方法有反转录半巢式聚合酶链式反应(PCR)、液滴数字 PCR 及三重荧光逆逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)等检测方法,其中三重荧光 RT-PCR 检测方法是手足口病监测与应急诊断的快速检测技术,在各大医院得到普遍应用。该技术分别在 VP1 基因保守区和 5' 非翻译区设计 EV71、CA16 和肠道病毒通用型的特异性检测引物及 Taqman 探针,在一个反应体系中同时对 EV71、CA16 和肠道病毒通用型进行检测,实现一管三检,具有高度特异性和灵敏性<sup>[18]</sup>。

三重荧光 RT-PCR 技术通过 FAM、HEX 和 TAMRA 通道进行荧光检测,可以实现一管多检,具有检测效率高、操作流程简便等特点(尤其在检测大量样品时能节约大量时间),可给临幊提供快而准确的检验结果。另一方面,由于引入荧光标记探针,三重荧光 RT-PCR 技术的特异性得到提高。但是,如果模板序列的探针位置发生一个或多个碱基变异,则扩增过程中探针和模板可能不能有效结合,容易导致假阴性的检测结果。

采用三重荧光 RT-PCR 技术检测 EV71 时,标本类型可以是咽拭子、粪便或疱疹液。考虑到标本采集的简便性和无污染要求,大多数医院送检的标本都是咽拭子。但在咽拭子采集过程中,可能由于患儿的哭闹会造成标本采集不合格并导致检查结果出现假阴性,此时应重新采样或改采疱疹液进行检测<sup>[19]</sup>。

### 2.2 血清学检测

**2.2.1 酶联免疫法检测** 将抗 EV71 特异性抗原蛋白包被在固相载体上,以辣根过氧化物酶标记的抗 EV71 单克隆抗体作为酶标抗体,建立酶联免疫吸附试验(ELISA)检测标本的 EV71-IgM 抗体水平。EV71-IgM 抗体是 EV71 感染的早期诊断指标之一,一般在感染 EV71 病毒后的 1~2 d 即可出现,并且随着病程的延长其阳性检出率不断增加。采用 ELISA 检测 EV71-IgM 抗体对手足口病有较高的诊断价值,其操作简单、快速,诊断 EV71 感染的特异性强、灵敏度高、结果稳定,对技术和设施条件要求简单,适合绝大多数基层医疗机构,利于 EV71 感染的早发现、早治疗和及时防控。但该方法检测的是抗体,较检测抗原的分子诊断方法具有滞后性,即存在窗口期,可能造成假阴性结果。另一方面,虽然 ELISA 包被的是特异的抗原蛋白,但是仍然无法避免肠道病毒的高度同源性带来的非特异性结合而造成的假阳性。临幊可以根据患者病程时间来合理地选择检测方法,或者在不延误病情的情况下隔天采血检测以避免窗口期造成的假阴性结果。

**2.2.2 胶体金法检测** 胶体金法采用胶体金免疫层析技术原理,在硝酸纤维素膜上的检测线包被 EV71 的抗原,用于定性检测人全血、血清或血浆标本中的 EV71-IgM 抗体<sup>[20]</sup>。EV71 胶体金检测试剂盒操作过程简单,作为 EV71 感染的初筛快检试剂非常适合门诊和急诊患者的检测,能较好地满足基层一线防控需求。由于胶体金硝酸纤维素膜检测线上包被的抗原种类数量有限,胶体金法检测 EV71-IgM 抗体时容易出现假阴性,造成漏诊现象,有时也会出现交叉反应造成假阳性。因此该方法的检测结果只能为临幊提供参考,不能作为确诊结果,还需要结合临床表现和其他检测结果进行进一步的验证。

**2.2.3 基于抗原肽的 EV71-IgM、EV71-IgG 检测** 当人体被 EV71 感染后,抗原递呈细胞(APC)会识别 EV71,通过吞噬、吸附、吞饮等途径摄取病原体;病原体在 APC 内经过一系列酶解后裂解,暴露出抗原性多肽,与 APC 中产生的 HLA-II 分子结合成复合物;该复合物被转运至 APC 表面,Th 细胞的 T 细胞受体特异性识别 HLA-II 分子-抗原多肽复合物产生特异性的抗体。基于该原理,本研究组和中科院苏州纳米研究所合作研发了一款基于抗原肽的 EV71-IgM 和 EV71-IgG 检测试剂盒,在 EV71 的众多抗原肽段中选择了最具特异性的 12 条肽段连接在改性硅胶膜上。该方法的优点是:(1)与胶体金法和 ELISA 包被的整个抗原蛋白相比,抗原肽包被在固相载体上,不受整体抗原空间结构的影响,能够更加特异地与抗体高效结合;(2)可以针对同一抗原的不同抗体亚型进行鉴别,从而能更加全面地捕捉到抗体谱变化与手足口病发展及治疗的关系;(3)对部分抗原内部隐藏表位进行了覆盖,扩大了检测抗体的范围<sup>[21]</sup>。

目前,该试剂盒处于调试阶段,其灵敏度达 96%,特异度在 90% 以上,有望成为诊断 EV71 感染的高灵敏度和高特异性试剂盒。同时,该试剂盒成本较低,操作简单,可结合 IgM 和 IgG 在疾病发展中的变化对患者病程做出合理的判断,对指导

临床医生用药有一定意义，在流行病学的调查和筛查及手足口病诊断方面都有较好的应用前景。

**2.3 细胞培养法检测** 采用吸附法或直接接种法将 EV71 病毒接种于非洲绿猴肾细胞中进行增殖，培养 60 h 后，在培养液中可以收获到较高滴度的病毒<sup>[22]</sup>。由于培养时间较长、难度较大，该方法不利于患儿病情的及时诊断和治疗，易出现假阴性，已逐渐被分子生物学和血清学检测方法所取代。

### 3 小结

近年来，EV71 在亚太地区广泛流行，在我国的感染情况依然严峻，是最为重要的中枢神经毒性病原体之一。因此，对 EV71 引起的手足口病的筛查、检测和诊断尤为重要。同时，鉴于手足口病原谱的复杂性、临床症状的多样性和小 RNA 病毒的易突变性，临床学者有必要不断地对该病原菌的病原学、分子流行病学、临床特征及生物学特性等方面进行系统研究，不断建立新的检测技术。这样才能对 EV71 感染引起的手足口病能够做到早预防、早发现、早治疗，从而降低手足口病对患儿的身心健康和生存质量的威胁。

### 参考文献

- [1] Liu SL, Pan H, Liu P, Amer S. Comparative epidemiology and virology of fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease in mainland China from 2008 to 2014[J]. Rev Med Virol, 2015, 25(2): 115-128.
- [2] Su PY, Wang YF. Cell surface nucleolin facilitates enterovirus 71 binding and infection[J]. J Virol, 2015, 89(8): 4527-4538.
- [3] Zhu YZ, Wu DG. The role of lipid rafts in the early stage of enterovirus 71 infection[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(4): 1347-1359.
- [4] Lee PH, Liu CM, Ho TS. Enterovirus 71 virion-associated galectin-1 facilitates viral replication and stability[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0116278.
- [5] Sun L, Wen H, Wang Z. Research into the pathogenicity of enterovirus 71[J]. Bing Du Xue Bao, 2015, 31(2): 192-196.
- [6] Ong KC, Wong KT. Understanding enterovirus 71 neuropathogenesis and its impact on other neurotropic enteroviruses[J]. Brain Pathol, 2015, 25(5): 614-624.
- [7] Li F, Liu XP, Li JA, et al. Correlation of an interleukin-4 gene polymorphism with susceptibility to severe enterovirus 71 infection in Chinese children[J]. Arch Virol, 2015, 160(4): 1035-1042.
- [8] Teng S, Wei Y, Zhao SY, et al. Intestinal detoxification time of hand-foot-and-mouth disease in children with EV71 infection and the related factors[J]. World J Pediatr, 2015, 11(4): 380-385.
- [9] Yang Q, Ding J, Cao J, et al. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Wuhan, China from 2012 to 2013: outbreaks of coxsackieviruses A10[J]. J Med Virol, 2015, 87(6): 954-960.
- [10] Luo W, Zhong J. Proteomic analysis of human brain microvascular endothelial cells reveals differential protein expression in response to enterovirus 71 infection[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015(3): 864169.
- [11] Li M, Kong XP, Liu H. Expression of EV71-VP1, PSGL-1 and SCARB2 in Tissues of Infants with Brain Stem Encephalitis[J]. Fa Yi Xue Za Zhi, 2015, 31(2): 97-101.
- [12] Guo SJ, Wang DX, Dai CL, et al. A neonate with hand, foot, and mouth disease complicated with brainstem encephalitis and pulmonary edema: A complete recovery[J]. Pak J Med Sci, 2014, 30(4): 917-919.
- [13] Guo SJ, Wang DX, Dai CL, et al. A neonate with hand, foot, and mouth disease complicated with brainstem encephalitis and pulmonary edema: a complete recovery[J]. Pak J Med Sci, 2014, 30(4): 917-919.
- [14] Ding Y, Chen X, Qian B, et al. Characterization of the antibody response against EV71 capsid proteins in Chinese individuals by NEIBM-ELISA[J]. Sci Rep, 2015, 5(5): 10636.
- [15] Lin L, Qin Y, Wu H, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits enterovirus 71 replication by down-regulating ubiquitin-proteasome system[J]. Virus Res, 2015, 195(1): 207-216.
- [16] Tu YF, Lin CH, Lee HT. Elevated cerebrospinal fluid endothelin 1 associated with neurogenic pulmonary edema in children with enterovirus 71 encephalitis[J]. Int J Infect Dis, 2015, 34(5): 105-111.
- [17] Huang Y, Zhou Y, Lu H, et al. Characterization of severe hand, foot, and mouth disease in Shenzhen, China, 2009-2013[J]. J Med Virol, 2015, 87(9): 1471-1479.
- [18] Li W, Zhang X, Chen X. Epidemiology of childhood enterovirus infections in Hangzhou, China[J]. Virol J, 2015, 12(1): 58.
- [19] Shen J, Zhao C. Relationship between serologic response and clinical symptoms in children with enterovirus 71-infected hand-foot-mouth disease[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 11608-11614.
- [20] 张帅, 王帧. 免疫层析法与酶联免疫法检测手足口病 EV71-IgM 抗体的阳性率比较[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(80): 11-12.
- [21] Hongwei M, Yuanzi W, Xiaoli Y. Integrated poly(dimethylsiloxane) with an Intrinsic nonfouling property approaching “Absolute” zero background in immunoassays [J]. Anal Chem, 2010, 821(15): 6338.
- [22] Yin Y, Xu Y, Ou Z. A simple and highly repeatable viral plaque assay for enterovirus 71[J]. J Basic Microbiol, 2015, 55(4): 538-541.

(收稿日期:2017-04-26 修回日期:2017-08-03)