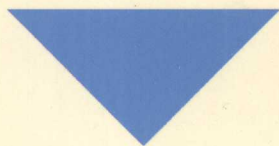




国家认监委实验室能力验证 技术报告汇编

国家认证认可监督管理委员会 编

2006年



中国计量出版社

CHINA METROLOGY PUBLISHING HOUSE

国家认监委实验室能力验证 技术报告汇编

(2006 年)

国家认证认可监督管理委员会 编

中国计量出版社

内 容 提 要

为了有效地提升我国实验室的检测能力,由中国国家认证认可监督管理委员会组织,国内主要实验室实施的,对禽流感病毒检测、农药残留检测、钢结构焊缝检测等涉及食品安全和公共安全的12个项目进行了实验室检测能力比对实验。本书汇编了12份比对检测报告,是指导实验室工作的参考资料。

(第 0002)

国 家 认 证 认 可 委 员 会 组 织

中国计量出版社出版

北京和平里西街甲2号

邮政编码 100013

电话 (010) 64275360

<http://www.zgjl.com.cn>

北京市密东印刷有限公司印刷

新华书店北京发行所发行

版权所有 不得翻印

*

880 mm × 1230 mm 16 开本 印张 27.75 字数 764 千字

2007 年 10 月第 1 版 2007 年 10 月第 1 次印刷

*

印数 1—1 000 定价: 100.00 元

统一书号 155026-2270

编委会名单

主 编：刘卓慧

副 主 编：刘安平 肖 良 齐 晓

执行副主编：李文龙

编 委 会：刘卓慧 刘安平 肖 良 齐 晓 李文龙 周 刚

黎玉娥 谢 澄 翟培军 茅祖兴 刘来福 曹志军

周启生 吴如军 王春燕 郑顺利 苏锡辉 赵丽秀

宋全厚 程劲松 成益民 王海舟 郭建雄 马振珠

刘元新 陈丽霞 巢强国

主要执笔人：张利峰 卢行安 李昭勇 庄松娟 于利军 姜 俊

赵 俭 王冬妍 张晓磊 曾小明 佟艳春 蚁细苗

朱晓玲 马占峰 王福龙 郑 蓉 曹程明

审 校：茅祖兴 李文龙

前言

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,也是实验室质量控制的重要工作。ISO/CASCO WG28 (合格评定委员会第 28 工作组)正在准备对 1997 年发布的 ISO/IEC 导则 43 进行修订,准备出台 ISO/IEC 17043《合格评定——利用实验室间比对的能力验证》国际标准,该标准与导则 43 的一个主要变化是,它重点强调了对能力验证提供者的要求。标准分管理要素和技术要素两部分,相关条款还将在 2008 年 1 月 30 日至 2 月 1 日召开的 ISO/CASCO WG28 第三次会议上最后敲定。这个标准一旦发布,我国 1999 年依据导则 43 翻译出台的 GB/T 15483—1999 也将会跟着进行修订。这个新的国际标准的出台,对于指导各国的实验室能力验证工作具有重大意义。

作为全国实验室资质的管理部门,中国国家认证认可监督管理委员会(后简称国家认监委——CNCA)一直着力于不断提高实验室的管理水平和监测能力。能力验证作为日常监督检查的辅助手段,能够有效地提升实验室的检测能力。近年来,国家认监委一直在社会广泛关注的重点领域,尤其是食品安全领域组织能力验证活动。通过孔雀石绿、禽流感等能力验证项目,对我国的重点食品检验检测机构的能力进行了摸底考试,促进这些实验室保持了有效的检测能力,同时帮组了部分实验室及时发现自身的不足并及时改进。每次能力验证计划完成后,国家认监委都及时公布参加能力验证计划的合格实验室名单,为食品安全领域的社会委托检验和政府部门布置监督检查任务提供了可靠的选择,对促进我国的食品安全工作起到了积极的作用。

很多实验室过于看重能力验证结果,对具体负责能力验证的检验人员提出了只许成功不许失败的要求,增加了检验人员的心理负担。甚至出现了串通结果的情况,这是绝对不允许的,也是没有必要的。能力验证的结果只能证明本次能力验证活动的情况,不能说明实验室的能力好坏,只有持续参加同一项目的能力验证活动,其总体结果才能反映实验室的能力状况。

国家认监委一直对能力验证工作给予高度的重视,从成立伊始就着手制定有关能力验证的制度和办法,在 2005 年出台了《能力验证实施办法》,初步建立了全国统一的能力验证管理机制,统一规范能力验证工作,提高能力验证的有效性和权威性,规范能力验证组织者、提供者和参加者的行为,科学确定能力验证的项目,使有关各方更好地利用能力验证的结果,避免多部门开展同类项目和相近项目内容的能力验证而造成的资源浪费,避免或减少能力验证项目的科学性、可靠性不强等而产生的不必要纠纷,减轻实验室的负担,充分发挥能力验证作为评价我国实验室技术能力的作用。

国家认监委连续几年开展的能力验证活动,取得了令人满意的结果。2006 年,国家

认监委经对有关单位申报项目的遴选,综合有关方面的意见,最后确定了由北京出入境检验检疫局申报的“高致病性禽流感病毒荧光 RT-PCR 定性检测”、辽宁出入境检验检疫局技术中心申报的“食品中常见致病菌检测”、国家啤酒质检中心(青岛市产品质量所)申报的“啤酒中原麦汁浓度、双乙酰检测”等 12 个项目,为国家认监委 2006 年能力验证项目。经过各项目承担单位的积极努力,12 个项目取得了圆满成功,都顺利通过了国家认监委组织的专家验收。2007 年 4 月 12 日,国家认监委在北京召开了“2006 年国家认监委能力验证项目总结暨 2007 年能力验证项目任务布置会”,2007 年 6 月 12 日,国家认监委 13 号公告发布了参加 2006 年国家认监委 12 个能力验证项目首次提交结果为满意结果的 705 家实验室名单(有的实验室参加了多个项目并取得满意结果)。

汇集出版 2006 年 12 个项目的能力验证技术报告,既是对 2006 年国家认监委能力验证工作的一个很好总结,也是为了给今后的能力验证工作协调单位(实验室)和参加的实验室提供一些技术参考。既可作为一本档案性材料,也是一本有意义的工作指导书。

由于执笔者和编审者水平有限,本汇编相关技术报告中难免会存在一些疏漏或错误,敬请广大读者批评指正。

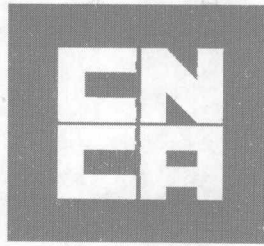
编者

2007 年 10 月

目 录

高致病性禽流感病毒荧光 RT-PCR 定性检测能力验证报告

(CNCA-06-01)	(1)
食品中常见致病菌能力验证报告 (CNCA-06-02)	(21)
啤酒中原麦汁浓度、双乙酰检测能力验证报告 (CNCA-06-03)	(61)
酱油中 3-氯-1, 2-丙二醇检测能力验证报告 (CNCA 06-04)	(105)
高钙奶中钙的测定能力验证报告 (CNCA-06-05)	(130)
葡萄酒中酒精度、干浸出物检测能力验证报告 (CNCA 06-06)	(168)
紧压茶 (边销茶) 中氟检测能力验证报告 (CNCA-06-07)	(201)
钢结构焊缝超声波检测能力验证总结报告 (CNCA 06-08)	(222)
糖中还原糖的测定能力验证报告 (CNCA-06-09)	(269)
溶剂型木器涂料中有害物质检测能力验证报告 (CNCA-06-10)	(297)
蜂蜜中果糖、葡萄糖含量检测能力验证报告 (CNCA 06-11)	(352)
水果 (浓缩水果汁) 中农药残留检测能力验证计划结果报告 (CNCA-06-12)	(373)



高致病性禽流感病毒荧光 RT-PCR 定性检测能力验证报告

(CNCA-06-01)

The Proficiency Testing Program of The Real-Time RT-PCR
For The Detection of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus

附录 A 验证结果汇总表 (表 1-2)
附录 B 高致病性禽流感病毒荧光 RT-PCR 定性检测能力验证样品制备及均匀性、稳定性技术报告
附录 C 参比实验室报告单

北京出入境检验检疫局 (AQIC) 组织
2007 年 6 月
中国认证认可监督管理委员会

目 录

- 1 前言
- 2 计划概述
 - 2.1 高致病性禽流感概述
 - 2.2 参加实验室统计
 - 2.3 方案概述
- 3 评价方法
- 4 样品传递
- 5 离群值及能力评估
- 6 统计处理结果
 - 6.1 参试实验室样品 A 的结果分布分析
 - 6.2 参试实验室样品 B 的结果分布分析
 - 6.3 参试实验室样品 C 的结果分布分析
 - 6.4 参试实验室样品 D 的结果分布分析
 - 6.5 结果分布情况分析
- 7 本次能力验证计划的结果分析和技术建议
 - 7.1 高致病性禽流感荧光 RT-PCR 检测技术特质分析
 - 7.2 不同行业实验室的差异
 - 7.3 不同检测试剂盒之间的结果差异
 - 7.4 各种荧光 PCR 检测设备及其使用的 PCR 管对结果的差异
- 8 总结
 - 8.1 本次能力验证计划的特点
 - 8.2 本次能力验证计划的创新点
 - 8.3 建议
- 9 能力验证项目组名单
 - 9.1 组织者
 - 9.2 协调者
 - 9.3 政策顾问
 - 9.4 技术顾问
 - 9.5 技术运作
- 10 依据的标准规范
- 附录 A 测试结果汇总表 (表 1-2)
- 附录 B 高致病性禽流感病毒荧光 RT-PCR 定性检测能力验证样品制备及均匀性、稳定性技术报告
- 附录 C 参试实验室指导资料清单

1 前 言

CNCA-06-01 能力验证计划是由国家认证认可监督管理委员会 (CNCA) 组织, 北京出入境检验检疫局技术中心协调, 旨在了解国内高致病性禽流感病毒检测领域的整体水平, 识别和掌握

实验室存在的差异,加强重点领域实验室能力建设,督促其保持和提高高致病性禽流感病毒的检测能力。

本次能力验证结果是实验室在高致病性禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测能力的客观反映。对取得满意结果的实验室,建议有关部门在相应领域指定、授权、委托检验任务时优先选用,在 2007 年进行实验室认可、计量认证/审查认可(授权)评审时,免于对该项目的现场实验。对于出现可疑结果的实验室,建议实验室采取相应的纠正措施;对于出现不满意结果的实验室,要求其进行原因分析,采取有效的纠正措施报协调者,由协调者安排补测。

为了保证计划的顺利实施,减少检测结果的离散性,此次能力验证对提供的检测样品中所含有的特定检测成分进行了 5 种不同的浓度水平设计,样品浓度梯度适宜,同时还制定了统一的作业指导书。根据能力验证样品要模拟实际样品和《H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》GB/T 19438.2—2004 以及生物安全的要求,采用了将 H5 亚型禽流感病毒尿囊液灭活后,分别稀释和混合均匀后进行分装,随机各抽取 3 份样品检验其均匀性和稳定性(检验结果见附录 B)。均匀性和稳定性检验结果报告表明,样品充分混匀和稳定,从而确保能力验证过程中出现的离群值不是由样品的差异所致。北京出入境检验检疫局技术中心在规定时间内将均匀性和稳定性符合要求的样品及作业指导书分发至各参加单位。

本次能力验证所用检测样品,由北京出入境检验检疫局技术中心动物检验检疫实验室研制并进行均匀性和稳定性检验。

本次能力验证结果的统计分析和技术分析,由项目组技术专家和统计专家完成。

本次能力验证结果的报告,由北京出入境检验检疫局组织相关人员编写。

2 计划概述

2.1 高致病性禽流感概述

高致病性禽流感病毒为 OIE 规定的 A 类传染病原,各国在进出口动物检疫和国内疫情普查过程中非常重视。在各国家禽及其产品的进出口贸易活动中对禽流感有严格的监管措施,在进出口家禽、野鸟中一旦检出,将作全群销毁处理,暂停国际贸易,并造成恶劣的国际影响。

另外,从 2004 年开始,日本、韩国、泰国、越南等亚洲国家和地区全面爆发 H5 亚型高致病性禽流感病毒,至今已有数百人感染禽流感致死,世界卫生组织专家警告说禽流感比非典更可怕。高致病性禽流感病毒荧光 RT-PCR 快速检测的实验能力是衡量家禽传染病诊断实验室检测高致病性禽流感病毒结果准确性的重要标志。因此,立项进行禽流感病毒荧光 RT-PCR 定性检测能力验证,确保监测体系的核心技术能力问题得到保障具有非常重要的现实意义和政治意义。

高致病性禽流感病毒荧光 RT-PCR 快速检测技术已在 2004 年发布为国家标准,并已在国家质检总局系统、农业部属的各地动物防疫站、全国所有禽肉出口集团公司的养殖场、禽肉加工场、各地的疾病预防控制中心,包括澳门民政总署化验所等多个行业部门的实验室使用,取得明显的经济和社会效益。

2.2 参加实验室统计

根据《关于下达 2006 年国家认监委实验室能力验证计划的通知》文件,各省级(含副省级市、计划单列市)产品质量监督检验院(所)、各直属出入境检验检疫局技术中心、各相关国家产品质量中心,凡其通过的计量认证考核项目中具有本通知所列 12 个项目的检测能力的,必须参加本次能力验证,因故不能参加的,要向国家认监委书面报告,其他实验室可自愿参加的精神。

实际共有 31 个实验室报名,其中 CNCA 要求必须参加的社会检测实验室 21 个;自愿参加的社会检测实验室 8 个;自愿参加的生产企业内部实验室 1 个;港澳台实验室 1 个。31 个实验室全部按时报送了有效结果。参加能力验证的实验室大多数是国家、省、市级的出入境检验检疫系统实验室、兽医防疫实验室和疾病预防控制中心的实验室。实验室的分类和分布情况见表 1-1。

表 1-1 参加本次能力验证的实验室认证认可、分布和类别情况

地 区	实验室资质		参加实验室数量					合 计
	通过计量 认证	通过实验室 认可	检验检疫	疾控中心	畜牧兽医站	企 业	港澳台	
北京			1					1
广东		5	6	2	1			9
福建		2	2					2
江苏	1		1	1				2
广西			1					1
辽宁		2	1	1				2
湖南		1	1					1
山西		1	1					1
河南		1				1		1
黑龙江		1	1					1
山东			1					1
云南			1					1
湖北			1					1
上海				1	1			2
澳门							1	1
浙江			1					1
沈阳		1	1					1
天津		1	1					1
吉林		1	1					1
总计			22	5	2	1	1	31

由表 1-1 的统计结果可以看出, 参加该项目能力验证的实验室, 主要涉及 5 个行业的实验室, 自愿参加的实验室比例达到了 30%, 表明国内各类禽流感检测实验室已经越来越注重技术能力的管理和验证活动。从地域分布看, 19 个省、自治区和直辖市均有的实验室参加。因此, 参加本次能力验证实验室具有普遍代表性。

2.3 方案概述

2.3.1 本次能力验证方案的设计遵循 ISO/IEC 导则 43: 1997《利用实验室间比对的能力验证》与 GB/T 15483《利用实验室间比对的能力验证》。

2.3.2 每个参试实验室进行惟一性编码。在报告中只出现实验室代码, 从而对参试实验室的有关技术信息保密。

2.3.3 测试结果汇总见附录 A。

2.3.4 本次能力验证计划的检测项目是: 高致病性禽流感病毒荧光 RT-PCR 定性检测。要求参试实验室使用国家标准 GB/T 19438.2—2004《H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》。

2.3.5 本次能力验证计划共 6 份样品待检, 编号分别为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 均为含有或不含有

灭活禽流感病毒的冻干样品, 测试项目为禽流感病毒核酸的定性测试。

2.3.6 在样品发送前, 样品已经充分混匀, 并进行了均匀性和稳定试验。实验结果 (附录 B) 表明, 测试样品足够均匀, 且在运输期限中保证灭活病毒样品不会发生明显变化。

2.3.7 具体操作按作业指导书进行, 并将结果和所用方法设备填写在结果报告单上 (附录 C)。

3 评价方法

本次能力验证测试共 6 份样品, 检测项目为禽流感病毒核酸的定性检测, 对测试的结果进行了直接评价。以 6 份样品的检测结果均符合已知值为结果满意, 否则为不满意。

4 样品传递

本次能力验证样品的均匀性稳定性检测在附录 B 中都有详细的实验研究数据, 样品在常温条件下传递也能达到本次试验对样品稳定性的要求。

5 离群值及能力评估

将测试结果与已知结果进行比较, 直接判定结果正确与否。31 个实验室参加了该测试项目, 都报告了检测结果。

其中, 检测结果全部符合已知值的实验室有 30 个, 结果满意。另外有 1 个实验室的结果报告情况分别为: 代码为 10 的实验室报送的结果不满意, 该实验室对一份强阳性样本检测为阴性, 存在漏检的失误。分析其原因应该是操作人员的技术失误或者是责任心不强所致, 实验室应加强人员的责任心教育。

6 统计处理结果

6.1 参试实验室样品 A 的结果分布分析

从图 1-1 样品 A 结果分布图, 可以看到: 实验室代码为 10 的实验室在检测样品 A 时结果严重偏离样品 A 的标准 CT 值。实验室代码为 7, 8, 12, 20, 50, 58, 62, 76 等 8 个实验室的结果偏离程度较大, 且主要都是呈现检测结果 CT 值数值偏大的问题, 但均未影响到结果阴阳性的判断。

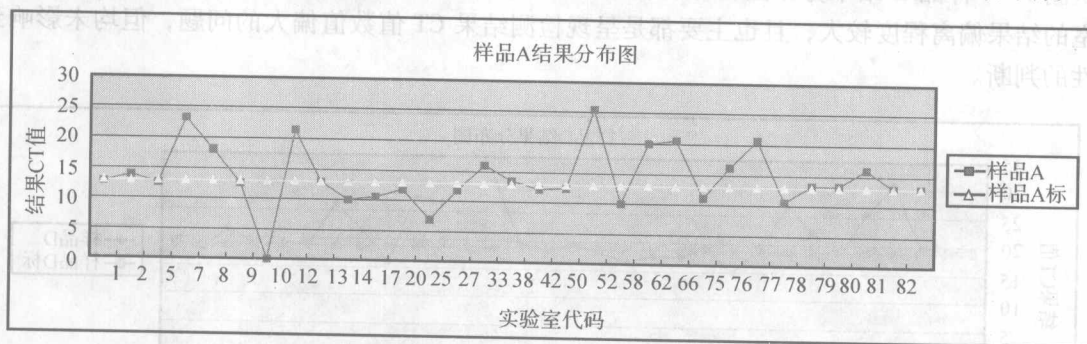


图 1-1 样品 A 结果分布图

6.2 参试实验室样品 B 的结果分布分析

从图 1-2 样品 B 结果分布图, 可以看到: 实验室代码为 1, 7, 8, 12, 50, 58, 76 等 7 个实验室的结果偏离程度较大, 且也主要都是呈现检测结果 CT 值数值偏大的问题, 但均未影响到结果阴阳性的判断。

6.3 参试实验室样品 C 的结果分布分析

从图 1-3 样品 C 结果分布图, 可以看到: 实验室代码为 7, 12, 50, 58, 76, 80 等 6 个实验室

的结果偏离程度较大,且也主要都是呈现检测结果 CT 值数值偏大的问题,但均未影响到结果阴性的判断。) 果部健美, 创为宝嘉祥村(世)补强, 民部公承登日品并, 浦盖安品种亦

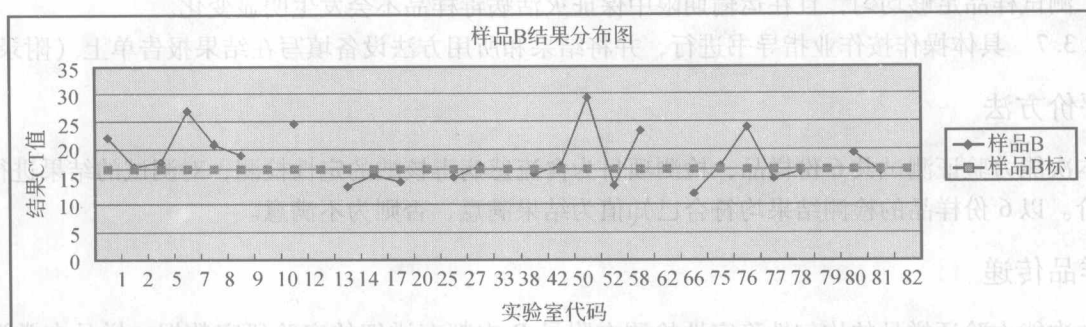


图 1-2 样品 B 结果分布图

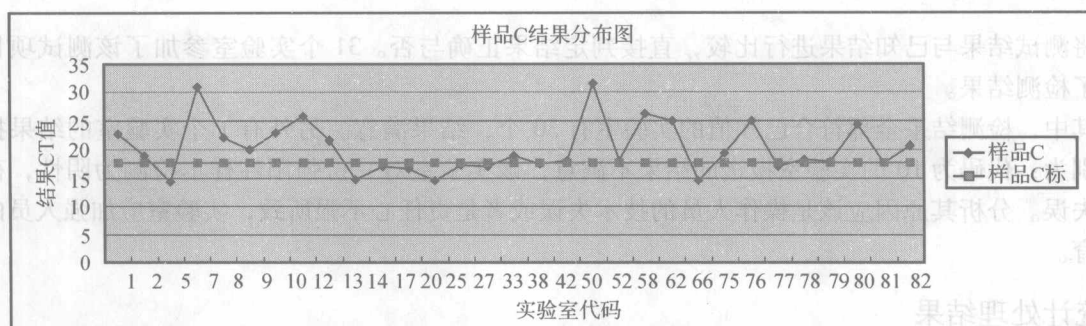


图 1-3 样品 C 结果分布图

6.4 参试实验室样品 D 的结果分布分析

从图 1-4 样品 D 结果分布图, 可以看到: 实验室代码为 7, 8, 10, 12, 50, 58, 62, 76 等 8 个实验室的结果偏离程度较大, 且也主要都是呈现检测结果 CT 值数值偏大的问题, 但均未影响到结果阴性的判断。

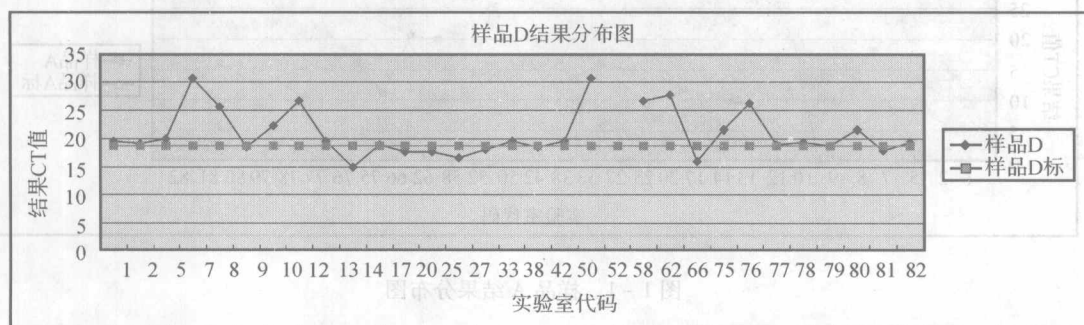


图 1-4 样品 D 结果分布图

6.5 结果分布情况分析

根据上述 4 个图的统计分析, 发现: 实验室代码为 7, 8, 12, 50, 58, 62, 76 等 7 个实验室的四类检测样品结果 CT 均偏离样品标准值程度较高。呈现出了一种系统性的检测结果漂移现象。存在一定的技术问题。

7 本次能力验证计划的结果分析和技术建议

7.1 高致病性禽流感荧光 RT-PCR 检测技术特质分析

高致病性禽流感荧光 RT-PCR 检测技术是建立在 TaqMan 技术基础上的 PCR 新技术。

该技术的要点是在普通 PCR 原有一对特异性引物基础上增加特异性的荧光双标记探针。该探针结合部位位于引物结合区域的中间 (见图 1-5)。探针的 5' 端和 3' 端分别标记不同的荧光素, 如 5' 端标记的荧光素, 它发出的荧光能够被检测仪器接收, 称为报告荧光基团 (用 R 表示), 3' 端标记的荧光素, 在近距离内能吸收 5' 端报告荧光基团发出的荧光信号, 称为淬灭荧光基团 (用 Q 表示)。当 PCR 反应在退火阶段时, 引物和探针同时与目的基因片段结合, 此时探针上 R 基团发出的荧光信号被 Q 基团所吸收, 仪器检测不到 R 所发出的荧光信号 (图 1-5A); PCR 反应进行到延伸阶段时, Taq 酶在引物的引导下, 沿着模板链合成新链 (图 1-5B); 当链的延伸进行到探针结合部位时, 此时的 Taq 酶发挥它的 5'→3' 外切核酸酶的功能, 将探针切成单核苷酸, 与此同时标记在探针上的 R 基团游离出来, R 所发出的荧光不再为 Q 所吸收而被检测仪所接收 (图 1-5C, 图 1-5D)。

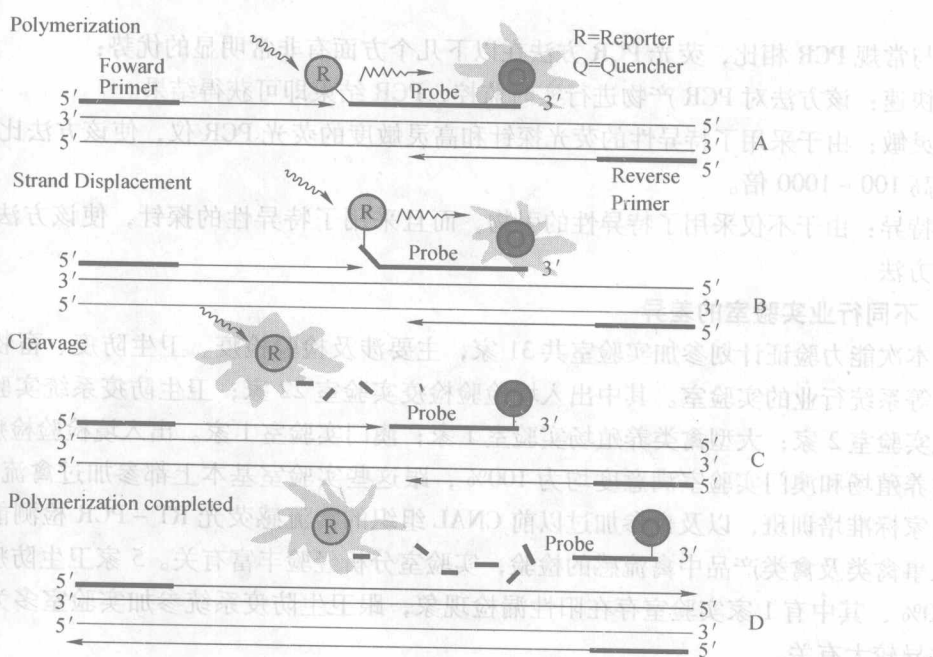


图 1-5 TaqMan 技术原理

如上所述, PCR 进行一个循环, 合成了 N 条新链的同时, 就水解了 N 条探针, 亦释放了相应数量的荧光基团。仪器所接收到荧光信号的强度与 PCR 反应产物的量呈对应关系。随着 PCR 反应的循环往复, PCR 产物呈指数形式增长, 荧光信号也相应增长。如果以每一个 PCR 循环结束时所测得的荧光值为纵坐标, 以 PCR 循环数为横坐标作图, 即可得到一条连接每一个循环后荧光值的曲线—称为扩增曲线。当检测标本中含有所要检测病原体的核酸序列时, 所得到的曲线呈“S”形; 而当标本中不含病原体, 则 PCR 过程不发生, 探针不被水解, 不产生荧光信号, 其扩增曲线为一水平线 (见图 1-6)。

PCR 扩增信号进入相对稳定对数增长期的最下限, 通常设定在 S 形扩增曲线的增长拐点处附近, 称为阈值线 (Threshold); 而扩增曲线与阈值线交叉点的循环数称为 CT 值。样本中病原体的浓度越高, CT 值就越小。以此方法测定未知标本中的病原体核酸, 不仅能快速定性, 还因为荧光 PCR 本身先进的荧光信号检测系统和强大的信息处理能力, 可以实现对病原体核酸的定量。

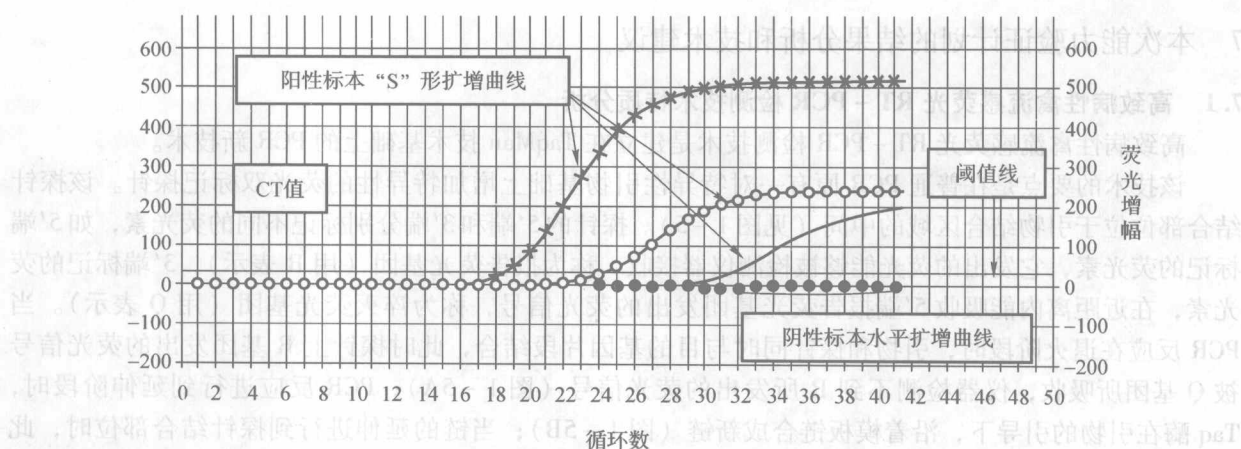


图 1-6 扩增曲线

与常规 PCR 相比, 荧光 PCR 方法在以下几个方面有非常明显的优势:

快速: 该方法对 PCR 产物进行实时监控, PCR 结束即可获得结果。

灵敏: 由于采用了特异性的荧光探针和高灵敏度的荧光 PCR 仪, 使该方法比传统的 PCR 方法灵敏度高 100 ~ 1000 倍。

特异: 由于不仅采用了特异性的引物, 而且采用了特异性的探针, 使该方法的特异性高于传统 PCR 方法。

7.2 不同行业实验室的差异

本次能力验证计划参加实验室共 31 家, 主要涉及检验检疫、卫生防疫、畜牧兽医和大型禽类养殖场等系统行业的实验室。其中出入境检验检疫实验室 22 家; 卫生防疫系统实验室 5 家; 畜牧兽医系统实验室 2 家; 大型禽类养殖场实验室 1 家; 澳门实验室 1 家。出入境检验检疫、畜牧兽医、大型禽类养殖场和澳门实验室满意度均为 100%, 跟这些实验室基本上都参加过禽流感荧光 RT-PCR 检测国家标准培训班, 以及也参加过以前 CNAL 组织的禽流感荧光 RT-PCR 检测能力验证计划, 并长期从事禽类及禽类产品中禽流感的检验, 实验室分析经验丰富有关。5 家卫生防疫系统实验室满意度为 80%, 其中有 1 家实验室存在阳性漏检现象, 跟卫生防疫系统参加实验室多为区县级实验室, 水平差异较大有关。

7.3 不同检测试剂盒之间的结果差异

针对实验室代码为 7, 8, 12, 50, 58, 62, 76 等 7 个结果偏差较大的实验室进行所使用的检测试剂盒进行调查分析, 发现: 7 号实验室在抽提 RNA 试剂采用的是深圳太太基因公司的产品; 8 号实验室用的检测试剂盒为深圳太太基因公司禽流感通用型荧光 RT-PCR 试剂盒; 12 号实验室所用试剂盒为深圳太太基因有限公司生产; 50 号实验室未报具体使用的试剂盒; 58 号实验室未报具体使用的试剂盒; 62 号实验室未报具体使用的试剂盒; 76 号实验室使用深圳太太基因公司生产的禽流感 H5 亚型实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒及其操作方法。

根据以上 7 个实验室的结果进行比较发现, 使用深圳太太基因公司的试剂所得到的检测结果普遍存在约偏移 10 个 CT 值得现象。

7.4 各种荧光 PCR 检测设备及其使用的 PCR 管对结果的差异

31 个参试实验室使用的荧光 PCR 检测设备主要有: ABI 7000; ABI 7300; ABI 7500; ABI 7900HT; ROCHE LIGHTCYCLER; MJ DNA ENGINE OPTICON2; ROTOR-GENE RG 3000; BIO-RAD ICYCLER IQ5 等机型设备。由于不同生产厂商的荧光 PCR 检测设备系列配套使用的 PCR 管均不

同,如 ROCHE LIGHTCYCLER 公司使用的是玻璃材料制作的毛细管,而其他生产厂商配套使用的多为薄壁 PCR 管或八排 PCR 管或 96 孔 PCR 光学反应板或 384 孔 PCR 光学反应板等多种系列的产品,同时还存在有 AXYGEN 公司生产的为各种荧光 PCR 仪配套使用的 PCR 反应管或反应板。目前,从现有的资料介绍和本次能力验证计划的结果与不同检测设备之间的关联度进行分析,尚未发现各种荧光 PCR 检测设备及其使用的 PCR 管对结果有明显的差异,但由于设备种类和型号众多,而且相应生产的板材种类更是繁多,且 PCR 管或板与设备并非通用。因此,建议实验室在使用相应的荧光 PCR 仪是一定要选用适宜的配套板材,以免造成结果的偏离和误差。

8 总 结

8.1 本次能力验证计划的特点

本次能力验证活动有以下几个特点:

第一,使用的标准方法统一。该检测国家标准从 2004 年发布实施以来已广泛应用于全国各行业高致病性禽流感的防控检测活动中,其快速、准确、灵敏和操作方便的技术特点非常适合于口岸疫病监测和国内疫情的防控需要,而且得到了实践检验,为国家的禽流感防控和促进农产品出口提供了有力的技术支撑。因此,本次能力验证规定选用该检测国家标准,也是在全国对该检测国家标准使用情况的一次验证和推动。

第二,参加实验室踊跃。2005 年中国实验室国家认可委员会组织,由北京出入境检验检疫局承办的 CNAL T0168 高致病性禽流感病毒定性检测能力验证计划共有 30 家实验室自愿参加,根据 CNCA《关于下达 2006 年国家认监委实验室能力验证计划的通知》的要求和 CNAS 的实验室认可能力验证规定,除检验检疫系统外的实验室可以自愿参加,但是,仍有部分实验室再次参加了禽流感的荧光 RT-PCR 检测能力验证计划,这也说明国内实验室对能力验证活动的重视和对外部质量控制有强劲的需求。

8.2 本次能力验证计划的创新点

第一,是我国首次在动物检疫和生物安全领域开展强制能力验证活动。近年来在国际范围内发生的因为高致病性禽流感造成的人员死亡和食品安全恐慌,以及给畜牧养殖业造成的严重的打击,使各国政府对禽流感检疫问题给予了前所未有的高度重视。认识到禽流感的“能力验证活动”能对提高实验室的检疫能力和质量控制起到重要的作用。本次组织的能力验证活动,客观反映我国实验室检测禽流感的技术水平,为领导决策提供了科学、客观、有力的数据,具有非常重要的现实意义。

第二,解决了以高致病性禽流感为代表的动物检疫领域能力验证样品制备技术。开展高致病性禽流感病原学检测能力验证首先就要面对能力验证样品传递的生物安全、生物活性和稳定性差等问题。在本次能力验证中经过对样品的灭活和病毒活性检验,以及冻干处理等一系列样品制备技术的研究,顺利地解决了样品的生物安全和样品保存稳定性差等问题。

第三,本次能力验证的方案设计是在质检总局科技成果《禽流感检疫能力验证规范》基础上广泛征求技术专家建议,规范化运作的结果。完善和打造了一个在动物检疫领域能力验证结果的国际互认平台,又切合我国动物检疫实验室特点,具有可操作性的动物检疫实验室能力验证模式,从而规范动物检疫实验室的能力验证活动,并使之标准化、规范化和国际化。

8.3 建议

8.3.1 新类型样品的制备

随着我国能力验证活动开展的不深入,我国的动物检疫领域能力验证活动也必将走向国际实验室间能力验证的互认和组织承办舞台。因此,如何在国际范围内进行诸如高致病性禽流感尤其是病原学方面的检测能力验证活动,也摆在了我们面前。开展国际间实验室禽流感等生物安全风险较高的能力验证活动,首要的就是如何制备既贴近检测工作中的实际样品状态,又能满足国际间传递和生物信

息和核酸资源的保密工作。一个思路就是传递病毒或细菌的核酸材料。

8.3.2 样品的安全性保障

病原学实验是动物检疫的一项重要工作,验证实验室在病原学检测能力非常重要。然而,生物材料如血液制品或组织样品如果含有活病毒或细菌就有生物安全的问题。我们建议一般首选将病毒或细菌灭活的方法。病毒或细菌灭活的方法有很多,但是同一种方法不一定对各种病毒或细菌都有作用。因此,在进行具体的样品制备时一定要具体问题具体研究,要用实验来证明灭活的效果。

一般证明灭活病毒效果的方法有以下几种:

- 1) 用 PCR 或荧光 PCR 等方法检测灭活后病毒液中病毒是否存在,病毒量的变化情况。
- 2) 用免疫学的方法检测灭活后病毒液中病毒的抗原决定簇是否有变化。
- 3) 用动物接种试验、组织培养试验或其他培养活病毒的方法检测病毒的灭活效果。

8.3.3 动物检疫领域试剂评价体系和机制的建立

从本次能力验证活动结果分析来看,影响检测结果的最大因素就是试剂问题。因此,对国内外相关生物检测试剂盒进行评价,建立评价机制的活动应该尽快实施和开展。

9 能力验证项目组名单

9.1 组织者

国家认证认可监督管理委员会实验室与检测监管部

联系人:肖良 李文龙 周刚

电话:010-82262768, 82262769, 82262770

9.2 协调者

北京出入境检验检疫局

联系人:刘来福 张鹤晓 张利峰

电话:010-58619121, 58648624, 58648626

9.3 政策顾问

肖良 CNCA 实验室与检测管理部

副主任

李文龙 CNCA 实验室与检测管理部评审管理处

处长

翟培军 CNAS 能力验证处

处长

9.4 技术顾问

茅祖兴 CNAS 能力验证处

技术专家

马贵平 北京出入境检验检疫局技术中心

研究员

张鹤晓 北京出入境检验检疫局动物检疫中心

研究员

赖平安 北京出入境检验检疫局动物检疫中心

研究员

9.5 技术运作

刘来福 北京出入境检验检疫局科技处

副处长

张利峰 北京出入境检验检疫局技术中心

兽医师

万鹏 北京出入境检验检疫局技术中心

工程师

高志强 北京出入境检验检疫局技术中心

兽医师

段向英 北京出入境检验检疫局技术中心

兽医师

谷强 北京出入境检验检疫局技术中心

兽医师

张向东 北京出入境检验检疫局技术中心

助理兽医师

10 依据的标准规范

[1] NATA 能力验证指南