

禽流感病毒实验检测研究进展

魏泉德* 谭爱军

(中国珠海市疾病预防控制中心 珠海 519000)

摘要 禽流感病毒(avian influenza viruses, AIV)给人类健康已带来严重威胁,而实验室快速、准确的诊断技术对禽流感的预防、控制及应急反应决策起着极其关键的作用,这使其成为了研究热点并取得了巨大进步。就禽流感的实验检测技术研究进展从病毒分离、免疫学诊断及分子诊断 3 个方面加以综述。

关键词 禽流感,病毒,实验诊断

中图分类号:Q93-332 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0986-05

Advances in Laboratory Diagnosis of Avian Influenza Virus

WEI Quan-De* TAN Ai-Jun

(Zhuhai Center of Disease Prevention and Control, Zhuhai 519000)

Abstract Avian influenza viruses (AIV) can cause serious economic losses and threaten to human health. The laboratory methods for rapid and accurate detecting AIV ensure timely implementation of intervention strategies so that it plays a key role in avian influenza prevention and control. The laboratory technologies for detecting AIV are topic subject and developed quickly those days. This paper reviews the advances of laboratory diagnosis technologies for AIV at 3 aspects of virus isolation, immunoassay and molecular diagnostics.

Key words Avian influenza (AI), Virus, Laboratory diagnosis

流感病毒是 RNA 病毒,基因组包括编码 10 种蛋白质的 8 个单股/负链 RNA 分子片段,这一特点使病毒在复制中易发生基因重组,导致新亚型毒株出现,属于正粘病毒科、甲型流感病毒属。典型的病毒粒子呈球形,核衣壳外为脂质包膜,表面纤维蛋白突乃 2 种独特的糖蛋白,即血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)。根据核蛋白(NP)和基质蛋白(MP)的抗原性不同可分为 A、B、C 3 型,B 和 C 无亚型,只有 A 型易变异^[1],在世界范围内广为流行,并可在禽、人、猪、马和海洋哺乳动物中暴发流行。根据其基质蛋白 HA 和 NA 的抗原特性可将现有的 A 型流感病毒分为 16 种 HA 亚型(H1~H16)和 9 种 NA 亚型(N1~N9),因此理论上共有 144 种亚型组合。到目前为止,已证实既可感染禽又可感染人的禽流感病毒(avian influenza viruses, AIV)主要为 H5N1、H9N2 和 H7N7、H7N2、H7N3 等亚型,高致病性禽流感均由 H5 及 H7 亚型引起,截止目前为止,几乎所有 H5N1 亚

型均为高致病性。AIV 给人类健康已带来严重威胁,而实验室快速、准确的诊断技术对禽流感预防、控制及应急反应决策起着极其关键的作用^[2],AIV 实验检测技术也随之成为人们研究的热点。虽然病毒分离仍然是诊断的金标准,但实验室的常规诊断通常由检测病毒抗原的免疫层析法或免疫荧光法,亦或检测病毒核酸的 RT-PCR 来完成,尤其是 RT-PCR 方法,在爆发流行时可于参比实验室以外的一般实验室进行亚型检测,对控制流行意义重大。本文就近年来 AIV 实验检测技术的研究进展作一综述。

1 病毒分离与鉴定

类似于人流感病毒,禽流感病毒可用鸡胚(SPF 鸡胚)或细胞(如 MDCK 或 LLC-MK2)分离培养,与人流感病毒,禽流感病毒无毒株培养所不同的是,高致病性禽流感病毒不需要额外加入外源性的胰蛋白酶。培养中出现的细胞病变是非特异性的。

* 通讯作者 Tel 0756-2261607, E-mail: quandew@hotmail.com

收稿日期:2007-02-08,修回日期:2007-04-26

因 AIV 的 HA 能使鸡红细胞发生凝集,可用血凝实验作病毒的初步鉴定;也可用针对 NP 的单抗,用免疫荧光染色作病毒的初步鉴定。进一步做 HA 及 NA 亚型可用培养上清作 RT-PCR、血凝抑制实验(HI)或神经氨酸酶抑制(NI)试验。禽流感通常从人类感染者的结膜拭子、呼吸道样品(如咽喉或分泌物/冲洗物)中分离到^[3,4]。虽然病毒分离仍然是检测 AIV 的一种经典、准确、敏感的病原学诊断金标准,特异性和敏感度均较高^[5],但禽流感病毒分离要求在 BSL-3 及以上的实验室进行,高致病性的毒株还易致鸡胚死亡,操作复杂,费时,通常需要 3d~5d。

2 免疫学检测

免疫学方法,就象家用怀孕测试一样,容易操作且可快速得到结果,但现有的方法缺乏足够的敏感性和特异性来可靠地区别禽流感与季节性流感,且不能检测新变异的毒株。

2.1 抗原检测

检测临床样品中的 A 型流感病毒的抗原,较常用的方法为直接免疫荧光法或快速免疫层析法(如胶体金快速测试条等),可以提供快速诊断,但由于对禽流感的敏感性较低而限制了其应用^[6],另外,一些抗原快速检测试剂盒不能区分流感 A 和 B 型,虽然有报道正开发快速检测 H5N1 特异性抗原的方法,但目前还没有一种检测抗原的免疫荧光法和免疫层析法能区分 A 型流感亚型^[7]。

2.2 抗体检测

抗体检测的方法众多,做亚型特异性抗体检测对爆发流行时的流行病学调查至关重要。

2.2.1 抗体中和实验:分常量和微量 2 种,中和抗体能用完整的病毒可靠的检测到。WHO 推荐使用微量中和法。1997 年香港 H5N1 爆发流行时证明用微量中和试验(microneutralization assay)检测,其敏感性大大高于血凝抑制(HI)试验。作为经典方法,病毒中和实验操作繁琐、耗时(症状出现 14d 以后,抗体滴度达到 1:640 则需 20d 以后),费料,对安全及检验技术的要求高,现已较少应用。

2.2.2 琼脂凝胶扩散试验(agar gel immunodiffusion, AGID):用于检测 AIV 共同抗原 NP 或 MP。由于所有的 AIV 都具有型特异性共同抗原,用一种 AIV 的抗原或抗血清就可对所有 AIV 的抗体或抗原进行

鉴定。免疫双向扩散及免疫电泳中以沉淀线判定可以定性,免疫单辐射扩散试验可以定量。由于抗体的限制,AGID 尚不能常规用于检测鸭、鹅及鸟血清,敏感性也较低。

2.2.3 血凝抑制(HI)试验:AIV 使鸡红细胞发生凝集现象可被特异性免疫血清所抑制,即红细胞凝集抑制试验。HI 可以检测血清中的抗体水平,也可以鉴定病毒,用抗不同血凝素的抗血清,由血凝抑制试验来确定 HA 亚型。但在禽流感检测中因其敏感性低而使其应用受限^[8],可能是禽流感病毒的免疫原性较低。有报道用马血球替代标准 HA 中的鸡或猪血球检测禽流感 H7,可提高敏感性达 85%,特异性达 100%^[9]。

2.2.4 免疫荧光方法(IFA):将抗原或抗体标记上荧光素,再进行抗原抗体反应。最早用于流感病毒是鉴定和定位病毒感染细胞中特异性的抗原、核蛋白(NP)或基质蛋白(MP)抗原。用 NP 抗原的荧光抗体染色,主要出现核内荧光;用 MP 抗原的荧光抗体主要出现胞质荧光,核内也可出现部分荧光。新近报道的微球免疫法(microsphere immunoassay, MIA)将重组 NP 结合于 Luminex(聚苯乙烯微球上检测禽流感^[10],敏感性和特异性分别可达 99.3%和 93.1%。由于该微球系统可发出不同颜色的荧光,理论上可同时检测 100 种不同的抗体,且试剂用量极少。

2.2.5 免疫层析分析法:AIV 抗体胶体金检测试纸条则是胶体金免疫层析分析法,用纯化病毒与胶体金颗粒偶联,吸附在玻璃纤维上制作而成,不需要其它试剂,一步完成,反应时间只需要几分钟(5min~10min),是一种检测微量 AIV 抗体快速、简便的方法。缺点是敏感性低,检测成本不菲。乳胶凝集实验也用于快速检测禽流感 H5N1^[7]。

2.2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA):运用 ELISA 原理建立的 AIV 检测方法较多,其敏感性不低于抗体中和实验,但特异性较中和实验次之,可能由于抗原表位之间的交叉反应所致。如用单克隆抗体介导的、经生物素-亲和素系统放大的 H5 亚型禽流感病毒捕获 ELISA 检测方法,为进一步研究检测试剂盒提供基础。用基因工程重组 NP 蛋白作为抗原建立的检测 AIV 抗 NP 抗体的间接 ELISA(iELISA)方法^[11,12],以及用重组 AIV NP 蛋白建立的竞争性

ELISA(cELISA)方法^[13,14]均用于检测禽流感。基于重组 HA 蛋白的间接 ELISA 方法,可以检测禽流感 H3、H5、H7、H9 亚型,特异性高,与传统 HI 方法比较符合率为 97.1%(774/807)^[15],可望用于 AIV 的保护性抗体水平检测。

2.3 其它

Western-blot^[16]及单辐射溶血实验(single radial hemolysis assay)^[17]也被用于禽流感的诊断;还有根据病毒抗原表位设计及合成的合成肽,也被用于检测禽流感抗体。

3 分子生物学检测

禽流感的核酸检测乃最敏感的检测手段,新的方法大大缩短了检测时间并得到广泛的应用,使 A 类病原体的实验诊断有了革命性的飞跃。分子诊断中用得最多的 3 种技术是 real time PCR、NASBA (nucleic acid sequence - based amplification)、DNA 芯片。这些方法仍然可能漏检新的病毒株,且需要高度训练的检验人员,比快速免疫方法耗时略长。

3.1 核酸扩增方法

核酸扩增技术(Nucleic acid-amplification testing, NAT)检测 AIV,选择好靶基因和引物及优化反应参数,均可获得高灵敏度和特异性。对于血清型众多的 AIV,不同亚型致病性不同,宿主分布不同,故快速、特异地分型在 AIV 诊断中显得尤为重要,而当前的核酸扩增技术可以鉴别出所有 HA 或 NA 的已知亚型,但最终结果尚需借助于测序方法确证^[18]。

3.1.1 RT-PCR:在香港及东南亚 H5N1 的爆发流行中,RT-PCR 检测病毒核酸被证明是有价值的,在爆发流行时可以选择的方法^[4,19]。基于 MP、NP 基因的高度保守区的引物,RT-PCR 甚至可以鉴定 AIV^[20]。Lee 等^[21]在此基础上针对 H1~H15 又分别设计了 15 对 HA 基因的特异性引物,同时进行 15 管 RT-PCR,可以检测 H1-H15 的 HA 亚型,该法所测 80 株病毒样品,与血清学方法符合率为 100%,但单管单测,操作繁琐。Phipps 等^[22]建立了相对简便的 RT-PCR 的 AIV 检测法,仅用一对引物扩增出 H1~H15 的 HA2 基因,产物由双脱氧核酸链中止法测序分析,盲测 12 株标准病毒和 30 株样品病毒,并与 HI 对照,完全相符。为了实现单管多检,在 RT-PCR 基础之上 Malik 等^[23]建立了相对快速和经济的多重 RT-PCR(mRT-PCR)检测方法,检测 3 种不同

的鸟类呼吸道病毒,与单管单检 RT-PCR 方法结果完全相符;Yamada 等^[24]建立了包括 5 对引物的 mRT-PCR 体系,可鉴别 5 种亚型 AIV;Xie 等^[25]建立的含 4 对引物的 mRT-PCR 体系,可同时检测禽流感及 H5、H7 和 H9 亚型;Wei 等^[26]建立了 3 对引物的一步法 mRT-PCR 方法,可单管检测禽流感 A 及 H5 与 N1 亚型。采用巢式或半巢式 RT-PCR^[20]可提高扩增的灵敏度和特异性,Bellau-Pujol 等^[27]运用多重半巢式 RT-PCR 可以检测包括 AIV 的 12 种呼吸道 RNA 病毒,使检测范围进一步扩展,其 203 个样本与培养方法及直接免疫荧光法对照,综合敏感度达 98%。

3.1.2 Real-time RT-PCR (RRT-PCR):RRT-PCR 运用特异性的荧光水解探针对相关扩增物实施实时检测,替代传统的凝胶电泳的检测方法,有一步法(反转录+PCR)和二步法之分(反转录,然后 PCR),除了有可以进行高通量和定量检测的优点之外,还因为扩增产物乃封闭检测,不需要处理而极大地减少了交叉污染的机会,其单位均检测成本与免疫方法相当但大大低于病毒分离,稳定性及重现性都要好于鸡胚培养法^[18]。RRT-PCR 方法可使检测时间缩短为 4 h^[5,18],同时敏感性约为传统 RT-PCR 法的 10~100 倍^[18]。检测 A 型流感的此类方法多用 MP 特异性引物来扩增高度保守的基质基因^[28]。Lee 等^[18]建立的检测 H5、H7 亚型 AIV 的定量 RRT-PCR 方法,与传统的鸡胚培养方法比较,并以 EID₅₀ (50% egg infectious dose,半数鸡胚感染剂量)为评价指标,RRT-PCR 检测 H5 的敏感性为 1 fg 或 10² RNA 拷贝,H7 为 0.1 fg 或 10 RNA 拷贝,所测病毒浓度均低于 0.1 EID₅₀(约相当于 10 个基因拷贝),敏感性高于培养方法。而应用 RRT-PCR 检测火鸡样品的敏感性和特异性分别为病毒分离法的 93.3%和 98.4%^[29]。使用 TaqMan 探针的 RRT-PCR 方法的检测限可达到 0.006 TCID₅₀/mL ~ 0.2TCID₅₀/mL (50% tissue culture infectious dose,半数组织培养感染剂量)^[28,30,31]。应用 MGB 探针可减少背景荧光,进一步提高敏感性,检测限可达 0.08EID₅₀ 和 0.006 TCID₅₀(约相当于 5 个 RNA 拷贝),线形范围 5~5×10⁸ 拷贝^[32]。探针的应用使假阳性达到了最小化。国内已有检测禽流感 H5、H7、H9 的试剂盒面市。

3.1.3 依赖核酸序列的扩增(NASBA): NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification) 是一种快速、等温的 RNA 扩增技术, 整个反应有赖于 AMV 逆转录酶、T7 RNA 多聚酶和核酸酶 H (RNase H) 共同协作而完成, 不需特殊仪器, 不需温度循环, 是以转录为基础, 单链核苷酸的连续扩增, 其反应产物是单链 RNA。扩增产物与磁珠上的捕捉探针及钉标记的电化学发光寡核苷酸探针 (ECL 探针) 杂交后, 形成复合物, 经 NucliSens 阅读器直接检测电化学发光强度^[33, 34]。Collins 等^[33]检测了亚欧谱系 H5 亚型 AIV, 同时还鉴别出高致病及低致病 H5 亚型。Lau 等^[34]建立的 NASBA 技术可以检测 H1 ~ H15 亚型的 AIV, 与其它病毒病原体无交叉反应, 并能区分出 H5 及 H7 亚型, 整个过程从核酸分离、扩增到检测 4h ~ 6h, 灵敏度与鸡胚培养相当^[35]。NASBA 扩增不需要复杂的温度变化, 其扩增效率高于传统的 PCR, 其敏感性要高于传统 PCR^[34, 36], 但现有的敏感性评估均为体外实验结果, 需要进行直接检测临床样品的彻底评估。已开发出可检测禽流感群特异性 (H1-H15) \ H5 亚型、H7 亚型的 NASBA /ECL 检测试剂盒^[33, 34, 36]。在 NASBA 技术上进一步发展出来的实时 NASBA (real-time NASBA) 技术, 使检测的敏感性和特异性大大提高, 达到 ~ 0.1 TCID₅₀, 相当于 RRT-PCR^[37]。检测临床样品的阳性率高于细胞培养法及直接免疫荧光法多达 64%^[37]。NASBA 技术拥有 RRT-PCR 相似的优点, 且因为不需要变性 DNA, 即便有基因组 DNA 污染也可以特异性扩增出目的 RNA, 而且还是一种高通量的方法, 可以同时检测 50 个样本, 非常适用于大规模样品的筛查。NASBA 技术的扩增产物为 RNA 分子, 使用者可以根据需要选择不同的检测方法, 如电化学发光法和酶联法等。而且, 与 PCR 的产物 DNA 分子不同, RNA 分子不易对实验仪器和环境造成污染, 避免了产物交叉污染实验仪器、操作环境导致的假阳性结果。但缺点是单位均检测成本要高于 RRT-PCR, 所以有条件的实验室, 最适合的技术还是 RRT-PCR。

3.1.4 环介导的等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP): Poon 等^[38]介绍了一种新的更加简便的扩增方法, LAMP 即环介导的等温扩增技术检测流感 A, 特异性地针对 6 个独立的结合位点设计 2 对引物扩增, 以看家基因或外源性 RNA 分子

作为阳性参照, 检测了 H1 ~ H3 的 AIV, 与常规方法比较符合率为 100%。由于反应中产生大量焦磷酸镁, 可以肉眼判断结果, 也可用结合双链 DNA 的荧光染料 SYBR Green I 染色, 于紫外灯下观察判断, 无需凝胶电泳。Imai 等^[39]报道了检测 H5N1 的 RT-LAMP 方法, 可以检测 0.01 PFU 的病毒, 敏感性是传统 RT-PCR 的 100 倍。LAMP 技术不需要昂贵的仪器设备, 特别适用于第一现场或条件较差的实验室。

3.2 基因芯片

将 RT-PCR 获得的病毒各种基因的 cDNA 或合成的特异性寡核苷酸探针固化于芯片, 利用核酸杂交技术可构建检测流感病毒 A、B 及其亚型的芯片平台, Cy3、Cy5 标记待检的 cDNA 或扩增的 DNA 与芯片杂交, 检测病毒核酸或进一步鉴别混合体系中扩增产物。理论上单次杂交可以检测多种病毒, 并有潜力进行成千上万种核酸序列的筛选。该项技术目前主要应用在人流感。Li 等^[40]用 cDNA 芯片及 mRT-PCR 对流感病毒进行检测及分型, 结果显示 cDNA 芯片为基于 PCR 的诊断技术提供了补充, 因为基于 PCR 的方法, 直接从 DNA 扩增片段大小不足以证明是目的产物。短探针的应用能更好地分辨近亲的相关病毒并证实某些遗传性特征包括 H1/H3 亚型^[41]。王秀荣等^[42]依据 M 蛋白进行基因型别鉴定和 HA 基因亚型鉴定, 用 Cy5 荧光标记, 在基因芯片平台上构建检测 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒 (AIV) 的实验技术模型, 检测 AIV 的 cDNA, 杂交达到预期结果。Kessler 等^[43]考虑到三维芯片潜在的优势 (因其增加了几何面积, 使反应效率提高, 同时动态的流质也使杂交时间缩短), 将芯片技术进一步改进, 建立了检测流感病毒 A、B 的三维芯片平台, 通过比较实验, 选择了特异性强的随机 RT-PCR 扩增方法, 和低背景的化学发光检测方法, 检测了 AIV (H1N1、H1N2、H3N2、H5N1) 和流感病毒 B, 特异性好, 全部检测过程不超过 5 h。目前基因芯片技术在流感的检测中还远远低于其它检测方法, 且检测成本及硬件要求均较高, 离实际应用还有很长的路要走。

4 展望

最近流感的爆发流行使改进已有的检测技术及发展新的快速诊断技术显得非常必要, 因为对

控制流行而言,时间就是生命。分子诊断策略的应用,提供了快速准确的手段来检测致病性禽流感,并且还有极大的提升空间。但有必要根据 OIE 的指导方针来建立一个实施这些新方法的恰当的标准,并且发展出能用于现场的快速、准确、稳定、简单及经济的检测方法。由于流感病毒的变异,我们所面临的最大挑战是,有能力检测今天的病毒,而不仅仅是昨天的。前面所述免疫方法不能检测新变异的病毒株,而病毒分离及现有的分子诊断方法也可能漏检。流感病毒的丰度表达的 NS1 病毒蛋白,可介导入侵并抑制宿主干扰素相关的抵抗力,但在禽流感这种蛋白似乎以特殊的形式存在,可以创建仅结合此特殊形式蛋白质的检测方法,使我们不仅能检测今天的,也能检测明天的病毒,这种方法也许今年我们不需要它,但将来我们一定得拥有它!

参考文献

- [1] Zambon MC. Rev Med Virol, 2001, **11** : 227 ~ 241.
- [2] Hien TT, de Jong M, Farrar J. N Engl J Med, 2004, **351** : 2363 ~ 2365.
- [3] Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2004, **101** : 1356 ~ 1361.
- [4] Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, *et al.* N Engl J Med, 2004, **350** : 1179 ~ 1188.
- [5] Stone B, Burrows J, Schepetiuk S, *et al.* J Virol Methods, 2004, **117** : 103 ~ 112.
- [6] Peiris JS, Yu WC, Leung CW, *et al.* Lancet, 2004, **363** : 617 ~ 619.
- [7] Xu X, Jin M, Yu Z, *et al.* J Clin Microbiol, 2005, **43** : 1953 ~ 1955.
- [8] Stephenson I, Wood JM, Nicholson, *et al.* J Med Virol, 2003, **70** : 391 ~ 398.
- [9] Meijer A, Bosman A, van de Kamp EEHM, *et al.* J Virol Methods, 2006, **132** : 113 ~ 120.
- [10] Deragt D, Furukawa-Stoffer TL, Tokaryk KL, *et al.* J Virol Methods, 2006, **137** : 88 ~ 94.
- [11] De Marco MA, Foni GE, Campitelli L, *et al.* Avian Dis, 2003, **47** : 861 ~ 866.
- [12] Jin M, Wang G, Zhang R, *et al.* Avian Dis, 2004, **48** : 870 ~ 878.
- [13] Shafer AL, Katz JB, Eernisse KA. Avian Dis, 1998, **42** : 28 ~ 34.
- [14] Starick E, Werner O, Schirmeier H, *et al.* J Vet Med, 2006, **B 53** : 370 ~ 375.
- [15] 郑其升, 刘华雷, 张晓勇, 等. 中国病毒学, 2005, **20**(3) : 293 ~ 297.
- [16] Terebuh P, Adija A, Katz J, *et al.* 2002. Options for the Control of Influenza V (abstract, 2003, W01P-72).
- [17] 郭元吉, 王敏, 张烨, 等. 2006, **20**(2) : 3 ~ 7.
- [18] Lee CW, Suarez DL. J Virol Methods, 2004, **119** : 151 ~ 158.
- [19] Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, *et al.* Emerg Infect Dis, 2005, **11** : 201 ~ 209.
- [20] Starick E, Romer-oberdorfer A, Werner O. J Vet Med Infect Dis Vet Public Health, 2000, **47** : 295 ~ 301.
- [21] Lee MS, Chang PC, Shien JH, *et al.* J Virol Methods, 2001, **97** : 13 ~ 22.
- [22] Phipps LP, Essen SC, Brown IH. J Virol Methods, 2004, **122** : 119 ~ 122.
- [23] Malik YS, Patnayak DP, Goyal SM. J Vet Diagn Invest, 2004, **16** : 244 ~ 248.
- [24] Yamada A, Lam L, Tam JS. International Congress Series, 2004, **1263** : 381 ~ 385.
- [25] Xie ZX, Pang YS, Liu JB, *et al.* Molecular and Cellular Probes, 2006, **20** : 245 ~ 249.
- [26] Wei HL, Bai GR, Mweene AS, *et al.* Virus Genes, 2006, **32** : 261 ~ 267.
- [27] Bellau-pujol S, Vabret A, Legrand L, *et al.* J Virol Methods, 2005, **126** : 53 ~ 63.
- [28] Fouchier RAM, Besterbroer TM, Herfst S, *et al.* J Clin Microbiol, 2000, **38** : 4096 ~ 4101.
- [29] Cattoli G, Drago A, Maniero S, *et al.* Avian Pathol, 2004, **33** : 432 ~ 437.
- [30] Schweiger B, Zadow I, Heckler R, *et al.* J Clin Microbiol, 2000, **38** : 1552 ~ 1558.
- [31] Poddar SK. J Virol Methods, 2002, **99** : 63 ~ 70.
- [32] Di Trani L, Bedini B, Donatelli I, *et al.* BMC Infectious Diseases, 2006, **6** : 87 (doi : 10. 1186/1471-2334-6-87 or <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/87>).
- [33] Collins RA, Ko LS, So KL, *et al.* J Virol Methods, 2002, **103** : 213 ~ 225.
- [34] Lau LT, Bank J, Aherne R, *et al.* Biochem Biophy Res Commun, 2004, **313** : 336 ~ 342.
- [35] Shan S, Ko LS, Collins RA, *et al.* Biochem Biophy Res Commun, 2003, **302** : 377 ~ 383.
- [36] Collins RA, Ko LS, Fung KY, *et al.* Biochem Biophy Res Commun, 2003, **300** : 507 ~ 515.
- [37] Moore C, Hibbitts S, Owen N, *et al.* J Med Virol, 2004, **74** : 619 ~ 628.
- [38] Poon LLM, Leung CSW, Chan KH, *et al.* J Clin Microbiol, 2005, **43** : 427 ~ 430.
- [39] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, *et al.* Vaccine, 2006, doi : 10. 1016/j.vaccine.2006.05.046 (Epub ahead of print).
- [40] Li JP, Chen S, Evans DH. J Clin Microbiol, 2001, **39** : 696 ~ 704.
- [41] Sengupta S, Onodera K, Lai A, *et al.* J Clin Micro, 2003, **41** : 4542 ~ 4550.
- [42] 王秀荣, 邓国华, 于康震, 等. 中国农业科学, 2005, **38**(2) : 394 ~ 398.
- [43] Kessler N, Ferraris O, Palmer K, *et al.* J Clin Microbiol, 2004, **42** : 2173 ~ 2185.