· 论 著 ·

ELISA 检测血清 EV71-IgM 诊断手足口病价值的 Meta 分析*

郑华珍[1,2],刘新光[1,2,3],赵 炜[1,2△]

(1. 广东医学院衰老研究所,广东东莞 523808;2. 广东省医学分子诊断重点实验室,广东东莞 523808;3. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所,广东东莞 523808)

摘 要:目的 系统评价酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清肠道病毒 71 型 IgM 抗体(EV71-IgM)诊断手足口病(HFMD)的价值。**方法** 检索 PubMed、Embase、Web of Science、Cochrane、维普、万方、中国知网以及中国医学生物文献数据库中有关用 ELISA 检测 EV71-IgM 诊断 HFMD 的文献,检索时限从建库至 2015 年 1 月。对符合纳入标准的文献进行资料提取、方法学质量评价,采用 Meta-disc 1.4 软件进行 Meta 分析。**结果** 共纳入文献 8 篇,合计 4 126 例,其中 HFMD 患者 1 484 例,非 HFMD 患者 2 642 例。Meta 分析结果显示,各研究间存在非阈值效应引起的异质性,合并灵敏度、特异度和诊断比值比分别为 84%、90%、28.77;拟合综合受试者特征曲线(SROC)下面积为 0.906 8。**结论** ELISA 检测血清 EV71-IgM 诊断 HFMD 有较高的诊断价值,但因纳入研究存在一些方法学缺陷,该结论尚需进一步开展高质量的诊断性试验来进行验证。

关键词:肠道病毒 71 型; 手足口病; 酶联免疫吸附试验; Meta 分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.04.005 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)04-0444-03

Value of EV71-IgM tested by enzyme-linked immunosorbent assay in diagnosis of hand, foot and mouth disease: a meta-analysis*

Zheng Huazhen[1,2], *Liu Xinguang*[1,2,3], *Zhao Wei*[1,2△]

(1. *Institute of Aging Research, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong* 523808, *China*; 2. *Key Laboratory for Medical Molecular Diagnostics of Guangdong Province, Dongguan, Guangdong* 523808, *China*; 3. *Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong* 523808, *China*)

Abstract: Objective To systematically review the diagnostic value of EV71-IgM tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in patients with Hand, Foot and Mouth Disease(HFMD). **Methods** Such databases as PubMed, Embase, Web of Science, Cochrane, VIP, Wan Fang Data, CNKI, and CBM were searched for studies about the diagnostic value of EV71-IgM tested by ELISA in patients with HFMD from inception to January, 2015. We screened literature according to inclusion criteria, extracted data, and assessed methodological quality of included studies. Meta-analysis was conducted using Meta-Disc 1.4 software. **Results** A total of eight studies were included, involving a total of 4 126 clinical samples, 1 484 of which with EV71 and 2 642 of which with non-EV71. The results of meta-analysis showed that heterogeneity was found in these studies, excepting for threshold effect and the pooled sensitivity, specificity, diagnostic odds ratio(DOR) and the area under the SROC curve was 84%, 90%, 28.77 and 0.906 8, respectively. **Conclusion** EV71-IgM tested by ELISA has certain value in the diagnosis of patients with HFMD. But due to some poor methodological qualities of the included studies, the above conclusion should be verified by conducting high quality diagnostic tests.

Key words: Enterovirus 71; hand, foot and mouth disease; enzyme-linked immunosorbent assay; Meta analysis

肠道病毒 71 型(EV71)是人类肠道病毒的一种,为单股正链 RNA 病毒,是引起手足口病(HFMD)的主要病原体之一。近年来,EV71 流行日益严重,且相对于柯萨奇病毒感染患者,EV71 感染患者更容易出现脑膜炎、脑炎、脑脊髓炎及肺水肿等并发症[1]。细胞培养分离病毒是 EV71 感染诊断的"金标准",该方法特异度高,但灵敏度低,鉴定时间长,不适合临床大规模检测;反转录聚合酶链反应(RT-PCR)和荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)是 EV71 临床实验室诊断的主要方法,其特异度和灵敏度高,但成本较高,样品处理较复杂;免疫学检查操作简单,不需要特殊仪器,被广泛应用于初筛试验,但准确性较低[2]。ELISA 检测血清 EV71-IgM 是辅助诊断 HFMD 的常见免疫学方法,为了进一步系统地评价该方法诊断 HFMD 的准确性,本研究全面收集相关文献进行 Meta 分析,以期为该方法在临床诊断应用中提供更可靠的证据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 计算机检索 PubMed、Embase、Web of Science、Cochrane、维普数据库、万方数据库、中国知网以及中国医学生物文献数据库,全面收集有关 ELISA 检测 EV71 感染的诊断性试验。检索时限均为建库至 2015 年 1 月。英文检索词包括"enterovirus 71","enterovirus type 71","EV71","hand, foot and mouth disease","HFMD","enzyme-linked immunosorbent assay","ELISA"。中文检索词包括"肠道病毒 71 型"、"手足口病"、"酶联免疫吸附试验"、"ELISA"。

1.2 纳入标准 (1)研究类型为公开发表的关于 EV71 感染

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170327);东莞市医疗卫生单位科技计划一般项目(2012108102022);广东医学院建博科技创新团队资助项目(STIF201102)。 作者简介:郑华珍,女,在读研究生,主要从事临床检验诊断学研究。 △ 通讯作者,E-mail:davidzhao1999@foxmail.com。

准确性的诊断性试验研究;(2)诊断金标准为细胞培养分离病毒或 FQ-PCR;(3)检测方法是 ELISA 法;(4)评价指标为血清中 EV71-IgM 水平;(5)各研究中可以提取到完整的四格表数值。

1.3　排除标准　(1)非 EV71 感染研究;(2)无法获取四格表信息;(3)研究例数少于 20 例;(4)非临床诊断研究试验、会议摘要及综述等文献;(5)同一作者重复发表的文献。

1.4　文献筛选、数据提取和质量评价　由两位研究者按照上述纳入和排除标准独立筛选文献,提取资料。提取资料内容包括第一作者、发表时间、试剂来源、样品总数、真阳性值、假阳性值、真阴性值、假阴性值等。用诊断试验质量评价工具 QUADAS[3] 对筛选出来的文献进行质量评价。评价内容是每项条目按"是"、"否"、"不清楚"进行评价,评价为"是"得 1 分,"否"为 0 分,"不清楚"得 0.5 分,进而算出每篇文献得分,如有分歧则通过第三方介入协商解决。

1.5　统计学处理　采用 Meta Disc 1.4 软件进行数据分析。先合并分析各研究间是否存在阈值效应引起的异质性。若有阈值效应,数据合并的最佳方式是拟合综合受试者特征曲线(SROC)并计算曲线下面积(AUC)或应用 Q^* 指数(Q^*)。若无阈值效应,则进一步判断是否存在非阈值效应所引起的异质性,并采用固定(无异质性时)或随机效应模型(有异质性时)计算其合并灵敏度(SEN)、特异度(SPE)、阳性似然比(PLR)、阴性似然比(NLR)和诊断比值比(DOR),绘制 SROC 曲线,并计算 AUC 和 Q^*。

2　结　　果

2.1　文献检索结果　初筛选出相关文献共 365 篇,其中英文文献 118 篇、中文文献 247 篇,排除综述、重复发表、不符合纳入标准文献后,最终纳入 8 篇文献,英文文献 1 篇,中文文献 7 篇。

2.2　纳入研究的基本特征与方法质量评价　8 项研究发表于 2004～2014 年,共 4 126 例,各项研究的基本特征见表 1。8 项研究均未提及检测结果的观察是否采用盲法,亦未报告难以解释的结果,纳入研究的详细 QUADAS 质量评价结果见表 2(见《国际检验医学杂志》网站主页"论文附件")。

表 1　纳入研究的基本特征

纳入研究	检测试剂	金标准	样品量(n)	真阳性(n)	假阳性(n)	假阴性(n)	真阴性(n)	SEN(%)	SPE(%)
杨兴林 2014[4]	北京贝尔	FQ-PCR	1 379	32	50	47	1 250	40.5	96.1
王瑜 2014[5]	北京贝尔	FQ-PCR	1 539	876	77	102	484	89.6	86.3
慕毅敏 2014[6]	北京万泰	FQ-PCR	159	18	0	35	106	34.0	100.0
白永生 2014[7]	北京贝尔	FQ-PCR	118	21	9	1	87	95.5	90.6
李虹泽 2012[8]	北京万泰	FQ-PCR	551	79	119	24	329	76.7	73.4
杜阳光 2011[9]	北京万泰	FQ-PCR	114	84	15	10	5	89.4	25.0
李金明 2011[10]	深圳博卡	FQ-PCR	30	13	3	6	8	68.4	72.7
Wang 2004[11]	Jackson,USA	病毒分离	236	129	3	7	97	94.9	97.0

2.3　异质性检验

2.3.1　阈值效应　本研究通过 SROC 曲线平面图检验阈值效应,结果显示不呈"肩臂状"分布,提示不存在阈值效应。进一步计算灵敏度对数与(1－特异度)对数的 Spearman 相关系数为 0.143,$P=0.736$,亦表明各研究间不存在阈值效应。

2.3.2　非阈值效应　本研究通过 DOR 探讨非阈值效应引起的异质性,DOR 的 Cochran-Q 检验结果为 $I^2=91.3\%$,Cochran-$Q=80.34$,$P=0.000\ 0$,表明存在非阈值效应引起的异质性,故 Meta 分析模型选用随机效应模型。

2.4　Meta 分析结果

2.4.1　合并统计量　采用 Meta Disc 1.4 软件随机效应模型 Meta 分析结果显示 $SEN_{合}=0.84[95\%CI(0.82\sim0.86)]$;$SPE_{合}=0.90[95\%CI(0.88\sim0.91)]$;$PLR_{合}=6.14[95\%CI(2.93\sim12.87)]$;$NLR_{合}=0.25[95\%CI(0.12\sim0.53)]$;$DOR_{合}=28.77[95\%CI(10.91\sim75.84)]$。

2.4.2　SROC 曲线分析　用 Meta Disc 1.4 软件绘制 SROC 曲线,结果显示:$AUC^{SROC}=0.906\ 8(SE=0.042\ 6)$,$Q^*=0.838\ 6(SE=0.046\ 6)$。

2.4.3　异质性来源分析　由于存在非阈值效应引起的异质性,现按 ELISA 试剂盒生产厂家和研究样品量进行亚组分析,从而分析异质性的可能来源。试剂盒主要来源于北京贝尔生物制品有限公司和北京万泰生物药业股份有限公司,且使用这两家试剂盒的研究各有 3 项。另外,对研究样品量进行分析,8 项研究中有 4 项样品量小于或等于 200 例,4 项样品量大于 200 例。采用随机效应模型进行亚组分析,结果见表 3。

表 3　生产厂家与样品量的亚组分析

项目		SEN	SPE	PLR	NLR	DOR	AUC^{SROC}	Q^*
试剂厂家	北京贝尔	0.86	0.93	8.48	0.17	42.05	0.939 4	0.876 7
	北京万泰	0.72	0.77	2.64	0.45	8.77	0.824 8	0.757 9
样品量	≤200 例	0.72	0.88	5.27	0.37	20.38	0.883 4	0.811 4
	＞200 例	0.85	0.89	5.76	0.29	20.57	0.894 4	0.825 3

3 讨　论

EV71 感染是全球性的重大公共卫生问题，不同地区 EV71 的流行差异很大，我国是 EV71 感染最为严重的地区之一[12]。因此，判断 EV71 感染对 HFMD 的早期诊断和防治具有重要意义。血清 EV71-IgM 是 EV71 感染的早期诊断指标之一，在感染后第 1～2 天即可出现，并且随着病程的延长阳性检出率不断增加[13-14]。商品化试剂盒一般采用 ELISA 捕获法对 EV71-IgM 进行检测。

本文全面检索了有关使用 ELISA 检测 EV71-IgM 诊断 HFMD 的研究，最终纳入 8 项研究。按照 QUADAS 对各文献进行质量评估，结果显示纳入文献为中高质量，结果较可信。通过 Meta Disc 1.4 软件描绘 SROC 曲线平面图和计算 Spearman 相关系数可知纳入研究间不存在阈值效应。但对其他来源的异质性进行检验，发现存在异质性。因此，采用随机效应模型合并效应量以减少异质性影响。

本研究结果显示采用 ELISA 检测血清 EV71-IgM 诊断 HFMD 的合并灵敏度和特异度都较高，为 84% 和 90%。表明采用 ELISA 检测 EV71-IgM 有 84% 的把握度将 HFMD 患者检测出来，漏诊率为 16%。这除了试剂盒本身方法学的不足，操作技术等原因导致假阴性外，还有可能因为存在其他肠道病毒的多重感染出现交叉反应，而降低 EV71-IgM 水平[15]。所以，对于临床症状明显而检测结果为阴性者，应联合检测其他相关项目。另外，该试验能将 90% 的非 EV71 感染患者分辨出来，10% 的非 EV71 感染患者可能误诊为患病。流行病学研究认为，阳性似然比大于 10 有肯定诊断的价值，阴性似然比小于 0.1 有否定价值。本研究中合并阳性似然比为 6.14，表明检测 EV71-IgM 阳性则患 HFMD 的可能性是不患 HFMD 的 6.14 倍；合并阴性似然比为 0.25，提示 EV71-IgM 阴性疑似病例不能排除感染 EV71 的可能。合并 DOR 为 28.77，说明用 ELISA 检测 EV71-IgM 诊断 HFMD 的效果较好。

SROC 曲线不仅能反映诊断试验的特异度和灵敏度，而且还能对某一诊断试性验进行全面的评价。AUC 是用于评判诊断性试验的准确性，取值在 0.9 以上时表示诊断准确性较高[16]。本研究绘制了 SROC 曲线，并得出其 AUC 为 0.906 8，表明用 ELISA 检测 EV71-IgM 诊断 HFMD 的准确性较好。

本研究对使用不同厂家试剂盒的研究进行 Meta 分析，发现北京贝尔试剂盒的检测灵敏度和特异度均高于北京万泰试剂盒。提示两试剂盒可能存在方法学异质性，这可能是因为包被的抗体来源、包被工艺、标记酶等不同。另外，发现样品量大于 200 例研究的检测合并灵敏度高于样品量小于或等于 200 例的，对特异度则无影响。这可能是因为不同样本量下阳性检出率明显不一致，样本量越大，其阳性检出率越高，故诊断效能高。

此外，还有一些因素可能导致本研究的异质性。如同样使用北京贝尔公司的试剂盒，杨兴林等[4]和王瑜[5]的研究中检测灵敏度和特异度分别为 40%、96% 和 89%、86%，说明不同实验室间的操作技术、实验仪器等可能存在差异。各研究中纳入的研究对象间的差异也是导致异质性的一个重要原因。本研究纳入文献[9]同时选择临床确诊患者和健康人为研究对象，文献[4,10-11]以临床疑似患者为研究对象，而文献[5-8]是以临床确诊患者为研究对象。另外，本 Meta 分析中的各项研究检测时未说明是否采用盲法，因此会增加检测偏倚的可能性。

综上所述，ELISA 检测血清 EV71-IgM 诊断手足口病有较高的诊断价值，可用于手足口病的辅助诊断。但由于纳入研究存在一些方法学缺陷，本结论仍需要进一步开展高质量的诊断性试验来进行验证。

参考文献

[1] Ho M. Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks[J]. Microbiol Immunol Infect, 2000, 33(4): 205-216.

[2] 田燕，陆志刚，梁洁. 手足口病检测方法的研究进展[J]. 现代预防医学，2011，38(15)：3058-3059.

[3] Whiting PF, Weswood ME, Rutjes AW, et al. QUADAS 评价：一种用于诊断性研究的质量评价工具（修订版）[J]. 中国循证医学杂志，2007，7(7)：531-536.

[4] 杨兴林，熊金凤，李丽，等. 荧光聚合酶链式反应与酶联免疫吸附法筛查肠道病毒 71 型病原感染的比较研究[J]. 华西医学，2014，29(7)：1309-1312.

[5] 王瑜. 联合检测手足口病肠道病毒 71 型 RNA 及 IgM 结果分析[J]. 医药论坛杂志，2014，35(9)：31-32.

[6] 慕毅敏，代岩石，孙伟，等. 肠道病毒 71 型手足口病病毒 3 种检测技术比较研究[J]. 中国卫生工程学，2014，13(3)：232-234.

[7] 白永生，郭林池，杨安宁，等. 病毒性脑炎患者脑脊液肠道病毒和 EV71 检测与分析[J]. 宁夏医学杂志，2014，36(9)：784-787.

[8] 李虹泽，项杰. 武汉地区 2011 年 553 例手足口病患儿 EV71-IgM ELISA 法和 EV71 RNA RT-PCR 法检测结果分析[J]. 临床肺科杂志，2012，17(9)：1726-1727.

[9] 杜阳光，杨晋川，晏嘉璐，等. 血清中 EV71 型 IgM 抗体检测对手足口病诊断的意义[J]. 中华全科医学，2011，9(10)：1574-1575.

[10] 李金明，熊德琴，齐晓彤，等. 实时荧光定量 PCR 在手足口病病原体检测中的应用[J]. 实验与检验医学，2011，29(2)：129-130.

[11] Wang SY, Lin TL, Chen HY, et al. Early and rapid detection of enterovirus 71 infection by an IgM-capture ELISA[J]. J Virol Methods, 2004, 119(1): 37-43.

[12] Wang Y, Feng Z, Yang Y, et al. Hand, foot, and mouth disease in China: patterns of spread and transmissibility[J]. Epidemiology, 2011, 22(6): 781-792.

[13] Xu F, Yan Q, Wang H, et al. Performance of detecting IgM antibodies against enterovirus 71 for early diagnosis[J]. PLoS One, 2010, 5(6): 11388.

[14] Tsao KC, Chan EC, Chang LY, et al. Responses of IgM for enterovirus 71 infection[J]. J Med Virol, 2002, 68(4): 574-580.

[15] Lin Y, Wen K, Pan Y, et al. Cross-reactivity of anti-EV71 IgM and neutralizing antibody in series sera of patients infected with Enterovirus 71 and Coxsackievirus A 16[J]. J Immunoass Immunoch, 2011, 32(3): 233-243.

[16] Mitchell MD. Validation of the summary ROC for diagnostic test meta-analysis: a monte carlo simulation[J]. Academic radiology, 2003, 10(1): 25-31.

（收稿日期：2015-10-22）