

细胞类制品微生物检查指导原则

本指导原则适用于细胞类制品风险放行的快速微生物（细菌/真菌）检查。本原则所述细胞类制品主要指经过适当的体外操作（如分离、培养、扩增、基因修饰等）制备后回输人体，按药品批准上市的人体来源的活细胞制品。细胞类制品在无菌工艺下生产，后续无法进行除菌工艺，且由于本身生物特性容易受到微生物污染。因此，微生物的污染检查是制品安全性质控的重要指标之一。

药品通常采用无菌检查法（通则 1101）进行微生物污染的评价，需要至少 14 天的培养观察微生物生长培养信号。细胞类制品由于效期短，产量小，可供检验的数量有限，生产与临床需求结合更为紧密，采用无菌检查法可能无法保证在制品使用前完成放行检查，且取样方案受限。因此细胞类制品在风险评估的基础上有条件地采用快速微生物检查法替代经典无菌检查法已成为安全性质控的必要手段。

随着微生物分析技术的发展，制药领域引入了多类快速微生物检测方法，如通则 9201 药品微生物检验替代方法指导原则中介绍的：检测培养生长信号的技术（例如呼吸信号技术等）；直接检测微生物的技术（例如固相细胞术、核酸扩增等）；结合了预培养和直接检测的技术（例如生物发光技术等）。与传统方法相比，快速方法在检测速度、自动化、实时监测、信息化方面具有一定的优势，不仅可用于生产过程中的质量控制，也可基于风险评估的结果，有条件地应用于成品的放行检查。快速微生物检测方法在药品质量控制方面的应用历史较短，在检测的广谱性、灵敏度等方面积累的数据有限，因此应用前需进行充分的评估。

基本原则

采用快速微生物检查法进行细胞类制品的微生物放行检查，应在充分考虑产品生产工艺、无菌保障水平、微生物污染风险、使用者获益/风险、检测方法原理、同行评议经验等因素的基础上，经风险评估后有条件地施行。微生物质控项目的放行决策应基于产品工艺整体的防污染控制策略及其结果，而非仅依赖于成品的快速微生物方法检查结果。

快速微生物检查法应先按照《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，并在应用于具体品种前进行方法适用性试验，用以考察方法是否适用于该制品的检查。采用本指导原则所述的呼吸信号法时，可直接进行方法适用性试验。

供试品应能代表产品的所有组分，并从最终成品中取样。如成品取样无法实现，需采用其他替代取样方案，应考虑工艺特点，充分评估取样点设计与产品质量控制之间的风险，并得到验证数据的支持。当采用本指导原则进行生产过程中间的质控时，应从相应质控点取样。

冷冻可能导致微生物活力受损，冷冻保存的细胞类制品建议在冷冻之前的最后工序后，完成取样。

细胞类制品的微生物检查应在无菌条件下进行，检验的全过程应严格遵守无菌操作，防止微生物污染，防止污染的措施不得影响供试品中微生物的检出。试验环境应符合无菌检查法（通则 1101）和药品微生物实验室质量管理指导原则（通则 9203）的要求。

当制品检出污染菌时，应对污染菌进行鉴定，进一步评估其对产品质量的影响，鉴定方法可参考微生物鉴定指导原则（通则 9204）。

当检查结果发生争议时，仲裁方法为无菌检查法（通则 1101）。

推荐方法（呼吸信号法）

原理

本指导原则所述方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。此处仅列举呼吸信号法。

呼吸信号法系基于检测微生物生长信号的仪器方法，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，判定供试品中有无微生物生长。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后使用。

呼吸信号法以往多应用于临床血液/体液标本的检测，为较早应用于细胞类制品放行检验的一类快速微生物检查方法。

作为使用仪器进行微生物培养和生长监测的方法，为确保仪器的稳定可靠，应定期对其关键性能（例如培养箱的温控性能）进行验证；对关键传感器（例如温度探头，孔位传感器）的状态进行校准或确认。

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。除痤疮丙酸杆菌外，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，接种痤疮丙酸杆菌的培养基应在 7 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 应至少包含表 1 中的试验菌种。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。除痤疮丙酸杆菌外，细菌悬液的计数采用胰酪大豆胨琼脂培养基，痤疮丙酸杆菌悬液的计数采用血琼脂培养基；真菌悬液的计数采用沙氏葡萄糖琼脂培养基。

表 1 试验菌种

培养条件	菌种
需氧培养	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)，例如[CMCC(B)26 003]
	大肠埃希菌(<i>Escherichia Coli</i>)，例如[CMCC(B)44102]
	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)，例如[CMCC(B)10104]
	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)，例如[CMCC(B)63501]
	酿脓链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>)，例如[CMCC(B) 32067]
	微球菌 (<i>Micrococcus sp.</i>)，例如[CMCC(B) 28020]
	白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)，例如[CMCC(F)98001]
	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)，例如[CMCC(F)98003]

厌氧培养

生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*)，例如[CMCC(B)64941]

痤疮丙酸杆菌 (*Cutibacterium acnes*)，例如[CMCC(B) 65111]

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 7 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。

供试品的快速微生物检查

取样及检验量 供试品取样按照基本原则的要求进行。

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 2；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，以及存放对检出效果的影响。

表 2 供试品的最少检验量

细胞类制品总体积 (ml)	<u>总接种体积 (分别接种至需氧培养基和厌氧培养基)</u>
$10 \leq V \leq 1000$	总体积的 1%
$1 \leq V < 10$	100 μ 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。

培养及观察 将供试品接种至培养基后，应按照仪器说明书的时间要求尽快置于仪器中培养。培养时间应不少于 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℃。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，且目视观察判断无微生物生长迹象，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，且目视观察判断有微生物生长迹象，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，但目视观察疑似微生物生长现象，或仪器判断为阳性结果，但目视观察未发现微生物生长迹象，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，方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

国家药典委员会

起草说明

本指导原则在国家药典委员会《细胞类制品微生物检查法》(上网公示稿)基础上,根据指导原则的体例以及反馈意见审议的采纳情况进行了修改。

一、概述

首先介绍了本指导原则的适用范围,本指导原则所述细胞类制品的涵盖范围(参考了2017年12月发布的《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》中的定义)。简述细胞类制品的工艺特点、微生物质控的特殊性,采用无菌检查替代方法的必要性,对不同类别的药品快速微生物替代方法做了简单列举,方法原理上未限定某一类方法,对后续收载新方法增加可行性。

二、基本原则

将原公示稿中细胞类制品微生物检查风险评估原则移至此处,并原则性地要求快速微生物检查法需进行方法学验证和方法适用性后使用。本指导原则后述的呼吸信号法,参考多年国际上的验证结果,本指导原则起草单位的验证结果以及欧美药品监管的要求,不再要求进行方法学验证,仅需进行方法适用性试验后即可使用。

供试品取样进行的原则性的要求。考虑细胞类制品的复杂性增加“需采用其他替代取样方案,应考虑工艺特点,充分评估取样点设计与产品质量控制之间的风险,并得到验证数据的支持。”等内容,增加采样灵活性,同时对采样点设计的风险评估予以提示。

最后增加了检验环境的要求以及制品出现污染菌、结果争议时的处理原则。

三、方法

根据起草单位的方法研究的结果,以及国际上已将呼吸信号法纳为药品快速微生物检查的法定方法的情况,本指导原则仅列举了呼吸信号法。原公示稿中的内容基本保留,与指导原则前面重复的内容不再赘述。

首先对方法原理进行了简述,原风险评估的使用原则因移至指导原则的基本原则项下,故在此处不再重复表述。

培养基方面明确了生长缓慢的痤疮丙酸杆菌的内容。

方法适用性试验上,对试验菌种采用更为清晰的列表描述,与药典其他微生物通则同步,暂不收录 ATCC 菌种,适当从严要求,保留铜绿假单胞菌。

取样量方面按照通则专业委员会的审议结果,参考欧洲药典的要求,按照总接种体积进行取样。取样基本原则移至基本要求中表述。增加取样后如存放应进行评估风险的提示。

结果判断部分将原浑浊的表述修改为“微生物生长迹象”。