



中华人民共和国国家标准

GB/T 40365—2021

细胞无菌检测通则

General guide for cell sterility testing

2021-08-20 发布

2022-03-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本文件起草单位：中国科学院动物研究所、北京干细胞与再生创新研究院、中国细胞生物学会、北京工商大学、中国测试技术研究院生物研究所、中国计量科学研究院、中国科学院微生物研究所、中国食品药品检定研究院、中国医学科学院、中国人民解放军军事科学院军事医学研究院。

本文件主要起草人：赵同标、郝捷、马爱进、王磊、丁进锋、胡宝洋、曹佳妮、王柳、周李华、张愚、魏军、傅博强、李启沅、郑爱华、傅钰、董关木、王斌、吴雪伶、魏强、范薇、祝焕新。

细胞无菌检测通则

1 范围

本文件规定了细胞无菌检测的一般要求、方法选择和过程控制。
本文件适用于细胞中的细菌、真菌、病毒和支原体的检测控制。

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(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

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

对细胞样本中是否存在微生物污染所进行的测定。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ITS1:核糖体 DNA 的第一内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer-1)

ITS2:核糖体 DNA 的第二内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer-2)

MNP:多核苷酸多态性(Multiple Nucleotide Polymorphism)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

16S rRNA:16S 核糖体 RNA(16S Ribosomal Ribonucleic Acid)

5 一般要求

5.1 应根据细胞来源、潜在污染暴露史、细胞预期应用目的及所处环境等方面对细胞进行风险评估。考虑的因素包括但不限于以下几个方面:

- a) 应考虑细胞样本源。来自不同物种的细胞很可能携带潜在的微生物;
- b) 应根据细胞的使用目的进行相关污染检测;
- c) 应考虑细胞制备和细胞培养的全周期所处的环境因素。根据暴露史评估可能的污染,如用于培养细胞的动物血清可能被特定的微生物污染。

5.2 依据风险评估判断可能性最大的微生物污染类型,评估现有检验方法的适用性,为待检测样本选择合适的方法。

6 方法选择

6.1 总体要求

6.1.1 在选择检测方法时,应了解该方法原理、微生物类型以及灵敏度等。

6.1.2 选择检测方法应依据预期目的、样本特性和处理因素。

6.1.3 选择的方法应经过验证或确认。

6.2 细菌和真菌

6.2.1 依据需要选择适用于细菌和真菌的检测方法,如直接镜检法、膜过滤法、直接接种法、PCR法、MNP标记法、飞行时间质谱等。

6.2.2 初步判断是否有细菌或真菌污染物,宜采用直接镜检法。

6.2.3 若试验样品性质如可行,应首先选择膜过滤法进行检测。

6.2.4 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。

6.2.5 利用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。利用PCR的方法检测细菌16S rRNA可变区的序列和MNP标记序列分析污染细菌的种属,利用MNP、ITS1或ITS2等序列判断感染真菌的种属。

6.2.6 对微生物的组分进行检测可采用飞行时间质谱法等。

6.3 病毒

6.3.1 依据需要选择适用于病毒检测的方法,如直接镜检法、细胞形态观察及血吸附试验、体外不同细胞接种法、动物检查法、鸡胚接种检查法、PCR法、高通量测序法、基因芯片技术、荧光免疫法、酶联免疫法和血细胞凝集试验等方法。

6.3.2 可利用光学显微镜观察病毒感染导致的细胞病变合胞体的形成;可通过电子显微镜观察大小和形态来识别病毒;可通过免疫电镜技术识别病毒。

6.3.3 取细胞培养物的上清液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。

6.3.4 若采用动物检查法,可通过对普通动物或者含有特定病原体的动物,如小鼠(包括乳鼠和成鼠)、豚鼠、仓鼠、家兔和非人灵长类动物等进行颅内、腹腔、鼻腔和皮下等部位接种,判断是否有病毒感染。

6.3.5 分离黏液病毒、疱疹病毒和痘病毒宜采用鸡胚接种检查法。鸡胚应来自无特定病原(SPF)鸡群。

6.3.6 采用PCR法检测病毒核酸高保守区的序列来判断是否有病毒污染。

6.3.7 可采用高通量测序法鉴定病毒特异性序列。

6.3.8 采用基因芯片技术检测病毒,需要合成与潜在污染的病毒基因组上的特定区域互补的核酸探针。

6.3.9 运用病毒抗原特异的抗体,通过荧光免疫反应用荧光显微镜检测细胞内病毒蛋白来判断特定的病毒污染。

6.3.10 运用病毒抗原特异的抗体,通过酶联免疫反应检测细胞内或者上清液中的病毒蛋白来判断特定的病毒污染。

6.3.11 通过凝集血细胞检测上清液中的病毒颗粒,如用鸡红细胞检测流感病毒。

6.4 支原体

6.4.1 依据需要选择适用于支原体检测的方法,如培养法、指示细胞培养DNA染色法、PCR法、荧光原

位杂交法、腺苷磷酸化酶活性检测法等方法。

6.4.2 若对支原体检测结果报告时间没有急切要求的,宜选择培养法进行检测。

6.4.3 利用 DNA 染色法,经荧光显微镜下观察看到有附着在细胞表面的大小不等、不规则的荧光着色颗粒则表明存在支原体污染。

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

6.4.5 利用荧光原位杂交法检测支原体,需要设计与支原体 rRNA 的高度保守区域互补的荧光探针。

6.4.6 腺苷磷酸化酶活性检测法不适用于本身腺苷磷酸化酶活性高的细胞。

7 过程控制

7.1 样品

7.1.1 应根据所选方法,确定足够量的供试样品。

7.1.2 应根据供试样品可能的稳定性考虑其储存条件。

7.1.3 应实行严格微生物规范操作,避免取样过程中微生物污染。

7.2 试剂材料和仪器设备用具

7.2.1 应考虑设备、试剂和耗材对微生物检测的影响。

7.2.2 检测过程中应使用标准物质。

7.2.3 应根据样品尺寸选择适宜的容器,避免蒸发、确保无微生物、无毒、无浸出。

7.2.4 应配备与微生物检测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要求。

7.2.5 检测所用试剂应贮存在适宜的环境中,以确保试剂的稳定性。

7.2.6 用于微生物检测的溶液、稀释剂或冲洗剂以及所使用的耗材若是作为微生物检测测试样品的成分,则不应具有抗微生物活性的特性。

7.3 操作

7.3.1 待测样品的收集操作应确保无污染引入。

7.3.2 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。

7.3.3 应根据微生物的生长速度,以获得足够数量的生物体。

7.3.4 应考虑某些微生物种类和真菌是否形成孢子。

7.3.5 应考虑细胞培养过程中受支原体污染时,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中。

7.4 人员

无菌检测操作人员应具有相应的检测能力、技能证明和/或工作经验。

7.5 环境

微生物检测实验室生物安全等级应遵守 GB 19489 的要求。
