

• 论 著 •

鼠疫菌感染兔血清中的 10 种重要抗体的检测分析^{*}

洪文艳, 王浩然[#], 郭兆彪, 周 蕾, 杨瑞馥[△]

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘 要:目的 对鼠疫感染兔血清中的 10 种重要抗体(Ab)进行检测, 寻找除 F1 外的其他可能用于鼠疫菌感染诊断的新靶标。方法 利用一种新的基于上转发光法的十通道免疫层析检测技术(TC-UPT-LF)和另一种经典的间接酶联免疫吸附试验(ELISA), 同时检测了 54 份抗 F1-Ag 抗体阳性的鼠疫菌感染兔血清样品, 对样品中 10 种靶标抗体的阳性率进行了综合分析。结果 在 54 份鼠疫菌感染兔血清样品中抗体检出阳性率较高的有 3 个, 依次为 F1-Ab(100%)、YPO1089-Ab(75%)、YopD-Ab(72%), 其余 7 个靶抗体阳性率都低于 50%。结论 在鼠疫感染的诊断中, 除现有的 F1 外, YopD 极有可能作为新的辅助诊断靶标。

关键词:耶尔森菌, 鼠疫; 抗体; 多重检测; 上转发光法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.08.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)08-0829-02

Detection and analysis of ten important antibodies in sera of rabbits with *Yersinia pestis* infection^{*}

Hong Wenyan, Wang Haoran[#], Guo Zhaobiao, Zhou Lei, Yang Ruifu[△]

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

Abstract: Objective To detect ten important antibodies in sera of rabbits with *Yersinia pestis* (*Y. pestis*) infection and to find new potential diagnostic markers besides F1 for the diagnosis of *Y. pestis* infection. **Methods** Ten target antibodies in 54 cases of serum specimens from rabbits with plague were detected by new lateral flow assay of ten-channel up-converting phosphor technology-based lateral flow assay(TC-UPT-LF) and classical indirect ELISA simultaneously and positive ratios of the ten target antibodies were aggregate analyzed. **Results** There were three antibodies with high positive ratio, including F1(100%), YPO1089(75%) and YopD(72%), while positive ratios of the other seven antibodies were less than 50%. **Conclusion** YopD could be a new potential diagnostic marker for *Y. pestis* infection besides F1.

Key words: yersinia pestis; antibodies; multi-detection; up-converting phosphor

鼠疫是一种由鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)感染引起的人畜共患烈性传染病, 其传染性强、病死率高、呈世界性分布, 中国也是鼠疫流行国家之一^[1]。2009 年中国青海又出现了鼠疫在动物和人群中的暴发流行, 造成了一定的人员伤亡和重大经济损失。因此, 有关鼠疫防控的研究具有重要的现实意义, 而有效防控的一个重要前提就是准确的早期快速诊断^[2]。在有关鼠疫的早期诊断上, 目前, 所用的各种免疫学检测方法基本都是测 F1 抗原或抗体的^[3]。然而, 由于 F1 抗原阴性的高致病性鼠疫菌变异株的发现^[4], 使得仅以 F1 作为诊断靶标在实际检测中存在漏检的可能, 这就需要寻找可以辅助 F1 进行鼠疫诊断的新靶标^[5]。

在本实验室前期研究中, 通过蛋白芯片技术对鼠疫菌 200 多个预测跨膜蛋白在多种鼠疫感染动物血清中的抗体谱进行了分析, 结果显示除 F1-Ag 外, 另有 9 个蛋白(YPO3827、YPO1303、YPO1089、YPO1613、YPO2131、YPO2118、YPO1435、YopD 和 LcrV)在鼠疫感染动物体内可刺激抗体产生^[6]。若要继续验证此 9 个蛋白在鼠疫菌感染过程中的免疫原性, 进而筛选出除 F1 外的辅助诊断靶标, 需要对各种鼠疫感染动物的血清进行系统的大样本量筛查分析。由于蛋白芯片的检测成本较高、实验流程较为复杂, 不宜用于大样本量检测^[7]。因而, 前

期研究中, 本研究建立了一种新型的基于上转发光法的十通道免疫层析检测技术(ten-channel up-converting phosphor technology-based lateral flow assay, TC-UPT-LF), 并以其作为技术检测平台, 展示了鼠疫菌感染猴以及鼠疫患者血清中上述 10 个蛋白的抗体谱^[8]。为了进一步评价他们作为诊断靶标的可能性, 本研究又对鼠疫菌感染兔血清中这些蛋白的抗体谱进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料 兔血清标本共 58 份, 其中正常兔血清 4 份, 鼠疫菌感染兔血清 54 份(间接血凝实验证实抗 F1-Ag 抗体阳性), 均由青海省地方病预防控制所提供。

1.2 方法

1.2.1 TC-UPT-LF 试剂制备与检测 (1)试剂制备: TC-UPT-LF 试纸盘及 TC-UPT 生物传感器分别由军事医学科学院微生物流行病学研究所和中国科学院上海光学精密机械研究所研制, 制备及检测原理见参考文献[7]。(2)样品检测: 100 μ L 待测标本与 900 μ L 样品处理液[磷酸盐缓冲液(PBS)(pH7.2, 0.03 mol/L)含 2%牛血清蛋白(BSA), 0.1%十二烷基硫酸钠(SDS), 0.1%聚乙二醇基苯基醚(Triton X-100)]混合, 1 毫升/盘加入 TC-UPT-LF 试纸盘, 室温平放 15 min 后, 用 TC-

^{*} 基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目(2007CB310505); 国家科技支撑计划资助项目(2009BAK43B31); 北京市自然科学基金资助项目(5082017)。 [#] 共同第一作者。 [△] 通讯作者, E-mail: ruifuyang@gmail.com。

UPT 生物传感器进行检测。结果判断标准:测量值=T 值(检测带)/C 值(质控带),cut off 值=阴性样品均值+2 倍标准差,定性分析中测量值大于 cut off 值则判定为检测结果阳性,反之则判断为阴性。

1.2.2 酶联免疫吸附剂法(ELISA)的试剂制备与检测 (1)试剂制备:原核表达 10 种鼠疫菌蛋白 YPO3827、YPO1303、YPO1089、YPO1613、YPO2131、YPO2118、YPO1435、YopD、LcrV、F1,并制备其相应抗体作为阳性质控^[9]。矩阵滴定的最佳抗原包被量为每孔 50 ng,以常规方法包被并封闭后,4 ℃保存备用^[10]。(2)样品检测:用 PBS 将待检血清样品 1:10 稀释,加入 ELISA 检测孔,每孔 100 μL,同时做空白对照(不加标本)、阴性对照(加阴性标本)、阳性对照(相应蛋白免疫兔的血清),37 ℃孵育 30 min;弃去反应液,以磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗液轻洗 5 次;加入 1:1 000 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG,每孔 100 μL,37 ℃孵育 20 min;弃去反应液,以 PBST 洗液轻洗 5 次;加 A、B 显色液,37 ℃孵育 10 min 后加终止液。ELISA 仪测定各孔 A₄₅₀ 值。每份血清样品都同时用 10 种抗原包被的 ELISA 板条依次进行相应抗体检测。样品检测孔的 A₄₅₀ 值大于阴性样品检测孔的 A₄₅₀ 均值×2.1 定为检测阳性,反之则判断为阴性。

2 结 果

2.1 样品的 TC-UPT-LF 检测 以 TC-UPT-LF 法对全部样品进行检测后,根据定性判断标准对 54 份鼠疫菌感染兔血清样品的检测数据进行了分析,结果见表 1。

表 1 样品中 10 种抗体的 TC-UPT-LF 定性检测结果(n)		
靶抗体	阳性	阴性
YPO3827	43	11
YPO2131	29	25
LcrV	25	29
YPO1089	40	14
YPO1303	22	32
YopD	31	23
YPO1435	16	38
YPO1613	10	44
F1	54	0
YPO2118	34	20

表 2 样品中 10 种抗体的 ELISA 定性检测结果(n)		
靶抗体	阳性	阴性
YPO3827	10	44
YPO2131	16	38
LcrV	5	49
YPO1089	28	26
YPO1303	15	39
YopD	37	17
YPO1435	14	40
YPO1613	3	51
F1	54	0
YPO2118	7	47

2.2 样品的 ELISA 检测 对 54 份鼠疫菌感染兔血清样品的 ELISA 检测数据进行了定性分析,结果见表 2。

2.3 检测结果的综合分析 将两种方法的定性结果综合判断,取两种检测方法定性结果一致的样品数进行统计分析,10 种靶抗体的检测结果中,F1 抗体全部阳性,另外 YPO1089 和 YopD 抗体的阳性率也较高,分别是 75%和 72%,其余抗体的阳性率则明显较低,分别在 0%~48%之间,见表 3。

表 3 样品中 10 种抗体用两种方法检测的结果			
靶抗体	双阳性(n)	双阴性(n)	阳性率(%)
YPO3827	10	11	48
YPO2131	14	23	38
LcrV	3	27	10
YPO1089	21	7	75
YPO1303	12	29	29
YopD	23	9	72
YPO1435	7	31	18
YPO1613	0	41	0
F1	54	0	100
YPO2118	7	20	26

3 讨 论

对于鼠疫菌感染的诊断来说,目前,F1-Ag 或其相应抗体的各种免疫学检测方法都存在一定局限。只有在 F1 的基础上补充其他辅助型靶标,才有降低漏检风险的可能。已有研究发现,有多种鼠疫菌蛋白对应的抗体在感染前后的动物或人血清中有明显的升高,这些抗体都有可能用于鼠疫的辅助诊断,尤其对 F1-Ag 阴性菌株感染的诊断^[6]。但是由于以前的研究中动物血清样品量过小(只有几份),实验结果还需更多样品研究的支持,故本实验室继续对更多的鼠疫菌感染猴及人的血清样品进行了检测^[8]。而本实验也是在前面的实验上继续扩展,对另一动物种属(兔)血清中的重要抗体进行了检测筛查,以进一步研究他们作为鼠疫诊断靶标的可能。

本实验结果显示,在 F1 抗体阳性的鼠疫菌感染兔血清样品的检测中,有另外两种抗体即 YPO1089(75%)和 YopD(72%)抗体的阳性率都比较高,而普遍预测的可能会有高阳性率表现的 LcrV 抗体的阳性率反而较低。在参考文献[8]的报道中,鼠疫菌感染猴血清和鼠疫患者血清样品的抗体谱分析结果显示,除 F1 抗体全部是 100%阳性外,猴血清中阳性率较高的还有 YopD(100%)、LcrV(92%)、YPO1303(64%)等,而患者血清中阳性率较高的还有 YopD(83%)、YPO1435(61%)、LcrV(54%)。因此,认为鼠疫抗体的产生及分布存在一定的种属差异,不同种属的血清样品中,针对同一抗原抗体的阳性率并不完全一致。本研究中鼠疫菌兔血清的抗体谱分析也进一步证实了参考文献[8]的研究结论。

综上所述,鼠疫菌兔血清与之前研究中鼠疫菌猴和人血清的抗体谱分析结果,可以推论在鼠疫菌感染的诊断中,除现有的 F1 外,YopD 极有可能作为新的辅助诊断靶标。

参考文献

[1] 周冬生,韩延平,宋亚军,等.鼠疫耶尔森菌基因(下转第 833 页)

外还有其他的耐药机制存在^[13-14],但它的主要机制为药物作用靶位的改变、主动外排机制增强等,而临床上分离出来的菌株经常存在多重耐药机制。

综上所述,治疗耐氟喹诺酮类药物 PA 引起的感染,应禁止无指征滥用抗生素,且其耐药机制十分复杂,有待进一步研究。从流行病学观点来看,高度重视临床分离耐氟喹诺酮类药物 PA 的耐药性和突变方式,进一步阐明其 *gyrA* 和 *parC* 突变与氟喹诺酮类药物耐药性的关系,将对研制有效治疗耐氟喹诺酮类药物 PA 的新型药物具有重要意义。

参考文献

[1] 蓝锴,陈茶.生物膜与铜绿假单胞菌耐药相关性研究进展[J].国际检验医学杂志,2007,28(10):942-944.

[2] 郭涛,汤华.铜绿假单胞菌的耐药性及多重耐药机制[J].医学检验与临床,2006,17(1):46-47.

[3] Oudhuis GJ, Verbon A, Hoogkamp-Korstanje JA, et al. Antimicrobial resistance in escherichia coli and pseudomonas aeruginosa from intensive care units in the Netherlands, 1998—2005[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31(1): 58-63.

[4] Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi IA, et al. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of pseudomonas aeruginosa isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(8): 2263.

[5] Poole K, Bianco N, Neshat S, et al. Conservation of the multidrug resistance efflux gene *oprM* in pseudomonas aeruginosa[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41: 853-856.

[6] Higgins PG, Fluit AC, Milatovic D, et al. Mutations in *gyrA*,

parC, *mexR* and *nfxB* in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa[J]. Int J Antimicrob Agents, 2003, 21(5): 409-413.

[7] Rubin J, Walker RD, Blickenstaff K, et al. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of pseudomonas aeruginosa isolated from canine infections[J]. Vet Microbiol, 2008, 131(1/2): 164-172.

[8] 吴爱武,蒋月婷,卢启君. CIP耐药的铜绿假单胞菌两种分子耐药机制关系的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(2): 131-134.

[9] Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson A, et al. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa[J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34(5): 414-418.

[10] 李学如,贾文祥,杨春,等.铜绿假单胞菌环丙沙星耐药株Ⅱ类拓扑异构酶基因突变的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(3): 155-171.

[11] Schneiders T, Amyess G, Levys B. Role of *acrR* and *ramA* in fluoroquinolone resistance in clinical klebsiella pneumoniae isolates from Singapore[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(9): 2831-2837.

[12] Wong-Beringer A, Wiener-Kronish J, Lynch S, et al. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and resistant clinical isolates of pseudomonas aeruginosa[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(4): 330-336.

[13] 刘蓉,罗必蓉,李明远.铜绿假单胞菌对β-内酰胺类抗生素耐药机制研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(8): 716-718.

[14] 许宏涛,陶凤蓉,梁玉珍,等.铜绿假单胞菌对喹诺酮类药物耐药机制的研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7(2): 92-95.

(收稿日期:2010-10-09)

(上接第 830 页)

组进化与生态位适应研究[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(3): 204-210.

[2] Ratsitorahina M, Chanteau S, Rahalison L, et al. Epidemiological and diagnostic aspects of the outbreak of pneumonic plague in Madagascar[J]. Lancet, 2000, 355(9198): 111-113.

[3] Neubauer H, Sprague LD, Scholz H, et al. Diagnosis of yersinia enterocolitica infections; a review on classical identification techniques and new molecular biological methods[J]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2001, 114(1/2): 1-7.

[4] Quenee LE, Cornelius CA, Ciletti NA, et al. Yersinia pestis cafl variants and the limits of plague vaccine protection[J]. Infect Immun, 2008, 76(5): 2025-2036.

[5] Welkos SL, Davis KM, Pitt LM, et al. Studies on the contribution of the F1 capsule-associated plasmid pFra to the virulence of yersinia pestis[J]. Contrib Microbiol Immunol, 1995, 13: 299-305.

[6] Li B, Jiang L, Song Q, et al. Protein microarray for profiling anti-

body responses to yersinia pestis live vaccine[J]. Infect Immun, 2005, 73(6): 3734-3739.

[7] Jokerst JV, Raamanathan A, Christodoulides N, et al. Nano-biochips for high performance multiplexed protein detection determinations of cancer biomarkers in serum and saliva using quantum dot bioconjugate labels[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(12): 3622-3629.

[8] Hong WY, Huang LH, Wang HR, et al. Development of an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay for profiling antibodies against yersinia pestis[J]. J Microbiol Methods, 2010, 83(2): 133-140.

[9] 蔺丽慧,崔玉宝,孔存权,等. Fcy-Der f2 载体构建及融合蛋白表达[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 1-3.

[10] 金伯泉. 细胞与分子免疫学实验技术[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2002: 1-6.

(收稿日期:2010-11-08)

参数与统计量

描述总体特征的数值为参数,通常是未知的,一般用希腊字母表示,如 μ 、 σ 、 π 等。描述样本特征的数值为统计量,是已知的或可计算获得的,用英文字母表述,如 S 、 P 等。从总体中随机抽样可获得样本,以样本为基础、通过统计推断(参数估计、假设检验)可获得对总体的认识。