

ICS 11.220

B 41

团 体 标 准

T/ CVMA 3—2018

兽医检测用核酸标准物质研制技术规范

**Technical specifications for Producing Nuclear Acid Reference Materials for
Veterinary Detection**

2018 - 10 - 24 发布

2018 - 10 - 24 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：中国动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：王传彬、杨林、原霖、宋晓晖、辛盛鹏、董浩、刘玉良、顾小雪、刘洋、韩焘、陈亚娜。

兽医检测用核酸标准物质研制技术规范

1 范围

本标准规定了兽医检测用核酸标准物质的制备、均匀性及稳定性评估、不确定度评定、定值及结果表示、标签和使用说明书、包装、贮存和运输、生物安全。

本标准适用于利用细菌、病毒等微生物或其核酸制备兽医检测用核酸标准物质。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅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。

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

JJF 1005-2016 标准物质通用术语和定义

JJF 1343-2012 标准物质定值的通用原则及统计学原理

3 术语和定义

JJF1005-2016界定的下列术语和定义适用于本文件。为了便于使用，以下重复列出了JJF 1005-2016中的某些术语和定义。

3.1

标准物质（又称标准样品） reference material

具有足够均匀和稳定的特定特性的物质，其特性适用于测量或标称特性检查中的预期用途。

[JJF1005-2016，第3.1条]

3.2

有证标准物质 certified reference material

附有由权威机构发布的文件，提供使用有效程序获得的具有不确定度和溯源性的一个或多个特性值的标准物质。

[JJF1005-2016，第3.2条]

3.3

特性值 property value

与标准物质的物理、化学或生物特性有关的值。

[JJF1005-2016，第4.1条]

3.4

定值 characterization

作为研制（生产）程序的一部分，确定标准物质特性值的过程。

[JJF1005-2016，第3.12条]

3.5

均匀性 homogeneity

标准物质中特定部分的某个规定特性值的一致性。

[JJF1005-2016，第3.14条]

3.6

稳定性 stability

在特定的时间范围和贮存条件下，标准物质的特性值保持在规定范围内的能力。

[JJF1005-2016，第3.17条]

3.7

不确定度 uncertainty

根据所用到的信息，表征赋予被测量量值分散性的非负参数。

[JJF1005-2016，第4.15条]

4 兽医检测用核酸标准物质制备**4.1 候选物选择**

4.1.1 兽医检测用核酸标准物质的原料应选择具有代表性的病毒、细菌或其他微生物，或含有其全部核酸或特定核酸片段的质粒。所有原料应获得全部核苷酸序列。

4.1.2 制备标准物质的候选物不应含有干扰性杂质，应有足够的稳定性和高度的特异性，并有足够的数量。特性值范围应适合该标准物质的用途。

4.2 标准物质原料制备

4.2.1 兽医检测用核酸标准物质应根据候选物的性质，选择合理的制备程序和工艺，并防止污染及待特性量的量值变化。需加保护剂等物质的，该类物质应对标准物质的活性、稳定性和试验操作过程无影响。

4.2.2 兽医检测用核酸标准物质的分装精确度应在±1.0%以内。需要干燥保存的应在分装后立即进行冻干和密封。冻干水分含量应不高于3.0%。

4.2.3 分装、冻干和密封过程中，应保持各瓶间含量的一致性和稳定性。

5 均匀性评估

5.1 抽取单元数

按照JJF 1343-2012 4.3.1的规定，若记总体单元数为N，当N≤200时，抽取单元数不少于11个；当200<N≤500时，抽取单元数不少于15个；当500<N≤1000时，抽取单元数不少于25个；当总体单元数N>1000时，抽取样品数不少于30个。对于均匀性好的样品，当N≤500时，抽取单元数不少于10个；当N>500时，抽取单元数不少于15个。

一般情况下，每个抽取单元应独立取样，重复测量次数不少于两次。

5.2 抽样方式

按照JJF 1343-2012 4.3.2的规定，抽样方法可以是随机抽样或分层随机抽样。

5.3 检测方法

采用实时荧光定量PCR或数字PCR的方法进行均匀性评估。使用的方法不低于定值方法的精密度和灵敏度。

5.4 最小取样量

将均匀性评估的取样量作为最小取样量。

5.5 均匀性评估的结果评价

按照JJF 1343-2012 4.3.5~4.3.7的规定，对标准物质的m个包装单元重复检测n次，采用方差分析方法对标准物质进行均匀性评估。

按式（1）和（2）计算组间差方和与组内差方和：

$$Q_1 = \sum_{i=1}^m n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

Q_1 —组间差方和；

n_i —每*i*个单元重复测定的次数；

m —均匀性检验抽取的单元数；

\bar{x}_i —第 i 个单元内测定的平均值；

\bar{x} — m 个单元测量结果的总平均值。

$$Q_2 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

Q_2 —组内差方和；

m —均匀性检验抽取的单元数；

n —每一单元重复测定的次数；

x_{ij} —第 i 个单元内的第 j 个测定值；

\bar{x}_i —第 i 个单元内测定的平均值。

按式 (3) 和 (4) 计算组间自由度和组内自由度：

$$v_1 = m - 1 \dots\dots\dots (3)$$

式中：

v_1 —组间自由度；

m —均匀性检验抽取的单元数。

$$v_2 = N - m \dots\dots\dots (4)$$

式中：

v_2 —组内自由度；

N —均匀性检验的总次数；

m —均匀性检验抽取的单元数。

按式 (5) 和 (6) 计算组间方差和组内方差：

$$s_1^2 = \frac{Q_1}{v_1} \dots\dots\dots (5)$$

式中：

s_1^2 —组间方差；

Q_1 —组间差方和；

ν_1 —组间自由度。

$$s_2^2 = \frac{Q_2}{\nu_2} \dots\dots\dots (6)$$

式中：

s_2^2 —组内方差；

Q_2 —组内差方和；

ν_2 —组内自由度。

按式（7）计算统计量 F ：

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \dots\dots\dots (7)$$

式中：

s_1^2 —组间方差；

s_2^2 —组内方差。

根据自由度 (ν_1, ν_2) 及给定的显著性水平 α ，可由 JJF 1343-2012 附录 B 表 B.2 F 表查得 F_α 值。若按公式算得的 F 值满足 $F < F_\alpha$ ，则认为数据组间无明显差异，样品是均匀的；若 $F \geq F_\alpha$ ，则怀疑各组间有系统差异，即样品之间存在差异。兽医检测用核酸标准物质应达到均匀性评估的要求。

5.6 不均匀性引起的不确定度

瓶间均匀性标准偏差 s_{bb} 可以按式（8）公式计算：

$$s_{bb}^2 = \frac{s_1^2 - s_2^2}{n} \dots\dots\dots (8)$$

在这种情况下， s_{bb} 等同于瓶间不均匀性导致的不确定度分量 u_{bb} ，见式（9）。

$$u_{bb} = s_{bb} \dots\dots\dots (9)$$

式中：

s_{bb} —瓶间标准偏差；

u_{bb} —标准物质的不均匀性引起的不确定度；

n —组内测量次数；

s_1^2 —组间方差；

s_2^2 —组内方差。

6 稳定性评估

6.1 稳定性的类型

标准物质研制时，主要应检测两种稳定性(不稳定性)：

——长期稳定性是物质在特定保存条件下有效期内的稳定性，通常不少于6个月，保存温度宜为 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

——短期稳定性是设定运输条件下的稳定性，保存温度为 4°C 、 25°C 、 37°C 。

6.2 时间间隔的选择

稳定性评估的时间间隔可以按先密后疏的原则安排，预期有效期内通常要求有5或6个取样时间点；短期稳定性通常考察周期较短，但至少应与标准物质运输的允许时间一样长，一般为1至2个月，通常涉及到3~5个时间点。在每个时间点，随机抽取2个以上最小单元。

6.3 稳定性研究的实验设计

按照JJF 1343-2012 5.2.5的规定，采取经典稳定性评估或同步稳定性评估。

6.4 检测方法

应采用实时荧光定量PCR或数字PCR的方法进行稳定性评估。使用的方法不低于定值方法精密度和灵敏度。

6.5 有效期

当稳定性评估结果表明待特性值没有显著性变化，以被比较的时间段为标准物质的有效期。兽医检测用核酸标准物质有效期应不少于6个月。

6.6 稳定性评估的结果评价

按照JJF 1343-2012 5.2.6的规定。每个时间点 (X_i) 抽取不少于一瓶样品进行重复测量, 每个时间点会对应多个测量值 (Y_i), 因此每个时间点 (X_i), 可以使用所有取样单元的均值。

按式 (10) 计算斜率:

$$\beta_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \dots\dots\dots (10)$$

式中:

β_1 —用时间和特性值拟合直线的斜率;

X_i —第 i 个时间点;

Y_i —第 i 个时间点的观测值;

\bar{X} —所有时间点的平均值;

\bar{Y} —所有观测值的平均值。

按式 (11) 计算截距:

$$\beta_0 = \bar{Y} - \beta_1 \bar{X} \dots\dots\dots (11)$$

式中:

β_0 —用时间和特性值拟合直线的截距;

\bar{Y} —所有观测值的平均值;

β_1 —用时间和特性值拟合直线的斜率;

\bar{X} —所有时间点的平均值。

斜率的标准偏差见式 (12)。

$$s(\beta_1) = \frac{S}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \dots\dots\dots (12)$$

式中：

$s(\beta_1)$ —斜率的标准偏差；

S—拟合直线的标准偏差；

n—拟合直线的点数；

X_i —第*i*个时间点；

\bar{X} —所有时间点的平均值。

拟合直线的标准偏差见式（13）。

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \beta_0 - \beta_1 X_i)^2}{n-2} \dots\dots\dots (13)$$

式中：

S—拟合直线的标准偏差；

n—测量次数；

Y_i —第*i*个时间点的观测值；

β_0 —用时间和特性值拟合直线的截距；

β_1 —用时间和特性值拟合直线的斜率；

X_i —第*i*个时间点。

按照JJF1343-2012 5.2.6的规定，基于 β_1 的标准偏差，可用t-检验进行以下判断：用式（12）和合适的t-因子（自由度等于n-2），可以检测出其显著性。即，若 $|\beta_1| < t_{0.95, n-2} \cdot s(\beta_1)$ ，则表明斜率不显著，没有观察到不稳定性。也可用F-检验来进行显著性判断。兽医检测用核酸标准物质应符合稳定性要求。

6.7 稳定性引起的不确定度

可根据式(14)计算由稳定性引入的不确定度 u_s ：

$$u_s = s(\beta_1) \cdot X \dots\dots\dots (14)$$

式中：

u_s —标准物质的不稳定性引起的不确定度；

$s(\beta_1)$ —斜率的标准偏差；

X —给定的保存期限。

7 定值

7.1 合作定值

7.1.1 采用多家实验室合作定值的方式对兽医检测用核酸标准物质进行定值。

7.1.2 合作定值实验室应通过实验室资质认定或认可，具备对相应的标准物质进行定量 PCR 核酸检测的能力。

7.1.3 多家实验室合作定值应按照 JJF 1343-2012 6.1.2.3 的规定，参加定值的实验室数量不少于 8 家，每个参加定值的实验室至少有 2 个操作者独立测定 3 个以上最小单元，每个单元至少测 2 次，提供不少于 6 次独立重复测量数据。

7.1.4 组织定值的实验室应制定详细的定值方案，根据方案发放定值样品和试剂，明确实验方法和实验条件，规定结果报告方式，按照统一要求汇总定值数据。

7.2 定值数据的统计处理

7.2.1 实验结果汇总

收集各实验室的单次测量结果，按独立测量组数汇总。审查各独立测量组的数据，如有疑问，通知有关实验室查找原因后重测。

7.2.2 数据的正态分布检验

按照 JJF 1343-2012 6.2.2 的规定，采用夏皮罗-威尔克法 (Shapiro-Wilk) 或达格斯提诺法 (D'Agostino) 检验数据正态性。

7.2.3 定值数据的统计处理

按照 JJF 1343-2012 6.2.2.2 的规定，每一组独立测量结果可用格拉布斯 (Grubbs) 法或狄克逊 (Dixon) 法从统计上剔除可疑值。对各组数据的标准偏差用科克伦 (Cochran) 法进行等精度检验。当数据是等精度时，在数据服从正态分布或近似正态分布的情况下，将每个实验室的所测数据的平均值视为单次测量值。构成一组新的测量数据，剔除可疑值后，计算出总平均值和标准偏差。

7.3 标准值及不确定度的确定

7.3.1 标准值的确定

特性量的测量总平均值即为该特性量的标准值。兽医核酸检测标准物质的值以微生物核酸拷贝数或基因组数为单位。

7.3.2 不确定度的确定

按照JJF 1343-2012 7.3.2的规定，当单次测量值服从正态分布或近似正态分布时，计算以保留数据的总算术平均值作为标准值，标准偏差 u_{char} 作为标准不确定度，按式（15）计算。

$$u_{\text{char}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{m(m-1)}} \dots\dots\dots (15)$$

式中：

u_{char} — 标准物质的定值过程带来的不确定度；

\bar{x}_i — 第*i*组数据的平均值；

\bar{x} — 所有数据的总平均值；

m — 定值实验室组数。

8 不确定度的评定

8.1 评定方式

定值结果的不确定度由3部分组成，分别为标准物质的均匀性引起的不确定度、标准物质的稳定性引起的不确定度以及标准物质的定值过程带来的不确定度。

8.2 合成标准不确定度的计算

按照JJF 1343-2012 7.4.1的规定，按式（16）计算合成标准不确定度。

$$u_{\text{CRM}} = \sqrt{u_{\text{char}}^2 + u_{bb}^2 + u_s^2} \dots\dots\dots (16)$$

式中：

u_{CRM} — 标准物质的合成标准不确定度；

u_{char} — 标准物质的定值过程带来的不确定度；

u_{bb} — 标准物质的不均匀性引起的不确定度；

u_s —标准物质的不稳定性引起的不确定度。

8.3 扩展不确定度的计算

按照JJF 1343-2012 7.4.2的规定，该合成标准不确定度乘以包含因子 k （若置信概率为95%， $k \approx 2$ ）得出的不确定度称为扩展不确定度或称总不确定度，记为 U_{CRM} 。按式（17）计算。

$$U_{CRM} = k \times u_{CRM} \dots\dots\dots (17)$$

式中：

U_{CRM} —研制标准物质的特性量标准值的扩展不确定度；

k —指定概率下的包含因子。

9 定值结果表示

9.1 定值结果组成

定值结果由标准值和扩展不确定度组成，即标准值 \pm 扩展不确定度。

9.2 扩展不确定度有效数字修约

扩展不确定度一般保留一位有效数字，最多只保留两位有效数字，采用只进不舍的规则。标准值的最后一位与扩展不确定度的相应位数要对齐。数值修约规则按GB/T 8170规定。

10 标签和使用说明书

10.1 标签

标准物质最小包装单元应贴有标签，标签中应标明标准物质名称、批号、标示量、标准值 \pm 扩展不确定度和制备单位等信息。

10.2 说明书

标准物质应附有说明书，其内容应包括：中文名称、英文名称、性状、含量、标准值 \pm 扩展不确定度、批号、保存条件、使用方法、有效期、制备单位等。

11 包装、贮存和运输

11.1 包装

标准物质的包装应满足该标准物质的用途，最小包装单元应贴有标准物质标签。

11.2 贮存

标准物质贮存条件应适合该标准物质的要求和有利于标准物质稳定的条件。

11.3 运输

标准物质应按制造商的要求运输。

12 生物安全

所有实验活动应符合NY/T 1948的相关要求。

中国兽医协会
CVMA

全国团体标准信息平台