



五种国产与进口小鼠病毒 ELISA 抗体检测试剂盒的比较研究

王吉, 卫礼, 付瑞, 李晓波, 岳秉飞, 贺争鸣

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 国家实验动物质量检测中心, 北京 100050)

【摘要】 目的 评价国产小鼠病毒抗体 ELISA 检测试剂盒。方法 选择国产与进口小鼠淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、肝炎病毒 (MHV)、仙台病毒 (SV)、腺病毒 (MAV)、细小病毒 (MPV) ELISA 抗体检测试剂盒, 进行敏感性、特异性、精密性、稳定性、可信度试验比较。结果 国产与进口试剂盒: 同种试剂盒之间灵敏度相差最低为 2 倍, 差异显著 ($P < 0.05$), 最高为 16 倍, 差异极显著 ($P < 0.01$); 特异性试验显示每种试剂盒, 与其他 4 种病毒均无交叉反应; 精密性试验显示 5 种试剂盒批内平均变异系数均小于 10%; 稳定性试验显示 5 种试剂盒相对偏差均小于 25%; 分别选择已知 36 份小鼠血清进行检测, 国产和进口 LCMV、MHV、SV、MPV 符合率均为 100%; 国产 MAV 符合率为 86.1%, 进口 MAV 符合率均为 100%, 二者之间差异极显著 ($P < 0.01$)。结论 除国产 MAV 试剂盒敏感性、可信度低于进口外, 国产 LCMV、MHV、SV、MPV 试剂盒与进口同种试剂盒相比, 在敏感性、特异性、精密性、稳定性和可信度方面均良好。

【关键词】 ELISA 检测试剂盒; 比较研究; 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒; 小鼠肝炎病毒; 仙台病毒; 腺病毒; 小鼠细小病毒

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)12-0004-04
doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.012.002

Comparison of Five Domestic and Imported ELISA Kits for Detection of Mouse Virus Antibodies

WANG Ji, WEI Li, FU Rui, LI Xiao-bo, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming

(National Institute for Food and Drug Control, National Center for Quality of Laboratory Animals, Beijing 100050, China)

【Abstract】 **Objective** To evaluate the domestic ELISA kit for detection of mouse virus antibodies. **Methods** Domestic and imported ELISA kits were chosen to detect five mouse virus antibodies, including lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), hepatitis virus (MHV), Sendai virus (SV), adenovirus (MAV), and parvovirus (MPV). The sensitivity, specificity, precision, stability, and reliability of the five kits were compared. **Result** There were significant differences in sensitivity of the same type domestic and imported kits, varying from at least 2 times ($P < 0.05$) up to 16 times ($P < 0.01$), and there were no cross reaction with the other four types of viruses. Precision test showed that the batch average coefficient of variation of the five kits was less than 10%. Stability test showed that the relative deviation of the five kits was less than 25%. 36 known mouse serum samples were tested with both the domestic and imported kits, respectively, and showed a coincidence rate of 100% for detection of LCMV, MHV, SV, and MPV.

[基金项目]“国家科技支撑计划”: 实验动物新品种的种群建立与质量标准化研究(2011BA115B01)。

[作者简介]王吉(1974-),女,副研究员,研究方向:微生物学和免疫学。

[通讯作者]贺争鸣(1957-),男,研究员,博士,研究方向:微生物学和免疫学。E-mail: zhengminghe57@163.com。

The domestic kit showed a coincidence rate of 86.1% in test for MAV, and that of the imported kit was 100%, with a very significant difference between them ($P < 0.01$). **Conclusions** Except that the domestic MAV kit shows a lower sensitivity and credibility than that obtained with the imported kits, the domestic and imported LCMV, MHV, SV, MPV kits showed similar sensitivity, specificity, precision, stability and reliability.

【Key words】 ELISA detection kit; Comparative study; Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV); Hepatitis virus (MHV; Sendai virus (SV); Adenovirus (MAV); Parvovirus (MPV)

国家标准规定,实验小鼠病毒抗体检测方法主要有酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫酶试验(IEA)、免疫荧光试验(IFA)、血凝试验(HA)、血凝抑制试验(HAI)、免疫组织化学试验(IH)。但实验室通常采取 ELISA 法作为主要检测手段。作为国家实验动物质量检测中心,在承担来自全国各省市送检实验动物质量检测任务的同时,还为实验动物相关单位提供实验动物病毒 ELISA 抗体检测试剂盒。为提高 ELISA 法检测的准确性及可靠性,保证 ELISA 抗体检测试剂盒的质量,我们制备的淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、小鼠肝炎病毒(MHV)、仙台病毒(SV)、腺病毒(MAV)、小鼠细小病毒(MPV)等 5 种病毒 ELISA 抗体检测试剂盒与美国 Charles River 公司生产的试剂盒进行比较,客观评价和分析了国产试剂与进口试剂的真实性及可靠性。

1 材料和方法

1.1 材料

国产小鼠淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、肝炎病毒(MHV)、仙台病毒(SV)、腺病毒(MAV)、细小(MPV)病毒 ELISA 抗体检测试剂盒(批号分别为 090122、090129、090206、090207、090212):本室生产;进口淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、小鼠肝炎病毒(MHV)、仙台病毒(SV)、腺病毒(MAV)、小鼠细小病毒(MPV)ELISA 抗体检测试剂盒(批号分别为: LCM: His3 (102808) T、MHV:17 (070908) T、SV: Q (012808) P、MadV: F-10 (11280F) Q、MPV: 302 (072808) U):美国 Charles River 产品;小鼠血清:2010 年国内送检的 24 份阴性血清和 12 份阳性血清。

1.2 主要仪器

酶标仪:Thermo Multiskan MK3;37℃ 水浴箱:上海森信实验仪器有限公司 DK-4500B 型;37℃ 培养箱:WGP-600。

1.3 方法

1.3.1 实验操作及判断标准的确定:

1.3.1.1 实验操作依据各自试剂盒说明书进行。

1.3.1.2 判断标准

(1)国产试剂盒:在阴、阳对照成立的情况下:待检血清特异抗原孔 A 值 ≥ 0.2 ;待检血清特异抗原孔 A 值/阴性对照特异抗原孔 A 值 ≥ 2.1 ;特异抗原孔和正常抗原孔 A 值比值 ≥ 2.0 时,判为阳性^[1]。

(2)进口试剂盒:在阴阳对照成立的情况下(阴性对照特异抗原孔 < 0.13 ,阳性对照特异抗原孔 > 0.26):特异抗原孔和正常抗原对照孔 A 值均 < 0.13 ,判为阴性;特异抗原孔和正常抗原对照孔 A 值均 > 0.26 ,判为阳性;特异抗原孔 A 值 > 0.26 ,正常抗原对照孔 A 值 < 0.26 ,用特异抗原孔 A 值减去正常抗原对照孔 A 值的差 ≥ 0.39 时,判为阳性。

1.3.2 敏感性试验:两种试剂盒分别检测国产、进口阳性血清。血清从 1:40 依次倍比稀释到 1:81920,进行检测。按照 2 种试剂盒的判断标准,最大稀释比例的阳性孔为其检测灵敏度^[1,2]。

1.3.3 特异性试验:用 5 种试剂盒分别检测国内和国外其他 4 种阳性血清,同时设阴、阳对照。观察每种试剂盒与其他 4 种病毒有无交叉反应^[2]。

1.3.4 精密性试验:同一批次试剂盒,测同一份阳性血清,同一稀释度同时做 20 孔,计算检测结果的批内变异系数^[1]。

1.3.5 稳定性试验:将同一批次抗原包被板于 4℃ 放置 30、90、180 d,同时检测已知 4 份阴性和 4 份阳性血清,计算试剂盒检测数值结果的变化率(相对偏差),比较试剂盒的时间稳定性^[1,2]。

1.3.6 可信度:分别用国产和进口 LCMV、MHV、SV、MAV、MPV 抗体 ELISA 检测试剂盒,检测已经用商品化 LCMV、MHV、SV、MAV、MPV IFA 抗体检测试剂盒检测过的各自相对应的已知 24 份阴性血清和 12 份阳性血清,验证国产和进口 ELISA 试剂盒的可信度^[1-4]。

1.3.7 统计方法:对实验数据用 SPSS11.5 统计软件进行卡方(χ^2)检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著,均具有统计学意义^[5,6]。

2 结果

2.1 敏感性试验

(1) 国产和进口试剂盒检测国产阳性血清

表 1 敏感性实验检测结果 I

Tab.1 Results of detection sensitivity obtained with the domestic and imported ELISA kits. I.

阳性血清 Positive sera	LCMV	MHV	SV	MAV	MPV
国产试剂盒 Domestic kit	1:640	1:5120	1:40960	1:80	1:640
进口试剂盒 Imported kit	1:80	1:2560	1:20480	1:1280	1:80

从表 1 检测结果看,国产和进口的 MHV 和 SV 试剂盒检测灵敏度均很高,国产试剂盒是进口试剂盒的 2 倍,差异显著 ($P < 0.05$); LCMV 和 MPV 检测灵敏度国产试剂盒均是进口试剂盒的 8 倍,差异极显著 ($P < 0.01$); MAV 检测灵敏度进口试剂盒是国产试剂盒的 16 倍,差异极显著 ($P < 0.01$)。

(2) 国产和进口试剂盒同时检测进口强阳性血清

表 2 敏感性实验检测结果 2

Tab.2 Results of detection sensitivity obtained with the domestic and imported ELISA kits. II.

试剂盒名称 Kits name	LCMV	MHV	SV	MAV	MPV
国产试剂盒 Domestic kit	1:80	1:320	1:320	1:40	1:80
进口试剂盒 Imported kit	1:80	1:640	1:640	1:640	1:80

从表 2 检测结果看, LCMV、MPV 试剂盒检测灵敏度相同,均为 1:80; 国产和进口 MHV 和 SV 试剂盒检测灵敏度均较高,进口试剂盒是国产试剂盒的 2 倍,差异显著 ($P < 0.05$); 进口 MAV 试剂盒检测灵敏度是国产的 16 倍,差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.2 特异性试验

每种试剂盒分别检测国内、国外其他 5 种病毒阳性血清,在阴、阳性对照均成立的情况下,对其他 4 种病毒阳性血清检测,结果均为阴性,说明每种试

剂盒与其他 4 种病毒均无交叉反应。

2.3 精密性试验

国内外五种试剂盒精密性试验结果(批内平均变异系数%)见表 3。

表 3 精密性试验结果(批内变异系数%)

Tab.3 Results of detection precision obtained with the domestic and imported ELISA kits (coefficient variations %)

试剂盒名称 Kits name	LCMV	MHV	SV	MAV	MPV
国产试剂盒 正抗 Tissue antigen	7.0	5.9	7.3	5.7	5.4
Domestic kit 特抗 Viral antigen	7.5	4.5	4.7	3.6	6.4
进口试剂盒 正抗 Tissue antigen	8.8	6.1	8.8	7.7	5.8
Imported kit 特抗 Viral antigen	6.5	5.6	5.7	8.0	7.2

国内外 5 种试剂盒精密性试验检测结果显示均小于 10%。

2.4 稳定性试验

稳定性试验检测结果见表 4。

表 4 稳定性试验结果(相对偏差%)

Tab.4 Results of detection stability obtained with the domestic and imported ELISA kits(Relative deviation, %)

试剂盒名称 Kits name	LCMV	MHV	SV	MAV	MPV
国产试剂盒 正抗 Tissue antigen	13.7	10.9	15.2	8.9	21.2
Domestic kit 特抗 Viral antigen	16.9	12.3	14.6	6.7	19.7
进口试剂盒 正抗 Tissue antigen	15.9	13.4	12.0	13.2	16.1
Imported kit 特抗 Viral antigen	17.9	12.8	15.4	11.9	13.5

稳定性试验结果显示五种国产试剂盒和进口试剂盒,测得的相对应的 8 份血清的 A 值变化率(相对偏差)均小于 25%。

2.5 可信度

每种病毒抗体的 24 份阴性血清,使用国产和进口试剂盒检测符合率均为 100%, LCMV、MHV、SV、MPV 4 种病毒抗体的 12 份阳性血清,使用国产和进口试剂盒检测符合率均为 100%, 仅有国产 MAV 试剂盒检测已知 12 份阳性血清,检测符合率为 86.1% (表 5)。

表 5 ELISA 方法检测已知 LCMV 抗体阴、阳血清结果

Tab.5 Detection results of known negative and positive sera samples with the domestic and imported ELISA kits

试剂盒名称 Kits name	试剂盒来源 Kit source	已知阴性血清 24 份 Negative sera		已知阳性血清 12 份 Positive sera		符合率 Coincidence rate (%)
		-	+	-	+	
LCMV	国产 Domestic	24	0	0	12	100
	进口 Imported	24	0	0	12	100
MHV	国产 Domestic	24	0	0	12	100
	进口 Imported	24	0	0	12	100
SV	国产 Domestic	24	0	0	12	100
	进口 Imported	24	0	0	12	100
MAV	国产 Domestic	24	0	5	7	86.1
	进口 Imported	24	0	0	12	100
MPV	国产 Domestic	24	0	0	12	100
	进口 Imported	24	0	0	12	100

3 讨论

敏感性试验显示, LCMV 和 MPV 国产试剂盒检测国产和进口阳性对照血清灵敏度分别为 1:640 和 1:80, 进口试剂盒检测国产和进口阳性对照血清灵敏度均为 1:80, 说明 LCMV、MPV 国产试剂盒检测敏感性不比进口试剂盒低。MHV、SV 国产与进口试剂盒检测国内阳性血清显示灵敏度均很高(均达到 1:2560 以上), 且国产试剂盒高于进口试剂盒 2 倍; 国产与进口试剂盒检测进口阳性血清显示灵敏度均较高(均达到 1:320 以上), 且进口试剂盒高于国产试剂盒 2 倍, 说明国产 MHV、SV 试剂盒检测敏感性与进口 MHV、SV 试剂盒检测敏感性均较好, 同时也说明了国产和进口试剂盒抗体检测水平相当^[4,7]。

国产 MAV 试剂盒检测国产和进口试剂盒阳性血清, 灵敏度均很低, 分别为 1:80 和 1:40, 且检测国产阳性对照血清 A 值最高只有 0.461, 检测进口阳性对照血清, A 值最高只有 0.304。而用进口试剂盒检测国产和进口试剂盒的阳性对照血清灵敏度均达到 1:1280, 且检测的 A 值均很高, 进口试剂盒检测国内 MAV 阳性对照血清 A 值最高达到 1.153, 进口试剂盒检测进口阳性对照血清最高达到 0.972。这说明我们的试剂盒抗原包被抗原性很低, 导致抗原抗体结合反应能力降低, 使试剂盒检测敏感性下降, 即抗体检测水平下降^[4,7]。同时通过此次试剂盒比对实验也使我们找到了近 2 年来检测过程中发现 MAV 阳性对照血清 A 值下降的原因。国产试剂盒用的检测抗原是经过蔗糖梯度纯化的全病毒抗原, 而病毒是用细胞来进行传代培养, 也就是我们在传代培养 MAV 过程中, 可能是由于细胞毒性导致了培养细胞病变, 误认为是病毒导致细胞病变, 而且一代一代传下去, 而导致病毒抗原性下降。本实验室通过分子生物学检测也证实了这一点。用 PCR 方法对本室传代的 MAV 进行检测时, 检测结果为阴性, 而用同一 PCR 方法检测从美国 ATCC 新购的 MAV(编号 VR-550)传代培养的 P3 代细胞毒, 检测结果为阳性。

但 MAV 试剂盒的阳性对照血清抗体效价很高, 可能与检测用抗原(批号:080624)和免疫用抗原(批号:030322)不是同一批号有关, 且通过此实

验证明国产 MAV 试剂盒阳性对照血清抗体效价还很高, 说明当时用于制备抗血清用的免疫用抗原(批号:080624)的抗原性还没有下降, 而用于检测用包被抗原(批号:080624)抗原性已经下降。

在试剂盒显色剂使用方面, 进口试剂盒使用 ABTS(2,2'-连氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)), 国产试剂盒使用 OPD 作为 ELISA 显色剂, 虽然敏感、特异, 但由于 OPD(邻苯二胺)具有挥发和致突变效应, 所以国内试剂盒显色剂需要进行改进。

通过此次比对实验不但使我们找到了国产 MAV 试剂盒检测敏感性下降的原因, 也提示我们, 实验室原有的病毒传代培养方式, 可能有的病毒不能适应, 所以为了保证和提高检测试剂的质量, 有些病毒的传代培养方式需要更新或改变。同时也说明除 MAV 试剂盒外, 与进口试剂盒比, 国产 LCMV、MHV、SV、MPV 试剂盒在敏感性、特异性、精密性、稳定性及可信度方面均较好, 而且通过在 2010 和 2011 年“实验动物质量检测机构比对实验”中, 用国产小鼠肝炎(MHV)、小鼠仙台(SV)ELISA 抗体检测试剂盒的进行不同人员及不同实验室的比对实验, 也证明了国产小鼠肝炎(MHV)、小鼠仙台(SV)ELISA 抗体检测试剂盒的质量可靠, 稳定性、重复性、准确性均较好。

参考文献:

- [1] 王吉, 卫礼, 巩薇, 等. 乙型脑炎病毒(JEV)ELISA 检测方法的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(8):56-59.
- [2] 杨艳艳, 张改平, 邓瑞广, 等. 氯霉素残留检测阻断 ELISA 试剂盒的研制及性能测定[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(2):130-134.
- [3] 刘启文, 李震, 赵凯, 等. 猪戊型肝炎 ELISA 诊断试剂盒的研制及应用[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(11):1435-1441.
- [4] 钟苑辉, 贺东升, 胡静, 等. 不同试剂盒检测口蹄疫抗体水平的比较[J]. 畜牧与兽医, 2012, 42(11):110-111.
- [5] 孔令勇, 彭会建, 何根山, 等. 三种 ELISA 法检测猪尿中莱克多巴胺的比较分析[J]. 养殖与饲料, 2007, (6):17-18.
- [6] 陈伟杰, 周彩琴, 黄怡君, 等. 检测猪为狂犬病抗体的 3 种 ELISA 试剂盒的比较分析[J]. 猪群保健, 2008, (8):96-98.
- [7] 张焕荣, 杨发龙. 两种免疫酶试剂盒检测猪抗 E 型肝炎病毒 IgG 的比较[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(8):30-33.

[修回日期]2012-10-15