维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)01-0005-05

呼吸道合胞病毒单克隆抗体抵抗株的体内筛选

赵晓东，W.Sullender，杨锡强

（重庆医科大学附属儿童医院肾脏免疫科，重庆 400014）

【摘 要】目的：Palivizumab（PZ）是目前唯一用于防治感染性疾病的单克隆抗体药物，主要用于预防高危患儿 RSV 感染。体外筛选获得的 PZ 逃逸株 F 基因发生众多突变，且在棉鼠体内完全抵抗大剂量 PZ 预防效应。本研究评估 RSV PZ 逃逸株在动物体内是否出现。方法：用环磷酰胺（CY）腹腔注射法制备免疫抑制棉鼠模型，鼻腔接种病毒前 24h 或后 6 周肌注 15mg/kg PZ。感染后 12 周收集棉鼠肺脏，用逆转录 PCR 法扩增 RSV F 基因片断并克隆入质粒载体，测定克隆 cDNA 序列筛查 F 基因突变。结果：在 5 只接受 PZ 预防或治疗的棉鼠中，3 只棉鼠肺内病毒为含有逃逸株和原型株的混合群体；来自上述 3 只棉鼠的 F 基因 cDNA 克隆中，超过 50%显示与体外 PZ 逃逸株相同的 F 基因突变。从其中 1 只棉鼠肺脏中分离的病毒抵抗 PZ 中和效应。结论：RSV 在环磷酰胺处理的棉鼠模型肺内复制时间明显延长，在 PZ 筛选压力存在情况下，PZ 逃逸株可在体内产生，并可能导致 PZ 预防或治疗失效，提示今后有必要在 PZ 使用人群中长期监控逃逸株是否出现。

【关键词】呼吸道合胞病毒；逃逸株；单克隆抗体；免疫抑制；动物模型

【中国图书分类法分类号】R373.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-06-17

In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to monoclonal antibody prophylaxis

ZHAO Xiaodong

(*Department of Kidney Immunity, Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Palivizumab (PZ) is the only monoclonal antibody presently available for use in humans against an infectious disease. RSV selected in cell culture for growth in the presence of PZ develops F gene mutations and is resistant to PZ prophylaxis in cotton rats. Here, we evaluated the potential for PZ resistant RSV to arise in vivo. *Methods*: Cotton rats were immunosuppressed with cyclophosphamide (CY), administered PZ, and inoculated intranasally with RSV. Lungs were harvested 12 weeks after RSV infection, RT-PCR amplified F gene fragments were cloned into plasmids, and the nucleotide sequences of the cloned cDNAs were determined. *Results*: Three of the five animals had mixed populations of lung viruses, and over 50% of the clones from the 3 animals revealed F gene mutations associated with resistance to PZ. A virus completely resistant to PZ neutralization was recovered from the lung homogenate of a rat that had received PZ. *Conclusion*: Prolonged pulmonary replication of RSV in the presence of PZ is followed by the appearance of viruses resistant to PZ. The potential for the development of resistance is a consideration as antibody is used prophylactically against RSV and as passively administered antibody is under development for other infections, including emerging viruses and agents of biodefense.

【Key words】Respiratory syncytial virus; Escape mutant; Monoclonal antibody; Immunosuppression; Animal model

呼吸道合胞病毒是婴儿呼吸道感染的首要病毒病原，免疫功能低下者患病率和死亡率尤高。Palivizumab（PZ，商品名 Synagis）为针对 RSV F 蛋白的人源化中和抗体，是全球第一个用于防治感染性疾病的单克隆抗体，目前在 20 多个发达国家用于预防早产儿或具有心肺基础疾病患儿 RSV 感染[1]。

体外筛选获得的 RSV 多克隆或单克隆抗体逃逸株已广为报道[2-4]，我们此前亦在体外通过 RSV 在 PZ 存在条件下连续传代获得了 RSV PZ 逃逸株，其 F 基因发生了两处点突变。F 基因第 828 位（A-T，逃逸株 MP4）和 827 位（A-C，逃逸株 MS412）核苷酸改变分别导致 F1 亚单位内第 272 位氨基酸由 A2 母株的赖氨酸变为甲硫氨酸或谷氨酰胺。上述两种逃逸株在体内外均显示对 PZ 中和效应的完全

作者介绍：赵晓东（1970- ），男，主任医师，
主要研究方向：儿童感染与免疫。

基金项目：美国国立卫生研究院 NIH Grant R01AI46495。

维普资讯 http://www.cqvip.com

抵抗。另一逃逸株 F212 的 F 基因突变位于第 816 位核苷酸（A-T），导致 F1 亚单位内第 268 位氨基酸由 A2 母株的天门冬氨酸变为异亮氨酸。与 MP4 和 MS412 不同，F212 在体外对 PZ 中和效应仅具部分抵抗，大剂量 PZ 仍可完全预防 F212 感染棉鼠。另外，F212 在 HEp-2 细胞中和棉鼠肺内复制水平明显低于 MP4 和 MS412[5,6]。上述所有突变均位于 F 蛋白 II 号抗原位点内。

经环磷酰胺（CY）处理的棉鼠可使 RSV 在肺内复制时间明显延长至 7 周[7]。RSV 在免疫抑制患者体内的复制时间亦明显延长。作为目前仅有的 RSV 感染预防制剂，有建议将 PZ 用于免疫功能不全患者。本文采用免疫抑制棉鼠模型探讨 RSV 在 PZ 筛选压力下体内超时复制会否导致 PZ 抵抗株产生，以探讨其用于免疫功能不全者德可行性。

1 材料和方法

1.1 动物模型

在 RSV 接种前，5~6 周龄棉鼠接受 50mg/kg CY 隔日腹腔注射 3 周以制备免疫抑制动物模型，实验过程中继续接受同样方案 CY 注射。CY 处理使棉鼠外周血白细胞总数下降 >80%，证实动物模型成功建立。

1.2 病毒和抗体

A2 母株和此前已报道的 PZ 逃逸株在 HEp-2 细胞中传代繁殖，在 Vero 细胞中用噬斑形成法检测病毒滴度。PZ 购自亚拉巴马州伯明翰儿童医院药房。

1.3 实验设计

12 只棉鼠分为 A、B、C、D 四组（图 1）：D 组棉鼠（2 只）未接受 CY 及 PZ，用作外周血白细胞计数对照，其他各组均接受 CY 处理。PZ 以 15mg/kg 肌肉注射：A 组棉鼠（4 只）注射 CY 3 周后用 PZ 预防，24h 后在浅麻醉下经鼻腔接种 5×10^5PFU（50μl）RSV A2 母株病毒，6 周后再次接受相同剂量 PZ 肌注；B 组棉鼠（2 只）接种病毒前未用 PZ 预防，仅在病毒接种后 6 周肌注 PZ；C 组棉鼠（4 只）接受 CY 处理但未使用 PZ，作为病毒长时间复制的阴性对照。每周采取 A、B 两组棉鼠鼻咽洗液，在 HEp-2 细胞中分离病毒，抽提为 RSV 感染的 HEp-2 细胞中 RNA，扩增其 F 基因片断并进行序列分析。病毒接种后 12 周处死动物，采取肺脏抽提 RNA 或进行病毒分离。

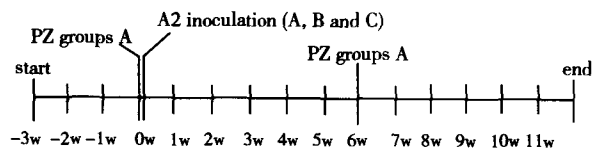


图 1 实验设计示意图

1.4 鼻咽病毒分离

标本采取前一天准备 HEp-2 细胞。浅麻醉下用 25μl 转运培养基（MEM+2%胎牛血清）冲洗棉鼠每只鼻腔，鼻咽洗液置于 1ml 冷转运培养基中。用 0.5ml 接种 HEp-2 细胞并吸附 2h，培养至细胞病变（CPE）出现或至少 5 天。如无 CPE 出现则再次传代，第二次代中仍无 CPE 则确认为病毒培养阴性。

1.5 棉鼠肺脏病毒分离

病毒感染后 12 周处死动物，收获肺脏进行病毒分离及 RNA 提取。300μl 肺组织匀浆吸附 HEp-2 细胞 2h，冲洗两次后换新鲜培养基，CO_2 孵箱中培养 4 天。首轮培养几乎无 CPE 出现，再次传代以分离病毒，如第 2 轮培养仍无 CPE 出现则认为病毒分离为阴性。

1.6 RNA 提取及 F 基因序列测定

用 Trizol（Invitrogen）从被感染的 HEp-2 细胞或研磨的棉鼠肺脏提取总 RNA。用 RT-PCR 法及引物 F622For（5′-GTTACCTATTGTGAACAAGG-3′）和 F1225Rev（5′-GCT-GCTTACATCTGTTTTTG-3′）扩增 RSV F 基因第 622 位至 1225 位核苷酸片断，长度为 603bp。首轮 PCR 产物经凝胶纯化（QIAGEN）后，用 ABI3100 自动测序仪进行序列测定。F 基因 622 至 1225 区域覆盖了既往体外获得的 PZ 逃逸株所有突变位点。

1.7 肺内病毒混合群体中各株病毒所占比例测定

上述从棉鼠肺脏或被 A2 母株感染的 HEp-2 细胞（阴性对照）中扩增获得的 603bp PCR 产物经凝胶纯化后克隆入质粒 pCR2.1-TOPO（Invitrogen）中，每一克隆反应挑取 20 至 50 个菌落再次用 F622For 及 F1225Rev 扩增插入子，直接进行序列测定，按相应位置碱基标志确定遗传型，计算混合群体中 A2 母株病毒和逃逸株病毒所占比例。

1.8 微中和实验

按文献报道方法稍加修改操作[8]。1000PFU 的 A2 母株、体外逃逸株 MS412、棉鼠肺内分离病毒 MCRL5（分离自棉鼠 A-4）、A2R3（分离自棉鼠 C-3）、A2R4（分离自棉鼠 C-4）或 5000PFU 体外逃逸株 F212 与不同稀释度 PZ 及豚鼠补体混匀，37℃共孵 1h。由于 F212 复制能力较弱，故升高其用量以使其初始光密度值与其余毒株可比。中和后的病毒用于接种 HEp-2 细胞（重复 3 孔，37℃ 1h），3 天后培养细胞用冷丙酮固定，然后用 G 蛋白特异性单抗测定细胞中 RSV 抗原量以代表 RSV 复制水平。

2 结 果

2.1 棉鼠鼻咽洗液病毒分离和逃逸株监测

A2 母株病毒接种后 6 周内从所有棉鼠鼻咽洗液中均成功分离出病毒（表 1），但接种后 4 周的标本多需体外传代两次方可见 CPE，接种后 6 周获得

维普资讯 http://www.cqvip.com

的病毒分离株渐稀少。分离株 F 基因 622–1225 序列测定显示，接种 A2 母株病毒后 6 周，1 只棉鼠（A–4）肺内含有病毒混合群体，于 F 基因第 827 位为 A2 母株(A)和体外 PZ 完全抵抗株 MS412（C）混合（图 2）。接种后 8 周，F 基因 827 位为均一的突变基因型 C，导致推倒氨基酸改变为赖氨酸 – 谷氨酰胺。

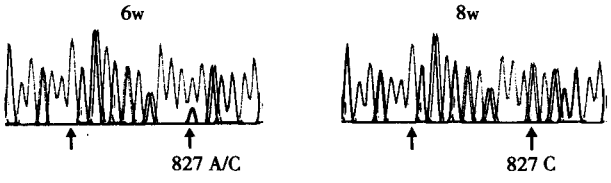


图 2　A–4 棉鼠鼻腔洗液内 PZ 逃逸株监测结果

蓝色箭头示第 816 位碱基。红色箭头示第 827 位碱基，绿色峰（A）为 A2 母株信号，蓝色峰（C）为逃逸株 MS412 信号。

2.2　棉鼠肺内病毒混合群体构成分析

直接序列测定分析：从 10 只接种病毒的棉鼠中的 9 只扩增出 F 基因片段并进行序列分析（图 3）。A 组中 1 只棉鼠（A–3）序列测定结果与 A2 母株无明显差别，另外 2 只存活鼠（A–2 和 A–4）于 F 基因第 816 位核苷酸均提示 A2 母株病毒和逃逸株 F212 混合群体存在。816 位核苷酸 A 代表 A2 母株，T 代表逃逸株 F212。B 组中两只棉鼠 RT–PCR 反应呈阳性，其中一只亦显示第 816 位 A2/F212 病毒混合群体。作为对照的 C 组棉鼠（接种 A2 病毒但未接受 PZ）肺内病毒的 F 基因未显示与体外 PZ 逃逸

表 1　棉鼠鼻腔排毒及 PZ 逃逸株监测

棉鼠编号	PZ处理	感染后时间						
		4w	5w	6w	7w	8w	9w	11w
A–1	PZ 0w, 6w	+	+P2	+P2	–	–	–	–
A–2	PZ 0w, 6w	+	+P2	+P2	–	–	+P2	+P2
A–3	PZ 0w, 6w	+	+	+P2	–	–	–	–
A–4	PZ 0w, 6w	+	+	+	–	+	–	–
				（混合病毒群体，第 827 位碱基 A/C）		（突变，第 827 位碱基 A–C）		
B–1	PZ 6w	+	+	+P2	+P2	+P2	+P2	+P2
B–2	PZ 6w	+	+P2	+P2	–	–	–	–

注：+ 示细胞病变阳性；– 示无细胞病变；+P2 示第二代出现细胞病变。测定病毒部分 F 基因序列（第 660 至 1210 位核苷酸），第 827 位碱基 C 与此前体外获得的逃逸株 MS412 相同。

表 2　棉鼠肺内病毒混合群体构成克隆定量分析

PCR产物来源	测定克隆数量	PZ处理	与 A2 母株或体外逃逸株基因型相同的克隆数及比例					
			无核苷酸改变(A2)	816 A–T (F212)	827 A–C (MS412)	828 A–T (MP4)	816 A–G	828A–G
A2 母株	24	NA	23 (96%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	0 (0%)
A–2 棉鼠	48	0w, 6w	19 (40%)	22 (46%)	3 (6%)	3 (6%)	1 (2%)	0 (0%)
A–3 棉鼠	45	0w, 6w	43 (96%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (4%)	0 (0%)	0 (0%)
A–4 棉鼠	50	0w, 6w	11 (22%)	18 (36%)	17 (34%)	3 (6%)	0 (0%)	0 (0%)
B–1 棉鼠	22	6w	6 (27%)	12 (55%)	1 (5%)	2 (9%)	0 (0%)	0 (0%)
B–2 棉鼠	23	6w	21 (91%)	1 (4%)	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
C–1 棉鼠	23	未处理	23 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
C–2 棉鼠	24	未处理	23 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
C–3 棉鼠	22	未处理	21 (96%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)
C–4 棉鼠	22	未处理	22 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

维普资讯 http://www.cqvip.com

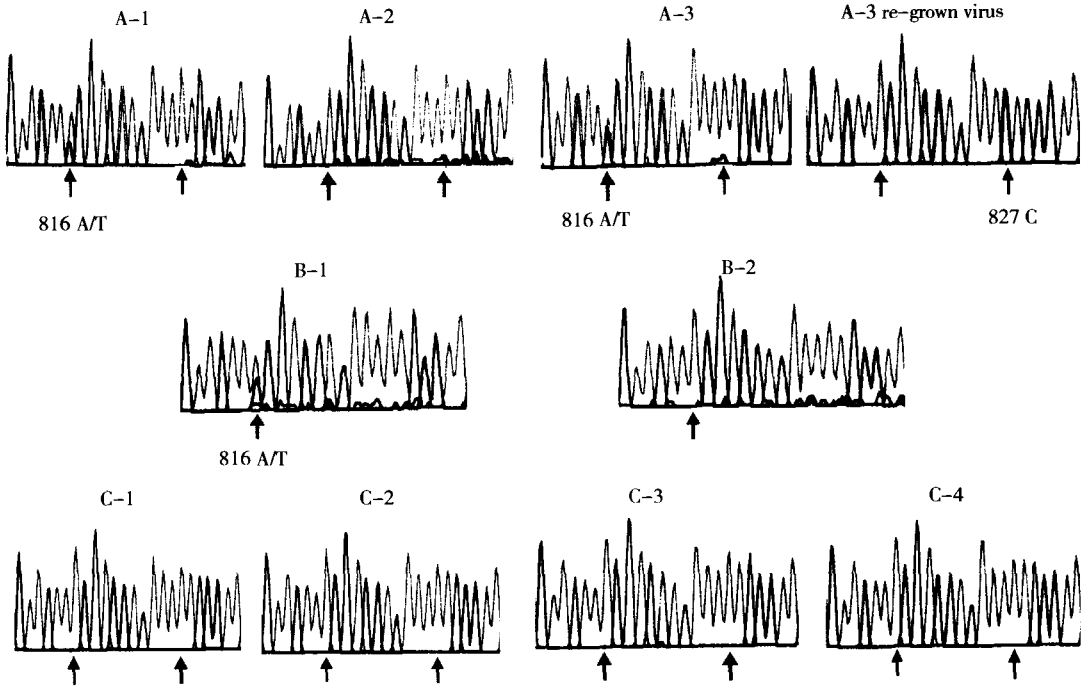


图 3　用序列测定鉴定棉鼠肺内病毒混合群体构成

A-4　re-grown 病毒指分离自 A-4 棉鼠肺组织的病毒，其余用于序列分析的 RNA 均提自肺组织。图示 F 基因第 810 至 833 位碱基。蓝色箭头示第 816 位碱基，绿色峰（A）示 A2 母株信号，红色峰（T）示逃逸株 F212 信号。红色箭头示第 827 位碱基，绿色峰（A）为 A2 母株信号，蓝色峰（C）为逃逸株 MS412 信号。

株相同的基因突变，提示上述逃逸株相关的基因突变仅与是否使用 PZ 有关。

用 cDNA 克隆序列测定法鉴定混合群体中 A2 母株 / 逃逸株构成比：直接序列测定显示肺内病毒混合群体构成较为复杂，为更精确定量，我们将扩增自棉鼠肺组织的 RT-PCR 产物克隆入载体并挑取一定数量菌落再次进行 PCR 反应，测定 PCR 产物序列，根据其遗传标志确定病毒混合群体中各种毒株所占比例。作为对照，扩增自 HEp-2 细胞中繁殖的 A2 母株的 24 个 cDNA 克隆仅 1 个为变异株（4%）。从 4 只对照组棉鼠（C 组，未接受 PZ）获取的 91 个 cDNA 克隆中亦仅发现一个变异克隆。而来自 A、B 两组 5 只棉鼠的 cDNA 克隆则显示了不同程度的逃逸株标志。5 只棉鼠中的 3 只肺内含有的超过 50%的突变序列的毒株，其序列改变与体外 PZ 逃逸株序列相同，包括对 PZ 完全抵抗的逃逸株 MP4 和 MS412。

2.3　棉鼠肺组织分离病毒 F 基因序列分析

从病毒接种后 12 周的 3 只棉鼠（A-4、C-3 和 C-4）肺组织中成功分离到病毒，分别命名为 MCRL5、A2R3 和 A2R4。分离的 F 基因序列与用 RT-PCR 反应直接从肺组织扩增的 F 基因序列比较，发现其中 MCRL5 的 F 基因序列与直接从 A-4 鼠扩增出的 PCR 片断序列在混合群体显示位点处差异很大。MCRL5　F 基因第 816 位核苷酸为代表 A2 母株的 A，并无逃逸株 F212 标志；于 F 基因第 827 位核苷酸为单一的完全逃逸株 MS412 信号（C），而无 A2 母株信号。相反，肺组织直接 PCR 产物序列分析显示 A-4 棉鼠肺内病毒于 F 基因 816 位为 A2/F212 混合群体，于 827 位亦为 A2/MS412 混合群体并以 A2 母株为主。A2R3 和 A2R4 F 基因序列与相应棉鼠肺组织直接序列分析结果无异。

2.4　肺组织分离病毒对 PZ 中和反应的抗性

用微中和法测定肺组织分离病毒对 PZ 的抗性（图 4）。MCRL5 对 PZ 中和反应具有完全抗性，而 A2 母株病毒、A2R3 和 A2R4 可被 PZ 中和；F212 与既往实验结果一致，具有部分 PZ 抗性。上述结果提示 MCRL5 与具有共同 F 基因型的体外 PZ 逃逸株 MS412 一样，在体内外均具有完全的 PZ 抗性。

维普资讯 http://www.cqvip.com

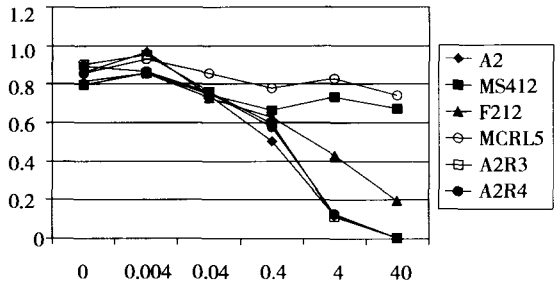


图 4　体内筛选获得的 PZ 逃逸株在体外对 PZ 中和效应的抗性

3　讨　论

使用抗体防治感染性疾病虽已有很长的历史，但 PZ 却为目前唯一用于临床预防感染性疾病的单克隆抗体。PZ 为美国食品和卫生管理局批准用于早产儿、慢性肺病和具有血流动力学改变的先天性心脏病儿童 RSV 感染预防。PZ 在免疫功能健全个体中对 RSV 感染无明显疗效，其用于治疗免疫功能不全个体 RSV 感染正处于临床试验中[9]。

RNA 病毒以准种方式存在，外界选择压力可使变异株获得生长优势[10]。在免疫功能健全个体中，正常的细胞免疫功能可最终清除病毒，而免疫功能不全患儿（尤其是细胞免疫功能不全）RSV 体内复制时程明显延长[11]。因此，针对 RSV 的抗体制剂将使 RSV 在筛选压力存在情况下完成多轮复制。包括 PZ 在内的许多 F 和 G 蛋白单克隆或多克隆抗体在体外均十分容易筛选到逃逸株，但抗体逃逸株是否在体内环境中产生及成功复制至今仍不清楚。我们在免疫抑制的动物模型中试图验证 PZ 抵抗病毒可否出现。与他人研究结果一致，RSV 在免疫抑制棉鼠动物模型中复制时间明显延长，感染后 6 周于鼻腔、感染后 12 周于肺内均可检测。

RSV 接种后 6 周，1 只棉鼠鼻腔分离的病毒为 A2 母株 / 逃逸株混合群体，接种后 8 周变为单一逃逸株群体。该棉鼠于 A2 母株接种后 6 周接受了第二次 PZ 注射，可能提供了持续的筛选压力使逃逸株获得生长优势。此逃逸株与体外筛选获得的 PZ 逃逸株 MS412 F 基因突变位点相同，MS412 在体外及动物体内均具有完全的 PZ 抗性，因而提示 PZ 使用后动物鼻咽部排泌的病毒含有 PZ 完全抵抗株。但如后述，由于病毒在特定环境中生长复制能力（即病毒适应性）等原因，采用 RT-PCR 直接从鼻咽洗液中扩增 F 基因可能较测定已被分离病毒的序列更为可靠。

感染后 12 周以肺组织 RNA 为模板的 RT-PCR 产物序列测定发现 F 基因第 816 位核苷酸为 A2 母株 / 逃逸株（F212）混合，此与病毒复制时间延长无关，因为对照组（C 组，未接受 PZ）未见逃逸株信号。为进一步明确混合病毒群体的构成，我们将 RT-PCR 产物克隆入质粒载体并挑取一定数量克隆进行序列测定，结果发现病毒混合群体的构成较序列测定图所示更为复杂，5 只接受 PZ 的棉鼠的众多克隆均显示 F 基因突变，这些突变在此前研究中亦明确为 PZ 抵抗基因型。

病毒接种后 12 周从接受 PZ 的一只棉鼠中分离出的病毒 MCRL5 具有与体外筛选获得的 PZ 逃逸株 MS412 相同的 F 基因突变（827 A-C）。MCRL5 在体外完全抵抗 PZ 的中和效应，提示 MCRL5 亦具有与 MS412 相似的表现型。值得注意的是，当采用肺组织 PCR 产物直接测序时，MCRL5 并非混合病毒群体中的优势生长株，提示病毒分离过程可能导致 MCRL5 优势生长。

无论 DNA 或 RNA 病毒均能在被动或主动免疫压力存在时发生变异，这已在流感病毒、手 - 足 - 口病毒和乙肝病毒中证实[12-16]。本研究首次证实 PZ 使用导致免疫功能缺陷宿主体内 F 基因突变株产生，且绝大部分突变株具有与体外筛选获得的 PZ 抵抗株相同的基因型，因而可以推测 PZ 的应用是 PZ 抵抗株产生的原因。但现仍不清楚上述逃逸株是否会在人体内产生，会否导致临床后果。如逃逸株适应性降低，其在人群中传播的可能性则较小。今后的研究应当关注 PZ 抵抗株的适应性，并长期进行 PZ 使用者 PZ 逃逸株的临床监测。

参　考　文　献

[1] American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn. Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus infections [J]. Pediatrics, 2003;112: 1442-1446.

[2] Beeler J, an Wyke C. Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus effect of mutation upon

（下转第 18 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

粒 pcDNA3.1(+)-cadF。重组质粒经双酶切鉴定、PCR 反应鉴定和 DNA 测序，其结果表明真核表达重组质粒 pcDNA3.1(+)-cadF 构建成功。为证实所构建的重组质粒具有应用价值，我们采用 PolyFect 转染试剂介导的转染法把重组质粒转入真核细胞 COS-7 进行表达，并采用 RT-PCR 法检测重组质粒在 COS-7 细胞中的瞬时表达。结果表明，重组质粒 pcDNA3.1(+)-cadF 转染成功，并能在 COS-7 细胞中表达，为进一步研究 DNA 疫苗在预防和控制 CJ 感染及其相关疾病中的作用奠定了基础。

参 考 文 献

[1] O'Ryan M, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world [J]. Semin Pediatr Infect Dis, 2005;16(2):125-136.

[2] Ryan MM. Guillain-Barr é syndrome in childhood [J]. J. Paediater Child Health, 2005;41(5-6):237-241.

[3] Parkhill J, Wren BW, Mungall K, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen Campylobacter jejuni reveals hypervariable sequences[J]. Nature, 2000;403(6770):665-668.

[4] Monteville MR, Yoon JE, Konkel ME. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by Campylobacter jejuni requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization [J]. Microbiology, 2003;149(10):153-165.

[5] Datta S, Niwa H, Itoh K. Prevalence of 11 pathogenic genes of Campylobacter jejuni by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces [J]. J Med Microbiol, 2003;52(4):345-348.

[6] Dorrell N, Mangan JA, Laing KG, et al. Whole genome comparison of Campylobacter jejuni human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity [J]. Genome Res, 2001; 11(10): 1706-1715.

[7] Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, et al. Multilocus sequence typing system for Campylobacter jejuni [J]. J Clin Microbio, 2001;39(1):4-23.

[8] Cui Z. DNA vaccine [J]. Adv Genet, 2005;54:257-289.

（上接第 9 页）

fusion function[J]. J Virol, 1989;63:2941-2950.

[3] Crowe J, Firestone C, Crim R, et al. Monoclonal antibody-resistant mutants selected with a respiratory syncytial virus-neutralizing human antibody Fab fragment (Fab 19) define a unique epitope on the fusion (F) glycoprotein[J]. Virology, 1998; 262:373-375.

[4] Garcia-Barreno B, Portela A, Delgado T, et al. Frame shift mutations as a novel mechanism for the generation of neutralization resistant mutants of human respiratory syncytial virus[J]. EMBO J, 1990;9:4181-4187.

[5] 赵晓东，杨锡强，陈坤华. 呼吸道合胞病毒对单克隆抗体预防的抵抗 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005;25: 222-226

[6] 赵晓东，W. Sullender，杨锡强. 呼吸道合胞病毒逃逸株对单克隆抗体预防的抗性比较[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005; 28:648-651.

[7] Johnson R, Prince G, Suffin S, et al. Respiratory syncytial virus infection in cyclophosphamide-treated cotton rats[J]. Infect. Immun, 1982;37:369-373.

[8] Anderson L, Hierholzer J, Bingham P, et al. Microneutralization test for respiratory syncytial virus based on an enzyme immunoassay[J]. J Clin Microbiol, 1985; 22:1050-1052.

[9] Boeckh M, Berrey M, Bowden R, et al. Phase 1 evaluation of the respiratory syncytial virus specific monoclonal antibody palivizumab in recipients of hematopoietic stem cell transplants[J]. J Infect Dis, 2001;184:350-354.

[10] Domingo E, Holland J. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses[M]. The evolutionary biology of viruses. S. Morse. New York, Raven Press: 1994;161-184.

[11] Fishaut M, Tubergen D , McIntosh K. Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity [J]. J. Pediatr, 1980;96: 179-186.

[12] Carman W, Zanetti A, Karayiannis P, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus [J]. Lancet, 1990;336: 325-329.

[13] Hamre D, Loosli C, Gerber P. Antigenic variants of influenza A virus (PR8 strain). III. Serological relationships of a line of variants derived in sequence in mice given homologous vaccine[J]. J Exp Med, 1958;107:829-844.

[14] Hyslop N, Fagg R. Isolation of variants during passage of a strain of foot-and-mouth disease virus in partly immunized cattle [J]. J Hyg (Lond), 1965; 63:357-368.

[15] Protzer-Knolle U, Naumann U, Bartenschlager R, et al. Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation[J]. Hepatology, 1998;27:254-263.

[16] Taboga O, Tami C, Carrillo E, et al. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants[J]. J Virol, 1997;71:2606-2614.