

猴 B 病毒抗体不同检测方法的比对

李晋文, 佟巍, 蔡 鹃, 向志光*, 魏 强*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 猴 B 病毒(monkey B virus, BV), 也称猴疱疹病毒 1 型(*Cercopithecine herpesvirus 1*), 是重要的人兽共患病原。根据国家标准, 猴 B 病毒作为抗原检测抗体, 但由于生物安全问题, 抗原制备受到很大限制, 因此使用替代抗原进行抗体血清学检测并进行比对验证。**方法** 应用 2 种 ELISA 方法(抗原分别为 BV 和 HVP2)和 1 种免疫酶法 EIA 方法(抗原为 HSV-1)对本实验室 135 份送检恒河猴血液样品进行筛查, 对阳性及可疑样品再以免疫荧光法 IFA 和 Western blot 方法(抗原为 HSV-1)以及以 HSV-1 gC1 纯化糖蛋白为抗原的免疫印迹方法验证。**结果** HVP2-ELISA、BV-ELISA 和 HSV-1-EIA 阳性检出率分别为 32.6%、37.8% 和 34.8%; 3 种方法检测结果一致的样品占 91.1% (123/135), 阳性结果可被 IFA 和 WB 确证; 可疑样品 12 份, 33.3% (4/12) 的样品经验证检验为阳性。**结论** 与 BV 抗原相比, 替代抗原 HSV-1 的敏感性和特异性较 HVP2 更为接近; 阳性样品及可疑样品的确证检验应使用多种方法, 避免漏检。

【关键词】 猴 B 病毒; 替代抗原; HSV-1; HVP2; ELISA; EIA; IFA; WB

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 07-0029-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.07.006

Comparison of different detection methods of monkey B virus antibody

LI Jin-wen, TONG Wei, CAI Juan, XIANG Zhi-guang*, WEI Qiang*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy Of Medical Sciences;
Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective Monkey B virus(BV), also known as *Cercopithecine herpesvirus 1*, is an important zoonotic pathogen. According to the national standard, antibodies are detected using BV as an antigen. However, the preparation of BV antigen is very strict due to biosafety issues. Therefore, in this study, we used alternative antigens to detect the BV antibody by serological assay and verified their specificity and sensitivity. **Methods** A total of 135 blood samples from rhesus monkeys were tested by two ELISA method (BV and HVP2) and enzyme immunoassay (EIA) method. The positive and suspicious samples were verified by immuno-fluorescence assay (IFA), Western blot and immunoblotting technique using HSV-1 gC1 purified glycoprotein as an antigen. **Results** The positive rates of HVP2-ELISA, BV-ELISA and HSV-1-EIA were 32.6%, 37.8% and 34.8%, respectively. Consistent result of the three detection method accounted for 91.1% (123/135), and the positive result were confirmed by IFA And WB. There were 12 suspicious samples, in which 33.3% (4/12) were verified to be positive. **Conclusions** Compared with BV antigen, the sensitivity and specificity of the alternative antigen HSV-1 are more close than HVP2. Positive and suspicious samples should be verified by several method to avoid missed detection.

【Key words】 Monkey B virus; Alternative antigen; HSV-1; HVP2; ELISA; Enzyme immunoassay, EIA;

[基金项目] 协和青年基金(编号:3332015196)和卫计委公益性行业科研专项(编号:201302006)。

[作者简介] 李晋文, 女, 硕士研究生, 比较医学。Email: elberra_ljw@163.com

[通讯作者] 向志光, Email: xiangzg@cnilas.org; 魏强, Email: weiqiang0430@sohu.com. * 共同通讯

Immuno fluorescence assay, IFA; Western blot

猴 B 病毒属于疱疹病毒科, α 疱疹病毒亚科, 单纯疱疹病毒属。猴 B 病毒自然宿主为亚洲猕猴, 如恒河猴、食蟹猴和豚尾猴等^[1,2], 动物自然感染一般无明显的临床表现, 病毒感染后多潜伏在神经组织^[2]。然而病毒感染人后, 可以导致脑炎、脑脊髓炎等严重的中枢神经系统感染症状, 甚至死亡^[3,4]。因此猴 B 病毒是非人灵长类动物使用中必须排除的烈性病原体^[5]。快速准确地检测猴 B 病毒对建立高质量的实验猴群以及对高危人群进行防护都有着非常重大的意义。

猴 B 病毒的检测多采用血清学方法, 但由于猴 B 病毒属于一类病原, 必须在生物安全四级 (biosafety level 4, BSL-4) 实验设施操作, 从生物安全的角度考虑出发, 目前国内外多采用与 B 病毒具有交叉抗原的替代病毒抗原检测 B 病毒抗体。也有科学家利用重组抗原进行 BV 血清学检测^[6-8], 但国内外常用 HSV-1、HVP2 等作为抗原检测猴 B 病毒^[9-12]。

本实验室 BV 常用的检测方法包括 ELISA (抗原分别为 BV 和 HVP2), 免疫酶法 (EIA) 和, 免疫荧光法 (IFA) (抗原为 HSV-1), Western Blot 方法以及以 HSV-1 gC1 纯化糖蛋白为抗原的免疫印迹方法, 本文将应用这些方法测试我单位近期送检的 135 份样品, 对以上检测方法进行比对。

1 材料和方法

1.1 恒河猴样本血清

HSV-1 (ATCC VR-539) 病毒抗原的制备参考既往方法^[5]。恒河猴血清样品送检时间为 2014 年 12 月 ~ 2016 年 6 月, 本室保存。质控阳性血清为既往 20 份 BV 阳性血清的混合物, 这些血清排除了猴免疫缺陷病毒、猴逆转 D 型病毒、猴 T 细胞趋向性病毒 I 型和猴痘病毒抗体的存在^[5]。质控阴性血清为 20 份 BV 阴性血清混合物, 同样排除其他病原抗体。

1.2 HSV-1 病毒抗原和 EIA、IFA、Western blot 方法

HSV-1 病毒抗原的制备和 HSV-1-WB 方法^[13]的参考既往方法, 调整如下: 抗原蛋白上样量 20 μg /道, 恒河猴血清样品稀释比例为 1:100, 二抗为辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的兔抗猴 IgG 抗体。

IFA 和 EIA 方法检测参考本实验室既往方法^[5]。

1.3 酶联免疫吸附法

猴 ELISA-BV (珠海海泰) 和 ELISA-HVP2 (苏州西山, VRA China) 为市售商品试剂。ELISA-HVP2 结果判定方法为: 样品 OD 值 ≥ 0.3 , 为阳性; 样品 OD 值 < 0.3 , 为阴性; 同时为保证实验结果可靠性, 对于 OD 值在 0.25 ~ 0.35 之间的样本, 建议复检或其他方法进一步复证。ELISA-BV 结果判定方法为: 样品 OD 值 $>$ 临界对照 OD 均值 $\times 1.15$, 为阳性; 临界对照 OD 均值 $\times 0.85 \leq$ 样品 OD 值 $\leq$ 临界对照 OD 均值 $\times 1.15$, 为可疑; 样品 OD 值 $<$ 临界对照 OD 均值 $\times 0.85$, 为阴性。实验室使用时 ELISA-HVP2 (苏州西山, VRA China) 判断标准进行了调整, 阳性样品判定标准调整为: 阳性: 样品 OD 值 > 0.25 ; 阴性: 样品 OD 值 < 0.35 ; 可疑: $0.25 \leq$ 样品 OD 值 ≤ 0.35 。

1.4 HSV-1 gC1 纯化糖蛋白为抗原的免疫印迹方法

亲和层析纯化的 HSV-1 糖蛋白 C1 (欧蒙医学诊断有限公司, EUROIMMUN) 用于免疫印迹检测, 为适应猴血清样品检测作以下调整: 酶结合物改为 HRP 标记的兔抗猴 IgG 抗体 (稀释比例为 1:10000); 通用缓冲液清洗 5 次后, 经 ECL 曝光显影。

2 结果

2.1 HSV-1 病毒蛋白经 SDS-PAGE 展示可显示血清样品中抗病毒抗体特异结合

经差速离心分离的 HSV-1 病毒经超声处理后与含 SDS 的上样缓冲液混合处理进行凝胶电泳, 并转移至 NC 膜上。和 B 病毒抗体阴性的恒河猴血清共孵育无特异条带 (图 A, N 泳道); 和 B 病毒抗体阳性的恒河猴血清共孵育显示出特异条带 (图 A, P 泳道), 包括分子量 115 kDa、分子量 65 kDa 和分子量 58 kDa 的条带, 符合猴 B 病毒糖蛋白 gB、gC 和 gD 的分子量大小, 和文献报道一致^[14]。

2.2 初筛检测方法的比较

用 HVP2-ELISA 方法、BV-ELISA 方法和 HSV-1-EIA 方法三种检测方法对 135 份恒河猴血清进行检测, 阳性率分别为 32.6% (44/135)、37.8% (51/135)、34.8% (47/135)。3 种方法检测结果一致的样品占 91.1% (123/135), 其中, 阳性样品结果一致

的有 42 份,阴性样品结果一致的有 81 份。而三种检测方法结果不一致的样品 11 份;三种方法均判定为可疑的样品 1 份。因此,三种方法每一种均不能完全覆盖其他样品的阳性检出范围。

随后,我们对阳性样品和可疑样品进行了后续验证检验。

2.3 可疑血清样品的判定

以上三种检测方法结果一致的阴性样品 81 份,阳性样品 42 份,所有结果可被 HSV-1 IFA、HSV-1 WB 和 HSV-1 gC1 纯化糖蛋白为抗原的免疫印迹方法确证。其余 8.9% (12/135) 为可疑阳性样品包括:1 份可疑样品,三种检测方法初筛为可疑样品,经多种方法确证为阴性;11 份三种检测结果不一致

的样品,其中,HVP2 ELISA 和 BV ELISA 方法检测结果不一致的样品有 7 份,经 HSV-1 IFA、HSV-1 WB(图 1B)和 HSV-1 gC1 纯化糖蛋白为抗原的免疫印迹方法确证,3 份样品被判定为阳性,4 份样品被判定为阴性(如表 1 所示)。然而,其中 2 和 7 号样品仅经 BV-ELISA 判定为阳性,经多种验证方法均无法确证为阳性,因此推测 BV-ELISA 方法检测猴 B 病毒抗体并不完全可靠。此外,对 HSV-1 EIA 与 BV ELISA 方法比较,检测结果不一致的其余 3 份样品也进行了确证,1 份样品被判定为阳性,2 份样品被判定为阴性。因此,可疑样品的验证检验的阳性率为 33.3% (4/12)。

表 1 HSV-1 IFA,HSV-1 WB 和 HSV-1 gC1 免疫印迹方法确证结果
Tab.1 Confirmation results of HSV-1 IFA,HSV-1 WB and HSV-1gC1 immunoblotting

编号 Number	EIA HSV-1	ELISA HVP2	ELISA BV	WB HSV-1	免疫印迹 HSV-1gC1	IFA HSV-1
1	-	UN	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-
3*	+	UN	+	+	+	+
4*	+	UN	+	+	+	+
5	+	UN	-	-	-	-
6*	+	-	+	+	+	+
7	-	-	+	-	-	-
8	-	UN	+	-	-	-
9	-	+	+	-	-	-
10*	-	+	+	+	+	+
11	UN	UN	UN	-	-	-
12	+	UN	+	-	-	-

注:UN 表示无法做出阳性或阴性判定的可疑样品;带“*”的样品是被验证为阳性的样品。
Note. UN indicates the suspicious samples that can not be qualified; The samples marked with“*” are confirmed as positive.

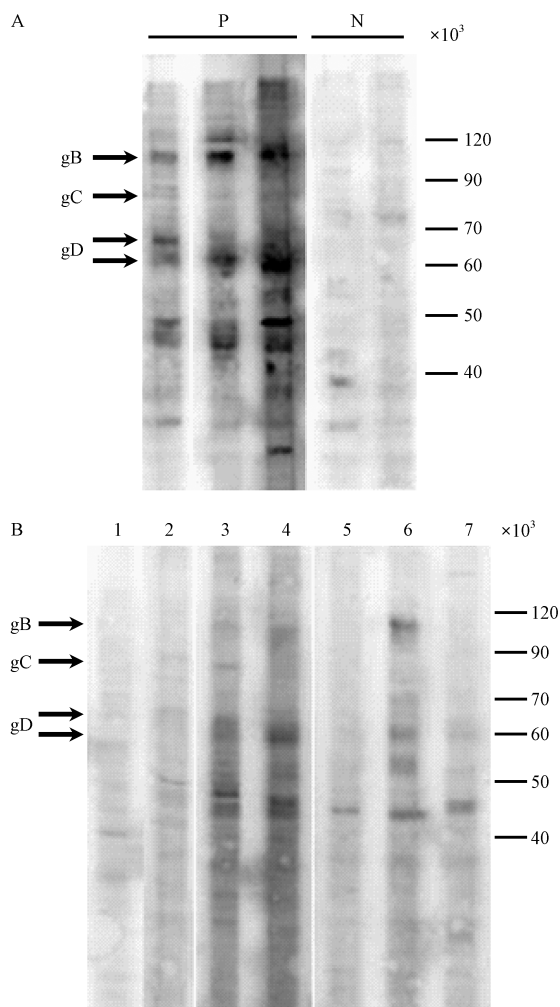
3 讨论

病原检测结果的准确性受多方面因素影响包括:抗原的状态、抗原来源以及质控样品以及临界值的判定标准等。EIA 和 IFA 检测方法病毒抗原以细胞感染的状态经丙酮固定、干燥,附着于载玻片;ELISA 方法病毒抗原蛋白通过电荷吸附的方式包被;WB 方法病毒蛋白抗原通过变性还原成线性表位。每一种检测方法展示的抗原表位可能存在差异,所有判定结果也会有不同。因此在猴 B 病毒抗体的检测中有必要使用多种方法进行检测。

猴 B 病毒存在非常高的生物安全风险,目前国内一般用 HSV-1 或 HVP2 等替代抗原检测猴 B 病毒。而多个实验室比较各种抗原的检测方法,认为使用替代抗原检测存在漏检的可能^[15-19]。本文 HVP2-ELISA 方法阳性检出率为 32.6%,检出率低

于其他检测方法,可能有漏检的情况发生,适当降低阳性样品的判定标准,将可疑样品判定范围下限值作为阳性判定标准时,三种方法结果较为一致。参考猴 B 病毒国家标准检测方法,本文 BV-ELISA 方法由于未设置正常抗原对照,无法排除非特异结合的可能,导致将阴性样品误判为阳性,因此 BV-ELISA 方法用来监测猴 B 病毒感染的动物并不完全可靠,还需要经多种检测方法验证。

在疱疹病毒中,表面糖蛋白在决定细胞趋向性和致病性方面起着重要作用。猴 B 病毒与 HSV-1 糖蛋白氨基酸序列一致性平均高达 62.5%,依次为 gB(79.9%),gD(57%),gC(49.9%),gE(46%)和 gG(29.2%)^[20]。由于血清抗 gE 抗体滴度低,而 gG 一般不能刺激产生抗体,因此 gB、gD 和 gC 是引起 HSV-1 病毒抗原和恒河猴抗血清发生抗原交叉反应的主要成分^[14]。其中 BV 与 HSV-1gB 的氨基酸序



注:A:猴 B 病毒阳性对照和阴性对照血清和仙台病毒抗原杂交结果。杂交使用预染分子量标准 (sm0671, Fermentas)。图中 N 为阴性对照血清,P 为阳性对照血清。B:待检可疑样品免疫印记结果。1~7 道依次为编号 1~7 检测样品。

图 1 猴 B 病毒 Western blot 检测结果

Note. A: Hybridization results of monkey BV positive serum and negative serum and Sendai virus antigen. Prestained molecular weight standard was used(sm0671, Fermentas). N: negative serum; P: positive serum. B: Immunoblot results of suspicious samples. The lines 1~7 indicate the samples to be detected.

Fig. 1 Results of Western blot detection of the BV samples

列一致性最高,抗 gB 抗体出现最早,抗体滴度最高;尽管如此,二者 gB 构象结构存在明显差异,而相应抗体的产生高度依赖于 gB 结构构象暴露的抗原表位,因此对于 WB 实验中展示的 HSV-1 gB 线性表位,相对于 gD 检测猴抗血清抗体敏感性较弱^[21]。此外,在 WB 和斑点印记实验中,血清抗 gC 抗体不

能高效识别 gC 线性表位。所以,恒河猴血清抗 gD 抗体与 HSV-1gD 特异结合显示 58 kDa 分子量大小的蛋白条带是本文 WB 方法主要的判定依据,gB 和 gC 显示的 115 kDa,65 kDa 和 80 kDa 的蛋白条带则作为参考依据,而以 HSV-1 gC1 为抗原的免疫印迹法仅作为辅助参考的检测方法。在 ELISA、IFA 和 EIA 三种方法中由于抗原纯度的限制而对某些感染情况难以判断,但是在 WB 方法中可以较好的区分非特异杂交的背景和核心抗原条带的杂交,如图 B 所示的样品,虽然存在一定的非特异背景,但是可以辨识出核心抗原条带的阳性杂交,因此可以判定为 BV 阳性。

本文通过对本实验室检测体系现有的检测方法进行比较,先使用不同抗原作为检测抗原所建立的 ELISA 和 EIA 方法筛查猴 B 病毒感染动物,再使用 WB 方法确证,同时联合 IFA 等其他方法,具有一定的实用价值和意义。而对于任意一种方法检测出的阳性以及可疑阳性样品,采用不同方法以做出诊断,无论对于繁育群体还是研究群体都是有重要意义的。

参考文献:

[1] Estep RD, Messaoudi I, Wong SW. Simian herpesviruses and their risk to humans[J]. Vaccine, 2010, 28(Suppl 2): B78 - 84.

[2] Elmore D, Eberle R. Monkey B virus (*Cercopithecine herpesvirus 1*) [J]. Comp Med, 2008, 58(1): 11 - 21.

[3] Tischer BK, Osterrieder N. Herpesviruses—a zoonotic threat? [J]. Vet Microbiol, 2010, 140(3 - 4): 266 - 270.

[4] Huff JL, Barry PA. B-virus (*Cercopithecine herpesvirus 1*) infection in humans and macaques: potential for zoonotic disease [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(2): 246 - 250.

[5] 国家标准:实验动物微生物学等级及监测,GB14922. 2 - 2011

[6] Pereelygina L, Patrusheva I, Hombaiah S, et al. Production of herpes B virus recombinant glycoproteins and evaluation of their diagnostic potential[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(2): 620 - 628.

[7] 肖锐,付瑞,贺争鸣,等. 猴 B 病毒 BVgD-多肽 ELISA 检测方法的建立[J]. 实验动物科学, 2008, 25(2): 20 - 23.

[8] 叶华虎,袁菊芳,刘欢,等. 猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 的 B 细胞表位预测及鉴定[J]. 中国比较医学杂志,2014, 24(11): 20 - 26.

[9] 吴小闲,蒋虹,曲立荣,等. 恒河猴 B 病毒相关抗体检测方法的比较[J]. 病毒学杂志, 1989, 3(1): 80 - 84.

[10] 王晓明,王建飞,戚晨伟,等. 恒河猴 B 病毒感染的初步探讨 [J]. 实验动物与动物实验,1990, (2): 4 - 6.

[11] Takano J, Narita T, Fujimoto K, et al. Detection of B virus

- infection in cynomolgus monkeys by ELISA using simian agent 8 as alternative antigen [J]. *Exp Anim*, 2001, 50 (4): 345 – 347.
- [12] Tanaka S, Mannen K, Sato H. Use of herpesvirus papio 2 as an alternative antigen in immunoblotting assay for B virus diagnosis [J]. *J Vet Med Sci*, 2004, 66(5): 529 – 532.
- [13] 向志光, 佟巍, 李雨函, 等. 大鼠仙台病毒 ELISA、间接免疫荧光和免疫印迹三种检测方法比较[J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(1): 23 – 26.
- [14] Pereylygina L, Patrusheva I, Zurkuhlen H, et al. Characterization of B virus glycoprotein antibodies induced by DNA immunization [J]. *Arch Virol*, 2002, 147(11): 2057 – 2073.
- [15] 韦毅, 符明泰, 石寒, 等. 三种不同抗原对猴 B 病毒抗体检测结果的比较研究[J]. *实验动物科学*, 2001, 18(2): 1 – 3.
- [16] 周亚敏, 李绍东, 杨森富, 等. 猴疱疹病毒(B 病毒)抗体检测方法的比较研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2005, 15(4): 237 – 239.
- [17] 贺争鸣, 卫礼, 巩薇, 等. 猴 B 病毒抗体 ELISA 法的建立和应用研究[J]. *中国实验动物学报*, 2003, 11(3): 161 – 164.
- [18] 王晓明, 邵伟娟, 王建飞. 猴 B 病毒抗体及 B 病毒相关抗体 ELISA 检测结果比较[J]. *实验动物与比较医学*, 1997, 17(2): 80 – 81.
- [19] 李舜, 李筱青, 蔡标, 等. 猕猴血清 B 病毒抗体 3 种检测方法的比较[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(1): 134 – 135.
- [20] Pereylygina L, Zhu L, Zurkuhlen H, et al. Complete sequence and comparative analysis of the genome of herpes B virus (*Cercopithecine herpesvirus 1*) from a rhesus monkey [J]. *J Virol*, 2003, 77(1): 6167 – 6177.
- [21] Eing BR, Kühn JE, Braun RW. Neutralizing activity of antibodies against the major herpes simplex virus type 1 glycoproteins[J]. *J Med Virol*, 1989, 27(1): 59 – 65.

[修回日期]2017-02-13

(上接第 16 页)

- [5] Tang Y, Liu X, Zhao J, et al. Hypothermia-induced ischemic tolerance is associated with Drp1 inhibition in cerebral ischemia-reperfusion injury of mice[J]. *Brain Res*, 2016, 1646: 73 – 83.
- [6] 潘震华 赵悦 于宏颖, 等. 饱和氢盐水对心肌缺血再灌注老年大鼠心肌细胞自噬的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(25): 2022 – 2026.
- [7] Tao B, Liu L, Wang N, et al. Effects of hydrogen-rich saline on aquaporin 1, 5 in septic rat lungs [J]. *J Surg Res*, 2016, 202(2): 291 – 298.
- [8] Sun Q, Cai J, Zhou J, et al. Hydrogen-rich saline reduces delayed neurologic sequelae in experimental carbon monoxide toxicity [J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(4): 765 – 769.
- [9] Li YH, Qiao LJ, Lin XY. Mechanism of low molecular weight GTP binding protein RAC1 in injury of neural function of rats with cerebral ischemia reperfusion [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(5): 474 – 477.
- [10] Tian Y, Guo S, Zhang Y, et al. Effects of hydrogen-rich saline on hepatectomy-induced postoperative cognitive dysfunction in old mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(4): 2579 – 2584.
- [11] Qin L, Tao Y, Wang L, et al. Hydrogen-rich saline as an innovative therapy for cataract: a hypothesis [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 3191 – 3195.
- [12] Shi Q, Chen C, Deng WH, et al. Hydrogen-rich saline attenuates acute hepatic injury in acute necrotizing pancreatitis by inhibiting inflammation and apoptosis, involving jnk and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent reactive oxygen species [J]. *Pancreas*, 2016, 45(10): 1424 – 1431.
- [13] Du H, Sheng M, Wu L, et al. Hydrogen-rich saline attenuates acute kidney injury after liver transplantation via activating p53 – mediated autophagy [J]. *Transplantation*, 2016, 100(3): 563 – 570.
- [14] Meng X, Chen H, Wang G, et al. Hydrogen-rich saline attenuates chemotherapy-induced ovarian injury via regulation of oxidative stress [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(6): 2277 – 2282.
- [15] Huang SL, Jiao J, Yan HW. Hydrogen-rich saline attenuates steroid-associated femoral head necrosis through inhibition of oxidative stress in a rabbit model [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(1): 177 – 182.
- [16] 薛金龙, 孙芳玲, 刘婷婷, 等. 莫诺苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Wnt7a 和 APC 表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(9): 9 – 13.
- [17] 刘志辉. 立普妥对高糖诱导的 HUVEC 凋亡及 PI3K/AKT/eNOS 信号通路的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(3): 58 – 63.
- [18] Tsai WH, Wu CH, Yu HJ, et al. L-Theanine inhibits proinflammatory PKC/ERK/ICAM – 1/IL – 33 signaling, apoptosis, and autophagy formation in substance P-induced hyperactive bladder in rats [J]. *Neurourol Urodyn*, 2017, 36(2): 297 – 307.

[修回日期]2017-01-05