



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

冯育芳,邢进,付瑞,王吉,李晓波,王淑菁,贺争鸣,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 通过实施实验动物金黄色葡萄球菌检出能力验证计划,了解实验动物检测机构检验能力,提高实验动物质量检测水平。**方法** 按照 CNAS 批准的能力验证方案,通过低温冻干制备样品,经过稳定性和均匀性检验合格,作为能力验证样品。采用随机编号,发样给参加单位,并附作业指导书。在规定时限提交检验报告和原始记录复印件,其结果与样品预检结果一致的判为满意结果,不一致或未能提交结果的判为不满意结果。

结果 共有 28 个实验室参加本次能力验证项目,其中获得满意验证结果的实验室为 22 个,占总参加机构的 78.57%;未得到满意验证结果的实验室为 6 个,占 21.43%。采用国标检测方法的有 27 个,采用 PCR 检测方法的有 1 个。

结论 实验动物质量检测机构对金黄色葡萄球菌的检测能力较高,实施能力验证计划能够反映实验室的检测水平。

【关键词】 实验动物;金黄色葡萄球菌;能力验证样品

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 02-0195-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.02.016

Evaluation of the ability to detect *Staphylococcus aureus* in experimental animal laboratories

FENG Yu-fang, XING Jin, FU Rui, WANG Ji, LI Xi-bo, WANG Shu-jing, HE Zheng-ming, YUE Bing-fei*

(Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To verify the detection ability of experimental animal quality detection laboratories in China for *Staphylococcus aureus*. **Methods** The testing samples for *Staphylococcus aureus* detection were prepared by bacterial culture, homogeneity test and stability test, according to the study plan approved by CNAS. Then the samples and operation instruction were sent to the participant laboratories. The detection reports from these laboratories should be submitted before the deadline expires, and the collected data were summarized and analyzed. **Results** There were 28 laboratories which joined to this test plan. Among them 22 laboratories (78.57%) achieved satisfactory test results, and six laboratories (21.43%) had unsatisfactory test results. 27 Laboratories used the national standard detection assay, while only one laboratory used PCR assay. **Conclusions** Most of experimental animal quality testing laboratories in China have sufficient proficiency in detection of *Staphylococcus aureus*. The obtained information are very helpful for the laboratory ability verification testing in future.

【Key words】 Laboratory animals; *Staphylococcus aureus*; Detection ability validation

Corresponding author: YUE Bing-fei, Email: y6784@126.com

[基金项目] 国家科技支撑计划(编号:2015BAI09B00)。

[作者简介] 冯育芳(1981-),女,副研究员,研究方向:实验动物微生物检测。E-mail: fyf307@126.com

[通讯作者] 岳秉飞(1960-),男,研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: y6784@126.com

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 属于葡萄球菌属 (*Staphylococcus*), 是人和动物体表、皮、毛、鼻、口腔、消化道的常见菌, 也是一种条件致病菌。在大多数情况下, 携带金黄色葡萄球菌的动物为健康动物, 但当动物由于外伤、应激和环境造成免疫低下时, 可引起化脓性睾丸炎、前列腺炎、卵巢脓肿、子宫内膜炎等, 影响动物种群繁育和动物实验结果^[1]。中华人民共和国国家标准 GB14922.2-2011《实验动物微生物学等级及监测》将金黄色葡萄球菌列为 SPF 级大鼠、小鼠、豚鼠、地鼠和兔必须排除的病原菌^[2]。近 5 年来我室共检测 SPF 级实验动物 6199 只, 其中, 金黄色葡萄球菌阳性率为 2.5%, 是 SPF 级动物检测中最常见的污染菌。

实验室能力验证, 是通过实验室间检测结果的比对来确定实验室能力的活动, 是实验室证明其技术能力的一种主要手段。当前, 能力验证是国际通行的实验室质量控制方法之一, 已成为世界各国政府以及国际实验室认可组织广泛采用的重要技术手段^[3]。为提高实验动物中金黄色葡萄球菌的检出能力, 依据 CNAS-RL03《能力验证提供者认可准则》^[4] 进行本次检测能力验证工作 (NIFDC-PT-011)。

本项目的研究, 包括金黄色葡萄球菌能力验证样品的制备工作、制定合适的评价方案以及比对结果的汇总分析, 探讨实验动物致病菌检测能力验证计划的组织和实施工作, 为今后实验动物微生物检测能力验证计划的实施提供有价值的参考和借鉴作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

金黄色葡萄球菌为标准参考株 CMCC26112, 购自中国食品药品检定研究院中国医学菌种保藏中心; 本次验证工作设置 1 个干扰菌-木糖葡萄球菌, 该菌为日常检测中常见的葡萄球菌, 菌株为本室分离株, 均用梅里埃的 Staphy 生化条进行了鉴定。

1.1.2 试剂材料

冻干液由中国食品药品检定研究院食品化妆品检定所提供; 培养基包括葡萄球菌培养基 110、哥伦比亚血琼脂基础和高盐甘露醇培养基; 生化鉴定试剂为梅里埃的葡萄球菌鉴定条。

1.1.3 SPF 大鼠

SPF 级 SD 大鼠 5 只, 体重 200 ~ 250 g, 2 月龄,

由中国食品药品检定研究院提供【SCXK(京) 2014-0013】。实验在中国食品药品检定研究院进行【SYXK(京) 2011-0008】。

1.2 方法

1.2.1 质控样品制备

将 36℃ 培养 24 h 的金黄色葡萄球菌和木糖葡萄球菌分别用无菌生理盐水调成 10^{11} CFU 的菌悬液备用。将 75% 的冻干液和 25% 的 SPF 大鼠粪便 (高压灭菌后) 震荡混合制成混悬液, 每个冻存管中分装 180 μ L 的混悬液, 然后加入 20 μ L 金黄色葡萄球菌菌悬液作为单一阳性样品、加入 20 μ L 金葡菌和 20 μ L 木糖菌菌悬液作为混合阳性样品, 加入 20 μ L 冻干保护液作为阴性样品, 用冷冻干燥机制成冻干样品。样品采用随机编号原则进行编号。

1.2.2 质控样品均匀性试验

随机抽取每种冻干质控样品 20 管, 参照作业指导书, 对样品进行检验。阳性质控样品应检出金黄色葡萄球菌, 阴性质控样品不应检出金黄色葡萄球菌。

1.2.3 质控样品稳定性试验

将金黄色葡萄球菌能力验证质控样品于 -20℃、4℃、25℃、37℃ 保存。-20℃ 和 4℃ 于 0、1、2、3、4、5、6 周, 各抽取 2 个样品, 25℃、37℃ 于 0、1、3、5、7、14、28 d, 各抽取 2 个样品, 对质控样品进行检验。阳性样品只要能够检出金葡菌即为可用, 而阴性样品不能检出金葡菌。同时对贮藏稳定性进行评价。

1.2.4 参加实验室

全国共 28 家实验室参加了此次能力验证计划。

1.2.5 检测方法

本次能力验证建议参考 GB/T14926.14-2001 实验动物金黄色葡萄球菌检测方法。但不规定具体测试方法, 仅要求在结果报告中注明所用的检测方法。

1.2.6 结果判定标准

阴性样品和标准阳性样品的检测结果与标准结果一致, 即判定为满意结果。阴性样本检测结果或标准菌株阳性样本的检测方法与标准结果不一致, 即判定为不满意结果^[5]。

2 结果

2.1 质控样品均匀性试验结果

随机选取 20 瓶阳性、20 瓶混合样品和 20 瓶阴

性样品用于均匀性验证,所有样品以随机次序在重复性条件下分别对样品中的金黄色葡萄球菌进行检测。在 20 瓶阴性样品中均未检出目标菌,而在 20 阳性样品和 20 瓶混合样品中均检出目标菌,表明所制备的样品是均匀的。

2.2 质控样品稳定性试验结果

按照 1.2.3 的方法对所制备的质控品进行温度和运输稳定性试验,冷藏(4℃)存储 6 周,常温(2℃)放置 28 d 或高温(37℃)放置 14 d,阳性检测率均能达到 100%。常温(25℃)或高温(37℃)运输 7 d,阳性检测率也能达到 100%,也证明了所制

备质控品的稳定性达到发放要求。

2.3 实验室反馈结果及采用方法

参加此次比对共 28 个实验室,均在规定时间内给出了反馈结果;根据结果判定标准满意的实验室有 22 个,占实验室总数的 79%,不满意的实验室有 6 个,占实验室总数的 21%,这 6 家不满意实验室中,有 4 家将混合阳性样品检测为阴性,有 1 家将阴性样品检测为阳性,有 1 家将阳性样品检测为阴性。本次结果不公布具体实验室名称,仅以实验室编号进行统计,实验室编号从 NIFDC-PT-011-001 ~ NIFDC-PT-011-028,具体结果见表 1。

表 1 实验动物金黄色葡萄球菌检出能力验证结果汇总

Tab.1 Summaries of validation of the detection ability of *Staphylococcus aureus* in laboratory animals

实验室编号 Lab code	样品 1 Sample 1	样品 2 Sample 2	样品 3 Sample 3	检测方法 Detection method	判定结果 Results
NIFDC-PT-011-001	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-002	+	-	-	GB	×
NIFDC-PT-011-003	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-004	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-005	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-006	+	-	-	GB	×
NIFDC-PT-011-007	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-008	+	-	+	PCR	√
NIFDC-PT-011-009	+	-	-	GB	×
NIFDC-PT-011-010	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-011	+	+	+	GB	×
NIFDC-PT-011-012	-	-	+	GB	×
NIFDC-PT-011-013	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-014	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-015	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-016	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-017	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-018	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-019	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-020	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-021	+	-	-	GB	×
NIFDC-PT-011-022	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-023	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-024	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-025	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-026	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-027	+	-	+	GB	√
NIFDC-PT-011-028	+	-	+	GB	√

注:样品 1 为阳性质控品,样品 2 为阴性质控品,样品 3 为混合阳性质控品;这里的样品 1、2、3 分别代表的是 1 组样品;GB 表示国标,√表示满意,×表示不满意。

Note. Sample 1: Positive control. Sample 2: Negative control. Sample 3: Mixed positive control. Samples 1, 2, 3 represent a group, respectively. GB represents national standard. √ represents satisfactory, and × represents unsatisfactory.

3 讨论

从 NIFDC-PT-011 实验动物金黄色葡萄球菌检出能力验证计划结果报告中可以看出,本次能力验证计划共计有 28 家实验室参加,所有实验室均在规

定时间内提交了结果反馈单。其中满意结果的 22 家,占 79%,不满意结果有 6 家,占 21%,27 家实验室均参照了国标中的方法进行检测,只有 1 家实验室采用的是 PCR 方法进行检测。6 家不满意实验室中有 4 家将混合阳性样品判定为阴性,一方面说

明样品因为掺杂了木糖葡萄球菌对金黄色葡萄球菌的检测有一定的影响,致使在分离培养时出现了漏检金葡菌的现象,另一方面也说明在参加比对计划时应尽可能采用 2 种以上的培养基对样品进行检测,以免造成漏检,出现对结果的判断不正确。必要时可实行 2 人同时检测,避免出现主观判断错误。

能力验证是实验室检测质量监控的重要手段,既是实验室内部质量控制的补充,又是政府和社会了解实验室检测能力的重要方法^[9]。能力验证作为日常监督检查的辅助手段,能够有效提升实验室的检测能力。促进实验室保持有效的检测能力,同时也帮助部分实验室及时发现自身的不足并加以改进,为更好地检测实验动物提供有力的技术支撑^[5-8]。

参 考 文 献

[1] 方喜业,邢瑞昌,贺争鸣. 实验动物质量控制[M]. 北京, 中国标准出版社, 008:371-372.

- [2] GB/T14922.2-2011, 实验动物微生物学等级及监测[S]. 中国标准出版社, 2011.
- [3] CNAS-RL02, 能力验证规则[S]. 中国合格评定国家认可委员会, 2010.
- [4] CNAS-RL03, 能力验证提供者认可准则[S]. 中国合格评定国家认可委员会, 2010.
- [5] 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): 982-989.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 陈文胜, 罗建波, 刘礼平. 实验室质量监督工作探讨[J]. 华南预防医学, 2007, 33(增刊): 105-107.

[收稿日期] 2016-01-13

(上接第 190 页)

3 讨论

由于至今还没有适于 RHDV 增殖的敏感细胞,使得 RHDV 的检测成为实验动物质量控制中的一个难点。RHDV 只和人红血球发生凝集反应,与兔或其他哺乳动物红血球均无凝集反应。这是因为人红血球上存在 ABH 抗原,而其他哺乳动物均无此抗原^[6]。用人“O”型血球和 RHDV 抗原进行的血凝抑制试验仍是目前经常采用的病毒抗体诊断方法,但是有些 RHDV 的病毒株在通常温度下没有血凝反应,而且血凝抑制实验操作较为繁杂,受实验人操作手法影响较大。而酶联免疫吸附试验(ELISA)在某种程度上比血凝抑制实验灵敏度更高,更易于标准化。

本次能力验证共有 20 个实验室参加,全部实验室均反馈结果,仅有 3 个实验室为不合格结果,合格率达到 85%。其中 12 个实验室仅采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法,2 个实验室同时采用了 ELISA 和血凝抑制(HAI)两种方法,在 14 个采用 ELISA 检测方法的实验室中,12 个实验室采用进口试剂盒(XpressBio 公司),结果均为优秀;1 个实验室未注

明试剂盒来源,结果为优秀;1 个实验室采用国产试剂盒,结果为不合格。其余 6 个实验室均采用 HAI 方法,其中 3 个实验室为优秀结果。其中 14 个采用 ELISA 检测方法的实验室对于弱阳性样品检测结果均为阳性,8 个采用了 HAI 检测方法的实验室对弱阳性样品检测结果 5 个为阳性。分析表明 ELISA 检测方法具有更好的灵敏度。

参 考 文 献

- [1] 田克恭,贺争鸣,刘群,等. 实验动物疫病学[M]. 中国农业出版社, 2015.
- [2] GB/T14926.21-2008 [S]. 2008.
- [3] GB/T14926.54-2001 [S]. 2001: 15-18.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S]. CNAS-GL03, 2006.
- [5] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证结果的统计处理和评价指南[S]. CNAS-GL02, 2006.
- [6] Ruvoen-Clouet N, Ganiere JP, André-Fontaine G, et al. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family [J]. J Virol. 2000, 74(24): 11950-11954.

[收稿日期] 2016-01-13