

· 论 著 ·

柯萨奇病毒 A 组 5 型实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立与评价^{*}

罗娟,田维霞,李永文,宋光敏,姚淼,陈佳丽,胡雨萌,刘娇阳,罗南宁,艾远航,吴凯峰[△]
遵义医科大学第三附属医院(遵义市第一人民医院)检验科/中心实验室,贵州遵义 563000

摘要:目的 建立柯萨奇病毒 A 组 5 型(CVA5)特异的一步法实时荧光反转录聚合酶链反应(RT-PCR)核酸检测方法。方法 以流行于遵义地区的 CVA5 病毒株和 NCBI 基因库中随机下载的 CVA5 VP1 基因序列为参考序列,分析这些序列的保守区域,在其保守区设计特异性的引物与 Taqman 探针,建立检测 CVA5 的一步法实时荧光 RT-PCR。通过构建含 CVA5 VP1 保守区域的重组质粒,绘制标准曲线,并对检测方法的灵敏度、特异性、重复性及临床样本检出限进行评价。利用该方法对遵义地区 273 份未明确分型的肠道病毒阳性样本进行检测,将检出的部分 CVA5 阳性产物进行测序。结果 成功建立一种基于实时荧光 RT-PCR 的 CVA5 检测方法,该方法在 $10^4 \sim 10^9$ copy/mL 范围内具有良好的线性关系($R^2 > 0.999$),平均扩增效率为 102.26%。灵敏度高,对临床样本的检出限为 10^3 copy/mL。该方法的特异性强,与柯萨奇病毒 A 组 2 型(CVA2)、柯萨奇病毒 A 组 4 型(CVA4)、柯萨奇病毒 A 组 6 型(CVA6)、丙型肝炎病毒、呼吸道合胞病毒和鼻病毒等均不发生交叉反应。重复性实验的变异系数低于 1.5%。273 份未明确分型肠道病毒阳性样本中共检出 25 份 CVA5,占未明确分型阳性样本的 9.16%。结论 该研究建立的一步法 CVA5 RT-PCR 检测方法灵敏度高、特异性强、重复性好,可用于 CVA5 的检测。

关键词:柯萨奇病毒 A5; 实时荧光反转录聚合酶链反应; 肠道病毒; 手足口病; 疱疹性咽峡炎

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.07.007

中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2023)07-0803-05

文献标志码:A

Establishment and evaluation of a real-time fluorescent RT-PCR

method for detection of Coxsackievirus A5 RNA^{*}

LUO Juan, TIAN Weixia, LI Yongwen, SONG Guangmin, YAO Miao, CHEN Jiali,
HU Yumeng, LIU Jiaoyang, LUO Nanning, AI Yuanhang, WU Kaifeng[△]

Department of Clinical Laboratory / Scientific Research Laboratory, Zunyi Medical University

Third Affiliated Hospital (the First People's Hospital of Zunyi), Zunyi, Guizhou 563000, China

Abstract: Objective To establish a specific one-step real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method for the detection of Coxsackieviruses A5 (CVA5) RNA. **Methods** The CVA5 virus strain prevalent in Zunyi and the CVA5 VP1 gene sequence randomly downloaded from the NCBI gene library were taken as the reference sequence, the conserved regions of these sequences were analyzed, and specific primers and Taqman probes were designed in the conserved regions to establish a one-step real-time fluorescent RT-PCR for detecting CVA5. By constructing the recombinant plasmid containing the conserved region of CVA5 VP1, the standard curve was drawn, and the sensitivity, specificity, repeatability and detection limit of clinical samples were evaluated. Then 273 enterovirus positive samples without clear typing in Zunyi were detected by this method, and the detected CVA5 positive products were sequenced. **Results** A new method for CVA5 detection based on real-time fluorescence RT-PCR was successfully established. The method had good linearity in the range of $10^4 \sim 10^9$ copies/mL ($R^2 > 0.999$), and the average amplification efficiency of the method was 102.26%. The sensitivity was high, the detection limit was 10^3 copies/mL. This method had strong specificity and did not cross react with CVA2, CVA4, CVA6, hepatitis C virus, respiratory syncytial virus and rhinovirus. The coefficient of variation of repeatability experiments was lower than 1.5%. A total of 25 cases of CVA5 were detected in 273 positive samples of without clear typing, accounting for 9.16% of the

* 基金项目:贵州省科学技术厅省市科技合作项目(省市科合[2015]38 号);贵州省教育厅创新群体研究项目(黔教合 KY 字[2021]019 项目)。

作者简介:罗娟,女,硕士研究生在读,主要从事分子病毒学研究。 △ 通信作者,E-mail:kiphoonwu@126.com。

positive samples of without clear typing. **Conclusion** The one-step CVA5 real-time fluorescence RT-PCR method established in this study has high sensitivity, specificity, strong repeatability and could be used for the detection of CVA5.

Key words: coxsackievirus A5; real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction; enterovirus; hand-foot-and-mouth disease; herpangina

手足口病(HFMD)和疱疹性咽峡炎(HA)均是由肠道病毒感染引起的儿童急性传染性疾病,我国大部分地区均有这两种疾病流行的报道。HA 主要表现为咽峡与软腭处的疱疹及溃疡,伴有发热、喉痛与食欲减退,预后较好^[1]。HFMD 则以口腔颊、舌黏膜处溃疡,手部、足部、膝部与臀部的特征性水疱为主要临床表现,少数患者可出现严重的中枢神经系统症状^[2]。自 2008 年首次报道以来,我国 30 多个省份出现了数百万例 HFMD 病例,严重危害我国婴幼儿健康和生命安全^[3]。肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(CVA16)曾是导致 HFMD 和 HA 的两种最主要病原体,其中 EV71 还与重症 HFMD 有着重要联系^[4-7]。但近年来的研究发现,EV71 和 CVA16 肠道病毒占比明显下降,非 EV71/CVA16 肠道病毒,包括柯萨奇病毒 A 组 6 型(CVA6)、柯萨奇病毒 A 组 10 型(CVA10)和柯萨奇病毒 A 组 5 型(CVA5)等成为 HFMD 和 HA 的重要病原体^[8-9]。更重要的是,笔者之前的研究发现 CVA5 感染与重症 HFMD 相关^[10]。目前我国临幊上常规检测的肠道病毒主要是 EV71、CVA16 和 CVA6,并未重视 CVA5 肠道病毒的检测,CVA5 肠道病毒的检测主要是通过传统的病毒分离方法进行鉴定,鉴于目前尚无成熟的单独的 CVA5 核酸检测方法,而 CVA5 又与重症 HFMD 有关,故本研究拟建立一种快速可靠的 CVA5 实时荧光反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测方法,为 CVA5 流行病学调查和实验室快速诊断提供有效

的分子检测手段。

1 材料与方法

1.1 材料来源 本研究所用病毒株(包括 CVA5、CVA2、CVA6、CVA4、丙型肝炎病毒、呼吸道合胞病毒和鼻病毒)均为本实验室分离,−80 ℃保存。273 份未明确分型的肠道病毒阳性咽拭子标本采集自遵义医科大学第三附属医院。

1.2 仪器与试剂 病毒核酸提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,反转录及 PCR 扩增试剂、核酸相对分子质量标准品 DL2000 DNA marker 均购自日本 TaKaRa 公司,肠道病毒 EV71/CVA16/EV 核酸检测试剂盒购自中山大学达安基因有限公司。实时荧光定量 PCR 仪(CFX96 实时荧光定量 PCR 仪)、凝胶成像仪均购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 引物和探针的设计 从 NCBI GenBank 数据库中下载 CVA5(MH 111030、MK 306840)的 VP1 序列,利用 MEGA7.0 软件将其与流行于遵义地区的 CVA5 序列进行同源性分析,确定以上病毒基因组的保守区域。使用 Geneious Prime 软件在其保守区设计高度特异性的引物与 Taqman 探针,引物及探针序列见表 1,探针 5'端标记的荧光报告基团是 VIC,3'端标记的荧光淬灭基团是 BHQ1,引物的扩增产物长度为 122 bp。引物及探针序列均通过 Primer BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)验证。以上引物及探针委托六合华大基因科技有限公司合成。

表 1 RT-PCR 的引物和探针序列

名称	位置*	序列(5'-3')
CVA5-正向引物	2589-2610	CACCGATGAGAGCATGATTGAA
CVA5-反向引物	2686-2710	CAGAGTCCTCRATTATCAAGATYCC
CAV5-探针	2622-2641	[VIC]-GGTYARCGGCATGGGGTTA-[BHQ1]

注: * 根据 GenBank 中 MH 111030 的基因组定位。

1.3.2 标准品的构建 委托六合华大基因有限公司合成 CVA5 的 VP1 保守序列并克隆到 pMV-AmpR 载体构建阳性质粒标准品,并对构建好的质粒标准品鉴定后提取质粒 DNA,测量质粒 DNA 的浓度后,根据公式计算成拷贝数:拷贝数(copy/mL)=6.02×10²³copy/mol×浓度(g/mL)/平均分子质量(g/mol),平均分子量(g/mol):dsDNA=碱基数×

660 道尔顿/碱基,10 倍梯度稀释后,−20 ℃保存备用。

1.3.3 RT-PCR 的建立 采用北京天根生化科技有限公司公司的 TIANamp RNA Kit for Virus Detection 试剂盒按照试剂盒说明书提取病毒核酸后取 5 μL 作为模板用于检测。反应在实时荧光定量 PCR 仪上进行,反应总体积为 25 μL,反应体系为:RT-

PCR 反应缓冲液(含 PCR 反应缓冲液、氯化镁和三磷酸脱氧核糖核苷酸混合物)12.5 μL, 酶混合液(含 Taq DNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂和 MMLV 反转录酶)1 μL, 10 μmol/L 引物探针混合液共 3 μL(包含特异性引物和相应的荧光探针各 1 μL), DEPC 水补足 25 μL。反应条件为: 反转录 42 °C 15 min; 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 15 s, 退火、延伸 55 °C 45 s, 共进行 40 个循环。在每个循环退火延伸结束时检测荧光信号, 荧光模式设为 VIC/BHQ1 双标记模式。

1.3.4 灵敏度评价 取 $10^3 \sim 10^9$ copy/mL 质粒标准品进行 RT-PCR 检测, 并设阴性对照, 来确定检测的灵敏度。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。将本研究设计的引物和探针通过 Primer BLST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 获得该引物能扩增出的 CVA5 病毒株数量, 将其与 NCBI 数据库中的所有 CVA5 序列进行比较, 计算出本研究设计的引物对数据库中 CVA5 病毒株的覆盖率。

1.3.5 标准曲线的建立 将 $10^4 \sim 10^8$ copy/mL 共计 5 个浓度的阳性标准品, 按上述反应体系进行 RT-PCR 检测, 同时设阴性对照组, 以质粒拷贝数的对数值为 X 轴, 循环数为 Y 轴, 根据反应体系中质粒拷贝数的对数和循环阈值 Cq 绘制标准曲线。

1.3.6 重复性试验 为了评估该方法的重复性、稳定性, 对不同浓度($10^4 \sim 10^7$ copy/mL)的质粒标准品进行 3 次独立重复检测, 依据检测结果得到 Cq 平均值(\bar{x})、标准差(s)和变异系数(CV), 通过 CV 评估试验的稳定性。

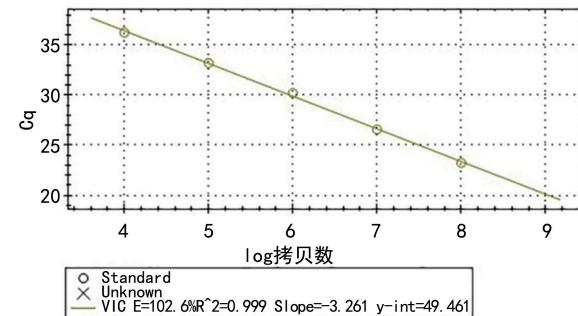
1.3.7 特异性检测 为验证该方法的特异性, 采用北京天根生化科技有限公司公司的 TIANamp RNA Kit for Virus Detection 试剂盒提取 CVA5、CVA2、CVA4、CVA6、丙型肝炎病毒、呼吸道合胞病毒及鼻病毒的核酸, 利用建好的 CVA5 一步法实时荧光 RT-PCR 对上述病毒核酸进行检测, 并设置阴性对照和阳性质粒对照, 以评价该检测方法的特异性。

1.3.8 检测限 将肠病毒阳性、CVA5 阴性的咽拭子样本提取核酸后分别与 500 copy/mL、 $10^3 \sim 10^9$ copy/mL 质粒标准品混合构建模拟临床样本, 用于初步评价本方法对临床样本的检出限。

1.3.9 临床样本检测 利用本研究建立的 RT-PCR 对遵义医科大学第三附属医院的 273 份未明确分型的肠道病毒阳性标本进行检测, 根据扩增曲线判断结果(CT 值 ≤ 35 且曲线呈“S”型时, 判为 CVA5 阳性; 未出现 CT 值、CT 值 > 40 或为 0 时, 判为 CVA5 阴性; $35 < CT \leq 40$ 时, 取更多量的标本富集病毒后重新检测, 第 2 次检测 CT 值 ≤ 38 即判为阳性, 否则判为阴性)。再随机抽取 10 份 RT-PCR 阳性产物进行测序, 以验证结果的真实性。

2 结 果

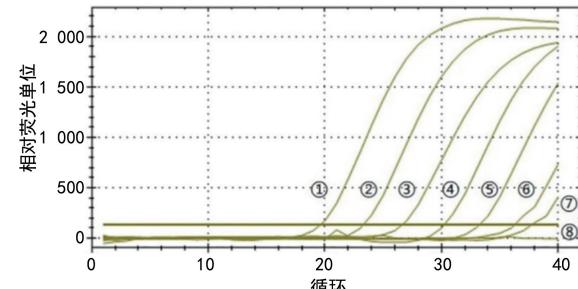
2.1 标准曲线的建立 通过公式计算出质粒原液的拷贝数为 1×10^{13} copy/mL, 将质粒原液进行 10 倍梯度稀释后取 $10^4 \sim 10^8$ copy/mL 的质粒标准品进行反应后得到的标准曲线见图 1, 标准品在 $10^4 \sim 10^8$ copy/mL 范围之间具有良好的线性关系(相关系数 $R^2 = 0.999$, 扩增效率 = 102.6%), 标准曲线方程为: $Y = -3.261X + 49.461$ 。



注: 4~9 分别代表 $10^4 \sim 10^8$ copy/mL 的质粒标准品。

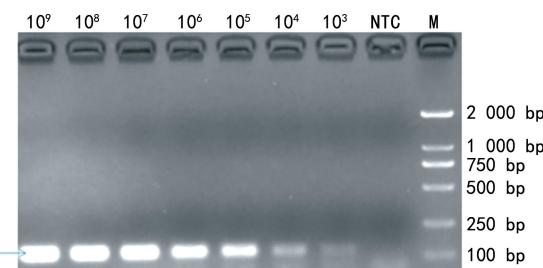
图 1 RT-PCR 方法的标准曲线

2.2 灵敏度检测 经过检测, 质粒标准品 $10^3 \sim 10^9$ copy/mL 均出现良好的扩增曲线, 而阴性对照无扩增曲线, 确定该方法的检测灵敏度为 10^3 copy/mL, 见图 2。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证, 见图 3。与 NCBI 数据库中的 CVA5 序列比较, 本研究设计的引物对 NCBI 中 CVA5 的覆盖率达到 64% (155/242)。



注: ①~⑧依次为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 copy/mL 质粒标准品和阴性对照扩增曲线。

图 2 不同稀释度标准品的扩增曲线



注: $10^3 \sim 10^9$ 依次为 $10^3 \sim 10^9$ copy/mL 质粒标准品扩增产物; NTC 为阴性对照; M 为 2000 bp DNA Marker。

图 3 不同稀释度标准品扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

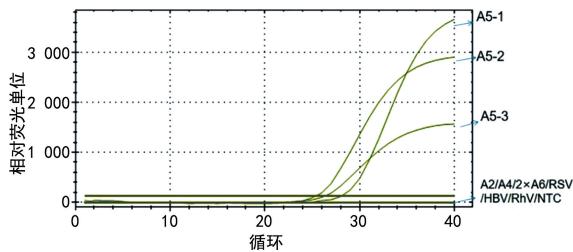
2.3 重复性试验 利用 IBM SPSS 19.0 软件对 4 个

浓度标准品($10^4 \sim 10^7$ copy/mL)的 3 次重复性实验结果进行统计分析,见表 2,3 次重复试验的 C_q 值的 s 在 $0.19 \sim 0.44$, CV 均低于 1.5%。

2.4 特异性检测 应用本方法对 CVA5、CVA2、CVA4、CVA6、丙型肝炎病毒、呼吸道合胞病毒和鼻病毒进行检测,结果显示,只有 CVA5 阳性样本及 CVA5 阳性质粒出现扩增曲线,其他病毒及阴性对照均无扩增曲线,见图 4,表明本方法具有良好的特异性。

表 2 RT-PCR 检测 CVA5 的重复性试验

项目	质粒标准品 (copy/mL)	扩增结果(C_q 值)			\bar{x} (C_q 值)	s	CV
		1	2	3			
CVA5	1×10^7	26.38	26.77	26.10	26.42	0.27	1.04
	1×10^6	29.82	30.29	30.04	30.05	0.19	0.63
	1×10^5	33.04	34.00	33.10	33.38	0.44	1.32
	1×10^4	36.64	37.22	36.24	36.70	0.40	1.10



注:A5-1 为 CVA5 阳性质粒;A5-2、A5-3 为 CVA5 阳性样本;A2 为 CVA2;A4 为 CVA4;A6 为 CVA6;RSA 为呼吸道合包病毒;HBV 为乙型肝炎病毒;RhV 为鼻病毒;NTC 为阴性对照。

图 4 RT-PCR 的特异性试验

2.5 检测限 $10^3 \sim 10^9$ copy/mL 质粒标准品与肠病毒阳性、CVA5 阴性的咽拭子样本核酸混合后利用本文建立的 RT-PCR 法扩增, $10^3 \sim 10^9$ copy/mL 质粒标准品均出现了扩增曲线,与拷贝数为 500 copy/mL 的 CVA5 质粒标准品混合的临床样本均没有扩增曲线,说明本方法对临床样本的检测限为 10^3 copy/mL。

2.6 临床样本检测 对遵义医科大学 273 份未明确分型的肠道病毒阳性咽拭子样本进行检测,共检测出 CVA5 阳性样本 25 份,占未明确分型的阳性样本的 9.16%。抽取的 10 份测序样本显示均为 CVA5。

3 讨 论

HFMD 和 HA 作为常见的婴幼儿急性传染病,传染性强,在短时间内可造成较大范围的流行,严重危害着我国儿童的身体健康。作为疾病重要病原体之一的 CVA5 感染除了可导致常规的 HA 及 HFMD 症状外,还可引发重症 HFMD,因此开展对 CVA5 感染 HFMD 的监测,密切关注其发展态势十分重要。在我国,目前临幊上主要针对 EV71、CVA16 和 CVA6 进行核酸分型鉴定,并未对 CVA5 进行单独的

常规分型检测^[11-14]。因此,为了快速高效地检测 CVA5,本研究拟建立一种便捷、灵敏度高、特异性强的 CVA5 核酸检测方法用于 CVA5 的临幊样本检测。

目前检测肠道病毒的方法主要有病毒分离培养、血清学检测和分子诊断法^[15]。其中病毒分离培养是诊断病毒性疾病的“金标准”,特异性强,但此方法对实验室的条件要求高,周期长,一般只作为回顾性诊断。血清学诊断技术虽然快速,但存在灵敏度较低及假阳性、假阴性率高的缺点。而分子诊断方法效率高,灵敏度高及特异性强,一直是临幊首选的肠道病毒检测方法。因此,世界各地的实验室也一直在研究新型肠病毒类型的分子诊断方法^[16-17]。在中国,为应对新型冠状病毒感染,自 2020 年以来,大部分县级以上医院和疾病控制机构中,荧光 PCR 仪得到了普及,因此,建立基于实时荧光系统的 RT-PCR 的 CVA5 检测可以与我国绝大多数实验室的现有基本条件相结合,具有很好的临幊实用性。

因此,本研究基于实时荧光系统建立了一种 CVA5 的核酸检测方法,并检测方法的检测限度、灵敏度、特异性和重复性。结果表明,本研究建立的一步法 CVA5 实时荧光 RT-PCR 检测方法灵敏度高,可达 10^3 copy/mL;且与其他类型病毒之间无交叉反应;重复性好,对 4 个不同浓度的质粒标准品进行 3 次重复扩增试验,结果表明 C_t 值的 s 在 $0.19 \sim 0.44$, CV 均低于 1.5%。与李静云等^[18]建立的 CVA2 和 CVA5 的双荧光定量 PCR 方法比较,本研究在设计引物及探针时将笔者前期研究中检测出的流行于遵义地区的 CVA5 病毒株纳入其中,检测更具有针对性。将本研究的引物用 Primer BLST 与 NCBI 数据库中的 CVA5 序列进行比对分析发现,本研究所用的引物扩增出的 CVA5 序列能与数据库中 64% 的 CVA5 匹配,较李静云等^[18]的方法的 31% 高,说明本研究设计的引物能覆盖更多的 CVA5 序列,对 CVA5 的检测具有更高的灵敏度。

此外,在收集临幊样本的过程中,笔者发现在新型冠状病毒感染后,感染 HFMD/HA 的儿童人数有所下降。HFMD/HA 主要是通过人群密切接触传播,而新型冠状病毒感染不仅减少了人群的聚集,还提高了公众的卫生意识,包括口罩的普及、更加注重手卫生和物品的消毒等,这些都在一定程度上减少了病毒的传播。综上所述,本研究建立了一种适用于常用 RT-PCR 仪的 CVA5 检测方法。该方法具有较高的灵敏度及较强的特异性,且重复性好,可用于鼻咽或口咽标本中 CVA5 的常规筛查。但由于本方法只在有限的样本中进行了评估,因此需要在更大的样本中进一步验证。

参考文献

- [1] 赵天朔,杜娟,刘翰谕,等.疱疹性咽峡炎流行病学及病原学研究进展[J].中国病毒病杂志,2020,10(5):385-390.
- [2] 周万航,李嫣斐,张媛媛,等.疱疹性咽峡炎与手足口病的相关性研究进展[J].口腔疾病防治,2020,28(1):61-64.
- [3] 李嘉铃,韦俞伽,董柏青,等.2008—2017年我国手足口病发病和死亡变化趋势研究[J].疾病监测,2022,37(2):233-240.
- [4] 陈琴,曾小平,李永武.2015—2020年海口市重症手足口病流行病学特征及影响因素分析[J].病毒学报,2021,37(4):860-865.
- [5] 梁礼娟,肖政辉,王友洁,等.2013至2017年手足口病患儿临床流行病学特征分析[J].中国小儿急救医学,2020,27(12):947-949.
- [6] 李洁,张勇,许文波.EV-A71感染导致的重症手足口病的机制及防控研究进展[J].病毒学报,2018,34(2):277-284.
- [7] 任敏睿,崔金朝,聂陶然,等.2008—2018年中国手足口病重症病例流行病学特征分析[J].中华流行病学杂志,2020,41(11):1802-1807.
- [8] 张斯钰,董瑞,赵善露,等.2019—2020年湖南省手足口病流行特征和病原学特征研究[J].实用预防医学,2022,29(1):22-26.
- [9] 侯自员,张相萍,包小兵,等.2017—2020年河南省安阳市手足口病病原监测及流行特征分析[J].河南预防医学杂志,2022,33(7):525-528.
- [10] AI Y H, ZHANG W W, WU J, et al. Molecular epidemiology and clinical features of enteroviruses-associated hand, foot, and mouth disease and herpangina outbreak in Zunyi, China, 2019[J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 656699.
- [11] 付辉,安丽娜,彭碧波.手足口病病原体EV71的检测方法学比较[J].武警医学,2018,29(1):60-63.
- [12] 苏旭,吕莉琨,李力,等.荧光定量RT-PCR检测柯萨奇病毒A组6和10型的方法建立及应用[J].国际病毒学杂志,2015,22(6):372-375.
- [13] 吕莉琨,杨东靖,李力,等.手足口病柯萨奇病毒A2、A4和A5型SYBR Green I实时荧光定量RT-PCR检测方法的建立[J].中国病原生物学杂志,2017,12(1):15-19.
- [14] 蔡丽娟,陈璐,杜红延,等.柯萨奇病毒A组16型Taq-Man一步法荧光定量RT-PCR快速检测方法的建立[J].广东医学,2012,33(5):598-600.
- [15] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.手足口病诊疗指南(2018年版)[J].中华临床感染病杂志,2018,11(3):161-166.
- [16] SHEN X X, QIU F Z, ZHAO H L, et al. A novel and highly sensitive real-time nested RT-PCR assay in a single closed tube for detection of enterovirus[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018, 90(3): 181-185.
- [17] HE S Y, HUANG Y Z, ZHAO Y L, et al. A reverse transcription-polymerase spiral reaction (RT-PSR)-based rapid Coxsackievirus A16 detection method and its application in the clinical diagnosis of hand, foot, and mouth disease[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 734.
- [18] 李静云,崔大伟,谢国良,等.双重荧光定量RT-PCR法检测柯萨奇病毒A2和A5型[J].临床检验杂志,2015,33(5):321-324.

(收稿日期:2022-05-10 修回日期:2022-11-25)

(上接第802页)

- [17] YU S, FANG H, HAN J, et al. The high prevalence of hypovitaminosis D in China: a multicenter vitamin D status survey [J]. Medicine, 2015, 94: e585.
- [18] 孟佳,许亚茹,缪晓涵,等.黑龙江省某医院抽样人群血清25羟维生素D水平回顾性研究[J].中国骨质疏松杂志,2022,28(1):62-65.
- [19] 高杲,陈晓.上海地区成人维生素D水平与性别、年龄、季节的关系[J].中国骨质疏松杂志,2022,28(2):280-284.
- [20] 赵瑾,苏艳丹,唐睿珠,等.昆明地区2563例人群维生素D营养的状况[J].昆明医科大学学报,2022,43(4):19-25.
- [21] 哈海枫,严鹏仲.高原人群维生素D水平的影响因素分析[J].医学息,2022,35(12):126-129.

- [22] 马雯娟,刘静,魏莲花,等.甘肃省健康成人血清维生素D水平及其相关因素[J].中华临床营养杂志,2017,25(4):240-245.
- [23] 李海侠,龚美亮,邓新立,等.中国老年人维生素D水平多中心调查分析[J].中华检验医学杂志,2021,44(1):39-44.
- [24] TEWABE H, AMARE T, MISGANAW B. Establishment of reference interval for selected clinical chemistry parameters in apparently healthy adult in sekela and burie woredas, Ethiopia[J]. J Orthop Surg Rehabil, 2021, 18(3): 1655-1661.

(收稿日期:2022-05-20 修回日期:2022-12-11)