

• 检验技术与方法 •

两种不同方法检测肠道 71 型病毒的比较

杜 昆,李 琦,刘学政

(湖北省荆州市第一人民医院检验科 434000)

摘 要:**目的** 研究不同方法检测肠道 71 型病毒的灵敏度和特异性。**方法** 采集 135 例临床确诊为手足口病患儿和 44 例临床确诊为非手足口病患儿血清,分别用免疫层析法(ICA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗肠道 71 型病毒 IgM 抗体。**结果** ICA 法检出阳性病例 29 例,ELISA 法检出阳性病例 27 例;ICA 法和 ELISA 法的灵敏度分别为 21.48%和 20.0%,特异性为 100%。**结论** ICA 法和 ELISA 法均具有较高特异性,但其灵敏度较低。

关键词:肠道病毒属; 敏感性 与 特异性; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)02-0215-02

Comparison of two different assays for detection of human enterovirus 71

Du Kun, Li Qi, Liu Xuezheng

(Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Jingzhou, Jingzhou, Hubei 434000, China)

Abstract:**Objective** To investigate the sensitivity and specificity of different assays for detection of human enterovirus 71 (EV71). **Methods** The sera from 179 patients which were diagnosed as hand-foot-and-mouth disease were collected. ICA and ELISA assays were used to detect the serum EV71 IgM antibody. **Results** 29 patients were identified as EV71 by ICA assay, and 27 patients were identified as EV71 by ELISA assay. The sensitivity and specificity of detection of EV71 with ICA and ELISA were 21.48% and 20.0%, 100% and 100%, respectively. **Conclusion** Both ICA and ELISA assays have a high specificity for detecting EV71, while a low sensitivity.

Key words: Enterovirus; sensitivity and specificity; enzyme-linked immunosorbent assay

手足口病(hand-foot and mouth disease, HFMD)是一种常见的病毒感染性疾病,主要以婴幼儿发病为主。临床症状主要表现为发热和手足口部疱疹,少数患儿可出现无菌性脑膜炎、脑炎、心肌炎、肺水肿和呼吸循环衰竭等并发症并导致死亡^[1-3]。手足口病是由多种肠道病毒引起,主要包括肠道病毒 71 型(human enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒 A16 (CA16)。其中, EV71 是引起我国婴幼儿手足口病死亡的主要原因^[4-7]。因此,对 EV71 的检测不但有利于手足口病的早期诊断和早期治疗,而且可以降低该病引起的并发症,具有重要的临床价值。本研究通过免疫层析法(ICA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 179 例临床标本,探讨这两种方法检测 EV71 的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 采集本院儿科 2012 年 3~10 月经临床确诊为手足口病的患儿血液 2 mL,分离血清并立即检测。共 135 例标本,其中,男 75 例,女 60 例;年龄最大 10 岁,最小 5 个月,平均年龄(3.02±2.51)岁。诊断符合卫生部颁发《手足口病诊疗指南(2008 年版)》诊断标准。对照组为本院儿科同期经临床确诊为非手足口病的患儿血清,共 44 例标本,其中,男 25 例,女 19 例;年龄最大 9 岁,最小 6 个月,平均年龄 3.52±2.31 岁。

1.1.2 主要试剂 EV71 ICA 检测试剂盒和 ELISA 检测试剂盒均购自北京万泰生物药业股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 ICA 法检测 EV71 严格按照试剂盒说明书进行操作。结果判断:测试区和对照区内同时出现条带,判为阳性;仅对照区内出现条带,判为阴性;测试区和对照区均无条带,或只

有测试区有条带,均判为无效,需重新检测。

1.2.2 ELISA 法检测 EV71 严格按照试剂盒说明书进行操作。取标准品和待测样品各 50 μL 分别加入反应孔内,然后加入 50 μL 的生物素标记的抗体,轻轻振荡混匀,37℃孵育 1 h,甩去孔内液体,用洗涤液洗涤 4 次,每孔加入 80 μL 的亲链霉素-HRP,轻轻振荡混匀,37℃孵育 30 min。用洗涤液洗涤 4 次,每孔加入底物 A、B 各 50 μL,轻轻振荡混匀,37℃避光孵育 15 min,加入 50 μL 终止液,450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。根据标准曲线换算出待测样品 EV71 IgM 的浓度。

1.2.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计数资料以率表示,进行 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法检测 EV71 的结果 两种方法检测均阳性 21 例,均阴性 143 例;ELISA 阳性,胶体金阴性 7 例;ELISA 阴性,胶体金阳性 8 例。二者比较差异无统计学意义($\chi^2=0.029, P>0.05$)。见表 1。

表 1 两种不同方法检测 EV71 的结果比较(n)

胶体金法	ELISA		合计
	阳性	阴性	
阳性	21	8	29
阴性	7	143	150
合计	28	151	179

2.2 两种方法检测 EV71 的灵敏度和特异性比较 135 例手足口病患儿中,ICA 法检出阳性标本 29 例,检出率为 21.48%; ELISA 法检出阳性标本 27 例,检出率为 20.0%。44 例非手足

口病患者中,ICA 法和 ELISA 法均未检出阳性标本。ICA 法和 ELISA 法的灵敏度分别为 21.48%和20.0%,特异性均为 100%,两种方法的灵敏度和特异性比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 两种不同方法检测 EV71 的灵敏度和特异性比较(%)

项目	ICA 法	ELISA 法
灵敏度	21.48	20.0
特异性	100	100

3 讨 论

手足口病是由 EV71 等病毒引起的一种常见的传染病。EV71 属小 RNA 病毒科肠道病毒属,该病毒的传染性较强^[8]。EV71 主要通过接触传播及飞沫传播,故可在短期内造成较大范围的流行^[9]。该病毒一年四季均可引起手足口病,其中以夏、秋季多见。轻者表现为发热和手足口部疱疹,重者可累及神经、呼吸、循环等系统,甚至引起死亡。目前对于该病尚无有效的治疗措施。所以,早期诊断手足口病对于预防和控制该病具有重要意义。

传统的病毒分离、培养是诊断手足口病的金标准,但该法对实验设备、技术要求较高,且周期长、阳性率低,并不适合临床上对 EV71 的检测,该法主要用于实验室研究。目前,RT-PCR 技术已成为诊断 EV71 感染的一种常用方法,但该法造成的假阳性和假阴性率均较高。近几年发展起来的荧光定量 PCR 法(FQ-PCR)检测 EV71,不仅能大大减少假阳性和假阴性率,而且与常规 RT-PCR 技术相比,无论从敏感性和特异性上都更具有优势^[10-11]。但由于该法需要的仪器昂贵,且对实验室条件要求较高,不适宜于基层单位开展。本研究中比较了 ICA 法和 ELISA 对 EV71 的检测情况。结果表明,ELISA 法检测阳性标本 27 例,ICA 法检测阳性标本 29 例,两种方法的检测结果比较差异无统计学意义($P>0.05$)。此外,进一步研究证实,ICA 法和 ELISA 法的灵敏度分别为 21.48%和 20.0%,特异性均为 100%。二者的灵敏度和特异性比较差异无统计学意义($P>0.05$)。而 ICA 法与 ELISA 法相比,操作更为简单,更加适于基层卫生医疗机构检测 EV71。有文献报道 ELISA 法检测 EV71 的灵敏度可达到 96.2%^[12],明显高于作者的检测结果,这可能与作者的采血时间有关。

(上接第 214 页)

参考文献

[1] Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, et al. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis[J]. Lab Hematol, 2005, 11(1): 83-90.

[2] 王悦,刘汝峰,任颖佳,等.肿瘤专科血液复检规则的初步建立和评价[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(1): 1-3.

[3] 魏峰,潘扬.国际血液分析仪 41 条复检规则的临床应用及实验室复检标准的建立[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(25): 2727-2729.

[4] 王银峰,吕娟.实验室全自动血液分析仪复检规则的建立及应用[J]. 宁夏医科大学学报, 2012, 34(6): 747-750.

[5] 陈桂兰,罗雪林. SYSMEX XT-1800i 血细胞分析仪复检规则的探讨和评估[J]. 分析仪器, 2012, 2(1): 69-71.

[6] 孙燕,鲜玉萍. XS-800i 血细胞分析仪显微镜复检规则的建立与评价[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(2): 207-209.

[7] 朱建未,朱芳. 血液分析仪复检规则的建立和临床应用[J]. 山东医药, 2012, 52(1): 105-106.

综上所述,ICA 法与 ELISA 法虽然均具有较高的特异性,但其灵敏度均较低。对这两种方法检测 EV71 为阴性的患者,如果临床症状与手足口病相符,建议进一步采用 FQ-PCR 进行检测,这样可以避免患者漏检。

参考文献

[1] Lum LC, Wong KT, Lain SK, et al. Neurogenic pulmonary edema and enterovirus 71 encephalomyelitis [J]. Lancet, 2008, 352(9137): 1391.

[2] 崔爱利,许文波,李秀珠. 肠道病毒 71 型的 RT-PCR 诊断及基因特征[J]. 病毒学报, 2004, 20(2): 16-165.

[3] Prager P, Nolan M, Andrews IP, et al. Neurogenic pulmonary edema in enterovirus 71 encephalitis is not uniformly fatal but causes severe morbidity in survivors[J]. Pediatr Crit Care Med, 2003, 4(3): 377-381.

[4] 张育才,李兴旺,朱晓东,等. 儿童危重肠道病毒 71 型脑炎及神经源性肺水肿的临床特征与救治叨[J]. 中华急诊医学杂志, 2008, 17(12): 1250-1254.

[5] 茹维平,康错,尤爱同,等. EV71 感染重症病例的临床表现及流行病学特征分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2010, 24(6): 448-450.

[6] 徐之良. 手足口病研究进展[J]. 临床内科杂志, 2009, 26(8): 509-510.

[7] 谢欣城,张永乐,张思泉,等. 肠道病毒 71 型核酸检测在诊断手足口病中的意义[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2010, 37(5): 303-305.

[8] 杨秀惠,何家鑫,严延生,等. 一起手足口病爆发的病原学诊断与分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(4): 323-326.

[9] 邓莉,张艳玲. 手足口病的流行与防治[J]. 北京医学, 2008, 30(6): 354-355.

[10] 陈宗波,董永绥,方峰,等. 应用逆转录聚合酶链反应检测肠道病毒感染[J]. 中华儿科杂志, 1997, 35(11): 597-600.

[11] 徐大鹏,刘建荣,宋淑娥,等. 实时荧光 PCR 技术在手足口病病毒核酸检测中的应用[J]. 首都公共卫, 2010, 4(6): 243-245.

[12] 夏明. ELISA 方法检测肠道病毒 71 型抗体效果分析[J]. 中国现代医生, 2012, 50(19): 132-133.

(收稿日期:2013-09-16)

[8] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社, 2006:123-124, 133-135.

[9] 中华检验医学杂志编辑委员会. 全国血液学复检专家小组工作会议纪要暨血细胞自动计数复检规则释义[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 380-382.

[10] 孙克. BC6800 血细胞分析仪性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(14): 1579-1580.

[11] Pierre RV. Peripheral blood film review, the demise of the eye-count leukocyte differential[J]. Clin Labmed, 2002, 22(3): 279-296.

[12] 孙苒,王厚芳,于俊峰,等. 血细胞显微镜复检规则的制定及临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(2): 155-157.

[13] 严能兵,李俊枫,陈斌,等. 血液分析仪分析后复检标准的建立和临床应用[J]. 新乡医学院学报, 2007, 24(4): 586-587.

[14] 丛玉隆,金大鸣,王鸿利,等. 中国人群成人静脉血细胞分析参考范围调查[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(10): 1201-1205.

(收稿日期:2013-09-15)