

不同小鼠肝炎病毒对 ELISA 方法检测其血清抗体的影响*

吴朋朋 白 冰 张彩勤 赵 勇 苗海港 师长宏

(空军军医大学实验动物中心,西安 710032)

摘要:目的 建立小鼠肝炎病毒(Mouse Hepatitis Virus,MHV)血清抗体 ELISA 检测方法,用于本地区 MHV 的日常监测,以便对 SPF 小鼠感染状况及时作出判断。方法 选取 3 种 MHV 毒株 MHV1、MHV-JHM 和 MHV-A59,通过 L929 细胞扩增培养获得纯化浓缩抗原并筛选适合包被抗原类型;免疫 BALB/C 小鼠,获得高效价免疫阳性血清;优化 ELISA 反应体系建立规范化的 ELISA 试剂盒并用于临床小鼠血清样品的检测。结果 筛选出适合本地区的 MHV 包被抗原类型为 MHV1,建立了病毒扩增及浓缩纯化方法,制备的 MHV 抗血清达到同批次大量高滴度的水平,可作为标准化质控血清。包被抗原、待检血清和酶结合物最佳工作浓度分别为 $4.0 \mu\text{g/mL}$ ($10^{-7.73}/0.1 \text{ mL TCID}_{50}$)、1:40 和 1:4 000 稀释;批次内和批次间平均变异系数分别为 5.13% 和 5.57%;检测灵敏度为 1:4 000 稀释;与小鼠仙台病毒(SV)、小鼠肺炎病毒(PVM)、呼肠孤病毒 III 型(Reo3)、小鼠细小病毒(MVM)和鼠痘病毒(Ect)阳性血清均无交叉反应。稳定性试验相对偏差小于 10%。对 165 份血清样品进行检测,阳性血清相符率 97.37% (37/38),阴性血清相符率 92.19% (118/127)。结论 本研究建立的 ELISA 方法检测小鼠血清 MHV 抗体具有较高的特异性、敏感性和结果可重复性,可以用于本地区 MHV 日常病原学监测,以便对小鼠感染状况作出准确判断。

关键词:小鼠肝炎病毒;血清学;酶联免疫吸附实验(ELISA)

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)06-0015-08

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.06.004

小鼠肝炎病毒(Mouse Hepatitis Virus,MHV)是国家标准(GB14922.2—2011)中规定的实验用鼠病毒学重要检测项目。MHV 具有高度传染性,但在鼠群中通常以潜伏性感染存在,并可通过胎盘垂直传播。当感染小鼠群免疫功能下降时,即可能引起整个鼠群爆发性的急性感染,导致动物大量死亡,严重影响实验动物的生产和动物实验的结果^[1]。除此之外,小鼠肝炎病毒感染后会引发小鼠各种免疫应答参数的改变,干扰试验结果,影响研究结果的准确性和可靠性^[2-3]。

国家标准(GB14922.2—2011)规定实验用小鼠每 3 个月至少进行一次微生物检测,故 MHV 血清抗体的检测是实验用小鼠质量控制的重要举措^[4-5]。然而,现今已分离到的 MHV 病毒株有 MHV1、MHV2、MHV3、JHM、A59、MHV-S、MHV-Z、MHV-U 等^[6],不同的 MHV 毒株因其嗜组织性不同

具有不同的致病性,如 JHM 为嗜神经毒性,MHV3 为嗜肝性,A59 同时具有嗜神经毒性和嗜肝性两种特性^[7-8]。由于 MHV 有多个毒株,在研制 ELISA 抗体检测试剂盒时,选用哪些毒株作为检测用的抗原,将直接影响到血清抗体检测结果的特异性和敏感性。各国及各地区 MHV 流行情况不一样,所选用的毒株也各不相同^[9]。国家标准(GB/T14926.22—2001)规定了 MHV1、MHV3、JHM 和 A59 4 种病毒作为 MHV 抗体检测的抗原^[10]。

本实验室每季度都会对本地区饲养的实验小鼠进行病毒检测,采用的方法是 ELISA 监测(GB/T14926.50—2001)、免疫荧光复检(GB/T14926.52—2001)和核酸测序确诊^[11]。其中 MHV 抗体水平检测采用的是国内生产的 ELISA 检测试剂盒。使用中发现 ELISA 抗体检测结果和 IFA 抗体检测结果存在一定差异,具体表现在:当血清抗体

收稿日期:2019-04-25

* 基金项目:陕西省科技资源开放共享平台项目(No. 2016FWPT-02);军队实验动物微生物检测体系的优化(No. SYDW[2018]08 号)

作者简介:吴朋朋(1987—),硕士研究生,研究方向:医学实验动物疾病研究。E-mail:wp217@163.com

白 冰(1980—),硕士研究生,研究方向:实验动物质量检测。E-mail:316691703@qq.com

通信作者:师长宏(1973—),教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:changhong@fmmu.edu.cn

水平处于判定临界值左右时(0.15~0.22),ELISA 抗体检测阴性结果在 IFA 复检时存在 29.7% 的阳性结果(11/37),病毒核酸测序结果也提示本地区的 MHV 流行毒株与 ELISA 抗原包被的 MHV 病毒株有所不同。为了获得适合本地区 MHV 抗体检测的 ELISA 方法,本研究选取了 3 种 MHV 毒株 MHV1、JHM 和 A59,通过 L929 细胞扩增培养获得纯化浓缩抗原,筛选获得了适合本地区的包被抗原类型,优化了 ELISA 反应体系,建立了规范化的 MHV 血清抗体检测方法。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞及实验动物等实验材料来源

小鼠肝炎病毒 MHV1(ATCC VR-261)、MHV-JHM(ATCC VR-765)、MHV-A59(ATCC VR-764)购于美国模式培养物集存库(ATCC);细胞 L929 购于国家实验细胞资源共享平台;DMEM 细胞培养基及其他添加剂均为 Hyclone 公司产品;小鼠肝炎病毒(MHV)、小鼠仙台病毒(SV)、小鼠肺炎病毒(PVM)、呼肠孤病毒 III 型(Reo3)、小鼠细小病毒(MVM)和鼠痘病毒(Ect)阳性血清购于中国食品药品检定研究院;HRP-羊抗鼠 IgG 酶标抗体购买于 Abcam 公司;酶标仪购于 Bio-rad 公司;超速离心机购于 Beckman 公司;商品化 MHV 抗体 ELISA 诊断试剂盒购买于国内某公司;165 份小鼠血清由本实验室保存。

SPF 级 BALB/C 小鼠 30 只,6~8 周龄,体质量 25~27 g,购于北京维通达生物技术有限公司[SCXK(京)2014-001],隔离饲养于空军军医大学实验动物中心 SPF 级动物设施[SYXK(陕)2014-001],动物实验通过了空军军医大学实验动物福利及伦理委员会批准(编号 17034)。

1.2 病毒的扩增及纯化

将购买的 3 株小鼠肝炎病毒 MHV-A59、MHV1 和 MHV-JHM 冰上融化后分别用无血清 DMEM 培养基稀释(0.1:5、1:10、1:20、1:40)后接种到培养成单层的 L929 细胞中,同时以无血清 DMEM 培养基作为阴性对照孔,在 37℃、5%的 CO₂ 培养箱中孵育 3 h(每 30 min 摇晃一下细胞),孵育结束后弃掉病毒孵育液补加适量的完全细胞培养液(含 10%胎牛血清)继续于 37℃、5%的 CO₂ 培养箱中,培养至出现明显的细胞病变。

将出现病变的细胞培养物反复冻融 5 次,每组取少量病毒冻融液用于病毒滴度测定,其余冻融液经 56℃ 30 min 灭活处理后,5 000 r/min 离心 30 min,除去细胞碎片,收集上清病毒液再 4℃ 超速离心(25 000 r/min,82 700 g)3 h 以浓缩病毒,将浓缩后的病毒液作为抗原用于后期的 ELISA 检测板包被^[12]。

1.3 病毒滴度(TCID₅₀)测定

将扩增后的病毒液 10 倍梯度稀释(10^{-1} ~ 10^{-8} 共 8 个梯度)后接种到 L929 细胞中,每个梯度 8 个重复,72 h 后观察细胞病变情况,按照 Reed-Muench 法计算病毒滴度^[13]。

1.4 血清的制备

阳性对照血清制备:取灭活的 3 种 MHV 病毒等体积混合液接种 6~8 周龄 SPF 级 BALB/C 小鼠 30 只,免疫程序参考侯丽波等^[14]方法,接种方法如下:第 1 天完全佐剂+病毒液(50 μg)每只小鼠肌肉注射 0.1 mL,腹腔注射 0.2 mL;第 14 天不完全佐剂+病毒液(50 μg)每只小鼠肌肉注射 0.1 mL,腹腔注射 0.2 mL;第 21 天不完全佐剂+病毒液(50 μg)每只小鼠肌肉注射 0.1 mL,腹腔注射 0.2 mL;第 28 天不完全佐剂+病毒液(50 μg)每只小鼠肌肉注射 0.1 mL,腹腔注射 0.2 mL。分别于免疫后第 1、3、5、7、14、21、28、35、42 天采血测定 MHV 抗体,确定最佳采血时间。抗体 ΔA 值介于 1.0~1.5 之间的稀释血清均可作为后续 ELISA 检测的阳性对照血清。

阴性对照血清制备:收集排除 MHV 感染的 SPF 级 BALB/C 小鼠血清,经 MHV 抗体检测抗体 ΔA 值小于 0.2 的稀释血清均可作为后续 ELISA 检测的阴性对照血清。

165 份待检血清制备:采取待检小鼠的血液 500 μL 以上,室温静置后离心分离血清,储藏在 -80℃ 冰箱中备用。

1.5 ELISA 反应体系的优化

用不同稀释倍数的病毒浓缩液包被 ELISA 酶标板,测定梯度稀释的免疫血清和标准对照血清的 A 值,挑选出最为合适的病毒包被浓度、封闭液浓度以及血清稀释倍数,并比较在不同的反应条件下免疫血清检测结果的差异,确定适合本实验室的最佳反应条件。

1.6 血清样品的检测及判定标准的确定

按照优化的最佳 ELISA 反应条件与步骤,随机选取 50 份已知抗体浓度的免疫血清,用本研究制备

的诊断试剂盒进行抗体浓度的测定,取波长492 nm和 405 nm,读取各孔 A 值,结果以 A_{492} 减 A_{405} (ΔA) 表示。

结果判定:阳性对照 ΔA 值 ≥ 0.2 , 阴性对照 ΔA 值 < 0.2 , 同时满足以上两个条件实验成立;否则不成立。

以已知阳性临界血清测量值为参考,计算出阴性血清样品平均 ΔA 值和标准差 SD,且每份阴性样品 ΔA 值是通过 3 次 ELISA 测定求的平均值,进而计算出阳性判定临界值 (cut-off value):临界值 = 阴性样品的平均 ΔA 值 + 3SD。

1.7 检测体系的质量控制

特异性试验:按照优化好的最适 ELISA 反应条件与步骤,用本试剂盒分别检测 MHV、SV、PVM、Reo3、MVM 和 Ect 阳性血清,每个样品重复检测 3 次,同时做阴性和阳性对照孔,分别计算每份血清的 ΔA 均值,从而确定本试剂盒的特异性。

重复性试验:用本试剂盒在相同的试验条件下,将 5 份 ELISA 阳性样品,2 份 ELISA 阴性样品,每个样品重复检测 3 次,分别计算每份血清的 ΔA 均值 (average value, AV)、标准差 (standard deviation, SD)、变异系数 (the coefficient of variation, CV)。同时用不同批次包被的酶标板进行批次间重复性检验。

稳定性试验:为评价所建立的 ELISA 检测方法的稳定性,将包被好的 ELISA 酶标板分别置于 37℃、25℃、4℃ 环境,每天取出 1 块,连续测定 7 d,观察阳性血清样品和阴性血清样品的 ΔA 值的变化。

灵敏度试验:将 MHV 阳性血清做倍比稀释,检测本研究制备的试剂盒所能检测出的最低抗体滴度。

1.8 性能评价与初步应用

用本研究制备的 ELISA 诊断试剂盒与商品化 MHV ELISA 试剂盒平行检测 165 份小鼠血清样品,评价本研究制备的试剂盒与商品化试剂盒的检测结果符合率。

1.9 统计方法

所有计量数据以平均数表示,应用 SPSS19.0 统计学软件对各项指标数据进行统计学分析,应用配对 t 检验对组间进行分析比较,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 病毒的扩增及病毒滴度的测定

L929 细胞感染 MHV-JHM 病毒株 36 h 即可观察到细胞病变,48~60 h 病变最为明显,72 h 后细胞逐渐崩解;MHV-A59 和 MHV1 毒株则于感染 48 h 以后出现细胞病变,病变明显时间段为 60~72 h,随后细胞逐渐崩解(图 1),分别在感染 96 h 后收取 3 种病毒的细胞培养物进行病毒滴度测定(图 2),发现 3 种病毒的最佳接种浓度(病毒稀释倍数)均不相同,MHV1 (1:5 稀释)、MHV-A59 (1:10 稀释)、MHV-JHM (1:20 稀释)。病毒培养物经 56℃ 30 min 灭活处理后,5 000 r/min 离心 30 min 除去细胞碎片,收集上清病毒液再经 4℃ 超速离心 (25 000 r/min, 82 700 g) 3 h 浓缩病毒,将浓缩后的病毒液作为抗原用于后期的酶标板包被。

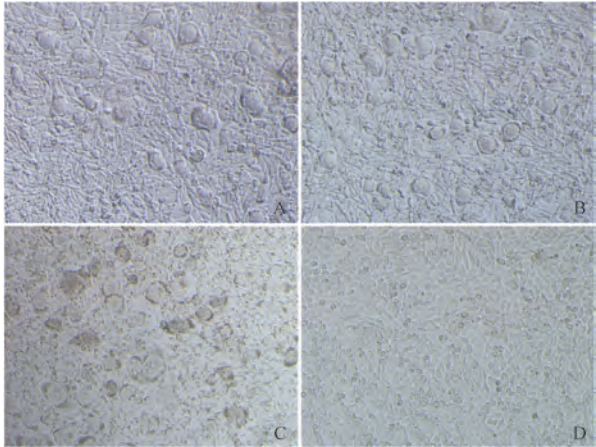


图 1 不同 MHV 感染 L929 细胞出现的细胞病变 (72 h, $\times 10$)

注: A: MHV-A59; B: MHV1; C: MHV-JHM; D: L929 细胞

Fig.1 The cytopathic effect inoculated with L929 in 72 hour

Note: A: MHV-A59; B: MHV1; C: MHV-JHM; D: L929

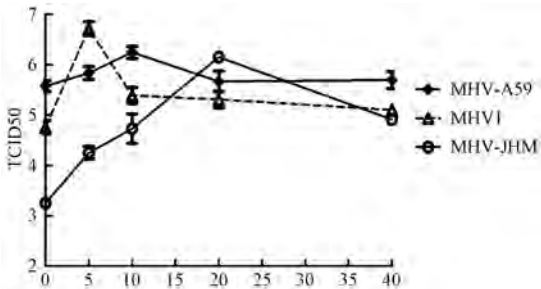


图 2 不同稀释倍数 MHV 感染 L929 细胞 96 h 病毒滴度

Fig.2 L929 cells were infected with different dilutions of MHV at 96 h

2.2 阳性标准血清的制备

如图3所示,BALB/C小鼠感染MHV后,第3天即可检测到抗体水平,5~7 d抗体水平开始快速升高,21 d左右抗体水平的 ΔA 值达到1.0以上,在35 d达到最高峰并维持一段时间,因此可于免疫后35 d采取全部小鼠血清,MHV抗体滴度(ΔA)介于1.0~1.5之间的稀释血清均可作为后续ELISA检测的阳性对照血清。

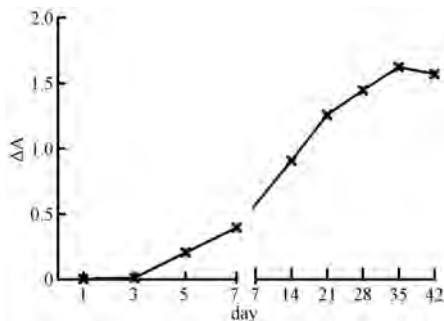


图3 MHV免疫BALB/C小鼠血清MHV抗体变化

Fig.3 The antibody variation of SPF mice (BALB/C) inoculated with MHV

2.3 ELISA反应体系的优化

2.3.1 病毒类型及包被浓度:分别用灭活的3种小鼠肝炎病毒MHV-A59、MHV1和MHV-JHM病毒包被ELISA酶标板孔,测定已知浓度的免疫阳性血清和标准血清的 ΔA 值,每组3个重复,以 ΔA 值最大为最优的包被病毒,结果如图4所示,MHV1包被的ELISA酶标板测定的血清浓度更为接近商品化试剂盒,与A59和JHM包被的ELISA酶标板测定的血清浓度差异显著($P < 0.05$)。

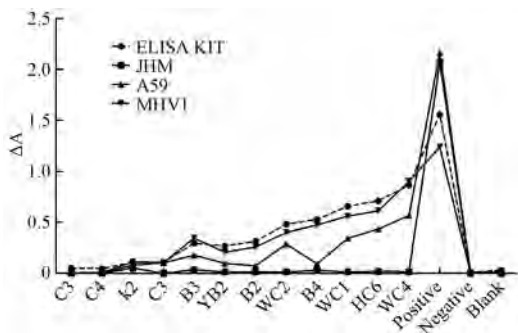


图4 不同MHV测定小鼠血清MHV抗体

注: C1-C6: C57BL/6J小鼠血清; B1-B4: BALB/C小鼠血清;

K2: 昆明小鼠血清; Positive: MHV阳性血清; Negative:

MHV阴性血清; BLANK: 空白对照

Fig.4 The MHV antibody of mice test with different MHV

Note: C1-C6: C57BL/6J; B1-B4: BALB/C; K2: Kunming; Positive:

MHV antibody positive serum sample; Negative: MHV antibody negative

serum sample; BLANK: MHV antigen-free control

MHV1病毒浓缩液用包被缓冲液稀释为不同浓度(0.1:5、1:10、1:20、1:40)包被ELISA酶标板孔,测定已知浓度的免疫阳性血清和标准血清的 ΔA 值,每组3个重复,以 ΔA 值最大为最优的病毒包被浓度。结果显示,1:10倍稀释的MHV1包被的ELISA酶标板测定的血清浓度更为接近商品化试剂盒,与其他稀释倍数组(0.1:5、1:20、1:40)包被的ELISA酶标板测定的血清浓度差异显著($P < 0.05$)。故本实验采用1:10倍的病毒稀释浓度为最优的病毒包被浓度(即病毒包被浓度为 $10^{-7.73}/0.1$ mL TCID₅₀,抗原蛋白浓度为4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

2.3.2 待检血清工作浓度的优化:将待检血清做0.1:10、1:20、1:40、1:80、1:160稀释,同时设3个阴性和阳性对照(不稀释),每组3个重复,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,孵育时间均为60 min,测定不同稀释浓度的待检血清的 ΔA 值,以 ΔA 值最大为待检血清工作浓度。结果显示,1:40倍稀释血清的浓度更为接近商品化试剂盒,与其它血清稀释组(0.1:10、1:20、1:80、1:160)测定的结果差异显著($P < 0.05$),故本实验采用1:40稀释的待检血清浓度为最优待检血清浓度。

2.3.3 HRP-羊抗鼠酶标抗体工作浓度的优化:将HRP-羊抗鼠酶标抗体1:100、1:200、1:500、1:1000、1:2000、1:4000稀释,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,每组3个重复,测定待检血清的 ΔA 值,以 ΔA 值最大为酶标抗体工作浓度,孵育时间均为1 h。结果显示,随着HRP-羊抗鼠酶标抗体浓度降低,各组抗体滴度呈缓慢下降的趋势,1:4000稀释的酶标抗体测定的血清浓度更为接近商品化试剂盒,故本实验采用1:4000酶标抗体稀释浓度为最优酶标抗体浓度。

2.3.4 显色时间的优化:每孔加100 μL 配好的OPD显色液[0.2 mol/L Na_2HPO_4 2.57 mL, 0.1 mol/L柠檬酸 2.43 mL,蒸馏水 5 mL,邻苯二胺(OPD) 4 mg, 3% H_2O_2 150 μL], 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色时间分别设为10 min、20 min、40 min、60 min和90 min,每组设3个重复,显色结束后加入50 μL 终止液(0.5 mol/L H_2SO_4)终止反应;取波长492 nm和405 nm,读取各孔A值,结果以 A_{492} 减 A_{405} (ΔA)表示,以 ΔA 值最大为最佳显色时间。结果显示,显色10 min内,血清抗体呈现显著升高的趋势,随后抗体增长平缓,各显色时间组之间无显著差异($P > 0.05$),因此本实验采用的最优显色时间为10 min。

综上所述,适合本实验室的最佳ELISA反应条

件及步骤如下:

浓缩后的病毒液用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 稀释至抗原蛋白浓度为 4.0 μg/mL, 每孔加 100 μL, 4 ℃ 包被过夜, 同时做只加包被液的孔作为空白对照; 弃去病毒液, 每孔加入 250 μL 封闭液 (pH 9.6, 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液含 2.0% BSA), 4 ℃ 孵育过夜; 将待检血清做 1:40 倍稀释, 每孔 100 μL, 振荡混匀, 37 ℃ 孵育 1 h; PBST (pH 7.4) 重复洗涤 5 次后甩干液体; 每孔加入 100 μL HRP 标记的羊抗鼠酶标抗体 (1:4 000 稀释), 37 ℃ 孵育 1 h; 弃去孔内液体, 重复上述洗涤步骤; 每孔加 100 μL OPD 显色液显色 10 min, 加入 50 μL 终止液; 取波长 492 nm 和 405 nm, 读取各孔 A 值, 结果以 A_{492} 减 A_{405} (ΔA) 表示。

2.4 血清样品的检测及判定标准的确定

使用本研究制备的诊断试剂, 按照优化好的 ELISA 反应条件与步骤, 随机选取本实验室保存的小鼠血清 165 份, 用于进行抗体浓度的测定, 同时用商品化试剂盒测定的血清抗体浓度作为对照。阳性对照 ΔA 值 ≥ 0.2 , 阴性对照 ΔA 值 < 0.2 , 同时满足以上两个条件则实验成立; 否则不成立。以已知阳性临界血清测量值为参考, 计算出阴性血清样品平均 ΔA 值和标准差 SD, 且每份阴性样品 ΔA 值是通过三次 ELISA 测定求的平均值, 进而计算出阳性判定临界值 (cut-off value): 临界值 = 阴性样品的平均 ΔA 值 + 3SD。结果如表 1 所示。

表 1 小鼠 MHV 血清抗体检测

Table 1 MHV antibody of mouse serum			
项目	阴性样品	阳性样品	总样品
Table	Negative	Positive	Total
试剂盒测定	样品数	127	38
	平均 ΔA	0.07	0.38
	标准差 (SD)	0.05	0.19
本方法测定	判定标准	≤ 0.17	> 0.22
	样品数	118	37
	相符率	92.91%	97.37%

注: 本方法判定标准: 阳性: 待检血清 $\Delta A > 0.22$ (阴性 $\Delta A + 3SD$), 阴性: 待检血清 $\Delta A \leq 0.17$ (阴性 $\Delta A + 2SD$), 可疑: 待检血清 $0.17 < \Delta A \leq 0.22$, 重复检测还是可疑即视为阳性

Note: Criterion: Positive: mouse serum $\Delta A > 0.22$ (Negative $\Delta A + 3SD$), Negative: mouse serum $\Delta A \leq 0.17$ (Negative $\Delta A + 2SD$), Disputability: mouse serum $0.17 < \Delta A \leq 0.22$, Repeated tests are suspicious considered positive

2.5 检测体系的质量控制

使用本研究制备的诊断试剂, 按照优化好的 ELISA 反应条件与步骤, 分别检测 MHV、SV、PVM、Reo3、MVM 和 Ect 阳性血清, 每个样品重复检测 3

次, 同时做阴性和阳性对照孔, 分别计算每份血清的 ΔA 均值, 从而确定本试剂盒的特异性。结果如表 2 所示, 只有 MHV 阳性血清的 ΔA 值远大于 0.22 判定为阳性, ECT 和 SV 阳性血清 ΔA 值虽处于可疑值范围之内, 考虑的阴性血清 ΔA 值较高 (> 0.1), 可视为血清非特异性结合, PVM、Reo3、MVM 阳性血清 ΔA 值均低于 0.17, 判定为阴性, 表明该方法具有良好的特异性。

表 2 特异性检测
Table 2 Specific tests

样品 Sample	ECT	MHV	SV	PVM	Reo3	MVM
Positive	0.173	1.258	0.194	0.092	0.116	0.054
	0.178	1.128	0.198	0.061	0.121	0.052
	0.175	1.055	0.175	0.089	0.115	0.060
Negative	0.106	0.175	0.134	0.045	0.125	0.045
Blank	0.076	0.051	0.063	0.044	0.043	0.053

重复性试验: 用本试剂盒将 5 份 MHV 阳性样品, 2 份 MHV 阴性样品, 每个样品重复检测 3 次, 分别计算每份血清的 ΔA 均值 (average value, AV)、标准差 (standard deviation, SD)、变异系数 (the coefficient of variation, CV)。结果如表 3 所示, 各组血清的重复性均良好 (CV 值 $< 10\%$)。

同时用不同批次包被的酶标板进行批次间重复性检验, 结果如表 4 所示, 阴性血清变异系数偏大 (10%), 但也在酶标仪测定误差范围之内, 其余各组血清的重复性均良好 (CV 值 $< 10\%$)。

表 3 批次内重复性检测

Table 3 Batch of repeatability tests						
样品 Sample	组内 1 Rep 1	组内 2 Rep 2	组内 3 Rep 3	均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV
B3	0.542	0.577	0.551	0.557	0.018	3%
JB1	0.652	0.676	0.686	0.671	0.017	3%
JB5	0.505	0.565	0.549	0.540	0.031	6%
JK4	0.247	0.266	0.235	0.249	0.016	6%
C3	0.149	0.164	0.149	0.154	0.009	6%
Positive	2.051	2.356	2.249	2.219	0.155	7%
Negative	0.048	0.058	0.054	0.053	0.005	9%
Blank	0.051	0.051	0.052	0.051	0.001	1%

表 4 批次间重复性检测

Table 4 Batch to batch repeatability tests						
样品 Sample	组间 1 Run 1	组间 2 Run 2	组间 3 Run 3	均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV
B3	0.504	0.516	0.545	0.522	0.021	4%
JB1	0.656	0.617	0.694	0.656	0.039	6%
JB5	0.523	0.566	0.568	0.552	0.025	5%
JK4	0.276	0.256	0.305	0.279	0.025	9%
C3	0.182	0.195	0.175	0.184	0.010	6%
Positive	2.133	2.154	2.149	2.145	0.011	1%
Negative	0.076	0.065	0.078	0.073	0.007	10%
Blank	0.057	0.063	0.059	0.060	0.003	5%

稳定性试验:为评价所建立的 ELISA 检测方法的稳定性,将包被好的 ELISA 酶标板分别置于 37 ℃、25 ℃、4℃ 环境,每天取出 1 块,连续测定 7 d,观察其在 405 nm 和 492 nm 波长处其 ΔA 值的变化。结果如表 5 所示,孵育环境(37 ℃)和室温环境(25 ℃),无论是样品血清(B3)还是阴阳性对照血

清,随着时间的延长(7 d),MHV 血清抗体水平呈缓慢下降的趋势且批次间 ΔA 值变异系数偏大(>10%),不适合试剂盒的长期储存;冷藏环境下(4 ℃),MHV 血清抗体水平各批次间 ΔA 值变异系数最小(<10%),适合于长期储存。

表 5 稳定性检测
Table 5 stability tests

样品 Sample	温度/℃ Temperature	时间/d							均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV
		1	2	3	4	5	6	7			
B3	37	0.513	0.506	0.461	0.467	0.407	0.345	0.313	0.430	0.078	18%
	25	0.551	0.552	0.549	0.483	0.457	0.445	0.434	0.496	0.053	11%
	4	0.561	0.563	0.559	0.559	0.561	0.547	0.555	0.558	0.005	1%
Positive	37	2.05	2.055	1.948	1.855	1.852	1.746	1.723	1.890	0.134	7%
	25	2.055	2.044	2.058	2.043	1.955	1.943	1.924	2.003	0.059	3%
	4	2.054	2.052	2.07	2.045	2.056	2.042	2.102	2.060	0.021	1%
Negative	37	0.072	0.063	0.064	0.059	0.058	0.047	0.041	0.058	0.011	18%
	25	0.056	0.054	0.056	0.046	0.045	0.042	0.043	0.049	0.006	13%
	4	0.032	0.040	0.038	0.041	0.041	0.041	0.036	0.038	0.003	9%

灵敏度试验:将 MHV 阳性血清做倍比稀释,检测本研究制备的试剂盒所能检测出的最低检出量。结果如表 6 所示,阳性对照(2.113)在稀释倍数大于 1:4 000 时 ΔA 值小于 0.22,临床阳性血清 B3

(0.603)则在稀释倍数大于 1:1 000 时 ΔA 值小于 0.22,具有一定的灵敏性,这与临床血清本身 MHV 抗体水平偏低有关。

表 6 灵敏性检测
Table 6 Sensitivity tests

稀释倍数 Dilution	40	100	1000	2000	4000	8000	16000	32000
B3	0.603	0.448	0.232	0.118	0.079	0.056	0.049	0.043
Positive	2.113	1.806	1.361	0.867	0.307	0.145	0.098	0.061
Negative	0.051	0.052	0.049	0.083	0.057	0.045	0.039	0.041
Blank	0.061	0.063	0.059	0.059	0.061	0.047	0.052	0.047

2.6 性能评价与初步应用

用本研究制备的 ELISA 诊断试剂盒与商品化 MHV ELISA 试剂盒平行检测 165 份小鼠血清样品,评价本研究制备的试剂盒与商品化试剂盒的符合率。阴阳性判定结果如表 1 所示,阴性样品符合率为 92.91%(118/127),阳性样品符合率为 97.37%(37/38)不符合样品为 10 份,主要分布在邻近商品化试剂盒判定标准附近的血清(0.15~0.22),需进一步复检,两次结果均为可疑则可判定为阳性。

3 讨论

由于 MHV 有多个毒株亚型,且不同地区之间

MHV 流行情况不一样,所选用的毒株也各不相同。在研制试剂盒时,选用哪些毒株作为检测用的抗原将直接影响到检测结果的特异性和敏感性,需要根据不同组织型的 MHV 选择不同的包被抗原进行检测^[15]。在实际应用中通常需要用不同的诊断试剂对同一份样品反复进行验证,才能确定其准确结果。或者采用同时包被多种抗原类型来达到一次操作能够检测多种病毒的目的,但由于不同抗原之间的干扰及各地区实际感染现状的差异,结果准确性较单一抗原有所降低,容易造成误判,使整个实验动物群体存在隐形感染 MHV 的风险^[16-17]。为此,在全面对本地区实验小鼠进行流行病学性调查的基础上,我们从美国 ATCC 购买了我国主要流行的 3 株小鼠

肝炎病毒 MHV1 (ATCC VR-261)、MHV-JHM (ATCC VR-765)、MHV-A59 (ATCC VR-764) 作为不同的 ELISA 包被抗原,用于本地小鼠 MHV 阳性临床血清抗体的检测。

在用 L929 细胞进行病毒扩增培养时我们发现, L929 细胞感染 MHV-JHM 病毒株 36 h 即可观察到细胞病变, 48~60 h 病变最为明显, 72 h 后细胞逐渐崩解; MHV-A59 和 MHV1 毒株则于感染 48 h 以后出现细胞病变, 病变明显时间段为 60~72 h, 随后细胞逐渐崩解 (见图 1), 分别在感染 96 h 后收取 3 种病毒的细胞培养物进行病毒滴度测定 (图 2), 发现 3 种病毒的最佳接种浓度 (病毒稀释倍数) 均不相同, MHV1 (1:5 稀释)、MHV-A59 (1:10 稀释)、MHV-JHM (1:20 稀释), 这说明病毒的扩增有一定的浓度要求。选取最佳接种剂量的小鼠肝炎病毒可以在感染细胞 2~3 d 的时间内出现病毒的快速增长, 病毒的培养较为稳定, 在接种后 72 h 收获病毒, 符合试剂盒病毒生产的需要。

研究表明 MHV-A59 与其它毒株之间有交叉反应, 是一个有广泛反应性的抗原, 曾作为 ELISA 检测的包被抗原, 我国 MHV 抗体酶标检测试剂盒主要使用三价抗原, 结合模式一般为经典毒株与新分离毒株相结合的组合, 检出率也明显高于单抗原, 阳性率的差别主要表现在对弱阳性样品或不确定样品的阳性检出率上^[18-21]。本研究用不同 MHV 病毒株抗原包被, 检测本地小鼠 MHV 阳性临床血清抗体, 结果发现相比于商品化试剂盒测定的血清抗体浓度, MHV1 抗原包被的 ELISA 酶标板测定的血清阳性检出率更为接近商品化试剂盒, 与 A59 和 JHM 包被的 ELISA 酶标板测定的结果差异显著 ($P < 0.05$), MHV-A59 检测结果只有参考值的一半, MHV-JHM 无论阴阳性血清均无明显反应, 这说明本地小鼠 MHV 阳性临床血清主要是 MHV1 和 MHV-A59 感染引起, 这与前期的病毒核酸测序鉴定结果相符。另一方面, 该商品化试剂盒的参考阳性血清检测结果 MHV-A59 和 MHV-JHM 抗体水平最高, 反而 MHV1 的检测结果最低, 这说明该试剂盒抗原包被时虽然都含有以上 3 种病毒类型, 但以 MHV-A59 和 MHV-JHM 病毒为主, MHV1 次之, 这与本地区流行的病毒株有很大的出入, 也可能是该试剂盒在使用过程中 ELISA 抗体检测结果和 IFA 抗体检测结果有着一定的差异的原因之一。

随后, 本研究选取了 MHV1 作为适合本地区的

包被抗原类型并优化 ELISA 反应体系, 以期获得一种稳定、精密、检测准确的 MHV 血清抗体 ELISA 诊断方法, 可以用于 MHV 的日常病原学监测。通过对大量临床小鼠血清样本 (165) 的测试, 小鼠的 MHV 阴性血清检测数据多控制在 0.07 左右, 而不同实验条件对此标准会有一定影响, 例如显色时间和显色液类型, 因此我们采取阴性参比血清的检测结果加 2SD (阴性 $\Delta A + 2SD$, 0.17) 作为阴性判定标准。以此标准对大量样品做多次检测, 检测的准确性达到 92.91% (118/127), 因此在检测过程中低于此标准的样品可做阴性判定。而高于此标准的血清样品, 仍有少量不能用 IFA 和 Western blot 等方法做阳性判定, 因此在本试剂盒中增设了阳性临界浓度血清判定指标阴性 $\Delta A + 3SD$ (0.22), 当 ELISA 检测结果高于此标准时, 使用 IFA 和 Western blot 等方法可对此样品做出一致的判断。而低于此标准高于阴性判定标准的样品 (0.15~0.22), 其来源动物的种群需要做进一步的检测来确认。

参 考 文 献

- [1] 仇保丰, 宋鸿雁, 董蓉莲, 等. 鼠痘、小鼠肝炎和鼠仙台病毒感染症的国内流行情况及防控对策[J]. 中国动物检疫, 2015, 32(10): 9-14.
- [2] 张志妮, 郭中敏, 严楚. 小鼠肝炎病毒抗体 ELISA 和 IFA 检测试剂盒真实性评价[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(3): 94-97.
- [3] Chatterjee D, Addya S, Khan R S, *et al.* Mouse hepatitis virus infection upregulates genes involved in innate immune responses [J]. PLoS One, 2014, 9(10): 351-354.
- [4] 周洁, 高诚, 胡建华. 小鼠肝炎病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(1): 6-9.
- [5] 胡晓燕, 佟巍, 刘先菊, 等. 小鼠肝炎病毒金标快速检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 96-100.
- [6] Wang H, Xue S, Yang H, *et al.* Recent progress in the discovery of inhibitors targeting coronavirus proteases[J]. Virol Sin, 2016, 3(1): 24-30.
- [7] Yang Q, Shi Y, Yang Y, *et al.* The sterile inflammation in the exacerbation of HBV-associated liver injury [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 508681.
- [8] Kenyon, L C, Biswas K, Shindler K S, *et al.* Gliopathy of Demyelinating and Non-Demyelinating Strains of Mouse Hepatitis Virus [J]. Frontiers in cellular neuroscience, 2015, 9(12): 488.
- [9] Asano A, Torigoe D, Sasakin, *et al.* Epitope mapping of the nucleocapsid protein of sendai virus and application of antigenic epitopes for the ELISA-based diagnosis of sendai virus infection [J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2013, 75(7):

- 909-916.
- [10] 中华人民共和国国家标准.GB /T 14926. 50-2001《实验动物微生物学检测方法》[S].酶联免疫吸附试验:1-4.
- [11] 熊伟,蒋静,张强,等.小鼠肝炎病毒核酸快速检测方法的建立和应用[J].实验动物科学,2013,**30**(4):1-5.
- [12] 刘先菊,佟巍,向志光,等.仙台病毒抗原的制备及初步应用[J].实验动物科学,2013,**30**(1):1-5.
- [13] 奥斯伯 F M,金斯顿 R E,塞德曼 J G,等.精编分子生物学实验指南[M].5 版.北京:科学出版社,2008.1-27.
- [14] 侯丽波,谢军芳,佟巍,等.小鼠仙台病毒标准化血清的制备及鉴定[J].中国比较医学杂志,2008,**18**(9):57-59.
- [15] 宋鸿雁,董蓉莲,仇保丰,等.华东地区清洁级大、小鼠中 ECTV、MHV 和 SV 的检测[J].畜牧与兽医,2016,**48**(1):90-92.
- [16] Song H Y, Dong R L, Qiu B F, *et al.* Detection of ECTV, MHV and SV in Clean-grade Mice and Rats in East China[J].Animal Husbandry and Feed Science, 2017, **9**(1): 41-43.
- [17] 王吉,卫礼,付瑞,等.长爪沙鼠仙台病毒(SeV)抗体 ELISA 检测方法的建立与应用[J].实验动物科学,2015,**32**(6):39-43.
- [18] Yang Z, Du J, Chen G, *et al.* Coronavirus MHV-A59 infects the lung and causes severe pneumonia in C57BL/6 mice[J]. Virol Sin, 2014, **29**(6): 393-402.
- [19] Cui W, Cui S S, Chen C, *et al.* The crystal structure of main protease from mouse hepatitis virus A59 in complex with an inhibitor [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019,**511**(4): 1-6.
- [20] Duhalde Vega M, Aparicio J L, Retegui L A. Retegui. Levo-1-methyl tryptophan aggravates the effects of mouse hepatitis virus (MHV-A59) infection[J]. International Immunopharmacology, 2015, **24**(2): 377-382.
- [21] 王吉,卫礼,肖镜,等.血清灭活法对消除 ELISA 假阳性结果的比较研究[J].实验动物科学,2008,**25**(5):50-61.

Effect of Different Mouse Hepatitis Viruses Antibodies Detected by ELISA

WU Pengpeng, BAI Bing, ZHANG Caiqin, ZHAO Yong, MIAO Haigang, SHI Changhong

(Laboratory Animal Center, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To establish the Mouse Hepatitis Virus (MHV) serum antibody ELISA test method for routine monitoring of MHV locally, in order to make timely judgments on the infection status of SPF mice. **Method**

Three kinds of MHV strains (MHV1, MHV-JHM and MHV-A59) were amplified in the L929 cells and purified by ultracentrifugation method. The appropriate virus antigen type was determined and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system was established. SPF BALB/c mice were immunized to obtain high titer immunopositive serum. The purified MHV antigens were coated in microtiter plates and the detection system of ELISA flat was also optimized to apply clinical mice serum detection. **Result** The suitable coating antigen for local region was MHV1 and the method for virus amplification and antigen purification were established. The prepared MHV antiserum keep high titer and can be used as standardized quality control serum. The optimal working concentrations of coated antigen, serum to be tested and enzyme conjugate were 4.0 $\mu\text{g/mL}$ ($10^{-7.73}$ /0.1 mL TCID₅₀), 1:40 and 1:4 000 respectively. The inter-assay and intra-assay average coefficient of variation is 5.13% and 5.57%, respectively. The detection sensitivity reaches more than 1:4 000. There was no cross-reactivity with Sendai Virus (SV), Pneumonia Virus of Mice (PVM), Reovirus type III (Reo3), Minute Virus of Mice (MVM) and Ectromelia Virus (Ect). The relative deviation of stability test was less than 10%. A totally 165 sera samples were analyzed by the current ELISA method, the positive serum coincidence rate was 97.37% (37/38) and the negative serum coincidence rate was 92.19% (118/127), compared with the result of the commercial ELISA kit.

Conclusion We have established ELISA method detection of mouse serum MHV, with high specificity, sensitivity and reproducibility. It can be used for daily pathogen monitoring of MHV in this region, so as to make accurate judgment on the infection status of mice.

Key words: Mouse Hepatitis Virus; Serology; ELISA