



中华人民共和国国家标准

---

## 细胞无菌检测通则

General rules for cell sterility testing

国家市场监督管理总局  
中国国家标准化管理委员会

# 前 言

本标准参考了国家标准 GB/T 1.1—2020 给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

# 细胞无菌检测通则

## 1 范围

本标准规定了细胞无菌检测一般要求、污染评估、检测方法、过程控制。  
本标准适用于细胞无菌检测。

## 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。

中华人民共和国药典（三部）（2015年版）

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 无菌检测 sterility testing

利用方法对细胞中细菌、真菌、支原体和病毒检验的过程。包括是否有污染及确定具体污染

## 4 细胞无菌检测一般要求

4.1 基于微生物培养法，应在严格无菌条件下进行。

4.2 应根据细胞类型、接触潜在污染的历史和细胞的预期应用目的，对用于特定细胞培养的生物制剂检测制度进行风险评估。应通过风险评估促进并制定用于特定细胞无菌检测制度。根据待测潜在污染生物体的特性和细胞的使用情况，选择适宜的检测方法。

4.3 在选择特定的检测方法时，应了解该方法的工作原理、其所能检测到和检测不到的类型/物种、以及预期的灵敏度。此外，方法的选择应考虑可用的特定样品，所选方法为定量、半定量或定性，预期的灵敏度水平等因素。

4.4 选择检测方法应依据预期的目的以及样本和处理因素，包括细胞的预期用途、细胞类型、细胞属性，以及样本特征、样本异质性等潜在影响。

4.5 实验室应制定质控物质和/或参考物质的获取程序，包括校准、验证、有效期和危害标识。

4.6 原始数据、质控和结果的详细记录应归档。

4.7 应评估最可能的微生物污染类型，审核现有检验方法的适用性，为待检测样本选择特定的合适的方法，并最终建立细胞的检测制度。

## 5 污染评估

细胞污染风险评估应基于细胞来源、潜在污染暴露史、细胞的预期应用及所处环境进行评估。

5.1 应考虑细胞样本源，来自不同物种的细胞很可能携带来自相应物种的微生物。

5.2 应考虑细胞的暴露史。能够根据暴露史估计可能的污染。例如，如果动物血清用于培养细胞，它可能被特定的动物病毒污染。

5.3 应根据细胞的使用目的进行相关污染检测。

5.4 应考虑细胞制备和细胞培养的全周期所处的环境因素。

## 6 检测方法

### 6.1 细菌和真菌

6.1.1 可采用革兰氏染色法、直接镜检法、膜过滤法、直接接种法对细菌或真菌进行检测判定，也可采用PCR法、气相色谱-质谱联用法、红外光谱法对其组分、核酸、代谢产物进行检测判定。

6.1.2 可通过显微镜直接对细菌或真菌污染物进行观察和鉴定。

6.1.3 试验样品性质如可行，应当首先选择膜过滤法进行检测，因该方法可以富集待检测样品中可能污染的细菌或/和真菌，增加检测的灵敏度。该法通常取细胞培养上清液至少10 ml。

6.1.4 可直接使用细菌和真菌培养基，在规定的条件下培养14天，观察可见污染，然后在固体琼脂培养基上进行再次转接培养，以确定培养生物的菌落类型。直接接种法对于细胞培养体系中添加抗生素的样品应考虑抗生素对细菌和真菌的抑制效应而影响检测的敏感性。

6.1.5 可采用PCR的方法检测细菌16S rRNA高保守区的序列来判断是否有细菌污染。还可测定细菌16S rRNA可变区的序列，利用序列分析污染菌的种属类。也可采用PCR的方法检测真菌18S rRNA或28S rRNA高保守区的序列来判断是否有真菌污染，利用ITS1或ITS2等序列判断感染真菌的种属。6.1.6 对微生物污染产生的特殊物质进行检测可采用气相色谱-质谱联用法。

6.1.7 应用革兰氏染色法鉴定污染细菌为革兰氏阴性或者阳性菌。

6.1.8 通过不同浓度、不同培养时间加热对活菌和灭活菌进行鉴别时可使用红外光谱技术。

6.1.9 可采用凝胶法、浊度法、显色试验、重组C因子方法、热原质试验、单核细胞活化测试等对内毒素进行检测判定。

6.1.10 可利用鲎试剂与内毒素产生凝集反应对内毒素产生聚集反应对内毒素进行限度或半定量检测进行判定。

6.1.11 可利用鲎试剂与内毒素反应过程中的浊度变化而测定内毒素的含量进行判定。

6.1.12 可利用反应过程中产生的凝固酶使特定底物释放出呈色团的多少,并以其吸光度或透过率的检测值测定内毒素进行判定。

6.1.13 可利用重组C因子方法检测内毒素水平进行判定。

6.1.14 用试验样品接种家兔,体温升高表明样品中含有致热源,可能含有内毒素进行判定。

6.1.15 可用单核细胞活化测试确定革兰氏阳性和阴性等多种细菌内毒素的存在进行判定。

## 6.2 病毒

6.2.1 可采用细胞形态观察及血吸附试验、体外不同细胞接种法、动物和鸡胚接种检查法、PCR法、高通量测序法、荧光免疫法、酶联免疫法和红细胞凝集试验等对病毒进行检测判定。

6.2.2 显微镜观察细胞形态以初步判断是否有病毒污染。光学显微镜分辨率不足以分辨大多数病毒,可利用光学显微镜观察病毒感染导致的细胞病变,如细胞变圆和合胞体的形成,进而判断是否有病毒污染的可能,并结合其他方法检测病毒污染。电子显微镜放大率高和分辨率高,可通过观察大小和形态来识别病毒,还可以用特异性抗体标记的免疫电镜,增加敏感性和检出率。

6.2.3 可用细胞培养法,取细胞培养物的上清或细胞培养物的裂解物,接种已知未污染病毒的相应细胞,检测是否出现细胞病变,或采用血细胞的吸附现象检测待检细胞培养物是否污染病毒。

6.2.4 可采用常规PCR、巢式PCR以及源于RNA的逆转录PCR以及实时荧光PCR等对病毒进行检测。

6.2.5 可利用高通量测序,对细胞培养物中的潜在污染病毒进行检测。

6.2.6 可利用基因芯片技术合成大量已知病毒的核酸探针检测细胞培养物中的潜在污染病毒信号或证据。

6.2.7 可采用逆转录酶检测方法(Product-Enhanced Reverse Transcriptase, PERT)以RNA为模板的PCR体系中,加入待测样品,如样品中含有逆转录病毒表达的逆转录酶,则该PCR体系得以扩增。可检测细胞培养物中的逆转录病毒污染的信号,检测出阳性的结果时应进一步检测是否存在完整的病毒颗粒。

6.2.8 可根据抗原抗体特异性结合的原理,将已知的抗体分子标记上荧光素,当与其相对应的抗原结合时,在荧光显微镜下即可见与抗原结合的荧光,从而确定细胞培养物中污染的病毒。

6.2.9 可利用特异性抗体与抗原结合的原理,可将已知特异的抗体(通常使用)IgG与相关的酶结合,通过酶-底物的酶促放大效应检测细胞培养物中的病毒污染。

6.2.10 可用于抗病毒抗体的检出。如果供试品中存在对红细胞表面决定基的抗体,则红细胞亦将凝集。

6.2.11 可将细胞培养物经反复冻融后的裂解物接种到相应的敏感动物,如细胞中污染了病毒,则可产生相应病毒的抗体,再以已知的病毒抗原检测该抗体,以检测细胞培养物中是否污染病毒。

6.2.12 多种常用实验动物对相应的病毒非常敏感,有小鼠(包括乳鼠和成鼠)、豚鼠、仓鼠、家兔和非人灵长类动物。常用的接种途径包括颅内、腹腔、鼻腔和皮下等途径。接种后,观察动物的体重、取食、运动、精神和存活状况,某些病毒对特定的动物具有特征性的疾病表现,可判断是否有病毒感染。然后取组织用其他病毒鉴定方法进一步鉴定。

6.2.13 鸡胚接种法是一种传统的病毒传代和检测方法。分离粘液病毒、疱疹病毒和痘病毒宜采用鸡胚接种。

## 6.3 支原体

6.3.1 可采用培养法、指示细胞培养法（DNA染色）、PCR法等对支原体进行检测判定。

6.3.2 培养法检测支原体生长可能需要较长的时间（28天），故对支原体检测结果报告时间没有急切要求的，可以选择该方法，具体操作见《中国药典》。

6.3.3 可采用DNA染色法，将样品接种于指示细胞(未受污染的Vero细胞或其他经国家有关部门批准的细胞)上，于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育3-5天，用特定荧光染料如DAPI、Hoechst33258染色。在合适的光照波长下，经荧光显微镜下观察看到有附着在细胞表面的支原体DNA染色则表明存在支原体污染。

6.3.4 可通过检测支原体16S rRNA序列保守区特异性序列来判定是否存在支原体。

6.3.5 可用腺苷磷酸化酶代谢物对指示细胞的毒性作用检测支原体。

## 7 过程控制

### 7.1 样品

7.1.1 应根据所选方法，确定好待测物品的数量、体积和大小。

7.1.2 应根据样品材料可能的稳定性考虑样品储存条件。

### 7.2 材料和仪器

7.2.1 检测过程中使用标准物质和标准样品，以确保测量的可追溯性、可比性和/或验证测量过程。应使用合适的有证标准物质或标准样品。

7.2.2 应根据样本尺寸选择适宜的容器，避免蒸发、确保无菌、无毒、无浸出。

7.2.3 应考虑设备、试剂和耗材对无菌检测的影响。

7.2.4 应配备与无菌检测应能力和工作量相适应的仪器设备，其类型、测量范围和准确度应符合检测所用标准的要求。

7.2.5 试剂的贮存和微生物检验应在试剂和检测设备可接受的稳定性范围内进行。

7.2.6 用于无菌检测的溶液、稀释剂或冲洗剂以及所使用的耗材，如果是作为无菌检测的测试样品的成分，则不应具有抗微生物活性的特性。

### 7.3 检测方法

对各种检测方法应该进行充分的验证，充分考虑影响检测性能指标的各种因素。

7.3.1 微生物检测方法选择参见附录A，微生物检测对象选择表见附录B。

7.3.2 应根据供试品中潜在污染微生物的类型及供试品的特性、细胞类型、细胞来源和用于培养的试剂来选择适宜的方法。

7.3.3 选择的每一种方法都应该经过验证，以便与特定的样本分析一起使用，以确保检测的适当敏感性，并应使用对照物进行挑战试验，以证明结果的持续有效性。

7.3.4 应依据微生物的最佳生长条件和营养需求选择专门的分离方法进行检测某些物种。

7.3.5 应考虑微生物的生长速度，有的可能需要经过长时间富集培养才能培养出生物体。

7.3.6 应考虑某些种类和真菌会形成孢子，这些孢子对干燥、高温和清洁材料具有很强的抵抗力。

7.3.7 应考虑细胞培养过程中支原体感染有时对细胞生长状态们没有明显影响，不易观察，支原体体积小，能通过一定孔径的膜过滤器，支原体可能黏附在细胞膜上仅以最低水平浓度存在于培养上清液种等因素。

## 7.4 环境

7.4.1 应尽量避免影响细胞培养物中无菌检测的环境因素。

7.4.2 所使用的细胞无菌检测实验室，应符合相关规定。

7.4.3 所使用的基因检测实验室，应符合相关规定。

## 7.5 人员

从事无菌检测工作的人员应具有微生物学或类似专业知识的教育背景，并在相应的检测程序中受过适宜的培训。

从事基因检测工作的人员应具有分子生物学或类似专业知识的教育背景，具备PCR实验室上岗证书。

附录 A

(资料性附录)

微生物检测方法选择表

微生物类别	分类	方法	耗时	精确度或特异性	灵敏度	操作复杂度	建立难易度	广谱性
细菌及真菌	直接镜检法	直接镜检法	快速	低	低	简单	简单	高
	基于培养的方法	膜过滤法	14 天	高	高	简单	简单	高
		直接培养法	14 天	高	高	简单	简单	高
	基于核酸的方法	16S rRNA PCR 法	当天	高	高	较复杂	较难	高
	基于代谢产物的方法	气相色谱-质谱联用	快速	高	高	简单	复杂	高
	基于微生物组分	革兰氏染色法	时间短	高	高	简单	简单	高
		傅里叶变换红外光谱学	快速	高	高	简单	简单	高
内毒素	基于鲎试剂的方法	凝胶法	快速	高	高	简便	快速	高
		浊度法	快速	高	高	简便	快速	高
		显色试验	快速	高	高	复杂	快速	高
	重组 C 因子法	重组 C 因子法		低	较高	简单	简单	低
	热原质试验	热原质试验	周期长	低	低	复杂	复杂	高
	单核细胞活化试验	单核细胞活化试验	2 天	低	低	简单	复杂	高
病毒	核酸的方法	PCR、实时 PCR、逆转录 PCR 和巢式 PCR	2 小时	高	高	简单	较难	高
		高通量测序和基因芯片技术	快速	高	高	较难	较难	高



微生物类别	分类	方法	耗时	精确度或特异性	灵敏度	操作复杂度	建立难度	广谱性
病毒	核酸的方法	逆转录酶检测方法	快速	高	高	复杂	较难	低
	基于免疫分析的方法	红细胞凝集试验	快速	高	高	简便	简单	低
		酶联免疫法	当天	较高	较高	简单	简单	低
		免疫荧光法	快速	高	高	简单	简单	低
		抗体生成法	时间较长	低	低	简单	简单	中
	显微镜直接观察法	光学显微镜、荧光显微镜、共聚焦显微镜 (CFM)、透射电镜 (TEM) 和扫描电镜 (SEM)	快速直接	高	高	较难	较难	高
	基于接种的方法	动物接种	耗时较长	低	高	较难	较难	高
		鸡胚接种	耗时较长	高	高	简便	简单	较高
		接种动物细胞系	耗时较长	低	低	繁琐	较难	较低
	支原体	基于培养的方法	培养法	28-35天	高	高	繁琐	简单
示踪细胞培养法 (DNA 染色)			比培养法快	高	高	繁琐	难	高
基于核酸的方法		核酸扩增法	3h	高	高	简单	较难	低
基于特异性酶的方法		支原体特异性酶的检测	2h	高	高	简单	简单	高

## 附录 B

(资料性附录)

### 微生物检测对象选择表

#### 1.1 真菌和细菌

方法	检测对象/注意事项
膜过滤法	大体积的细胞培养物中细菌和真菌检测
直接培养法	活的细菌和真菌
微生物代谢产物的放射检测	活的细菌和真菌
革兰氏染色法	活的或死的细菌和真菌
16S RNA PCR 法	存在于活的或死的细胞中, 或游离于上清液中的核酸
傅里叶变换红外光谱学	活的或死的细菌和真菌
气相色谱-质谱联用	死细菌或真菌多糖中的脂肪酸、单糖和熊果酸
凝胶法	革兰氏阴性细菌脂多糖 结果取决于萤试剂的灵敏度。
浊度法	革兰氏阴性细菌脂多糖 浊度法不能用于某些混浊或有色产品。
比色测定	革兰氏阴性细菌脂多糖 比色法不能用于某些混浊或有色产品。
显色试验	革兰氏阴性细菌脂多糖 显色法不能用于某些混浊或有色产品。
重组 C 因子法	革兰氏阴性细菌脂多糖 该方法能有效避免假阳性。
热原质试验	所有种类的能导致动物体温升高的内毒素。
单核细胞活化试验	内毒素广泛存在于细菌中, 包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。

#### 1.2 病毒

方法	检测对象/注意事项
核酸的方法	存在于活细胞、死细胞或游离于上清液中的特定病毒的核酸
基于免疫分析的方法	特定的病毒抗原。
显微镜	在细胞或培养上清中的活的和死的病毒结构。可采用不同的技术如下: 光学显微镜检查细胞培养的病变。 荧光显微镜检测病毒抗原。 透射电镜观察细胞内病毒。 扫描电镜观察细胞表面病毒颗粒。
红细胞凝集试验用红细胞接种到受感染的细胞培养物上	用于检测可以引起红细胞凝集的病毒抗原或活病毒颗粒。
动物接种	能引起动物病理效应的活病毒。
鸡胚接种	可感染鸡胚的不同组织的活病毒。
接种动物细胞系	活病毒, 引起细胞病变或表达可检测的病毒抗原。

### 1.3 支原体

方法	检测对象/注意事项
在肉汤和固体琼脂培养基中培养支原体	活的、可培养的支原体。
示踪细胞培养法(DNA 染色)	适用于各种支原体。
核酸扩增法	用特异性引物检测特异性支原体。
DNA 染色	用于检测不能在选择性培养基或琼脂培养基上生长的支原体菌株。
支原体特异性酶的检测	本方法检测支原体特异性酶。