

猪细小病毒核酸检测实验室能力验证结果分析

李晓波, 王吉, 王洪, 王淑菁, 王莎莎, 秦晓, 李威, 岳秉飞, 付瑞

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 国家啮齿类实验动物资源库, 北京 102629)

[摘要] **目的** 通过实施猪细小病毒 (porcine parvovirus, PPV) 核酸检测实验室能力验证计划, 了解相关检测实验室的检测水平, 规范 PPV 核酸检测。**方法** 2022 年 1—8 月, 中国食品药品检定研究院组织开展针对猪血清样品中 PPV 核酸检测的实验室能力验证计划 (编号 NIFDC-PT-364)。按照中国合格评定国家认可委员会 (China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS) 相关准则, 通过在 PPV 为阴性的猪血清中加入灭活的 PPV, 制备能力验证样品。样品经均一性、稳定性测试合格后, 发放各参加实验室。每个实验室发放 3 个样品。要求各实验室对 PPV 核酸进行定性检测, 并在规定时间内提交结果及相关原始记录。最后对各实验室提交的结果进行汇总分析。**结果** 共有 9 家实验室报名参加本次能力验证, 均在规定时间内反馈结果。其中 8 家实验室结果符合预期, 占比 88.9%; 1 家实验室的 3 个样品均检测为 PPV 阳性, 与预期结果不符, 判为不满意。大多数实验室采用实时荧光 PCR 检测方法, 核酸提取采用国产试剂的实验室占多数, 而 PCR 扩增试剂以进口试剂为主, 采用不同品牌的试剂未对检测结果产生影响。个别实验室存在实验结果图谱不清晰、原始记录信息不全等问题。**结论** 各参加实验室大多具备 PPV 核酸检测能力, 检测细节方面还有待提升。

[关键词] 猪细小病毒; 能力验证; 核酸; 聚合酶链式反应

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)06-0490-08

Analysis of Laboratory Proficiency Testing Results on the Detection of Porcine Parvovirus Nucleic Acid

LI Xiaobo, WANG Ji, WANG Hong, WANG Shujing, WANG Shasha, QIN Xiao, LI Wei, YUE Bingfei, FU Rui

(National Rodent Laboratory Animal Resources Center, Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Correspondence to: FU Rui (ORCID: 0000-0003-0321-2773), E-mail: furui78@nifdc.org.cn

[ABSTRACT] **Objective** To understand the testing level of the relevant laboratories and standardize the detection of porcine parvovirus (PPV) nucleic acid by implementing laboratory proficiency testing plan of the PPV nucleic acid testing. **Methods** From January to August 2022, NIFDC organized the laboratory proficiency testing plan for PPV nucleic acid detection (plan number: NIFDC-PT-364). According to relevant CNAS standards, inactivated PPV was added into the serum of PPV negative pigs to prepare proficiency testing samples. After passing the homogeneity and stability tests, the samples should be distributed to the participating laboratories. Each laboratory was distributed 3 samples and was required to conduct qualitative detection of PPV nucleic acid, and submit the results and relevant original records within the specified time. Finally, the results submitted by each laboratory were summarized and analyzed. **Results** A total of 9 laboratories registered to participate in this proficiency testing, and all of them fed back the results within the specified time. Among them, the results of 8 laboratories met the expectations, accounting for 88.9%. Three samples from one laboratory were all tested positive for PPV, which was not consistent with the expected results, and it was judged as unsatisfactory. Most laboratories adopted real-time fluorescent PCR detection method, and used domestic reagents for nucleic acid extraction, while the PCR amplification reagents were mainly imported reagents. The use of different brands of

[基金项目] 国家重点研发计划“基础科研条件与重大科学仪器设备研发”重点专项“实验动物新发病原检测与抗体评价关键技术体系建立” (2021YFF0703100)

[第一作者] 李晓波 (1980—), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: lxb493059@163.com;

王吉 (1974—), 女, 硕士, 研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: wj_nd_jds@sina.com

[通信作者] 付瑞 (1978—), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: furui78@nifdc.org.cn。ORCID: 0000-0003-0321-2773

reagents didn't have impact on the detection results. There were some problems in some laboratories, such as unclear diagram of experimental results and incomplete information of original records. **Conclusion** Most of the participating laboratories are capable of PPV nucleic acid detection, but the detection details need to be improved.

[Key words] Porcine parvovirus; Proficiency testing; Nucleic acid; PCR

猪作为医学研究中常用的实验动物,目前已广泛应用于人类疾病动物模型、新药安全性评价及异种器官移植等领域。猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)可使猪罹患猪细小病毒病,是世界范围内猪繁殖障碍的主要病原,属细小病毒科细小病毒属;其基因组为单股DNA,无囊膜,对热、酸、碱及有机溶剂等有较强抵抗力。PPV最常见的传播途径是消化道、交配、胎盘感染及垂直传播;母猪感染后主要表现为流产、木乃伊胎、死胎,而活仔猪可变成免疫耐受性猪,从而长期带毒,成为传染源。所以,猪场一旦受到污染,几乎不可能彻底清除该病毒^[1-2]。猪细小病毒病最早发生于欧洲,后发展到北美、亚洲,在我国多地出现过流行^[3]。PPV的实验室检测技术主要包括病毒的分离培养、血清学方法[血凝抑制试验、免疫荧光法、酶联免疫吸附(ELISA)等]和聚合酶链式反应(PCR)等,其中PCR法具有较高的检测敏感性和特异性,可有效检测猪组织样品中的PPV^[4-5]。

中国食品药品检定研究院(简称中检院)作为中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)认可的实验室能力验证提供者^[6],2022年1—8月组织了1次针对PPV核酸检测的实验室能力验证计划(NIFDC-PT-364猪血清样品中PPV核酸检测能力验证计划),为国内实验动物领域的首次。本计划依据CNAS相关准则^[7-8]实施,由中检院实验动物资源研究所实验动物质量检测室(以下简称本检测室)落实。本文对该计划实施情况进行总结分析,具体如下。

1 材料与方法

1.1 能力验证样品来源

猪血清来自本检测室日常接收的外单位送检样品[中检动(福)第2021(A)007号],参考行业标准SN/T 1919—2016《猪细小病毒病检疫技术规范》,采用实时荧光定量PCR法检测确认PPV核酸为阴性,同时采用ELISA检测确认PPV抗体为阴性,即确保所用猪血清为PPV双阴性。PPV NADL-2株购自美国模式

培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)(编号:VR-742™),本检测室用猪肾细胞PK-15传至第21代,本次能力验证使用的是第21代病毒细胞培养液,经测定,其半数组织培养感染剂量(median tissue culture infective dose, TCID₅₀)为10^{-6.875}/0.1 mL, -70℃冰箱保存备用。

1.2 试剂

PCR引物探针序列由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,用RNase-free水配制成工作浓度10 μmol/L;Taq Hot Start Version(批号:AJG2479A)和RNase-free水(批号:A112200A)为宝生物工程(大连)有限公司产品;核酸提取试剂cador Pathogen 96 QIAcube HT Kit(批号:163033810)为德国QIAGEN公司产品。

1.3 仪器设备

全自动核酸提取仪(德国QIAGEN,型号QIAcubeHT),荧光定量PCR仪(美国ABI,型号7500fast),生物安全柜(美国NUAIR,型号NUAIR-NU-437-400S),恒温培养型(日本SANYO,型号MIR-262),冰箱(中国海尔,型号BCD-649WE)。

1.4 参加实验室

全国共9家实验室报名参加本次能力验证计划。其中,省级实验动物质检系统实验室(含国家质检中心)、科研院所及企业各3家。实验室所在地区分布于北京、上海、广东、江西、江苏、湖北及黑龙江等地。

1.5 能力验证样品的制备与分装

能力验证样品的制备与分装均在生物安全2级实验室进行。操作在生物安全柜内完成。日常收检的猪血清样品,采用实时荧光定量PCR法检测PPV,将经检测为阴性的样品混合,作为能力验证阴性样品。PPV细胞培养上清液,经80℃水浴灭活10 min,灭活后的病毒培养液与阴性样品按照体积比为1:31的比例混合,作为能力验证Ⅰ类阳性样品。将上述灭活后的病毒培养液与阴性样品按照体积比为1:1 023的比例混合,作为能力验证Ⅱ类阳性样品。将制备的阴性、Ⅰ类阳性及Ⅱ类阳性样品分装至样品管,每种分装100份,每份300 μL, -20℃保存备用。

1.6 能力验证样品的均一性、稳定性检测

1.6.1 样品均一性测试

随机抽取分装的阴性、I类阳性及II类阳性样品各16份,提取核酸,采用实时荧光定量PCR法进行检测。PCR体系:10×PCR buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL, 上下游引物各1 μL, 探针0.5 μL, Taq酶0.25 μL, 待测样品2 μL, RNase-free 水补至25 μL。反应条件:94℃ 5 min; 94℃ 15 s, 60℃ 1 min (收集信号), 共40个循环。通过计算各组样品Ct值的变异系数来判断样品的均一性, 变异系数=(标准偏差/平均值)×100%。

1.6.2 样品稳定性测试

取分装的阴性、I类阳性及II类阳性样品各30份,于4℃和37℃下分别放置1~15 d,每天各取一份,冻存于-20℃,作为保存稳定性样品。参照样品实际运输条件,在泡沫盒放置4~6个冰袋,取I类阳性、II类阳性及阴性样品各7份,和温度监控仪一起放入泡沫盒,胶带密封,室温放置7 d,每天取I类阳性、II类阳性及阴性样品各1份,冻存于-20℃,作为运输稳定性样品,同时读取电子温度计从发出到收到整个时间周期内的温度变化。保存稳定性及运输稳定性样品收集完毕后,统一提取核酸,采用荧光定量PCR法进行检测,测试样品的稳定性。

1.7 样品的发放

将分装的阴性、I类阳性及II类阳性样品采用随机数字编号,打印贴标签,封口膜封口后放入封口袋封装,同时装入作业指导书。本计划对每个参加实验室赋予一个代码,凡说明参加者的检测结果和能力评价时均以代码表示。每种样品各取1份分发给各实验室,即每个实验室分到3份样品(阴性、I类阳性及II类阳性样品各1份),但参与实验室对这3份样品的阴阳性比例等信息不知情。运输过程中加入冰袋保持低温,收到样品后如不立即检测需-20℃冻存。

1.8 结果反馈

能力验证从收到样品到结果的反馈均通过线上实现。各实验室在收到能力验证样品后,需登录到中检院能力验证平台(<http://223.71.250.33/>),在规定时间内进行收样确认(样品接收当日完成)及结果报告单填写(接收样品当天起10个工作日内)等操作。

1.9 结果评价原则

本次能力验证为定性检测,检测方法参考SN/T 1919—2016《猪细小病毒病检疫技术规范》,结果以PPV核酸阳性或阴性来表示。参加比对的实验室可采

用作业指导书所推荐的实时荧光PCR方法,也可采用其他标准方法或企业内部方法。由于每个参加单位分到的3个样品均经比对实施机构即本检测室检测确定阳性或阴性,因此将参与比对实验室的检测结果与实施机构的标准结果进行比较以确认是否相符。实验室结果与标准结果完全一致,即判定为满意结果;实验室结果与标准结果不完全一致或未按时限反馈结果,即判定为不满意结果。

2 结果

2.1 样品均一性和稳定性

随机抽取阴性、I类阳性及II类阳性样品各16份,经实时荧光PCR测定,计算各组样品Ct值的变异系数。

I类阳性样品变异系数为3.5%, II类阳性样品为2.3%, 阴性样品无Ct值,表明样品均一性良好(表1)。

I类阳性及II类阳性样品在4℃、37℃分别放置15 d,其Ct值变异系数分别为2.6%及1.3%、1.6%及2.0%, 阴性样品无Ct值,表明样品保存稳定性良好;模拟实际运输条件放置7 d, I类阳性及II类阳性样品Ct值变异系数分别为2.8%和3.3%,同时阴性样品为无Ct值,表明样品运输稳定性良好(表1)。

2.2 各实验室所用检测方法及试剂统计

9家反馈结果的实验室中,7家采用了实时荧光PCR法,占比77.8%;3家采用了PCR法,其中一家同时采用了荧光PCR和PCR两种方法。进一步分析各实验室反馈的原始记录:6家实验室提供了核酸提取试剂及PCR扩增试剂的来源及批号;1家实验室仅提供了核酸提取试剂的来源,但未注明批号;2家实验室未注明试剂来源。详见表2。

2.3 各实验室反馈结果

9家报名实验室均按时反馈了检测结果并提供原始记录,大部分实验室的原始记录比较详细明了,检测结果真实可信。通过比对结果发现,有1家结果不符合预期,其余8家均符合预期,满意率为88.9%,详见表3。

3 分析与讨论

3.1 检测方法分析

SN/T 1919—2016《猪细小病毒病检疫技术规范》是国家质量监督检验检疫总局发布的出入境行业标准,规定了猪细小病毒病的临床诊断、病毒分离、血凝抑制试验、ELISA试验、胶体金免疫、PCR及实时荧光

表1 样品均一性及稳定性测试结果(实时荧光PCR的Ct值)

Table 1 Testing results for the homogeneity and stability of samples (Ct value in real-time PCR)

样品序号 Sample No.	均一性 Homogeneity		保存稳定性 Preservation stability				运输稳定性 Transport stability	
			4 °C		37 °C		I 类阳性 II 类阳性	
	I 类阳性	II 类阳性	I 类阳性	II 类阳性	I 类阳性	II 类阳性		
1	23.7	23.3	24.4	26.5	26.7	27.9	24.2	24.4
2	23.4	22.4	24.7	27.8	26.7	27.8	23.5	24.0
3	23.2	23.7	24.6	26.9	26.1	27.0	23.7	23.9
4	23.1	24.3	25.1	27.4	26.8	28.0	25.1	23.6
5	23.4	24.2	24.9	27.3	26.8	27.9	24.8	25.3
6	21.6	23.7	24.8	26.9	26.7	28.4	24.6	25.2
7	22.5	24.3	25.4	27.4	27.0	28.6	25.3	25.7
8	22.1	23.3	26.4	27.6	27.8	29.2	-	-
9	22.6	23.9	26.3	27.5	27.6	28.6	-	-
10	20.9	24.4	25.8	27.5	27.4	28.6	-	-
11	23.4	23.6	26.0	27.7	26.7	28.3	-	-
12	23.0	24.2	25.9	27.7	27.1	28.2	-	-
13	23.3	22.9	25.9	27.3	27.1	28.5	-	-
14	23.0	23.8	26.0	27.7	27.0	28.6	-	-
15	23.8	23.8	25.4	27.2	27.5	29.3	-	-
16	22.4	23.9	-	-	-	-	-	-
$\bar{x}\pm s$	22.8±0.79	23.7±0.54	25.4±0.65	27.4±0.36	27.0±0.44	28.3±0.57	24.5±0.69	24.6±0.81
变异系数/% Coefficient of variation	3.5	2.3	2.6	1.3	1.6	2.0	2.8	3.3

表2 参加能力验证实验室采用的检测方法

Table 2 Testing methods adopted by labs participating in proficiency testing

实验室代码 Code of laboratory	检测方法 Test method	参考标准 Reference standards	核酸提取试剂 Nucleic acid extraction reagent		PCR试剂 PCR reagent	
			批号 Batch number		批号 Batch number	
			来源 Source	批号 Batch number	来源 Source	批号 Batch number
070	实时荧光PCR	SN/T 1919—2016	天根生化	无	-	-
849	实时荧光PCR	-	-	有	-	有
358	实时荧光PCR	企业 SOP	-	-	-	-
052	实时荧光PCR	SN/T 1919—2016	麦诺迪(上海)	有	麦诺迪(上海)	有
174	PCR	SN/T 1919—2016	德国 QIAGEN	有	日本 TAKARA	有
553	实时荧光PCR	SN/T 1919—2016	新百基生物	有	艾科瑞生物	有
532	PCR	企业 SOP	日本 TAKARA	有	日本 TAKARA	有
965	实时荧光PCR及PCR两种方法	SN/T 1919—2016	天根生化	有	日本 TAKARA	有
860	实时荧光PCR	SN/T 1919—2016	日本 TAKARA	有	日本 TAKARA	有

注:“-”表示记录中未注明。SOP, 标准化操作流程。
Note: “-” means not indicated in the record. SOP, standard operating procedure.

PCR的技术要求。本次能力验证要求对样品核酸进行检测, 推荐采用该行业标准中的实时荧光PCR方法, 同时并不硬性规定, 参加单位也可采用其他标准方法或企业内部方法。从反馈的结果看, 9家提交材料的实验室中, 7家(代码070、849、358、052、553、965、860)采用了实时荧光PCR法(占比77.8%), 3家(代码174、532、965)采用了PCR法, 其中一家(代码965)同时采用了荧光PCR和PCR两种方法。分析各实验室参考的检测标准, 有6家实验室(代码070、052、174、553、965、860)参考SN/T 1919—2016, 2家(代码358、532)采用企业内部SOP, 一家(代码849)未写明参考何标准(表2)。

表3 9个实验室的猪细小病毒核酸检测能力验证结果

Table 3 Proficiency testing results of 9 laboratories on detection of porcine parvovirus (PPV) nucleic acid

实验室代码	样品编号	测定结果	标准结果	结论
Code of laboratory	Sample number	Testing results	Standard results	Evaluation results
070	CB03640040-043	+	+	Y
	CB03640040-026	+	+	
	CB03640040-087	-	-	
849	CB03640071-011	+	+	Y
	CB03640071-024	+	+	
	CB03640071-085	-	-	
358	CB03640058-013	+	+	Y
	CB03640058-073	+	+	
	CB03640058-074	-	-	
052	CB03640054-016	+	+	Y
	CB03640054-001	+	+	
	CB03640054-013	-	-	
174	CB03640075-023	+	+	N
	CB03640075-054	+	+	
	CB03640075-049	+	-	
553	CB03640021-060	+	+	Y
	CB03640021-036	+	+	
	CB03640021-003	-	-	
532	CB03640043-074	+	+	Y
	CB03640043-064	+	+	
	CB03640043-056	-	-	
965	CB03640092-013	+	+	Y
	CB03640092-080	+	+	
	CB03640092-046	-	-	
860	CB03640088-034	+	+	Y
	CB03640088-037	+	+	
	CB03640088-052	-	-	

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性，“Y”表示结果满意，“N”表示不满意。
Note: “+” means positive, “-” means negative, “Y” means satisfied with the results, and “N” means dissatisfied.

结合结果满意情况进行分析，9家反馈结果的实验室中，8家为满意结果，占比88.9%；仅一家（代码174）结果为不满意，出现的问题为样品CB03640075-049检测为PPV阳性（预期应为阴性）。分析其原因，该实验室采用了PCR方法，从反馈的原始记录来看并未发现问题原因，实验对照均成立，推测可能在样品核酸提取过程或PCR反应体系配制过程出现了污染，从而出现假阳性结果。建议实验室内部在操作的每一步骤均设置对照，尤其是阴性对照，从而进一步分析具体原因。另外，实验室965同时采用了实时荧光PCR和PCR两种方法检测，结果为满意。结合历年来能力验证中采用两种以上方法进行检测的单位均得到了满意结果^[9-11]，可以得出以下结论：采用两种以上方法进行检测，两种方法互相印证，可以明显提高检测的可靠性，建议检测实验室在日常的检测工作中多储备一

些检测技术，不仅可以丰富检测手段，同时可大大提高检测准确度。但需要注意，不同检测方法的检测效能之间的差异需要经过验证，以确定不同方法检测敏感性和特异性的差异，避免出现假阳性或假阴性结果。

3.2 检测试剂分析

本次能力验证提供的阳性样品为加入灭活PPV的猪血清，需要先进行核酸提取，随后进行PCR扩增，因此检测试剂主要包括核酸提取试剂及PCR扩增试剂。6家实验室（代码052、174、553、532、965、860）提供了核酸提取试剂及PCR扩增试剂的来源及批号，1家实验室（代码070）仅提供了核酸提取试剂的来源，但未注明批号，2家实验室（代码849、358）未注明试剂来源。从是否使用国产试剂分析，有4家实验室（代码070、052、553、965）采用了国产核酸提取试剂，3家（代码174、052、860）采用进口试剂；

有2家实验室(代码052, 553)采用国产PCR扩增试剂, 4家(代码174、532、965、860)采用进口试剂, 且这4家试剂均为日本TAKARA公司产品。总体上, 核酸提取使用国产试剂多一些, 而PCR扩增多采用进口试剂; 而从反馈结果看, 不论是国产检测试剂, 还是进口检测试剂, 其质量均是可靠的。3家实验室(代码174、553、860)注明了PCR扩增所用的引物或探针序列, 其中仅1家实验室(代码860)写明了引物探针来源, 其余实验室均未有引物探针信息。引物探针作为PCR检测的关键试剂, 在PCR扩增中发挥核心作用。根据以往的实验数据, 不同厂家合成的荧光标记探针检测效果有明显差别, 因此建议各实验室在原始记录中注明引物探针来源。实验室052使用的是商品化的PPV荧光定量PCR试剂盒, 虽然最终结果是满意的, 但在使用过程中未对试剂盒的性能进行验证。根据CNAS-CL01《检测和校准实验室能力认可准则》应用要求^[9]规定, 实验室在使用外部提供的产品和服务, 包括商品化的试剂盒时, 需要对所用商品化试剂盒进行技术评价并提供相应证明。

3.3 问题与建议

本次能力验证与以往有较大不同。一是检测方法和项目发生了变化。以往能力验证均检测病毒抗体^[10-12]。由于不同方法检测抗体的敏感性、特异性差异较大, 为了避免不同方法对检测结果产生影响, 以往能力验证对检测方法及参考标准均进行了限制, 统一要求按照实验动物国家标准规定的ELISA法进行检测。而本次能力验证检测病毒核酸, 需采用分子生物学方法, 且未对检测方法及参考标准进行硬性规定, 推荐参照SN/T 1919—2016标准中规定的实时荧光PCR法, 也可以采用其他标准方法或实验室内部常用方法。二是检测动物发生了变化。本次能力验证检测的是猪样品, 猪作为医学研究中常用的实验动物, 在人类疾病动物模型、新药安全性评价及异种器官移植等领域具有广阔的应用前景^[13]。本检测室开展猪的检测已有十多年历史, 积累了丰富经验。但由于以往报名参加能力验证计划的单位多为传统实验动物质检机构或相关部门, 往往不涉及猪的检测, 因此本次能力验证中最终仅有9家单位报名, 相比以往二三十家的数量大大减少。

本次能力验证样品是通过向PPV阴性猪血清中掺入不同浓度的灭活病毒制备而成, 与历次能力验证样品配制相同。本次能力验证配制3种样品, 包括I类

阳性(PPV按1:32比例加入)、II类阳性(PPV按1:1 024比例加入)及阴性样品。每个实验室发放I类阳性、II类阳性及阴性等3种样品各1份, 为增加难度, 并未将这些信息告知相关检测实验室。本次能力验证设置了两类阳性样品, 在阳性样品制备前先进行预实验以确定PPV加入的稀释度: 将PPV与阴性猪血清分别按1:2至1:1 024比例进行两倍系列稀释, 随后提取核酸进行实时荧光PCR扩增, 每个稀释度做了3个平行, 根据Ct均值选择合适的稀释度。考虑到增加检测难度, 同时避免稀释过度导致检测不出等情况, 本次能力验证计划选择Ct均值在25及30左右对应的稀释度作为两种阳性样品的PPV加入比例, 实时荧光PCR结果显示PPV 1:32稀释对应的Ct均值为25.6, 1:1 024稀释对应的Ct均值为30.1, 符合要求; 同时用传统PCR方法对这两个稀释度的样品进行了检测验证, 证明也可以检出。因此, 最终选择1:32及1:1 024两个PPV稀释比例作为两类阳性样品; 但在后续的稳定性和均一性实验过程中发现, I类和II类阳性样品的Ct均值比较接近, 如均一性实验中I类和II类阳性样品的Ct均值分别为22.8和23.7, 分析原因可能在于预实验和随后的稳定性、均一性实验所用的样品核酸提取试剂不同, 最后洗脱体积也不同。预实验过程采用的是手工提取试剂盒, 最后核酸洗脱体积为50 μ L, 而后续的稳定性和均一性实验由于样品量较大而采取了全自动核酸提取仪, 洗脱体积为150 μ L。虽然两种核酸提取试剂均为QIAGEN公司产品, 提取原理也相同, 但手工操作和仪器提取的差异以及最终洗脱体积不同都可能造成Ct值出现差异。样品制备过程的这个疏忽也从侧面印证了核酸提取的重要性, 在今后的能力验证方案设计中须引以为戒, 确保实验试剂和操作的一致性。经了解, 尽管很多实验室是首次参加PPV能力验证项目, 但大都有核酸检测的经验, 且大部分实验室均取得了满意结果, 表明这些实验室已具备了PPV核酸检测能力。

参加能力验证的9家实验室均同时提交了报告和原始记录。总体分析来看, 大部分实验室的原始记录比较详实规范, 所用实验仪器信息及样品交接记录均有体现。其中单位532的原始记录最为全面, 详细列出了所用试剂的批号及来源、阳性对照来源以及所用仪器的厂家、型号、编号、校验有效期等信息, 值得大家学习借鉴。其他实验室也有亮点, 如: 实验室174写明了每一操作步骤的起止时间, 精准到了分钟; 实

实验室070对初次检测阳性的样品进行了重复检测;实验室358对每个样品做了3个平行检测;实验室174、553和860分别注明了所用的引物或探针序列,同时860注明了引物探针的来源。存在的问题:实验室849仅提供了试剂信息和实验结果,无具体操作步骤及结果图谱;实验室358仅提供了实验结果及图谱,无具体操作步骤及试剂仪器等信息;实验室052及174提供的结果图谱不够清晰。建议有问题的实验室应注意原始记录的详实规范。

上面提到实验室052使用的是商品化的PPV荧光定量PCR试剂盒,其中包含了PPV实时荧光PCR检测所需的所有试剂,虽然最终结果是满意的,但其并未对试剂盒性能进行验证。由于商品化试剂盒良莠不齐,检测性能未知,仅仅试剂盒自带的对照成立并不能说明其能够有效检测PPV,因此需要用质控品对试剂盒的性能进行验证。检测实验室应该有相应检测项目的质控品或标准物质,要求来源清楚,符合相关标准。本次能力验证提供的样品,其制备及均一性和稳定性测试均符合标准物质制备的相关规定^[14],并经过本次多家实验室的能力验证实验,因此可作为PPV阳性参考品,作为质控品来使用。其他8家实验室虽然未使用商品化的试剂盒,但除了实验室532注明了所用阳性对照及来源外,其他实验室均未说明所用阳性对照是什么及源自何处,这一点需要参加实验室引起重视,在日常检测工作中予以补充完善。

[作者贡献 Author Contribution]

李晓波和王吉作为共同第一作者,贡献相当,分别负责能力验证计划的策划、实施、结果分析、初稿撰写,以及样品制备、结果收集和论文构思。王淑菁负责病毒培养;王莎莎和秦晓负责病毒灭活及验证;李威负责细胞培养;王洪负责能力验证计划协调与报告修改;付瑞负责能力验证计划报告审签和论文修改;岳秉飞负责能力验证计划的质量控制。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 杨希川. 非洲猪瘟形势下猪细小病毒病防控分析[J]. 畜牧业环境, 2022(6):68-69.
YANG X C. Analysis on prevention and control of Porcine parvovirus disease under the situation of African classical swine fever[J]. Animal Ind Environ, 2022(6):68-69.
- [2] 许晶, 曹凯捷. 浅谈猪细小病毒病的诊断与综合防控[J]. 吉林畜牧兽医, 2022, 43(4):11-12.
XU J, CAO K J. Diagnosis and comprehensive prevention and control of porcine parvovirus disease[J]. Jilin Animal Husbandry Vet Med, 2022, 43(4):11-12.
- [3] 国家质量监督检验检疫总局. 猪细小病毒病检疫技术规范: SN/T 1919—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Quarantine protocol for porcine parvovirus infection: SN/T 1919—2016[S]. Beijing: China Standards Press, 2017.
- [4] STRECK A F, TRUYEN U. Porcine parvovirus[J]. Curr Issues Mol Biol, 2020, 37:33-46. DOI:10.21775/cimb.037.033.
- [5] PARTHIBAN S, SOWNDHARAYA R K V, RAJA P, et al. Molecular detection of porcine parvovirus 1-associated reproductive failure in southern India[J]. Trop Anim Health Prod, 2022, 54(3):195. DOI:10.1007/s11250-022-03194-8.
- [6] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.02.015.
XING J, FENG Y F, WANG H, et al. Results and analysis of the proficiency of laboratories in detection of Salmonella in laboratory animals[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2016, 24(2): 191-194. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.02.015.
- [7] 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: CNAS GL003—2018[S]. 2018.
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Guidance on evaluating the homogeneity and stability of samples used for proficiency testing: CNAS GL003-2018[S]. 2018.
- [8] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证提供者认可准则(ISO/IEC 17043-2010): CNAS CL03-2010[S]. 2010.
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Accreditation criteria for proficiency testing providers(ISO/IEC 17043-2010): CNAS CL03-2010[S]. 2010.
- [9] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL01《检测和校准实验室能力认可准则》应用要求: CNAS CL01 G001: 2018[S]. 2018.
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Application of CNAS-CL01 Accreditation Criteria for the Competency of Testing and Calibration Laboratories: CNAS CL01 G001: 2018[S]. 2018.
- [10] 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. DOI:10.16153/j.1002-7777.2014.09.039.
LI X B, WANG H, FU R, et al. Laboratory capacity evaluation report of rat parvovirus H-1 strain antibody detection[J]. Chin Pharm Aff, 2014, 28(9):990-994. DOI:10.16153/j.1002-7777.2014.09.039.
- [11] 李晓波, 付瑞, 王洪, 等. 实验大鼠仙台病毒抗体检测能力验证结果评价[J]. 实验动物科学, 2017, 34(1):1-6.
LI X B, FU R, WANG H, et al. Laboratory proficiency testing for rat Sendai virus antibody detection[J]. Lab Animal Sci, 2017, 34(1):1-6.
- [12] 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. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.02.013.
WANG J, FU R, LI X B, et al. Evaluation of the detection proficiency of laboratories testing of mammalian orthoreovirus 3 antibody in laboratory mice[J]. Acta Lab Animalis Sci

Sin, 2016, 24(2): 183-187. DOI: 10.3969/j. issn. 1005-4847.2016.02.013.

[13] 苟春天, 应方园, 王野. 小型猪的饲养管理及人类疾病动物模型应用[J]. 畜牧兽医科技信息, 2022(3):20-22. DOI:10.3969/J.ISSN.1671-6027.2022.03.008.

GOU C T, YING F Y, WANG Y. Feeding management of miniature pigs and application of animal models of human diseases[J]. Chin J Animal Husb Vet Med, 2022(3):20-22. DOI:

10.3969/J.ISSN.1671-6027.2022.03.008.

[14] 中国兽医协会. 兽医检测用核酸标准物质研制技术规范: T/ CVMA 3—2018[S]. 2018.

China Veterinary Association. Technical specifications for Producing Nuclear Acid Reference Materials forVeterinary Detection: T/CVMA 3-2018[S]. 2018.

(收稿日期:2022-08-31 修回日期:2022-12-02)

(本文编辑:张俊彦,丁宇菁,富群华)

《实验动物与比较医学》常用英文缩略词表

英文缩略词	英文全称	中文全称(备注)
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
FDA	Food and Drug Administration	食品药品监督管理局(美国)
SPF	specific pathogen-free	无特定病原体
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
CT	computerized tomography	计算机体层摄影
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
CCK8	cell counting kit 8	细胞计数试剂盒-8
MTT	thiazolyl blue	噻唑蓝(细胞增殖活性检测试剂)
BCA	bicinchoninic acid	二辛可宁酸(蛋白浓度测定试剂)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
SP	streptavidin-peroxidase	链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶
HE	hematoxylin and eosin	苏木精-伊红
DAB	3,3'-diaminobenzidine	二氨基联苯胺
ddH ₂ O	distillation-distillation H ₂ O	双蒸水
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	杜氏磷酸盐缓冲液
PBST	phosphate-buffered saline with Tween-20	含Tween-20的磷酸盐缓冲液
TBST	Tris-buffered saline with Tween-20	含Tween-20的Tris盐酸缓冲液
DEPC	diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
PE	phycoerythrin	藻红蛋白
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
RIPA	radio immunoprecipitation assay	放射免疫沉淀法
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
PI	propidium iodide	碘化丙啶
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	B淋巴细胞瘤-2基因
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶(内参)
Ras	rat sarcoma gene	大鼠肉瘤基因
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
cDNA	complementary DNA	互补(反向转录)DNA
siRNA	small interfering RNA	小干扰RNA
miRNA	microRNA	微RNA