

临床研究

1型登革病毒初次感染患者血清中和抗体的动态反应分析

胡冬梅¹, 李洁¹, 王大虎², 狄飏², 丘立文¹, 王压娣¹, 丁细霞¹, 车小燕¹

¹南方医科大学珠江医院检验医学部, 广东 广州 510282; ²广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510440

摘要:目的 研究感染登革病毒(DENV)后, 机体DENV中和抗体产生的特点及其动态变化规律。方法 采集2006年DENV-1初次感染患者在发病2周之内的, 以及同一组患者在2010年随诊期间的血清标本, 用本实验室建立的以群特异性DENV NS1抗原捕获ELISA为基础的, 可同时测定4型DENV中和抗体的微中和试验(ELISA-MNT), 对这两组血清中的DENV中和抗体滴度进行检测。这两组血清标本均检测了全部抗4型DENV的中和抗体。此外, 2010年的血清标本还检测了抗3种不同毒株的DENV-1(其中包括1株标准株和2株临床分离株)的中和抗体。结果 2006年和2010年这两组不同时间段的血清标本对全部4型DENV均可显示出一定程度的交叉中和抗体反应, 其中, 2006年的血清标本交叉中和抗体反应更为明显, 表现为其最高的中和抗体针对的甚至是DENV-2, 而不是预计中的DENV-1; 2010年的血清标本中最高中和抗体滴度针对的是同型的DENV-1。Mann-whitney U检验显示: 对于同型的抗DENV-1中和抗体滴度, 2010年的血清要明显高于2006年的血清($U=86.500, P=0.000$), 但异型中和抗体滴度在两组血清标本中无明显改变。Friedman检验显示, 尽管同属DENV-1, 但2010年的血清标本对3种不同毒株的DENV-1的中和抗体滴度之间还是存在显著差异($\chi^2=12.123, P=0.002$)。结论 4型交叉中和抗体反应是DENV感染后, 尤其是在感染早期中和抗体的产生特点, 但只有同型DENV中和抗体滴度可随时间的推移而发生明显的上升; 然而即使是同属于一种血清型, 不同毒株之间的中和抗体也可能存在差异。

关键词:登革病毒; 非结构蛋白1; 中和抗体; 微中和试验

中图分类号: R373.33; R511 文献标志码: A 文章编号: 1673-4254(2012)12-1773-04

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.12.019

Analysis of serum neutralizing antibody response in patients with primary dengue virus type 1 infection

HU Dongmei¹, LI Jie¹, WANG Dahu², DI Biao², QIU Liwen¹, WANG Yadi¹, DING Xixia¹, CHE Xiaoyan¹

¹Department of Laboratory Medicine, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440, China

Abstract: Objective To investigate the characteristics and dynamic changes of serum neutralizing antibody response in patients with primary infection of dengue virus type 1 (DENV-1). **Methoda** Serum samples were obtained from the same patients with primary infection of DENV-1 within 2 weeks after symptom onset in 2006 and in 2010. A group-specific DENV NS1 capture ELISA-based micro-neutralizing test (ELISA-MNT) capable of detecting neutralizing antibodies against all the 4 serotypes of DENV was used to test the neutralizing antibody titers against DENV in the serum samples. The neutralizing antibody titers against a standard strain and 2 clinically isolated strains of DENV-1 were detected in serum samples collected in 2010. **Results** Cross-reactive neutralizing antibody response against all the 4 serotypes of DENV was found in both of the serum samples collected in 2006 and 2010, but the samples collected in 2006 showed stronger cross-reactive neutralizing antibody responses. The neutralizing antibody against DENV-2, rather than the anticipated DENV-1 antibody, had the highest titer in the samples collected in 2006, whereas the antibody against homologous DENV-1 had the highest titer in the samples obtained in 2010. The neutralizing antibody titers against the homologous DENV-1 was significantly higher in samples collected in 2010 ($U=86.500, P=0.000$), which also demonstrated significantly different neutralizing antibody titers against the 3 different strains of DENV-1 ($\chi^2=12.123, P=0.002$). **Conclusion** The production of cross-reactive neutralizing antibodies between the 4 serotypes of DENV is a characteristic of DENV infection, particularly during early infection, but only the homologous neutralizing antibody increases obviously over time. The titers of the neutralizing antibodies against different strains, even of the same serotype, may differ distinctly.

Key words: dengue virus; non-structural 1; neutralizing antibody; micro-neutralizing test

收稿日期: 2012-09-15

基金项目: NSFC-广东联合基金(U1132002); 国家自然科学基金(30671874)

Supported by National Natural Science-Guangdong united Foundation (U1132002) and National Natural Science Foundation of China (30671874).

作者简介: 胡冬梅, 博士, E-mail: zjyhdm@163.com

通讯作者: 车小燕, 研究员, E-mail: chexiaoyan@126.com

登革热是一种最常见的虫媒传染病, 广泛流行于热带和亚热带的100多个国家和地区, 是全世界最重要的公共卫生问题^[1]。登革病毒(DENV)是一种单股正链的RNA病毒, 它包括4种血清型, DENV-1~DENV-4。任何一种血清型DENV的感染, 都将诱导机体产生针对该血清型DENV的终生免疫保护, 但对其他血清型仅仅有短暂而微弱的交叉免疫保护作用^[2]。若二次感染的

是异型DENV,体内预先存在的非中和抗体或亚中和浓度的中和抗体将促进FcR的允许细胞对DENV的摄取,增加DENV在细胞内的复制,从而导致感染的加强,这种现象称之为抗体依赖增强(ADE)效应^[3-5]。ADE是重症的登革出血热(DHF)和/或登革休克综合征(DSS)的易发因素^[6-7],也是制约登革疫苗研制的重要原因之一。然而,登革热感染的免疫发病机制远未得到详尽的阐述。事实上,交叉反应性中和抗体不仅可在二次异型DENV感染时诱发ADE效应,还有可能对二次异型DENV感染提供免疫保护作用^[8]。

由于登革热中和抗体在登革热的预防和治疗方面存在着重要意义,在本研究中,我们利用本实验室制备的,以群特异性DENV非结构蛋白1(NS1)抗原捕获ELISA为基础的微中和实验(ELISA-MNT)^[9]对来自同一组DENV-1初次感染患者在发病2周内及其3年后的随诊期两个不同时间段的血清标本进行了中和抗体滴度的检测,以揭示DENV感染后抗4型DENV中和抗体的产生特点及其在患者体内的动态变化规律。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要的实验材料 MEM培养基、胎牛血清(FBS)和庆大霉素购自Gibco公司;辣根过氧化物酶(HRP)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺二盐酸(TMB)为美国KPL公司产品;96孔酶联板条购自美国Corning公司。NS1单抗为本实验室自制^[10]。

1.1.2 临床血清标本 登革热患者血清标本由广州市疾病预防控制中心提供。两组血清标本均来自2006年广州市DENV-1流行期确诊的35名患者;第1组血清标本采自这些患者在2006年的发病2周之内;第2组血清标本采自这些患者在2010年的康复期。所有受试者在采集第2组血清时均处于健康状态。根据WHO对登革热的分类标准,这35例患者均为登革热,而非重症的DHF/DSS。这些患者确诊的方法为病毒分离和/或RT-PCR和/或血清学方法,感染的血清型确定为DENV-1^[11-12]。根据Vazquez^[13]发表的对登革热感染状态的确定标准,用商品化的Panbio IgM和IgG捕获ELISA判定这些患者为DENV-1的初次感染^[14]。

1.1.3 细胞和病毒 本实验中采用了4型DENV的标准株,它们分别是:DENV-1, Hawaii; DENV-2, New Guinea-C; DENV-3, Guangxi-80-2; DENV-4, H241。此外,还有两株2006年广州DENV-1流行期的临床分离株,6551和6555。所有4型DENV都用C6/36细胞在33℃、5% CO₂培养箱中,用含2% FBS、0.1%庆大霉素的MEM培养基进行培养、扩增。Vero E6细胞用于病毒滴度的滴定以及微中和试验。Vero E6细胞和C6/36

细胞均为本实验室细胞库保存。

1.2 实验方法

1.2.1 微中和实验测定血清抗4型DENV中和抗体滴度

登革热中和抗体滴度的检测按照以前本实验室建立的微中和实验方法^[9],但有少许修改。简述如下:在进行微中和实验的前1 d,将Vero E6细胞接种在96孔培养板中,200 μl/孔,含1×10⁴细胞。将培养板置于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h,使之在实验前达到80%的融合。将全部的临床血清标本和FBS在56℃灭活30 min,然后用含2% FBS的MEM培养液将血清标本从1:5开始倍比稀释12个稀释度直至1:10 240。将释好的血清标本分别与等量的、浓度为500 pfu/ml的4型DENV的病毒液混合,将混合物置于37℃孵育1 h。将上述96孔培养板中的培养液吸弃,然后将50 μl血清-病毒混合物加入各孔中,每个稀释度重复3个孔,在37℃孵育1.5 h,使病毒充分吸附到细胞上。随后吸弃混合物,加入200 μl新鲜的含2% FBS的MEM培养液,置37℃、5% CO₂培养9 d。取100 μl细胞培养上清液至本研究所自制的DENV群特异性NS1抗原捕获ELISA的酶标板中,检测其中的NS1蛋白^[10]。

1.2.2 DENV NS1抗原捕获ELISA检测微中和实验中分泌的NS1蛋白 具体检测方法见文献[10],简述如下:将培养上清液加入酶标板相应的各孔后,37℃水浴锅孵育1 h。洗板后,加入100 μl连接有HRP、浓度为1:1000的4型交叉反应性NS1单抗,继续37℃孵育30 min。再次洗板后,加入100 μl TMB,室温静置10 min,最后加入100 μl 1%硫酸终止反应。在450 nm波长处用酶标仪读板。本研究以健康献血者的血清作为阴性对照,以重组包膜蛋白3区免疫小鼠的血清标本作为阳性对照,以未被DENV感染的细胞培养上清液的平均D₄₅₀值的2倍为cutoff值。病毒若被血清中和抗体所中和,将检测不到细胞培养液中的NS1蛋白,在ELISA检测中显示为阴性值。血清稀释终点的倒数被设为血清标本的中和滴度。

1.3 统计学处理

研究结果采用SPSS 13.0和GraphPad Prism 5.0统计软件进行统计分析和制图。同一组血清中不同血清型DENV之间的中和抗体滴度的差异用秩和检验进行分析;两组不同时间段采集的血清对同一血清型DENV中和抗体滴度的差异用Mann-Whitney U检验进行分析。同一组血清中对不同血清型中和抗体滴度的差异用Wilcoxon符号秩检验进行比较。 $P < 0.05$ 设定为统计学上具有显著差异。

2 结果

2.1 血清中的抗4型DENV的中和抗体滴度

由图1所示,4型DENV中和抗体具有低滴度的交

又中和反应。Friedman检验发现,这些随诊血清标本中抗4种血清型DENV的中和抗体滴度之间存在着显著差异($\chi^2=51.019, P=0.000$)。从DENV-1到-4,其中和抗体滴度的平均秩次分别为:3.75、2.46、2.07和1.72。Wilcoxon符号秩检验结果($F=7.618, P=0.000$)则进一步显示,DENV-1的中和抗体滴度显著高于其他3种异型DENV(DENV-2、DENV-3和DENV-4的Z值分别为3.921、3.317和5.088,其P值分别为0.000、0.001和0.000)。在本研究中,我们进一步检测了这些随诊血清对3种不同DENV-1毒株,其中包括1株标准株和2株临床分离株,6551和6555的中和抗体滴度(图2)。用Friedman检验显示,3种DENV-1毒株的中和抗体滴度之间存在着差异($\chi^2=12.123, P=0.002$)。其中,标准株、6551株和6555株中和抗体滴度的秩次分别为2.43、1.84和1.73。Wilcoxon符号秩检验结果则显示,两株临床分离株之间以及标准株与临床分离株6551之间的中和抗体滴度无差异(Z值分别是1.253和2.288,P值分别为0.21和0.022),但标准株的中和抗体滴度要明显高于临床分离株6555($Z=3.318, P=0.001$)。

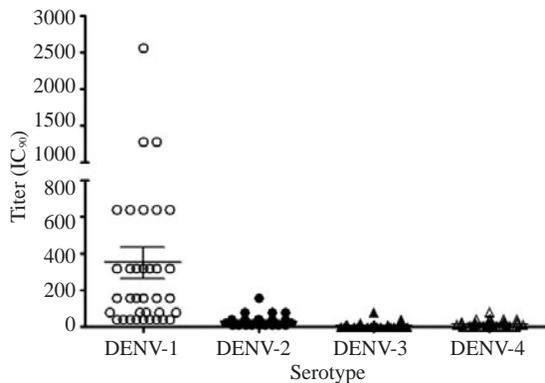


图1 ELISA-MINT检测的2010年随诊期血清抗4型DENV标准株的中和抗体滴度
Fig.1 Detection of neutralizing antibody titers against all the 4 serotypes of DENV in serum samples obtained in 2010 using ELISA-MINT. The straight lines indicate the mean values with standard errors. The plot shows significantly higher neutralizing antibody titers against DENV-1 than those against the other 3 serotypes of DENV.

2.2 2006年血清标本中的中和抗体滴度

因为血清标本的数量有限,2006年的血清标本中,只有33份血清标本可用于检测抗DENV-1的中和滴度,28份用于检测对DENV-2的中和滴度,20份用于检测对DENV-3的中和滴度,15份用于检测对DENV-4的中和滴度。结果(图3)显示,4型DENV中和抗体滴度之间存在明显的交叉中和反应。Friedman检验表明,2006年血清对4型DENV的中和抗体滴度之间存在统计学差异($\chi^2=16.714, P=0.001$)。其中,DENV-1至-4的中和抗体滴度的平均秩次分别为2.07、3.61、2.32和

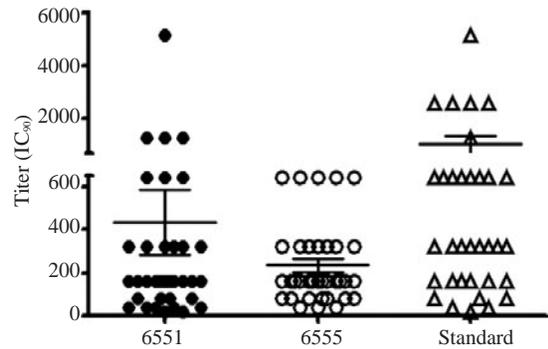


图2 ELISA-MNT检测的2010年随诊期血清标本中抗3种不同DENV-1毒株的中和抗体滴度
Fig.2 Significantly different neutralizing antibody titers against 3 different strains of DENV-1 in serum samples collected in 2010. The straight lines indicate the mean values with standard errors.

2.00。DENV-2中和抗体滴度要高于其他3种血清型,而后三者的平均秩次比较接近。

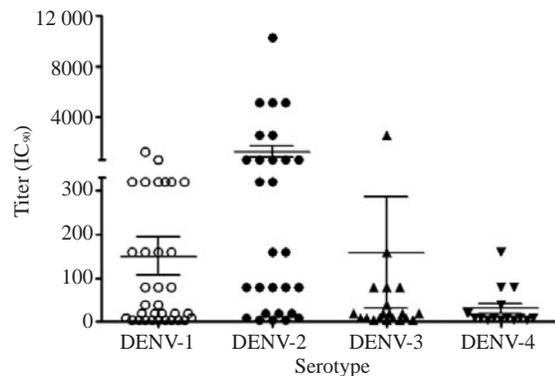


图3 ELISA-MNT检测的2006年发病期血清标本中抗4型DENV的中和抗体滴度
Fig.3 Detection of neutralizing antibody titers against all the 4 serotypes of DENV in serum samples obtained in 2006. The straight lines indicate the mean values with standard errors. The neutralizing antibody titers differ between the 4 serotypes, and DENV-2 neutralizing antibody has the highest titer.

2.3 两组血清标本之间的中和抗体滴度比较

对于前后不同时间段采集的两组血清标本之间的比较有助于判定DENV中和抗体动态变化情况。在本研究中,Mann-whitney U检验发现,2010年血清的各型中和抗体的滴度均高于2006年相应的血清型,但仅有DENV-1的中和抗体滴度有明显的升高($U=86.500, P=0.000$)。尽管DENV-4中和抗体滴度也有升高,但并不特别明显($Z=154.000, P=0.041$),而DENV-2和DENV-3的中和抗体滴度在两个时间段的血清中不存在显著差异。

3 讨论

对DENV中和抗体的检测在登革热的免疫发病机

制、血清流行病学调查以及疫苗有效性的验证方面都具有重要意义。常用的登革热中和抗体的检测方法有蚀斑减少中和试验。这种方法常以50%的抑制率作为检测的靶标。尽管这种方法是DENV中和抗体检测的经典方法,但该方法存在诸如耗时长,工作量大,对技术人员的要求高,无法实现高通量等缺陷^[15]。而一些改良的微中和实验^[16-18],例如基于ELISA或ELISPOT的微中和实验等尽管可以高通量,但是对有关参数,例如如何确定感染的病毒量,以及病毒感染后ELISA检测的时间等难以控制^[17],而有的微中和实验则存在检测成本过高的问题^[15-16]。在本研究中,我们采用并进一步改良了本实验室自制的基于ELISA检测的微中和实验(ELISA-MNT)。在这种方法中,未被中和抗体完全中和的DENV,即便是极少量,都有可能感染Vero E6细胞。在经过9 d的过度生长后,其产生并释放的大量NS1蛋白可被群特异性DENV NS1抗原捕获ELISA检测出来。从理论上,这种方法检测的至少是大于90%的病毒抑制率。这种方法不仅高度敏感,而且价廉易得,操作方便,更重要的是无需考虑检测的时机,它有可能是DENV中和抗体检测的一种很好的替代方法,但是其有效性仍需要通过对更多样本的检测来得到验证。

利用这种ELISA-MNT,我们对来自同一组DENV-1初次感染患者在发病期和随诊期两个不同时间段采集的血清标本进行了检测。由于这两组血清是来自同一组患者,因此,对两者之间中和抗体滴度的比较更能体现DENV中和抗体实际的动态变化情况。本研究发现,DENV-1感染后机体可同时产生抗4型DENV的交叉中和抗体。其中,发病期血清标本显示出更强的交叉中和活性,乃至DENV-2的中和抗体滴度甚至要高于同型的DENV-1。这些结果说明,4型DENV之间具有高度的同源性。这种交叉反应性的中和抗体,尤其是发病期的交叉中和抗体可能对全部4型DENV的感染产生交叉免疫保护作用。早在1952年,Sabin^[2]通过临床观察就发现,在感染某种血清型的DENV之后短时间内(3~6个月),患者不会感染其他血清型的DENV,说明任何一型DENV抗体对全部血清型DENV的感染具有保护作用,但是这一论断一直缺乏相应的实验室数据支持,而本研究结果正好对这一临床现象从理论上进行了验证。

2010年采集的随诊血清标本中仍可检测出4型DENV的中和抗体滴度。但是,与2006年的血清不同的是,2010年的血清的中和抗体显示出以DENV-1为主。DENV-1中和抗体滴度不仅显著高于其他血清型的中和抗体滴度,而且显著高于2006年的DENV-1的中和抗体滴度。相比之下,其他3种异型DENV的中和抗体滴度并没有随时间的推移发生变化,或者变化不明

显。这说明,DENV感染后产生的中和抗体,只有对同型的DENV产生持久的免疫保护,但对于其他型的DENV不具有长期的保护作用。这种在体内存在的亚中和浓度的中和抗体,普遍被认为是二次感染异型DENV时,诱发ADE效应,导致重症登革热,DHF/DSS发生的原因^[1,3-5]。

有趣的是,本研究还发现尽管属于同一种血清型,2010年的血清标本对不同的DENV-1毒株产生了不同的中和抗体反应。可能是因为不同毒株之间的基因变异所致。DENV是一种基因变异迅速的RNA病毒,在进化压力的作用下,DENV可能发生“适应性”改变^[19],从而发挥中和逃避的作用。

总之,本研究阐明DENV感染后,机体将产生针对全部4型DENV的交叉中和抗体反应。在感染的早期,这种交叉抗体反应情况更为明显,提示感染早期产生的中和抗体对全部4型DENV的感染均具有保护作用。但是,随着时间的推移,只有同型DENV中和抗体滴度将产生明显的上升,提示机体产生的中和抗体只有对同型的DENV才会产生长期的保护作用。而机体对与相同血清型,不同毒株的DENV产生不同的中和抗体反应,提示微小的基因变异对中和抗体反应的影响,这对于登革热疫苗研制具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] Halstead SB. Dengue[J]. Lancet, 2007, 370(9599): 1644-52.
- [2] Sabin AB. Research on dengue during World War II[J]. Am J Trop Med Hyg, 1952, 1(1): 30-50.
- [3] Goncalvez AP, Engle RE, St Claire M, et al. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection *in vitro* and *in vivo* and strategies for prevention[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(22): 9422-7.
- [4] Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity[J]. J Infect Dis, 2000, 181(1): 2-9.
- [5] Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirirakul N, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans[J]. Science, 2010, 328(5979): 745-8.
- [6] Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez-Roche R, et al. Neutralizing antibodies after infection with dengue 1 virus[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(2): 282-6.
- [7] Schmidt AC. Response to dengue fever--the good, the bad, and the ugly[J]. N Engl J Med, 2010, 363(5): 484-7.
- [8] Kyle JL, Balsitis SJ, Zhang L, et al. Antibodies play a greater role than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection in a mouse model[J]. Virology, 2008, 380(2): 296-303.
- [9] 温坤,丁彦青,丘立文,等.非结构蛋白1抗原捕获酶联免疫吸附法评价登革病毒抗体中和活性[J].中华预防医学杂志, 2009, 43(8): 680-5.

- [10] Tinsley JH, Wu MH, Ma W, et al. Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in coronary venular endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(35): 24930-4.
- [11] Chen TC, Chien SJ, Kuo HC, et al. High glucose-treated macrophages augment E-selectin expression in endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(29): 25564-73.
- [12] Mazzone T, Chait A, Plutzky J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies [J]. *Lancet*, 2008, 371(9626): 1800-9.
- [13] Libby P, Ridker PM, Hansson GK, et al. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(23): 2129-38.
- [14] Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 317-25.
- [15] Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(10): 803-15.
- [16] Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium [J]. *Br J Anaesth*, 2004, 93(1): 105-13.
- [17] Yuan SY, Breslin JW, Perrin R, et al. Microvascular permeability in diabetes and insulin resistance [J]. *Microcirculation*, 2007, 14(4-5): 363-73.
- [18] Inoguchi T, Battan R, Handler E, et al. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(22): 11059-63.
- [19] Kang N, Alexander G, Park JK, et al. Differential expression of protein kinase C isoforms in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Kidney Int*, 1999, 56(5): 1737-50.

(编辑:黄开颜)

(上接1776页)

- [10] Ding X, Hu D, Chen Y, et al. Full serotype- and group-specific NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assay for rapid differential diagnosis of dengue virus infection [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(3): 430-4.
- [11] Chen S. The origin of dengue viruses caused the DF outbreak in Guangdong province, China, in 2006 [J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(5): 1183-7.
- [12] Bai Z, Liu L, Tu Z, et al. Real-time PCR for detecting circulating dengue virus in the Guangdong Province of China in 2006 [J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt 12): 1547-52.
- [13] Vazquez S, Hafner G, Ruiz D, et al. Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic dengue infections [J]. *J Clin Virol*, 2007, 39(3): 194-8.
- [14] Hu D, Di B, Ding X, et al. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection [J]. *Virol J*, 2011, 8: 47.
- [15] Roehrig JT, Hombach J, Barrett AD. Guidelines for Plaque-Reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses [J]. *Viral Immunol*, 2008, 21(2): 123-32.
- [16] Liu L, Wen K, Li J, et al. Comparison of plaque- and enzyme-linked immunosorbent assay-based assays to measure the neutralizing activities of monoclonal antibodies specific to domain III of dengue virus envelope protein [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19(1): 73-8.
- [17] Vorndam V, Beltran M. Enzyme-linked immunosorbent assay-format microneutralization test for dengue viruses [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2002, 66(2): 208-12.
- [18] Rodrigo WW, Alcena DC, Rose RC, et al. An automated Dengue virus microneutralization plaque assay performed in human Fc {gamma} receptor-expressing CV-1 cells [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2009, 80(1): 61-5.
- [19] Rodriguez-Roche R, Sanchez L, Burgher Y, et al. Virus role during intraepidemic increase in dengue disease severity [J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011, 11(6): 675-81.

(编辑:黄开颜)