

## • 基础实验研究论著 •

## 鼠疫耶尔森菌感染动物血清标本中 10 种抗体检测与分析\*

洪文艳, 王浩然, 郭兆彪, 王 津, 周 蕾, 杨瑞霞<sup>△</sup>

(中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

**摘要:**目的 分析鼠疫耶尔森菌(*Y. pestis*)感染动物血清标本中鼠疫抗体的分布规律,寻找新的鼠疫血清学辅助诊断靶标。方法 采用自制的酶联免疫吸附试验板条检测不同种属的 *Y. pestis* 感染动物血清标本(狗血清 5 例、羊血清 5 例及黄鼠血清 14 例)中的 10 种靶标抗体。结果 各靶标抗体在 3 种不同种属动物血清标本中具有不同的阳性率;抗 FI 抗体阳性率最高(100.0%),抗 YopD 抗体的阳性率较高(狗、羊和黄鼠血清标本的阳性率分别为 80.0%、100.0%和 78.6%),针对 LcrV、YPO1089、YPO1613、YPO2131、YPO2118、YPO1435 这 6 个蛋白的抗体在 3 种血清标本中的阳性率差异较大,抗 YPO3827 抗体和抗 YPO1303 抗体在 3 种血清标本中的阳性率均较低。结论 除抗 FI 抗体外,针对其他抗原的抗体的分布均存在种属差异,抗 YopD 抗体有可能成为新的 *Y. pestis* 感染辅助诊断靶标。

**关键词:**鼠疫耶尔森氏菌; 抗体病毒; 多重检测; 酶联免疫吸附测定

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.003

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2012)05-0517-02

Detection and analysis of 10 antibodies in serum samples of animals infected by *Yersinia pestis*\*Hong Wenyan, Wang Haoran, Guo Zhaobiao, Wang Jin, Zhou Lei, Yang Ruifu<sup>△</sup>

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

**Abstract: Objective** To analyze the antibodies spectrum in serum samples of animals infected by *Yersinia pestis*(*Y. pestis*) to identify new potential diagnosis target for *Y. pestis* infection. **Methods** 10 target antibodies in serum samples of 5 cases of dog, 5 cases of sheep and 14 cases of *Citellus mongolicus umbratus*, all being infected by *Y. pestis*, were detected by using self-made enzyme linked immunosorbent assay kits. **Results** The antibody positive rates were different in serum samples of different animals. The positive rate of anti-FI was all 100.0%, and that of anti-YopD-Ab was 100.0% in serum samples of sheep, 80.0% of dogs and 78.0% of *Citellus mongolicus umbratus*. The positive rates of antibodies specific for LcrV, YPO1089, YPO1613, YPO2131, YPO2118 and YPO1435 varied in serum samples of different animals. The positive rates of antibodies specific for YPO3827 and YPO1303 were low in all samples. **Conclusion** The spectrum of antibodies specific for *Y. pestis* could be different in different animals infected by *Y. pestis*. Beside classical anti-FI antibody, the anti-YopAb might be a new potential diagnostic marker for *Y. pestis* infection.

**Key words:** *Yersinia pestis*; antibodies viral; multi-detection; enzyme-linked immunosorbent assay

鼠疫是由鼠疫耶尔森菌(*Y. pestis*)感染所致的烈性传染病。目前对 *Y. pestis* 感染的检测方法较多,其中针对 FI 抗体的间接血凝试验是相对简单、快速的经典方法之一<sup>[1]</sup>。其他血清学检测方法,如胶体金或上转换发光免疫层析试纸等<sup>[2-3]</sup>,也针对性地检测 FI 抗原或抗体,但 FI 阴性、高致死性 *Y. pestis* 变异株有可能导致现有的完全依赖 FI 靶标的诊断方法出现漏诊。为了规避漏诊风险,鼠疫诊断新靶标已成为研究热点之一,但国内外研究人员目前尚未找到除 FI 以外的可靠的血清学诊断新靶标<sup>[4-7]</sup>。本课题组通过前期生物信息学及蛋白芯片等技术的验证,在众多可能靶标中选取了 10 个已证实具有免疫原性和免疫反应性的重要跨膜蛋白(FI、LcrV、YPO3827、YPO1303、YPO1089、YPO1613、YPO2131、YPO2118、YPO1435 和 YopD),并利用多种方法对鼠疫患者及动物血清标本中的对应抗体进行了筛查<sup>[8-9]</sup>。本研究系该系列研究之一,即利用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 3 种不同动物血清标本中的目标抗体。结果报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 一般资料** 24 例 *Y. pestis* 感染动物血清标本,包括狗血清 5 例、羊血清 5 例和黄鼠血清 14 例,均经间接血凝试验证实

为抗 FI 抗体阳性。阴性对照血清标本为 3 例狗血清、4 例羊血清和 6 例黄鼠血清。所有标本由青海省及云南省疾病预防控制中心提供。

**1.2 ELISA 试剂制备** 原核表达并纯化 YPO3827、YPO1303、YPO1089、YPO1613、YPO2131、YPO2118、YPO1435、YopD、LcrV 和 FI,作为 ELISA 包被抗原,并分别免疫家兔,获得相应的兔源性多克隆抗体作为 ELISA 阳性质控血清,制备方法见文献<sup>[10]</sup>。二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG,常规显色液,制备方法见文献<sup>[11]</sup>。

## 1.3 ELISA 检测

**1.3.1 ELISA 板条制备** 选取深圳金灿华公司的空白 ELISA 板条,参照文献<sup>[12-13]</sup>,经矩阵滴定,确定最佳抗原包被量为 50 纳克/孔,以常规的 NaHCO<sub>3</sub> 包被液(pH9.0)稀释后,按 100 微升/孔加入空板条,37℃包被固定 2 h 后弃去包被液,按 200 微升/孔加入封闭液[含 3%牛血清清蛋白和 0.5%干酪素的磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.2)],4℃封闭过夜后弃去液体,拍干后置 4℃保存,即为 ELISA 备用板条。

**1.3.2 血清标本检测** 待检血清标本以 PBS 缓冲液稀释 20 倍,按 100 微升/孔加入 ELISA 备用板条检测孔,在同一板条

内同时设置空白对照孔 1 孔(不加标本)、阴性对照孔 3 孔(加阴性对照血清标本)、阳性对照孔 3 孔(加阳性质控血清);37℃ 孵育 30min 后弃去反应液,以含 2% Tween-20 的 PBS(PBST) 洗液洗板 5 次;按 100 微升/孔加入工作浓度的二抗,37℃ 孵育 20 min 后弃去反应液,以 PBST 洗液洗板 5 次;按 50 微升/孔分别加入显色液 A、B,37℃ 孵育 10 min 后按 50 微升/孔加入终止液,酶联仪测定各孔 450 nm 处的光密度(OD)值,即 OD<sub>450</sub>。每份血清标本都同时用 10 种抗原包被的 ELISA 板条分别进行相应抗体检测。阳性判断标准为:血清标本检测孔 OD<sub>450</sub>>(阴性对照孔 OD<sub>450</sub> 均值+2 倍标准差)。

1.4 统计学处理 采用 Microsoft Excel 软件进行数据记录和统计学计算。

2 结 果

5 例 Y. pestis 感染狗血清标本、5 例羊血清标本和 14 例黄鼠血清标本 10 种靶抗体检测结果见表 1。3 种动物血清标本抗 FI 抗体均为阳性,抗 YopD 抗体的阳性率也较高。抗 YPO1303 抗体和抗 YPO3827 抗体在 3 种动物血清标本中的阳性率均较低。针对 LcrV、YPO1435、YPO2118、YPO2131、YPO1089 和 YPO1613 这 6 种抗原的抗体,仅在某 2 种或 1 种动物血清标本中的阳性率较高,如抗 LcrV 抗体在 Y. pestis 感染狗血清标本中的阳性率为 100.0%,在羊血清中为 60.0%,但在黄鼠血清中仅有 21.4%;抗 YPO1435 抗体在 Y. pestis 感染狗血清标本中的阳性率达 100.0%,在羊和黄鼠血清标本中的阳性率为 40.0%和 21.4%。

表 1 Y. pestis 感染动物血清标本靶抗体检测阳性结果[n(%)]

靶抗原	动物血清标本		
	狗(n=5)	羊(n=5)	黄鼠(n=14)
FI	5(100.0)	5(100.0)	14(100.0)
YopD	4(80.0)	5(100.0)	11(78.6)
LcrV	5(100.0)	3(60.0)	3(21.4)
YPO1435	5(100.0)	2(40.0)	3(21.4)
YPO2118	5(100.0)	1(20.0)	3(21.4)
YPO2131	3(60.0)	0(0.0)	2(14.3)
YPO1089	4(80.0)	3(60.0)	1(7.1)
YPO1613	4(80.0)	3(60.0)	0(0.0)
YPO1303	1(20.0)	0(0.0)	1(7.1)
YPO3827	1(20.0)	1(20.0)	0(0.0)

3 讨 论

为寻找可用于鼠疫诊断的血清学辅助诊断靶标及可用于制备疫苗的亚单位组分,本课题组对各种 Y. pestis 感染患者及动物血清标本中的 10 种抗体靶标进行了检测,并分析了其可能的分布规律。根据前期筛查 Y. pestis 感染兔、人及人工 Y. pestis 感染猴抗体谱所获得的结果,笔者曾作出 2 个推论:(1)不同宿主感染 Y. pestis 后,针对同一抗原的抗体的产生及分布可能存在一定的种属差异,即在不同种属宿主的血清标本中,同一种抗体的阳性率并不完全一致;(2)除现有的 FI 抗原外,作为 Y. pestis 三型分泌系统中重要功能蛋白之一的

YopD,有可能成为新的辅助诊断靶标<sup>[9-10]</sup>。为进一步验证上述推论,本研究继续对另外 3 种常见动物宿主,即狗、羊和黄鼠的血清标本中的相关抗体进行了检测与分析。

由于缺乏可用于本研究中 10 种抗体靶标检测的商品化 ELISA 试剂盒,本研究自制了相应的 ELISA 板条。试验结果显示,自制板条对所有血清标本抗 FI 抗体检测结果与间接血凝试验检测结果完全一致,说明自制试验材料具有良好的检测效果,也为本研究检测和分析其他抗体的分布奠定了基础。

由于 Y. pestis 感染动物血清极难收集,因此可供检测的血清标本量均较少,但通过对数量有限的血清标本的检测获得了较有意义的结果,且本研究的结果与之前报道的 Y. pestis 感染兔、猴及人的抗体谱研究结果类似,有利于进一步确定上述 2 个推论的正确性,即尽管鼠疫抗体的分布存在种属差异,但抗 YopD 抗体仍有可能成为新的辅助诊断靶标。

参考文献

- [1] 俞东征. 鼠疫形势与我国鼠疫控制策略[J]. 国外医学医学地理分册, 2009, 30(3): 99-103, F4.
- [2] 张涛, 冯志勇, 海荣, 等. 胶体金试剂条在鼠疫监测中的应用[J]. 中国热带医学杂志, 2008, 8(7): 13-16.
- [3] Yan Z, Zhou L, Zhao Y, et al. Rapid quantitative detection of Yersinia pestis by lateral-flow immunoassay and up-converting phosphor technology-based biosensor [J]. Sens Actuators B Chem, 2006, 119(4): 656-663.
- [4] Quenee LE, Cornelius CA, Ciletti NA, et al. Yersinia pestis cafI variants and the limits of plague vaccine protection[J]. Infect Immun, 2008, 76(5): 2025-2036.
- [5] 周冬生, 杨瑞馥. 鼠疫研究进展与展望[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(10): 1176-1182.
- [6] 海荣, 俞东征, 夏连续, 等. 基因和抗原检测技术在鼠疫监测中的应用与评价[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(5): 426-429.
- [7] 石丽媛, 白丽, 于国林, 等. 鼠疫耶尔森菌纤维蛋白溶解酶原激活因子的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(12): 1112-1113, 1116.
- [8] Li B, Jiang L, Song Q, et al. Protein microarray for profiling antibody responses to Yersinia pestis live vaccine[J]. Infect Immun, 2005, 73(6): 3734-3739.
- [9] 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.
- [10] 洪文艳, 王浩然, 郭兆彪, 等. 鼠疫菌感染兔血清中的 10 种重要抗体的检测分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(8): 829-830, 833.
- [11] 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.
- [12] 沈美心, 龚非力. 抗体实验技术指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] 张文艳, 胡红霞. 酶联免疫吸附试验中常见问题及解决方法[J]. 中外医疗, 2009, 28(32): 80.

(收稿日期: 2011-12-09)