山西省地方标准

DB14/T XXX—XXXX

|  |
| --- |
|  |

制药企业质量控制 菌种保存使用技术要求

|  |  |
| --- | --- |
| XXXX - XX - XX 发布 | XXXX - XX - XX 实施 |

山西省市场监督管理局  发布

|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.020.20 |
| CCS | B 38   |  | | --- | | **地标** **14** | |

目次

[前言 II](#_Toc20254)

[1 范围 1](#_Toc5446)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc13558)

[3 术语和定义 1](#_Toc29466)

[4 基本要求 1](#_Toc17923)

[5 人员要求 2](#_Toc13952)

[6 环境要求 2](#_Toc13774)

[7 仪器设备要求 3](#_Toc24641)

[8 标准菌株（种）获取 3](#_Toc22471)

[9 标准菌株（种）复苏 3](#_Toc31945)

10 菌种保存方法 4

11 菌种活化 5

12 记录 5

[附录A 7](#_Toc23155)

1. 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。

本文件由山西省药品监督管理局提出、组织实施和监督检查。

本文件由山西省市场监督管理局对标准的组织实施情况进行监督检查。

本文件由山西省药品质量管理标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：山西锦烁生物医药科技有限公司、山西省检验检测中心（山西省标准计量技术研究院）负责起草。

本文件主要起草人：邢瑶瑶、曲萍、刘建军、武瑞杰、甘雨鑫、崔小芳、李鹏飞、田小鹏、雷岚芬、邓自新、王春芳、罗晋萍、赵春燕、冯调兰。

制药企业质量控制 菌种保存使用技术要求

1. 范围

本文件规定了药品生产企业日常用菌种保存和使用的术语和定义、基本要求、人员要求、环境要求、仪器设备要求、菌种获取、菌种活化和使用及记录。

本文件适用于药品生产企业菌种的保存和使用。

1. 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

GB/T 27025 检测和校准实验室能力的通用要求

GB/T 27476.1 检测实验室安全 第1部分：总则

SN/T 2660 食品微生物实验室菌种保藏方法

中华人民共和国药典

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

菌种

可培养的具有保藏价值的微生物纯培养（株）。

菌种保存

将微生物菌种用各种适宜的方法妥善保藏，避免死亡、污染，保持其原有性状基本稳定。

菌种活化

菌种活化就是将保藏状态的菌种接种至适宜的培养基中培养，逐级扩大培养得到纯而壮的培养物。

标准菌株（种）

由国内或国际菌种保藏机构保藏的，遗传学特性得到确认和保证并可追溯的菌株。

菌种传代

从菌种保藏机构获得的标准菌株为第0代，1代是指将活的培养物接种到微生物生长的新鲜培养基中培养，任何形式的转种均被认为是传代1次。

1. 基本要求

菌种的保存和使用应符合GB 19489等国家强制标准及相关政策法规要求。

针对菌种特性选择适宜的保存方法，宜采用两种或两种以上的方法保存。

菌种保存和使用的器皿应清洁、透明、无破损、无裂痕。

菌种保存和使用过程中应无菌操作，避免污染。

菌种应培养至稳定期或成熟期后进行保存。

菌种保存期间，应定时检查菌种存放设施的温度、菌种有无污染、棉塞有无霉变，如有异常应重新移植培养确认无误后进行更换。

融化后的菌种保存管不可再进行冷冻保存。

在使用过程中发现菌种异常或污染，应立即停止使用，及时灭菌销毁。

菌种保存和使用过程中应遵循生物安全规范，避免污染和交叉感染。

菌种保存时应实行双人双锁负责制管理，由专人负责保管和发放，严格保管和发放制度。

1. 人员要求

从事菌种保存与使用工作人员应为微生物检验工作人员（以下统称检验人员），应具备微生物学或相近专业知识的教育背景。

检验人员上岗前应依据所在岗位和职责接受相应培训，培训内容包括胜任工作所必需的设备操作、微生物检验技术等，经考核合格后方可上岗。

检验人员应经过实验室生物安全方面的培训。

检验人员应进行卫生培训，建立人员卫生操作规程，卫生操作规程应当包括与健康、卫生习惯及人员着装相关的内容。

检验人员应确定持续培训需求，制定继续教育计划。

非简单压力容器操作人员需持有特种设备作业人员证书。

应对检验人员进行健康管理，并建立健康档案。检验人员上岗前应进行健康检查且以后每年至少进行一次健康检查。

实验人员应当避免裸手直接接触实验用具及设备表面。

任何进入洁净室（区）的人员应按照操作规程更衣、洗手。无菌工作服的选材、式样及穿戴方式应当与空气洁净度级别要求相适应，具体要求见《药品生产质量管理规范》。

进入洁净室（区）的人员不得化妆和佩带饰物。

1. 环境要求
   1. 菌种的传代和使用应在微生物实验室进行。
   2. 微生物实验室应具有进行微生物检验所需的适宜、充分的设施设备条件，实验环境应不影响检验结果的准确性。
   3. 微生物实验室应专用，并与生产、办公等其他区域分开。

微生物实验室的布局与设计应充分考虑到试验设备安装、良好微生物实验室操作规范和实验室安全的要求。

微生物实验室应包括相应的洁净室（区）和生物安全控制区域，生物安全控制区域应配备满足要求的生物安全柜。

微生物实验室的设计和建筑材料应考虑其适用性，以利清洁、消毒并减少污染的风险。

洁净室（区）应配备独立的空气机组或空气净化系统。空气过滤系统应定期维护和更换，并保存相关记录。

初次使用的洁净室（区）应进行参数确认。洁净室（区）的关键设备发生重大变化时应清洁消毒后重新进行参数测试。

洁净室（区）物理参数的测试应当在微生物监测方案实施之前进行。测试应在模拟正常检测条件下进行。

洁净室（区）应按照《中华人民共和国药典》要求进行日常监测和定期监测。

根据紫外强度检测结果或紫外灯管使用寿命参数定期更换紫外灯管，同时做好使用时长和更换记录，定期归档保存。

除实验必需用品外，其他与实验无关的物品一律不得在洁净室（区）内存放。

1. 仪器设备要求

实验室应配备生物安全柜、培养箱、冰箱、超低温冰箱、高压蒸汽灭菌器等仪器，高压蒸汽灭菌器应按要求向使用登记机关办理登记手续。

仪器设备完成相应的检定、校准、验证、确认其性能，并形成相应的操作、维护和保养的标准操作规程后方可正式使用。

应定期对生物安全柜、培养箱、冰箱、超低温冰箱、高压蒸汽灭菌器进行校准，定期对仪器设备进行维护和性能验证，并记录，仪器设备脱离实验室或检修后，恢复使用前应重新确认其性能符合要求。

实验室应监控培养箱、冰箱、超低温冰箱的运行温度，并保存记录。

应定期使用生物指示物检查灭菌设备的灭菌效果并记录，指示物应放在不易达到灭菌的部位。日常监控可以采用物理或化学方式进行。

容易污染微生物的仪器设备应定期进行清洁和消毒。

1. 标准菌株（种）获取

获取途径

8.1.1 标准菌株（种）可通过国家级菌种保藏中心获取。

8.1.2 从上级机构下发的质控盲样中分离出的菌种，被证明结果是正确的、且从考核机构获得该菌种的保藏机构名称及菌种编号的，可作为标准菌株（种）使用。

8.1.3 从其他有效的，经过资质认证的商业机构获得原包装的标准菌株（种）。

验收

药品生产企业应制定标准菌株（种）验收控制程序，确保所获取的标准菌株（种）满足要求。

标准菌株（种）保存

应按照制造商提供的使用说明进行保存。

1. 标准菌株（种）复苏

安瓿瓶复苏

1. 用75%酒精棉球擦净标准菌株（种）玻璃安瓿外壁，待干。
2. 用砂轮或玻璃刀划安瓿上端。
3. 用干燥无菌纱布包裹安瓿，掰开。若掰不开，可将安瓿上端划痕处置于火焰上烧灼，用无菌吸管吸取少量灭菌水滴于灼热处，使其骤冷产生裂痕，再用干燥无菌纱布包裹安瓿，掰开。
4. 用无菌吸管或注射器吸取约0.5mL适宜液体培养基（按说明书），注入安瓿内，轻轻震摇使菌块溶解、混匀。随即吸出安瓿内容物分别接种至1支适宜液体培养基和1支适宜固体培养基（平板和斜面均可）上。
5. 置适宜温度培养。
6. 液体培养物用于分装或转种制备标准储备菌株（种），固体培养物用于菌种确认。菌种确认试验包括观察菌落形态、镜检和生化试验等或选择全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定，只有经确认无误的菌种才可进行保存。保存方法遵照下述第10款的规定。
7. 或可按照菌种所附说明书操作进行复苏。

西林瓶复苏

1. 用75%酒精棉球擦净标准菌株（种）西林瓶外壁及开口处，待干。
2. 确认西林瓶铝盖上的开口方向，将适当工具（如剪刀、钳子、镊子等）用75%酒精棉球擦净，然后沿开口方向将铝盖撬开，撬开后用剪刀或镊子将铝盖下的橡皮塞夹出。
3. 用无菌吸管或注射器吸取约0.5 mL适宜的液体培养基，注入西林瓶内，轻轻震摇使菌块溶解、混匀，随机吸出西林瓶内容物分别接种至1支适宜液体培养基和1支适宜固体培养基（平板和斜面均可）上。
4. 置适宜条件下培养。
5. 液体培养物用于分装或转种制备标准储备菌株（种），固体培养物用于菌种确认。菌种确认试验包括观察菌落形态、镜检和生化试验等或选择全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定，只有经确认无误的菌种才可进行保存。保存方法遵照下述第10款的规定。
6. 或可按照菌种所附说明书操作进行复苏。
7. 菌种保存方法

斜面保存法

1. 将适宜琼脂培养基加热煮沸溶解后分装至试管中，灭菌后摆放长斜面(斜面培养基形成的斜面长度不超过试管总长的1/2)凝固。
2. 以无菌操作挑取菌种纯培养物“之”字形划线接种至斜面上或穿刺接种至斜面上。
3. 在适宜培养条件下培养至稳定期或成熟期，并进行纯度检查。
4. 培养好的菌种于2℃~8℃冷藏保存（部分菌株会在4℃产生自溶，如铜绿假单胞菌等，可置室温或-20℃以下避光保存）。

液体石蜡保存法

1. 将营养琼脂（或其他适宜培养基）加热煮沸后分装至试管中灭菌后摆长斜面凝固，或将半固体培养基加热煮沸溶解后分装至小试管中，灭菌后直立摆放。
2. 以无菌操作挑取菌种纯培养物“之”字形划线接种至斜面上或穿刺接种至半固体培养基管中。
3. 置适宜条件下培养。
4. 培养结束后，在培养基表面覆盖一层无菌液体石蜡，液面高于斜面顶部1cm左右。
5. 注入液体石蜡的菌种斜面以直立状态置2℃～8℃冷藏干燥处保存（需室温保存的菌种可在室温下保存）。

瓷珠保存法

1. 将直径为2 mm～3 mm的小瓷珠分装到小螺帽瓶中制成冻存管（每瓶最多分装30粒），高压灭菌。
2. 标记冻存管。
3. 待保存菌株在适宜培养条件下培养至稳定期或成熟期， 进行纯度检查后，挑取新鲜纯培养物于适宜培养基中制成菌悬液（约3～4麦氏比浊度），在无菌状态下打开冻存管，将菌悬液转移至冻存管中，盖上盖子。
4. 封好冷冻管并颠倒四至五次乳化菌悬液，切勿涡旋振荡。
5. 菌种吸附于瓷珠上后，将多余的菌悬液吸出。
6. 将冻存管置于-20℃或-70℃冰箱中。
7. 如使用商业化的菌种冻存管，应按照产品说明书进行操作。

甘油冷冻保存法

1. 无菌操作挑取新鲜菌种纯培养物至适宜培养基（含有15%～30%的甘油）中，混匀制成约3～4麦氏比浊度的菌悬液，分装至液体菌种保存管中，每管1～2mL。
2. 将液体菌种保存管置于-20℃冰箱或-70℃超低温冰箱中保存。
3. 菌种活化

斜面保存法

在无菌条件下挑取少量菌苔直接转接至适宜培养基上，置最适培养条件下培养后使用。

液体石蜡保存法

在无菌条件下挑取少量菌苔转接至适宜培养基上，置最适培养条件下培养后，挑取单个菌落再重新转接一次后使用，每转接培养一次为一代。

瓷珠保存法

在无菌条件下打开冻存管，用无菌镊子取出一粒瓷珠，直接平板划线或加至适宜的液体培养基中，置最适培养条件下培养后使用。

甘油冷冻保存法

取出液体菌种保存管置室温下自然解冻。在无菌条件下开启保存管，将内容物接种至适宜的培养基中，置最适培养条件下培养后使用。

1. 记录

微生物菌种应建立出入库记录。记录中应包括（但不局限于）以下内容：菌种名称、编号、传代代数、购入或领用数量、购入人或领用人，日期等。

微生物菌种传代应建立相应的记录。记录中应包括（但不局限于）以下内容：菌种名称、编号、传代代数、支数、所用培养基及培养条件、菌种保存条件、销毁处置方式、传代人和传代日期等。

微生物菌种确认应建立相应的记录。记录中应包括（但不局限于）以下内容：菌种名称、编号、试验过程和结果、确认时间和确认人等。

微生物菌种使用记录。记录中应包括（但不局限于）以下内容：菌种名称、编号、代数、使用时间、使用支数、剩余支数，使用人等。

技术资料档案应当妥善保存，保存期一般为6年。

菌种复苏及活化使用适宜培养基见表A.1。

表A.1 菌种复苏及活化使用适宜培养基

|  |  |
| --- | --- |
| 菌种名称及编号 | 培养基 |
| 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)〔CMCC(B)26003〕 | 胰酪大豆胨液体培养基/胰酪大豆胨琼脂培养基 |
| 铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)〔CMCC(B)10104〕 | 胰酪大豆胨液体培养基/胰酪大豆胨琼脂培养基 |
| 大肠埃希菌(Escherichia coli)〔CMCC(B)44102〕 | 胰酪大豆胨液体培养基/胰酪大豆胨琼脂培养基 |
| 乙型副伤寒沙门菌(Salmonella paratyphiB)〔CMCC(B)50094〕 | 胰酪大豆胨液体培养基/胰酪大豆胨琼脂培养基 |
| 白色念珠菌(Candida albicans)〔CMCC(F)98001〕 | 沙氏葡萄糖琼脂培养基/沙氏葡萄糖液体培养基 |
| 生孢梭菌(Clostridium sporogenes)〔CMCC(B)64941〕 | 梭菌增菌培养基 |

EndLine