

Arleta Krzysztozek¹, Magdalena Wieczorek^{1*}

¹Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w czerwcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Budowa i klasyfikacja. 3. Receptory komórkowe i replikacja. 4. Przebieg zakażenia. 5. EV71 na świecie. 6. Genotypy EV71 i zmienność wirusa. 7. Patogeneza. 8. Prace nad szczepionką. 9. Zakończenie

Successor of polio virus – enterovirus 71

Abstract: Enterovirus 71 (EV71) is one of the most important causes of hand, foot, and mouth disease. It can also cause severe complications of the central nervous system. Brain stem encephalitis with pulmonary edema is a severe complication that can lead to death. EV71 was first isolated in California in 1969. Since the late 1990s, EV71 has seriously affected the Asia-Pacific region. In recent years, there have been an increasing number of reports of HFMD outbreaks with fatal cases due to EV71 in Asian countries. Generally, EV-71 is divided into three broad genotypes: A, B and C, based on analysis of complete genome sequences of many strains. Recent studies suggest that recombination has played a crucial role in EV71 evolution. Poliovirus, another enterovirus, is nearly completely eradicated as a result of global immunization efforts. EV71 may become an important pathogen, replacing poliovirus, with increasing health threat to humans. Prevention of EV71 epidemics is likely to require the development of an effective vaccine. This is an important public health problem causing serious clinical illness and, potentially, death in young children.

1. Introduction. 2. Structure and classification. 3. Cellular receptors and replication. 4. Course of infection. 5. EV71 in the world. 6. EV71 genotypes and variability of the virus. 7. Pathogenesis. 8. Vaccine development. 9. Summary

Słowa kluczowe: enterowirus 71, choroba dłoni, stóp i ust, genotypy

Key words: enterovirus 71; hand, foot and mouth disease; genotypes

1. Wstęp

Wirus polio towarzyszy człowiekowi już od czasów starożytnych, o czym może świadczyć staroegipska stela, czyli pomnik nagrobny, przedstawiający mężczyznę ze stopą zniekształconą charakterystycznie dla postaci porażennej *poliomyelitis*. Przez tysiące lat była to choroba rzadka, większość przypadków zachorowań dotyczyła dzieci do 4 roku życia. Pierwsze małe lokalne epidemie miały miejsce około 1900 roku w Stanach Zjednoczonych Ameryki (USA) i w Europie. W pierwszej połowie XX wieku wybuchła już wielka pandemia *poliomyelitis*, chorowały głównie dzieci w wieku od 5 do 9 lat, jedna trzecia przypadków dotyczyła osób powyżej 15 roku życia, co spowodowało, że trwałych porażen po zachorowaniu było dużo więcej niż gdy chorowały małe dzieci i niemowlęta. W 1952 w USA zachorowało 58 000 osób, z czego ponad 3 000 zmarło, a 20 000 doznało trwałych porażen [79]. Obecnie program eradykacji *poliomyelitis* zmierza ku końcowi, w 2013 roku na całym świecie wystąpiło 416 przypadków zachorowań wywołanych dzikim poliovirusem. Ostatni odnotowany przypadek zachorowania wywołanego dzikim polio typu 2 miał miejsce w Indiach w 1999, wydaje się że dziki wirus polio typu 3 także został wyeradykowany, ostatni opisany przypadek miał miejsce w Nigerii w 2012 roku [67].

W latach 70 w Europie pojawiły się dwie duże epidemie, które początkowo przypisywano wirusowi polio, ze względu na duże podobieństwo obrazu klinicznego choroby. Jednak okazało się, że czynnikiem etiologicznym licznych zachorowań był po raz pierwszy wyizolowany w 1969 roku w USA enterowirus 71 (EV71). Od lat 90, w regionie Azji i Pacyfiku mają miejsce liczne epidemie z udziałem EV71. W 2009 roku w Chinach zachorowało 1,2 miliona osób, odnotowano 353 przypadki śmiertelne, była to, jak dotąd największa z odnotowanych epidemii [3]. Trzy lata później (2012) w Kambodży media informowały o „tajemniczej chorobie”, na którą dzieci umierają tuż po przyjęciu do szpitala. Dokładne badania laboratoryjne wykazały obecność EV71 [71]. Historia EV71 jest bardzo podobna do historii wirusa polio. Czy enterowirus 71 ma szansę zostać „najgroźniejszym” enterowirusem w sukcesji po „odchodzącym” poliovirusie?

2. Budowa i klasyfikacja

Enterowirus 71 (EV71), podobnie jak inne wirusy z rodziny *Picornaviridae*, to mały, bezosłonkowy wirus, o ikosaedralnym kształcie kapsydu, którego materiałem genetycznym jest jednoniciowe RNA o dodatniej polarności (+ ssRNA). EV71 zaliczany jest do

* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel.: 22 54 21 230; e-mail: mrechnio@pzh.gov.pl

gatunku A enterowirusów (EV-A), razem z wirusami Coxsackie A (CV-A2-8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16) oraz z innymi enterowirusami (EV68, EV89, EV90, EV91, EV92). Jest on najbliższym spokrewnionym z wirusem Coxsackie A16 (CV-A16) [68], homologia pomiędzy tymi dwoma typami na poziomie genomu wynosi 77%, natomiast na poziomie sekwencji aminokwasowej 89%. Przypuszcza się że EV71 wyewoluował z CV-A16 około roku 1940 [76].

Monocistronowy genom EV71 zbudowany jest z 7,4 tysięcy nukleotydów. Na obu końcach nici znajdują się regiony niekodujące (UTR) stanowiące aż 10% genomu wirusa. Koniec 5' nici RNA związany jest kowalencyjnie z białkiem VPg, uczestniczącym w procesie inicjacji replikacji, natomiast niekodujący region 3', także odpowiadający za inicjację replikacji, zakończony jest sekwencją poli(A) [65]. Pojedyncza otwarta ramka odczytu koduje 11 białek: 4 białka strukturalne (region P1) i 7 białek niestukturalnych (regiony P2 i P3). W wyniku translacji powstaje pojedyncza poliproteina o masie 250 kDa podlegająca obróbce proteolitycznej. W wyniku proteolitycznego cięcia poliproteiny powstają trzy prekursorowe peptydy: P1, P2 i P3. Peptyd P1 jest cięty na trzy białka: VP0, VP1 i VP3, które łączą się ze sobą tworząc protomer, pięć protomerów formuje pentamer, a 12 pentamerów buduje prokapsyd. Dopiero w trakcie dojrzewania kapsydu białko VP0 ulega cięciu na VP2 i VP4. VP1, VP2 i VP3 są białkami powierzchniowymi kapsydu, natomiast białko VP4 jest białkiem wewnętrznym. Białka kapsydu odpowiadają za wiązanie receptora na powierzchni wrażliwych komórek. Peptydy P2 i P3 cięte są na 7 białek pełniących funkcje niestukturalne; jest wśród nich RNA zależna polimeraza RNA 3Dpol [6, 37].

Ikosaedralny kapsyd jest pozbawiony osłonki, co wpływa na stabilność wirusa w środowisku gospodarza, cząstki wirusa są odporne na kwasy żołądkowe i bez trudu przedostają się do jelita. EV71 jest odporny także na rozpuszczalniki organiczne (70% etanol, eter, chloroform), wirusa można inaktywować promieniowaniem ultrafioletowym oraz stosując środki dezynfekujące zawierające formaldehyd i chlor. Temperatura powyżej 56°C inaktywuje cząstki EV71, natomiast w temperaturze pokojowej wirus może przetrwać i zachować zakaźność nawet kilka dni [16, 74]. Wirus ten znajdowany był w wodach powierzchniowych i podziemnych, w ściekach, a także w gorących źródłach [21, 34].

3. Receptory komórkowe i replikacja

Gospodarzem dla enterowirusa 71 jest człowiek. Wirus wnika do komórki gospodarza poprzez połączenie się z receptorem znajdującym się na powierzchni komórki wrażliwej. Jak dotąd odkryto siedem recepto-

rów komórkowych wykorzystywanych przez enterowirusy: 3 integryny, receptor dla wirusa polio (CD155), czynnik DAF (CD55), ICAM-1 (CD54) i receptor dla coxsackie i adenowirusów (CAR) [63, 65]. Natomiast enterowirus 71 wykorzystuje jeszcze cztery inne receptory. W 2009 roku opisano dwa receptory dla EV71: błonowe białko występujące na leukocytach ludzkich – glikoproteinowy ligand 1 P-selektyny (PSGL-1; CD162) [57] oraz białko transmembranowe zlokalizowane na lizosomach i endosomach – SCARB2 [94]. SCARB2 jest wszechobecny w organizmie człowieka, wykorzystywanie tego białka jako receptora przez EV71 może być powodem rozwoju ogólnoustrojowych zakażeń. Z receptorem SCARB wiążą się wszystkie genotypy EV71 oraz CV-A16. EV71 może łączyć się także z występującym w przewodzie pokarmowym i oddechowym glikanem powiązany z kwasem sialowym [93] oraz z receptorem DC-SIGN (CD209) [49] obecnym na komórkach dendrytycznych i makrofagach, odgrywającym także istotną rolę w rozwoju zakażenia wywołanego wirusem HIV.

Przylączenie cząstki wirusowej do receptora prowadzi zarówno do zmian strukturalnych kapsydu jak i błony komórkowej, co skutkuje uwolnieniem materiału genetycznego wirusa do cytoplazmy [90]. W komórce gospodarza wirusowe RNA podlega translacji, powstają białka wirusowe, materiał genetyczny podlega powieleniu, powstają cząstki potomne, ostatecznie dochodzi do lizy komórki i uwolnienia cząstek potomnych [72, 75, 78, 91].

4. Przebieg zakażenia

Wirus szerzy się głównie na drodze fekalno-oralnej, w mniejszym stopniu również drogą kropelkową [14, 77]. Wrotami zakażenia jest jama ustna, po wnikięciu do organizmu wirus replikuje w migdałkach i jelicie cienkim, następnie przenika do okolicznych węzłów chłonnych. Na tym etapie zakażenia choroba ma charakter bezobjawowy co ma miejsce u 70% przypadków osób zakażonych. U części osób zakażonych dochodzi jednak do zajęcia przez wirusa wątroby, śledziony, szpiku kostnego i kolejnych węzłów chłonnych. Wirus może przedostać się także do serca, płuc, trzustki, błon śluzowych, skóry i do układu nerwowego.

Główne objawy zakażenia enterowirusem 71 to: gorączka, pęcherze w jamie ustnej, obniżona świadomość, nerwowość, wymioty, kaszel i przeziębienie [82]. Najłagodniejsze w przebiegu są postaci dermatologiczne zakażenia: herpangina i choroba dłoni, stóp i ust (HFMD), o wiele ostrzejsze w przebiegu są choroby układu nerwowego: zapalenie mózgu, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, czy ostre porażenie wiotkie (AFP) [51, 85]. W przebiegu zakażenia EV71 zdarzają

się także: zapalenie mózdzku, zapalenie pnia mózgu, encefalopatia miokloniczna Kinsobourne'a, Zespół Guillaina-Barrégo i poprzeczne zapalenie rdzenia kręgowego [82]. Wirus do ośrodkowego układu nerwowego przedostaje się za pomocą wstecznego transportu aksonalnego, nerwem czaszkowym lub peryferyjnym. Niewykluczone jest także, że wirus przekracza barierę krew-mózg [22]. Zmiany powstałe w ośrodkowym układzie nerwowym pod wpływem zakażenia EV71 dotyczą głównie istoty szarej rdzenia kręgowego i rdzenia przedłużonego, spotyka się je także w podwzgórzu, mózdzku i korze ruchowej, przypominają one obrzęk, neuronofagię i guzki mikrogleju występujące także w zapaleniu mózgu powodowanym zakażeniami innymi wirusami [74].

Jednak najczęściej występujące zakażenia ośrodkowego układu nerwowego wywołane EV71 to zapalenie mózgu i ostre porażenie wiotkie. Najczęściej obserwowanymi objawami towarzyszącymi zapaleniu mózgu są mioklonie czyli gwałtowne i nagłe skurcze poszczególnych grup mięśniowych, wymioty i ataksja [61]. U niektórych pacjentów z zapaleniem mózgu dochodzi do obrzęku płuc, zapaści sercowo-płucnej i krwotoku. Po epidemii na Tajwanie 1998 roku opisano trzy stadia kliniczne choroby: 1) nieskomplikowane zapalenie mózgu kończące się w 100% wyzdrowieniem; 2) rozregulowanie autonomicznego układu nerwowego kończące się w 100% wyzdrowieniem; 3) neurogeny obrzęk płuc o śmiertelności 80% [16, 46].

Po ustąpieniu ostrych objawów zakażenia wirus cały czas namnaża się w organizmie gospodarza. Wirus izolowany jest z gardła jeszcze 4 tygodnie po wystąpieniu pierwszych objawów, a z kału do 11 tygodni [14, 30, 61]. Tak długi okres wydzielania warunkuje szeroką transmisję wirusa, największy współczynnik transmisji (52%) wystąpił pomiędzy dziećmi do lat 6, rodzeństwem lub kuzynostwem. Dzieci są w większym stopniu zdolne do przekazywania wirusa niż dorośli [91].

5. EV71 na świecie

Po raz pierwszy obraz choroby po zakażeniu wirusem EV71 opisał Schmidt i współpracownicy w 1974 roku. Opisali 20 przypadków zakażeń centralnego układu nerwowego, w tym jeden przypadek śmiertelny, które miały miejsce w Stanach Zjednoczonych w latach 1969–1972 [70]. EV71 po raz pierwszy został wyizolowany w 1969 roku w USA, w Kalifornii, z kału 9 miesięcznego dziecka chorego na zapalenie mózgu. W latach 1969–1977 opisano dwie małe epidemie wywołane przez EV71 w Kalifornii (23 przypadki) [54] i Nowym Jorku (28 przypadków) [27], chorzy rozwinęli głównie objawy neurologiczne [31, 41, 51]. W tym samym czasie na świecie miały miejsce

epidemie o szerokim spektrum chorób od HFMD poprzez zapalenie mózgu, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, porażenia, silne zakażenia układu oddechowego i zapalenia mięśnia sercowego. Epidemie te miały miejsce w: Australii (1972–1973 i 1986) [28, 40]; Szwecji (1973); Japonii (1973 i 1978) [29, 38]; Bułgarii (1975) [26]; na Węgrzech (1978) [56]; we Francji (1979), w Hong Kongu (1985) i w Filadelfii, w USA (1987) [9, 31, 51]. Epidemie opisane od 1974 do połowy lat 90 miały charakter od łagodnych po ciężkie. W Japonii w 1973 i 1978 roku zachorowało odpowiednio 3 296 i 36 301 osób [3]. Większość pacjentów rozwinęła typową chorobę dłoni, stóp i ust, podobnie jak w Australii w 1986 roku. W czasie epidemii w Bułgarii w 1975 roku, zachorowało 705 osób, większość z nich (77%) rozwinęła zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, około 21% miało ostre porażenia wiotkie, odnotowano 44 przypadki śmiertelne [51, 74]. Na Węgrzech w 1978 roku, zachorowało 323 osoby, większości zachorowań towarzyszyły objawy neurologiczne w postaci zapalenia mózgu, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i ostrych porażen wiotkich, obserwowano także pojedyncze przypadki HFMD, zmarło 47 osób [56].

W drugiej połowie lat 90 wystąpiły dwie duże epidemie związane z zakażeniami EV71. Pierwsza miała miejsce w Malezji, w Sarawak, w 1997 roku, a druga na Tajwanie w 1998 roku. W Malezji zachorowało 2 628 osób, w większości były to przypadki HFMD i herpanginy. W 30% przypadków dochodziło do zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (zomr; AFP; zapalenie mózgu i pnia mózgu; zapalenie rdzenia oraz ataksje). U około połowy osób z objawami neurologicznymi (52%) miały miejsce także objawy skórne w postaci HFMD. Po raz pierwszy obserwowano także przypadki ostrego zapalenia mózgu z obrzękiem płuc i krwotokiem, szybko kończące się śmiercią. W czasie tej epidemii zmarło 40 osób [1, 10, 12]. Epidemia na Tajwanie była spowodowana koinfekcją EV71 i CV-A16. Zachorowało 129 106 osób, większość osób rozwinęła objawy skórne: HFMD i herpanginę (79%); zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (zomr, zapalenie mózgu i pnia, AFP) dotyczyło tylko 35% przypadków. Wśród zakażeń ośrodkowego układu nerwowego 41% przypadków stanowiły nieskomplikowane zapalenia mózgu, w 44% zapaleniu mózgu towarzyszyło rozregulowanie układu autonomicznego, a u 15% przypadków dochodziło do obrzęku płuc. Ciężkim zakażeniom towarzyszyły krwotoki i zapalenie mięśnia sercowego. Śmiertelność w przypadkach z obrzękiem płuc wynosiła 90%, podczas gdy w przypadkach z objawami tylko ze strony układu nerwowego wynosiła 20%. Zarejestrowano 78 przypadków śmiertelnych [23, 32, 48].

XXI wiek przyniósł liczne i duże epidemie HFMD w regionie Azji i Pacyfiku. W Australii, w 2000–2001, do szpitali trafiło około 200 dzieci, w tym 9 miało

objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego, a 5 osób rozwinęło obrzęk płuc [3, 53]. W 2013 roku zanotowano 30 przypadków zakażeń EV71 z objawami neurologicznymi.

W Brunei, w 2006 roku, zachorowało 1 681 dzieci, u większości z nich zdiagnozowano HFMD lub herpanginę, trójka z nich zmarła w wyniku ciężkich chorób neurologicznych [2].

W Chinach, w 2007 roku, epidemia HFMD wybuchła w prowincji Shandong [3], odnotowano 1 149 zachorowań, głównie wśród dzieci poniżej 5 roku życia (84,4%). 11 przypadków HFMD (0,9%) została zakwalifikowana jako ciężkie, z towarzyszącymi komplikacjami ze strony układu nerwowego. W czasie epidemii zmarło troje dzieci (0,3%; wiek ≤ 3). W następnym roku (2008) zarejestrowano 61 459 przypadków HFMD, prawie we wszystkich prowincjach chińskich. Głównie chorowały dzieci poniżej 5 roku życia (92%), zmarło 36 dzieci [100]. W 2009 roku liczba zanotowanych przypadków HFMD na terenie Chin sięgnęła 1 155 525, ciężkie przypadki stanowiły 1,2% (13 810), odnotowano 353 zgonów (0,03%). Większość zachorowań dotyczyła dzieci w wieku poniżej 6 lat (93%); dzieci poniżej 4 lat stanowiły 75% wszystkich przypadków. Chorowało 2 razy więcej chłopców niż dziewczynek (1,8: 1) [3].

Po dużej epidemii na Tajwanie w 1998, w następnych latach miały miejsce mniejsze epidemie w 2000 i 2001 roku, odnotowano 291 i 389 ciężkich przypadków oraz odpowiednio 41 i 55 przypadków śmiertelnych [48]. Pomiędzy rokiem 1998 i 2005, liczba ciężkich przypadków HFMD występujących w ciągu roku wzrosła z 35 do 405 [23]. W tym 8-letnim okresie zanotowano 1 548 zachorowań o ciężkim przebiegu, w tym 93% dotyczyło dzieci poniżej 5 lat, a 75% dotyczyło dzieci poniżej 3 roku życia, w sumie zmarło 245 osób. Po 2005 roku liczba ciężkich przypadków i zgonów wyglądała następująco: w 2006 roku 11 i 0; 2007: 12 i 2; 2008 – 373 i 14; 2009 29 i 2 [3].

Od 1999 do 2005 w Japonii średnio raportowano 42,7 przypadku HFMD na rok. Dwie epidemie miały miejsce w 2000 i 2003 roku, zachorowało 205 365 i 172 659 osób. Około 90% pacjentów z HFMD była w wieku poniżej 6 lat [3].

W Malezji, od 2000 roku, miały miejsce 4 epidemie: w 2000 (konfekcja EV71 z E7), 2003, 2006, 2008 i 2009 [14, 25, 59, 66].

W Mongolii zgłaszanie przypadków HFMD rozpoczęto w 2008 roku, w danym roku zarejestrowano 3 210 przypadków [3].

Zakażenia EV71 z rozwinęciem HFMD miały miejsce także w Korei (2008–2009; 719 przypadków) [42], w Indiach w 2007 [69] i na Tajlandii (2006, 2008–2009) [3, 20].

W Singapurze, w 2000 roku, miała miejsce duża epidemia HFMD, zachorowało 3 790 osób, odnotowano

3 przypadki śmiertelne. Kolejne epidemie miały miejsce w latach: 2001 (5 187 przypadków); 2006 (15 282) i 2008 (15 030) [3, 4].

W Wietnamie, w 2003 roku odnotowano liczne ostre zapalenia mózgu połączone z HFMD. W 2005 roku u 764 dzieci zdiagnozowano HFMD [80]. Kolejne epidemie zanotowano w latach 2007–2009 (2007 – 5 717 (+23); 2008 – 10 958 (+25); 2009 – 10 632 (+23)) [3]. W 2011, odnotowano 77 895 przypadków HFMD, zmarło ponad 137 osób.

Poza dużymi epidemiami w rejonie Azji i Pacyfiku zachorowania w wyniku zakażenia EV71 odnotowywano na całym świecie: w USA [64], Holandii [83], Norwegii [3], Austrii [62], Wielkiej Brytanii [7], Niemczech [3], Finlandii [33] i Francji [39].

6. Genotypy EV71 i zmienność wirusa

Na podstawie analizy dwóch genów kodujących białka strukturalne VP-1 i VP-4, opisano trzy genotypy EV71: A, B, C. Genotypy B i C podzielono na subgenotypy: C1-C5; B1-B5 [11, 84]. Na podstawie analizy sekwencji VP-1 i 3D polimerazy RNA zaproponowano utworzenie nowego genotypu D z genotypu C4 oraz włączenie subgenotypu B5 do B4 [14]. Inna grupa naukowców zaproponowała także utworzenie subgenotypu B0 dla szczepu, który krążył w Holandii w latach 1963–1967, oraz C0 dla szczepu, który krążył w Japonii w 1978 roku [15, 83]. Prototypowy szczep BrCr EV-71 zidentyfikowany w Kalifornii w 1969 należał do genotypu A, genotyp ten nie był opisywany do 2008 roku, kiedy to pojawił się w czasie epidemii w Chinach (Tabela I). Genotyp A wydaje się być stabilnym genetycznie, ponieważ izolaty z 1969 i 2008 roku niewiele się różnią sekwencją nukleotydową [96].

Subgenogrupy od B1 do B5 oraz C1, C2 i C4 są kosmopolityczne i występują na całym świecie [55], natomiast występowanie subgenogrup C3 i C5 ogranicza się do Korei, Wietnamu, Tajlandii i Tajwanu [15]. Współkrążenie kilku subgenogrup jest obserwowane w wielu krajach np.: w Malezji, w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej, na Tajwanie, w Japonii [8]. Subgenogrupy B1 i B2, powodujące głównie epidemie HFMD w latach 70 i 80 [51], zostały zastąpione przez nowe subgenogrupy (B3, B4, i B5), które stały się grupami dominującymi i występują endemicznie w rejonie Azji i Pacyfiku, powodując duże epidemie HFMD [52], także te z licznymi przypadkami śmiertelnymi w Malezji i Tajwanie [24, 36, 43].

Subgenogrupa C1, która po raz pierwszy została opisana w Australii i USA w latach 80, od jej pierwszego opisanie jest stale wykrywana w różnych krajach. W latach 90 genogrupa C uległa dużemu zróżnicowaniu, pojawiły się nowe subgenogrupy w rejonie Azji

Tabela I
Występowanie genotypów EV71 na świecie [8, 10, 37, 45, 74]

	1960–1969	1970–1979	1980–1989	1990–1999	2000–2009	2010–
Brunei					B5	
Chiny				C4	A, C4	C4
Japonia		B1, C0	B1, B2, C1	B2, B3, B4, C2	B4, B5, C2, C4	
Korea					C3, C4	
Malezja				B3, B4, C1, C2	B4, B5, C1	
Singapur				B3, B4, C1	B4, B5, C1	
Tajlandia					B5, C1, C2, C4, C5	
Tajwan			B1	B4, C2, C4	B4, B5, C4, C5	C4
Wietnam					C1, C4, C5	C4
Australia			B2, C1	B3, C1, C2	B3, B4, C1, C4	
Nowa Zelandia				C1, C2	C2	
Austria					C1, C4	
Bułgaria		B1				
Holandia	B0	B1, B2	B2, C1	C1, C2	C1, C2	
Norwegia					C1	
Węgry		B1			C4	
Wielka Brytania			C1	C1, C2	C1, C2	
USA	A	B1	B2, C1	C1, C2	C2	

i Pacyfiku, m.in. C2, C4, i C5 związane z śmiertelnymi przypadkami HFMD na Tajwanie (1998), w Chinach (2008) i w Wietnamie (2005) [84].

W czasie syntezy pojedynczej kopii genomu EV71 RNA zależna polimeraza RNA wstawia 1–2 błędne zasady. Brak mechanizmów naprawczych skutkuje dużym tempem mutacji podobnym to tego jaki występuje u poliovirusów. Tempo mutacji EV71 szacuje się na $1,35 \times 10^{-2}$ substytucji na nukleotyd/rok [9]. Tempo mutacji w regionie kodującym powierzchniowe białko VP1 jest jeszcze większe i wynosi $4,5 \times 10^{-3}$ [76], wynika to z wysokiej presji selekcyjnej układu immunologicznego gospodarza. Genom EV71 podlega ciągłym zmianom, o wysokiej zmienności genetycznej świadczą liczne genotypy wirusa. Źródłem zmienności są liczne mutacje, wpływ układu immunologicznego gospodarza, ale także częste rekombinacje [65, 73]. Rekombinacja przyczynia się do wytworzenia nowych wariantów wirusa i zwiększenia zmienności genetycznej, prowadzi do zwiększenia tempa ewolucji i możliwości napraw uszkodzeń RNA. Jest to najszybsza droga do nabywania zmian genetycznych warunkujących zmiany w wirulencji wirusa. Do rekombinacji dochodzi gdy komórki gospodarza zakażą jednocześnie 2 typy wirusów [37]. W czasie replikacji może dojść do częściowej wymiany materiału genetycznego, w wyniku zmiany matrycy. Może dojść do rekombinacji pomiędzy różnymi genotypami EV71 (rekombinacja intratypowa) oraz pomiędzy EV71 i innymi wirusami z grupy A enterowirusów (rekombinacja intertypowa) [36, 95, 98]. Większość genotypów krążących w rejonie Azji po 1997 roku to rekombinanty [13]. Zaobserwowano, że genotypy star-

sze, od dawna krążące w populacji, wywołują łżejsze w przebiegu choroby niż nowopowstałe genotypy często wywołujące duże epidemie [84]. Wybuch epidemii jest poprzedzony zmianą genotypu dominującego [11, 74, 80], który pojawia się w puli krążących genotypów od 2 do 5 lat przed stanieniem się genotypem dominującym. Obserwacja ta potwierdza wyniki uzyskane metodą zegara molekularnego, które szacują czas od pojawienia się nowego genotypu do spowodowania przez niego epidemii na 2–5 lat dla genotypu B i 1–5 lat dla genotypu C [11, 37, 51, 76]. Znany jest przypadek zmiany dominującego genotypu w ciągu kilku miesięcy (Japonia B5) [8].

7. Patogeneza

Największym czynnikiem ryzyka rozwoju ciężkiej postaci choroby po zakażeniu EV71 jest wiek. Wraz z wiekiem liczba osób posiadające odporność przeciw EV71 jest coraz większa. Szacuje się, że 50% populacji po 5 roku życia posiada przeciwciała anty-EV71. U małych dzieci do 6 miesiąca życia dużą rolę w odporności na zakażenie odgrywają przeciwciała matczyne [18, 31]. Najbardziej narażone na zakażenia o ostrym przebiegu, często kończącym się zgonem, są dzieci w wieku od 6 miesiąca do 4 roku życia. W czasie epidemii w 1998 roku na Tajwanie dzieci do lat 5 stanowiły 89% osób chorujących [85].

Brak podatność gospodarza na rozwój ciężkiej postaci zakażenia związana jest ze wcześniej nabytą odpornością krzyżową, co tłumaczy młody wiek jako

czynnik ryzyka rozwinięcia ciężkiego stadium choroby. Odporność krzyżowa nabywana jest po wcześniejszym zetknięciu się z innym genotypem tego samego gatunku wirusa lub wirusem blisko spokrewnionym. Badania potwierdziły odporność krzyżową pomiędzy genotypami B i C [74, 91].

Badania genetyczne przeprowadzone na Tajwanie wykazały, że obecność antygeny zgodności tkankowej HLA-A33 jest związana ze zwiększoną wrażliwością na zakażenia E71. W populacji azjatyckiej występowanie HLA-A33 jest częstsze niż wśród rasy białej, czym tłumaczy się liczne epidemie EV71 w rejonie Azji. Sugeruje się także rolę HLA-A2 w rozwoju niewydolności krążeniowej w pacjentów zakażonych EV71 [17].

Kolejnym czynnikiem mogącym mieć wpływ na przebieg zakażenia EV71 jest występowanie współzakażeń. W Malezji podczas epidemii w latach 1997, 2000 i 2003, z materiałów pobranych od pacjentów, oprócz EV71, izolowano także adenowirusy [10, 58]. Epidemie na Tajwanie z 1998 roku i w Australii z 1999 roku były wywołane współzakażeniem EV-71 z CV-A16 (wirus Coxsackie A 16). W czasie epidemii w Kambodży w 2012 roku, jako główną przyczynę śmierci dzieci podano zakażenie mieszane EV71, wirusem dengi i *Streptococcus suis* oraz błędne leczenie (użycie steroidów) [71]. Prawdopodobnie obecność dodatkowego wirusa sprzyja replikacji EV71, lecz nie zawsze obecność dodatkowego czynnika wpływała na nasilenie objawów klinicznych [10, 31, 58].

Obecnie w Azji główną przyczyną śmierci po zakażeniu EV71 jest zapalenie mózgu powiązane z dysfunkcją sercowo-płucną [92], jeszcze w latach 80 główną przyczyną było zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Przyczyny obrzęku płuc, występującego w najcięższych przypadkach, nie są znane. Do jego wystąpienia może się przyczynić: zwiększona przepuszczalność naczyń, zaburzenie czynności serca, także obecność cytokin prozapalnych. Obrzękowi płuc przypisuje się pochodzenie neurogenne, gdyż jest poprzedzony zakażeniem ośrodkowego układu nerwowego. Badania pośmiertne pacjentów, u których wystąpił obrzęk płuc, wykazały zmiany w ośrodkach oddechowych i wazomotorycznych pnia mózgu. Wcześniejsze badania wykazały, że zmiany patologiczne w OUN mogą powodować wzrost ciśnienia (w tym płucnego) i wystąpienie obrzęku płuc [63, 74, 88]. Bardzo podobny obraz choroby z obrzękiem płuc po zajęciu przez wirusa ośrodków rdzenie przedłużonego miał miejsce w przypadkach postaci opuszkowej *poliomyelitis*. Obrzękowi płuc towarzyszą zaburzenia pracy serca, nie obserwuje się zmian zapalnych, jedynie zmiany patologiczne podobne do tych, które powstają pod wpływem katecholamin. Przypuszcza się, że zapalenie mózgu powoduje wzrost poziomu katecholamin, które mają bezpośredni wpływ na wywoływanie zmian patologicznych serca oraz indukują obrzęk płuc

poprzez wzrost ciśnienia [88]. Dodatkowo cytokiny i chemokiny, których stężenie wzrasta po zakażeniu EV71, przyczyniają się do wzrostu przepuszczalności naczyń [47, 89]. Obserwacje kliniczne wykazały, że przy dającym podobne zmiany w pniu mózgu japońskim zapaleniu mózgu nie dochodzi do obrzęku płuc, chociaż może wystąpić zespół poliopodobny.

Zakażenia objawowe EV71 po epidemii na Tajwanie w 1998 roku zostały podzielone na cztery stadia [16, 46], dla każdego stadium choroby opracowano odpowiednie leczenie. Do stadium 1 zalicza się objawy dermatologiczne czyli HFMD (80%) i herpanginę (10%) oraz zapalenie gardła, niespecyficzne choroby gorączkowe ($>39^{\circ}\text{C}$), wysypkę i nieżyt żołądkowo-jelitowy. Poza EV71, HFMD mogą powodować inne enterowirusy; CV-A4-6, CV-A9-10, CV-A16, CV-B2 i CV-B5, ale tylko EV71 wywołuje ostrą postać tej choroby z licznymi powikłaniami [45]. HFMD może przebiegać z owrzodzeniem języka i policzków, z wysypką rumieniową na dłoniach, kolanach, stopach i pośladkach, ale także zmiany mogą być niepozorne i zostać przeoczone przez lekarza. Herpangina ma postać owrzodzenia łuku podniebienia, śluzówki policzkowej i języczka [61]. Pacjenci z objawami stadium 1 nie wymagają hospitalizacji oraz leczenia.

Stadium 2 zakażenia EV71 dotyczy objawów ze strony układu nerwowego. Od 1 do 5 dni po wystąpieniu objawów dermatologicznych może pojawić się: zapalenie mózgu, jałowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie mózgu i rdzenia oraz ostre porażenie wiotkie (AFP) [60]. Zapaleniu mózgu towarzyszą mioklonie w czasie snu, letarg, śpiączka, senna, drgawki, ataksja, porażenie nerwu czaszkowego, niedrożność jelit, trudności w połykaniu, oczopląs, potliwość. Dla zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych charakterystyczne są: wymioty, mioklonie, sztywność karku, ból głowy i drażliwość oraz płacz. Objawy zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych najczęściej ustępują po 7 dniach. Ostre porażenie wiotkie po zakażeniu EV71 jest zazwyczaj łagodniejsze w przebiegu i częściej dochodzi do wyzdrowień niż po zakażeniu wirusem polio, objawia się słabością kończyn i obniżonym refleksem. Sugeruje się, że mechanizm powstawania AFP w przypadku zakażenia EV71 jest odmienny od mechanizmu powstawania porażenia po zakażeniu wirusem polio. Porażenie ustępuje najczęściej po 10 dniach od pierwszych objawów, ale połowa przypadków skutkuje długotrwałymi następstwami, takimi jak atrofie i trudności w poruszaniu się. Zapalenie mózgu i rdzenia charakteryzuje się objawami wspólnymi z AFP. W stadium 2 choroby zawsze wymagana jest hospitalizacja [16].

W 3 stadium choroby także występują objawy neurologiczne, mają one postać dysfunkcji autonomicznego układu nerwowego, niewydolności sercowo-płucnej i obrzęku płuc. Objawy stadium 3 pojawiają

się drugiego dnia po wystąpieniu pierwszych objawów neurologicznych i są to: tachykardia, przyspieszony oddech, cyjanozą i nadciśnienie, którym towarzyszy gorączka i potliwość. Może dojść do utraty świadomości, niedociśnienia, skąpomoczu lub bezmoczu. Jednocześnie stadium 3 wiąże się ze wzmożoną odpowiedzią komórkową i postępującą immunopatogenezą. Obserwuje się leukocytozę, hiperglikemię, niski poziom komórek NK i limfocytów CD4+ i CD8+, wysoki poziom cytokin porozapalnych: IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-1 β oraz γ -interferonu, a także czynnika TNF- α [86]. W Tajwanie w 1998 roku 80% chorych dzieci umierało w ciągu 12 godzin od pojawienia się pierwszych objawów stadium 3 choroby, w przypadku wystąpienia niewydolności sercowo-płucnej śmiertelność wynosiła 90%. Wprowadzenie odpowiedniego leczenia dla 3 stadium (intensywna opieka medyczna, intubacje, podanie inotropów) obniża śmiertelność do 30%.

Stadium 4 choroby dotyczy zdrowienia oraz długotrwałych następstw zakażenia w postaci atrofii i słabości kończyn, a także obniżenia sprawności umysłowej [35]. Może zaistnieć potrzeba podtrzymywania funkcji życiowych np. oddychania oraz karmienia.

Pacjenci w stadium 1 leczeni są objawowo, stadium 2 wymaga już hospitalizacji i monitorowania podstawowych czynności życiowych. Podawane są diuretyki, furosemid, dożylna immunoglobulina (IVIG) oraz milrinon. Występująca przy ostrym zakażeniu EV71 uogólniona odpowiedź zapalna może być regulowana przez ludzką immunoglobulinę, która poprzez wpływ na sieć cytokin reguluje proces zapalny. Immunoglobulinę podaje się z pozytywnym skutkiem w przypadku zakażeń enterowirusowych u noworodków oraz w przypadkach miokarditów, gdzie po podaniu dochodzi do poprawy czynności serca i wyleczenia. Dożylna immunoglobulina stosowana była z sukcesem także w czasie epidemii w Malezji i na Tajwanie [61]. Powszechnie stosowany w chorobach serca milrinon – syntetyczny inhibitor fosfodiesterazy o działaniu wazodylacyjnym (rozszerza naczynia) i inotropowym (reguluje siłę skurczu serca), w przypadku ciężkich stadiów zakażenia EV71 zmniejsza stężenie cytokin, a tym samym redukuje stan zapalny, a także zmniejsza opór naczyniowy, zwiększa wydajność serca i znacznie redukuje śmiertelność [87]. Użycie w terapii preparatów interferonów, które hamują replikację wirusa, skutkowało wzrostem przeżywalności po zakażeniu EV71 [88]. Pacjenci w stadium 3 są poddawani intensywnej opiece medycznej, wymagają wspomagania oddychania oraz podawania środków inotropowych. W przypadkach nieżytów żołądkowo-jelitowych dochodzi do odwodnienia i zmniejszenia objętości krwi, stąd niezbędne jest kontrolowane podawanie płynów [61]. Stadium 4 to okres rekonwalescencji, wymagana jest rehabilitacja, niekiedy także monitorowanie czynności serca i płuc.

8. Prace nad szczepionką

Wydaje się, że szczepienie, podobnie jak w przypadku wirusa polio, będzie najefektywniejszym sposobem kontroli epidemii spowodowanych EV71. Na dzień dzisiejszy nie ma gotowej szczepionki przeciw EV71, choć w maju 2013 roku doniesiono o pomyślnym zakończeniu 3 fazy badań klinicznych potencjalnej szczepionki zawierającej wirusa inaktywowanego [99]. Szczepionka powinna spełniać wiele kryteriów, przede wszystkim powinna być bezpieczna, szeroko dostępna, a więc łatwa w produkcji i tania. Populację docelową stanowią dzieci do 3 roku życia, gdyż są one najwrażliwsze na zakażenie EV71.

Po epidemii w Bułgarii w 1975 roku, w Moskwie stworzono szczepionkę inaktywowaną, która miała działać na tej samej zasadzie co inaktywowana szczepionka Salka przeciw polio. Szczepionka została podana dzieciom do 4 roku życia w Bułgarii w 1976 roku była skuteczna i dobrze tolerowana, jednak nie zastosowano jej na szeroką skalę [45]. Produkcja tego typu szczepionki wymaga inaktywacji szczepów wirusowych formaliną lub wysoką temperaturą. Użycie formaliny zachowuje strukturę cząstek wirusowych i ich antygenowość, tego typu preparat charakteryzuje się wysoką immunogennością. Inaktywacja wysoką temperaturą skutkuje niższą immunogennością i potrzebą zastosowania większej dawki wirusa [90]. Poddawane próbom szczepionki wykorzystują różne genotypy wirusa jak B4 czy C2 [50]. Szczepionka inaktywowana wydaje się być obecnie najlepszym kandydatem ze względu na ustalone i sprawdzone warunki przygotowania [16]. Jedna z potencjalnych szczepionek przeszła pomyślnie trzecią fazę badań klinicznych [99].

Prace nad szczepionką atenuowaną skupiły się nad konstrukcją wirusa szczepu prototypowego genotypu A, genetycznie zmodyfikowanego, działającego na tej samej zasadzie co atenuowana szczepionka Sabina przeciw polio [5]. Wprowadzono zmiany w rejonie 5'UTR, 3'UTR oraz w genie kodującym polimerazę 3D, co spowodowało obniżenie wirulencji i ograniczyło możliwość transmisji wirusa. Skonstruowana szczepionka była immunogenna, dawała odporność krzyżową przeciw wielu genotypom EV71, ale podanie tej szczepionki powodowało także wystąpienie łagodnych objawów neurologicznych, co wymaga dalszych badań. Ten typ szczepionki wymaga badań stabilności wirusa, by wykluczyć ryzyko powrotu do formy wysoce zjadliwej [97].

Kolejną alternatywą jest zastosowanie pustych cząstek wirusowych składających się wyłącznie z białek VP1 – VP4 [97]. Tego typu szczepionka wywołuje silną odpowiedź immunologiczną humoralną i komórkową i jej zastosowanie nie niesie ryzyka powrotu do formy wirulentnej. Możliwa jest doustna droga podania szczepionki np. w formie transgenicznych roślin.

Rozważa się także możliwość użycia szczepionki DNA [81], szczepionki zawierającej peptydy syntetyczne czy szczepionki podjednostkowej [44, 97]. Wszystkie te typy szczepionek nie niosą ryzyka powrotu do neurowirulencji.

9. Zakończenie

Enterowirus 71 to bardzo zmienny wirus, zdolny do szybkiej ewolucji i powstawania nowych genotypów. Jest wymieniamy wśród patogenów wywołujących nowopojawiające się zakażenia, których znaczenie może znacznie wzrosnąć w najbliższych latach. W bardzo krótkim czasie enterowirus 71 z bycia rzadką przyczyną HFMD stał się powodem regularnych i dużych epidemii w rejonie Azji i Pacyfiku, z wieloma ciężkimi komplikacjami neurologicznymi często kończącymi się śmiercią. W wielu krajach regionu azjatyckiego choroba ta jest pod stałym nadzorem epidemiologicznym. Prowadzenie tego typu programów zbierających dane kliniczne i epidemiczne, śledzenie ewolucji i transmisji genotypów jest bardzo istotne do czasu kiedy nie zostanie stworzona skuteczna szczepionka przeciw EV71 dostępna do powszechnego użycia. Fenomen dużych epidemii w regionie Azji i Pacyfiku oraz jednoczesne krążenie wirusa w pozostałych regionach świata bez wywoływania licznych zachorowań, budzi niepokój. Czy jest to zapowiedź zbliżającej się pandemii, która ogarnie świat podobnie jak pandemia *poliomyelitis* nagle wybuchła w pierwszej połowie XX wieku? Czy w przededniu eradykacji dzikiego wirusa polio pojawił się godny następcą w postaci enterowirusa 71? Odpowiedzi na te pytania przyniesie czas, ale miejmy nadzieję, że doświadczenia, które ludzkość nabyła w walce z wirusem polio, pozwolą na skuteczną walkę z enterowirusem 71.

Piśmiennictwo

1. AbuBakar S., Chee H.Y., Al-Kobaisi M.F., Xiaoshan J., Chua K.B., Lam S.K.: Identification of enterovirus 71 isolates from an outbreak of hand, foot and mouth disease (HFMD) with fatal cases of encephalomyelitis in Malaysia. *Virus Res.* **61**, 1–9 (1999)
2. AbuBakar S., Sam I.C., Yusof J., Lim M.K., Misbah S., MatRahim N., Hooi P.S.: Enterovirus 71 outbreak, Brunei. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 79–82 (2009)
3. A guide to clinical management and public health response for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD) (online), World Health Organization Press, http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/documents/HFMDGuidance/en/. (27 lutego 2014 roku)
4. Ang L.W., Koh B.K.W., Chan K.P., Chua L.T., James L., Goh K.T.: Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore, 2001–2007. *Ann. Acad. Med. Singapore*, **38**, 106–112 (2009)
5. Arita M., Nagata N., Iwata N., Ami Y., Sasaki Y., Mizuta K., Iwaszki 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.* **81**, 9386–9395 (2007)
6. Bedard K.M., Semler B.L.: Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect.* **6**, 702–713 (2004)
7. Bible J.M., Iturriza-Gomara M., Megson B., Brown D., Pantelidis P., Earl P., Bendig J., Tong C.Y.W.: Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3192–3200 (2008)
8. Bible J.M., Pantelidis P., Chan P.K.S., Tong C.Y.W.: Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications. *Rev. Med. Virol.* **17**, 371–379 (2007)
9. Brown B.A., Oberste M.S., Alexander J.P., Kennett M.L., Pallansch M.A.: Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J. Virol.* **73**, 9969–9975 (1999)
10. Cardoso M.J., Krishnan S., Tio P.H., Perera D., Wong S.C.: Isolation of subgenus B adenovirus during a fatal outbreak of enterovirus 71-associated hand, foot and mouth disease in Sibul, Sarawak. *Lancet*, **354**, 987–991 (1999)
11. Cardoso M.J., Perera D., Brown B.A., Cheon D., Chan H.M., Chan K.P., 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.* **9**, 462–468 (2003)
12. Chan L.G., Anderson L.J. i wsp.: Deaths of children during an outbreak of hand, foot and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 678–683 (2000)
13. Chan Y.F., AbuBakar S.: Recombinant human enterovirus 71 in hand, foot and mouth disease patients. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1468–1470 (2004)
14. Chan Y.F., Sam I.C., Wee K.L., AbuBakar S.: Enterovirus 71 in Malaysia: a decade later. *Neurol. Asia*. **16**, 1–15 (2011)
15. Chan Y.F., Sam J.C., AbuBakar S.: Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences. *Infect. Genet. Evol.* **10**, 404–412 (2010)
16. Chang L.Y.: Enterovirus 71 in Taiwan. *Pediatr. Neonatol.* **49**, 103–112 (2008)
17. Chang L.Y., Huang L.M. i wsp.: HLA-A33 is associated with susceptibility to enterovirus 71 infection. *Pediatrics*, **122**, 1271–1276 (2008)
18. Chang L.Y., Lin T.Y. i wsp.: Risk factors of enterovirus 71 infection and associated hand, foot and mouth/herpangina in children during an epidemic in Taiwan. *Pediatrics*, **109**, doi: 10.1542/peds.109.6.e88 (2002)
19. Chang L.Y., Tsao K.C., Hsia S.H., Shih S.R., Huang C.G., Chan W.K., Hsu K.H., Fang T.Y., Huang Y.C., Lin T.Y.: Transmission and clinical features of enterovirus 71 infections in household contacts in Taiwan. *JAMA*, **291**, 222–227 (2004)
20. Chatproedprai S., Theanboonlers A., Korkong S., Thongmee C., Wanankul S., Poovorawan Y.: Clinical and molecular characterization of hand, foot and mouth disease in Thailand, 2008–2009. *Jpn. J. Infect. Dis.* **63**, 229–233 (2010)
21. Chen C.H., Hsu B.M., Wan M.T.: Molecular detection and prevalence of enterovirus within environmental water in Taiwan. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 817–823 (2008)
22. Chen C.S., Yao Y.C., Lin S.C., Lee Y.P., Wang Y.F., Wang J.R., Liu C.C., Lei H.Y., Yu C.K.: Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice. *J. Virol.* **81**, 8996–9003 (2007)
23. Chen K.T., Chang H.L., Wang S.T., Cheng Y.T., Yang J.Y.: Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998–2005. *Pediatrics*, **120**, 244–252 (2007)

24. Chua K.B., Chua B.H., Lee C.S.M., Chem Y.K., Ismail N., Kiyu A., Kumarasamy V.: Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in the 1997, 2000 and 2005 outbreaks, Peninsular Malaysia. *Malays. J. Pathol.* **29**, 69–78 (2007)
25. Chua K.B., Kasri A.R.: Hand, foot and mouth disease due to enterovirus 71 in Malaysia. *Viol. Sin.* **26**, 221–228 (2011)
26. Chumakov M., Rodin V. i wsp.: Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch. Virol.* **60**, 329–340 (1979)
27. Deibel R, Gross LL, Collins DN.: Isolation of a new enterovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **148**, 203–207 (1975)
28. Gilbert G.L., Dickson K.E., Waters M.J., Kennett M.L., Land S.A., Sneddon M.: Outbreak of enterovirus 71 infection in Victoria, Australia, with a high incidence of neurologic involvement. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**, 484–488 (1988)
29. Hagiwara A., Tagaya I., Yoneyama T.: Epidemic of hand, foot and mouth disease associated with enterovirus 71 infection. *Intervirology*, **9**, 60–633 (1978)
30. Han J., Ma X.J., Wan J.F., Liu Y.H., Han Y.L., Chen C., Tian C., Gao C., Wang M., Dong X.P.: Long persistence of EV71 specific nucleotides in respiratory and feces samples of the patients with hand-foot-mouth disease after recovery. *BMC Infect. Dis.* **10**, doi:10.1186/1471-2334-10-178 (2010)
31. Ho M.: Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **33**, 205–216 (2000)
32. Ho M., Chen E.R., Hsu K.H., Twu S.J., Chen K.T., Tsai S.F., Wang J.R., Shih S.R.: An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N. Engl. J. Med.* **341**, 929–935 (1999)
33. Honkanen H., Hyötty H. i wsp.: Human enterovirus 71 strains in the background population and in hospital patients in Finland. *J. Clin. Virol.* **56**, 348–353 (2013)
34. Hsu B.M., Chen C.H., Wan M.T.: Prevalence of enteroviruses in hot spring recreation areas of Taiwan. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**, 253–259 (2008)
35. Huang M.C., Wang S.M., Hsu Y.W., Lin H.C., Chi C.Y., Liu C.C.: Long-term cognitive and motor deficits after enterovirus 71 brain-stem encephalitis in children. *Pediatrics*, **118**, 1785–1788 (2006)
36. Huang S.W., Hsu Y.W., Smith D.J., Kiang D., Tsai H.P., Lin K.H., Wang S.M., Liu C.C., Su I.J., Wang J.R.: Reemergence of enterovirus 71 in 2008 in Taiwan: dynamics of genetic and antigenic evolution from 1998 to 2008. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 3653–3662 (2009)
37. Huang S.W., Kiang D., Smith D.J., Wang J.R.: Evolution of re-emergent virus and its impact on enterovirus 71 epidemics. *Exp. Biol. Med.* **236**, 899–908 (2011)
38. Ishimaru Y., Nakano S., Yamaoka K., Takami S.: Outbreaks of hand, foot, and mouth disease by enterovirus 71. High incidence of complication disorders of central nervous system. *Arch. Dis. Child.* **55**, 583–588 (1980)
39. Kassab S., Saghi T., Boyer A., Lafon ME., Gruson D., Lina B., Fleury H., Schuffenecker I.: Fatal case of enterovirus 71 infection and rituximab therapy, France, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1345–1347 (2013)
40. Kennett M.L., Birch C.J., Lewis F.A., Yung A.P., Locarnini S.A., Gust I.D.: Enterovirus type 71 infection in Melbourne. *Bull. World Health Organ.* **51**, 609–615 (1974)
41. Khetsuriani N., LaMonte-Fowlkes A., Oberste M.S., Palansch M.A.: Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005. *MMWR Surveill. Summ.* **55**, 1–20 (2006)
42. Kim K.H.: Enterovirus 71 infection: An experience in Korea, 2009. *Korean J. Pediatr.* **53**, 616–622 (2010)
43. Kung S.H., Wang S.F., Huang C.W., Hsu C.C., Liu H.F., Yang J.Y.: Genetic and antigenic analyses of enterovirus 71 isolates in Taiwan during 1998–2005. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 782–787 (2007)
44. Kuo R.L., Shih S.R.: Strategies to develop antivirals against enterovirus 71. *Viol. J.* **10**, doi:10.1186/1743-422X-10-28 (2013)
45. Lee M.S., Tseng F.C., Wang J.R., Chi C.Y., Chong P., Su I.J.: Challenges to licensure of enterovirus 71 vaccines. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, doi: 10.1371/journal.pntd.0001737 (2012)
46. Lin T.Y., Chang L.Y., Hsia S.H., Huang Y.C., Chiu C.H., Hsueh C., Shih S.R., Liu C.C., Wu M.H.: The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 52–57 (2002)
47. Lin T.Y., Hsia S.H., Huang Y.C., Wu C.T., Chang L.Y.: Proinflammatory cytokine reactions in enterovirus 71 infections of the central nervous system. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 269–274 (2003)
48. Lin T.Y., Twu S.J., Ho M.S., Chang L.Y., Lee C.Y.: Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: occurrence and recognition. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 291–293 (2003)
49. Lin Y.W., Wang S.W., Tung Y.Y., Chen S.H.: Enterovirus 71 infection of human dendritic cells. *Exp. Biol. Med.* **234**, 1166–1173 (2009)
50. Liu C.C., Lian W.C., Butler M., Wu S.C.: High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-free microcarrier Vero cell culture. *Vaccine*, **25**, 19–24 (2007)
51. McMinn P.C.: An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 91–107 (2002)
52. McMinn P., Lindsay K., Perera D., Chan H.M., Chan K.P., Cardoso M.J.: Phylogenetic analysis of enterovirus 71 isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore and Western Australia. *J. Virol.* **75**, 7732–7738 (2001)
53. McMinn P., Stratov I., Nagarajan L., Davis S.: Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot and mouth disease in Western Australia. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 236–242 (2001)
54. Melnick J.L.: Enterovirus type 71 infections: a varied clinical pattern sometimes mimicking paralytic poliomyelitis. *Rev. Infect. Dis.* **6**, 387–390 (1984)
55. Mirand A., Bailly J.L. i wsp.: Phylogenetic evidence for a recent spread of two populations of human enterovirus 71 in European countries. *J. Gen. Virol.* **91**, 2263–2277 (2010)
56. Nagy G., Takatsy S., Kukan E., Mihaly I., Dömök I.: Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS Disease in Hungary in 1978. *Arch. Virol.* **71**, 217–227 (1982)
57. Nishimura Y., Shimojima M., Tano Y., Miyamura T., Wakita T., Shimizu H.: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for Enterovirus 71. *Nat. Med.* **15**, 794–797 (2009)
58. Ooi M.H., Solomon T. i wsp.: Adenovirus type 21-associated Acute Flaccid Paralysis during an outbreak of Hand-foot-and-mouth Disease in Sarawak, Malaysia. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 550–559 (2003)
59. Ooi M.H., Solomon T. i wsp.: Human enterovirus 71 disease in Sarawak, Malaysia: a prospective clinical, virological and molecular epidemiological study. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 646–656 (2007)
60. Ooi M.H., Solomon T. i wsp.: Identification and validation of clinical predictors for the risk of neurological involvement in children with hand, foot and mouth disease in Sarawak. *BMC Infect. Dis.* **9**, doi:10.1186/1471-2334-9-3 (2009)
61. Ooi M.H., Wong S.C., Lewthwaite P., Cardoso M.J., Solomon T.: Clinical features, diagnosis, and management of Enterovirus 71. *Lancet Neurol.* **9**, 1097–1105 (2010)
62. Ortner B., Huang C.W., Schmid D., Mutz I., Wewalka G., Allerberger F., Yang J.Y., Huemer H.P.: Epidemiology of enterovirus types causing neurological disease in Austria 1999–2007: detection of clusters of echovirus 30 and enterovirus 71 and analysis of prevalent genotypes. *J. Med. Virol.* **81**, 317–324 (2009)

63. Palacios G., Oberste M.S.: Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neurovirol.* **11**, 424–433 (2005)
64. Pérez-Vélez C.M., Anderson M.S., Robinson C.C., McFarland E., Nix W.A., Pallansch M.A., Oberste M.S., Glodé M.P.: Outbreak of neurologic enterovirus type 71 disease: a diagnostic challenge. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 950–957 (2007)
65. Piekarowicz A.: Podstawy wirusologii molekularnej, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2012, 76–94, 151–57, 194–196
66. Podin Y., Cardoso M.J. i wsp.: Sentinel surveillance for human enterovirus 71 in Sarawak, Malaysia: lessons from the first 7 years. *BMC Public Health.* **6**, doi:10.1186/1471-2458-6-180 (2006)
67. Poliomyelitis (online). World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/en/>. (06 marca 2014 roku)
68. Santti J., Hyypiä T., Kinnunen L., Salminen M.: Evidence of recombination among enteroviruses. *J. Virol.* **73**, 8741–8749 (1999)
69. Sarma N., Sarkar A., Mukherjee A., Ghosh A., Dhar S., Malakar R.: Epidemic of hand, foot and mouth disease in West Bengal, India in August, 2007: A multicentric study. *Indian J. Dermatol.* **54**, 26–30 (2009)
70. Schmidt N.J., Lennette E.H., Ho H.H.: An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J. Infect. Dis.* **129**, 304–309 (1974)
71. Severe complications of hand, foot and mouth disease (HFMD) caused by EV-71 in Cambodia – conclusion of the joint investigation (online), World Health Organization, http://www.who.int/csr/don/2012_07_13/en/. (03 marca 2014 roku)
72. Shih S.R., Stollar V., Li M.L.: Host factors in enterovirus 71 replication. *J. Virol.* **85**, 9658–9666 (2011)
73. Simmonds P., Welch J.: Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J. Virol.* **80**, 483–493 (2006)
74. Solomon T., Lewthwaite P., Perera D., Cardoso M.J., McMinn P., Ooi M.H.: Virology, epidemiology, pathogenesis and control of enterovirus 71. *Lancet Infect. Dis.* **10**, 778–790 (2010)
75. Tang W.F., Yang S.Y., Wu B.W., Jheng J.R., Chen Y.L., Shih C.H., Lin K.H., Lai H.C., Tang P., Horng J.T.: Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication. *J. Biol. Chem.* **282**, 5888–5898 (2007)
76. Tee K.K., Lam T.T.Y., Chan Y.F., Bible J.M., Kamarulzaman A., Tong C.Y.W., Takebe Y., Pybus O.G.: Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection and seasonal periodicity of the VP1 gene. *J. Virol.* **84**, 3339–3350 (2010)
77. Tee K.K., Takebe Y., Kamarulzaman A.: Emerging and re-emerging viruses in Malaysia, 1997–2007. *Inter. J. Infect. Dis.* **13**, 307–318 (2009)
78. Thompson S.R., Sarnow P.: Enterovirus 71 contains a type I IRES element that functions when eukaryotic initiation factor eIF4G is cleaved. *Virology*, **315**, 259–266 (2003)
79. Trevelyan B., Smallman-Raynor M., Cliff A.D.: The Spatial Dynamics of Poliomyelitis in the United States: From Epidemic Emergence to Vaccine-Induced Retreat, 1910–1971. *Ann. Assoc. Am. Geogr.* **95**, 269–293 (2005)
80. Tu P.V., Thao N.T.T., Perera D., Huu T.K., Tien N.T.K., Thuong T.C., How O.M., Cardoso M.J., McMinn P.C.: Epidemiologic and virologic investigation of hand foot and mouth disease, southern Vietnam, 2005. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1733–1741 (2007)
81. Tung W.S., Bakar S.A., Sekawi Z., Rosli R.: DNA vaccine constructs against enterovirus 71 elicit immune response in mice. *Genet. Vaccines Ther.* **5**, doi:10.1186/1479-0556-5-6 (2007)
82. Tyler K.L.: Emerging viral infections of the central nervous system. Part 1. *Arch. Neurol.* **66**, 939–948 (2009)
83. Van der Sanden S., Koopmans M., Uslu G., Van der Avoort H., Dutch Working Group for Clinical Virology.: Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963–2008. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 2826–2833 (2009)
84. Van der Sanden S., Van der Avoort H., Lemey P., Uslu G., Koopmans M.: Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C viruses. *J. Gen. Virol.* **91**, 1949–1958 (2010)
85. Wang S.M., Ho T.S., Shen C.F., Liu C.C.: Enterovirus 71, one virus and many stories. *Pediatr. Neonatol.* **49**, 113–115 (2008)
86. Wang S.M., Lei H.Y., Huang K.J., Wu J.M., Wang J.R., Yu C.K., Su I.J., Liu C.C.: Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema. *J. Infect. Dis.* **188**, 564–570 (2003)
87. Wang S.M., Lei H.Y., Huang M.C., Wu J.M., Chen C.T., Wang J.N., Wang J.R., Liu C.C.: Therapeutic efficacy of milrinone in the management of enterovirus 71-induced pulmonary edema. *Pediatr. Pulmonol.* **39**, 219–223 (2005)
88. Wang S.M., Lei H.Y., Liu C.C.: Cytokine immunopathogenesis of enterovirus 71 brain stem encephalitis. *Clin. Dev. Immun.* **2012**, doi: 10.1155/2012/876241 (2012)
89. Wang S.M., Lei H.Y., Yu C.K., Wang J.R., Su I.J., Liu C.C.: Acute chemokine response in the blood and cerebrospinal fluid of children with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *J. Infect. Dis.* **198**, 1002–1006 (2008)
90. Wang X., Rao Z. i wsp.: A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 424–429 (2012)
91. Weng K.F., Li M.L., Hung C.T., Shih S.R.: Enterovirus 71 3C protease cleaves a novel target CstF-64 and inhibits cellular polyadenylation. *PLoS Pathog.* **5**, doi: 10.1371/journal.ppat.1000593 (2009)
92. Wu J.M., Wang J.N., Tsai Y.C., Liu C.C., Huang C.C., Chen Y.J., Yeh T.F.: Cardiopulmonary manifestations of fulminant enterovirus 71 infection. *Pediatrics*, **109**, doi:10.1186/1479-0556-5-6 (2002)
93. Yang B., Chuang H., Yang K.D.: Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells. *Virol. J.* **6**, doi: 10.1186/1743-422X-6-141 (2009)
94. Yamayoshi S., Yamashita Y., Li J., Hanagata N., Minowa T., Takemura T., Koine S.: Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat. Med.* **15**, 798–801 (2009)
95. Yoke-Fun C., AbuBakar S.: Phylogenetic evidence for intertypic recombination in the emergence of human enterovirus 71 subgenotypes. *BMC Microbiol.* **6**, doi: 10.1186/1471-2180-6-74 (2006)
96. Yu H., Chen W., Chang H., Tang R., Zhao J., Gan L., Liu B., Chen J., Wang M.: Genetic analysis of the VP1 region of enterovirus 71 reveals the emergence of genotype A in central China in 2008. *Virus Genes.* **41**, 1–4 (2010)
97. Zhang D., Lu J., Lu J.: Enterovirus 71 vaccine: close but still far. *Inter. J. Infect. Dis.* **14**, 739–743 (2010)
98. Zhang Y., Xu W. i wsp.: An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand foot and mouth disease in Fuyang city of China. *Virol. J.* **7**, doi: 10.1186/1743-422X-7-94 (2010)
99. Zhu F.C., Shen X.L. i wsp.: Efficacy, safety and immunology of an inactivated alum-adjuvant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, **381**, 2024–2032 (2013)
100. Zhu Z., Xu W. i wsp.: Retrospective seroepidemiology indicated that human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulated widely in central and southern China before large-scale outbreaks from 2008. *Virol. J.* **7**, doi: 10.1186/1743-422X-7-300 (2010)