

团 体 标 准

T/SHPPA 030—2025

生物制品中支原体核酸扩增技术检查法 验证要求

Requirements for validating rapid mycoplasma testing of
biologics by nucleic acid amplification techniques

2025-08-05 发布

2025-09-05 实施

上海医药行业协会 发 布

目 次

前言 II

引言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 总体原则 2

5 技术要求 2

 5.1 验证要求 2

 5.2 验证参数 3

 5.3 干扰物质试验 4

附录 A（资料性） 检测原理 7

参考文献 8

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。

本文件由上海市生物医药科技产业促进中心、上海医药行业协会提出。

本文件由上海医药行业协会归口。

本文件起草单位：上海市生物医药科技产业促进中心、上海药品审评核查中心、上海农林职业技术学院、上海医药行业协会。

本文件主要起草人：刘厚佳、唐军、陈明伟、郑熊媛、梅妮、张洋、赵思扬、夷征宇、吴耀卫、朱蓓芬、尉茜、钱洋、徐增辉、韩忠阳、顾莉萍、唐勇、王利俭、杨清、孙晓亮、卢洪秀 徐莉。

本文件首批执行单位：深圳赛诺菲巴斯德生物制品有限公司、上海细胞治疗集团、上海金检测有限公司、北京艺妙神州医药科技有限公司、上海药知科技有限公司。

引 言

支原体是生物制品生产过程中越来越不可忽视的污染源，按照目前的法规和检测方法常指代的是柔膜菌纲微生物。它们是目前已知的最小最简单的单细胞微生物，具有多形性，生产过程中所使用的除菌滤膜无法对其有效拦截；对常用抗生素具有一定耐药性；且有黏附性，易污染生产用细胞株/系且较难清除。

真核细胞株/系易受支原体污染，会导致反应系统的效能和产物质量下降，损失成本和生产时间，对直接用于患者治疗的如细胞治疗产品，其支原体污染的控制尤为重要。

现有支原体检查法检查时间较长，故可通过验证建立快速支原体检查法，用于中间过程控制或产品放行检查。本文件用于指导生物制品中支原体核酸扩增技术检查法的验证，以确保方法正确性。

生物制品中支原体核酸扩增技术检查法验证要求

1 范围

本文件给出了生物制品中支原体核酸扩增技术检查法的验证原则及要求。

本文件适用于采用真核细胞株/系进行生产的生物制品（包括：重组疫苗、单克隆抗体、偶联抗体、病毒载体等）及其他生物培养体系生产的疫苗（包括：鸡胚产灭活疫苗等）、细胞治疗产品等支原体核酸扩增技术检查法的验证管理。

生物制品和细胞治疗产品研发、临床试验，及中间过程控制时采用支原体核酸扩增技术检查法的验证可参照执行。

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。

药品生产质量管理规范（2010年修订）

药品生产质量管理规范（2010年修订）无菌药品附录（征求意见稿）（2025年3月14日）

中华人民共和国药典<9203> 药品微生物实验室质量管理指导原则（2025年版）

中华人民共和国药典<3301> 支原体检查法（2025年版）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

核酸扩增技术 nucleic acid amplification techniques, NAT

利用引物和聚合酶链式反应（polymerase chain reaction）在体外对目标核酸进行特异性扩增的方法。

3.2

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction, PCR

利用DNA双链复制的原理，在生物体外复制特定DNA片段的核酸合成技术，通常利用热循环仪完成变性、退火、延伸三个基本步骤的循环。

3.3

基因拷贝数 gene copy, GC

某个基因在生物体基因组中的个数。

3.4

阳性临界值 positive cut-off point

95%的测试循环中可以检测到的每单位体积样本中的最小目标序列数。

3.5

专属性 specificity

在预期存在的成分中明确评估目标核酸的能力。

3.6

检测限 limit of detection, LOD

样本中可以检测到的目标核酸（或换算成CFU）的最低量，无需量化为准确数值。

3.7

耐用性 robustness

当方法测试条件有小的变动时，检验结果不受影响的能力。

3.8

中间过程控制 in-process control, IPC

为确保产品符合有关标准，生产中对工艺过程加以监控，必要时进行调节而做的各项检查。

4 总体原则

4.1 进行支原体检查的实验室，应符合药品生产质量管理规范及无菌药品附录中对质量控制实验室管理和生物安全的要求，以及中华人民共和国药典<9203>药品微生物实验室质量管理指导原则的要求。

4.2 在实行支原体 NAT 检查法替代药典支原体检查法前，应进行替代方法验证，本文件对验证方法提供技术指导。

4.3 经评估，企业可参考试剂盒供应商的基本验证报告部分代替验证。

5 技术要求

5.1 验证要求

5.1.1 取样要求

柔膜菌纲微生物可黏附于真核细胞膜表面，或通过胞吞进入到细胞中，验证时取样应考虑不同类别样品的代表性，尽可能同时包含细胞组分和上清液。可选择一些无抑制性的样品（如PBS缓冲液等）来验证NAT检查法的基准性能，同时可配制一些代表该生物制品实际的样品或类似物（例如 5×10^6 CHO细胞/mL的细胞培养基等）。

5.1.2 菌种

5.1.2.1 可参考各国药典支原体检查法的要求，结合产品原辅料的来源、产品的风险，选择相应的试验菌株，见表1。

表 1 主要试验菌菌株列表及污染风险

试验菌种	菌种来源举例	污染风险
莱氏无胆甾原体 <i>Acholeplasma Laidlawii</i>	如： ATCC 23206、NCTC 10116、 CIP 75.27、NBRC 14400等	在生产过程中使用抗生素的人用和兽用疫苗 及细胞培养物
精氨酸类似支原体 <i>Mycoplasma arginini</i>	如： ATCC 23838、NCTC 10129 等	/
滑液囊类似支原体 <i>Mycoplasma synoviae</i>	如： ATCC 25204、NCTC 10124 等	在生产过程中使用或暴露于禽类原辅料，或 用于家禽的疫苗或细胞库

表 1 主要试验菌菌株列表及污染风险（续）

试验菌种	菌种来源举例	污染风险
发酵类似支原体 <i>Mycoplasmopsis fermentans</i>	如：ATCC 19989、NCTC 10117、NBRC 14854等	人用疫苗或细胞库
肺炎拟支原体 <i>Mycoplasmoides pneumoniae</i>	如：ATCC 15531、NCTC 10119、NBRC 14401 等	人用疫苗或细胞库，有致病性的相关证据
鸡毒拟支原体 <i>Mycoplasmoides gallisepticum</i>	如：ATCC 19610、NCTC 10115 等	在生产过程中使用或暴露于禽类原辅料，或用于家禽的疫苗或细胞培养物
猪鼻中间支原体 <i>Mesomycoplasma hyorhinis</i>	如：ATCC 17981、ATCC 29052、NCTC 10130、NBRC 14858等	非禽类兽用疫苗或细胞培养物，在生产过程中使用细胞培养或猪源的原辅料
口腔类支原体 <i>Metamycoplasma orale</i>	如：ATCC 23714、NCTC 10112、NBRC 14477 等	人用和兽用疫苗，有致病性的相关证据
唾液类支原体 <i>Metamycoplasma salivarium</i>	如：ATCC 23064、NCTC 10113、NBRC 14478 等	有致病性的相关证据
柑橘顽固螺原体 <i>Spiroplasma citri</i>	如：ATCC 27556、ATCC 29747 等	生产过程中使用或暴露于昆虫/植物原辅料
注：在《伯杰氏细菌学系统发育手册》中，支原体以支原体属（<i>Mycoplasma</i> sp.）分类单位记载，共有117个独立的种。随着分类单位的不断进展，目前在药典中所描述的“支原体”常扩充至柔膜菌纲（<i>Mollicutes</i> class）微生物，包括：类似支原体属（<i>Mycoplasmopsis</i>）、中间支原体属（<i>Mesomycoplasma</i>）、类支原体属（<i>Metamycoplasma</i>）、拟支原体属（<i>Mycoplasmoides</i>）、螺原体属（<i>Spiroplasma</i>）、无胆甾原体属（<i>Acholeplasma</i>）等。		

5.1.2.2 实验用菌株应保存于适宜条件下，其培养及传代应符合中华人民共和国药典<3301>中不超过15代的规定。

5.1.2.3 如采用商品化的定量菌株时，需根据产品合格证书载明的 GC 及 CFU 数值，计算 GC/CFU 的比值小于 10，以确保菌株的活性。应选择有明确来源、可溯源的商品化菌株。

5.2 验证参数

5.2.1 验证参数的选择

验证参数应至少包括：专属性、检测限和耐用性。

5.2.2 专属性

应验证 NAT 检出柔膜菌纲微生物种属的能力，包括包容性（即能检测出的柔膜菌纲微生物尽可能多）、排他性（即排除交叉检测的潜在可能）。

——包容性。NAT 系统（及商品化的试剂盒）通常基于引物和探针的混合设计，应使用特征化的参考菌株（例如 EDQM 或 ATCC 提供）来证实其实验结果的能力，不应仅通过与数据库进行比较来进行理论分析。对制造过程（如使用哺乳动物细胞、禽类或昆虫原辅料、细胞系表达）、生物制品种类（如生物制剂、细胞或基因治疗产品、疫苗）、污染发生的可能进行风险评估后，选择与原辅料来源密切相关的菌株（如牛类似支原体 *Mycoplasmopsis bovis*），或有明确致病风险的菌株（如人型类支原体 *Metamycoplasma hominis*）。根据验证结果，应证明所选择的 NAT 方法在包容性方面优于或等同于药典方法。

——排他性。验证应避免检测到其他细菌种属。应选择与柔膜菌纲微生物有密切系统发育关系的革

兰氏阳性菌进行此项验证，包括但不限于梭菌（*Clostridium*）、乳杆菌（*Lactobacillus*）、链球菌（*Streptococcus*）和芽孢杆菌（*Bacillus*）等。验证结果应证明对于 $10^5 \sim 10^8$ CFU/mL 的高浓度验证菌不得检出。验证时应关注排他性差距，即检出非柔膜菌纲微生物核酸，可在日常检查中解释阳性结果或进行二次检查。

5.2.3 检测限

5.2.3.1 应首先确定NAT检查法的阳性临界值，使用特征性的定量菌株进行倍比稀释。定量菌株可选择实验室制备的工作菌株、专业机构提供的定量菌株（如EDQM BRPs或ATCC-TTR）、或可溯源的商品化定量菌株。根据风险评估进行菌种选择，见表1。应明确定义定量菌株的GC/CFU比例的接受标准，即比例小于10。

5.2.3.2 对于所选的每个菌株，应测试至少3个独立数量级的倍比稀释，每稀释级足够次数的重复，以获得总共24个测试结果用于进行统计分析。

示例：可独立测试3个稀释级，每稀释级8次重复；独立测试4个稀释级，每稀释级6次重复；或独立测试6个稀释级，每稀释级4次重复。为将稀释倍数保持在可控水平，应进行预实验以获得初步的阳性临界值（即产生阳性信号的最高稀释级），然后可在预确定的初步临界值附近选择稀释范围。可使用适当的统计学评价来计算在95%的测试循环中可检测到的柔膜菌纲微生物的浓度（CFU或GC）。

5.2.3.3 检测限的接受标准为：

- 如用NAT检查法替代培养法，则应证明系统能检测到10CFU/mL或少于100GC/mL的所选菌株；
- 如用NAT检查法替代指示细胞培养法，则应证明系统能检测到100CFU/mL或少于1000GC/mL的所选菌株。

5.2.4 耐用性

耐用性的验证应在方法开发阶段进行评估，证明在测定条件有小变化时的可靠性和潜在影响。根据实际情况，可进行以下试验：

- 通过重复测试含有高浓度支原体的样品后进行阴性样品测试（即残留测试），评估由于高阳性样品的残留而导致假阳性结果的可能性；
- 通过改变样品的前处理方式（如离心、混匀步骤，或步骤间的间隔时间等）；
- 通过改变试剂（如MgCl₂、引物或脱氧核糖核苷酸）浓度来证明方法的耐用性；
- 评估核酸提取规程、热循环仪类型的刻意变化带来的影响；
- 通过不同验证实验室间的协作研究来评估方法的耐用性。

耐用性的接受标准为，所参考的条件变化不影响NAT方法的检测结果。

5.3 干扰物质试验

在完成了方法验证后，应对生产过程中包含原辅料及残留的添加物等干扰物质进行试验，证明未对 NAT 检查法造成干扰。应基于风险评估，根据表 2 选择适当的项目。

表 2 常见干扰物质的类别及验证选择

类别	干扰物质	制备条件举例
细胞系	中国仓鼠卵巢细胞（CHO）	5×10^5 Cells/mL
	小鼠骨髓瘤细胞（SP2/0）	4.7×10^5 Cells/mL
	昆虫卵巢细胞（Sf9）	1×10^6 Cells/mL

表 2 常见干扰物质的类别及验证选择（续）

类别	干扰物质	制备条件举例
细胞系	人胚胎肾细胞（HEK293）	7.7×10^5 Cells/mL
	非洲绿猴肾细胞（COS-7）	10%体积比
	非洲绿猴肾细胞（Vero）	8.7×10^4 Cells/mL
发酵用微生物	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	2.2×10^7 CFU/mL
	酿酒酵母菌 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.43×10^8 CFU/mL
消毒剂/ 杀孢子剂	乙醇	1%体积比
	异丙醇	1%体积比
	酚酸（低pH值）	1%体积比
	酚酸（高pH值）	1%体积比
	漂白剂	1%体积比
	过氧化物	1%体积比
冻存液	二甲基亚砜（DMSO）	10%体积比
	甘油	10%体积比
细胞培养基及血清	改良Eagle培养基（DMEM）	100%体积比
	胎牛血清	10%或1%体积比
	马血清	100%体积比
	胰酶大豆肉汤	100%体积比
	Grace补充昆虫培养基	100%体积比
	FRIIS肉汤培养基	100%体积比
	Frey氏培养基	100%体积比
抗生素	庆大霉素	50 μg/mL
	青链霉素合剂	100 U/mL
	新霉素	50 μg/mL
	多粘菌素B	50 μg/mL
	环丙沙星	10 μg/mL
	大环内酯/氟喹诺酮	25 μg/mL
	两性霉素	2.5 μg/mL

表 2 常见干扰物质的类别及验证选择（续）

类别	干扰物质	制备条件举例
酶	胰酶-EDTA	100%体积比
	胶原蛋白酶	5mg/mL
	嗜热菌蛋白酶	50μg/mL

附录 A

(资料性)

检测原理

目前应用于生物制品快速支原体检查的采用NAT原理的检测系统包括但不限于以下几种：

A.1 荧光定量核酸扩增技术

这类检测技术是一种在聚合酶链式反应（PCR）反应中加入能够与DNA双螺旋结合并发出荧光信号的染料或探针。随着PCR反应的进行，扩增产物不断累积，荧光信号强度也随之增加，从而可以实时监测到每个循环中的扩增情况。根据所用荧光化学物质的不同，qPCR可分为荧光染料法和荧光探针法两种类型。供应商会针对目标支原体的核酸序列选择引物与探针，并设计成商品化的试剂盒，配合实验室通用的核酸提纯设备、qPCR平台进行相关的检测。

A.2 改良核酸扩增技术

这类检测技术是利用微流体芯片原理，针对原有PCR检测的各个阶段进行整合，将核酸的提纯、反转录、多重巢氏PCR的第一/二阶段高度整合在微流体芯片上进行，并通过特殊的PCR仪进行控制和检测。这种改良旨在提高检测速度和封闭性，降低操作复杂性和人力成本，提升总体的准确度，从而更加符合生物制药质量控制的合规需求。

A.3 其他核酸扩增技术

其他核酸扩增技术包括：

- 数字PCR（Digital PCR, dPCR），是一种基于聚合酶链反应（PCR）的高灵敏度和高精度核酸定量技术；
- 环介导等温扩增（LAMP），是一种在恒温条件下利用特异性引物和链置换DNA聚合酶进行高效、特异性的基因扩增和检测的技术；
- 重组酶聚合酶扩增（RPA），是一种新型恒温核酸扩增技术，可以在37~42℃条件下，在10~30min内完成待测靶标的快速检测；
- 基于CRISPR/Cas系统的核酸扩增，是将CRISPR/Cas系统结合多种核酸扩增技术（如PCR、LAMP、RCA），用于实现快速、灵敏和特异性的核酸检测。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国药典<1101> 无菌检查法（2025年版）
 - [2] 支原体检查的核酸检测方法及方法学验证的思考 赵翔、冯建平、孟淑芳，中国药事，2018
 - [3] CAR-T细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点 吴雪伶、赵翔、孟淑芳，中国药事，2018
 - [4] EP 2.6.7 Mycoplasmas (2nd Draft in 2024)
 - [5] USP <77>.Mycoplasma nucleic acid amplification tests (2nd Draft in 2025)
 - [6] JP G3-14-170.Mycoplasma Testing for Cell Substrates used for the Production of Biotechnological/Biological Products (18th Edition)
 - [7] European GMP, Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products (2023)
 - [8] PDA Technical Report 50.Alternative Methods for Mycoplasma Testing (2010)
 - [9] Septic Arthritis Due to Mycoplasma orale In a Young Patient with Hypogammaglobulinemia. AC Liu, et. al. Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada, 2021
 - [10] Epidemiology, Clinical Manifestations, Pathogenesis and Laboratory Detection of Mycoplasma pneumoniae Infections. Thomas Prescott Atkinson, et. al. FEMS Microbiol, 2008
 - [11] Clinical and Microbiological Characterization of Bloodstream Infections Caused by Mycoplasma hominis: An Overlooked Pathogen. Tong Zeng, et. al. Infectious Diseases and Therapy, 2022
 - [12] Mycoplasma genitalium: A Review. Roshina Gnanadurai, et. al. Microbiology, 2020
 - [13] Phylogenetic framework for the phylum Tenericutes based on genome sequence data: proposal for the creation of a new order Mycoplasmoidales ord. nov., containing two new families Mycoplasmoidaceae fam. nov. and Metamycoplasmataceae fam. nov. harbouring Eperythrozoon, Ureaplasma and five novel genera. Radhey S. Gupta. etc. Antonie van Leeuwenhoek, 2018
-