

实验小鼠肾匀浆中苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1 实验室检测能力验证结果评价

王洪, 魏杰, 于鹏丽, 巩薇*, 岳秉飞*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 目的 通过实验小鼠肾匀浆中苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1 检测能力验证计划, 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, 通过样品制备, 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 10 个实验室参加本次能力验证项目, 其中满意结果的实验室 8 个, 占总参加机构的 80%, 不满意的实验室有 2 个, 占 20%。结论 实验动物质量检测机构在实验小鼠肾匀浆中苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1 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】 能力验证; 实验动物; 苹果酸酶-1; 异柠檬酸脱氢酶-1

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 02-0199-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.02.017

Laboratory proficiency evaluation of the detection ability of malic enzyme 1 and isocitrate dehydrogenase 1 in mouse kidneys

WANG Hong, WEI Jie, YU Peng-li, GONG Wei*, YUE Bing-fei*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To investigate the detection capacity of malic enzyme 1 and isocitrate dehydrogenase 1 (Mod1 & Idh1) in the laboratory animal monitoring laboratories in China in order to understand the detection capacity of laboratories and to improve the detection level of laboratory animals' quality. **Methods** Based on the program approved by CNAS, samples preparing, homogeneity test and stability test of malic enzyme 1 and isocitrate dehydrogenase 1 in the mouse kidneys were carried out. Standard operation procedure and samples with random numbers were distributed to the laboratories. The laboratories should submit the result reports before the time limit expires. If the laboratory reports were the same with the standard results, the laboratories will receive satisfactory remark. If laboratory reports were not the same with the standard results, the laboratories will receive unsatisfactory remark. If a laboratory did not submit report, the laboratory will also receive unsatisfactory result. **Results** Eight laboratories out of 10 (80%) enrolled laboratories reported satisfactory experiment results, and two laboratories (20%) presented unsatisfactory results. **Conclusions** The whole detection level of laboratories in Mod1 & Idh1 is relatively high in the laboratory animals monitoring laboratories in China. It can reflect the detection level of laboratories to conduct the laboratory capacity evaluation.

【Key words】 Capacity evaluation; Laboratory animal; Malic enzyme 1; Isocitrate dehydrogenase 1

Corresponding author: YUE Bing-fei, Email: y6784@126.com. GONG Wei, Email: hou20121221@126.com

[基金项目] 实验用动物病原分子生物学快速检测新技术研究与应用(编号:2015BAI07B02)。

[作者简介] 王洪(1977-), 女, 副研究员。研究方向: 动物遗传学。E-mail: littstar@163.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。巩薇(1973-), 女, 副研究员。研究方向: 实验动物管理。E-mail: hou20121221@126.com

实验动物质量控制是保证实验动物质量和动物实验可靠程度的根本手段,全国已经通过国家实验动物质量检测机构技术审查的实验室有 20 多家。各省市级药检院也配备有相应的进行动物实验和实验动物质量控制的实验室。为了增加实验室间的技术交流,提高检测水平,按照实验室认可和实验室资质认可的有关要求,中国食品药品检定研究院-国家实验动物质量(遗传、微生物)检测中心,组织实施本次能力验证活动:NIFDC-PT038“实验小鼠肾匀浆中苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1 检测”。

实验室能力验证计划是通过实验室间检测结果的比对来衡量实验室能力的活动,是实验室证明其检测技术能力水平的一种手段。能力验证是国际通行的实验室质量控制方法,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。生化标记检测法是近交系实验小鼠遗传质量评价的重要方法,国家标准 GB/T14927.1-2008 中要求进行 14 个生化标记位点的测定,其中小鼠肾匀浆中的苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1,这两个位点要求的检测技术具有一定的难度。

本次实验室间比对的目的是要了解参加实验室在本检测项目的技术水平和能力,分析考察实验室间差异,从而掌握实验室检测能力,为加强质量管理体系建设提供数据支持。更重要的是发现并解决检验中存在的问题,促进各实验室加强质量管理,完善程序,提高检测水平^[1]。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验动物:SPF 级 8 周龄雄性小鼠 C57BL/6 和 BABL/c 各 10 只来源于中国食品药品检定研究院【SCXK(京)2014-0013】。SPF 级 8 周龄 CBA 雄性小鼠 10 只,来源于上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK(沪)2012-0002】。按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 检测样品

本次比对试验提供的被测样品为小鼠肾匀浆冻干样品。制备方法:按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀,处死动物,剖腹,取小鼠肾脏 2 只,加入蒸馏水,蒸馏水与脏器的比例为 2:1(V/W)。匀浆后,放置到 4℃ 低温高速离心机中,15 000 r/min,30 min。取上清,加一定体积的保护剂,分装,每瓶装量 100 mg,用冻干机冻干。小鼠肾匀浆冻干样品

为红色固体。加盖,封口膜封口,封口袋包装。采用随机数字方式编号(表 1)。贮藏条件为密封,冷藏。每个参加实验室分配 3 瓶样品,通过冷链运输方式运输。样品已经经过均匀性和稳定性检查,满足质量控制的要求^[2-4]。

表 1 能力验证样品随机分组编号

Tab.1 Random numbers of the samples

序号 Serial numbers	单位代码 Institution numbers	样品编号 Sample numbers
1	905	CBG0080010, CBG0070007, CBG0060006
2	090	CBG0080001, CBG0070010, CBG0060004
3	929	CBG0080005, CBG0070008, CBG0060005
4	468	CBG0080003, CBG0070002, CBG0060003
5	766	CBG0080008, CBG0070005, CBG0060002
6	826	CBG0080002, CBG0070006, CBG0060010
7	404	CBG0080009, CBG0070009, CBG0060001
8	301	CBG0080004, CBG0070001, CBG0060007
9	286	CBG0080007, CBG0070003, CBG0060009
10	017	CBG0080006, CBG0070004, CBG0060008

1.3 参加实验室

本次能力验证活动面向全国药检系统和实验动物质量检测中心以及相关企业检测实验室。报名参加本次能力验证活动的实验室共计 10 个,10 家实验室全部提交有效结果。10 家实验室主要是实验动物检测中心、疾控中心、高校和企业内部实验室。10 家实验室主要分布于北京、上海、广东、湖南、湖北、辽宁、吉林、陕西和新疆等地。

1.4 比对项目

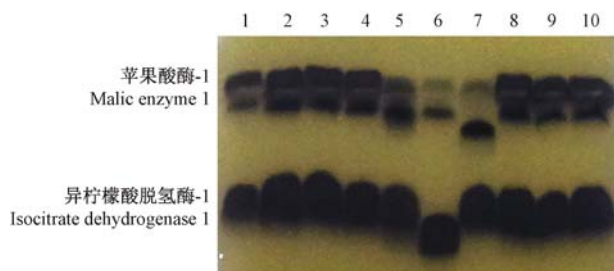
本次试验要求进行小鼠肾匀浆中苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1 检测,检测指标包括苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1a 基因型和苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1b 基因型。

1.5 实验方法

本次能力验证活动没有要求统一的检测方法,以各实验室上报的检测结果作为依据。为保证检测结果具有可比性,所提供的样品无需加工处理,可直接开封,加入 70 μ L 蒸馏水溶解后取样测定。检测结果为定性的结果,报告基因型 a 型或者 b 型。测定完成后将结果报告单与原始记录一并提交。

1.6 评价方法^[5]

本次能力验证活动的结果是定性的结果,依据国家标准 GB/T14927.1-2008,对各实验室提供的检测结果进行评价,实验室提供的结果与标准结果一致时,判定为满意结果;实验室提供的结果与标准结果不一致时,判定为不满意结果。如图 1 所示。



注: 1. 样品 1; 2. 样品 2; 3. 样品 3; 4. 样品 4; 5. 标准 1; 6. 标准 2; 7. 标准 3; 8. 样品 5; 9. 样品 6; 10. 样品 7。

图 1 苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1 均一性检验

Note. 1. Sample 1; 2. Sample 2; 3. Sample 3;

4. Sample 4; 5. Standard 1; 6. Standard 2;

7. Standard 3; 8. Sample 5; 9. Sample 6; 10. Sample 7.

Fig. 1 Results of the homogeneity test of malic enzyme 1 and isocitrate dehydrogenase 1

2 结果

小鼠肾匀浆中苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1 能力验证结果:

本次比对样品共发放给 10 家报名实验室, 提交有效结果的实验室共 10 个, 获满意结果的实验室 8 家, 占参加单位的 80%; 不满意结果有 2 家, 占参加单位的 20%。见表 2。

3 讨论

从各实验室反馈的原始记录中统计, 本次能力验证活动各实验室均采用国家标准 GB/T14927. 1 - 2008 推荐的生化标记检测法。

表 2 能力验证苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1 结果统计一览表

Tab. 2 Results of testing for malic enzyme 1 and isocitrate dehydrogenase 1

序号 No.	代码 Code	样品编号 Sample numbers	苹果酸酶-1 Malic enzyme 1		异柠檬酸脱氢酶-1 Isocitrate dehydrogenase 1		Remarks
			标准结果 Standard results	实际结果 Real results	标准结果 Standard results	实际结果 Real results	
1	905	CBG0080010	B	B	B	A	*
		CBG0070007	B	B	A	A	
		CBG0060006	A	A	A	A	
2	090	CBG0080001	B	B	B	B	
		CBG0070010	B	B	A	A	
		CBG0060004	A	A	A	A	
3	929	CBG0080005	B	B	B	B	
		CBG0070008	B	B	A	A	
		CBG0060005	A	A	A	A	
4	468	CBG0080003	B	B	B	B	
		CBG0070002	B	B	A	A	
		CBG0060003	A	A	A	A	
5	766	CBG0080008	B	B	B	B	
		CBG0070005	B	B	A	A	
		CBG0060002	A	A	A	A	
6	826	CBG0080002	B	B	B	B	
		CBG0070006	B	B	A	A	
		CBG0060010	A	A	A	A	
7	404	CBG0080009	B	B	B	B	
		CBG0070009	B	B	A	A	
		CBG0060001	A	A	A	A	
8	301	CBG0080004	B	B	B	B	
		CBG0070001	B	B	A	A	
		CBG0060007	A	A	A	B	
9	286	CBG0080007	B	B	B	B	
		CBG0070003	B	B	A	A	
		CBG0060009	A	A	A	A	
10	017	CBG0080006	B	B	B	B	
		CBG0070004	B	B	A	A	
		CBG0060008	A	A	A	A	

注: * 为不满意结果

Note. * means unsatisfactory result.

3.1 能力验证的重要性

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,同时帮助部分实验室及时发现自身的不足并加以改进。我们在 2013 年实施相关的能力验证计划时,发现有 1 家实验室不具备相应的检测能力。同一家实验室,在 2015 年的能力验证活动中依然反馈了不满意结果。说明该实验室的质量体系存在一定问题,有必要通过持续地参加相应的能力验证活动来促进该检测实验室加强实验室的质量管理,便于促进检测水平的提高。

3.2 不满意结果的原因分析

不满意结果的实验室有 2 家:代码为 905 的实验室将样品 CBG0080010 的异柠檬酸脱氢酶-1 判断为 A 型,而标准结果是 B 型。代码为 301 的实验室将样品 CBG0060007 的异柠檬酸脱氢酶-1 判断为 B 型,而标准结果是 A 型。这两家实验室提供的结果与标准结果不一致,判定为不满意结果。代码为 905 的实验室提供的原始结果图,条带可见,但没有图注释,无法进一步分析不满意结果的原因。代码为 301 的实验室提供的原始结果图,无法看到条带,也不能进一步分析不满意结果的原因。

3.3 没有进行的操作不应该出现在原始记录中

本次能力验证发放的是冻干样品,不需要进行样本采集、离心、匀浆等操作步骤,因此这些没有进行的操作不应该出现在原始记录中。有 2 家实验室没有按照实际情况进行原始记录。

3.4 原始记录的复核人以及审核人有漏签的情况发生。

3.5 原始记录中的醋酸纤维素膜电泳图应拍照,利于长期保存

醋酸纤维素膜显色会随着时间逐渐变淡直至完全褪去,虽然可以体现实验结果的原始性,但不利于结果的长期保存,建议拍照存档。

3.6 图题和图注应详细标注

内容详尽的图题和图注有利于实验结果的分析,尤其是对不满意结果的原因分析。这次参加能力验证的实验室有个别实验室没有图题和图注,无法对结果作分析判断。

3.7 多数实验室能够提供清晰内容详尽的原始记录电泳图(如图 2 所示)

3.8 组织对实验室的培训宣贯

一次能力验证的结果只能证明实验室参加的本次能力验证活动的情况,不能说明实验室的检测水平,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^[6-10]。CNAS-RL01:2011《实验室认可规则》、CNAS-RL02:2010《能力验证规则》规定申请认可和获准认可的实验室必须通过参加能力验证活动(包括 CNAS 组织实施或承认的能力验证计划、测量审核)证明其技术能力。只有在能力验证活动中表现满意,或对于不满意结果能证明已开展了有效纠正措施的实验室,CNAS 方受理认可申请或予以认可。当不满意结果已不能符合专业标准或规范时,除实施纠正措施并验证其有效性外,实验室还应自行暂停在相应项目的证书/报告中 CNAS 认可标识。在验证纠正措施有效后,实验室可自行恢复使用认可标识。对不能满足能力验证领域和频次要求,或虽参加了能力验证但结果不满意且未在 180 天(能力验证结果报告发布之日起)内开展纠正措施及其验证活动的实验室,CNAS 可撤销其相应项目的认可资格。对参加了 CNAS 组织及其承认的能力验证活动且有稳定满意表现的实验室,在 CNAS 的各类评审中可考虑适当简化相关项目的能力确认过程。实验室应保存上述记录以备评审组检查^[11,12]。

通过实施本次实验小鼠肾匀浆中苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1 检测能力验证计划,我们发现,全国药检系统和实验动物质量检测中心以及相关企业检测实验室具备苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1 检测能力,个别实验室的检测水平需要提高,对个别检测能力有待提高的实验室建议加强质量管理体系的建设,尽快提高检测能力。每次能力验证计划完成后,CNAS 都及时公布参加能力验证计划的合格实验室名单,为各级政府管理部门利用实验室资源提供了基础数据,为实验动物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依据,对促进我国的实验动物工作起到了积极的推动作用。

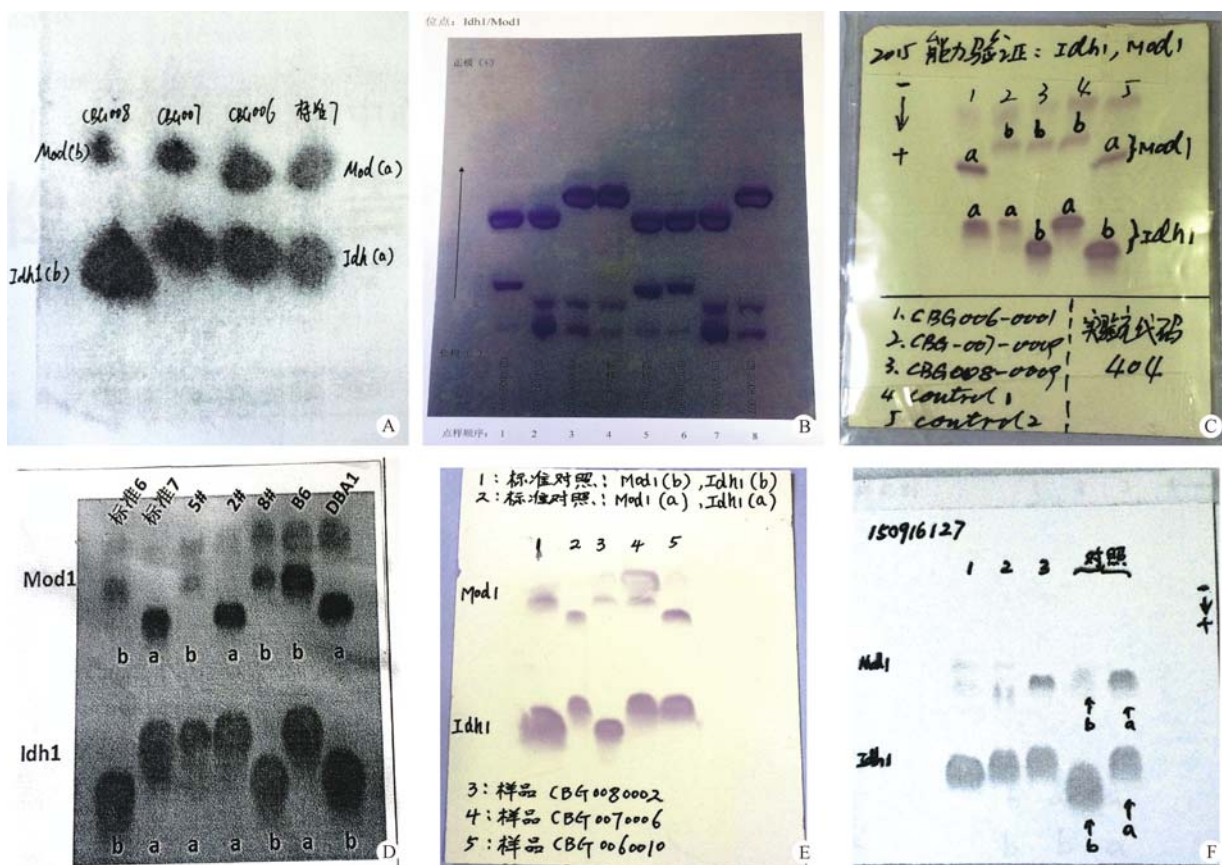


图 2 分别为代码 090 实验室(A), 代码 286 实验室(B), 代码 404 实验室(C), 代码 766 实验室(D), 代码 826 实验室(E)和代码 929 实验室(F)的原始记录

Fig. 2 Original records of the No. 090 laboratory (A), No. 286 laboratory (B), No. 404 laboratory (C), No. 766 laboratory (D), No. 826 laboratory (E) and No. 929 laboratory (F)

参 考 文 献

[1] 刘丽娜, 毛歆, 金红宇, 等. 全国药检系统酸枣仁中黄曲霉毒素残留比对试验 [J]. 中国药事, 2013, 27(8): 790 - 793.

[2] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS/GL03 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2006.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS/GL02 能力验证结果的统计处理和评价指南 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2006.

[6] 卢大伟, 白东亭. 医疗器械比对试验组织实施工作的总结与思考 [J]. 中国药事, 2013, 27(1): 73 - 78.

[7] 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.

[8] 项新华, 赵素娟, 宋景平. 北京地区室内空气质量检测机构 TVOCs 能力验证结果评价 [J]. 环境卫生学杂志, 2013, 3(1): 60 - 62.

[9] 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.

[10] 于欣, 毛歆, 肖静, 等. 全国药检系统实验室间比对工作的分析和思考 [J]. 中国药事, 2013, 27(11): 1154 - 1156.

[11] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-RL01: 2011《实验室认可规则》[S]. 北京: 中国计量出版社, 2011.

[12] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-RL02: 2010《能力验证规则》[S]. 北京: 中国计量出版社, 2010.

[收稿日期] 2016-01-13