

团 体 标 准

T/SHPPA 012-2022

细胞和基因治疗产品快速无菌检查法的 验证技术要求

Validation technical requirements for rapid sterility testing method
of cellular and gene therapy products

2022-06-28 发布

2022-07-28 实施

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 技术要求	2
4.1 总体原则	2
4.2 验证要求	2
4.3 其他要求	5
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发展中心、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发展中心、上海市食品药品检验研究院、上海药品审评核查中心、上海医药行业协会。

本文件主要起草人：李积宗、任大伟、史彤、陈钢、秦峰、杨燕、厉高懿、于玲莉、王诗琳、梅妮、夷征宇、吴耀卫、朱蓓芬、陶铜静、赵思扬。

本文件首批执行单位：科济生物医药（上海）有限公司、上海丹瑞生物医药科技有限公司、上海优卡迪生物医药科技有限公司、上海药明巨诺生物科技有限公司、原启生物科技（上海）有限责任公司。

引 言

细胞和基因治疗产品的微生物质量保证是通过环境、起始物料和包装的控制，合理的生产过程设计和确认、模拟研究以及采用过程控制与终产品检测相结合的检测策略。

细胞和基因治疗产品有别于传统的无菌药品，存在工艺差异性大、产量少、效期短、临床需求紧迫等特殊性，现有的药典无菌检查法难以适用，故需要对产品进行快速检测。

采用快速无菌检查法替代药典的无菌检查法时，应基于风险评估，验证其适用性，以确保患者使用安全。

细胞和基因治疗产品快速无菌检查法的验证技术要求

1 范围

本文件规定了采用基于微生物生长原理的培养系统,对细胞和基因治疗产品进行快速无菌检查法的验证技术要求。

本文件适用于效期短、批量小,采用现行药典方法无法保证在产品使用前完成放行检查的细胞和基因治疗产品。

本文件亦可作为细胞和基因治疗产品临床试验阶段采用快速无菌检查法的执行参考依据。

注:本文件中药典方法均指传统培养法

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修订)

中华人民共和国药典<9201> 药品微生物检验替代方法验证指导原则、<9203> 药品微生物实验室质量管理指导原则

2021年10月26日细胞类制品微生物检查法(国家药典委员会公示稿)

USP 美国药典<1223> 微生物替代方法验证(U.S.Pharmacopeia/National Formulary <1223> Validation of alternative microbiological methods)

EP 欧洲药典5.1.6 微生物质量控制的替代方法(European Pharmacopeia 5.1.6 Alternative methods for control of microbiological quality)

EP 欧洲药典2.6.27 细胞制品的微生物检查(European Pharmacopeia 2.6.27 Microbiological examination of cell-based preparations)

PDA 美国注射剂协会TR33 替代和快速的微生物方法的评价、验证与实施(PDA Technical Report No.33 Evaluation, validation and implementation of alternative and rapid microbiological methods)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

快速无菌检查 rapid sterility testing

指采用自动化仪器和专用培养基进行测试,缩短传统检查方法的判读时间,并提供定性的微生物试验结果。

3.2

专属性 specificity

指检测样品中可能存在的特定微生物种类的能力。

3.3

检测限 limit of detection

指在设定的检验条件下，在培养前初始供试品中能被检出的微生物的最低数量。

3.4

重现性 reproducibility

指同一样品在正常的试验条件发生变化时，所得检验结果的精密度，验证快速无菌检查法在检验结果上抵抗环境和操作变化的能力。

3.5

耐用性 robustness

指当方法参数有小的刻意变化时，检验结果不受影响的能力，验证该方法使用后的可靠性。

4 技术要求

4.1 总体原则

4.1.1 使用细胞和基因治疗产品快速无菌检查法的实验室，应符合药品生产质量管理规范（2010修订）中对质量控制实验室管理以及中国药典通则<9203>药品微生物实验室质量管理指导原则的要求。

4.1.2 可同时参考中国药典通则<9201>药品微生物检验替代方法验证指导原则、USP<1223>微生物替代方法验证、EP5.1.6 微生物质量控制的替代方法、EP2.6.27 细胞制品的微生物检查和/或 PDA TR33 替代和快速的微生物方法的评价、验证与实施等相关要求开展无菌快速检查方法替代药典方法的验证工作。

4.1.3 采用本方法应在充分考虑制品生产工艺、无菌保障水平、微生物（尤其是慢生长微生物）污染风险、使用者获益/风险等因素的基础上，经风险评估后有条件地实行。

4.1.4 在实行快速无菌检查法替代药典无菌检查法前，应进行替代方法学验证。验证的目的是确认快速无菌检查法的应用效果优于或等同于药典方法。

4.1.5 开展验证前，应对起始物料的来源、生产操作的自动化水平、生产系统的密闭程度、细胞培养时间以及其他与生产或物料相关的因素进行系统性风险评估，在基于风险评估的基础上制定验证方案。建议在最差条件下开展验证，应充分考虑样品基质、不同批次细胞密度、慢生长微生物及苛养微生物对试验结果的影响。

4.1.6 验证通过后方可将该方法用于产品的无菌检查，检查可参照“细胞类生物制品微生物检查法”（国家药典委员会公示稿）。

4.2 验证要求

4.2.1 取样及检验量

一般情况下，应从产品中取样。对于产品量较少，可选择代表性、关键性的样品，混批样品或替代样品等进行方法验证。验证时，每份培养基的产品接种量与产品放行快速无菌检查保持一致。对于单个容器且总体积（V）在 1mL~1L 的单一批次细胞产品，接入每种培养基的最少量不应低于表 1。对于总量小于 1mL 的单一批次产品，可经评估后采用替代取样方案、过程检查或其他适宜方式。

表 1 取样量示例

产品总体积 (mL)	接入每种培养基的最少量
>1000	按照中国药典通则<1101>无菌检查法取样量要求
$10 \leq V \leq 1000$	总体积的百分之一
$1 \leq V < 10$	100 μ L
$V < 1$	不适用

4.2.2 菌种

4.2.2.1 可根据各国药典无菌检查法的要求选择相应试验菌株，并制备相应的菌液（见表 2）。如采用商品化的定量菌株时，需参考产品说明书配制菌液。

4.2.2.2 试验用菌株应保存于适宜条件下，其培养及传代应符合药典的相关规定。应根据产品的来源、特点及产品既往微生物污染情况，增加环境分离菌株，尤其是在生产环境监测中获得的分离菌株，尽可能选取不同种类微生物，特别是慢生长微生物，并尽可能将其鉴定到种。

4.2.2.3 如环境微生物控制方法发生改变，应评估该变化对环境菌种类和数量造成的影响，并在需要时补充或重做相关验证。

表 2 主要试验菌菌株列表及其菌液制备

试验菌种	菌种来源举例	试验菌液的制备
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	如：CMCC(B)26003、ATCC6538、CIP4.83 等	胰酪大豆胨液体培养基或胰酪大豆胨琼脂培养基，培养温度 30~35℃，培养时间：18~24 小时。
铜绿假单胞杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	如：CMCC(B)10104、ATCC9027、NCIMB8626 等	胰酪大豆胨液体培养基或胰酪大豆胨琼脂培养基，培养温度 30~35℃，培养时间：18~24 小时。
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	如：CMCC(B)63501、ATCC6633、CIP52.62 等	胰酪大豆胨液体培养基或胰酪大豆胨琼脂培养基，培养温度 30~35℃，培养时间：18~24 小时。
生孢梭菌 <i>Clostridium sporogenes</i>	如：CMCC(B)64941、ATCC19404、CIP79.3 等	硫乙醇酸盐流体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间：18~24 小时。
白色假丝酵母菌（白色念珠菌） <i>Candida albicans</i>	如：CMCC(F)98001、ATCC10231、IP48.72 等	沙氏葡萄糖液体培养基或沙氏葡萄糖琼脂培养基，培养温度 20~25℃，培养时间：2~3 天。
巴西曲霉菌 <i>Aspergillus brasiliensis</i>	如：ATCC16404、IP1431.83、IMI149007 等	沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基或马铃薯葡萄糖琼脂培养基，培养温度 20~25℃，培养时间：5~7 天。
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	CMCC(F)98003	沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基或马铃薯葡萄糖琼脂培养基，培养温度 20~25℃，培养时间：5~7 天。
大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	CMCC(B)44102	胰酪大豆胨液体培养基或胰酪大豆胨琼脂培养基，培养温度 30~35℃，培养时间：18~24 小时。
酿脓链球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i>	如：CMCC(B)32067、ATCC19615、CIP1042.26 等	胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间：2~3 天。

表 2 主要试验菌菌株列表及其菌液制备（续）

试验菌种	菌种来源举例	试验菌液的制备
微球菌 <i>Micrococcus</i> sp.	如：CMCC(B)28020、ATCC9341、 ATCC700405 等	胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培 养时间：3~4 天。
痤疮丙酸杆菌 <i>Propionibacterium acnes</i>	如：CMCC(B) 65111、ATCC11827、 ATCC6919 等	硫乙醇酸盐液体培养基，培养温度 30~35℃，培 养时间：6~7 天。

4.2.3 验证参数

验证需符合微生物定性检验要求，选择的参数应至少包括：专属性、检测限、重现性、耐用性。

4.2.3.1 专属性

无菌检查专属性应能证明其具备对细菌和真菌的广谱检查能力，检查结果出现假阴性和假阳性的比例应在可接受范围内。

当快速无菌检查法以微生物生长作为判断微生物是否存在时，其专属性验证时应确认所用培养基的促生长试验，还应考虑样品的存在对检验结果的影响。

专属性应将拟采用的快速无菌检查法与药典方法进行比较试验。取供试品分别采用快速方法及药典方法进行检查，接种不大于 100cfu 的试验菌至每份培养基，两种方法均应检出阳性结果，且快速方法的报告阳性时间应在规定范围内。

4.2.3.2 检测限

应证明快速无菌检查法的检测限与药典方法相当，如存在供试品的稀释则需考虑倍数的换算。

采用较低浓度的接种物，根据两种方法检出的阴性阳性结果，通过统计分析证明两种方法的检测限无差异。尽可能配制不大于 5cfu/单位（常用不大于 2cfu/单位）的菌液，至少设置 5 组平行组，以接种后采用药典方法 50% 的样品可检出该试验菌为宜。如：

——当采用单个较低浓度的微生物菌液进行试验时，可以采用卡方检验评估两种方法的检测限是否存在差异；

——当采用一系列稀释浓度梯度的试验菌进行验证时，可采用最可能数法（Most Probable Number, MPN 法），评估两种方法的最可能数置信区间是否重叠。

由于检测限验证通常采用低浓度的微生物，因此与其它验证项目相比，需要更多的重复次数以满足统计学要求。

4.2.3.3 重现性

重现性试验可不需与药典方法进行比较，接种量应在检测限以上。需要考量的正常变化包括但不限于：

- 试验地点变化；
- 仪器变化；
- 实验人员变化。

根据实际情况，可选择上述变量或增加变量，每一种变量的重复测试次数应满足分析要求。

4.2.3.4 耐用性

耐用性试验应根据所选定方法的参数，设定其需要考虑的变量，包括但不限于：

——培养温度调整；

——样品接种体积调整。

耐用性可不需与药典方法进行比较试验。

4.2.4 方法适用性

4.2.4.1 采用自动化仪器和专用培养基进行产品的快速无菌检查前，应进行方法适用性试验，以确认产品不存在干扰（即该方法适用）。

若发生可能影响检验结果的变更时，应对变更进行评估并重新进行方法适用性试验，包括但不限于：

——检验程序变化；

——产品组分变化等。

应至少采用 3 个批次的供试品进行方法适用性试验。若单一生产批次无法满足方法验证需求，经评估后可采用多生产批次经混合后制备方法适用性检验样品。

4.2.4.2 方法适用性试验确认应选择表 2 中列举的各类试验菌，将其配制成一定浓度的菌液，或选用可以溯源的定量菌株，对每一试验菌株逐一进行方法确认。

取仪器适配的培养瓶 2 组，其中 1 组每瓶接种规定量的供试品（表 1），各自接种不大于 100cfu 的菌液；另 1 组接种等量的各试验菌液。将 2 组培养基分别培养后检测，除另有规定外，培养时间不得超过 5 天。

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。

4.3 其他要求

4.3.1 与药典方法的平行实施期

4.3.1.1 采用快速无菌检查法作为放行方法前，应先通过专属性、检测限、重现性及耐用性等参数的试验，完成与药典方法的比较，选择至少 3 批拟采用该方法的样品进行方法适用性试验，确认试验结果能够完全满足快速无菌检查法的要求后，可以接纳该方法进入平行实施期。

4.3.1.2 快速无菌检查法在完成替代方法学验证后，可采用该方法进行产品检验，并同步实施药典方法检测，累计一定数量批次数据，以评估无菌快速检查法和药典无菌检查方法的一致性。

4.3.1.3 平行实施期应以药典方法的检验结果为产品无菌检查的最终判定依据。

4.3.1.4 药典方法和快速无菌检查法检验结果不一致时，应对检验过程予以充分的调查，分析造成无菌检查结果不一致的原因。收集、纯化检验过程中发现的污染微生物，并建立污染微生物菌种库。

4.3.2 方法的再确认或再验证

为保证快速无菌检查法在无菌检验过程中的适用性，应持续关注生产、检验过程中可能对方法适用性造成的影响。如：

- 生产工艺变更导致产品组分或浓度改变；
- 检验方法参数变化影响污染微生物活力；
- 检验样品中是否含有抑菌物质。

依据评估结果，判断变更是否影响方法适用性，对方法进行全部或部分再确认或再验证。

附录 A (资料性) 检测原理

目前细胞和基因治疗产品主要应用的快速无菌检查法主要采用基于微生物生长的原理,其中检测微生物呼吸信号的方法为目前最常见的类型,包括但不限于以下几种:

A.1 基于二氧化碳底物显色的检测技术

这类检测技术通过仪器配套的专用培养瓶进行培养,微生物增殖所累积的产物 CO_2 可引起瓶内 H^+ 浓度变化,培养瓶底部显色硅胶感应器会与 H^+ 结合而产生颜色变化,从而被仪器检测记录。仪器每隔一定时间即会检测每个孔位中培养瓶底部的显色硅胶的颜色变化,根据这种实时读数结果绘制信号曲线,之后综合特有的算法对信号曲线进行分析,从而判断阳性与阴性结果。

A.2 基于荧光增强显示的检测技术

这类检测技术是一种特殊的显色底物检测技术。在仪器配套的专用培养瓶底部显色硅胶配方中加入荧光显色基团。细菌真菌培养中,微生物增殖所累积的产物 CO_2 引起瓶底部荧光底物的光强和波长变化,从而被仪器检测记录。仪器每隔一定时间检测每个孔位中培养瓶底部信号,根据这种实时读数结果绘制生长曲线,之后综合特有的算法及二期运算法则对信号曲线进行分析,从而判断阳性与阴性结果。

A.3 基于气压感应的检测技术

这类检测技术通过仪器配套的专用培养瓶对细菌真菌进行培养,微生物在生长过程中代谢产生 CO_2 、 H_2 、 N_2 等气体或者消耗 O_2 等,培养瓶内气体产生(正压)或气体消耗(负压),仪器通过无菌压力传感器检测瓶内顶部空间压力变化,并实时监测压力随时间的变化,记录数据绘制成信号曲线,通过对变化比率的分析,判定样品是否有微生物污染。

参 考 文 献

- [1] GB/T 40365-2021 细胞无菌检测通则
 - [2] YY/T 0656-2008 自动化血培养系统
 - [3] 药品记录与数据管理要求（试行）
 - [4] WHO QAS/19.819 数据完整性指南（征求意见稿）
 - [5] PDA Technical Report No.80 Data integrity management system for pharmaceutical laboratories
 - [6] European Commission “Guidelines on good manufacturing practice specific to advanced therapy medicinal products”
 - [7] ISO 14161 医疗保健产品灭菌生物指示物选择、使用和结果判断指南
 - [8] ISO 18362 基于细胞的医疗保健产品生产加工过程中微生物风险的控制
-