

• 论 著 •

轮状病毒减毒活疫苗感染性滴度一步法 RT-qPCR 检测方法的建立^{*}杜加亮, 刘悦越, 张 永, 赵荣荣, 赵一荣, 韩 菲, 刘 艳[△]

(中国食品药品检定研究院肠道病毒疫苗室, 北京 102629)

摘 要:目的 建立型别特异性一步法反转录实时荧光定量聚合酶链反应检测方法, 用于多价轮状病毒疫苗的鉴别和效力评价。方法 针对 G1、G2、G3、G4、G9 型轮状病毒设计引物探针, 优化反应温度和条件, 使用轮状病毒疫苗株培养后收获液进行特异性、线性和范围、重复性检测, 评估该反应体系的性能。结果 各型别之间无交叉反应, 其他肠道病毒阳性标本未见特异性扩增曲线。每个型别的稀释倍数和 Ct 值的线性决定系数均 $>95\%$ 。每个型别各浓度梯度同一检测日内和不同检测日间的变异系数均 $<15\%$, 并且差异均无统计学意义 ($P=0.917, 0.746$)。结论 该方法特异性、线性和范围、重复性都符合检测要求, 可用于多价轮状病毒疫苗的鉴别和效力评价。

关键词: 荧光定量聚合酶链反应; 轮状病毒; 疫苗

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.21.003

中图法分类号: R725.1; R44

文章编号: 1673-4130(2020)21-2570-05

文献标识码: A

One-step real time RT-PCR in titration of rotavirus vaccine^{*}DU Jiali, LIU Yueyue, ZHANG Yong, ZHAO Rongrong, ZHAO Yirong, HAN Fei, LIU Yan[△]

(Division of Enterovirus Vaccines, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: **Objective** To establish of a serotype-specific one-step reverse transcription real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction for the identification and potency evaluation of multivalent rotavirus vaccines. **Methods** Serotype-specific primers and probes were designed for G1, G2, G3, G4, G9 rotavirus, followed by optimization of reaction temperature and conditions. Consequently, the evaluation of specificity, linearity and range, repeatability of this method was performed by using the culture of five rotavirus vaccine strains. **Results** There was no cross-reaction between the five serotypes, and other enterovirus-positive samples showed no specific amplification curve. All the coefficients of determination between dilution factor and Ct value were more than 95% . The intra- and inter-day coefficients of variation were less than 15% and showed no statistic difference ($P=0.917, 0.746$). **Conclusion** The specificity, linearity and range, repeatability of the method are consistent with the requirements of detection, which can be used for the identification and potency evaluation of multivalent rotavirus vaccines.

Key words: real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction; rotavirus; vaccine

轮状病毒是世界范围内导致 5 岁以下儿童严重腹泻的最主要病原体。自 2001 年轮状病毒疫苗问世以来, 全球已经有 100 多个国家和地区在使用。在疫苗问世之前, 轮状病毒相关胃肠炎 (RVGE) 在 5 岁以下儿童中每年导致超过 50 万死亡病例^[1]。虽然疫苗的问世减少了死亡病例, 但是在低收入国家, RVGE 每年仍然导致超过 20 万死亡病例^[2]。轮状病毒疫苗可有效降低 RVGE 的负担, 因此, 对疫苗的评价显得尤为重要, 尤其是多价疫苗的鉴别和效力评价。常用

的检测方法为使用特异性抗体, 通过荧光灶试验 (FFA)、空斑试验或细胞培养半数感染量 (CCID₅₀) 等来实现^[3-5], 但是这些方法均涉及特异性抗体制备困难、操作复杂且要求高、耗时长、主观性大、通量小等不足, 不利于多价疫苗产品的精准配制和生产全过程的质量控制。相比之下, 基于核酸的定量检测方法具有试剂材料可及性强、可操作性强、一致性高、耗时短、通量大、结果更加客观等优点, 已经成功应用于甲型肝炎、腮腺炎病毒疫苗的滴度检测^[6-7]。MSD Ro-

^{*} 基金项目: 十二五国家重大科技专项 (2012ZX10004702); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2012AA02A402)。

作者简介: 杜加亮, 男, 副研究员, 主要从事肠道病毒疫苗的质量控制研究。 [△] 通信作者, E-mail: liuyan@nifdc.org.cn。

本文引用格式: 杜加亮, 刘悦越, 张永, 等. 轮状病毒减毒活疫苗感染性滴度一步法 RT-qPCR 检测方法的建立 [J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(21): 2570-2574.

taTeq 使用的就是基于细胞感染的核酸定量检测方法^[8],但由于疫苗毒株不同,基因序列不同,细胞感染特点也不同,该方法需要针对不同疫苗毒株进行不同设计。轮状病毒流行株因地区和年份而不同,G1、G2、G3、G4、G9 型构成了我国的主要流行株^[9]。国内某企业生产的五价人-牛重配轮状病毒减毒活疫苗涵盖了以上 5 种主要流行株。本研究针对该疫苗,参考现有方法^[10],设计一步法反转录实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR),用于多价轮状病毒疫苗的鉴别和效力评价。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 单价轮状病毒参考品由国内某企业提供,病毒滴度分别为 G1:1.04×10⁷ CCID₅₀/mL, G2:1.05×10⁷ CCID₅₀/mL, G3:1.76×10⁷ CCID₅₀/mL, G4:3.96×10⁷ CCID₅₀/mL, G9:3.45×10⁷ CCID₅₀/mL。一步法荧光定量 PCR 试剂盒(RR064)和一步法反转录 PCR 试剂盒(RR057)购自 TaKaRa 公司,QIAamp Viral RNA Mini Kit 购自 QIAGEN 公司。细胞培养液为 Gibco RPMI Medium 1640(1×)+1%(v/v)谷氨酰胺+1%(v/v)双抗+10%(v/v)胎牛血清。病毒

稀释液为 Gibco RPMI Medium 1640(1×)+1%(v/v)谷氨酰胺+1%(v/v)双抗+5 μg/mL 胰酶。荧光定量 PCR 仪(7500)购自 Thermofisher Scientific 公司;恒河猴肾细胞 MA104 为实验室保存。

1.2 引物探针设计和质粒参考品制备 分别吸取 200 μL G1、G2、G3、G4 和 G9 型单价病毒原液,按照 QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒说明书的步骤提取病毒 RNA。利用通用型 VP7 引物 VP7-F 和 VP7-R 扩增各型单价病毒原液的 VP7 基因,见表 1。目的条带经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定回收后,与 pEASY-T3 载体连接。转化 DH5a 大肠埃希菌感受态后,经过蓝白斑筛选、PCR 鉴定、酶切鉴定和测序验证。测序结果经序列比对后,选择型别间差异明显的区段进行引物和探针设计(表 1),并由生工生物工程(上海)有限公司合成。质粒纯度符合要求(A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.8~2.0)后作为备用参考品原液。质粒拷贝数(copy/μL)按照以下公式计算:(6.02×10¹²)×(质粒浓度 ng/μL×10⁻⁹)/(质粒长度 bp×660)。本研究中使用稀释至 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² copy/μL 的质粒作为参考品。

表 1 本研究使用的探针/引物信息

名称	碱基序列	标记
VP7-F	GGCTTTAAGAGAGAGAATTTCCATCTGG	
VP7-R	GGTCACATCTTACAATTCTAATCTAAG	
G1F	ACAATCGCGAGAATCAAATAAGT	
G1R	CCTATCCCTAACGGTTGTGTATT	
G1P	ATATCGATGGCATCATCATGTACCGTGAA	5'-FAM-3'Tamara
G2F	ATAACGCGGTCACTAGACGC	
G2R	TCTCATTTTTAGCTTATGCTGGAT	
G2P	TGTATATACGAATTAGACTAGTGAGAGCCAT	5'-FAM-3'Tamara
G3F	TCCGATTAATGGATCAATGGACA	
G3R	GTTGCTACTTCAGTTGGGTAA	
G3P	CATAAAGTCGAAGTTAAGAATACTTCTTCGC	5'-FAM-3'Tamara
G4F	TGGCTATAATACAAGTTGGCGGTT	
G4R	GAATACTTGCCACAATTTTTTCCAG	
G4P	ACAGCTGATCCCACTTCTCCACAAAGAGAACGA	5'-FAM-3'Tamara
G9F	TCACCATTTGGAAGACGCAA	
G9R	AGTTGATGCGTCAGCAGGGTA	
G9P	TGGAATTAATTTACCAATCGCTGGCTCCAT	5'FAM-3'Tamara

1.3 细胞培养和病毒接种 取生长密度合适的 MA104 细胞,消化制成浓度约为 1.2×10⁶ 个细胞的悬液,铺 96 孔细胞培养板,每孔 200 μL,置于 37 ℃ 5%CO₂ 培养箱中培养 3~5 d 后使用。使用病毒稀释液进行待测病毒稀释,置于 37 ℃ 培养箱中活化 60

min。取出预先铺有 MA104 细胞的 96 孔细胞培养板,弃掉细胞维持液。把活化后的病毒加到相应的细胞培养孔中,每孔 40 μL,每个稀释度 4 孔,置于 37 ℃ 5%CO₂ 培养箱中培养 18~20 h。每孔中加入 4.5% Triton X-100 工作液 10 μL,置于一 70 ℃ 放置至少 1 h。

1.4 RT-qPCR 感染板室温放置 20 min 直至解冻, 1 000 r/min 振荡 10 s, 1 000 r/min 离心 1 min, 从每孔中吸取 15 μ L 溶液进行 40 倍稀释作为 RT-qPCR 的模板。RT-qPCR 反应体系为 12.5 μ L Buffer、0.5 μ L 反转录酶、0.5 μ L Taq 酶、上下游引物(10 μ mol)各 0.4 μ L、探针(10 μ mol)0.4 μ L、5 μ L 模板、加水补足至 25 μ L。反应条件为 42 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s(收集荧光), 40 个循环。结果解释: Ct 值 $\leq$ 35 且扩增曲线呈 S 型为阳性, 否则为阴性。

1.5 特异性检测 每个血清型毒株特异性引物/探针对每个重配株的单价培养物进行 RT-qPCR 来确定方法的特异性。每对引物/探针都应选择性地使 G1、G2、G3、G4 和 G9 重配株的 VP7 基因片段序列扩增。所有引物/探针只能对特异型扩增, 对其他型无扩增或选择性差异 $\geq$ 210 倍。将灭活的其他肠道病毒[柯萨奇病毒 A(CA16)、肠道病毒 71 型(EV71)和脊髓灰质炎病毒]进行 RT-qPCR, Ct 值 $\geq$ 35 或无扩增。

1.6 线性和范围检测 将单价轮状病毒参考品以 1:15 的稀释倍数首次稀释, 然后以 2.5 倍倍比稀释 4 种稀释度, 以基于细胞感染的 RT-qPCR 进行轮状病毒体外感染效力测定。以 Ct 值对被测物浓度制图, 用最小二乘法进行线性回归。回归方程的相关系数(r^2) $\geq$ 0.950 0。确定 Ct 值与被测物浓度呈线性关系的浓度范围。

1.7 重复性检测 使用上述稀释倍数的标本, 采用

RT-qPCR 分析病毒感染效力。使用 5 个型的轮状病毒特异性引物探针对每个型进行定量检测, 试验重复 3 次, 每次试验 4 个重复, 每个型的每个稀释度共得到 12 个 Ct 值, 其变异系数(CV)不超过 10%。

1.8 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件对重复性检测结果进行数据分析处理, 比较同一工作日内及不同工作日、不同血清型、不同稀释度间的检测结果是否有差异。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均值差异性比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 特异性 每个血清型毒株特异性引物/探针对每个重配株的单价培养物进行 RT-qPCR 来确定方法的特异性。每对引物/探针都应选择性地使 G1、G2、G3、G4 和 G9 重配株的 VP7 基因片段序列扩增。所有引物/探针对其特异型扩增的 Ct 值与其对其他型扩增的 Ct 值比较, 选择性差异 $\geq$ 210 倍。对其他型扩增的 Ct 值 $\geq$ 35 或无扩增(图 1)。

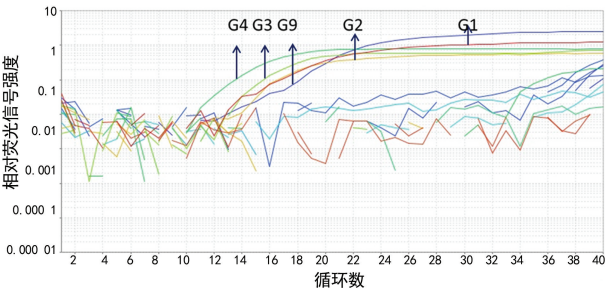


图 1 特异性扩增曲线

表 2 不同稀释倍数和 Ct 值的线性相关系数(r^2)

检测次数	G1(6.93~0.18 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	G2(7.00~0.18 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	G3(11.70~0.30 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	G4(26.40~0.68 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	G9(23.00~0.59 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)
1	0.994 8	0.986 1	0.987 3	0.957 6	0.987 8
2	0.993 1	0.993 1	0.980 0	0.942 9	0.973 8
3	0.992 5	0.990 1	0.966 9	0.972 2	0.997 1
均值	0.993 5	0.989 8	0.978 1	0.957 6	0.986 2

检测次数	G1(6.93~0.44 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	G2(7.00~0.45 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	G3(11.70~0.75 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	G4(26.40~1.69 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	G9(23.00~1.47 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)
1	0.990 7	0.995 2	0.977 6	0.952 3	0.975 8
2	0.993 1	0.993 3	0.960 3	0.936 5	0.975 8
3	0.993 9	0.990 0	0.949 5	0.964 3	0.997 6
均值	0.992 6	0.992 8	0.962 5	0.951 0	0.983 1

检测次数	G1(2.77~0.18 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	G2(2.80~0.18 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	G3(4.69~0.30 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	G4(10.56~0.68 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	G9(9.20~0.59 $\times$ 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)
1	0.995 8	0.974 3	0.999 1	0.991 4	0.997 9
2	0.990 9	0.988 4	0.988 6	0.986 2	0.993 4
3	0.986 2	0.980 2	0.991 7	0.996 8	0.999 2
均值	0.991 0	0.981 0	0.993 1	0.991 5	0.996 8

2.2 线性和范围 当使用全部 5 种稀释度的检测数值进行计算时, G1、G2、G3、G4、G9 型的稀释倍数和 Ct 值的线性 r^2 为 0.957 6~0.993 5; 当使用前 4 种稀释度的检测数值进行计算时, G1、G2、G3、G4、G9 型的稀释倍数和 Ct 值的线性 r^2 为 0.951 0~0.992 8; 当使用后 4 种稀释度的检测数值进行计算时, G1、G2、G3、G4、G9 型的稀释倍数和 Ct 值的线性 r^2 为 0.981 0~0.996 8(表 2)。

2.3 重复性 如表 3 所示, G1、G2、G3、G4、G9 型重配株第 1、2、3 天重复检测结果的 CV 值为 0.65%~

6.71%、0.72%~10.10%、0.05%~8.10%, 不同日间结果的 CV 值为 2.05%~13.54%, 一般认为重复性尚好($CV<15\%$)。经统计学分析, 同一日重复检测结果和日间结果比较, 差异均无统计学意义($P=0.917、0.746$)。不同稀释度间的检测结果差异有统计学意义($P<0.001$), 说明本研究中选择的稀释度可以有效反映不同感染剂量的病毒复制。不同血清型之间的检测结果差异无统计学意义($P=0.345$), 说明各个血清型的疫苗毒株感染 MA104 细胞后具有相似的复制特征。

表 3 重复性检测结果

型别	浓度(× 10 ⁵ CCID ₅₀ /mL)	第 1 天		第 2 天		第 3 天		不同日间 CV(%)
		$\bar{x}\pm s$ (copy/ μ L)	CV(%)	$\bar{x}\pm s$ (copy/ μ L)	CV(%)	$\bar{x}\pm s$ (copy/ μ L)	CV(%)	
G1	6.93	6.28±0.09	1.37	6.43±0.14	2.19	6.51±0.05	0.05	2.05
	2.77	5.80±0.20	3.41	6.08±0.15	2.51	6.18±0.09	1.44	3.59
	1.11	5.37±0.08	1.51	5.56±0.12	2.10	5.68±0.11	1.92	2.94
	0.44	5.06±0.11	2.15	5.23±0.23	4.40	5.23±0.05	0.90	3.07
	0.18	4.64±0.10	2.08	4.66±0.09	1.91	4.95±0.16	3.15	3.79
G2	7.00	5.63±0.08	1.49	6.04±0.04	0.72	6.28±0.05	0.75	4.83
	2.80	4.99±0.13	2.70	5.54±0.11	1.96	5.69±0.03	0.46	6.02
	1.12	4.45±0.16	3.58	4.90±0.07	1.36	5.11±0.09	1.76	6.36
	0.45	3.99±0.12	2.95	4.50±0.17	3.70	4.74±0.11	2.26	7.91
	0.18	3.06±0.21	6.71	3.76±0.38	10.10	3.94±0.32	8.10	13.54
G3	11.70	7.02±0.08	1.17	7.57±0.18	2.35	7.69±0.11	1.44	4.36
	4.69	6.76±0.16	2.31	7.28±0.10	1.36	7.48±0.21	2.79	4.83
	1.88	6.29±0.17	2.76	6.77±0.11	1.57	7.09±0.10	1.35	5.36
	0.75	5.75±0.11	1.93	6.00±0.11	1.77	6.46±0.14	2.21	5.38
	0.30	5.27±0.15	2.85	5.57±0.11	2.00	5.89±0.22	3.71	5.47
G4	26.40	6.75±0.15	2.22	7.02±0.05	0.72	7.15±0.12	1.74	2.90
	10.56	6.64±0.24	3.64	6.94±0.27	3.95	6.97±0.20	2.89	3.92
	4.22	6.18±0.21	3.41	6.42±0.13	2.02	6.54±0.18	2.73	3.47
	1.69	5.78±0.19	3.33	6.00±0.08	1.28	6.05±0.11	1.87	2.91
	0.68	5.17±0.15	2.92	5.26±0.09	1.78	5.49±0.19	3.42	3.68
G9	23.00	5.79±0.06	0.98	6.14±0.10	1.66	6.52±0.05	0.75	5.12
	9.20	5.56±0.04	0.65	5.89±0.10	1.76	6.10±0.11	1.73	4.18
	3.68	5.05±0.04	0.72	5.35±0.07	1.24	5.60±0.02	0.34	4.47
	1.47	4.55±0.03	0.66	4.81±0.05	0.97	5.09±0.09	1.76	4.86
	0.59	4.14±0.13	3.16	4.06±0.24	5.93	4.52±0.16	3.48	6.35

3 讨 论

对于经黏膜途径感染的病毒来说,与天然病毒具有相同感染和复制方式的减毒活疫苗仍然是最有效的激发机体免疫保护的方式^[11]。对于其他可经传统方法制备的灭活病毒疫苗来说,生产工艺中也必然少不了存在活病毒的灭活前阶段^[12]。因此,开发快速、

简便的滴度检测方法显得尤为重要。本研究初步建立了一种快速、灵敏、特异的检测多价轮状病毒减毒活疫苗病毒滴度的技术,该方法对其他肠道病毒(CA16、EV71 和脊髓灰质炎病毒)无扩增,特异性符合要求;当使用前 4 种稀释度的检测数值进行计算时,5 种型别的稀释倍数和 Ct 值的线性 r 最高,均在

0.980 0 以上,故选择前 4 种稀释度作为该方法的线性和范围;重复性检测结果显示,该方法在同一工作日内和不同工作日内均能得到差异无统计学意义的结果,重复性符合要求;不同稀释度和不同血清型之间的统计学分析结果也显示该方法在线性和范围内可有效反映不同病毒株的复制情况。因此,该方法具有一定的推广应用价值。

另外,轮状病毒流行株因地区和年份而不同,G1、G2、G3、G4、G9 型构成了我国的主要流行株^[11],G8 型也时有检出^[12]。我国多家企业都在进行多价轮状病毒疫苗的研发。多价轮状病毒疫苗是以动物来源的轮状病毒为母本,是将其主要抗原成分 VP7 和/或 VP4 替换成人源轮状病毒的相应组分制备而成的。正是多价疫苗各个毒株之间的这种微小差异(主要抗原成分不同),使多价疫苗的鉴别和效力检测需要用到型别特异性单克隆抗体^[4-6]。但是基于特异性单克隆抗体的检测方法存在多种影响检测结果和操作过程的因素,不利于多价疫苗产品的精准配制和生产全过程的质量控制。与基于特异性单克隆抗体的检测方法相比,一步法荧光定量 PCR 不仅缩短了检测时间,而且极大地减少了操作步骤,使检测结果具有更好的一致性和客观性。另外,该方法还具有以下 2 个方面的优势,一是该方法建立在细胞感染的基础上,疫苗中的活病毒得以复制和扩增,而死病毒无法复制,最终检测结果能够客观反映病毒滴度;二是整个操作过程省去了核酸提取的步骤,避免了核酸提取步骤中存在的核酸损失情况造成的误差。

本研究在进行重复性验证时,临时使用了质粒参考品,但是在正式使用过程中,需要制备一批性质均一,且能长期稳定保存的标准疫苗作为标准品对待测品进行赋值^[8-9],从而可以在疫苗生产工艺的各个环节(包括病毒液的收获时间、半成品及成品的配制等)进行生产指导和质量控制。

4 结 论

对于病毒疫苗的质量控制来说,滴度或者效价的检测是最重要的指标。RT-qPCR 的建立和后续的适用性研究将为滴度或者效价检测提供简便、快速的方法,将更加有利于不同企业生产的相同品种的病毒疫苗之间结果的可比性研究。

参考文献

[1] TATE J E, BURTON A H, BOSCHI-PINTO C, et al. 2008 es-

timate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(2): 136-141.

[2] TATE J E, BURTON A H, BOSCHI-PINTO C, et al. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000–2013[J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 62(Suppl 2): S96-S105.

[3] 梁婧, 徐葛林, 黄晓媛, 等. 检测轮状病毒滴度的荧光灶法的改进[J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(7): 620-622.

[4] 白萱, 姜志军, 何泗涛, 等. 测定六价轮状病毒疫苗各型病毒滴度的荧光灶试验的验证[J]. *国际生物制品学杂志*, 2018, 41(3): 118-122.

[5] 刘艳, 高加梅, 周旭, 等. 口服轮状病毒活疫苗病毒滴度评价国家参考品的制备[J]. *国际生物制品学杂志*, 2016, 39(5): 214-217.

[6] 孟凡红, 刘先超, 王爽, 等. 腮腺炎减毒活疫苗感染性滴度荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及验证[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(11): 1463-1467.

[7] 夏青娟, 徐晓霞, 李树林, 等. TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 检测甲型肝炎减毒活疫苗病毒含量的研究[J]. *微生物学免疫学进展*, 2013, 41(5): 14-17.

[8] RANHEIM T, MATHIS P K, JOELSSON D B, et al. Development and application of a quantitative RT-PCR potency assay for a pentavalent rotavirus vaccine (RotaTeq)[J]. *J Virol Methods*, 2006, 131(2): 193-201.

[9] CALZAS C, CHEVALIER C. Innovative mucosal vaccine formulations against influenza A virus infections[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1605-1609.

[10] WU X X, CHEN K D, CHEN D Z, et al. Process optimization for the rapid production of Enterovirus 71[J]. *Cyto-technology*, 2019, 71(6): 1053-1061.

[11] YU J, LAI S, GENG Q, et al. Prevalence of rotavirus and rapid changes in circulating rotavirus strains among children with acute diarrhea in China, 2009–2015[J]. *J Infection*, 2019, 78(1): 66-74.

[12] WU B S, HUANG Z M, WENG Y W, et al. Prevalence and genotypes of rotavirus A and human adenovirus among hospitalized children with acute gastroenteritis in Fujian, China, 2009–2017[J]. *Biomed Environ Sci*, 2019, 32(3): 210-214.

(收稿日期: 2020-02-06 修回日期: 2020-06-11)