

- 4 Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, *et al.* Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients[J]. *Am J Ophthalmol*, 2004; 137(1): 62 – 69
- 5 Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. The role of oxidative stress in glaucoma[J]. *Mutat Res*, 2006, 612(2): 105 – 114
- 6 Sacca SC, Pascotto A, Camicione P, *et al.* Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork – clinical correlation in patients with primary open – angle glaucoma[J]. *Arch Ophthalmol* 2005, 123: 458 – 463
- 7 Izzotti A, Sacca SC, Longobardi M, *et al.* Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma[J]. *Arch Ophthalmol*, 2010, 128(6): 724 – 730
- 8 Liu Q, Ju WK, Crowston JG, *et al.* Oxidative stress is an early event in hydrostatic pressure induced retinal ganglion cell damage[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(10): 4580 – 4589
- 9 周崎, 刘玉琴, 赵家良, 等. 氧化应激对猪眼小梁细胞内皮细胞白蛋白黏附分子-1 表达的影响[J]. *中国医学科学院学报*, 2007, 29(3): 394 – 397
- 10 Luna C, Li G, Qiu J, *et al.* Role of miR – 29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress[J]. *Mol Vis*, 2009, 28(15): 2488 – 2497
- 11 Campello L, Esteve – Rudd J, Cuenca N, *et al.* The ubiquitin – proteasome system in retinal health and disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47(2): 790 – 810
- 12 Guo W, Shang F, Liu Q, *et al.* Ubiquitin – proteasome pathway function is required for lens cell proliferation and differentiation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(6): 2569 – 2575
- 13 张铁英, 刘奕志, 吴明星, 等. 老年性白内障与透明晶状体上皮内蛋白酶活性的比较[J]. *眼科学报*, 2006, 22: 89 – 92
- 14 Zhang X, Zhou J, Fernandes AF, *et al.* The proteasome: a target of oxidative damage in cultured human retina pigment epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(8): 3622 – 3630
- 15 Caballero M, Liton PB, Epstein DL, *et al.* Proteasome inhibition by chronic oxidative stress in human trabecular meshwork cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 22: 308(2): 346 – 352
- 16 Erb C, Heinke M. Oxidative stress in primary open – angle glaucoma [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011, 3: 1524 – 1533
- 17 Babizhayev MA, Yegorov YE. Senescent phenotype of trabecular meshwork cells displays biomarkers in primary open – angle glaucoma [J]. *Curr Mol Med*, 2011, 11(7): 528 – 552

(收稿日期: 2014 – 06 – 08)

(修回日期: 2014 – 06 – 27)

EV71 及 CA16 不同检测方法敏感度及特异性比较

李 华 杨 婷 姜广菊 何晓娟 岳 磊 谢天宏 杨水芝 朱凡丽 龙润乡 杨 蓉 罗芳宇 谢忠平

摘 要 目的 比较检测肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 及柯萨奇病毒 A 组 16 型 (coxsackievirus A16, CA16) 不同检测方法、不同生产厂家 (A、B、C、D、E) 荧光定量 PCR 检测试剂的敏感度及特异性。**方法** 对 EV71 及 CA16 各 10 个病毒株进行稀释, 取原倍、 10^{-3} 及 10^{-6} 3 个浓度, 分别采用实时荧光定量 PCR 法 (分别用不同厂家的检测试剂)、RT – PCR 法、ELISA 法及细胞培养 4 种方法进行检测, 每种检测连续重复 3 次, 然后将其结果进行比较分析。**结果** EV71 及 CA16 经不同方法及试剂检测后结果显示, 荧光定量 PCR 方法敏感度最高, 依次为细胞培养法、RT – PCR (VP1) 法及 ELISA 法; 细胞培养法、RT – PCR (VP1) 法及 ELISA 法的特异性较荧光定量 PCR 检测方法的特异性高, 但荧光定量 PCR 检测试剂均出现不同程度非特异的假阳性结果; 不同的荧光定量 PCR 检测试剂中, D 厂家试剂检测 EV71 和 C 厂家试剂检测 CA16 的敏感度和特异性最高。**结论** RT – PCR (VP1) 方法更适于检测 EV71 及 CA16, 如条件许可则建议联合采用细胞培养检测方法, 提高检测结果的敏感度和特异性。

关键词 手足口病 EV71 CA16 敏感度 特异性

中图分类号 R446.1

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.01.017

Evaluate the Sensitivity and Specificity of Differentiating Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16. Li Hua, Yang Ting, Jiang Guangju, *et al.* Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College/Chinese Academy of Medical Science, Yunan 650118, China

Abstract Objective To evaluate the sensitivity and specificity of detecting EV71 and CA16 with four different methods and manufacturers (A, B, C, D, E) of the real – time PCR. **Methods** Ten EV71 strains and ten CA16 strains were diluted to three different concentrations, respectively, the original, 10^{-3} and 10^{-6} times, which were detected simultaneously by the real – time PCR (kits from five manu-

基金项目: 云南省重点新产品研究项目 (2012BC006)

作者单位: 650118 昆明, 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所

通讯作者: 谢忠平, 电子信箱: xzp218@126.com

facturers), RT-PCR, ELISA and Cell culture. Each test repeated three times, and then we compared the results. **Results** real-time PCR got highest sensitivity, followed by Cell culture, RT-PCR and ELISA. The specificity of cell culture, RT-PCR and ELISA were higher than the real-time PCR, but there were non-specificity and false positive result by the method of the real-time PCR. EV71 from D manufacturer achieved the highest sensitivity and specificity. CA16 from C manufacturer achieved the highest sensitivity and specificity. **Conclusion** RT-PCR (VP1) is more suitable for detecting EV71 and CA16. It suggests that combining cell culture will improve sensitivity and specificity if the condition allows.

Key words Hand,foot and mouth disease; EV71; CA16;Sensitivity; Specificity

手足口病(hand-foot-and-mouth disease, HFMD)是由肠道病毒引起的,为全球性传染病,多发生于 5 岁以下儿童,尤以 <3 岁儿童发生率最高^[1]。可引起手、足、口腔等部位的疱疹,少数患儿可引起心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜脑炎等并发症。病毒还可侵犯呼吸系统、中枢神经系统等引起脑炎、肺水肿、弛缓性麻痹、心肌炎等症状,个别重症病例还可导致死亡^[2-4]。

引起手足口病的肠道病毒有 20 多种,其中以柯萨奇病毒 A16 型(coxsackievirus A16,C A16)和肠道病毒 71 型(enterovirus 71,EV71)最为常见^[2]。国家卫生和计划生育委员会(原卫生部)于 2008 年 5 月 2 日将 HFMD 纳入丙类法定传染病管理,并制订了相应的诊疗、防控指南^[5,6]。2013 年统计手足口病发病 1825649 例,死亡人数 620 例,占丙类传染病总死亡数百分比是 81.50%。CA16 和 EV71 引起的 HFMD 临床表现相似,难以鉴别。而且 EV 71 和 CA 16 在遗传学上同源性也较高,核苷酸序列有 77% 的同源性,氨基酸序列的同源性为 89%^[7]。因此,研究快速、准确、特异地对 EV 71 和 CA 16 的诊断方法尤为重要。目前实验室检测手足口病方法,包括病毒分离培养法、血清学中和试验法、ELISA 法、病原体核酸 RT-PCR 法及荧光定量 PCR 法^[8-13]。针对目前品种繁多的检测方法,本试验通过用不同方法、同种方法的不同试剂,检测分离的 20 株手足口病病毒(CA16、EV71 各 10 株),并进行对比,分析检测方法及检测试剂的敏感度及特异性,同时为自制的 ELISA 抗原检测试剂盒找到可参比的试剂和方法。

材料与方法

1. 检测用病毒:选本实验室从临床患儿标本中(临床标本的采集及临床研究已申请“知情同意书”免签申请,得到伦理委员会批准)分离、并经过鉴定的 EV71 病毒株及 CA16 毒株各 10 株,进行稀释,选择原倍、10⁻³ 及 10⁻⁶ 3 个浓度,所有的检测方法(试剂)均同时对该 20 个毒株的不同浓度(稀释度)病毒进行检测,以确定其敏感度及特异性。
2. 检测用细胞:Vero 细胞由笔者单位质量检定室提供。

3. EV71 及 CA 16 荧光定量 PCR 检测试剂:共选择市场上销售量大的 5 个试剂公司生产的荧光定量 PCR 检测试剂盒,分别编号为 A 公司、B 公司、C 公司、D 公司及 E 公司。实验的操作及结果的判定均严格按各试剂的使用说明书进行操作。

4. RT-PCR 检测方法:按表 1 设计 VP1 引物,引物由生物工程(上海)股份有限公司合成^[14];采用核酸提取试剂盒(硅胶膜吸附法)提取病毒核酸,用 Prime Script One Step RT-PCR Kit(TaKaRa 公司,大连)对 VP1 片段进行扩增,产物进行琼脂糖凝胶电泳。

表 1 EV71 及 CA16 RT-PCR 引物设计序列

引物名称		引物序列(5'→3')	PCR 产物长度(bp)
Cox A16	上游	GCAAACGGCTAACATACA	932
	下游	TGTCCAAACTTTCCCAAC	
EV71	上游	AAGGATGCTAGTGATATCCT	1009
	下游	CATTGTGAGTGGCAAGAT	

5. EV71 及 CA16 ELISA 抗原检测试剂:由笔者所在研究室制备^[8,9]。

6. 细胞培养法:将不同稀释度的病毒接种 Vero 细胞,37℃ 培养 7 天观察细胞病变情况,以出现病变的最高稀释度为检测敏感度。

结 果

1. EV71 及 CA16 不同检测方法的敏感度:经过对检测结果进行统计分析,其检测方法的敏感度依次为:荧光定量 PCR 检测方法、细胞培养病变法(中和法)、普通 RT-PCR(VP1)及 ELISA 抗原检测法。对于病毒含量达到 10⁶ CCID₅₀/ml 的样品,所有检测方法的检出率均可达 100%;对于病毒含量达到 10³ CCID₅₀/ml 的样品,细胞培养法检出率达 100%,荧光定量 PCR 检测试剂检出率为 80%~100%,普通 RT-PCR(VP1)检测率约 50%,而 ELISA 抗原检测试剂检出率仅为 10%;对于 <20 CCID₅₀/ml 病毒载量的样品,则仅有荧光定量 PCR 可检出,检出率为 0~50%(表 2、表 3)。

2. EV71 及 CA16 不同检测试剂的敏感度:CA16 检测试剂,对于病毒量达到 10⁶ CCID₅₀/ml 样品,所用

5 个生产厂家的荧光定量 PCR 检测试剂均能 100% 检出;对于病毒量达到 10^3 CCID₅₀/ml 级样品,荧光定量 PCR 检测试剂检出率为 80% ~ 100%,对于 < 20CCID₅₀/ml 病毒量的样品,则只有荧光定量 PCR 检测试剂才可检出。荧光定量 PCR 检测 EV71 的敏感度顺序为 D > B > A = E = C; 荧光定量 PCR 检测 CA16 的敏感度顺序为 C > E > D > B > A (表 4、表 5)。

3. 检测方法的特异性:经检测 ELISA 抗原检测试剂、细胞培养病变法(中和法)及普通 RT - PCR (VP1) 3 种方法均未发现非特异性假阳性结果,表现为检测方法特异性好,而所用的 5 个生产厂家的荧光

定量 PCR 检测试剂均出现不同程度的非特异性假阳性结果,即荧光定量 PCR 检测方法特异性差(表 2、表 3)。

4. 检测试剂的特异性:5 个生产厂家的荧光定量 PCR 检测试剂均出现不同程度的非特异性假阳性结果,假阳性率为 10% ~ 100%;通过对 5 家 EV71 荧光定量检测试剂的特异性进行分析,其顺序为 D > A > E > C > B;检测 CA16 的特异性顺序为 A > C > D > E > B,呈现出假阳性率为高病毒量的样品假阳性率高,低病毒量的样品假阳性率低的趋势(表 4、表 5)。

表 2 EV71 4 种检测方法敏感度及特异性分析

病毒	稀释度	病毒量 (CCID ₅₀ /ml)	荧光定量 PCR	普通 RT - PCR	ELISA 抗原	细胞培养病变法
			检测试剂	(VP1)	检测试剂	(中和法)
EV71	原倍	(1.2 ~ 3.2) × 10 ⁶	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)
	10 ⁻³	(1.2 ~ 3.2) × 10 ³	100% (10/10)	50% (5/10)	10% (1/10)	100% (10/10)
	10 ⁻⁶	1.2 ~ 3.2	30% (3/10)	20% (2/10)	0 (0/10)	50% (5/10)
CA16	原倍	(0.2 ~ 12.6) × 10 ⁶	30% (3/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)
	10 ⁻³	(0.2 ~ 12.6) × 10 ³	10% (1/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)
	10 ⁻⁶	0.2 ~ 12.6	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)

表 3 CA16 4 种检测方法敏感度及特异性分析

病毒	稀释度	病毒量 (CCID ₅₀ /ml)	荧光定量 PCR	普通 RT - PCR	ELISA 抗原	细胞培养病变法
			检测试剂	(VP1)	检测试剂	(中和法)
CA16 病毒	原倍	(1.2 ~ 3.2) × 10 ⁶	100% (9/9)	100% (9/9)	100% (10/10)	100% (10/10)
	10 ⁻³	(1.2 ~ 3.2) × 10 ³	88.89% (8/9)	44.44% (4/9)	0 (0/10)	100% (10/10)
	10 ⁻⁶	1.2 ~ 3.2	11.11% (1/9)	0 (0/10)	0 (0/10)	50% (5/10)
EV71	原倍	(0.2 ~ 12.6) × 10 ⁶	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)
	10 ⁻³	(0.2 ~ 12.6) × 10 ³	10% (1/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)
	10 ⁻⁶	0.2 ~ 12.6	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)

表 4 EV71 检测试剂敏感度及特异性分析

病毒	稀释度	病毒量 (CCID ₅₀ /ml)	荧光定量 PCR 检测试剂				
			A	B	C	D	E
EV71	原倍	(1.2 ~ 3.2) × 10 ⁶	100% (10/10)	100% (10/10)	90% (9/10)	100 (10/10)	100% (10/10)
	10 ⁻³	(1.2 ~ 3.2) × 10 ³	100% (10/10)	90% (9/10)	80% (8/10)	100% (10/10)	100% (10/10)
	10 ⁻⁶	1.2 ~ 3.2	30% (3/10)	40% (4/10)	30% (3/10)	100% (10/10)	30% (3/10)
CA16	原倍	(0.2 ~ 12.6) × 10 ⁶	30% (3/10)	100% (10/10)	80% (8/10)	22.22% (2/9)	40% (4/10)
	10 ⁻³	(0.2 ~ 12.6) × 10 ³	10% (1/10)	100% (10/10)	0 (0/10)	11.11% (1/9)	90% (9/10)
	10 ⁻⁶	0.2 ~ 12.6	0 (0/10)	100% (10/10)	20% (2/10)	44.44% (4/9)	20% (2/10)

表 5 CA16 检测试剂敏感度及特异性分析

病毒	稀释度	病毒量 (CCID ₅₀ /ml)	荧光定量 PCR 检测试剂				
			A	B	C	D	E
CA16	原倍	(1.2 ~ 3.2) × 10 ⁶	100% (9/9)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (9/9)	90% (9/10)
	10 ⁻³	(1.2 ~ 3.2) × 10 ³	88.89% (8/9)	100% (10/10)	100% (10/10)	88.89% (8/9)	100% (10/10)
	10 ⁻⁶	1.2 ~ 3.2	11.11% (1/9)	40% (4/10)	80% (8/10)	55.56% (5/9)	60% (8/10)
EV71	原倍	(0.2 ~ 12.6) × 10 ⁶	0 (0/10)	100% (10/10)	20% (2/10)	90% (9/10)	100% (10/10)
	10 ⁻³	(0.2 ~ 12.6) × 10 ³	10% (1/10)	100% (10/10)	80% (8/10)	20% (2/10)	100% (10/10)
	10 ⁻⁶	0.2 ~ 12.6	0 (0/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	40% (4/10)	40% (4/10)

5. EV71 及 CA16 荧光定量 PCR 检测试剂假阳性结果分析:通过对产生假阳性样品的 CT 值进行分析,除 C 公司 EV71 试剂检测 CA16 样品 CT 值集中在 20~30 外,其余均集中在 >30 的区域,接近阳性标准的上限值,应该是在灰区的范围(表 6),所以确

定可疑值范围或设定灰区是有必要的。从研究的结果分析,凡 CT 值在灰区范围内的样品都应按要求进行重试,这样可以减少非特异阳性结果的产生,保证检测结果的可靠性和准确性。

表 6 EV71 及 CA16 荧光定量 PCR 检测试剂假阳性结果 CT 值分析

试剂相关 参数	A		B		C		D		E	
	EV71	CA16	EV71	CA16	EV71	CA16	EV71	CA16	EV71	CA16
	试剂检测	试剂检测	试剂检测	试剂检测	试剂检测	试剂检测	试剂检测	试剂检测	试剂检测	试剂检测
	CA16 样品	EV71 样品	CA16 样品	EV71 样品	CA16 样品	EV71 样品	CA16 样品	EV71 样品	CA16 样品	EV71 样品
阳性判定标准	CT≤38	CT≤38	CT≤35	CT≤35	CT≤35.1	CT≤34.8	CT≤37.0	CT≤37.0	CT<35	CT<35
可疑值(灰区)标准	38<CT	38<CT	35<CT	35<CT	无		37<CT	37<CT	35≤CT	35≤CT
最低检测限	≤40	≤40	≤38	≤38	无		<40	<40	<40	<40
	1×10 ³	1×10 ³	2×10 ³	2×10 ³	1×10 ³	1×10 ³	1×10 ³	1×10 ³	1×10 ³	1×10 ³
阴性质控品要求	拷贝/毫升	拷贝/毫升	CCID ₅₀ /ml	CCID ₅₀ /ml	CCID ₅₀ /ml	CCID ₅₀ /ml	CCID ₅₀ /ml	CCID ₅₀ /ml	拷贝/毫升	拷贝/毫升
	无 CT 显示或 CT>40	无 CT 显示或 CT>40	无 S 型扩增曲线	无 S 型扩增曲线	无 S 型扩增曲线或无 CT 显示	无 S 型扩增曲线或无 CT 显示	无 CT 或 CT 为 0	无 CT 或 CT 为 0	CT<35	CT<35
阳性质控品要求	CT≤35	CT≤35	CT≤30	CT≤30	CT<30	CT<30	CT<30	CT<30	CT 强阳<CT 弱阳<35	CT 强阳<CT 弱阳<35
平均 CT 值	30.79	33.69	30.14	34.00	27.10	29.33	22.88	27.27	30.87	32.15
CT 值 SD	7.12	3.63	4.97	1.01	4.33	5.46	10.55	/	4.80	1.11
检测样品数	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
假阳性数	10	21	7	13	30	29	19	1	14	20
CT 值 <20	10%	4.76%	0	0	3.33%	3.45%	47.37%	0	7.14%	0
	(1/10)	(1/21)	(0/7)	(0/13)	(1/30)	(1/29)	(9/19)	(0/1)	(1/14)	(0/20)
分组 20~30	10%	4.76%	42.86%	0	96.67%	31.03%	15.79%	100%	14.28%	5%
	(1/10)	(1/21)	(3/7)	(0/13)	(29/30)	(9/29)	(3/19)	(1/1)	(2/14)	(1/20)
>30	80%	90.48%	57.14%	100%	0	65.52%	36.84%	0	78.57%	95%
	(8/10)	(19/21)	(4/7)	(13/13)	(0/30)	(19/29)	(7/19)	(0/1)	(11/14)	(19/20)

讨 论

对手足口病主要病原体 EV71 及 CA16 的检测,最初采用病毒培养的方法,但病毒培养方法耗时长,不能满足临床上早期诊断和治疗的要求。随后建立了 ELISA 方法,加快了 EV71 及 CA16 病毒的检测速度。随着分子生物学技术的发展,RT-PCR 及荧光定量 PCR 技术获得广泛应用。

从检测样品的分析结果显示,荧光定量 PCR 检测法、细胞培养病变法(中和法)、普通 RT-PCR(VP1)及 ELISA 抗原 4 种检测方法,荧光定量 PCR 检测方法敏感度最高,且可检测到 <20CCID₅₀/ml 病毒载量的样品,这与报道一致,荧光定量 PCR 检测方法最低检测限达到 9.22×10² PFU/ml 的样本,敏感度比 RT-PCR 方法高 10 倍^[15,16]。但荧光定量 PCR 检测法也有不足,即特异性差,易造成误差,出现假阳

性。对于病毒量达到 10³ CCID₅₀/ml 级样品,细胞培养法能 100% 检出、荧光定量 PCR 检测试剂检出率为 80%~100% 不等、普通 RT-PCR(VP1)检测率约为 50%,而 ELISA 抗原检测试剂检出率仅为 10% 左右,由此试验结果显示,细胞培养法检出率高,是可以与荧光定量 PCR 相提并论的,只是由于细胞培养法耗时长,对实验室条件及操作人员要求严格,且一般县级单位不具备细胞培养的硬件设施条件和要求,所以选择荧光定量 PCR 或者普通 RT-PCR 进行病毒检测。

特异性的检测可以看出所用 5 个生产厂家的荧光定量 PCR 检测试剂均出现不同程度的非特异性假阳性结果,假阳性率出现的趋势是高病毒量的样品假阳性率高,低病毒量的样品假阳性率低,且假阳性率从 10% 至 100% 不等,这与报道不相符^[17~19]。这可

能是由于本次所用的样品为细胞培养的病毒液,病毒含量相对于临床采集样品具有病毒载量高的原因所致。EV71 及 CA16 荧光定量 PCR 检测的结果是根据 CT 值进行判定的,所以 CT 值大于试剂盒阳性判定标准值为阴性,反之为阳性,在灰区为可疑值,应进行重试。在本实验中, EV71 试剂检测 CA16 样品有 50.0% (15/30) 在可疑值范围内、CA16 试剂检测 EV71 样品有 53.6% (15/28) 在可疑值范围内,在这些样品应按说明书要求进行重试 2 次,这样可以减少非特异阳性结果的产生,有必要的还进行敏感细胞的分离培养,降低假阳性的发生率。有研究结果显示, RT-PCR 法与 RD 细胞病毒分离法检测出的阳性标本按不同分类统计比较后,差异无统计学意义^[20]。从本试验结果看,细胞培养病变法(中和法)及普通 RT-PCR(VP1)法检测出的阳性标本按不同分类统计比较后,两者差异也无统计学意义,这与报道一致。

综上所述,分析比较 5 个生产厂家检测试剂的敏感度及特异性,可以得出检测 EV71 和 CA16 分别选择 D、C 厂家的荧光定量 PCR 试剂效果较好。4 种检测方法中,虽然细胞培养病毒分离是确定手足口病病原体的金标准,但所需时间相对较长,本试验结果显示细胞培养病变法及普通 RT-PCR(VP1)法检测的结果一致性高,所以在应急阶段可首选普通 RT-PCR(VP1)法。

参考文献

- 1 卫生部.手足口病诊疗指南(2010 版)[J]. 国际呼吸杂志, 2010, 30(24): 1473-1475
- 2 周世力,杨帆,金奇. 肠道病毒 71 型的研究进展[J]. 病毒学报, 2003, 19(3): 284-287
- 3 陆一涵,姜庆五. 人肠道病毒 71 型与手足口病[J]. 疾病控制杂志, 2008, 12(3): 183-188
- 4 李琳琳,何雅晴,朱俊萍,等. 柯萨奇病毒 A 组 16 型中国分离株(Coxsackievirus A16 SHZH0021)全基因组序列测定及分析[J]. 病毒学报, 2005, 3(21): 217-222
- 5 中华人民共和国卫生部. 肠道病毒(EV71)感染诊疗指南(2008 年版)[S]. 2008
- 6 中华人民共和国卫生部. 2008 年手足口病预防控制指南[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2008, 2(3): 210-213
- 7 Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998[J]. J Virol, 1999, 73(12): 9969-9975
- 8 龙润乡,谢忠平,杨蓉,等. EV71 抗原 BA-ELISA 检测方法的建立及应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 23(4): 1230-1232
- 9 刘正玲,李华,龙润乡,等. Cox A16 抗原检测试剂研究及初步应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(4): 801-805
- 10 严菊英,卢亦愚,徐昌平,等. 肠道病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 法快速检测[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(7): 45-46
- 11 王松,许城,张红梅,等. RT-PCR 检测手足口病病原体 EV71[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2008, 2(4): 30-31
- 12 Chen TC, Chen GW, Hsiung CA, et al. Combining multiplex reverse transcription-PCR and a diagnostic microarray to detect and differentiate enterovirus 71 and coxsackievirus A16[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(6): 2212-2219
- 13 Thao NT, Ngoc NT, Tu PV, et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous identification of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16[J]. J Virol Methods, 2010, 170(1-2): 134-139
- 14 姜广菊,李华,杨婷,等. 科萨奇病毒 A 组 16 型临床分离株的生物学特性分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(5): 607-611
- 15 朱坤,高秀杰,邓中平,等. 肠道病毒 71 型实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立及临床评价[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(5): 505-519
- 16 严菊英,卢亦愚,徐昌平,等. 肠道病毒 EV71 荧光定量 RT-PCR 法快速检测[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(7): 843-844
- 17 雷永良,陈秀英,叶碧峰,等. 实时荧光定量 PCR 在手足口病肠道病毒快速检测中的应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 10(3): 738-739
- 18 王成勇,王建,高远征,等. 手足口病病原体核酸在患者不同样本中的分布[J]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(3): 101-103
- 19 廖英,谢鸿恩. 手足口病病原学检测及临床特点相关性研究[J]. 吉林医学, 2010, 31(24): 4075-4076
- 20 梁英,怀清杰,张炳丽,等. 两种检测方法对 EV71 病毒监测结果的影响研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(7): 1590-1592

(收稿日期:2014-06-17)

(修回日期:2014-07-27)

欢迎订阅 2015 年《医学研究杂志》

《医学研究杂志》每册定价 10 元,全年 120 元(含邮费)。每月 25 日出版,国内外公开发行人。邮发代号:2-590。全国各地邮局均可订阅,也可通过编辑部订阅,编辑部电话:010-52328678。