

## 通则 细胞类制品微生物检查法

本法系采用商品化全自动微生物培养系统,通过仪器实时监测微生物生长代谢产生的二氧化碳引起的培养瓶内反应底物的显色或荧光变化信号,或培养瓶顶空压力变化信号,结合目视观察,判定供试品中是否有微生物生长。本法为快速微生物检查法,主要适用于效期短、批量小,采用现行无菌检查法(通则 1101)无法保证在产品使用前完成放行检查的细胞类制品。采用本法进行产品的微生物放行检查,应在充分考虑制品生产工艺、无菌保障水平、微生物污染风险、使用者获益/风险等因素的基础上,经风险评估后有条件地施行;采用的快速微生物检查法应按照《药品微生物检验替代方法验证指导原则》(通则 9201)进行方法学验证并符合规定。

### 培养基

本法所用培养基为商品化的仪器适配的培养基,应参照无菌检查法(通则 1101)进行培养基适用性检查并符合产品相关规定。至少应有 2 种适宜培养基用于检测真菌、需氧细菌和厌氧细菌。检查方法与可参考无菌检查法(通则 1101)培养基的适用性检查,包括无菌性检查和灵敏度检查。试验菌株的选择按照“方法适用性试验”项下的要求,检测真菌、需氧细菌和厌氧细菌的培养基应分别接种不大于 100 CFU 的试验菌,置于系统确认的培养温度下培养,除另有规定外,接种细菌的培养基应在 3 天内生长良好,接种真菌的培养基应在 5 天内生长良好。

### 方法适用性试验

采用本法进行产品快速无菌检查时,应进行方法适用性试验,以确认所采用的方法适用于该产品。若检验程序或产品发生变化可能影响检验结果时,应重新进行方法适用性试验。

应至少采用 2 个批次的供试品进行方法适用性试验,每批供试品应至少平行进行 3 个重复的独立实验。

方法适用性试验按下列要求进行操作。对每一试验菌应逐一进行方法确认。

**菌种及菌液制备** 应至少包含金黄色葡萄球菌如 CMCC(B) 26003,大肠埃希

菌如 CMCC(B) 44102, 铜绿假单胞菌如 CMCC(B) 10104, 生孢梭菌如 CMCC(B) 64941, 枯草芽孢杆菌如 CMCC(B) 63501, 白色念珠菌如 CMCC(F) 98001, 黑曲霉如 CMCC(F) 98003, 酿脓链球菌如 CMCC(B) 32067, 微球菌如 CMCC(B) 28020, 痤疮丙酸杆菌如 CMCC(B) 65111。必要时, 根据产品的来源、特点及产品既往微生物污染情况, 可增加相应的菌株。金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉的菌液制备方法见无菌检查法(通则 1101)。接种酿脓链球菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨液体培养基中, 30~35℃培养 2~3 天; 接种微球菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨液体培养基, 30~35℃培养 3~4 天; 接种痤疮丙酸杆菌的新鲜培养物至硫乙醇酸盐流体培养基中, 30~35℃培养 6~7 天, 上述培养物用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9% 无菌氯化钠溶液, 制成适宜浓度的菌悬液。

**接种及培养** 取仪器适配的培养基 2 组, 其中 1 组按照“供试品的快速无菌检查”项下的方法, 每个培养管分别加入供试品, 再分别接种不大于 100 CFU 的各试验菌, 另 1 组培养基, 加入等量的各试验菌作为对照组。2 组培养基均置于仪器内进行培养, 除另有规定外, 培养时间不得超过 5 天。

**结果判断** 与对照组相比, 接种供试品和试验菌的培养基组在仪器内均应显示为阳性结果, 且目视观察生长良好, 不能出现因为生长微弱、缓慢而导致仪器报告阳性的时间明显滞后的现象。否则说明供试品有抑菌作用, 应采用适当方法消除供试品的抑菌作用, 重新进行方法适用性试验。

### 供试品的快速无菌检查

**取样及检验量** 供试品应能代表细胞产品的所有组分, 并从成品中取样。如成品取样不适用, 可采用替代取样方案, 如选取在处理细胞最后接触的液体中取样。采用本法进行生产过程的中间质控时, 应从相应质控点取样。

对于单个容器且总体积(V)在 1ml~1L 的单一批次细胞制剂, 供试品的最少检验量不应低于表 1; 中间产品有多个容器时, 每个容器应分别取样进行检测。取样后应尽快将供试品接种至培养基, 如供试品需存放, 应评估存放的潜在污染风险。

表 1 供试品的最少检验量

细胞类制品总体积 (ml)	接入每种培养基的最少量
---------------	-------------

---

$10 \leq V \leq 1000$	总体积的 1%
$1 \leq V < 10$	100 $\mu$ L
$V < 1$	不适用

---

对于总量小于 1ml 的单一批次产品，上述取样方式不适用，可经评估后采用替代取样方案、过程检查或其他适宜方式。

**供试品处理及接种培养基** 用适宜的方法对供试品包装容器表面进行彻底消毒，在无菌条件下抽取规定量供试品，分别等量接种至仪器适配的每种培养基内，每个容器中接种的供试品体积、培养基的装量和高度同方法适用性试验。除另有规定外，每个容器接种的供试品与培养基体积的比例不应超过仪器说明书的规定。

**阳性对照** 应根据供试品特性和方法适用性试验的结果，选择至少一种阳性对照菌，并评估阳性对照瓶在仪器中培养后报告阳性结果的时间范围。阳性对照瓶加菌量不大于 100 CFU，加入的供试品用量同供试品无菌检查时每份培养基接种的样品量。阳性对照瓶在经验证的时间期限内培养，应为阳性结果。

**阴性对照** 供试品快速无菌检查时，应取相应溶剂、稀释液、或冲洗液同法操作，作为阴性对照。阴性对照应为阴性结果。对于总量小于 1ml 的单一批次产品，上述取样方式不适用，可经评估后采用替代取样方案、过程检查或其他适宜方式。

**培养及观察** 将供试品接种至培养基后尽快置于仪器中培养，禁止储存。培养时间不少于 7 天，根据方法适用性试验结果及特殊相关微生物的情况，可延长至 14 天。

仪器的培养温度应依据方法适用性试验结果而定，原则上应能检测到尽可能多的微生物，培养温度范围通常为 30~37℃。但应根据产品的来源、特点、既往发生过的或与特定细胞类型相关的微生物污染情况具体考虑，对于存在较高环境污染风险的产品，可增加一个需氧条件的温度培养范围，如 20~25℃，以便能覆盖更多的微生物。

**结果判断** 在培养期间定期及结束培养时，按照说明书对仪器进行检查并同时进行目视观察。

若仪器判定各供试品管均为阴性结果，且目视观察未见浑浊，则供试品可判为符合规定。

---

若仪器判定有供试品管为阳性结果，且目视观察发现浑浊，则供试品判为不符合规定。

若仪器判定供试品管为阴性结果，但目视观察发现浑浊，或仪器判断为阳性结果，但目视观察未发现浑浊，出现以上两种情况时，取该培养物不少于 1 ml 转种至同种新鲜培养基中，将原始培养物和新接种的培养基继续培养不少于 4 天，观察接种的同种培养基是否再出现浑浊；或取培养液涂片，染色，镜检，判断是否有菌。如目视观察发现浑浊或涂片发现有菌生长，判供试品不符合规定。

上述任何一种情况下如判供试品不符合规定，除非能充分证明试验结果无效，即生长的微生物非供试品所含，可对供试品进行重试，重试时，应重新取同量供试品，依法检查，结果判定同上。

应至少符合下列条件之一，判为试验无效：

(1) 无菌检查试验所用的设备及环境的微生物监控结果不符合无菌检查法的要求。

(2) 回顾无菌试验过程，发现有可能引起微生物污染的因素。

(3) 在阴性对照中观察到微生物生长。

(4) 供试品管中生长的微生物经鉴定后，确证是因无菌试验中所使用的物品和（或）无菌操作技术不当引起的。

起草单位：中国食品药品检定研究院  
上海市食品药品检验研究院

联系方式：010-53851720  
021-50798176