



ICS 65.020.30

CCS B40/49

Q/MSXW

重庆梦享生物技术合伙企业（有限合伙）企业标准

Q/MSXW 003—2024

疾病诊断用标准血清制备技术规范

2024-10-28 发布

2024-11-01 实施

重庆梦享生物技术合伙企业（有限合伙）发布



前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分:标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件起草单位:四川农业大学、重庆市畜牧科学院、国家生猪技术创新中心。

本文件主要起草人员:徐志文、陈弟诗、葛良鹏、朱玲、邵丽娜、刘作华、曾秀、孙静、丁玉春、吴梦、徐通、李晓开。

企业标准信息公共服务平台
公开
2024年10月30日 10点34分



疾病诊断用标准血清制备技术规范

1. 范围

本标准规定实验室对重大疫病（ASFV、GETV、SVA）的疫病诊断用标准阴、阳性血清制备技术规范。

2. 规范性引用文件

下列文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

《中国兽药典和国家计量技术规范》（JJF1343-2012）

《兽医系统实验室质量管理规范》（DB34/T 3928-2021）

《兽医实验室质量和技术要求》（NY/T2961-2016）

《兽医实验室生物安全要求通则》（NY/T1948-2010）

《兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》（NY/T 541-2002）

《实验室质量控制规范 动物检疫》（GB/T27401-2008）

《高致病性动物病原微生物菌（毒）种或者样品运输包装规范》（农业部公告第503号）

《国家民航局关于运输动物菌毒种样本病料等有关事项的通知》（局发明电〔2008〕4487号）

3. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 质控 quality control

用于质量控制目的的标本。

3.2 均匀性 homogeneity

与物质的一种或多种特性相关的具有相同结构或组成的状态。通过测量取自不同包装单元(如:瓶、包等)或取自同一包装单元的、特定大小的样品，测量结果落在规定不确定度范围内,则可认为标准物质对指定的特性量是均匀的。

3.3 瓶间均匀性 between-bottle homogeneity



标准物质的特性在瓶与瓶之间的变异。

3.4 稳定性 stability

在特定的时间范围和贮存条件下,标准物质的特性量值保持在规定范围内的能力。

3.5 长期稳定性 long-term stability

在标准物质生产者规定贮存条件下标准物质特性的稳定性。

4. 设备、材料和试剂

4.1 设备

水浴锅、恒温金属浴、II级生物安全柜、4℃冰箱、-20℃冰箱、-80℃冰箱、二氧化碳恒温培养箱、普通光学显微镜、恒温培养箱、荧光显微镜、PCR 扩增仪、电子天平、微波炉、水平电泳仪、紫外凝胶成像系统、多功能酶标仪。

4.2 材料

标准种毒株、HEK-293T 细胞、非洲绿猴肾细胞 (Vero)、BHK-21 细胞、产气荚膜梭菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌。

4.3 试剂

胎牛血清、支原体直接检测试剂盒、青链霉素混合液、胰酶和PBS缓冲液 0.22μM、0.48μM 过滤器、RNA提取试剂盒、琼脂糖、核酸染料。

5. 操作步骤

5.1 标准物质的制备

5.1.1 血清灭活

阳性和阴性血清候选物, 56℃水浴锅灭活30min。

5.1.2 荧光抗体病毒中和试验 (FAVN)

将灭活后的血清取出, 采用FAVN方法, 检测阳性和阴性血清候选物抗体效价。将板子划分为4个区域, 分别为OIE参考血清、内部阳性对照、CVS 滴定、阴性血清对照。在每



孔内加入细胞 4×10^5 个细胞的悬液，孵育48h后按照说明书操作。每孔加入FITC抗体50 μ L，置37 $^{\circ}$ C温育30min。

在荧光显微镜下观察每个孔的所有视野，以定性方式记录结果（+或-），无荧光细胞的孔判定为“-”，有荧光细胞孔判定为“+”。试验结果反映的是参考血清和待检血清共同培养后未被中和的病毒的量。

5.1.3 稀释强阳性血清

根据以上FAVN试验结果，90mL阴性血清加入30mL强阳性血清，混匀，静置等待分装。

5.1.4 过滤、分装、密封。

使用0.45 μ M和0.22 μ M滤器过滤除菌，将阳性和阴性血清分装至西林瓶中，每瓶定容1mL，使用三叉胶塞稍微密封，胶塞留有2/3余地，将血清放入真空冷冻干燥机中，完成冻干。

5.1.5 性状试验

利用随机数表抽取样品各5支，观察冻干制品性状，打开西林瓶加入去离子水，静止一会，观察复溶后血清变化。

5.1.6 真空度测定

采用真空度测定法。随机数表抽取西林瓶盛装的冻干血清各5瓶，使用电火花真空检测器进行密封后容器内真空度测定。如果容器内出现白色、粉色或紫色辉光，则判定标准物质合格。

5.1.7 剩余水分测定法

根据中国兽药典采用真空烘干法。打开真空度良好的阳性和阴性血清，每批随机抽取4瓶，将冻干血清分别导入无菌干燥的1.5mL离心管，盖好在天平上称重，记录。称重后，立即将离心管置于有干燥剂的真空浓缩仪中，打开离心管盖，关闭真空浓缩仪，抽真空，加热至60 $^{\circ}$ C，干燥3小时。待真空浓缩仪温度下降后，打开真空浓缩仪，迅速盖好离心管盖，并取出，将离心管放入含有变色硅胶的干燥箱中，冷却至室温，称重，放回真空浓缩仪继续干燥1小时，两次干燥至恒重，减失的重量即为含水量。按照中国兽药典规定，冻干的标准物质剩余水分含量应不高于3.0%。

$$\text{剩余水分}\% = (\text{干燥前重} - \text{干燥后重}) / \text{干燥前重} \times 100\%$$

5.1.8 冻干前后效价检测

为检验冻干技术对标准物质效价是否有影响，并确定冻干后第0天抗体效价，选取冻干



前、冻干第0天阳性血清和阴性血清各3瓶每瓶检测一次。

5.1.9 无菌检验

将金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌、白色念珠菌培养物用0.1%蛋白胨水制成每1.0mL含菌数小于50CFU的菌悬液。取每管9.0mL的硫乙醇酸盐流体培养基8支，分别接种金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌悬液，各接种3支，作为阳性对照，2支阴性对照不接种，37℃培养7天；取每管7.0mL的胰酪大豆胨液体培养基4支，接种3支白色念珠菌悬液，作为阳性对照，阴性对照不接种，25℃培养7天。

5.1.10 成品检验

抽取冻干的血清各1瓶，加入1.0mL去离子水稀释，取样进行检验。将复溶后血清全部接种于50mLTG培养基，37℃培养，3天后吸取培养物，接种TG小管2支，每支200μL置25℃和37℃培养，另取200μL接种1支TSB小管，置25℃培养，培养7天。

5.1.11 支原体检验

利用世纪元亨支原体荧光定量PCR试剂盒对分装未冻干的阴性血清和阳性血清进行支原体检测，按照试剂盒指导说明书操作，将1mL血清转移至1.5mL，15000×g离心10min，提取核酸-20℃保存备用，检测支原体。

5.1.12 均匀性评估

均匀性评估试验使用数量根据国家计量技术规范JJF1343-2012中单元数与总体单元数对应关系表抽取。均匀性试验使用ELISA抗体检测试剂盒，按照试剂盒说明书操作，阳性血清和阴性血清标准物质450nm处读取OD值。测得的OD值，用检验法对标准物质的均匀性进行评估。

5.1.13 稳定性评估

标准物质的特性值随着时间的变化而发生改变，为了验证制备的标准物质在运输及恶劣的条件下的温度、贮藏方式等考察标准物质效价的变化，从而确定标准物质适宜的保存温度和条件。按照运输稳定性和长期稳定性两种方式相结合，时间间隔按照先密后疏的原则安排。

5.1.14 定值

实验室3名人员采用FAVN方法对标准物质进行独家定值，随机抽取阳性和阴性血清标准物质各3瓶，每人提供3组独立的检测数据，计算检测结果的平均值。——