

## 3306 无菌检验或纯粹检验法（标准草案）

除另有规定外，无菌检验或纯粹检验按照下列方法进行。

### 1 抽样 应随机抽样并注意代表性。

1.1 制造疫苗用的各种原菌液、毒液和其他配苗组织乳剂、稳定剂及半成品的无菌或纯粹检验，应每瓶（罐）分别抽样进行，抽样量为2~10ml。

1.2 成品的无菌检验或纯粹检验应按每批或每个亚批进行，每批按瓶数的百分之一抽样，但应不少于5瓶，最多不超过10瓶，每瓶分别进行检验。

### 2 培养基

2.1 无菌检验用培养基 硫乙醇酸盐流体培养基（Fluid Thioglycollate Medium，简称TG），用于厌氧菌和需氧菌的检查；酪胨琼脂培养基（Peptone from casein Agar Medium，简称GA），用于需氧菌的检查；胰酪大豆胨液体培养基（Trypticase Soy Broth，简称TSB；亦称大豆酪蛋白消化物培养基，Soybean-Casein Digest Medium），用于真菌和需氧菌的检查。

#### 2.1.1 培养基的配制

##### 2.1.1.1 硫乙醇酸盐流体培养基（TG）

胰酪蛋白胨	15g
酵母浸出粉	5.0g
无水葡萄糖	5.0g
硫乙醇酸钠	0.5g
（或硫乙醇酸）	（或0.3ml）
L-半胱氨酸盐酸盐（或L-胱氨酸）	0.5g
氯化钠	2.5g
新配制的0.1%刃天青溶液	1.0ml
琼脂	0.75g
纯化水	加至1000ml

除葡萄糖和0.1%刃天青溶液外，将上述成分混合，加热溶解，然后加入葡萄糖和0.1%刃天青溶液，摇匀，将加热的培养基放至室温，用1.0mol/L氢氧化钠溶液调整pH值，使灭菌后的培养基pH值为6.9~7.3，分装，116℃灭菌30分钟。若培养基氧化层（粉红色）的高度超过培养基深度的1/3，需用水浴或自由流动的蒸汽加热驱氧，至粉红色消失后，迅速冷却，只限加热1次，并防止污染。

##### 2.1.1.2 酪胨琼脂培养基（GA）

胰酪蛋白胨	15g
酵母浸出粉	5.0g
无水葡萄糖	5.0g
L-半胱氨酸盐酸盐（或L-胱氨酸）	0.5g
氯化钠	2.5g
琼脂	12.0g
纯化水	加至1000ml

除葡萄糖外，将上述成分混合，加热溶解，然后加入葡萄糖，混匀，将加热的培养基放至室温，用1.0mol/L氢氧化钠溶液调整pH值，使灭菌后的培养基pH值为6.9~7.3，分装，116℃灭菌30分钟。

##### 2.1.1.3 胰酪大豆胨液体培养基（TSB）

葡萄糖（含 1 个结晶水）	2.5g
胰酪蛋白胨	17g
大豆粉木瓜蛋白酶消化物（大豆胨）	3.0g
磷酸氢二钾（含 3 个结晶水）	2.5g
氯化钠	5.0g
纯化水	加至 1000ml

将上述成分混合，微热溶解，将培养基放至室温，调节 pH 值，使灭菌后的培养基 pH 值为 7.1~7.5，分装，116°C 灭菌 30 分钟。

2.1.2 培养基的质量控制 使用每批培养基应符合以下检查规定，可与制品的检验平行操作，也可提前进行下列检测。

#### 2.1.2.1 性状

2.1.2.1.1 硫乙醇酸盐流体培养基（TG） 流体，氧化层的高度（上层粉红色）不超过培养基深度的 1/3。

2.1.2.1.2 酪胺琼脂培养基（GA） 淡黄色固体。

2.1.2.1.3 胰酪大豆胨液体培养基（TSB） 澄清液体。

#### 2.1.2.2 pH 值

2.1.2.2.1 硫乙醇酸盐流体培养基（TG）的 pH 值为 6.9~7.3。

2.1.2.2.2 酪胺琼脂培养基（GA）的 pH 值为 6.9~7.3。

2.1.2.2.3 胰酪大豆胨液体培养基（TSB）的 pH 值为 7.1~7.5。

2.1.2.3 无菌检验 每批培养基随机抽取 10 支（瓶），5 支（瓶）置 35~37°C，另 5 支（瓶）置 23~25°C，均培养 7 日，逐日观察。培养基 10/10 无菌生长，判该培养基无菌检验符合规定。

#### 2.1.2.4 微生物促生长试验

##### 2.1.2.4.1 质控菌种

需氧菌（Aerobic bacteria）	菌种代号
金黄色葡萄球菌（ <i>Staphylococcus aureus</i> ）	CVCC 2086
铜绿假单胞菌（ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ）	CVCC 2000
厌氧菌（Anaerobic bacteria）	
生孢梭菌（ <i>Clostridium sporogenes</i> ）	CVCC 1180
真菌（Fungi）	
白假丝酵母（亦称白色念珠菌）（ <i>Candida albicans</i> ）	CVCC 3597
巴西曲霉（黑曲霉） [ <i>Aspergillus brasiliensis</i> （ <i>Aspergillus niger</i> ）]	CVCC 3596

2.1.2.4.2 培养基检验 取装有 9.0ml 硫乙醇酸盐流体培养基的小管 10 支，分别接金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和生孢梭菌质控菌种标准品，每个菌种接种 3 支，另 1 支不接种，作为阴性对照，置 35~37°C 培养 3 日；取装有 6.0ml 酪胺琼脂培养基的斜面 7 支，分别接种金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌质控菌种标准品，每个菌种接种 3 支，另 1 支不接种，作为阴性对照，置 35~37°C 培养 3 日；取装有 7.0ml 胰酪大豆胨液体培养基的小管 7 支，分别接种白假丝酵母、巴西曲霉质控菌种标准品，每个菌种接种 3 支，另 1 支不接种，作为阴性对照，置 23~25°C 培养 5 日，逐日观察结果。接种管 3/3 有菌生长，阴性对照管无菌生长，判定该批培养基微生物促生长试验符合规定。

2.2 纯粹检验用培养基 无菌检验培养基和适用于本菌生长的培养基。

### 3 检验方法

#### 3.1 半成品的检验

3.1.1 细菌原液（种子液）、细菌活疫苗半成品的纯粹检验 取供试品接种 TG 小管、GA 斜面及适宜于本菌生长的其他培养基各 2 管，每支 0.2ml，1 支置 35~37℃培养，1 支置 23~25℃培养，观察 3~5 日，应纯粹。

3.1.2 病毒原液和其他配苗组织乳剂、稳定剂及半成品的无菌检验 取供试品接种 TG 小管和 GA 斜面各 2 支，每支 0.2ml，1 支置 35~37℃培养，1 支置 23~25℃培养，另取 0.2ml，接种 1 支 TSB 小管，置 23~25℃培养，均培养 7 日，应无菌生长。

#### 3.1.3 灭活抗原的无菌检验

3.1.3.1 灭活细菌菌液的无菌检验 细菌灭活后，用适于本菌生长的培养基 2 支，各接种 0.2ml，置 35~37℃培养 7 日，应无菌生长。

3.1.3.2 灭活病毒液的无菌检验 病毒液灭活后，接种 TG 小管和 GA 斜面各 2 支，每支 0.2ml，1 支置 35~37℃培养，1 支置 23~25℃培养，另取 0.2ml，接种 1 支 TSB 小管，置 23~25℃培养，均培养 7 日，应无菌生长。

3.1.3.3 类毒素的无菌检验 毒素脱毒过滤后，接种 TG 小管和 GA 斜面各 2 支，每支 0.2ml，1 支置 35~37℃培养，1 支置 23~25℃培养，另取 0.2ml，接种 1 支 TSB 小管，置 23~25℃培养，均培养 7 日，应无菌生长。

#### 3.2 成品检验

##### 3.2.1 无菌检验

###### 3.2.1.1 样品的处理

3.2.1.1.1 液体制品样品的处理 当样品装量大于 1.0ml 时，不做处理，直接取样进行检验；当样品的装量小于 1.0ml 时，其内容物全部取出，用于检验。

3.2.1.1.2 冻干制品样品的处理 当样品的原装量大于 1.0ml 时，用适宜的稀释液恢复至原量，取样进行检验；当样品的原装量小于 1.0ml 时，用适宜的稀释液复溶后，全部取出用于检验。

3.2.1.2 检验 样品（原）装量大于 1.0ml 的，取处理好的样品 1.0ml，样品（原）装量小于 1.0ml 的，取其处理好的样品的全部内容物，接种 50mlTG 培养基，置 35~37℃培养，3 日后吸取培养物，接种 TG 小管、GA 斜面各 2 支，必要时接种 2 支适宜疫苗株生长的培养基，每支 0.2ml，1 支置 35~37℃培养，1 支置 23~25℃培养，另取 0.2ml，接种 1 支 TSB 小管，置 23~25℃培养，均培养 7 日，应无菌生长。

如果允许制品中含有一定数量的非病原菌，应进一步做杂菌计数和病原性鉴定。

##### 3.2.2 纯粹检验

###### 3.2.2.1 样品的处理

3.2.2.1.1 液体制品样品的处理 当样品装量大于 1.5ml 时，不做处理，直接取样进行检验；当样品的装量小于 1.5ml 时，适宜的稀释液稀释至 1.5ml。

3.2.2.1.2 冻干制品样品的处理 当样品的原装量大于 1.5ml 时，用适宜的稀释液恢复至原量，取样进行检验；当样品的原装量小于 1.5ml 时，用适宜的稀释液复溶至 1.5ml，取样进行检验。

3.2.2.2 检验 取处理好的样品，接种 TG 小管、GA 斜面和适于本菌生长的其他培养基各 2 支，每支 0.2ml，1 支置 35~37℃培养，1 支置 23~25℃培养，另用 1 支 TSB 小管，接种 0.2ml，置 23~25℃培养，均培养 5 日，应纯粹。

#### 4 结果判定

每批抽检的样品必须全部无菌或纯粹生长。如果纯粹检验发现个别瓶有杂菌生长或无菌检验发现个别瓶有菌生长或结果可疑，应抽取加倍数量的样品重检，如果仍有杂菌生长或有菌生长，则作为污染杂菌处理。如果允许制品中含有一定数量非病原菌，应进一步作杂菌计数和病原性鉴定。

##### 修订说明：

1. 本标准系在 2020 年版《中国兽药典》附录 3306 基础上修订而成，并按照 2024 年第 2 次会议意见修改完善。

2. 删除“2 检验用培养基”中的“检验用”，将“2.1 无菌检验”修改为“2.1 无菌检验用培养基”，将“2.1.1 培养基及配方”修改为“2.1.1 培养基的配制”。删除了 2.1 “\*\*\*培养基，用于污染\*\*\*的检查等”中“污染”；删除了“按照以下配方生产的符合规定的商品化培养基也可用于无菌检验”的描述。

3. 依据 2024 年第 12 次会议审查意见：修改完善“微生物促生长试验”内容，鉴于 CVCC 菌种可以满足使用要求，删除了质控菌种所列的 ATCC 和 CMCC 菌种内容；将 2.1.2.4.2.1 和 2.1.2.4.2.2 项合并至 2.1.2.4.2，规范修改了培养基检验的描述并引入质控菌株标准品。科学表述检验要求及判定结果。即：“2.1.2.4.2 培养基检验 取装有 9.0ml 硫乙醇酸盐流体培养基的小管 10 支，分别接金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和生孢梭菌质控菌种标准品，每个菌种接种 3 支，另 1 支不接种，作为阴性对照，置 35~37℃培养 3 日；取装有 6.0ml 酪胺琼脂培养基的斜面 7 支，分别接种金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌质控菌种标准品，每个菌种接种 3 支，另 1 支不接种，作为阴性对照，置 35~37℃培养 3 日；取装有 7.0ml 胰酪大豆胨液体培养基的小管 7 支，分别接种白假丝酵母、巴西曲霉质控菌种标准品，每个菌种接种 3 支，另 1 支不接种，作为阴性对照，置 23~25℃培养 5 日，逐日观察结果。接种管 3/3 有菌生长，阴性对照管无菌生长，判定该批培养基微生物促生长试验符合规定”。

4. 在 3.2.1.2 中增加“必要时接种适宜疫苗株生长的培养基 2 支，”的描述，以避免部分疫苗灭活不完全无菌检验检不出的情况。

5. 依据第 12 次会议审查意见，将结果判定改回 2020 版的描述，“2 瓶以内（含 2 瓶）”恢复为“个别”，维持 2020 年版《中国兽药典》附录 3306 中第 4 项中的描述。