

# 猪瘟疫毒阴、阳性血清国家参考品 候选物的均匀性考察

戴志红, 蒋卉, 李翠, 张秀英, 陆连寿, 孙海燕, 魏津, 关孚时, 王在时

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2012-06-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 01-0004-03 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为了研制猪瘟疫毒阴、阳性血清国家参考品,对猪瘟疫毒阴、阳性血清国家参考品候选物的均匀性进行检验。每亚批随机抽取16支样品,其中1支样品取样10次,其余样品取样1次,用猪瘟疫 ELISA 抗体检测试剂盒测定其 OD<sub>450</sub> 值,用 *t* 检验和 *F* 检验进行统计分析。结果显示,各组测定数据的均值与方差无显著差异。该批候选物是均匀的。

**[关键词]** 猪瘟疫; 参照品; 均匀性

## Homogeneity Test of Candidate National Reference Materials for Negative and Positive Antisera of Classical Swine Fever Virus

DAI Zhi-hong, JIANG Hui, LI Cui, ZHANG Xiu-ying, LU Lian-shou, SUN Hai-yan,  
WEI Jin, GUAN Fu-shi, WANG Zai-shi

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract:** In order to test the homogeneity of candidate national reference materials for negative and positive antisera of classical swine fever virus (CSFV), 16 samples were randomly selected from each sub-batch of the candidates, from which one sample was tested 10 times with a CSFV antibody ELISA Kit to measure the OD<sub>450</sub> values, the remains tested only once. Statistics researches were conducted with *t*-test and *F*-test. It showed that average and variance of within-bottle and between-bottle results of three sub-batches did not showed significant difference. It could be concluded that the candidate national reference materials had appropriate homogeneity.

**Key words:** classical swine fever; reference materials; homogeneity

猪瘟疫 (Classical Swine Fever, CSF) 是由猪瘟疫毒 (Classical Swine Fever Virus, CSFV) 引起的一种高度接触性、致死性的猪传染病, 在世界上很多国家和地区均有发生<sup>[1-2]</sup>, 给畜牧业生产带来了严重的经济损失。世界动物卫生组织 (OIE) 将猪瘟疫列为法定通报性疫病<sup>[3]</sup>, 我国将其划为一类动物传染病<sup>[4]</sup>, 并纳入重大动物疫病防控计划。猪瘟疫抗体检

测是猪瘟疫诊断、免疫效果评价和流行病学调查的重要手段, 但其敏感度和准确性易受方法、人员、试剂、实验动物等诸多因素影响。猪瘟疫阴、阳性血清国家参考品则是控制和校准猪瘟疫抗体检测的实物“标尺”, 但我国目前尚缺乏猪瘟疫阴、阳性血清国家参考品。为了研制猪瘟疫阴、阳性血清国家参考品, 中国兽医药品监察所与相关单位制备了 1 批猪瘟疫

基金项目: “十一五”科技支撑计划(2006BAD06A10); 农业部“兽药监察关键技术引进”项目(2011-G14)

作者简介: 戴志红, 博士, 助理研究员, 从事兽药标准物质研究。

通讯作者: 王在时。E-mail: wangzaishi@ivdc.gov.cn

阴、阳性血清国家参考品候选物。均匀性是标准物质的基本要求之一,因此,对该批候选物进行了均匀性检验。

## 1 材料与方法

1.1 猪瘟病毒阴、阳性血清国家参考品候选物 猪瘟病毒阴、阳性血清国家参考品候选物包括分装、冻干、抽真空、熔封后的阴性血清(200905-1)、弱阳性血清(200905-2)和强阳性血清(200905-3)各1000支,1 mL/支,由中国兽医药品监察所制备。

1.2 试剂 猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂盒(Lot No. 43220-T761), Idexx 公司。

### 1.3 均匀性检验

1.3.1 抽取单元数 每亚批随机抽取16支,分别

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{S_{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}}, S_{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (x_{1j} - \bar{x}_1)^2 + \sum_{j=1}^n (x_{2j} - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}} \times \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}, F = \frac{S_{较大}^2}{S_{较小}^2}$$

计算统计量  $t$  和  $S_{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}$  时,公式中的  $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$  为两组测定结果的平均值, $n_1$ 、 $n_2$  为瓶内测量次数和瓶间测量次数。 $S_{较大}$  为较大的样本方差, $S_{较小}$  为较小的样本方差。由  $t$  分布表查得  $t_{临界值}$ ,若  $t < t_{临界值}$ ,则可认为两组测定结果的均值是一致的;由  $F$  分布表查得  $F_{临界值}$ ,若  $F < F_{临界值}$ ,则可认为两组测定结果的方差是一致的。当统计量  $t < t_{临界值}$  且  $F < F_{临界值}$  时,则可认为样品是均匀的。

## 2 结果

对3亚批样品的测定结果(表1)进行了狄克

逊检验,所有结果均被保留。结果显示,200905-1

1.3.2 取样方法 每亚批从其中1支取样10次,其余各支取样1次<sup>[5-6]</sup>。

1.3.3 取样量 每次取样50  $\mu$ L。

1.3.4 测定顺序 按随机顺序测定所取样品。

1.3.5 测定方法 用猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂盒一次检测所有取样的 OD<sub>450</sub> 值。

1.3.6 统计分析 用狄克逊(Dixon)法剔除数据中的异常值,再进行  $t$  检验和  $F$  检验,用  $t$  检验法检验瓶内和瓶间两组测定结果的平均值是否存在统计学差异,用  $F$  检验法检验瓶内和瓶间两组测定结果的方差是否存在显著性差异<sup>[7-8]</sup>。根据以下公式计算:

逊检验,所有结果均被保留。结果显示,200905-1亚批的瓶内平均 OD<sub>450</sub> 值为 1.501,瓶间平均 OD<sub>450</sub> 值为 1.508;200905-2 亚批的瓶内平均 OD<sub>450</sub> 值为 0.8490,瓶间平均 OD<sub>450</sub> 值为 0.8493;200905-3 亚批的瓶内平均 OD<sub>450</sub> 值为 0.1409,瓶间平均 OD<sub>450</sub> 值为 0.1405。按照  $\alpha = 0.05$  显著水平进行的  $t$  检验和  $F$  检验结果显示,每亚批的统计量  $t$  和  $F$  均小于其临界值(表2),表明每亚批的候选物是均匀的。

表1 候选物的均匀性测定结果(OD<sub>450</sub>)

批次		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
200905-1	瓶内	1.539	1.482	1.467	1.496	1.528	1.536	1.443	1.546	1.465	1.511					
	瓶间	1.489	1.487	1.523	1.530	1.479	1.506	1.517	1.515	1.534	1.531	1.526	1.528	1.501	1.478	1.469
200905-2	瓶内	0.859	0.842	0.853	0.856	0.836	0.852	0.851	0.845	0.847	0.849					
	瓶间	0.856	0.848	0.844	0.850	0.855	0.857	0.851	0.840	0.845	0.846	0.855	0.858	0.842	0.854	0.839
200905-3	瓶内	0.142	0.140	0.144	0.139	0.138	0.141	0.145	0.144	0.140	0.136					
	瓶间	0.137	0.138	0.142	0.141	0.140	0.139	0.147	0.136	0.138	0.146	0.142	0.141	0.140	0.137	0.144

表2 候选物的均匀性统计分析结果

批次	组别	$\bar{X}$	$S^2$	$t$	$t_{临界值}$	$F$	$F_{临界值}$
200905-1	瓶内	1.501	$1.303 \times 10^{-3}$	0.603		2.65	
	瓶间	1.508	$4.916 \times 10^{-4}$				
200905-2	瓶内	0.8490	$4.622 \times 10^{-5}$	0.112	2.069	1.13	3.02
	瓶间	0.8493	$4.110 \times 10^{-5}$				
200905-3	瓶内	0.1409	$8.322 \times 10^{-6}$	0.313		1.29	
	瓶间	0.1405	$1.070 \times 10^{-5}$				

### 3 讨论

均匀性是标准物质最重要的基本属性之一,用于描述标准物质特性的空间分布特征。凡成批制备并分装成最小包装单元的标准物质,必须进行均匀性检验。均匀性检验受检验方法、测量方法、抽样方法、抽样数量、取样量、测定顺序等影响,因此必须科学考虑各种因素以保证检验结果的准确性和可信度。

均匀性检验可以按两种方式进行:ANOVA 方式和替代方式<sup>[5-6]</sup>。ANOVA 方式是抽取一定数量样品,每瓶重复测量几次;替代方式是选一瓶重复测量多次,其余每瓶测量 1 次。ANOVA 方式可以获得较多数据,替代方式可以减少测量次数。均匀性检验所选择的测量方法不一定是定值方法。选择的方法具有足够的灵敏度和重复性即可。均匀性检验与测量方法的精密度密切相关,所以应该在最佳重复性条件下进行,即同一操作者在同一实验室用同一仪器在尽量短的时间内完成测量。本试验采用 ELISA 实验作为测量方法,其灵敏度和重复性较好,并且便于在同一实验室用一台仪器一次完成测量;另外,采用了替代方式进行均匀性检验,减少了取样次数,节约了试验成本。

均匀性检验的抽样方法包括随机抽样、分层随机抽样和系统抽样。随机抽样和分层随机抽样实际应用较多,当已知某种物理现象可能导致不均匀时则使用系统抽样<sup>[9]</sup>。抽样数量也需均有足够的代表性。《一级标准物质技术规范》要求:总体单元数少于 500 时,抽取单元数不少于 15 个,总体单元数大于 500 时,抽取单元数不少于 25 个;对于均匀性良好的样品,总体单元数少于 500 时,抽取单元数不少于 10 个,总体单元数大于 500 时,抽取单元数不少于 15 个<sup>[10]</sup>。在本试验中,每亚批随机抽取 16 支样品,符合要求。

测量的准确性与取样量密切相关,所以标准物质的均匀性检验结果跟取样量有关,取样量过小

时,检验结果更容易呈现不均匀。因此,应尽量采用较大的取样量以获得较好的测量重复性<sup>[9]</sup>。此外,均匀性检验抽样数量较多,测定时间较长,测定结果可能会受测定时间影响,按随机顺序测定所取样本可以减少数据漂移。在本试验中,每次取样 50  $\mu\text{L}$ ,既符合猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂盒要求,也能保证重复性,并且向酶标板中加样也是按照随机顺序进行的。

总之,本试验综合考虑了多个因素,对猪瘟病毒阴、阳性血清国家参考品候选物进行了均匀性检验。结果显示,该批候选物均匀性良好,可以用于进一步研制国家参考品。

### 参考文献:

- [1] Edwards S, Fukusho A, Lefèvre P C, *et al.* Classical swine fever: the global situation[J]. *Vet Microbiol.* 2000, 73(2-3): 103-119.
- [2] Domenech J, Lubroth J, Eddi C, *et al.* Regional and international approaches on prevention and control of animal transboundary and emerging diseases[J]. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1081: 90-107.
- [3] Animal health in the world[EB/OL]. (2010-1-4). [http://www.oie.int/eng/maladies/en\\_classification2010.htm?e1d7](http://www.oie.int/eng/maladies/en_classification2010.htm?e1d7).
- [4] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告第 1125 号[S].
- [5] VanderVeen A M H, Linsinger T P, Pauwels J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials of homogeneity study[J]. *Accred Qual Assur*, 2001, 6: 26-30.
- [6] Linsinger T P, Pauwels J, VanderVeen A M H, *et al.* Homogeneity and stability of reference materials[J]. *Accred Qual Assur*, 2001, 6: 20-25.
- [7] 全浩. 标准物质及其应用技术[M]. 北京: 中国标准出版社, 1991: 106-108.
- [8] 蒋子刚, 顾雪梅. 分析测试中的数理统计与质量保证[M]. 上海: 华东化工学院出版社, 1991: 298-300.
- [9] ISO, Geneva, Switzerland, ISO Guide 35: 2006, Reference materials - General and statistical principles for certification[S].
- [10] 中华人民共和国国家计量技术规范(JJG1006-94). 一级标准物质技术规范[S]. 北京: 中国计量出版社, 1995.