

单纯疱疹病毒性角膜炎的实验室检查现状及进展

马君鑫, 周如侠, 王林农

基金项目: 2012年南京市医学重点科技发展项目(No. ZKX12022)
作者单位: (210006) 中国江苏省南京市, 南京医科大学附属南京
医院眼科

作者简介: 马君鑫, 在读硕士研究生, 研究方向: 角膜病。
通讯作者: 王林农, 本科, 主任医师, 研究方向: 角膜病、白内障、
眼底病、青光眼。linnongwang@aliyun.com
收稿日期: 2013-09-03 修回日期: 2013-11-10

关键词: 单纯疱疹病毒性角膜炎; 诊断; 实验室检测技术
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.12.14

引用: 马君鑫, 周如侠, 王林农. 单纯疱疹病毒性角膜炎的实验室检查现状及进展. 国际眼科杂志 2013; 13(12): 2414-2417

Progress on the diagnosis of herpes simplex keratitis

Jun-Xin Ma, Ru-Xia Zhou, Lin-Nong Wang

Foundation item: Key Science and Technology Development Program on Medicine of Nanjing in 2012(No. ZKX12022)

Department of Ophthalmology, Nanjing Hospital Affiliated of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Lin-Nong Wang. Department of Ophthalmology, Nanjing Hospital Affiliated of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. linnongwang@aliyun.com

Received: 2013-09-03 Accepted: 2013-11-10

Abstract

• Herpes simplex keratitis (HSK) is the leading cause of infectious blindness. In general, diagnosis of HSK is based on clinical findings, which often are not confirmatory. With the development of molecular biology, a variety of laboratory methods that helped in achieving a diagnosis including *in vivo* confocal microscopy (IVCM), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), real-time polymerase chain reaction (rt-PCR), nested PCR and multiplex PCR. They are considered as accurate and fast diagnostic techniques, thus characteristics of these are reviewed in this paper.

• KEYWORDS: herpes simplex keratitis; diagnosis; laboratory techniques

Citation: Ma JX, Zhou RX, Wang LN. Progress on the diagnosis of herpes simplex keratitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013; 13(12): 2414-2417

摘要

单纯疱疹病毒性角膜(herpes simplex keratitis, HSK)是一种严重的感染性致盲性眼病。过去HSK的诊断主要依据临床特征,然而这并不可靠。随着分子生物学的发展,目前对于单纯疱疹病毒性角膜炎的诊断有了突飞猛进的发展。共焦显微技术、环媒恒温扩增技术、实时荧光探针定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、巢式PCR(nested PCR)及多重聚合酶链式反应(multiplex PCR)等被认为是较敏感且快速的诊断方法。

0 引言

单纯疱疹病毒性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)的复发率高、致盲率高,是当今最严重的感染性眼病之一^[1]。此病多由单纯疱疹I型病毒(HSV-1)感染所致,分为原发和复发两种类型。原发感染常发生于幼儿,表现为唇部疱疹、皮肤疱疹或急性滤泡性结膜炎。原发感染后病毒通常潜伏在三叉神经节或者角膜内,当机体抵抗力下降时,如发烧、疲劳、月经、局部用皮质类固醇或创伤刺激之后,病毒活化,引起多种形式的角膜炎,最大的特点是易反复发作。此病在发达国家的发病率为 $6/10^5 \sim 20/10^5$,患病率为 $149/10^5$ ^[2]。复发性HSV-1感染通常表现为溃疡性角膜炎或基质型角膜炎,角膜基质细胞免疫反应引起的炎症常致使角膜新生血管形成、角膜水肿、角膜组织损害、角膜混浊并最终导致失明。我国谢立信教授将HSK分为3种类型:上皮型角膜炎,基质型角膜炎,内皮型角膜炎。目前国际上的分类有所改变,美国密尼苏达大学眼科的Holand教授等于1999年将HSK分为4种类型:上皮型角膜炎,基质型角膜炎,内皮型角膜炎,神经营养型角膜炎^[3]。过去HSK的诊断主要依据病史询问,典型的症状和体征,但由于该病临床表现较为复杂多变,恰当或不恰当药物的多次使用后,病变变得不典型,对确诊造成困难,容易漏诊或者误诊^[4]。随着生物分子学的进展,实验室检查将成为临床确诊的重要依据。我们将对HSK实验室检测技术现状及进展做一个综述。

1 现状

目前常用的实验室HSK诊断方法为:病毒分离(virus isolation)、涂片法、电镜法、免疫技术、分子技术等。

1.1 病毒分离 病毒分离过去一度被认为是诊断病毒感染的“金标准”。Shimeld^[5]于1982年首次从人类角膜中分离出HSV-1,后Easty等^[6]于1987年从慢性基质型角膜炎中分离出HSV-1。病毒分离是以组织的活细胞为母体,使活病毒得到扩增,引起宿主细胞病变。HSV具有严格的细胞内寄生性,可在多种细胞中培养,增殖后可产生典型的致细胞病变作用(cytopathic effect, CPE)。一般接种标本1~2d后可观察到CPE,即宿主细胞出现细胞肿胀,变圆并成为巨细胞,融合细胞内可见嗜酸性核内包涵体及染色体的畸变。此方法一度被认为是最准确,最可靠的方法。由于此方法检出率较低,目前有学者认为可通过选择接种细胞提高其敏感性。过去人们常利用原代细胞株如兔、地鼠肾细胞,或利用传代细胞株如Hela, Vero, MA104等细胞进行培养,最近有人使用兔角膜上皮细胞

系或人类角膜上皮细胞系 (human corneal epithelial cell line, HCE) 等做了一系列实验。Athmanathan 等^[7]采集了临床上经过病原学检查确诊为 HSK 的 17 例患者的角膜上皮组织,在 HCE 和 Vero 细胞中培养,分别有 10/17 (58.82%) 和 4/17 (23.52%) 的细胞中出现典型的致细胞病变作用。该实验说明采用 HCE 培养的病毒分离法较采用传统细胞的方法而言,敏感性更高,尤其当病毒含量较少时,无论是定性还是定量,都更具优势。病毒分离并不总是成功的,即便不出现 CPE,也可能是由于局部及全身药物的使用,病毒数量减少而造成,需要盲目传代三次后方可明确,盲目传代对于实验室的要求较高,培养周期较长,细胞易被污染。如果潜伏期病毒未复制,病毒颗粒不高,仍可造成假阴性,采用组织活化培养后,可提高其敏感性^[8]。病毒分离技术需要花费较长的时间^[9],对于标本的运输,培养的细胞及实验室设备的要求都较高,因此只能在有条件的医院或者实验室开展。

1.2 涂片法 直接采集病变标本在光镜下检查。通常取病变角膜与正常角膜交接处的上皮组织,采用 Giemsa 染色或 Papanicolaou 染色。若发现有多核巨细胞则高度提示 HSK,此方法操作简单便宜,但敏感性及特异性都不高,不能排除其他病毒感染,故不适于临床大规模检测使用。

1.3 电镜法 直接使用电镜对标本中的病毒颗粒进行形态学观察。现在有人选择使用免疫电镜技术 (immunoelectron microscopy, IEM),即先将标本通过和特异性抗血清相混合,使病毒颗粒凝集,从而提高检出率^[10]。此法可以让我们真实的看到病毒颗粒的存在,但由于病毒颗粒较小,电镜技术对于病毒颗粒的浓度要求高,而且电镜设备价格昂贵,对于使用者的经验要求较高,故不适于临床大规模检测使用。

1.4 免疫法

1.4.1 免疫荧光技术 根据免疫荧光 (fluorescence immunoassay, FIA) 显微镜下显示出荧光素 (通常为异硫氰酸) 标记的抗体与标本中的病毒抗原结合而成的复合物而诊断。可分为直接免疫荧光技术和间接免疫荧光技术。直接免疫荧光技术即以荧光素标记的 HSV-1 特异性抗体直接与标本中的病毒抗原相结合。间接免疫荧光是以未标记的特异性抗体 (第一抗体) 先与标本中的病毒抗原结合,然后加入荧光素标记的针对第一抗体的免疫球蛋白 (第二抗体)。Kaufman 等^[11]将免疫荧光技术应用于诊断 HSK,并以组织培养分离病毒作为对照,实验结果表明两者相符。说明免疫荧光检查在一定程度上可代替病毒分离的方法。免疫荧光技术的检测时间较短,通常 1~2h 内便可得出结果^[12]。跟病毒分离相比,对于标本的储存较方便;跟涂片法相比,敏感度更高;跟普通电镜法相比,对于病毒颗粒的浓度要求较低。直接免疫荧光法特异性强,需要高效价的血清进行结合;间接免疫荧光法因为第一抗体增加了标记的第二抗体的附着面积,所以较直接法敏感,但由于反应体系中增加了试剂,特异性降低。此方法适用于快速诊断,由于我国广大地区缺乏荧光显微镜所以暂时无法广泛开展此技术。

1.4.2 酶免疫技术

1.4.2.1 酶免疫法 酶免疫法 (enzyme immunoassay assay, EIA) 利用特异性抗病毒血清检测病毒抗原。常用的有间接过氧化物酶-抗过氧化物酶法 (the indirect peroxidase-antiperoxidase method, PAP) 及直接过氧化物酶法 (direct

peroxidase method, DIP)。主要在抗体上标记特定酶,通过滴加供酶反应的底物,产生普通光学显微镜能识别的有色产物而测出病毒抗原。肉眼或分光光度计做定性或定量分析。较免疫荧光法而言,原理相似,但无需使用荧光显微镜。目前通常采用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),即将已知特异性抗体或抗原吸附于固相载体上,加入辣根过氧化物酶偶联的特异性抗体或抗原,最后加入酶的底物如邻苯二胺,免疫复合物的酶催化作用使底物呈颜色反应。Huang 等^[13]最新研究表明:使用 ELISA 技术检测 41 例基质型单纯疱疹性角膜炎患者泪液中的 sIgA 并观察其治疗后 4mo~1a 的复发率,结果表明 36.59% 的患者泪液中发现 sIgA,且这些患者更易复发,而对照组都未检测出 sIgA。ELISA 法较传统方法相比,特异性和敏感性都较高,而且价格较为便宜,目前临床上普遍制成试剂盒后使用。

1.4.2.2 单克隆抗体技术 单克隆抗体技术 (monoclonal antibody technique, McAb) 使免疫反应增强,更单一,故 HSV 的抗原检测的敏感性及特异性得到了很大的提高。Bordin 等^[14]采用免疫荧光 McAb 技术检测 42 例临床上诊断为 HSK 的患者角膜上皮组织,发现 38 例为阳性 (90.5%),而对照组都为阴性。说明此技术的敏感性和特异性都较高,但目前单抗技术尚欠成熟,价格较贵,尚未推广。

1.5 分子技术

1.5.1 核酸杂交技术 核酸杂交技术 (nucleic acid hybridization) 采用特异性 HSV DNA 标记探针与固定在适当的载体如硝酸纤维素膜或尼龙膜上的待测标本的核酸单链进行杂交,通过放射显影或显色方法判断待测核酸与探针是否同源。谢立信等曾使用核酸杂交技术证明角膜是 HSV-1 病毒的潜伏场所^[15]。目前多采用核酸杂交技术与聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 相结合,McKechnie 等^[16]认为核酸杂交技术与多重聚合酶链式反应 (multiplex PCR) 相结合,可以更敏感,更迅速,更方便并且相对便宜的检测出 HSV-1 病毒。

1.5.2 聚合酶链式反应 聚合酶链式反应 (polymerase Chain Reaction, PCR) 基于 DNA 的复制原理在体外扩增 HSV DNA 而实现的^[17]。有常规 PCR、实时荧光 PCR 技术 (real-time PCR, rt-PCR)、巢式 PCR (nested PCR)、多重 PCR 技术 (multiplex PCR) 等。可自己设计或购买试剂盒。通常采用泪液,病变角膜上皮组织,房水等作样本。Satpathy 等^[8]采集临床上高度怀疑为 HSK 的 229 例患者的泪液及 153 例患者的泪液和角膜组织,使用间接免疫荧光技术,病毒分离 (Hep2 细胞中培养) 及 PCR 技术,检测样本中病毒的阳性率。间接免疫荧光技术检测出泪液中 HSV 阳性率为 31/229 (13.53%),角膜上皮中 HSV 阳性率为 35/153 (22.87%);病毒分离技术检测出泪液中 HSV 阳性率为 12/229 (5.2%),角膜上皮中 HSV 阳性率为 17/153 (11.11%),PCR 技术检测出泪液中 HSV 阳性率为 32/229 (13.97%),角膜上皮中 HSV 阳性率为 56/153 (36.66%)。Gita 认为角膜上皮中 HSV 阳性率较泪液中更高,PCR 技术较间接免疫荧光技术和病毒分离技术的敏感性更强。

2 最新进展

2.1 共焦显微镜检查 直接采集病变标本在共焦显微镜 (in vivo confocal microscopy, IVC) 下观察。随着技术的

进步,越来越多的学者考虑使用共焦显微镜观察活动期或者静止期的单纯疱疹病毒性角膜炎中角膜上皮细胞的形态和炎症反应。Hamrah等^[18]通过使用共焦显微镜观察了31例临床上被诊断为急性或慢性单纯疱疹病毒性角膜炎的患者,认为HSK患者的角膜下神经丛密度较正常人的减少,这与角膜知觉的减退之间有关^[19]。Mocan等^[20]对此做了进一步的补充和说明,认为随着角膜炎反应,细胞向角膜各层渗漏,角膜下神经丛密度降低,内皮细胞数量减少。林辉等^[21]通过共焦显微镜观察28例单眼患病的HSK静止期患者中泪膜破裂时间小于5s的患眼,认为HSK静止期患者多存在泪膜改变,活体共焦显微镜可见泪膜功能异常者出现与干眼类似的角膜上皮细胞及上皮下神经纤维的形态学改变。共焦显微镜虽然可以发现HSK患者角膜形态学异常并随访恢复情况,但对于HSK的诊断无特异性。

2.2 环媒恒温扩增法 环媒恒温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新式的恒温核酸扩增方法,由Notomi于2000年研发。原理为设计4种引物,特异性识别靶基因上6个不同的序列区域,利用链置换DNA聚合酶(Bst DNA polymerase)扩增靶基因(恒温条件下一小时内可扩增靶基因的109倍),后用凝胶电泳检测扩增产物^[22]。Sugiyama等利用此法与t-PCR和“金标准”病毒培养法检测38例疑似HSV-1感染的生殖器皮损样品,结果显示:与病毒培养相比,LAMP的敏感性较高;与rt-PCR相比,LAMP的敏感性较低^[23]。但当LAMP扩增时间从30min变为60min的时候,敏感性明显的有大幅提高^[24]。随着LAMP设备的改善,更多研究^[25]表明LAMP在病毒含量较少时,在定性和定量上都更具优势,且其敏感性与rt-PCR相差不大。

2.3 PCR技术的改进

2.3.1 过程的简化 常规PCR需首先提取样品DNA为扩增提供模板,目前在最大化减少样品中的抑制物后可应用PCR直接检测样品,从而节约时间^[26]。

2.3.2 rt-PCR 在PCR反应体系中加入特异性荧光探针(如TaqMan探针)和引物,从而提高特异度,假阳性率降低,更加快速准确^[27]。Zuzana等收集了212例临床高度怀疑为HSK的患者泪液和角膜上皮组织,进行rt-PCR,结果表明在第一治疗时,85例为阳性,127例为阴性。随着治疗的进行,阳性率逐渐下降^[28]。Akiko等更进一步检测了取自90例HSK患者的144份样本(包括角膜上皮,泪液,房水),认为在典型的上皮型角膜炎中,角膜上皮组织中可见 1.0×10^7 copies,泪液中可见 3.5×10^5 copies,在不典型的上皮型角膜炎,病毒含量较少;在基质型角膜炎,病毒含量远较上皮型角膜炎少,泪液中可见 4.7×10^2 copies;在内皮型角膜炎中,房水中病毒含量较少,仅有 2.9×10^2 copies/ μL ,若合并虹膜睫状体炎,则病毒含量变化较大, $(1.2 \sim 4.8) \times 10^5$ copies/ μL ^[29]。Jazeron等^[30]、Zuzana等进一步说明rt-PCR技术是近几年发展起来的新技术,具有高敏感性、高特异性和高精确性等优点,它克服了传统PCR技术中存在的假阳性感染和不能进行准确定量的缺点,在疾病诊断、预后监测等方面有着广泛的应用前景^[28,31]。

2.3.3 巢式PCR 在常规PCR技术基础上改进和发展起来的一种新型扩增技术,即在同一PCR反应体系内加入两对特异性引物,第一对PCR引物扩增片段和普通PCR

相似。第二对引物称为巢式引物(因为他们在第一次PCR扩增片段的内部)结合在第一次PCR产物内部,使得第二次PCR扩增片段短于第一次扩增^[32]。优点在于如果第一次扩增产生了错误片断,则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低。但价格较贵,引物设计较为繁琐。哈达等^[33]通过巢式PCR检测非生殖器官部位Bowen病HPV DNA,在病毒含量较低时仍能检测,说明巢式PCR在扩增模板中病毒含量较低时,为了提高检测灵敏度和特异性而采用的。这种方法较一般PCR更加敏感,适用于病毒核酸的扩增。

2.3.4 多重PCR 一种新型PCR技术,在同一PCR反应体系里加上二对以上引物,同时扩增出多个核酸片段的PCR反应,其反应原理,反应试剂和操作过程与一般PCR相同。Weidmann等^[34]设计了TaqMan探针引导的多重PCR,用来检测样本中HSV-1、HSV-2和带状疱疹病毒(HZV)。认为多重PCR具有高效性,可在同一PCR反应管内同时检出多种病毒,速度快,敏感性高,节省试验原料。但由于多重PCR引物设计较困难,故目前临床使用尚未推广。

3 小结

HSK是一种高复发率和高致盲性疾病,及时准确诊断和有效治疗十分重要。因为其临床表现常不典型,易漏诊误诊,故快速而且灵敏的实验室诊断技术非常必要。病毒分离法曾为诊断病毒感染的“金标准”,但检出率较低,花费时间长;涂片法较为方便,但敏感性及特异性都不高;电泳法对病毒含量要求较高,对设备要求亦较高,以上三种方法都不适合推广。共焦显微镜检查可以发现病灶的形态学改变,但对于HSK的诊断无特异性,可用作辅助检查。免疫法特异性和敏感性都较高,目前临床上普遍联合分子技术制成试剂盒后使用。巢式PCR设计较为复杂,可在扩增模板中病毒含量较低时,为了提高检测灵敏度和特异性而使用;多重PCR可检测多种病毒,速度快,敏感性高,但引物设计较困难,可用作鉴别诊断;LAMP法、rt-PCR能够较快速有效的筛检患者且阳性率相对较高,即便价格较高、对技术的要求较高,仍值得普及推广。目前尚缺少对种检测方法关于灵敏度、特异度、可行性、阳性率和阴性率等的比较性研究,以便为眼科临床工作者在HSK的诊断和治疗中提供决策性的依据。

参考文献

- 1 张晓英,李凌.单纯疱疹病毒性角膜炎的研究新进展.国际眼科杂志2011;11(3):439-441
- 2 王欣,徐建江,乐琦骅,等.更昔洛韦胶囊治疗单纯疱疹病毒性角膜炎的临床观察.中华眼科杂志2010;46(11):994-999
- 3 Nagasato D, Araki-Sasaki K, Kojima T, et al. Morphological changes of corneal subepithelial nerve plexus in different types of herpetic keratitis. *Jpn J Ophthalmol* 2011;55(5):444-450
- 4 Yoon KC, Im SK, Park HY. Recurrent herpes simplex keratitis after verteporfin photodynamic therapy for corneal neovascularization. *Cornea* 2010;29(4):465-467
- 5 Shimeld C, Tullo AB, Easty DL, et al. Isolation of herpes simplex virus from the cornea in chronic stromal keratitis. *Br J Ophthalmol* 1982;66(10):643-647
- 6 Easty DL, Shimeld C, Claoue CM, et al. Herpes simplex virus isolation in chronic stromal keratitis: human and laboratory studies. *Curr Eye Res* 1987;6(1):69-74
- 7 Athmanathan S, Reddy SB, Nutheti R, et al. Comparison of an immortalized human corneal epithelial cell line with Vero cells in the

isolation of Herpes simplex virus-1 for the laboratory diagnosis of Herpes simplex keratitis. *BMC Ophthalmology* 2002;2:3

8 Satpathy G, Mishra AK, Tandon R, et al. Evaluation of tear samples for Herpes Simplex Virus 1 (HSV) detection in suspected cases of viral keratitis using PCR assay and conventional laboratory diagnostic tools. *Br J Ophthalmol* 2011;95(3):415-418

9 Kowalski RP, Thompson PP, Cronin TH. Cell culture isolation can miss the laboratory diagnosis of HSV ocular infection. *Int J Ophthalmol* 2010;3(2):164-167

10 Meyers-Elliott RH, Pettit TH, Maxwell WA. Viral antigens in the immune ring of Herpes simplexstromal keratitis. *Arch Ophthalmol* 1980;98(5):897-904

11 Kaufman HE, Haw WH. Ganciclovir ophthalmic gel 0.15%: safety and efficacy of a new treatment for herpes simplex keratitis. *Curr Eye Res* 2012;37(7):654-660

12 Goldschmidt P, Rostane H, Saint-Jean C, et al. Effects of topical anaesthetics and fluorescein on the real-time PCR used for the diagnosis of Herpesviruses and Acanthamoeba keratitis. *Br J Ophthalmol* 2006;90(11):1354-1356

13 Huang FF, Wang ZJ, Zhang CR. Tear HSV-Specificsecretory IgA as a potential indicator for recurrent stromal herpes simplex keratitis: a preliminary study. *Cornea* 2013;32(7):987-991

14 Bordin P, Merlin U, Pugina P, et al. Reliability of the herpes simplex virus immunofluorescent test in corneal disease. *Eur J Ophthalmol* 1992;2(4):175-178

15 Li S, Xie L, Dong X. An experimental study on HSV-1 corneal latency by *in situ* nucleic acid hybridization. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 1995;31(5):366

16 McKechnie ML, Hillman R, Couldwell D, et al. Simultaneous identification of 14 genital microorganisms in urine by use of a multiplex PCR-based reverse line blot assay. *J Clin Microbiol* 2009;47(6):1871-1877

17 Chudzik E, Karabin K, Dzieciatkowski T, et al. Development of a novel real-time PCR method for detection of HSV types 1 and 2 DNA using HybProbe chemistry. *Med Dosw Mikrobiol* 2010;62(3):255-262

18 Hamrah P, Cruzat A, Dastjerdi MH, et al. Corneal sensation and subbasal nerve alterations in patients with herpes simplex keratitis: an *in vivo* confocal microscopy study. *Ophthalmology* 2010;117(10):1930-1936

19 Hamrah P, Sahin A, Dastjerdi MH, et al. Cellular changes of the corneal epithelium and stroma in herpes simplex keratitis: an *in vivo* confocal microscopy study. *Ophthalmology* 2012;119(9):1791-1797

20 Mocan MC, Irkec M, Mikropoulos DG, et al. *In vivo* confocal microscopic evaluation of the inflammatory response in non-epithelial

herpes simplex keratitis. *Curr Eye Res* 2012;37(12):1099-1106

21 林辉,刘祖国,李炜,等.单纯疱疹病毒性角膜基质炎静止期泪膜改变的初步观察. *中华眼科杂志* 2010;46(9):785-790

22 Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *J Infect Chemother* 2013;19(3):404-411

23 Chen HJ, Zhang J, Ma LN, et al. Rapid pre-clinical detection of classical swine fever by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Mol Cell Probes* 2009;23(2):71-74

24 Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc* 2008;3(5):877-882

25 Reddy AK, Balne PK, Reddy RK, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of retinitis caused by herpes simplex virus-1. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(2):210-213

26 Pandori MW, Lei J, Wong EH, et al. Real-Time PCR for detection of herpes simplex virus without nucleic acid extraction. *BMC Infect Dis* 2006;6(1):104-104

27 陈志永,肖建鹏,马莉珍,等. RT-PCR 与 SYBR Green 实时 RT-PCR 方检测乙型脑炎病毒的比较. *实用医学杂志* 2010;26(5):718-721

28 Hlinomazová Z, Loukotová V, Horáčková M, et al. The treatment of HSV1 ocular infections using quantitative real-time PCR results. *Acta Ophthalmol* 2012;90(5):456-460

29 Kakimaru - Hasegawa A, Kuo CH, Komatsu N, et al. Clinical application of real-time polymerase chain reaction for diagnosis of herpetic diseases of the anterior segment of the eye. *Jpn J Ophthalmol* 2008;52(1):24-31

30 Jazeron JF, Barbe C, Frobert E, et al. Virological diagnosis of herpes simplex virus 1 esophagitis by quantitative real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2012;50(3):948-952

31 vander Beek MT, Claas EC, van der Blij-de Brouwer CS, et al. Rapid susceptibility testing for herpes simplex virus type 1 using real-time PCR. *J Clin Virol* 2013;56(1):19-24

32 Takahashi T, Tamura M, Miki K, et al. Varicella zoster virus myelitis in two elderly patients: diagnostic value of nested polymerase chain reaction assay and antibody index for cerebrospinal fluid specimens. *Case Rep Neurol* 2013;5(1):81-90

33 哈达,孔迎辉,魏焯平,等.巢式 PCR 方法检测非生殖器部位 Bowen 病 HPV DNA. *中华皮肤科杂志* 2012;45(2):99-101

34 Weidmann M, Armbruster K, Hufert FT. Challenges in designing a Taqman-based multiplex assay for the simultaneous detection of Herpes simplex virus types 1 and 2 and Varicella-zoster virus. *J Clin Virol* 2008;42(4):326-334