

病毒性脑炎诊断的最新进展

姜 博^{1*}, 王玲玲², 庞未丽^{2,3#}

¹北华大学附属医院泌尿外科, 吉林 吉林

²北华大学附属医院神经内科, 吉林 吉林

³武汉市江夏区第一人民医院神经介入科, 湖北 武汉

收稿日期: 2024年7月5日; 录用日期: 2024年7月29日; 发布日期: 2024年8月7日

摘 要

病毒性脑炎是中枢神经系统常见的感染性疾病。目前主要通过患者的临床表现、脑电图、脑脊液检查, 同时结合影像学 and 病原学检查结果确诊。部分患者治疗后遗留有精神症状、癫痫等的神经系统后遗症, 严重影响患者的预后。因此, 早期诊断并优化治疗方案是降低疾病不良预后的关键。本文就病毒性脑炎诊断技术的最新进展做一综述。

关键词

病毒性脑炎, 癫痫, 诊断, 预后

Advances in the Diagnosis of Viral Encephalitis

Bo Jiang^{1*}, Lingling Wang², Weili Pang^{2,3#}

¹Department of Urology, Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin Jilin

²Department of Neurology, Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin Jilin

³Department of Neurointervention, The First People's Hospital of Wuhan Jiangxia District, Wuhan Hubei

Received: Jul. 5th, 2024; accepted: Jul. 29th, 2024; published: Aug. 7th, 2024

Abstract

Viral encephalitis is a prevalent infectious disorder of the central nervous system. Recently, the diagnosis was confirmed by clinical manifestations, EEG, cerebrospinal fluid examination, com-

*第一作者。

#通讯作者。

combined with imaging and etiological examination results. Some patients have neurological sequelae such as residual mental symptoms and epilepsy after treatment, which seriously affect the prognosis. Therefore, early diagnosis and optimal treatment are key to reducing the adverse prognosis of the disease. This article reviews the latest progress in the diagnosis of viral encephalitis.

Keywords

Viral Encephalitis, Epilepsy, Diagnosis, Prognosis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

病毒性脑炎是中枢神经系统常见的感染性疾病，由各种病毒侵入脑实质引起炎症所致，临床主要表现为呕吐、头痛、发热、伴有不同程度意识障碍或脑膜刺激征等。疾病呈全球分布，严重影响公共卫生，并且幸存者在长期随访时显示预后较差[1]，部分存在不同程度的后遗症，包括癫痫、瘫痪、智能下降、人格改变等，导致患者生活质量下降，使其成为家庭和社会的负担[2]。因此在疾病发生早期寻找可能导致预后不良的危险因素至关重要。

2. 临床表现

任何年龄均可患病，急性或亚急性起病，病程长短不一，为数日至数月。可有潜伏期，前驱期可有发热、咽痛、乏力，头痛、肌痛、腹痛、腹泻等症状，部分病人可有口唇疱疹史。临床常见症状包括头痛、头晕、恶心、呕吐、惊厥抽搐、意识和人格改变、记忆障碍、运动感觉障碍、失语、偏盲、视神经异常、精神行为异常、脑膜刺激征等，随着疾病进展患者可发生昏迷甚至脑疝。部分患者出现癫痫发作或以精神行为异常为首发或唯一症状，表现为情感淡漠、表情呆滞、行动迟缓、木僵、缄默或有动作增多和冲动行为等。

3. 脑电图

脑电图作为一种无创性检查方法，具有实用性和易操作性，对病毒性脑炎的诊断具有一定价值。脑电图诊断病毒性脑炎的异常率极高，神经细胞受疾病影响会发生功能紊乱，此时脑电图检查就会捕捉到异常的生理改变，国内有研究报道显示，脑电图诊断病毒性脑炎的准确率可达 71.67%~100% [3]。病毒性脑炎异常的脑电图主要表现为基本慢波化，以弥漫性或局限性异常慢波背景活动为特征，阵发性或持续性出现中高波幅 θ 波和 δ 波[4]。据报道，多数病毒性脑炎脑电图有典型异常改变，重症病例可表现为弥漫性棘慢波或低电压，可评价患者的意识状态水平、癫痫活动，甚至脑死亡。

脑电图异常程度与病情轻重大致平行，背景活动为低波幅者症状较重、恢复慢、脑电异常持续时间长、预后比高波幅者差。研究显示脑电图可作为评估病毒性脑炎预后的重要检查手段[5]。在大多数急性脑炎中，脑电图表现为非特异性弥漫性慢活动。但单纯疱疹性脑炎(Herpes Simplex Encephalitis, HSE)慢性病毒感染或朊病毒病等疾病常出现周期性脑电图异常，如周期性同步放电和周期性侧化癫痫样放电。尽管这种异常不是疾病所特有的，但有时是具有诊断性的。近年来，动态脑电图对于病毒性脑炎的诊断在临床的应用逐渐增多。动态脑电图的优势在于可连续 24 小时监测，而常规脑电图由于监测时间短，不能

及时有效地观察到脑部短暂爆发的异常放电时刻,而且在患者睡眠情况下也无法观察到脑电图的异常改变,容易出现漏诊[6]。有研究报道,对比常规脑电图,动态脑电图阳性检出率较高,可准确区分病毒性脑炎患者的病情严重程度,促进其临床预后改善[7]。

4. 脑脊液

脑脊液检查是临床诊断病毒性脑炎的一项重要手段,不同类型脑炎各有不同的特点,虽然脑脊液检查不具有特异性,但其可作为鉴别诊断细菌性、真菌性、癌性等脑炎的一种方式。病毒性脑炎脑脊液常规检查通常表现为:脑脊液压力正常或轻度升高、有核细胞数增多为 $(50\sim 100) \times 10^6/L$,可高达 $1000 \times 10^6/L$,其中以淋巴细胞为主,蛋白质呈轻度或中度增高、葡萄糖与氯化物大多正常。有研究报道脑脊液异常检出率可达 84.6% [8]。脑脊液压力增高在病毒性脑炎早期诊断中优于细胞数增多和蛋白质增高。脑脊液蛋白增高与病情相关,随着病情好转,血脑屏障逐渐修复,脑脊液的蛋白质含量逐渐下降,可用来观察感染程度及疗效[9]。病毒性脑炎脑脊液细胞学检查表现为:外观多为无色透明,多呈淋巴细胞反应型,可见激活淋巴细胞、少量单核细胞、浆细胞、和中性粒细胞,若存在出血可见大量红细胞或红细胞吞噬细胞。镜下可见血管炎症反应,神经细胞肿胀,尼氏小体消失,胞质内出现空泡,核移位,重者可见核碎裂,核溶解,软化灶形成,胶质细胞增生。有时细胞核内可见嗜酸性包涵体,这对病毒性脑炎具有重要的诊断意义。在疾病早期以中性粒细胞为主,以后迅速转化为以淋巴细胞为主[10],嗜中性粒细胞反应持续时间很短(可仅数小时,一般为 24~48 h),而患者就诊时间往往已经超过 48 小时。有研究表明疾病早期单纯小淋巴细胞比例增多,出现数量不一的激活淋巴细胞和浆细胞,恢复以后激活细胞逐渐减少,呈混合细胞反应[11]。

近年来随着临床诊疗技术的提升,脑脊液宏基因组二代测序技术(Metagenomics Next-generation Sequencing, NGS)在临床诊断病毒性脑炎的应用逐渐增多。NGS 每次运行产生数百万到数十亿个 DNA/RNA 序列的能力使宏基因组分析成为可能,其以无偏倚、耗时短、高通量测序、不使用任何探针或引物进行特异扩增,以及在病毒学方面的应用优势突出。理论上所有具有基因组的病原体均可被检测出来。脑脊液 NGS 是通过提取患者脑脊液样本中病原体核酸信息,分析和对比整个已知基因库,从而确定样本所含病原体的类型[12]。如 Feng Hu 等[13]通过 NGS 测定伪狂犬病病毒可导致病毒性脑炎后的双侧坏死性视网膜;Perlejewski K 等[14]在搜索 RNA 病原体时意外发现人类疱疹病毒。脑脊液样品 NGS 也可作为评价治疗效果的半定量方法研究。如 Guo LY 等[15]通过 NGS 测定病毒 DNA 特异读数含量变化评估了病情严重程度与转归。NGS 还可以用于病毒耐药基因分型的检测。Takuya Inagaki 等[16]报道了通过 NGS 对单纯疱疹病毒耐药基因的检测。有研究显示 NGS 的敏感性为 65.79%,特异性为 71.43%。阳性检出率较传统方法高(37.88%比 24.39%) [17]。Zhang JZ [18]表明 NGS 更适用于病因不明脑炎的病原学诊断,而且脑脊液常规检查方法结合 NGS 提高了阳性检出率,扩大了已知病原谱。因此传统脑脊液检查结合 NGS,使诊断结果更加完善。即使 NGS 的结果与传统检测的结果一致,它也可能是有价值的,不仅可以确保传统方法获得的诊断是正确的,而且还可能发现或排除合并感染,特别是在免疫缺陷患者中[19]。

5. 影像学检查

目前常用于诊断病毒性的影像学检查包括:头颅 CT、MRI、DWI、MRS、SWI 等,而常规 X 线检查对病毒性脑炎无诊断价值。病毒侵袭可导致大脑组织的水肿、神经细胞坏死、胶质细胞增生、炎症细胞的浸润,弥漫性脱髓鞘改变[20]。虽然不同病毒类型所致脑炎累积的大脑组织部位不尽相同,如单纯疱疹脑炎病灶主要集中于颞叶、额下区、脑岛及扣带回,而 EB 病毒对基底节区有特殊亲和性,但是大部分病毒性脑炎病变位置主要位于皮层、皮层下及侧脑室周围白质,呈对称或不对称分布。大部分病毒性脑炎患者在头颅 CT 上病灶呈低密度,但急性早期 CT 可表现正常,CT 增强呈不均匀强化。PET-CT 对早期诊断也有帮助,表现为低灌注。

典型异常 MRI 呈弥漫或局限的片状或斑点状,在 T2 加权像上为稍高信号,在 T1 上为稍低信号,在 FLAIR 像上为更为明显的高信号,可见不同程度的脑水肿和占位效应,脑沟变浅、皮质与白质界限分布不清,如果出现出血,可表现为相应信号,SWI 对病灶中的微出血非常敏感,可作为常规 MRI 的补充;在亚急性期以后,由于血脑屏障受损, MRI 增强扫描多呈点状、斑片状或弥漫脑回状强化,累及脑膜炎症时可出现脑膜增厚强化。但是由于颅底骨质伪影干扰及模糊效应等因素的存在,CT 检查对早期病灶显示的敏感性较差。而 MRI 能清楚显示病灶部位、形态及范围,因此 MRI 往往是诊断病毒性脑炎的首选影像学检查方法,研究[21]显示在 MRI 检查中,病毒性脑炎的阳诊检出率高达 92.7%,比 CT 平扫的确诊率高出 14.7%,MRI 诊断价值要高于 CT。因此早期 CT 阴性,做常规 MRI 往往可发现阳性结果。MRI 对于诊断、病情评估及判断预后具有重要价值。

除常规 MRI 外,DWI 对病毒性脑炎也有诊断价值。在急性期,大多数患者病灶侧发生细胞毒性水肿,使弥散受限 DWI 增高、ADC 值降低;在慢性期病灶内开始坏死和脱髓鞘,ADC 值逐渐升高。Sener RN [22]报道了 HSE 有两种不同类型 DWI 结果,类似于细胞毒性水肿的病变和类似于血管源性水肿的病变。前者的患者有爆发性疾病,处于严重的临床状态。后者为早期病例,临床预后良好。DWI 在早期病毒性脑炎病变的检测和病变边界的描述方面优于其他常规诊断 MR 序列,与其他序列相结合,DWI 可能有助于确定疾病的分期。

MRS 是非创伤性地利用化学位移成像对活体组织进行定量分析机体代谢物的一种技术,在临床上广泛用于检查颅脑病变,也适用于病毒性脑炎。MRS 显示病灶部位 NAA/Cr 降低(神经元坏死、缺失所致),Cho/Cr 降低(髓鞘脱失),兴奋性氨基酸、大分子化合物和 MI 峰增高,此为炎症或感染的证据。而代谢性或缺血性疾病不会出现 ml 峰的增高,因此 MRS 也可以作为病毒性脑炎鉴别诊断的手段。有研究报道了 NAA/Cr 比值在疾病早期下降,随着治疗病情好转其比值逐渐升高[23]。彭娟等[24]研究表明大部分病毒性脑炎的 Cho 峰降低,NAA 峰降低,Cr 峰降低相较于对侧正常脑实质。也有报道 Cho 峰增高,可能为炎症导致胶质细胞增生所致[25]。因此 MRS 可为病毒性脑炎提供诊断依据,对评估病情的进展和预后有重要的作用。

6. 病原学检查

虽然病毒分离是诊断病毒性脑炎的“金标准”,但其需在特定的超净实验室进行操作而且价格昂贵、操作复杂、费时费力、病毒分离阳性率低。尽管脑活检可提高阳性检出率,但其是侵入性检查,脑活检会造成脑组织的损失,患者及家属多不易接受,故在临床上病毒分离较难普及,主要用于实验室研究。病毒性脑炎的特异性抗体检测方法包括有 Western 印迹法、间接免疫荧光测定及 ELISA 法。ELISA 法又称酶联免疫吸附实验,因其高敏感度、特异性以及操作简单,目前临床应用较多。IgM 抗体属早期反应性抗体,机体在接触病毒后 3~5 天产生,起病后 1~5 天应用 ELISA 法即可在血及脑脊液中检出[26]。IgM 抗体检测对蜱传脑炎、西尼罗脑炎、乙型脑炎等具有重要的诊断意义。早期和恢复期双份标本 2 次及 2 次以上病毒抗体滴度 4 倍以上升高、滴度在 1:80 以上、血与脑脊液抗体比值 < 40 时均可诊断。但也由于其可检出的病毒种类有限,对于病毒性脑炎的诊断而言,有待进一步研究。

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)是一种用微量的特定核酸片段进行放大扩增的分子生物技术。Debiasi RL 等研究显示 PCR 敏感度、特异度高达 98%、94% [27],作为早期诊断的快速诊断方法,目前已广泛用于检测 DNA 和 RNA 病毒,有学者认为其在临床上可取代病毒分离成为病毒性脑炎诊断的金标准。目前常用的 PCR 技术还包括 RT-PCR、RT-n-PCR、RT-qPCR、mPCR 等。RT-PCR 是利用反转录酶生成 cDNA 进行 PCR 扩增。RT-n-PCR 又称套式 PCR,其优势在于为两次扩增,并使用两对寡核苷酸可以进行更多的循环,从而提高了 PCR 的灵敏度。特异度的提高来自于将两组不同的引物结合

到相同的目标模板上[28]。Pisano MBYONG [29]应用 RT-n-PCR 检测出了委内瑞拉马脑炎新的亚型 VI 型。然而 RT-n-PCR 需要在第二步打开试管,这增加了交叉感染的风险。Shen XX [30]利用引物的退火温度不同,设计出一种单封闭试管套式 PCR,优化了运行条件。RT-n-qPCR 是扩增时对产物荧光信号的实时检测,并同时量化的一种技术[31]。Bhullar 等[32]应用 RT-n-qPCR 检测脑脊液中 HSV-1 病毒,显示载量较高的患者更有可能发生更严重的神经损伤。但其对病毒载量较低的疑似脑炎患者的脑脊液样本检测灵敏度不高。mPCR 的优势在于用一次扩增反应可获得多个目的基因,有学者用 mPCR 实现了日本脑炎病毒基因型 I 与 III 的快速分化[33]。近年来,随着分子生物学技术的飞速发展,PCR 技术在各方面已经趋向成熟,在病原学诊断、预测疾病进展等方面提供了信息和决策依据,其发展前景相当可观。但不同种类的 PCR 技术仍有不同的优缺点,在临床与实验上的应用有待进一步完善与研究。

7. 总结与展望

综上所述,对病毒性脑炎患者的诊断主要包括临床表现、脑电图、脑脊液、影像学、病原体的检查等,其中病原体检测是诊断的金标准,但传统的病原学检测方法阳性率不高,因此需要借助各项辅助检查做综合性的诊断。近年来,随着分子生物学技术研究的深入发展,在诊断病毒性脑炎方面取得了很大进展,基于 PCR 基本原理的新型诊断模式越来越多,为病毒性脑炎的诊断与治疗决策提供了更为可靠的依据。

基金项目

吉林省教育厅科学技术研究项目(JJKH20210062KJ);吉林省发展和改革委员会基金项目(2021C018)。

参考文献

- [1] Venkatesan, A. (2015) Epidemiology and Outcomes of Acute Encephalitis. *Current Opinion in Neurology*, **28**, 277-282. <https://doi.org/10.1097/wco.000000000000199>
- [2] 张少浩,朱勇冬,林麒.病毒性脑炎 217 例症状性癫痫发生风险的预测研究[J].安徽医药,2024,28(7):1430-1434.
- [3] 卢紫芬,曾卓鹏,彭亚娟,等.脑电图鉴别诊断病毒性脑炎及预后评估的应用价值[J].影像研究与医学应用,2021,5(22):235-236.
- [4] 张文化,李艳玲,王亮,等.80 例儿童病毒性脑炎病原学结果、脑电图表现及影像学特征[J].哈尔滨医科大学学报,2024,58(2):198-202.
- [5] 章镭.病毒性脑炎的脑电图分析[J].现代电生理学杂志,2014,21(1):39-42.
- [6] 桂芹,周红梅.脑电图在病毒性脑炎诊断中的临床意义[J].重庆医学,2006,35(22):2027+2029.
- [7] 范连荣.动态脑电图与常规脑电图诊断病毒性脑炎的准确率比照观察[J].影像研究与医学应用,2021,5(6):248-249.
- [8] 严波,张家堂,赵威,等.病毒性脑炎 124 例脑脊液分析[J].解放军医学院学报,2014,35(5):430-432.
- [9] 龚守会,曹治华,宋金辉,等.病毒性脑炎患者脑脊液检测分析[J].脑与神经疾病杂志,2008,16(6):694-696.
- [10] Yong, H.Y.F., Pastula, D.M. and Kapadia, R.K. (2023) Diagnosing Viral Encephalitis and Emerging Concepts. *Current Opinion in Neurology*, **36**, 175-184. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000001155>
- [11] 赵德明.脑脊液细胞学检查对病毒性脑炎的诊断价值[J].蚌埠医学院学报,2002,27(1):45-46.
- [12] Chiu, C.Y. and Miller, S.A. (2019) Clinical Metagenomics. *Nature Reviews Genetics*, **20**, 341-355. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0113-7>
- [13] Hu, F., Wang, J. and Peng, X. (2020) Bilateral Necrotizing Retinitis Following Encephalitis Caused by the Pseudorabies Virus Confirmed by Next-Generation Sequencing. *Ocular Immunology and Inflammation*, **29**, 922-925. <https://doi.org/10.1080/09273948.2019.1704027>
- [14] Perlejewski, K., Popiel, M., Laskus, T., Nakamura, S., Motooka, D., Stokowy, T., et al. (2015) Next-Generation Sequencing (NGS) in the Identification of Encephalitis-Causing Viruses: Unexpected Detection of Human Herpesvirus 1

- While Searching for RNA Pathogens. *Journal of Virological Methods*, **226**, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.09.010>
- [15] Liu, L., Guo, L., Dong, J., Huang, W., Zhao, L., Liu, B., *et al.* (2019) Next-Generation Sequencing Technology as a Powerful Detection and Semi-Quantitative Method for Herpes Simplex Virus Type 1 in Pediatric Encephalitis. *Journal of NeuroVirology*, **26**, 273-276. <https://doi.org/10.1007/s13365-019-00803-5>
 - [16] Inagaki, T., Satoh, M., Fujii, H., Yamada, S., Shibamura, M., Yoshikawa, T., *et al.* (2018) Acyclovir Sensitivity and Neurovirulence of Herpes Simplex Virus Type 1 with Amino Acid Substitutions in the Viral Thymidine Kinase Gene, Which Were Detected in the Patients with Intractable Herpes Simplex Encephalitis Previously Reported. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **71**, 343-349. <https://doi.org/10.7883/yoken.jjid.2018.176>
 - [17] Gu, J., Chen, L., Zeng, C., Yang, X., Pan, D., Cao, H., *et al.* (2022) A Retrospective Analysis of Metagenomic Next Generation Sequencing (mNGS) of Cerebrospinal Fluid from Patients with Suspected Encephalitis or Meningitis Infections. *Journal of Healthcare Engineering*, **2022**, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2022/5641609>
 - [18] Zhang, J., Zheng, P., Sun, H., Dong, J., Li, S., Fan, S., *et al.* (2019) Next-Generation Sequencing Combined with Routine Methods to Detect the Pathogens of Encephalitis/meningitis from a Chinese Tertiary Pediatric Neurology Center. *Journal of Infection*, **78**, 409-421. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.02.011>
 - [19] Wilson, M.R., Sample, H.A., Zorn, K.C., Arevalo, S., Yu, G., Neuhaus, J., *et al.* (2019) Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. *New England Journal of Medicine*, **380**, 2327-2340. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1803396>
 - [20] 王丽敏. 甲泼尼龙冲击联合丙种球蛋白治疗儿童重症病毒性脑炎的临床效果分析[J]. 大医生, 2024, 9(3): 55-57.
 - [21] 孔延亮, 黄勇, 胡重灵, 等. 病毒性脑炎的 CT 和 MRI 诊断价值研究及对比分析[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2016, 14(12): 7-9.
 - [22] Sener, R.N. (2001) Herpes Simplex Encephalitis: Diffusion MR Imaging Findings. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, **25**, 391-397. [https://doi.org/10.1016/s0895-6111\(01\)00005-2](https://doi.org/10.1016/s0895-6111(01)00005-2)
 - [23] Takanashi, J., Sugita, K., Ishii, M., Aoyagi, M. and Niimi, H. (1997) Longitudinal MR Imaging and Proton MR Spectroscopy in Herpes Simplex Encephalitis. *Journal of the Neurological Sciences*, **149**, 99-102. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(97\)05401-4](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(97)05401-4)
 - [24] 彭娟, 罗天友, 吕发金, 等. 病毒性脑炎的核磁共振成像、扩散加权成像和质子 MR 波谱表现[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(3): 257-260.
 - [25] Zawadzki, R., Kubas, B., Hładuński, M., Zajkowska, O., Zajkowska, J., Jurgilewicz, D., *et al.* (2019) Proton Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H-MRS) of the Brain in Patients with Tick-Borne Encephalitis. *Scientific Reports*, **9**, Article No. 2839. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39352-6>
 - [26] 巴庆华. 病毒性脑炎脑脊液病毒特异性抗体 ELISA 检测结果分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(10): 944-945+948.
 - [27] DeBiasi, R.L. and Tyler, K.L. (2004) Molecular Methods for Diagnosis of Viral Encephalitis. *Clinical Microbiology Reviews*, **17**, 903-925. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.4.903-925.2004>
 - [28] Green, M.R. and Sambrook, J. (2019) Nested Polymerase Chain Reaction (Pcr). *Cold Spring Harbor Protocols*, **2019**, pdb.prot095182. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>
 - [29] Pisano, M.B., Seco, M.P.S., Ré, V.E., Fariás, A.A., Contigiani, M.S. and Tenorio, A. (2012) Specific Detection of All Members of the Venezuelan Equine Encephalitis Complex: Development of a RT-Nested PCR. *Journal of Virological Methods*, **186**, 203-206. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.05.009>
 - [30] Shen, X., Qiu, F., Zhao, H., Yang, M., Hong, L., Xu, S., *et al.* (2018) A Novel and Highly Sensitive Real-Time Nested RT-PCR Assay in a Single Closed Tube for Detection of Enterovirus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **90**, 181-185. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.11.015>
 - [31] Singh, C. and Roy-Chowdhuri, S. (2016) Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. In: Luthra, R., Singh, R.R. and Patel, K.P., Eds., *Clinical Applications of PCR*, Springer, 161-176. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0_15
 - [32] Bhullar, S.S., Chandak, N.H., Purohit, H.J., Taori, G.M., Dagainwala, H.F. and Kashyap, R.S. (2013) Determination of Viral Load by Quantitative Real-Time PCR in Herpes Simplex Encephalitis Patients. *Intervirolgy*, **57**, 1-7. <https://doi.org/10.1159/000351521>
 - [33] Chen, Y.Y., Lin, J.W., Fan, Y.C. and Chiou, S.S. (2012) Detection and Differentiation of Genotype I and III Japanese Encephalitis Virus in Mosquitoes by Multiplex Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Transboundary and Emerging Diseases*, **61**, 37-43. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01369.x>