

# 寨卡病毒 NS1 蛋白的原核表达和单克隆抗体的制备

赵亭亭, 徐 叶, 廖旻晶, 刘如石, 李晓丹

**摘要:**目的 高效表达和纯化重组的寨卡病毒 NS1 蛋白, 制备抗 NS1 蛋白的单克隆抗体。方法 构建含有寨卡病毒 NS1 基因的原核表达质粒, 利用大肠杆菌大量表达重组 NS1 蛋白, 纯化蛋白后免疫小鼠并进行细胞融合, 筛选制备高纯度的单克隆抗体。结果 在大肠杆菌中高效表达了重组 NS1 蛋白, 重组 NS1 蛋白具有良好的免疫原性, 筛选出 3 株分泌针对寨卡病毒 NS1 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 6B8、7D11 和 3E2, 纯化的单克隆抗体与重组 NS1 蛋白有良好的特异性反应。结论 利用重组 NS1 蛋白免疫制备了抗 NS1 的单克隆抗体, 为后续建立针对 NS1 蛋白的 ELISA 检测方法及相关研究提供了基础。

**关键词:**寨卡病毒; NS1; 原核表达; 单克隆抗体

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2019)03-0196-05

## Prokaryotic expression and monoclonal antibody preparation against NS1 protein of Zika virus

ZHAO Ting-ting, XU Ye, LIAO Min-jing, LIU Ru-shi, LI Xiao-dan

(Medical College, Hunan Normal University, Changsha 410013, China)

**Abstract:** In order to prepare the monoclonal antibodies against Zika virus NS1 protein, a recombinant plasmid containing Zika virus NS1 gene was constructed, and the recombinant NS1 protein was expressed by *E.coli*. The mice were immunized with the purified recombinant NS1 protein, and anti-NS1 monoclonal antibodies were prepared by cell fusion and screening. After rounds of selection, three strains of hybridoma cell lines which secreted monoclonal antibodies against Zika virus NS1 protein were established and designated as 3E2, 6B8 and 7D11 respectively. The monoclonal antibodies with high purity were generated and purified from the ascites. All the mAbs belong to IgG 1 isotype, and have a specific reaction to the recombinant NS1 protein. In conclusion, the monoclonal antibodies against NS1 were prepared, which will provide a raw material for the ELISA detection method of Zika virus.

**Keywords:** Zika virus; NS1; prokaryotic expression; monoclonal antibody

Supported by the open research fund of the Key Laboratory of Etiology and Biosafety of Emerging Infectious Diseases, Chinese Academy of Sciences (No.2016SPCAS001)

Corresponding author: Li Xiao-dan, Email: lxd@live.cn

寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)是一种新发的虫媒传播病毒,属于黄病毒属成员,其基因组编码 3 种结构蛋白(Capsid, prM/M, E)和 7 种非结构蛋白(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5)。ZIKV 主要通过伊蚊主要是埃及伊蚊和白纹伊蚊叮

咬传播,也可通过母婴传播、血液传播和性传播<sup>[1]</sup>。2007 年在西太平洋密克罗尼西亚的雅浦(Yap)岛上发生了第一次 ZIKV 感染疫情<sup>[2]</sup>,2013 年 10 月,在法属波利尼西亚发生了大规模疫情<sup>[2-3]</sup>,之后,ZIKV 在世界范围内迅速蔓延,并在 2015 年,巴西的 ZIKV 感染已经达到了大规模流行的水平。ZIKV 感染后 80% 的成年人几乎没有任何明显症状,20% 的成年患者有轻微的症状,通常表现为发热、黄斑皮疹、关节痛、结膜炎、头痛等<sup>[2]</sup>。但是,孕期感染 ZIKV 的母亲产下的孩子会有小头畸形<sup>[4]</sup>,此外,在

中国科学院新发和烈性传染病病原学与生物安全重点实验室开放研究基金资助项目(No.2016SPCAS001)

通讯作者: 李晓丹, Email: lxd@live.cn

ORCID: 0000-0002-4953-6709

作者单位: 湖南师范大学医学院, 长沙 410013

ZIKV 非常流行的哥伦比亚发现了大量的格林-巴利综合征的患者<sup>[5]</sup>,这意味着 ZIKV 和这些神经障碍之间有很强的联系。ZIKV 感染已成为热带和亚热带地区的一个主要公共卫生问题,2016 年起,ZIKV 的流行已被世界卫生组织列为国际公共卫生紧急事件<sup>[6]</sup>。

目前没有任何针对 ZIKV 感染的抗病毒药物,预防感染的疫苗仍在临床试验阶段<sup>[7]</sup>,因此,病毒感染的早期诊断在患者治疗中显得尤为重要。在常规的诊断方法中,使用 RT-PCR、Real-time RT-PCR 检测病毒核酸具有较高的灵敏度和特异性,但是需要专门的实验设备和经验丰富的技术人员,并且由于核酸提取过程容易受酚类、盐和乙醇等化学试剂残留等影响而容易出现假阴性结果,实验室内核酸交叉污染也容易导致假阳性问题。联合两种或两种以上的检测方法对 ZIKV 感染的诊断更为准确,因此,发展 ZIKV 血清学检测手段具有重要的意义。在使用 RT-PCR 方法检测雅浦 ZIKV 感染病人血清的同时,Robert S. Lanciotti 等人分别使用 ZIKV、登革热病毒(DENV)1-4 型、黄热病病毒(YFV)、日本脑炎病毒(JEV)和墨累河谷脑炎病毒(MVEV)抗原包被捕获血清 IgM 的 ELISA 方法检测病人血清,发现 ZIKV 感染的病人血清 IgM 与登革病毒、日本脑炎病毒和黄热病毒的抗原交叉反应,这种交叉反应在第一次被黄病毒感染的病人中出现的几率较小,而在第二次被黄病毒感染的病人中出现的几率很大<sup>[8]</sup>。这种与其他黄病毒间的交叉反应性增加了使用 ELISA 法诊断 ZIKV 感染的难度,目前为止仍没有开发出针对 ZIKV 的 ELISA 检测试剂盒。

黄病毒 NS1 蛋白是 7 种非结构蛋白中唯一能分泌到感染病人血清中的非结构蛋白<sup>[9-10]</sup>,在病毒感染细胞后,NS1 能够以可溶的六聚体形式分泌出细胞外,在病毒感染早期即能够在血清中检测到 NS1,因此,NS1 可作为临床快速诊断病毒早期感染的标志。已有研究显示 NS1 蛋白中携带有较多的特异性表位,可以诱导出多个在黄病毒属病毒中无交叉反应的特异性抗体<sup>[11]</sup>。本研究拟通过构建寨卡病毒 NS1 蛋白重组表达质粒、表达与纯化 NS1 蛋白、小鼠免疫、细胞融合和抗体筛选等步骤制备针对寨卡病毒 NS1 蛋白的单克隆抗体,为后续建立针对 NS1 蛋白的 ELISA 检测方法及相关研究提供基础。

## 1 材料与方法

**1.1 质粒和菌株、实验动物和主要试剂** 原核表达质粒 pET-32a、ER<sub>2566</sub> 菌株以及 HB101 菌株由本实验室保存。BALB/C 小鼠购自斯莱克景达实验动物有限公司。GAM-IgG-HRP 由厦门大学夏宁邵教授惠赠;限制性内切酶 *Xho*I、*Xba*I 以及 DNA 相对质量标准购自 TaKaRa 公司;抗 His-tag 鼠单克隆抗体、Ni-IDA Resin、质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒购自上海生工公司;HT、HAT 以及弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂,购自 Sigma 公司;DMEM 培养基购自 GIBCO 公司;胎牛血清购自天杭生物科技有限公司;HRP-DAB 底物显色试剂盒购自天能科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒,购自碧云天生物技术有限公司。

**1.2 重组质粒的构建与鉴定** 以研究较多的 2007 年雅浦岛 Zika 流行株(GenBank No. AY632535)序列为模板,商业合成 NS1 基因序列,使用 PCR 的方法在 NS1 的 N 端引入 6×His 标签。将 ZIKV 的 NS1 片段与表达载体 pET32a 经 *Xho*I/*Xba*I 双酶切后,16 °C 连接 1 h,转化至大肠杆菌 HB101 中,挑取单菌落进行鉴定,将鉴定正确的质粒转化至大肠杆菌表达菌 ER<sub>2566</sub> 中,挑取单菌落接种至 3 mL LB 液体培养基中,待 OD<sub>600 nm</sub> 至 0.6~0.8 时,加入浓度为 200 μg/mL 的 IPTG,诱导重组蛋白的表达,离心收集菌体,制备蛋白质样品进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳鉴定。

**1.3 ZIKV NS1 蛋白的表达及纯化** 将重组表达菌株接种到 1 L LB 液体培养基中,待菌液 OD<sub>600 nm</sub> 至 0.6~0.8 时,加入浓度为 200 μg/mL 的 IPTG,诱导后离心收菌并超声破碎,悬液、上清和沉淀分别取样,12% 的 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的表达方式。用 2% 的 TritonX-100 (buffer D) 和 buffer I 洗涤沉淀,然后用 8 mol/L 尿素溶液重悬,4 °C 梯度透析复性,当透析至 2 mol/L Urea (PBS) 后,用镍柱亲和层析法对收集的蛋白进行纯化。分别用含 2 mol/L 尿素的不同浓度的咪唑进行梯度洗脱,分别收集流穿液和洗脱液,将洗脱液用 1 mol/L Urea (PBS)、PBS 梯度透析复性,12% SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度。

以 10 倍柱床体积的磷酸 Buffer 预先平衡 TSK-GEL G3000 SW 分子筛层析柱至 280 nm 处的吸收值的波动小于 0.001,把透析复性后的样品先用 0.22 μm 的滤膜过滤,接着以 0.5 mL/min 的流速过柱,收集 280 nm 处吸收值大于 0.2 AU 的蛋白峰。制备蛋白质样品进行 12% SDS-PAGE 鉴定

蛋白纯度。

将纯化后的重组 NS1 蛋白进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳,300 mA 恒电流转 60 min,用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 2 h,以鼠源 His-tag 单抗作为一抗,4 °C 孵育过夜,以 GAM-IgG-HRP 作为二抗,室温孵育 1 h,配制新鲜的 ECL 工作液,滴加到膜上后显影。

**1.4 小鼠免疫** 将纯化后的蛋白按 1:1 的比例与弗氏完全佐剂充分乳化后,皮下多点免疫 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠,剂量为 100  $\mu$ g/只。两周后,与弗氏不完全佐剂充分乳化,然后以同样的剂量和方法对小鼠进行两次加强免疫,每次间隔两周。在细胞融合前 3d,对小鼠进行脾脏加强免疫,剂量为 100  $\mu$ g/只。每次免疫前 1d 对小鼠进行眼球静脉取血,间接 ELISA 检测免疫小鼠效价。将纯化的 NS1 蛋白用蛋白包被液稀释至浓度为 1  $\mu$ g/mL 后包被于聚苯乙烯板条上,ED 封闭,用小鼠血清作为一抗,浓度从 1:100 梯度稀释至 1:400 000,HRP 标记羊抗鼠 IgG (1:10 000) 作为二抗,TBST 洗板,TMB 底物显色,2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色反应,450 nm/630 nm 双波长检测各孔的 OD<sub>450 nm</sub> 值,将小鼠免疫前的血清作为阴性对照,以大于 2.1 倍阴性值作为阳性。

**1.5 细胞融合** 脾脏免疫后 3 d,取免疫小鼠的脾脏,收集脾细胞,再收集生长状态良好的 SP2/6 骨髓瘤细胞,将 SP2/6 与脾细胞按 1:5~1:10 进行混合,在 37 °C 预热的聚乙二醇(PEG)1500 作用下进行细胞融合,并用无血清 DMEM 培养基终止融合。用 20% FBS-HAT-DMEM 培养基悬浮细胞,然后均匀铺于 96 孔板中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

**1.6 杂交瘤细胞的筛选及克隆化** 融合后的细胞在培养第 7 d 左右用 10% FBS-HT-DMEM 培养基半量换液,待细胞集落长至孔底面积的 1/3~1/2 时,取培养上清,用间接 ELISA 方法进行检测,以细胞培养上清作为一抗,选取 OD<sub>450 nm</sub> 值较高且细胞集落数目少的孔,通过有限稀释法进行克隆化。进行 3~4 次克隆化,直至细胞培养上清阳性率达 100%。取细胞上清作为一抗,分别以抗 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM 的抗体作为二抗,使用间接 ELISA 法对单克隆抗体进行亚型鉴定。

**1.7 单克隆抗体的制备、纯化和鉴定** 取 8~10 周龄的雄性 BALB/c 小鼠,按每只 500  $\mu$ L 的剂量腹腔注射石蜡油。7 d 后用 PBS 将杂交瘤细胞数调整为 1 $\times$ 10<sup>6</sup>~2 $\times$ 10<sup>6</sup> 个/mL,按每只 500  $\mu$ L 的剂量腹腔

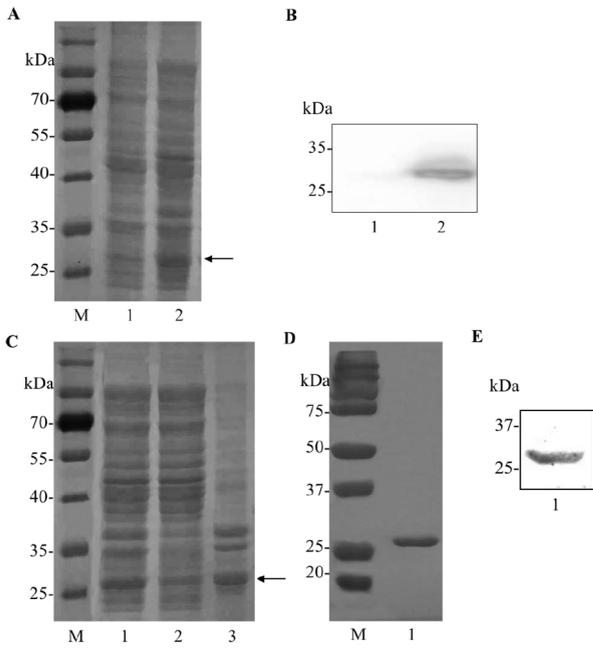
注射小鼠。7~10 d 后,收集腹水,将腹水通过辛酸-饱和硫酸铵沉淀和 Protein G 柱进行纯化,将纯化前后的腹水抗体进行 12% SDS-PAGE 鉴定。将纯化后的重组 NS1 蛋白进行 12% SDS-PAGE,以制备的单克隆抗体作为一抗,以 GAM-IgG-HRP 作为二抗,对单克隆抗体进行鉴定。

**1.8 单克隆抗体的效价测定** 使用间接 ELISA 法测定抗体效价,用单克隆抗体作为一抗,浓度从 1:1 600 梯度稀释至 1:1 280 000,将 OD<sub>450 nm</sub> 值大于阴性对照 2.1 倍的检测孔的最低抗体浓度定为抗体效价。

## 2 结果

**2.1 ZIKV NS1 原核表达质粒的构建及重组 NS1 蛋白的表达与纯化** 以化学合成的 ZIKV (GenBank No. AY632535) 序列为模板扩增 NS1 基因,通过 *Xho*I/*Xba*I 双酶切将 NS1 基因插入 pET32a 原核表达质粒中,将重组 NS1-pET32a 质粒转化至表达菌株,经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 检测蛋白表达情况,结果显示:与对照组相比,诱导后的重组菌株表达了一个大小约 30 kD 的蛋白(图 1A)。重组 NS1 蛋白含有 358 个氨基酸,大小约 40 kD,为了验证诱导后表达蛋白是否为 NS1 蛋白,我们以抗 His 标签抗体作为一抗,使用 Western blot 对重组蛋白的表达情况进行鉴定,结果显示,在 30 kD 处经 IPTG 诱导的重组菌株出现了特异性条带,而对照菌株中没有出现(图 1B),说明表达菌株经 IPTG 诱导后所表达蛋白为带有 His 标签的 NS1 重组蛋白,重组蛋白电泳比预期分子量小,可能是由于蛋白电泳速率差异,或者是重组 NS1 在菌体中出现部分片段降解所导致的。超声破碎经 IPTG 诱导的重组表达菌株,SDS-PAGE 结果显示,与其他黄病毒 NS1 蛋白原核表达一致<sup>[12]</sup>,ZIKV NS1 蛋白也主要以包涵体的形式表达(图 1C)。我们将包涵体用尿素溶解后透析复性,并经 His-tag 亲和层析纯化后,继续对其进行分子筛层析,并用 Western Blot 鉴定,结果显示:经分子筛层析纯化后的蛋白纯度高,达到免疫小鼠制备单克隆抗体的要求(图 1D、E)。

**2.2 间接 ELISA 检测免疫小鼠的效价** 以纯化后的 NS1 蛋白作为抗原免疫小鼠,使用间接 ELISA 法检测血清中抗体效价,结果显示:小鼠在初次免疫后抗体水平较低,在第 2 次和第 3 次加强免疫以后,小鼠血清抗体含量明显升高,效价可达 1:100 000 (图 2),说明重组 NS1 蛋白在小鼠体内能引起较强的免疫反应,其作为抗原具有良好的免疫原性,3 次



(A) SDS-PAGE、(B) Western Blot 鉴定重组 NS1 的表达(M: 预染蛋白质相对分子质量标准; 1: 未加 IPTG 的对照菌株表达的蛋白; 2: 加 IPTG 诱导的重组菌株表达的蛋白)。(C) SDS-PAGE 鉴定重组 NS1 的表达方式(M: 预染蛋白质相对分子质量标准; 1: 超声破碎后悬液; 2: 离心后上清; 3: 离心后沉淀)。(D) SDS-PAGE 鉴定分子筛纯化后的重组蛋白纯度(M: 预染蛋白质相对分子质量标准; 1: 分子筛纯化后的重组 NS1 蛋白)。(E) Western Blot 鉴定分子筛纯化后的重组蛋白纯度。黑色箭头所指为目的蛋白。

图 1 重组 NS1 蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化

Fig.1 Expression and purification of the recombinant NS1 protein of Zika virus

免疫后血清效价达到制备单克隆抗体的要求。

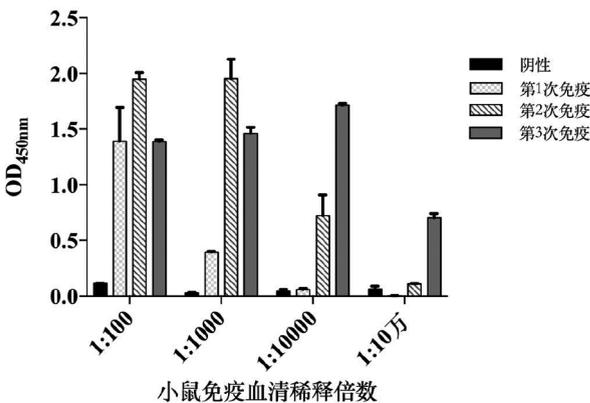


图 2 间接 ELISA 检测小鼠血清抗体效价

Fig.2 Antibody titers of mice sera detected by indirect ELISA

2.3 细胞融合、抗重组 NS1 单克隆抗体的筛选及亚型鉴定 将小鼠脾细胞取出与骨髓瘤细胞进行融合,用间接 ELISA 方法进行阳性克隆的检测,然后

通过有限稀释法对  $OD_{450\text{nm}}$  值较高且细胞集落数目少的孔进行克隆化(图 3),通过 4 次克隆化,筛选出了 3 株能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 6B8、7D11、3E2。将杂交瘤细胞的培养上清进行亚型鉴定,结果显示:6B8、7D11、3E2 亚型均为 IgG1 型。

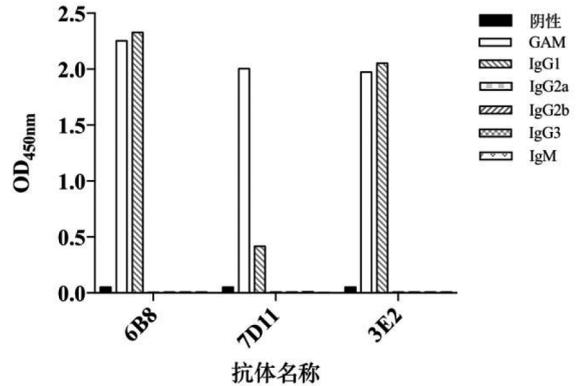


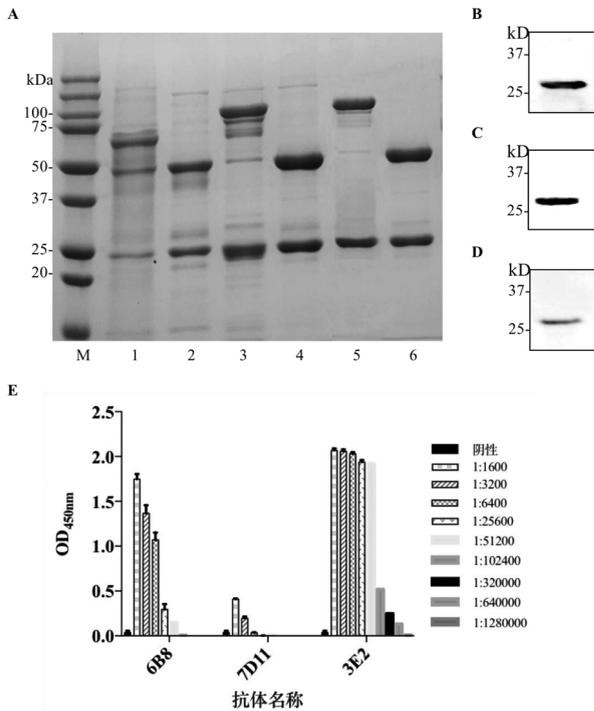
图 3 单克隆抗体的亚型鉴定

Fig.3 Subtype identification of anti-NS1 monoclonal antibodies

2.4 单克隆抗体的纯化与鉴定 收集注射杂交瘤细胞的小鼠腹水,使用辛酸-饱和硫酸铵沉淀和 Protein G 柱纯化单克隆抗体,将纯化前后的腹水抗体进行 12% SDS-PAGE 电泳,结果显示:纯化后的抗体出现了 3 条带:50 kD 的重链、25 kD 的轻链和大小约 100 kD 的条带。煮沸后 50 kD 的重链条带明显变强,100 kD 的条带变弱,25 kD 的轻链煮沸前后条带强弱相差不大(图 4A)。100 kD 的条带为重链与重链的聚合物,是由于两条重链间的二硫键没有完全破坏所形成。凝胶图上杂蛋白条带很少,说明纯化后的单克隆抗体达到了很高的纯度,可以用于后续实验。Western Blot 结果显示:三株抗体与重组蛋白反应后出现单一条带(图 4B、C、D),说明筛选的 3 株单抗能够特异识别重组 NS1 蛋白。使用间接 ELISA 法测定纯化后的单克隆抗体的效价,结果显示:6B8 的效价可达到 1:51 200,7D11 的效价为 1:3 200,3E2 的效价最高,可达到 1:640 000 (图 4E)。

### 3 讨论

ZIKV 属于黄病毒属成员,同属的 JEV、DENV、YFV 等病毒均在我国流行,因此 ZIKV 也有在我国有大规模暴发的可能。目前没有任何针对 ZIKV 的抗病毒药物,预防的疫苗仍在临床试验阶段<sup>[7]</sup>,早期诊断可以为患者节省宝贵的时间,因此,



(A) SDS-PAGE 鉴定纯化后的单克隆抗体(M: 预染蛋白质相对分子质量标准; 1: 腹水(稀释 10 倍); 2: 辛酸沉淀纯化; 3: 未煮沸的 50% 硫酸铵沉淀纯化; 4: 煮沸的 50% 硫酸铵沉淀纯化; 5: 未煮沸的纯化后单克隆抗体; 6: 煮沸的纯化后单克隆抗体)。 (B) Western Blot 鉴定 3E2。 (C) Western Blot 鉴定 6B8。 (D) Western Blot 鉴定 7D11。 (E) 单克隆抗体的效价测定。

图 4 单克隆抗体的纯化和鉴定

Fig. 4 Purification and identification of monoclonal antibodies

在边境口岸建立 ZIKV 快速检测技术, 进行 ZIKV 的现场筛查和检测就显得尤为重要。

本研究中, 诱导表达的温度和诱导时间都是至关重要的。温度过低, 由于酶活性降低导致生物大分子合成速度变慢, 不利于高效表达重组蛋白; 而温度过高, 蛋白虽然能大量表达, 但不利于其形成正确的空间构象。本实验中将重组表达菌在 16 °C 诱导 8 h 后发现, 重组蛋白表达量低, 与诱导前无明显差别。而当诱导条件改为 37 °C 诱导 4 h 后, 经收集菌体、超声破碎细胞发现, 重组蛋白大量表达, 并主要以包涵体的形式存在。包涵体是外源基因在原核细胞中表达时, 尤其在大肠杆菌中高效表达时, 形成的由膜包裹的高密度、不溶性蛋白质颗粒。而尿素是一种变性剂, 可以使蛋白变性, 从而变成可溶的形态。对包涵体进行洗涤, 在溶解包涵体时发现 2 mol/L 和 4 mol/L 尿素不能溶解重组蛋白, 而 8 mol/L 尿素可以溶解大部分重组蛋白。本研究采用透析复性来恢复蛋白质的生物活性, 先将蛋白浓度调节至 0.1~1 mg/mL, 因浓度太高容易形成聚

体沉淀, 浓度太低不经济, 而且很多蛋白在低浓度时不稳定, 容易变性。然后在 4 °C 条件下, 每隔 3 h 梯度稀释透析液, 当透析至 1 mol/L 尿素时, 有大量蛋白发生沉淀, 目的蛋白回收率很低, 因此当透析至 2 mol/L 尿素后, 先用镍柱亲和层析法对收集的蛋白进行纯化, 即用含 2 mol/L 尿素的不同浓度的咪唑进行梯度洗脱, 分别收集流穿液和洗脱液, 然后将洗脱液用 1 mol/L 尿素、PBS 梯度透析复性, 在透析过程中, 只有少量蛋白发生了沉积现象, 目的蛋白的回收率较高。本研究在动物免疫时选取了弗式佐剂以及皮下注射的免疫策略, 通过对细胞融合这一关键步骤的把握, 保证了较好的阳性克隆率。融合后至细胞生长到孔底面积的 1/3~1/2 时进行亚克隆, 避免发生阳性细胞漏检和染色体丢失的情况。采用操作简便的有限稀释法, 确保了杂交瘤细胞系的稳定性和抗体分泌效价高的特点。经过 4 次克隆化, 使获得的杂交瘤细胞培养上清阳性率达 100%, 得到的杂交瘤细胞株能稳定、高效的分泌抗 NS1 蛋白的单克隆抗体, 为后续建立针对 NS1 蛋白的 ELISA 检测方法及相关研究提供了基础。

利益冲突: 无

引用本文格式: 赵亭亭, 徐叶, 廖旻晶, 等. 寨卡病毒 NS1 蛋白的原核表达和单克隆抗体的制备[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(3): 196-200. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.009

#### 参考文献:

- [1] Kim YH, Lee J, Kim YE, et al. Development of a rapid diagnostic test kit to detect IgG/IgM antibody against zika virus using monoclonal antibodies to the envelope and non-structural protein 1 of the virus[J]. Korean J Parasitol, 2018, 56(1): 61-70.
- [2] Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia[J]. N Engl J Med, 2009, 360(24): 2536-2543. DOI: 10.1056/NEJMoa0805715
- [3] Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(6): 1085-1086. DOI: 10.3201/eid2006.140138
- [4] Vargas A, Saad E, Dimech GS, et al. Characteristics of the first cases of microcephaly possibly related to Zika virus reported in the Metropolitan Region of Recife, Pernambuco State, Brazil[J]. Epidemiol Serv Saude, 2016, 25(4): 691-700. DOI: 10.5123/S1679-49742016000400003
- [5] Machado-Alba JE, Machado-Duque ME, Gaviria-Mendoza A, et al. Diagnosis of neurological disorders and the Zika virus epidemic in Colombia 2014-2016[J]. Int J Infect Dis, 2016, 51: 133-134. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.09.010

(下转第 211 页)