

# 犬接种鼠疫菌后的血清鼠疫 F1 抗体及 IgM 动态

王信惠,雷刚,热娜·吐尔地,廖力夫,李冰,涂杰,阿不力米提·买托呼提,徐秉臣

**摘要:**目的 通过观测犬接种鼠疫菌后鼠疫 F1 抗体及其 IgM 动态,推算发生动物鼠疫流行的时间和地点。**方法** 应用 ELISA 夹心法检测犬鼠疫 F1 抗体,捕获法检测 IgM,两种方法同步检测接种鼠疫菌 EV<sub>paris</sub> 株活菌的犬血清。结果 犬接种鼠疫菌后第 5 d,抗鼠疫 F1 抗体和 IgM 都出现了阳性反应,IgM 显色和滴度第 7~9 d 达到高峰,第 15~22 d 开始快速下降,第 46 d 以后降到阳性标准以下;F1 抗体在接种鼠疫菌后第 38 d 显色和滴度达到高峰,第 78 d 仍保持在 OD<sub>450nm</sub> 2.700 以上和滴度 1:2<sup>10</sup> 左右。**结论** 根据 ELISA 检测犬鼠疫 F1 抗体和 IgM 的结果,可推算动物间鼠疫流行的时间和范围,为及时实施防控措施提供参考资料。

**关键词:**鼠疫监测;ELISA;犬;F1 抗体;IgM

中图分类号:R378.6

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)01-0035-04

## Dynamic of serum plague F1 antibody and IgM in dogs inoculated with *Yersinia pestis*

WANG Xin-hui, LEI Gang, RENA TURD, LIAO Li-fu, LI Bing, TU Jie, ABULYMIT MATTUHUT, XU Bing-chen

(Department for Prevention and Cure of Plague, Center for Disease Control and Prevention,  
Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830002, China)

**ABSTRACT:** The dynamic of plague F1 antibody and IgM of dogs inoculated with *Yersinia pestis* was surveyed to predict the time and place of animal plague. Both capture ELISA and sandwich ELISA were used synchronously to detect plague antibody of dogs inoculated with EV<sub>paris</sub> strains of viable *Yersinia pestis*. And the capture ELISA and sandwich ELISA were used to detect IgM and F1 antibody, respectively. Results indicated that both IgM and F1 antibody showed positive reactions on the 5th day after inoculation. The IgM color and titers reached a peak on the 7th-9th day, declined rapidly on the 15th-22nd day, and declined below positive criteria on the 46th day. The F1 antibody color and titers reached a peak on the 38th days after inoculation and remained above 2.700 of OD<sub>450nm</sub> and 1:2<sup>10</sup> of titers until the 78th day. Based on the results of the ELISA for detecting F1 antibody and IgM of dogs, the timing and scope of animal plague epidemic could be predicted and the reference information for the timely implementation of control measures could be provided.

**KEY WORDS:** plague survey; ELISA; dogs; F1 antibody; IgM

Supported by the 11th Five-year National Science and Technology Program (No. 2007BA107A14), and the Xinjiang High and New Technology Research and Development Program (No. 200611112)

Corresponding author: Xu Bing-chen, Email: xbch0849@sina.com

鼠疫是自然疫源性疾病,传播快、病程短、病死率高,名列我国甲类传染病之首,曾给人类带来巨大的灾难。鼠疫传染源主要存在于宿主动物,监测宿主及相关动物的鼠疫疫情,是疫情监测工作的主要内容。多数旱獭鼠疫自然疫源地是水草丰茂的牧

场,牧民普遍养犬,牧犬鼠疫 F1 抗体阳性率高。模拟牧犬自然感染鼠疫实验,牧犬舌舔和啃食鼠疫病死动物血和尸体,症状轻微,都出现较高滴度的鼠疫 F1 抗体,并能保持较长的时间,但滴度和持续时间个体差异大<sup>[1]</sup>。我国把检测牧犬血清鼠疫 F1 抗体列入了鼠疫监测方案<sup>[2]</sup>。感染性疾病 IgM 抗体出现早,持续时间短,可间接反映近期感染状况。本文用 ELISA 检测鼠疫 F1 抗体和抗体 IgM,观测牧犬接种鼠疫菌后鼠疫 F1 抗体和 IgM 动态,讨论其在

十一五国家科技支撑计划(2007BA107A14),新疆高新技术研究发展计划(200611112)联合资助

通讯作者:徐秉臣,Email:xbch0849@sina.com

作者单位:新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心鼠疫防治科,乌鲁木

齐 830002

鼠疫监测中的应用价值。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 鼠疫菌 EV<sub>paris</sub> 株:新疆疾病预防控制中心保存;比格小猎犬(雌性):新疆药品监督所赠送;羊抗犬 IgM: Bethyl Laboratories, Inc A40-116A-14;酶标反应板(型号 K15):厦门怡佳美实验器材有限公司;鼠疫 F1 抗原:新疆疾病预防控制中心制备,批号:200503;辣根过氧化物酶(RZ>3.0):中科院上海生化所东风生化技术公司;TMB 显色液(A 液 B 液):新疆疾病预防控制中心制备,(批号:20110501);鼠疫 F1 抗体诊断试剂盒:新疆疾病预防控制中心,兰州生物制品研究所联合研制,(批号:20110501);酶标仪:Multiskan Mk3 上海热电仪器有限公司;洗板机:WELLWASH 4MK2 赛默飞世尔(上海)仪器有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验犬接种鼠疫 EV<sub>paris</sub> 株活菌和采血** 鼠疫 EV<sub>paris</sub> 株用 LB 培养基 37 °C 培养,比浊法测定浓度,用生理盐水稀释菌液,菌液浓度 10<sup>8</sup>/mL;每只犬多点皮下注射 3 mL。接种后第 3 d 到第 78 d,持续间歇静脉采血,分离血清,−30 °C 保存备用。

**1.2.2 ELISA(捕获法)检测犬血清鼠疫抗体 IgM**

**1.2.2.1 羊抗犬 IgM 抗体包被反应板** 包被反应板:包被液为 0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液,含羊抗犬 IgM 抗体 0.2 μg/mL,反应板每管加包被液 100 μL,37 °C 湿盒放置 3 h;饱和包被液为含 5 × 10<sup>-4</sup> 牛血清白蛋白,每管加 100 μL,37 °C 湿盒放置 2 h;甩弃反应板管内包被液,每管加洗涤液 200 μL,37 °C 湿盒放置 1 h;甩弃洗涤液,流水冲洗 5 次,在吸水纸上拍打反应板,直到管内外无可见水珠;直立放入 37 °C 温箱 6~12 h,干燥后取出,装入塑料袋,封口,4~10 °C 保存。

**1.2.2.2 酶标记鼠疫 F1 抗原** 辣根过氧化物酶(HRP)标记鼠疫 F1 抗原:用简化过碘酸钠法。

**1.2.2.3 检测抗鼠疫 F1 犬抗体 IgM 初筛试验:**

(1) 加样本:抗犬 IgM 抗体包被反应板,每孔加稀释液 50 μL,加待测血清 50 μL,并设 IgM 阳性对照 2 孔、阴性对照 2 孔、空白对照 1 孔,将反应板加盖 37 °C 温育 90 min;洗涤反应板 5 次,在吸水纸上拍干。(2) 加酶标记物:每孔加酶标鼠疫 F1 抗原溶液 100 μL,加盖 37 °C 温育 45 min,洗涤反应板 5 次;(3) 加底物 TMP 显色:每孔加入底物 A、B 试剂各 50 μL,轻摇混匀,置 37 °C 暗处静置 15 min;每孔加终止液 50 μL,轻摇混匀,在 10 min 内完成读数。

**(4) 比色判定结果:**酶标仪单波长 450 nm,空白孔调 0,测定各孔 OD 值,阴性对照 OD 值<0.10 按 0.10 计算;阳性 OD 限值>阴性对照平均 OD 值×2.0。初筛试验阳性样本需进一步做验证试验。验证试验:初筛阳性样本每份做 2 列,同步做犬 F1 抗体 IgM 阳性对照。第 1 列为滴度列,每孔加样本稀释液 100 μL;第 2 列为抑制列,每孔加抑制试验用 F1 抗原液 100 μL。设空白对照 2 孔;两列的 A 孔加入初筛阳性样本 100 μL,从 A 孔开始做 2 倍连续稀释,末孔弃去 100 μL,以下步骤温育,洗涤,加酶标记物,温育,洗涤,加 TMP 显色,比色判定结果按初筛试验的步骤进行;两列比较,抑制列比滴度列低 2 孔或 2 孔以上为验证试验阳性。阳性用滴度列的滴度 1:2<sup>n</sup> 标示记录。

### 1.2.3 ELISA(夹心法)检测犬血清鼠疫 F1 抗体

用 ELISA(夹心法)检测犬血清鼠疫 F1 抗体<sup>[3]</sup>,除了反应板为鼠疫 F1 抗原包被板,阳性对照为鼠疫 F1 抗体外,其余试剂、器材、检验程序和结果判定均与 ELISA(捕获法)检测犬血清鼠疫 F1 抗体 IgM 相同<sup>[3]</sup>。

## 2 结 果

**2.1 检测接种鼠疫菌的犬血清鼠疫 F1 抗体及其 IgM 滴度** ELISA 夹心法检测犬血清鼠疫 F1 抗体,ELISA 捕获法检测犬血清鼠疫 F1 抗体 IgM, F1 抗体及其 IgM 滴度 1:2<sup>n</sup> 列于表 1。取相同时间采集的犬血清鼠疫 F1 抗体及其 IgM 平均滴度做图,滴度动态见图 1。

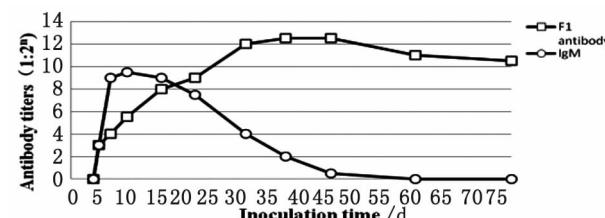


图 1 ELISA 检测接种鼠疫菌后犬血清 F1 抗体与 IgM 滴度动态

Fig. 1 Dynamic of titers of serum F1 antibody and IgM in dogs inoculated with *Yersinia pestis* by ELISA

**2.2 检测接种鼠疫菌的犬血清鼠疫 F1 抗体及其 IgM 的 OD<sub>450</sub> 值** ELISA 夹心法检测犬血清鼠疫 F1 抗体,ELISA 捕获法检测犬血清鼠疫 F1 抗体 IgM, 血清浓度 1:4 时的 F1 抗体及其 IgM 显色 OD<sub>450</sub> 值列于表 2。取相同时间采集的犬血清鼠疫 F1 抗体及其 IgM 平均显色 OD<sub>450</sub> 值做图,OD<sub>450</sub> 值动态见图 2。

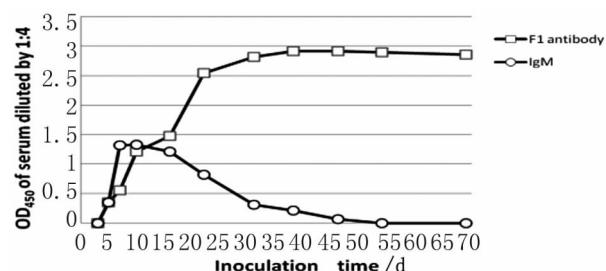
表 1 ELISA 检测接种鼠疫菌后犬血清 F1 抗体与 IgM 滴度

Tab. 1 Titers of serum F1 antibody and IgM in dogs inoculated with *Yersinia pestis* by ELISA

Dog	Antibody (1 : 2 <sup>n</sup> )	Inoculation time (d)												
		4	5	7	10	16	22	31	38	46	54	61	69	78
No. 1	F1Ab	—	4	6	7	9	10	12	12	12	13	10	10	10
	IgM	—	4	10	10	10	8	5	3	1	—	—	—	—
No. 2	F1Ab	—	2	2	4	7	8	12	13	13	13	12	12	11
	IgM	—	2	8	9	8	7	3	1	—	—	—	—	—

表 2 ELISA 检测接种鼠疫菌后犬血清 F1 抗体与 IgM 显色值(OD<sub>450</sub>)Tab. 2 Colorations of serum F1 antibody and IgM (OD<sub>450nm</sub>) in dogs inoculated with *Yersinia pestis* by ELISA

Dog	Antibody (OD <sub>450</sub> )	Inoculation time (d)											
		4	5	7	10	16	22	31	38	46	54	69	78
No. 1	F1Ab	0.035	0.211	0.491	0.962	2.033	2.567	2.832	2.913	2.919	2.868	2.817	2.738
	IgM	0.068	0.501	1.411	1.428	1.326	0.990	0.498	0.292	0.101	0.053	0.057	0.03
No. 2	F1Ab	0.005	0.217	0.883	1.454	1.910	2.515	2.781	2.816	2.811	2.928	2.893	2.564
	IgM	0.037	0.297	1.251	1.219	0.919	0.636	0.282	0.134	0.035	0.028	0.036	0.03

图 2 ELISA 检测接种鼠疫菌后犬血清 F1 抗体与 IgM OD<sub>450</sub> 值动态Fig. 2 Dynamic of serum F1 antibody and IgM (OD<sub>450</sub>) in dogs inoculated with *Yersinia pestis* by ELISA

### 3 讨论

小型野生动物与病死动物尸体是牧犬的主要觅食目标,鼠疫疫区的牧犬感染鼠疫的机会多。世界卫生组织推荐间接血凝试验(IHA)检测鼠疫 F1 抗体,1970 年开始在我国推广应用。实验观测牧犬舌舔、啃食鼠疫病死旱獭的血和尸体,症状轻微,体温一过性升高,多数没有明显的症状,用 IHA 检测鼠疫 F1 抗体,在第 5 d 可检出抗体阳性,第 38 d 达到高峰 1 : 2<sup>7~12</sup>,持续 30 d 左右,而后缓慢降低,有的 18 个月仍可测到 1 : 2<sup>7</sup> 的高滴度抗体<sup>[1]</sup>。感染试验显示牧犬对鼠疫易感、耐受且抗体持续时间长短不一。3 种旱獭鼠疫疫源地监测工作中 IHA 检测鼠疫 F1 抗体资料显示,灰旱獭和牧犬阳性率分别为 0.44%、12.61%,喜玛拉雅旱獭和牧犬阳性率分别为 0.67%、19.2%,红旱獭和牧犬阳性率分别为 0.49%、8.3%。牧犬鼠疫 F1 抗体阳性率是宿主动物旱獭的 16.9~31.5 倍<sup>[1]</sup>。牧犬鼠疫 F1 抗体是间

接反映宿主动物鼠疫流行状态的敏感指标,被列入我国的鼠疫监测方案<sup>[2]</sup>。

ELISA 法具有灵敏、特异、简单、快速、稳定及易于自动化操作等特点,已经成为各种疾病诊断中最常用的方法。上世纪 90 代初,其敏感性、特异性和稳定性就达到国际先进水平,现已得到广泛应用<sup>[4~5]</sup>,2008 年列入鼠疫诊断国家标准<sup>[6]</sup>。

ELISA(夹心法)和 IHA 检测鼠疫 F1 抗体的原理基本相同,皆是被测抗体和两个抗原结合,IHA 通过红血球凝集,ELISA 通过酶催底物显色显示抗体总量,单份血清检测抗体,主要用于阐明传染病的存在与分布状况;在鼠疫自然疫源地调查工作中,检测牧犬血清鼠疫 F1 抗体,以血清鼠疫 F1 抗体阳性牧犬的活动区域为重点,开展综合调查工作,仅新疆就查出了和田、阿图什、且末、若羌、温泉等多个新鼠疫疫源市、县。检测牧犬血清鼠疫 F1 抗体,在鼠疫自然疫源地调查工作中发挥了重要作用<sup>[7]</sup>。

模拟牧犬自然感染鼠疫 F1 抗体滴度个体差异大,很难根据单份血清抗体滴度高低推算感染时间。双份血清法间隔 15 d 采血检测抗体,经常在传染病诊断和流行病学调查工作中应用,第二份血清抗体升降 ≥ 4 倍或转阴,表示近期新染、再染或痊愈恢复<sup>[8]</sup>。双份血清法检测抗体总量拖的时间太长,对于急性传染病特别是鼠疫不适用。

血清中的 IgM 出现较早,半衰期只有 5 d,升降速度快,持续时间短。检测 IgM 追述传染病的存在与分布状况远不如检测抗体总量。但在传染病防治工作中,根据 IgM 的早、快、短特点,常以检测 IgM

结果作为诊断近期感染传染病的依据。

检测方法影响不同抗体的滴度和显色 OD 值, ELISA 捕获法检测 IgM, 抗 IgM 重链抗体和 IgM 的重链结合, 对轻链的和抗原结合的活性部位影响较小, 反应活性被充分显示, 出现较高的滴度和显色 OD 值; 在夹心法中, IgM 的部分活性部位和反应板上的抗原结合, 使结合酶标抗原的活性部位减少, 滴度和显色 OD 值降低; 捕获法检测 IgM 的滴度和显色 OD 值比夹心法高。在感染或免疫早期, 由于 IgM 出现早、含量多, IgG 出现晚、含量低, 这时的夹心法显示的主要是 IgM 的滴度和显色 OD 值, 所以出现了 IgM 滴度和显色 OD 值高于 F1 总抗体的现象。

犬实验感染鼠疫菌 EV<sub>Paris</sub> 株, ELISA 夹心法检测鼠疫 F1 抗体, ELISA 捕获法检测鼠疫 F1 抗体 IgM。第 5 d F1 抗体和 IgM 开始出现阳性反应, 滴度基本相同; 第 7~16 d, IgM 滴度上升快, 滴度高于 F1 抗体; 第 22 d 开始, IgM 滴度迅速降低, F1 抗体滴度逐渐增高, 滴度超过 IgM; 第 46 d 后, IgM 转阴, F1 抗体滴度开始缓慢下降, 到第 78 d 仍保持在 1:2<sup>10~11</sup> 高滴度。本次犬实验感染鼠疫菌 ELISA 夹心法检测鼠疫 F1 抗体的动态, 与先前 IHA 检测同类实验感染犬血清鼠疫抗体的结果基本一致, 参照 IHA 检测犬血清鼠疫抗体的动态, ELISA 夹心法检测实验感染鼠疫菌 16 个月时的鼠疫 F1 抗体滴度仍保持在 1:2<sup>6~8</sup>。

ELISA 夹心法检测鼠疫 F1 抗体, 可判定牧犬 1~2 年内是否感染鼠疫; ELISA 捕获法检测鼠疫 F1 抗体中的 IgM, 可判定牧犬 2 月内是否感染鼠疫; 两种方法同步检测单份血清鼠疫 F1 抗体及其 IgM, 比对鼠疫 F1 抗体与 IgM 的滴度和显色 OD 值差异, 推算犬感染鼠疫菌的时间, 可精确到 5~10 d。

## 参考文献:

- [1] Zhang HY. Xinjiang plague[M]. Urumqi: Endemic Bulletin Editorial Board, 1994: 90~102. (in Chinese)  
张鸿猷. 新疆鼠疫[M]. 乌鲁木齐: 地方病通报编辑部, 1994: 90~102.

102.

- [2] Emergency Office of the Ministry of Health & Chinese Centers for Disease Control and Prevention. The plague prevention and control emergency manual (2009 version)[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2009: 304~324. (in Chinese)  
卫生部卫生应急办公室,中国疾病预防控制中心. 鼠疫防控应急手册(2009 年版)[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2009: 304~324.
- [3] Xia LX, Lei G, Cai H, et al. Application study of the F1 antigen (antibody) ELISA test kit for the diagnosis of plague[J]. China Vector Biol Contr, 2007, 18(4): 298~300. (in Chinese)  
夏连续,雷刚,蔡虹,等. 鼠疫 F1 抗原(抗体)检测试剂盒的应用研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2007, 18(4): 298~300.
- [4] Qin YX, Gao JW, Tian T, et al. Seroepidemiology investigation of high-risk population with plague foci in Ningxia in 2007 and 2008[J]. Chin J Endemol, 2010, 29(4): 443~445. (in Chinese)  
秦迎旭,高建伟,田涛,等. 2007 年和 2008 年宁夏鼠疫疫源地高危人群血清流行病学调查[J]. 中国地方病学杂志, 2010, 29(4): 443~445.
- [5] Lei G, Lu TY, Tang JG, et al. Detection of F1 antibody against *Yersinia pestis* in flushing fluid of heart blood of *Rhombomys opimus* with ELISA: a feasibility study[J]. Chin J Endemol, 2011, 30(1): 36~39. (in Chinese)  
雷刚,吕天义,唐建国,等. 酶联免疫吸附试验检测大沙鼠心血冲洗液中鼠疫 F1 抗体的可行性分析[J]. 中国地方病学杂志, 2011, 30(1): 36~39.
- [6] Health care industry standard of the People's Republic of China WS 279-2008 diagnostic criteria of plague[S] (The 2008-09-01 implementation). (in Chinese)  
中华人民共和国卫生行业标准 WS 279 -2008 鼠疫诊断标准[S]. (2008-09-01 实施)
- [7] Liang Y, Song ZZ, Guo Y, et al. Seroepidemiological survey of F1 antibody of indicator animals in wild rodents loci of plague in Yunnan Province[J]. Chin J Endemol, 2008, 27(6): 644~646. (in Chinese)  
梁云,宋忠志,郭英,等. 云南省野鼠鼠疫疫源地鼠疫指示动物血清 F1 抗体流行病学调查[J]. 中国地方病学杂志, 2008, 27(6): 644~646.
- [8] Yu DZ. Animal plague epidemiology[M]. Beijing: Science and Technology Press, 2009: 237~357. (in Chinese)  
俞东征. 鼠疫动物流行病学[M]. 北京: 科教出版社, 2009: 237~357.

收稿日期:2012-05-10;修回日期:2012-11-11