研究报告

六年实验动物病原菌检测能力验证结果分析

邢　进,冯育芳,王　洪,张雪清,付　瑞,岳秉飞*

(中国食品药品检定研究院,实验动物资源研究所,北京　100050)

【摘要】 **目的**　总结分析 2011 年、2013 ~ 2017 年实验动物病原菌检测能力验证活动情况,提高检测能力,促进能力验证活动开展。**方法**　2011 年、2013 年 ~ 2017 年,本院组织开展了六次 7 个项目的实验动物病原菌检测能力验证活动。通过汇总六年中能力验证活动的结果数据,分析整体趋势,总结归纳出现的问题。**结果**　六年中共有全国 20 个省市的 45 个单位先后报名参加实验动物病原菌的能力验证活动,项目包括肺支原体、泰泽病原体、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门菌、肺炎克雷伯杆菌和支气管鲍特杆菌;满意率分别为 75%、87.5%、80.0%、78.6%、93.3%、96.2% 和 88.0%。不满意结果原因主要有培养时间不足、可疑菌落筛选错误、生化鉴定错误、报告书写笔误以及未及时提交报告等。**结论**　通过连续的能力验证活动,国内实验动物病原菌检测水平逐渐提高,达到预期目标。

【关键词】 实验动物;能力验证;病原菌检测;中国合格评定国家认可委员会

【中图分类号】R-33　　【文献标识码】A　　【文章编号】1671-7856(2018) 04-0103-05

doi: 10.3969/j.issn.1671 - 7856. 2018.04.018

Analysis of proficiency testing results for pathogenic bacteria in laboratory animal in six years

XING Jin, FENG Yufang, WANG Hong, ZHANG Xueqing, FU Rui, YUE Bingfei*

(National Institutes for Food and Drug Control, Department of Laboratory Animal Quality Testing, Beijing 100050, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To analyze the result of proficiency testing (PT) of detection activities for Laboratory animal pathogenic bacteria in 2011 and 2013 - 2017. To further improve the detection capacity of laboratory animal testing agency, and promote PT to be carried out in future. **Methods**　During the six years (2011 and 2013 - 2017), the National Institutes for Food and Drug Control conducted a total of six (seven projects) PT activities of laboratory animal pathogen bacteria. We analyzed the overall trend and the exposed problems by summarizing the result data of the PT in 6 years. **Results**　A total of 45 laboratories in the country including 20 provinces and cities participated in the PT. The PT projects included *Mycoplasma pulmonis*, *Clostridium piliformis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchiseptica*. The satisfaction rates were 75%, 87.5%, 80.0%, 78.6%, 93.3, 96.2% and 88.0%, respectively. The main reasons of unsatisfactory results were for lack of incubation time, select errors of suspicious bacteria, biochemical identification errors, report writing errors and not timely feedback results. **Conclusions**　The level of domestic laboratory animal pathogenic bacteria detection is gradually increased to achieve the desired goal through continuous proficiency testing activities.

【**Key words**】 laboratory animal; proficiency testing; pathogenic bacteria detection

能力验证(proficiency testing, PT)是利用实验室间比对来判定实验室和检测机构能力的活动。作为一项重要的外部质量评价活动,利用实验室间的比对,按照预先制定的准则评价参加者的能力。

[作者简介]邢进(1979—),男,副研究员,研究方向:实验动物微生物检测。E-mail: xjvet@nifdc.org.cn

[通信作者]岳秉飞(1960—),男,博士,研究员,研究方向:比较医学。E-mail: y6784@126.com

参加能力验证活动,是实验室证明其技术能力的一种重要方式,也是认可机构加入和维持国际相互承认协议(MRA)的必要条件之一。寻求中国合格评定国家认可委员会(CNAS)认可和已获准认可的机构必须满足 CNAS 的能力验证相关政策,并按照 CNAS 能力验证领域、频次要求参加 CNAS 组织或承认的能力验证活动,包括能力验证计划、实验室间比对和测量审核活动。[1-2]。

近年来,我国实验动物领域不断发展,许多相关研究已达到国际领先水平。实验动物质量检测作为保障实验动物和动物实验质量的根本手段,开展能力验证活动势在必行。通过能力验证活动,可以增进实验动物检测实验室间的交流,发现自身不足,补充、完善内部质量控制技术,提高质量检测能力和水平。本院从 2011 年开始采用与 CNAS 联合举办能力验证活动,在病毒[3-5]、病原菌[6-8]和遗传[9-10]检测项目上积累了丰富的经验。2015 年本院顺利通过了 CNAS 能力验证提供者(Proficiency Testing Provider,PTP)的现场评审,成为合格的能力验证提供者。

实验动物细菌检测是实验动物质量检测的重要内容,依据《实验动物微生物学检测方法(2)》[11],对常用实验动物的检测方法主要包含分离培养法和血清学方法。目标菌主要包括感染呼吸道和肠道的病原菌。本院作为能力验证活动的提供者,依据 CNAS-RL02《能力验证规则》[1] 和 CNAS-RL03《能力验证提供者认可准则》[12] 在 2011、2013 ~ 2017 年共开展了六次能力验证活动,包括对 7 种病原菌的检测。现将其汇总如下。

1 材料和方法

1.1 样品制备

1.1.1 血清样品

用标准菌株超声波破碎制备免疫抗原,免疫小鼠和大鼠,获得免疫血清。用 ELISA 和 IFA 方法分别测定支原体和泰泽病原体的抗体效价,制成强阳性、弱阳性的工作浓度和阴性样本后分装于螺口冻存管,至 -20℃保存。

1.1.2 带菌样品

将目标菌株和干扰菌株复苏后分别采用生化鉴定和 16SrDNA 测序的方式进行鉴定,确认无误后开展下一步制备。用灭菌生理盐水制成菌悬液,然后按比例加入细菌保护液。与灭菌的或带菌清楚的动物样品均匀混合,制成带菌匀浆。样品分装于螺口 1.5 mL 无菌冻存管中。2014 年开始,样品均采用冷冻干燥处理。见表 1。

六次能力验证中设置了免疫血清和带菌样品。所用菌株和样品形式如表 1。

1.2 样品检验

编号前,依据 CNAS-GL03[13] 文件要求,采用国家标准中的方法对制备好的样品进行均匀性、稳定性评价,确保样品符合要求。分别随机抽取已制备样品总数量的 10% 用于均匀性和稳定性检验。进行均匀性评价时,对血清样品采用 OD 值 $S \leqslant 0.3\sigma$ 方法,对带菌样品定性观察培养出的目标菌落数。稳定性评价至少进行 4℃、室温(23℃~25℃)和 36℃温度下的存放稳定性检验,血清样品时间至少为 2 周,带菌样品时间至少为 1 个月。

1.3 样品编号

除 2011 年采用相同编号外,其他年份的比对样品均采用顺序编号,各样品随机组合,由软件自动分配,确保每个参与实验室随机得到 3 份或 5 份样品,见表 1。2016 年样品分组采用三种不同样品全部随机的方式编排,因此有可能出现各种组合,即可能存在 3 份阴性或 3 份阳性的极端情况。实验室无法通过样品编号判断组别,防止了实验室间对结果的相互沟通。

1.4 样品发放

2015 年之前的样品通过 EMS 形式运输,外包装为泡沫塑料,内至冰袋和样品。2016 年后除个别地区的限制,仍采用冰袋冷藏外,其他地区均采用干冰冷链运输。

1.5 评价方法

各实验室收到的所有样品的测定结果与标准结果完全一致时,被判定为满意结果;任何 1 份样品的测定结果与标准结果不一致时,即判定为不满意结果;实验室如果未按时限反馈结果,也将判定为不满意结果。

2 结果

2.1 参与单位统计

从 2011 年、2013 ~ 2017年,共有 45 家单位参与了能力验证活动,参与次数 4 次以上的有 18 家,见图 1。参与单位类型主要分为实验动物检测机构、疾病预防控制中心、药监系统、科研院校和企业实验室,见图 2。2011 年只有实验动物检测机构参与。其中药检系统和科研院校的数量变化相对较大。

表 1　实验动物病原菌检测能力验证所用菌株和样品形式

Tab. 1　Strains and sample forms of PT for detection of laboratory animal pathogenic bacteria

年份 Years	目标菌种 Positive strains	干扰菌种 1 Interfering strain 1	干扰菌种 2 Interfering strain 2	样品形式 Sample form	阳性率设置 Positive rate setting
2011	肺支原体 ATCC19612 *Mycoplasma pulmonis*	/	/	免疫血清 Immune serum	3/5
2011	泰泽病原体 RJ 株 *Clostridium piliformis*	/	/	免疫血清 Immune serum	2/5
2013	绿脓杆菌 CMCC10110 *Pseudomonas aeruginosa*	/	/	粪便 Feces	3/5
2014	金黄色葡萄球菌 CMCC26112 *Staphylococcus aureus*	木糖葡萄球菌分离株 *Staphylococcus xylosus*	/	粪便 Feces	1/3
2015	乙型副伤寒沙门氏菌 CMCC 50094 *Salmonella paratyphi B*	变形杆菌分离株 *Proteus vulgaris*	大肠杆菌 CMCC 44110 *Escherichia coli*	冻干粪便 Freeze-dried feces	1/3
2016	肺炎克雷伯菌杆菌 CMCC46108 *Klebsiella pneumoniae*	产酸克雷伯菌分离株 *Klebsiella oxytoca*	/	冻干粪便 Freeze-dried feces	随机/3 Random/3
2017	支气管鲍特杆菌 ATCC 19395 *Bordetella bronchiseptica*	产气巴斯德杆菌 ATCC 27883 *Pasteurella aerogenes*	大肠杆菌 CMCC 44110 *Escherichia coli*	冻干气管冲洗液 Freeze-dried tracheal lavage fluid	1/3

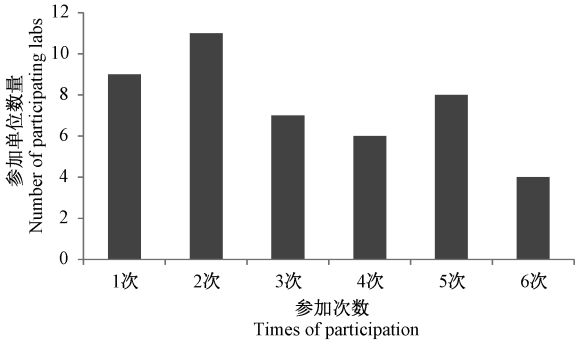

图 1　单位参与次数

Fig. 1　Laboratory participation statistics

2.2　结果汇总

2011 年开展了 2 项比对项目,检测血清中的抗体。2012 年未开展。2013~2017 年为检测动物样品中的病原菌。几项能力验证的满意率在 75%~96.2%之间。见表 2。其中获得不满意结果的实验室后续均通过了测量审核。

能力验证活动没有规定检测方法,参与单位可根据自身情况自行选择。参与单位多数按照国家标准中的方法进行检测,少数实验室采用 PCR 方法直接扩增样品中的特异片段,也可取得满意结果。

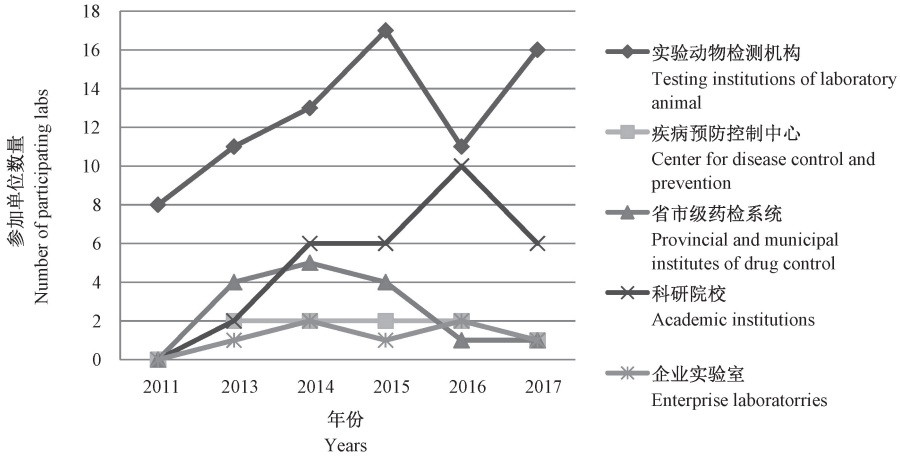

图 2　参与单位类型

Fig. 2　Types of laboratories participating in PT

表 2 2011 年、2013 ~ 2017 年实验动物细菌能力验证项目和结果

Tab. 2 Projects and results of PT for detection of laboratory animal pathogenic bacteria from 2011 and 2013 – 2017

年份 Years	比对项目 Projects	参加单位数 Number of labs	省份数量 Number of provinces	ELISA 或 IFA 法 ELISA or IFA methods	分离培养法 Culture methods	PCR 法 PCR method	满意率(%) Satisfaction rate
2011	支原体 *Mycoplasma spp.*	8	7	8	/	/	75.0
2011	泰泽病原体 Tyzzer's organism	8	7	8	/	/	87.5
2013	绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*	20	14	/	19	1	80.0
2014	金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	28	18	/	24	1	78.6
2015	沙门氏菌 *Salmonella spp.*	30	20	/	29	1	93.3
2016	肺炎克雷伯菌杆菌 *Klebsiella pneumoniae*	26	15	/	22	4	96.2
2017	支气管鲍特杆菌 *Bordetella bronchiseptica*	25	17	/	24	2	88.0

3 讨论

3.1 项目的选择

2011 年本院首次尝试性开展国内实验室比对工作。充分考虑样品制备和实验室比对的可操作性,在项目选择上遵循由易到难的原则,首先进行的是血清学检测项目。支原体和泰泽病原体是清洁级大、小鼠的必检项目,在国家标准中可采用血清学方法检测,对检测实验室软硬件要求不高,可以比较方便的购买到两种病原菌的检测试剂盒。通过对这两个项目的检测,能够直接考察参与实验室在实验动物病原菌血清学检测方面的基本能力。经过一年的准备,2013 年开始连续开展了四年肠道细菌检测项目带菌样品的能力验证工作。分别是对绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和肺炎克雷伯杆菌的检测。选择这四种细菌主要有三方面原因:①易培养、保存和鉴定。这四种细菌对培养条件的要求相对较低,而且具有特征性的鉴别要点,样品制备时容易获得稳定的样品,便于后续比对实验的开展。②阳性率高。特别是绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌,是实验动物中肠道细菌阳性率最高的两种病原菌,沙门氏菌和肺炎克雷伯杆菌次之,均严重影响动物实验和人员健康。③等级检测需要。沙门氏菌是国家标准中各级别动物首先要排除的病原菌,另外三种细菌均为 SPF 级啮齿类和兔中必须要排除的病原菌,通过对这几种常见的肠道病原菌的能力验证,能够比较全面的考察参加实验室在肠道病原菌检测方面的能力。经过连续几年的能力验证活动,反馈结果的满意率逐渐提高。2017 年首次开展了呼吸道细菌的带菌样品的验证活动,在样品制备方面也提出了更高的要求。先期开展的项目是支气管鲍特杆菌,作为 SPF 级动物必检项目,该菌比其他呼吸道病原菌更易培养和保存,通过制备工艺的调整,样品均稳实验获得理想结果,为下一步呼吸道病原菌检测项目的扩展奠定了基础。

3.2 样品制备

目前实验动物病原菌能力验证的带菌样品中的基质,如粪便或回盲内容物等均经过严格的检测或灭菌处理,确保无待检目标菌的存在。同时,通过添加保护剂和冷冻干燥的方法,最大程度的保持样品中受试菌的稳定性,不受外界环境干扰。并且不断完善准确性、均匀性和稳定性的实验方法,建立实验动物细菌 PT 样品的质量控制程序,确保制备出合格的 PT 样品。

3.3 检测方法

2011 年开展的支原体和泰泽病原体项目检测方法主要是酶联免疫吸附试验(ELISA)和间接免疫荧光试验(IFA)方法,使用设备和试剂相对单一,操作程序成熟。使用新鲜配制的试剂,按照常规检测方法操作均可检测准确。针对带菌样品的检测方法一方面可选择传统的分离培养法,对可疑菌进行生化鉴定;另一方面也可以采用快速的 PCR 方法,对样品直接提取 DNA,采用特异性引物扩增其中的目的基因。根据 5 项带菌项目的检测结果,PCR 方法均获得满意结果。对于非常规性的实验动物检

测实验室而言,PCR 是非常理想的方法。

3.4　不满意结果分析

通过对反馈结果和报告的分析,将不满意结果的原因总结为以下几个方面:(1)培养时间不足。比如绿脓杆菌在初代分离培养时应在 NAC 液体培养基中培养至 72 h;金黄色葡萄球菌初代在高盐甘露醇琼脂培养基中培养至36~48 h,最有利于菌落形态的观察。(2)可疑菌落筛错误。从样品的初代分离培养物中筛选出可疑的目标菌需要有丰富的细菌学检测经验,初代可疑菌的挑取对后续的细菌鉴定至关重要。绿脓杆菌比对项目中设置了不产色素菌株,金黄色葡萄球菌项目中设置了浅黄色菌落的木糖葡萄球菌作为干扰项,沙门菌项目中设置了普通变形杆菌作为干扰项,支气管鲍特杆菌项目中设置了嗜肺巴斯德杆菌作为干扰项。当出现大量非典型菌落和相似菌落的情况时有可能出现漏检。(3)生化鉴定错误。生化鉴定是细菌鉴定的关键步骤。根据国家标准进行手工鉴定时容易造成主观判定的误差。当个别生化项目与标准不符时,容易得出假阴性结论。(4)报告书写错误。检测结果准确,原始记录中编号书写混淆导致最终报告错误。(5)未及时反馈结果。当能力验证样品发样时间有可能与高校或科研单位的暑假相冲突,造成未及时对样品进行处理和检测,造成结果反馈超期。

最初的从不满意结果的原因能够看出鉴定试剂有可能成为结果的决定。实验动物微生物检测试剂主要包括培养基、生化鉴定试剂、血清学检测试剂等。专门用于实验动物检测的试剂仍然比较匮乏。现有这些试剂的质量和判定标准存在一定差异。2011 年的两项检测均为血清学方法,支原体采用 ELISA 方法,泰泽病原体采用 ELISA 或 IFA 方法。国内市场上支原体和泰泽病原体的抗体检测试剂非常少,进口试剂往往价格昂贵,订购周期长,很大程度上限制了检测工作的开展。在细菌培养基方面,国产培养基质量不断提高,从比对结果和原始记录分析,不同来源的国产或进口培养基对分离结果的没有显著影响。

实验动物细菌检测中,对可疑菌的生化鉴定是最关键内容。随着检测技术和检测条件的提高,自动化鉴定设备已经逐步应用于检测中。2013~2017 年使用商品化鉴定试纸条或自动细菌鉴定仪的实验室所占比例分别为 30% 左右,均获得满意结果。采用手工生化鉴定时,常因试剂反应弱或反应滞后造成主观判断错误。

3.5　工作展望

开展能力验证的根本目的是为了提高实验动物检测机构的能力和水平。本院开展能力验证以来,参与单位数量从 2011 年的 8 家增加到最多时的 30 家,一共有 45 个单位参与了能力验证工作。前几年的实验动物病原菌检测能力验证满意率整体稳定,并且呈稳步升高的趋势。随着国内实验动物检测机构检测水平的不断提升,能力验证样品的难度设置也应相应增加,同时对 PTP 的要求也更高。虽然顺利的完成了此前的能力验证工作,但其中很多环节仍有待改进,比如完善样品制备工艺、增加检测项目,丰富样品设置等。希望在全国实验动物工作者的共同努力和支持下,能力验证工作能够助力国内实验动物质量检测整体水平的进一步提高。

参考文献:

[1] CNAS-RL02,能力验证规则[S].

[2] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证简介[DB/OL]. https://www.cnas.org.cn/fwzl/nlyzzl/nlyzjj/2013/01/723096.shtml

[3] 李晓波,王洪,付瑞, 等. 实验大鼠细小病毒 H-1 株抗体检测能力验证结果评价 [J]. 中国药事,2014, 28(9):990-994.

[4] 王吉, 付瑞, 李晓波, 等. 实验小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型抗体的实验室检测能力验证结果评价[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 183-187.

[5] 付瑞, 王洪, 王淑菁, 等. 兔出血症病毒抗体的实验室检测能力验证结果评价 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24 (2): 188-190,198.

[6] 邢进, 冯育芳, 王洪, 等. 实验动物中绿脓杆菌检测能力验证的结果与分析 [J]. 中国药事, 2014, 28(9): 986-989.

[7] 冯育芳, 邢进,付瑞, 等. 实验动物金黄色葡萄球菌的实验室检测能力验证结果评价 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 195-198.

[8] 邢进, 冯育芳, 王洪, 等. 实验动物中沙门菌的实验室检测能力验证的结果与分析 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 191-194.

[9] 王洪, 魏杰, 李芳芳, 等. 实验动物质检机构碱性磷酸酶-1 测定能力验证评价 [J]. 中国药事, 2014, 28(12): 1339-1341.

[10] 魏杰, 王洪, 李芳芳, 等. 实验室能力验证用酯酶-3 标准样品的均匀性和稳定性研究 [J]. 中国药事, 2014, 28(9): 990-994.

[11] GB/T 14922.2-2011,实验动物微生物学等级及监测[S].

[12] CNAS-CL03,能力验证提供者认可准则[S].

[13] CNAS-GL03,能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S].

〔收稿日期〕2017-10-24