

文章编号:1004-1478(2011)05-0080-04

# 肠道病毒检测方法述评

孙新城<sup>1</sup>, 周贺娟<sup>2</sup>

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002;  
2. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001)

**摘要:**综述了肠道病毒的种类、结构、生物学特性、致病性及肠道病毒的检测方法. 通过对各方法优缺点的比较, 认为免疫学检测方法在方便快捷检测肠道病毒中的独特优势, 尤其是免疫胶体金标记法和酶联免疫吸附试验备受青睐. 提出确定肠道病毒的共同抗原和研制胶体金多元化检测试纸条可作为今后肠道病毒的通用检测方法的研究重点.

**关键词:**肠道病毒检测方法; 免疫学检测; 胶体金多元化检测

中图分类号: R446

文献标志码: A

## Review of detection methods of enterovirus

SUN Xin-cheng<sup>1</sup>, ZHOU He-juan<sup>2</sup>

(1. College of Food and Bioeng., Zhengzhou Univ. of Light Ind., Zhengzhou 450002, China;  
2. Biological Eng. Dept., Zhengzhou Univ., Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** The types, structures, biological characteristics, pathogenic of enterovirus detection methods of enterovirus were summarized. By comparing the advantage and disadvantage of every detection method, it was found that the specific advantage of immunological method was the best convenient and fastest detection methods, especially immune colloidal gold detection methods and enzyme-linked immunosorbent detection methods. It was put forward that determination of the common enterovirus antigens and the development of colloidal gold test strips of common intestinal virus detection methods was important in the common detection methods about enterovirus.

**Key words:** detection method of enterovirus; immunology detection; immune colloidal gold diversification detection

## 0 引言

肠道病毒引起的疾病种类很多, 且容易大范围、高频率地爆发, 严重威胁人类的健康, 由于其与

很多其他病原体(如腮腺炎、麻疹、乙型脑炎等)所引起的疾病症状相似, 很容易造成误诊致使病情加重甚至威胁生命. 如果在患病早期及时诊断出肠道病毒, 有利于后续的治疗和防治以及抑制流行病的

收稿日期: 2011-06-01

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(102102310093)

作者简介: 孙新城(1977—), 男, 山东省巨野县人, 郑州轻工业学院讲师, 主要研究方向为分子病毒学及生物检测.

爆发.目前常用的肠道病毒的检测方法仅仅是针对肠道病毒中的一种类型或者是一种类型的部分血清型,所以,研制高效、快速、通用的肠道病毒的检测方法,具有非常重要的意义.本文拟对肠道病毒的种类、结构、生物学特性、致病性及肠道病毒检测方法予以述评,并指出今后的研究思路.

## 1 肠道病毒的种类、结构、生物学特性、致病性<sup>[1-5]</sup>

肠道病毒是主要生长于肠道的RNA病毒,属于小RNA病毒科,肠道病毒属,包括以下4类:1)脊髓灰质炎病毒,有1,2,3三型;2)柯萨奇病毒,分A,B两组,A组包括1—22,24型,B组包括1—6型;3)埃可病毒,包括1—9,11—27,29—33型;4)新肠道病毒,为1969年后陆续分离到的,包括68,69,70和71型.

肠道病毒的共同特性是:1)病毒体呈球形,衣壳为20面体对称结构(共有60个颗粒),无包膜;2)基因组为单股正链RNA,具有感染性,并起mRNA作用;3)在宿主细胞浆内增殖,迅速引起细胞病变;4)耐乙醚,耐酸,56℃,30min可使病毒灭活,对紫外线、干燥敏感,在污水或粪便中可存活数月;5)主要经粪—口途径传播,以上呼吸道、咽喉和肠道为入侵门户.肠道病毒首先在人类消化道细胞壁繁殖,然后通过血液侵犯其他靶细胞,引起各种临床综合征,临床表现多样化,可致多种疾病,如麻痹、无菌性脑炎、心肌损伤、腹泻和皮疹等.致病特点是病毒在肠道中增殖,却很少引起肠道疾病;不同类型的病毒可引起相同的临床综合征,同一型病毒亦可引起几种不同的临床疾病,但某些病毒只倾向于引起某种综合征的情况也存在.

## 2 肠道病毒的检测方法

### 2.1 生物学检测技术

**2.1.1 动物接种法** 动物接种法是肠道病毒诊断最早的实验手段,常用小鼠进行腹腔接种或脑内接种,也可用乳鼠进行腹腔接种,然后观察小鼠或乳鼠的发病情况,以判断标本是否有病毒存在.该实验方法不但操作繁琐,而且动物个体差异较大,所测得的结果不够稳定,需重复多次.对实验技术人

员的操作要求也比较高.目前除了科研的需要,一般不用该方法进行肠道病毒的分离检测.

**2.1.2 细胞培养法** 细胞培养法用于分离病毒的细胞有原代细胞、二倍体细胞或异倍体细胞.现在使用较多的有Vero细胞、Hela细胞等,这些细胞可连续传代,而且对多种主要致病的肠道病毒敏感.但用该法分离肠道病毒所需时间长(大多7d后判断结果),而且需要有诊断某种病毒的敏感细胞系和熟练的操作技术.

### 2.2 免疫学诊断技术

**2.2.1 中和试验<sup>[1]</sup>** 中和试验以测得病毒的感染力为基础,有固定血清稀释病毒法和固定病毒稀释血清法两种.它通过观察细胞病变程度了解被测血清中抗肠道病毒的抗体水平,如果有标准血清,也可用此法给肠道病毒定型.但病毒颗粒的完整性、抗血清滴度的强弱、宿主细胞的敏感性等各因素的变化都会影响其结果的准确性,而且整个实验需双份血清(即早期感染的血清和恢复期血清),判断实验结果所需时间也较长,故不适用于快速诊断.

**2.2.2 酶联免疫吸附试验** 酶联免疫吸附试验(ELISA)方法的基本原理是用酶标记抗体后仍能与相应的抗原形成免疫复合物,这种复合物经底物显色后观察结果.酶联免疫吸附试验是目前应用最广泛的病毒抗原及抗体的检测技术,已有间接法、又抗体夹心法、双抗原夹心法、捕获法和生物素亲和素法、膜酶免疫试验和微孔膜免疫试验、竞争抑制法等多种方法<sup>[6-9]</sup>.酶联免疫吸附试验操作简单,所需时间短,灵敏度高,不需要特殊的仪器,尤其适合大批样品血清学检测,但该方法的检测结果的特异性受包被的抗原或抗体纯度的影响较大.

**2.2.3 免疫荧光法** 免疫荧光法的基本原理是标记荧光素抗体仍能与相应的抗原形成免疫复合物,这种复合物由于有荧光素的参与,借助荧光显微镜能观察到细胞内病毒抗原及其存在的位置,从而得知相应的病毒抗原.该技术最大优点为敏感性和特异性高,特别是单克隆抗体的问世大大提高了免疫荧光测定的效果,主要应用于快速诊断.免疫荧光法分直接法和间接法.国外有些研究者经预试验发现,免疫荧光法能鉴别多半肠道病毒血清型,与中和试验的符合率较高.免疫荧光法操作简便、快速,

可弥补核酸杂交试验和 PCR 法不能分型的缺点. 利用酶联免疫吸附试验捕捉法或间接法检测早期病人血清中的 IgM 和 IgG 抗体, 是较常用的手段, 尤其以柯萨奇 B 组病毒的感染诊断较多, 因此, 近些年有研究者将免疫荧光法与间接免疫法结合, 创建了间接免疫荧光和 PCR - ELISA 试验法, 以检测肠道病毒<sup>[9-10]</sup>.

**2.2.4 免疫胶体金标记法** 1980 年最早报道了用胶体金检测人绒毛膜促性腺激素的凝集试验, 1985 年已有商品试剂盒供应, 从此免疫胶体金标记法成为研究新热点, 近年该法已在各种生物学、医学研究中广泛使用. 免疫胶体金标记技术由于具有操作简便、无需任何专用仪器、无需特殊培训操作人员、检测结果直观、方便基层单位和现场使用等特点, 成为近些年体外诊断试剂发展的趋势.

### 2.3 核酸诊断技术

**2.3.1 核素杂交技术** 该技术是将制成的<sup>32</sup>P 同位素标记、生物素标记或地高辛标记的探针与患者标本中提取的病毒 RNA 进行杂交, 然后进行定性、定量分析. 核酸杂交技术敏感性很高, G. J. Zoll 等<sup>[11]</sup>用<sup>32</sup>P 标记的探针对肠道病毒标准毒株进行检测, 其阳性检出率达 90% 以上, 对照组的肠道病毒检出率 < 15%. R. Dörries 等<sup>[12]</sup>用生物素标记的探针检测 63 种血清型, 结果 61 份血清型表现为阳性. 但核素半衰期短, 易污染, 其贮藏需有严密的防护措施.

**2.3.2 聚合酶链反应** 聚合酶链反应是用肠道病毒特异性引物检测标本中和肠道病毒 RNA 同源的基因序列, 将其结果作为判断的依据. 有人将 DNA 酶免疫试验与 PCR 方法结合, 既克服了标记探针步骤复杂的缺陷, 又弥补了 EB 敏感性和特异性较低的缺点, 为提高 PCR 扩增产物的检测水平创造了条件. 聚合酶链反应法灵敏度高, 所需时间短, 较适合肠道病毒的快速诊断. 近几年出现的逆转录 - 聚合酶链反应法 (RT - PCR) 成为肠道病毒快速诊断的重要方法. 该方法的缺点是容易出现假阳性, 检测样本容易污染, 而且需要精密仪器和专业技术人员, 不便于大规模普及<sup>[13-15]</sup>.

**2.3.3 TaqMan 荧光定量 RT - PCR 法** 这是根据肠道病毒基因的保守区设计特异性引物和 Taq-

Man 探针, 通过对荧光 RT - PCR 反应条件进行优化而建立起来的一种方法. 该方法对肠道病毒的检测有高度的特异性, 可检测出脊髓灰质炎病毒、EV71 柯萨奇病毒和埃可病毒等肠道病毒, 与腮腺炎、麻疹、乙型脑炎等病毒无交叉反应. TaqMan 荧光定量 RT - PCR 法比常规 RT - PCR 更敏感、快速和简便, 从核酸提取至完成检测仅需 3 h 左右. 不过该方法也因需要精密仪器和专业技术人员而不易大规模普及<sup>[15-26]</sup>.

**2.3.4 基因芯片技术** 基因芯片技术是通过压电打印法、原位合成法、分子印章法等方法, 将 DNA 片段高密度地固化到经特殊处理的载体 (硅片、醛基化的玻片、表面氨基化等) 表面, 在特定条件下与荧光标记的样品分子进行杂交, 然后通过激光共聚焦显微镜等设备收集杂交信号, 并用生物信息学软件分析, 从而获得样品的遗传信息<sup>[27-28]</sup>. 目前国外已有公司研发出肠道病毒鉴定芯片, 可快速检测肠道病毒的型别, 国内尚无使用基因芯片对肠道病毒进行检测的相关报道.

使用基因芯片技术对 EV71 进行诊断时, 因其可同时检测多段基因, 因而具有较高的灵敏度. 同时由于分子杂交本身高度的严谨性, 应用多组探针联合判断检测结果, 可有效降低假阳性率. 此外, 因基因芯片本身具备高通量、大规模的特点, 故可以将多种与 EV71 早期症状类似的病毒 (如柯萨奇、疱疹病毒、埃可病毒、轮状病毒等) 常见病原体点样到芯片上进行联合诊断, 对于确诊病人、排除疑似患者具有重要意义. 此方法目前还属于高新技术, 虽能快速地检测出肠道病毒, 但距离大规模推广还有一段很长的路.

## 3 结语

诊断肠道病毒的方法有很多, 总的来说, 传统的检测方法复杂费时, 核酸检测方法需要精密仪器和专业的技术人员. 随着近些年体外检测试剂的发展, 免疫学检测方法尤其是免疫胶体金标记法和酶联免疫吸附试验以其特有的优势备受青睐. 目前, 还没有一种通用方法能方便地快速检测肠道病毒, 且把肠道病毒与其他病原体分开. 研制出一种方便快捷的肠道病毒通用检测方法<sup>[28]</sup>, 在患病早期及时

诊断出肠道病毒病原体,有利于后续的治疗和防治.笔者认为,研发肠道病毒方便、快速、通用的检测方法,可以着力于以下2个方面:

1)研究并确定肠道病毒的共同抗原,制备相应的胶体金检测试纸条或酶联免疫检测试剂盒,通过检测肠道病毒的抗原或抗体进而确定肠道病毒的存在.目前,肠道病毒的共同抗原还没有确定,杨秀惠等<sup>[29]</sup>虽指出VP1是很多肠道病毒的共同抗原,但没有足够的证据证明它就是肠道病毒的共同抗原.

2)研制胶体金多元化检测试纸条<sup>[30]</sup>.胶体金多元化检测就是采用在同一膜上作多种项目测定和多项目组合测定2种方式,1次检测可同时得到1组结果,这对于检测某些具有联检意义的物质具有很大的应用价值.肠道病毒的通用检测方法的主要障碍是没有确定的共同抗原,但是确定几种能够代表所有肠道病毒的抗原,应该比确定1种共同抗原容易些,所以可以这些抗原做多元化检测试纸条.

#### 参考文献:

- [1] 李卫中.脊髓灰质炎I型/柯萨奇B3型嵌合病毒构建及其生物学特性的初步研究[D].昆明:昆明医学院,2004:60-69.
- [2] CDC. Deaths among children during an outbreak of hand, foot and mouth disease [J]. *MMWR*,1998,47(30):629.
- [3] CDC. Outbreaks of aseptic meningitis associated with echoviruses 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity[J]. *MMWR*,2003,52(32):761.
- [4] 赵雅男,姜仁杰,姜庆五,等.苏北地区无菌性脑膜炎病因病毒的分离和初步鉴定[J].*中华检验医学杂志*,2006,29(1):49.
- [5] 杨秀惠,严延生,何爱华,等.肠道病毒ECHO19型引起无菌性脑膜炎流行的诊断与遗传性分析[J].*中华流行病学杂志*,2006,27(5):375.
- [6] Xu F, He D, He S, et al. Development of an IgM-capture ELISA for coxsackievirus A16 infection[J]. *J Virol Methods*,2011,171(1):107.
- [7] Xu F H, Yan Q, Wang H, et al. Performance of detecting IgM antibodies against enterovirus 71 for early diagnosis [J]. *PLoS One*,2010,5(6):e11388.
- [8] Wang S Y, Lin T L, Chen H Y, et al. Early and rapid detection of enterovirus 71 infection by an IgM-capture ELISA[J]. *J Virol Methods*,2004,119:37.
- [9] Park K, Lee K, Baek K, et al. Application of a diagnostic method using reverse transcription-PCR ELISA for the diagnosis of enteroviral infections (Korean) [J]. *J Lab Med*, 2009,29(6):594.
- [10] 高洁,赵雅男,姜仁杰,等.间接免疫荧光实验在人群埃可30型肠道病毒检测中的应用[J].*检验医学*,2006,21(6):602.
- [11] Zoll G J, Melchers W J, Kopecka, et al. General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses application for diagnostic routine and persistent infections[J]. *J Clin Microbiol*,1992,30:160.
- [12] Dörries R, Ter Meulen V. Detection of enterovirus specific IgG and IgM antibodies in humans by an indirect solid phase radioimmunoassay [J]. *Med Microbiol Immunol*, 1980,168:159.
- [13] 赵红,欧蔚妮,闫杰,等.肠道病毒71型临床研究进展[J].*中华实验和临床感染病杂志:电子版*,2008,2(3):226.
- [14] 颜瑾,柯昌文,郑焕英,等.基于VP4基因扩增和序列测定快速检测鉴别人肠道病毒的研究[J].*中国计划免疫*,2006,12(6):469.
- [15] 张崇森,刘永军,王晓昌,等.逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术同时检测水中多种肠道病毒[J].*环境科学研究*,2007,20(3):137.
- [16] 严菊英,卢亦愚,徐昌平,等.肠道病毒TaqMan荧光定量RT-PCR法[J].*中国公共卫生*,2007,23(7):818.
- [17] 陈秋霞,吴德,李晖,等.应用TaqMan荧光定量RT-PCR快速检测肠道病毒的研究[J].*中国病原生物学杂志*,2008,3(11):807.
- [18] Janssen K, Floré K, Piette A, et al. Implementation of real-time RT-PCR for detection of human metapneumovirus and its comparison with enzyme immunoassay [J]. *Arch Virol*,2010,155:207.
- [19] 王云龙,李智涛,李玉林,等.荧光定量RT-PCR检测临床标本中的肠道病毒RNA[J].*中国卫生检验杂志*,2009,19(16):1329.
- [20] 肖性龙,何雅,余以刚,等.内标多重荧光RT-PCR同时检测肠道病毒71型和柯萨奇病毒A16型[J].*微生物学报*,2009,49(1):98.
- [21] 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):80.

(下转第95页)

表7 4种加工模式对比评吸结果

组别	对比样品	感官品质对比评吸	优选样品
第1组	A <sub>1</sub> 与B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> 样品香气自然性及圆润性好,柔和性好;B <sub>1</sub> 样品香气透发性好,浓度高,劲头感受较强	B <sub>1</sub>
第2组	A <sub>1</sub> 与A <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> 样品香气自然性、细腻性好;A <sub>2</sub> 样品香气浓郁,透发性好	A <sub>2</sub>
第3组	A <sub>1</sub> 与B <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> 样品香气自然性好,细腻性好,烟气浓度略欠,透发性略欠;B <sub>2</sub> 样品香气偏焦香气息,烟气浓郁,劲头感受明显	A <sub>1</sub>
第4组	B <sub>1</sub> 与A <sub>2</sub>	两者香气厚实性浓度及丰满度无明显差异,但A <sub>2</sub> 样品比B <sub>1</sub> 样品香气清香韵略有减弱,焦香气息稍有显露,烟气略偏粗糙	B <sub>1</sub>
第5组	B <sub>1</sub> 与B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> 比B <sub>1</sub> 样品烟气较浓郁,略偏粗糙,劲头较大,且B <sub>2</sub> 样品香气偏焦香气息较明显	B <sub>1</sub>
第6组	A <sub>2</sub> 与B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> 比A <sub>2</sub> 样品香气偏焦香气息较明显,烟气较浓郁,略偏粗糙,劲头较大	A <sub>2</sub>

## 参考文献:

- [1] 闫克玉. 烟草化学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2002: 161-164.
- [2] 白晓莉, 邹泉, 牟定荣, 等. 制丝过程对再造烟叶物理及化学性质的影响[J]. 烟草科技, 2009(8): 14.
- [3] 白晓莉, 邹泉, 董伟, 等. 工艺加工对再造烟叶致香成分、有害成分和感官质量的影响[J]. 烟草科技, 2009(10): 12.
- [4] 许淑红, 熊安言, 赵伟民, 等. 真空回潮对烟叶质量的影响[J]. 烟草科技, 2007(5): 12.
- [5] 过伟民, 尹启生, 宋纪真, 等. 烤烟质体色素含量的品种间差异及其与感官质量的关系[J]. 烟草科技, 2009(8): 51.
- [6] 李雪震, 张希杰, 李念胜, 等. 烤烟烟叶色素与烟叶品质的关系[J]. 中国烟草, 1988(2): 23.
- [7] 徐晓燕, 孙五三, 王能如. 烟草多酚类化合物的合成与烟叶品质的关系[J]. 中国烟草科学, 2003, 24(1): 3.
- [8] 刘阳, 尹启生, 宋纪真, 等. 不同品种烤烟多酚含量和组成的差异分析[J]. 烟草科技, 2007(8): 32.
- [9] 于存峰, 张俊松, 闫洪洋, 等. 烟草中多酚类化合物研究进展[J]. 河南农业科学, 2008, 22(4): 10.
- [10] 朱小茜, 徐晓燕, 黄义德, 等. 多酚类物质对烟草品质的影响[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(8): 1910.
- [11] 梁强, 王加深, 劳艳卿, 等. 全片烟工艺条件下增设真空回潮工序初探[J]. 郑州轻工业学院学报: 自然科学版, 2002, 17(1): 10.
- (上接第83页)
- [22] Pattara Khamrina, Makiko Okameb, Aksara Thongprachumb, et al. A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea[J]. J of Virological Methods, 2011, 173: 390.
- [23] Oberste M Steven, Penaranda Silvia, Rogers Shannon L, et al. Comparative evaluation of Taqman real-time PCR and semi-nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens[J]. J Clin Virol, 2010, 49(1): 73.
- [24] Thaoa Nguyen Thi Thanh, Ngoca Nguyen Thi Kim, Túa Phan Van, et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous identification of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 [J]. J of Clinical Virology, 2010, 170(1/2): 134.
- [25] Lee Min-Hsiung, Huang Li-Min, Wong Wing-Wai. Molecular diagnosis and clinical presentations of enteroviral infections in Taipei during the 2008 epidemic[J]. J of Microbiology, Immunology and Infection, 2011, 44: 178.
- [26] Nie Kai, Zhang Yong, Luo Le, et al. Visual detection of human enterovirus 71 subgenotype C4 and coxsackievirus A16 by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with the hydroxynaphthol blue dye[J]. J of Virological Methods, 2011, 175(2): 283.
- [27] 马文丽, 郑文岭. DNA芯片技术的方法及应用[M]. 广州: 广东科技出版社, 2002.
- [28] Shih S R, Wang Y W, Chen G W, et al. Serotype-specific detection of enterovirus 71 in clinical specimens by DNA microchip array[J]. J Virol Methods, 2003, 111: 55.
- [29] 杨秀惠, 严延生, 潘伟毅. 应用共同抗原的多克隆与单克隆抗体进行肠道病毒诊断的研究[J]. 中国人畜共患病学报, 2007, 23(1): 1002.
- [30] 陈凤梅, 李娟, 曲原君, 等. 免疫胶体金技术的应用及研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(8): 33.