

## 西尼罗病毒感染的抗体检测方法研究进展

陈晓 曾志磊 谢鹏

【关键词】 西尼罗病毒; 抗体; 检测

**A review on assays for detecting antibodies of West Nile virus infection** CHEN Xiao, ZENG Zhi-lei, XIE Peng. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Corresponding author: XIE Peng, Email: peng.xie58@gmail.com

【Key words】 West Nile virus; Antibody; Detection

西尼罗病毒(West Nile virus, WNV)是一种单股正链 RNA 病毒,属黄病毒科(Family Flaviviridae)、黄病毒属(Genus Flavivirus),与日本乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)、墨累谷脑炎病毒(Murray Valley encephalitis virus, MVEV)、圣路易斯脑炎病毒(St. Louis encephalitis virus, SLEV)、昆津病毒(Kunjin virus, KV)同属 JEV 血清群。病毒核酸编码 3 种结构蛋白和 7 种非结构蛋白。3 种结构蛋白分别是病毒壳蛋白(C)、包膜蛋白(E)和前膜蛋白(prM)。7 种非结构蛋白分别是 NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b 和 NS5。该病毒为虫媒病毒,蚊尤其是库蚊是其最主要的传播媒介,携带病毒的鸟类是主要的传染源和储存宿主,病毒在鸟和蚊之间维持着自然循环,再感染人及其他动物。

WNV 分布广泛,已在非洲、欧洲、澳洲、亚洲、中东、北美等地区引起流行<sup>[1]</sup>,给发病国家造成重大危害。我国目前还没有发现 WNV,但是我国的自然气候、地理环境复杂,蚊虫种类繁多,病毒传入的危险性很大。阻断该病毒的传入,已成为我国卫生工作者的当务之急。加强病毒的监测,熟悉病毒的实验室诊断方法并将其应用在监测工作中就显得尤为重要。本文就 WNV 感染的抗体检测方法加以综述。

WNV 抗体的检测是诊断 WNV 感染的主要手段。抗体检测需要采集患者血清和脑脊液,也可用血浆进行检测。一般于急性期(发病后 5 d 内)和恢复期(发病后 14 d 以上)2 次以上采血和脑脊液,对双份血清和脑脊液样本进行抗体测定。检测的方法有很多,包括血凝抑制试验(HIT)、补体结合试验(CFT)、蚀斑减少中和试验(PRNT)、免疫荧光试验(IFA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、微球免疫方法(MIA)等。

1. HIT: 是一种特异性的抗体中和反应,其基本原理是病毒的血凝素可凝集红细胞,若先让特异性抗体与病毒作用,再加入红细胞,则不出现红细胞凝集,称为血凝抑制。该试验常用于检测 WNV 感染者体内特异性抗体<sup>[2]</sup>,包括 IgM 和 IgG,是一种定量检测抗体水平(滴度)的方法。

检测时取待测血清加入丙酮,萃取出非特异性抑制剂和天然的血凝素,再分别加入鹅红细胞以发生吸附作用。接着稀释丙酮处理过的血清,再加入 8 个血凝单位的乳鼠脑 WNV 抗原 4℃ 孵育过夜,将鹅红细胞加入血清与抗原的混合液中室温下孵育 1 h。注意要预先测定分离病毒的血凝单位,使用前滴定并配制,然后用 8 个血凝单位的病毒与血清进行 HIT。使红细胞完全凝集抑制的血清最高稀释度作为判定终点即是该血清的血凝抑制效价<sup>[2]</sup>。1958 年 Southam 和 Greene 用 HIT 检测故意感染 WNV 作为抗肿瘤剂的癌症患者的 WNV 抗体,发现在感染后 7 d 可以检出抗体,2 周后抗体滴度接近最高水平,直到 12 周抗体滴度仍持续增加,而 CFT 在 10 周时已不能检出抗体。研究证实,HIT 检测到的抗体滴度比标准的中和试验要高,比 micro-PRNTs 检测的阳性率低<sup>[3]</sup>,敏感性不如 ELISA。

由于 HIT 检测 WNV 与其他黄病毒的感染(圣路易斯脑炎、登革热、日本乙型脑炎、黄热病)及疫苗接种(黄热或乙脑疫苗)时存在交叉反应;所以通过该试验检测到患者急性期和恢复期血清抗体水平的升高,只能提示近期有黄病毒的感染或接种过疫苗,不能肯定是否是 WNV。这时就需要补充进行其他的实验,帮助确定结果,加之 HIT 的试剂不易保存,所以目前该试验应用减少,偶用于抗体筛检<sup>[4]</sup>。

2. CFT: 是一种传统的血清学技术,以免疫溶血机制做指示系统,来检测另一反应系统抗原或抗体的试验。抗原与相应抗体结合后,抗原抗体复合物可以结合补体,但这一反应肉眼不能察觉,再加入红细胞和溶血素,即可根据是否出现溶血反应来判定反应系统中是否存在相应的抗原或抗体。

CFT 主要用于监测 IgM,同时也可以检测到其他抗体。如果患者的血清中补体结合抗体能识别待测病毒的抗原,就能消耗加入其中的外源性补体(如豚鼠),而此时已加入的指示细胞(包裹抗体的红细胞)就不会溶解。因此,不发生溶血,提示相应抗体的存在,这种情况称为 CFT 阳性。连续稀释样本,以红细胞溶解 50% 的最高稀释度作为样本的补体结合效价。补体结合抗体常出现在黄病毒感染发病后 2 周,2 个月开始减少,在 1~2 年内维持在基线水平,所以它常被作为近期感染的指标。

CFT 和 HIT 一样在检测 WNV 与其他黄病毒的感染时存在交叉反应,这就影响了它的特异性。此外有报道显示,患

者感染黄病毒后却没有产生补体结合抗体<sup>[5]</sup>。因此,尽管在历史上 CFT 在研究中发挥了很大的作用,现在却渐渐被一些特异性和敏感性都更好的方法取代。

3. PRNT: 该试验是病毒血清学试验的经典方法之一,是实验诊断病毒感染的重要手段。中和试验其基本原理是特异性的中和抗体与病毒作用,能够抑制病毒对敏感细胞的吸附、穿入和脱衣,从而阻止病毒增殖,使其失去感染能力。PRNT 是检测 WNV 特异性抗体的金标准,是检测黄病毒特异性最好的试验,它可以帮助排除假阳性反应和由其他黄病毒感染引起的血清学交叉反应。

检测时将患者血清 56℃, 30 min 灭活,接着成倍数稀释,测定西尼罗活病毒的感染单位,血清中加入一定量的活病毒孵育 1 h,再将血清病毒混合物加入有单层 Vero 细胞的培养板,于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养细胞 6 d,计数蚀斑。笔者用蚀斑减少的数量来衡量其中和病毒感染 Vero 细胞的能力。在 Vero 细胞上减少 80%~90% 病毒蚀斑的血清最高稀释度作为判定终点即是该血清中和抗体的滴度<sup>[6]</sup>。依据不同抗血清中和抗体滴度之比来确定病毒种类,滴度之比要 >4 倍。PRNT 可以检测 IgM 和 IgG,但高滴度的试验结果主要与 IgG 有关。

PRNT 在操作时引起意外感染的风险较高,随着 IgG 和 IgM ELISA 的出现,越来越少的样本采用该方法进行检测。这些少数样本多是由于 IgM ELISA 的结果可疑或是来自第一次出现感染的地区,而需要用 PRNT 进行检测。限制该方法广泛应用的主要因素就是安全问题,因为操作时会用到活病毒,需要高水平的实验室(P3 实验室,BSL3)和技术人员,且实验周期长,操作较繁琐,费时费力,难以大规模应用<sup>[7]</sup>。当然近几年随着技术的不断完善,PRNT 的操作也越来越安全,应用也越来越多<sup>[8,9]</sup>。例如重组病毒的发展,使其毒力减弱后再应用于 PRNT,增强了实验的安全性,促进了该方法的推广。Johnson 等<sup>[10]</sup>用减毒的黄热病毒疫苗株的包膜蛋白代替 WNV 的包膜蛋白构建出重组病毒,并将其应用于 PRNT,使该试验可以在生物安全 2 级的实验室中完成。

4. IFA: 该方法的基本原理是标记荧光素抗体能和相应的抗原形成免疫复合物,这种复合物由于有荧光素的参与,借助于荧光显微镜,能观察到细胞内病毒抗原及其存在的位置,从而得知相应的病毒抗原。IFA 分为直接法和间接法。直接法是将荧光素标记在特异性 IgG 或 IgM 抗体上,标记的抗体直接与载玻片上细胞内的病毒抗原结合,然后在荧光显微镜下直接显现结果。间接法是用标记了荧光素的抗 IgG 或 IgM 的二抗检测抗体和抗原的结合物,常用于检测 WNV 的 IgG 和 IgM,耗时 3 h 左右。

检测时首先要制备抗原片,培养感染 WNV 的细胞直到出现轻度的细胞病变反应(CPE)时,将其与正常细胞按一定的比例混合,滴加在抗原片上,丙酮固定、干燥后,-20℃ 保存备用。进行间接免疫荧光试验时,将稀释的血清或脑脊液加在抗原片上与抗原产生反应,孵育并用磷酸缓冲液(PBS)清洗,加入荧光标记的抗人 IgG 或 IgM,再次孵育、清洗并晾干,

最后在荧光显微镜下观察染色情况。出现清楚的细胞质荧光图像为阳性,如绿荧光提示 IgG 阳性。需要注意的是因为载玻片上只有部分感染 WNV 的细胞,所以全部细胞都有荧光提示非特异性反应,而非 WNV 抗体阳性。血清中的自身抗体引起的非特异性反应,可以通过血清与正常细胞的反应来排除<sup>[6]</sup>。为了保证检测结果的准确性,检测 IgM 时血清标本需要加入含有抗人 IgG 的缓冲液清除 IgG,以防止 IgG 和 IgM 竞争抗原结合位点造成的假阴性,同时排除结合 WNV 特异性 IgG 的 IgM 类风湿因子导致的假阳性结果。

IFA 最大的优点在于它可以分别检测 IgM 和 IgG 抗体,而之前这几种方法检测的是总抗体。可以通过抗体的检测来推测感染的时间,IgG 阴性而 IgM 阳性提示最近的感染,IgG 阳性而 IgM 阴性提示过去的感染。IFA 能在 1 d 内完成,比其他方法拿到结果更早,所以常用于快速诊断急性病例。过去认为 IFA 检测 WNV 的敏感性不如 ELISA,但近几年又有研究表明 IFA 检测 WNV 的敏感性与 ELISA 相当,甚至有时敏感性更高,结果更可靠<sup>[11,12]</sup>。同时这些研究也指出,IFA 在检测 WNV 抗体时特异性比 ELISA 好,但仍然存在其他黄病毒感染引起的血清学交叉反应,并且 IgG 的交叉反应要多于 IgM。在进行 WNV 的流行病学调查时,对同一样本仍需同时检测 WNV 与其他黄病毒的抗体,并根据病毒抗体效价的比较结果进行初步的鉴别诊断。

5. ELISA<sup>[13]</sup>: 在过去的几十年中,大多数对 WNV 抗体的研究都是采用这一方法。该方法的基本原理是:抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记,加入酶反应的底物后,底物被酶催化成为有色产物,产物的量与样本中受检物质的量直接相关,由此进行定性或定量分析。ELISA 是目前用于 WNV 抗体检测的主要方法。

Feinstein 建立了经典的间接 ELISA 法检测人血清中 IgG 和 IgM<sup>[14]</sup>。用感染 WNV 的 Vero 细胞制备抗原,将其包埋在微量反应孔中,再加入稀释血清,抗体可以识别包埋的抗原,加入酶(碱性磷酸酶)标抗人 IgG 或 IgM,从而间接地标记上酶,再加酶底物显色,最后加稀释的氢氧化钠终止反应,并用分光光度计测量显色产物。介于间接 IgM 法有类风湿因子的干扰,于是发展出了 IgM 抗体捕获 ELISA (MAC-ELISA)。此方法在固相上吸附抗人 IgM,再加入稀释的人血清,血清中的 IgM 就会结合固相上的抗 IgM。此时包括特异性 WNV IgM 在内的所有 IgM 均被捕获,接着加入 WNV 抗原识别特异性 WNV IgM<sup>[15]</sup>。

美国疾病预防控制中心(CDC)建立了标准化的 IgM 捕获 ELISA 方法检测人、马和禽血清以及脑脊液样本中 WNV 抗体。该方法应用感染 WNV 的乳鼠脑为抗原,抗原不标记,用酶标记黄病毒特异性的单克隆抗体(单克隆 6B6C-1)<sup>[15]</sup>。该方法以正常鼠脑抗原作为特异性对照,在鼠脑准备过程中排除了非黄病毒抗原的非特异性反应和捕获的 IgM 分子与酶标单克隆抗体 6B6C-1 之间的非特异性反应。考虑到结果的有效性,感染鼠脑抗原的吸光度值应该为正常鼠脑抗原的 2 倍。结果以 P/N 值表示,P 代表人的样本与感染病毒的鼠脑

抗原反应所得的吸光度值,  $N$  代表已知阴性样本与未感染对照抗原反应所得的吸光度值,  $P/N$  值  $\geq 3$  为阳性。此外, 美国 CDC 根据单克隆抗体反应建立了改良的间接黄病毒 IgG ELISA 法<sup>[6]</sup>。在此方法中, 将黄病毒的单克隆抗体(4G2)包埋在微量反应孔中, 以捕获黄病毒抗原。再加入稀释血清, 所有识别黄病毒抗原的抗体均吸附在抗原上, 最后加入酶标记的抗人 IgG、酶底物和反应终止剂。这一方法最大的优点在于它不需要高纯度的黄病毒抗原, 因为非病毒性的抗原不会结合在单克隆抗体上。

随着重组技术的发展, 人们将 ELISA 应用到 WNV 的抗原制备中, 降低了感染的风险。一些研究者率先将重组的 WNV 抗原应用于 ELISA 来检测抗体<sup>[17]</sup>, 并且证实重组的 E 蛋白能够检测感染者血清中的 IgG 抗体。2000 年 Chang 等<sup>[18]</sup>用日本脑炎病毒 pre 蛋白和 E 蛋白的质粒转染 COS-1 细胞, 从而分泌出由 pre 蛋白和 E 蛋白组成的非感染性的亚病毒颗粒, 以作为 IgM 捕获 ELISA 的抗原。2002 年, 美国 CDC 用重组 WNV 代替鼠脑抗原, 应用于 IgM 捕获 ELISA 和单克隆抗原捕获 IgG ELISA。

随着 WNV 在美国的扩散, 抗体的检测出现了商业化的 IgM 和 IgG 抗体 ELISA。2003 年初美国食品药品监督管理局(FDA)批准了商业化的 WNV IgM 捕获 ELISA 试剂盒, 该试剂盒利用天然 WNV 抗原由 PanBio 公司生产。Malan 等<sup>[19]</sup>对该试剂盒进行评估, 其灵敏性为 94%, 而特异性为 96%。Focus 公司用重组 WNV 抗原研究开发了间接 WNV IgG ELISA 试剂盒和 WNV IgM 捕获 ELISA 试剂盒。IgG 试剂盒在微量反应孔中包埋重组的 WNV 抗原和过氧化物酶标记的羊抗人 IgG。IgM 捕获试剂盒在微量反应孔中包埋兔抗人 IgM, 非标记的重组 WNV 抗原和过氧化物酶标记的抗黄病毒单克隆抗体。有研究报道<sup>[20]</sup>, Focus 公司 WNV IgM 捕获 ELISA 试剂盒的敏感性和特异性都为 99%, WNV IgG ELISA 试剂盒的敏感性和特异性分别为 98% 和 97%。WNV IgM 捕获 ELISA 试剂盒的交叉反应率为 12%, WNV IgG ELISA 试剂盒交叉反应率为 35%。Hogrefe 等<sup>[20]</sup>也对试剂盒进行评估, 表明 WNV IgG 和 IgM ELISA 的灵敏性均为 97%, 而特异性分别为 100% 和 97%。WNV IgM ELISA 的假阳性率为 2.5%。

间接的 IgG ELISA 法有较好敏感性和特异性, 一直被沿用至今<sup>[21]</sup>, 只是对酶和终止溶液进行了改良。但是间接的 IgM ELISA 法却存在假阳性的困扰, 类风湿因子可以通过与 IgG 的反应结合在 WNV 的抗原上。另外, ELISA 方法操作起来比较麻烦, 需要准备多种黄病毒抗原和多克隆抗体, 容易产生交叉反应, 降低了实验的特异性, 有时多克隆抗体和抗鼠 IgG 能被捕获 IgM 类风湿因子和异嗜性抗体识别而导致假阳性的结果。所以 ELISA 方法虽然灵敏, 常用于黄病毒抗体的筛检, 却不能进行确诊。为了鉴别诊断 WNV 与其他黄病毒感染所诱发的抗体, 一般采用特异的 PRNT 来加以区分。也有研究者提出可以通过  $P/N$  值高低来鉴别不同的黄病毒的感染, 对这一假设还需要更多的证据予以支持。

6. MIA: 又称为液相蛋白芯片免疫诊断方法。液相芯片技术在国际上被称之为 xMAP (flexibleMulti-Analyte Profiling) 技术, 其核心技术是乳胶微球包被、荧光编码以及液相分子杂交。该技术由美国 Luminex Corporation (Austin, TX) 研制开发并于 20 世纪 90 年代中期发展起来, 是在流式细胞技术、ELISA 技术和传统芯片技术基础上开发的新一代生物芯片技术和新型蛋白质研究平台<sup>[22]</sup>。

MIA 能够同时对多个黄病毒的抗体水平进行快速评估, 并且价格合理。最常用的 MIA 的体系以聚苯乙烯微球为基质, 微球悬浮于液相体系, 每种微球上有特定比例的红色和橙色荧光染料, 在改良的流式细胞仪中可以显示特定的荧光图像。这一方法可以检测不同抗原的 IgG 抗体, 将不同的抗原分别与特定的荧光微球结合, 再把这些结合不同抗原的微球集中混合在一起, 加入血清, 这时候抗体就可以识别混合物中的抗原。接着加入报告抗体——标记荧光试剂(藻红蛋白)的山羊抗人 IgG, 结合任何捕获的 IgG, 再对微球和报告抗体的荧光图像进行同步分析。报告荧光强度取决于微球结合的 IgG 抗体的数量。这样就可以在单个反应孔里检测多种抗原的抗体<sup>[6]</sup>。

国外已建立多种 MIA 用于 WNV 的快速检测。Wong 等<sup>[23, 24]</sup>用重组的 WNV NS5 蛋白和 E 蛋白包被聚苯乙烯微球, 以藻红蛋白标记的多价羊抗人免疫球蛋白(可以识别 IgG、IgM 和 IgA)为报告抗体。应用重组 NS5 蛋白的 MIA 可以在发病 6 d 左右检出 WNV, 应用重组 E 蛋白的 MIA 可以在发病 2~6 d 检出 WNV。结果显示, 多价 MIA 和美国 CDC 的 WNV IgG ELISA 有较好的一致性, 并能将 WNV 感染与登革热病毒感染、圣路易斯脑炎病毒感染以及黄热病鉴别开来。此外, Johnson 等<sup>[25]</sup>还建立了同时检测 WNV 和圣路易斯脑炎病毒 IgM 抗体的 MIA。

相较 ELISA 而言 MIA 拥有灵敏度更高、重复性好、检测范围宽、通量高、样本处理时间少、操作简便、检测时需要的样本量更少等优点。目前研究者正在开发更多相关病毒的 MIA, 并不断完善现有的方法, 可以预见该方法在临床和科研中的应用前景。

7. 结语: WNV 抗体检测方法多种多样, 通过对这些方法的归纳与总结了解其优缺点和适用范围, 便于根据实际情况进行选择, 从而更好地为临床和科研服务。我国目前尚无 WNV 感染致病的报道, 但由于该病毒大多呈隐性感染, 且我国存在各种库蚊和鸟类, 具备了病毒传播流行的条件。此外, WNV 对我国是一种全新的致病病毒, 人群普遍缺乏免疫力, 一旦出现病毒感染的爆发性流行, 后果不堪设想。所以卫生防疫部门应该加强与完善监测体系, 主动应对 WNV 的威胁。

## 参 考 文 献

- [1] 高志勇, 庄辉. 西尼罗病毒研究进展. 中华流行病学杂志, 2005, 26(1): 62-64.
- [2] Cohen JK, Kilpatrick AM, Stroud FC, et al. Seroprevalence of

- West Nile virus in nonhuman primates as related to mosquito abundance at two national primate research centers. *Comp Med*, 2007, 57(1):115-119.
- [3] Weingartl HM, Drebot MA, Hubalek Z, et al. Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in chicken serum. *Can J Vet Res*, 2003, 67(2):128-132.
- [4] Lindh E, Huovilainen A, Rätti O, et al. Orthomyxo-, paramyxo- and flavivirus infections in wild waterfowl in Finland. *Viro J*, 2008, 5:35.
- [5] Kuno G. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. *Adv Virus Res*, 2003, 61:3-65.
- [6] Shi PY, Wong SJ. Serologic diagnosis of West Nile virus infection. *Expert Rev Mol Diagn*, 2003, 3(6):733-741.
- [7] 魏荣, 王志亮. 美国西尼罗病毒感染的实验室诊断进展. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24(2):162-164.
- [8] Magnarelli LA, Bushmich SL, Anderson JF, et al. Serum antibodies to West Nile virus in naturally exposed and vaccinated horses. *J Med Microbiol*, 2008, 57(9):1087-1093.
- [9] Patiris PJ, Ocegüera LF 3rd, Peck GW, et al. Serologic diagnosis of West Nile and St. Louis encephalitis virus infections in domestic chickens. *Am J Trop Med Hyg*, 2008, 78(3):434-441.
- [10] Johnson BW, Chambers TV, Crabtree MB, et al. Analysis of the replication kinetics of the chimerivax™-DEN 1, 2, 3, 4 tetravalent virus mixture in *Aedes aegypti* by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 2004, 70(1):89-97.
- [11] Malan AK, Stipanovich PJ, Martins TB, et al. Detection of IgG and IgM to West Nile virus. Development of an immunofluorescence assay. *Am J Clin Pathol*, 2003, 119(4):508-515.
- [12] Hukkanen RR, Liggitt HD, Kelley ST, et al. Comparison of commercially available and novel West Nile virus immunoassays for detection of seroconversion in pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*). *Comp Med*, 2006, 56(1):46-54.
- [13] Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA) / enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*, 2005, 51(12):2415-2418.
- [14] 于萍. 西尼罗病毒巢式 RT-PCR 和荧光定量 RT-PCR 两种检测方法的建立. 福州:福建农林大学, 2005.
- [15] Martin DA, Muth DA, Brown T, et al. Standardization of Immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(5):1823-1826.
- [16] Johnson AJ, Martin DA, Karabatsos N, et al. Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(5):1827-1831.
- [17] Wang T, Magnarelli LA, Anderson JF, et al. A recombinant envelope protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for West Nile virus serodiagnosis. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2002, 2(2):105-109.
- [18] Chang GJ, Hunt AR, Davis B. A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice. *J Virol*, 2000, 74(9):4244-4252.
- [19] Malan AK, Martins TB, Hill HR, et al. Evaluations of commercial West Nile virus immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme immunoassays show the value of continuous validation. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(2):727-733.
- [20] Hogrefe WR, Moore R, Lape-Nixon M, et al. The performance of West Nile virus recombinant (preM/E)-based IgG and IgM ELISA for the detection of West Nile virus and other flavivirus antibodies. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(10):4641-4648.
- [21] Prince HE, Tobler LH, Yeh C, et al. Persistence of West Nile virus-specific antibodies in viremic blood donors. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14(9):1228-1230.
- [22] 陈茹, 刘林琳, 许如苏. 液相蛋白芯片技术及其在免疫诊断和分析领域的应用进展. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(3):232-234.
- [23] Wong SJ, Boyle RH, Demarest VI, et al. Immunoassay targeting nonstructural protein 5 to differentiate West Nile virus infection from dengue and St. Louis encephalitis virus infections and from flavivirus vaccination. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(9):4217-4223.
- [24] Wong SJ, Demarest VL, Boyle RH, et al. Detection of human anti-flavivirus antibodies with a West Nile virus recombinant antigen microsphere immunoassay. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(1):65-72.
- [25] Johnson AJ, Cheshier RC, Cosentino G, et al. Validation of a microsphere-based immunoassay for detection of anti-West Nile virus and anti-St. Louis encephalitis virus immunoglobulin M antibodies. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14(9):1084-1093.

(收稿日期:2008-12-18)

(本文编辑:尹廉)