

*标准*指南*共识*

开放科学
(OSID)

预防性生物制品用病原微生物菌(毒)种 低温保藏技术指南 (T/CAV 002—2023) (T/CAS 714—2023)

中国疫苗行业协会, 中国标准化协会

摘要: 本标准规定了预防性生物制品用病原微生物菌(毒)种低温保藏流程和技术要求, 适用于病原微生物菌(毒)种保藏中心、保藏专业实验室等保藏机构, 以及涉及病原微生物菌(毒)种保管、使用和疫苗生产企业等单位。

关键词: 病原微生物菌(毒)种; 低温保藏; 团体标准

中图分类号: R211; R37; Q939.99

文献标志码: A

文章编号: 1003-9961(2023)12-1429-03

Technical Guideline for Low Temperature Preservation of Pathogenic Microorganisms for Prophylactic Biological Products (T/CAV 002—2023)(T/CAS714—2023) China Association for Vaccines, China Association for Standardization.

Corresponding author: Wei Qiang, Email: weiqiang@chinacdc.cn

Abstract: This standard stipulate the process and technical requirements for the low temperature storage of pathogenic microorganisms for prophylactic biological products, and is applicable to the collection organizations such as the preservation center of pathogenic microorganisms, the specifically preserving laboratory, and the storage and use of pathogenic microorganisms and the vaccine production enterprises.

Key words: Pathogenic microorganism strains; Low temperature preservation; Group standard

1 范围

本文件规定了预防性生物制品用病原微生物菌(毒)种低温保藏流程和技术要求, 包括保藏基本要求, 冷藏保藏、超低温保藏、深低温保藏、冷冻干燥保藏等流程及相关要求。

本文件适用于病原微生物菌(毒)种保藏中心、保藏专业实验室等保藏机构, 以及涉及病原微生物菌(毒)种保管、使用和疫苗生产企业等单位。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中, 注日期的引用文件, 仅该日期对应的版本适用于本文件; 不注日期的引用文件, 其最新版本(包括所有修改单)适用于本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求

WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则

WS 315 人间传染的病原微生物菌(毒)种保藏机构设置技术规范

T/CPMA 011 病原微生物菌(毒)种保藏数据描述通则

3 术语和定义

WS 315—2010 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1 病原微生物 (pathogenic microorganism) 可

侵犯人体, 引起人感染甚至传染病的微生物, 包括病毒、细菌、真菌、立克次体等。

3.2 菌(毒)种 (microorganism strain) 可培养的, 人间传染的病毒、细菌、真菌、立克次体等具保存价值的, 经鉴定、分类并给予固定编号的病原微生物。

3.3 预防性生物制品 (prophylactic biological product) 以天然的或者人工改造的微生物、细胞以及动物和各种人源的组织、液体等生物材料制备, 用于人类疾病预防的生物制品。

3.4 保存 (storage) 储存菌(毒)种, 维持其活性和生物学特性的活动。

3.5 低温保藏 (low temperature preservation) 在低温条件下保存菌(毒)种, 使其代谢水平降低乃至完全停止生长繁殖, 达到半休眠或完全休眠状态的技术方法。

注: 低温保藏条件包括冷藏(2~8℃)、低温(-20~-40℃)、超低温(-60~-80℃)、深低温(-150~-196℃)等。

3.6 程序降温 (programmed cooling) 按照特定程序设计对菌(毒)种进行降温的过程。其中程序设计包括合理的温度梯度、可控的降温速率等。

3.7 低温保护剂 (cryoprotectant) 保护菌(毒)种, 使其在低温保藏过程中保持活性的物质。

3.8 冻干保护剂 (lyoprotectant) 保护菌(毒)种, 使其在冷冻干燥和保藏过程中保持活性的物质。

3.9 冷藏保藏 (refrigerated preservation) 在2~8℃条件保存菌(毒)种的方法。

3.10 超低温保藏 (ultra-low temperature preservation) 在-60~-80℃条件下保存菌(毒)种的方法。

3.11 深低温保藏 (deep cryogenic preservation) 在-150~-196℃条件下保存菌(毒)种的方法。

通信作者: 魏强, Tel: 010-58900339, Email: weiqiang@chinacdc.cn

收稿日期: 2023-09-14 网络出版日期: 2023-11-20



3.12 冷冻干燥保藏 (freeze-drying preservation)

将菌(毒)种悬浮于适宜的冻干保护剂中,经预冻后在高真空状态下以升华方式除去水分,熔封管口或轧盖密封后,在冷藏保藏条件下(2~8℃)或-20℃及以下保存菌(毒)种的方法。

3.13 复苏 (revial) 将菌(毒)种代谢活动从停止或趋于停止状态恢复到正常生理活动状态的过程。

4 保藏基本要求

4.1 菌(毒)种特征信息

4.1.1 基本信息完整 包括但不限于名称、分类学地位、来源历史、分离时间和分离地址等。信息描述应符合 T/CPMA 011。

4.1.2 代表性信息明确 具有用于疫苗用途的典型生物学特性或遗传学特性的描述,如首个分离株、传代水平、特定的生理、生化、血清型、基因型、耐药性、变异性、致病性等。

4.1.3 活性和传代信息明确

4.1.3.1 应具有生长、繁殖活性并可培养、传代。

4.1.3.2 应是纯培养物,无杂菌、支原体、噬菌体等外源因子干扰且浓度、毒力(滴度)确定。

4.1.3.3 传代明确、可溯源。传代信息应包含代次、批号、传代时间及传代培养过程中的其他信息。

4.1.4 培养条件、表型和分子特征稳定

4.1.4.1 培养使用的细胞、培养基的成分配比、培养温度、pH 值、离子强度、对氧需求程度,或活体培养条件等宜相对稳定。

4.1.4.2 表型特征稳定,其形态、染色反应、生理生化、致细胞病变效应或血清学特性相对稳定。

4.1.4.3 分子特征和基因型特征稳定,并具有完整基因组序列信息。

4.2 低温(冻干)保护剂选择

4.2.1 应建立选择低温(冻干)保护剂的程序和方法。常用低温(冻干)保护剂及其推荐使用情况,见附录 A 和附录 B。

4.2.2 不同类型的菌(毒)种宜使用不同类型及相应浓度的低温(冻干)保护剂。

4.2.3 不同类型的保藏方法宜使用不同类型的低温(冻干)保护剂。

4.3 设施设备

4.3.1 保藏机构分区、实验室设施设备应符合《病原微生物实验室生物安全管理条例》《人间传染的病原微生物菌(毒)种保藏机构管理办法》《人间传染的病原微生物目录》及《疫苗生产车间生物安全通用要求》及 GB 19489 和 WS 233 等有关生物安全要求。

4.3.2 保藏机构设施设备、温度和湿度、标识系统等管理,应符合 WS 315 的要求。

4.4 保存方法

4.4.1 针对菌(毒)种特性选择适宜的保存方法,宜

采用两种或两种以上方法保存。

4.4.2 如只采用一种保存方法,菌(毒)种须备份并存放于两个独立的保存区域内。

4.5 质量控制

4.5.1 数据

4.5.1.1 数据信息应真实、准确、完整、可溯源,应包含菌(毒)种基本信息和保藏相关信息。

4.5.1.2 数据的纸质记录或电子记录应受控,设置修改权限并具备审计追踪能力。

4.5.2 菌(毒)种

4.5.2.1 建立种子批管理制度。菌(毒)种应分为原始种子、主种子批和工作种子批,应规定各级种子批的传代次数。

4.5.2.2 制定并执行污染控制程序文件。制备菌(毒)种过程中所用培养基、细胞、血清、胰酶等原辅材料也应无外源病毒、细菌、支原体污染。

4.5.2.3 制定并执行鉴定程序文件。应明确鉴定检测方法,包括但不限于检测菌(毒)种的滴度、稳定性、生物学特性等的方法。

4.5.2.4 制定定期抽样检查和意外事件处置程序。明确菌(毒)种的活力和纯度,并记录抽查结果。

4.5.2.5 复苏后的剩余菌(毒)种不应再继续用于低温保藏。

5 冷藏保藏

5.1 技术要求

5.1.1 用于菌(毒)种短期保存,无需添加低温保护剂。

5.1.2 宜使用一次性无菌培养瓶或试管。如使用非一次性培养瓶或试管,清洗后于 121℃ 下高压灭菌 15 min 备用,或确认达到可靠效果的 F_0 值($F_0 \geq 8$)。

5.2 菌(毒)种准备

5.2.1 将单个细菌和真菌菌落接种于含相应培养基的培养瓶或试管中,在合适的培养条件培养。

5.2.2 通过动物接种、鸡胚培养、组织培养、细胞培养等方法获得病毒培养物。

5.3 保存

5.3.1 待生长至对数生长中后期或适宜浓度,将培养瓶口或试管密封,保存于 2~8℃ 的冷藏条件。

5.3.2 保存时间根据菌(毒)种的种类不同而异。

6 超低温保藏

6.1 低温保护剂准备

6.1.1 根据菌(毒)种类别选择适合的、针对性低温保护剂,如采用无菌甘油或脱脂奶粉,或二甲基亚砜。

6.1.2 应在培养物中添加相应浓度的低温保护剂。

6.2 菌(毒)种准备

6.2.1 使用对数生长中后期(细菌和真菌)或稳定期

(病毒)培养物,避免不同的生理状态对微生物存活率的影响。

6.2.2 接种固体培养基的细菌和真菌,可刮取适量菌苔转移至含有无菌低温保护剂(如含 20% 甘油的新配制液体培养基)的冻存管内,混匀,制成菌悬液。

6.2.3 接种液体培养基的细菌和真菌,振荡培养后取菌悬液与低温保护剂按一定比例混匀后分装于无菌冻存管内,或者用无菌玻璃珠或磁珠吸附菌种悬液,然后将玻璃珠或磁珠置于无菌冻存管内。

6.2.4 病毒在培养至稳定期后,收获培养病毒至无菌冻存管内(需要时,加适宜的低温保护剂)。

6.3 程序降温

6.3.1 将含菌(毒)种的冻存管置入程序降温设备中,应控制合适的降温速率。

6.3.2 待冻存管降至规定温度后转移至储存盒,置于 $-60\sim-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温保藏设备中保存。

6.4 保存 保存期间应定期检查活力及杂菌情况。建议保存周期为 1~5 年。

6.5 复苏

6.5.1 从低温保藏设备中取出菌(毒)种冻存管,可采用常温、 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 化冻或 $37\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴等方式复温,直到融化为止。

6.5.2 开启冻存管,将菌(毒)种移至适宜的培养条件培养。

7 深低温保藏

7.1 低温保护剂准备 同 6.1。

7.2 菌(毒)种准备 同 6.2。

7.3 程序降温

7.3.1 将含菌(毒)种的冻存管置于程序降温设备中,以合适的降温速率进行降温,直到温度达到菌(毒)种悬浮液冻结点之下(通常为 $5\sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$),并维持 1~2 h。

7.3.2 将冻存管迅速移入液氮罐中于液相($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$)或气相($-150\text{ }^{\circ}\text{C}$)中保存。

7.3.3 若无程序降温设备,则可将含菌(毒)种的冻存管置于($-60\sim-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)冰箱中冷冻 2 h 后,迅速移入液氮罐中于液相($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$)或气相($-150\text{ }^{\circ}\text{C}$)中保存。

7.4 保存 保存期间应定期检查活力及杂菌情况。

7.5 复苏 同 6.5。

8 冷冻干燥保藏

8.1 冻干保护剂准备

8.1.1 宜采用合适的冻干保护剂,见附录 B。

8.1.2 除菌过滤或高压灭菌备用。

8.2 菌(毒)种准备

8.2.1 在无菌条件下,先将低温保护剂加入培养物斜面,轻轻刮下稳定期的菌苔或成熟的孢子,或将冻干保护剂与细菌培养液按一定比例混匀,制成菌悬液。

8.2.2 病毒收获液与冻干保护剂按一定比例混匀。

8.2.3 取适量体积菌(毒)种悬液分装至灭菌安瓿管或西林瓶中,避免溅污上部管壁,无菌封口。

8.2.4 若是液体培养的菌(毒)种,应离心去除培养基,然后将培养物与冻干保护剂混匀,再分装至灭菌安瓿管或西林瓶中,并在 1~2 h 内分装完毕。

8.3 预冻 将装有菌(毒)种悬液的安瓿管或西林瓶,以合适降温速率降至预冻目标温度,并预冻 2 h 以上。

8.4 冷冻干燥 预冻结束后,结合不同菌(毒)种生物学特性,选择合适的冷冻干燥程序进行操作。

8.5 熔封或密封 干燥后,将安瓿管颈部用强火焰拉细熔封,或西林瓶轧盖密封。

8.6 真空度或密封性测定 熔封或密封后的安瓿管或西林瓶采用适宜方法确定真空度或密封性。

注:若管内出现红色光说明尚未真空,如蓝色光则符合要求。

8.7 保存

8.7.1 安瓿管或西林瓶应在 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下温度避光保存。

8.7.2 保存期间应定期抽检开展质量控制。

8.8 复苏 从低温设备中取出并打开安瓿管或西林瓶,加入适量培养基。缓慢旋转安瓿管或西林瓶后,将菌(毒)种移种到新鲜培养基中(上)培养。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

本标准主要起草人

魏 强 中国疾病预防控制中心

姜孟楠 中国疾病预防控制中心

赵元元 中国疾病预防控制中心

王多春 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

韩 俊 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所

胥 义 上海理工大学

宋 杰 中国医学科学院医学微生物研究所

隋志伟 中国计量科学研究院

顾 华 中国科学院基础医学与肿瘤研究所

李志峰 重庆市疾病预防控制中心

张严峻 浙江省疾病预防控制中心

江永忠 湖北省疾病预防控制中心

王 刚 北京生物制品研究所有限责任公司

王泽鋆 武汉生物制品研究所有限责任公司

引用本文: 中国疫苗行业协会, 中国标准化协会. 预防性生物制品用病原微生物菌(毒)种低温保藏技术指南(T/CAV 002—2023)(T/CAS 714—2023)[J]. 疾病监测, 2023, 38(12): 1429—1431. DOI: 10.3784/jbjc.202309140469

China Association for Vaccines, China Association for Standardization. Technical Guideline for Low Temperature Preservation of Pathogenic Microorganisms for Prophylactic Biological Products (T/CAV 002—2023)(T/CAS714—2023)[J]. *Dis Surveill*, 2023, 38(12): 1429—1431. DOI: 10.3784/jbjc.202309140469

(本文编辑: 杨小平)