

3306 无菌检验或纯粹检验法

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2~10 ml。

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，但不应少于5瓶，最多不超过10瓶，每瓶分别进行检验。

2 检验用培养基

2.1 无菌检验

2.1.1 培养基及配方

硫乙醇酸盐流体培养基（Fluid Thioglycollate Medium，简称TG）用于厌氧菌的检查，同时也可以用于检查需氧菌。**酪胺琼脂培养基（Peptone from casein Agar Medium，简称GA）用于检查需氧菌。**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。

2.1.1.1 硫乙醇酸盐流体培养基

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

（灭菌后pH值为6.9~7.3）

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1.0 mol/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 酪胺琼脂培养基

胰酪蛋白胨	15 g
酵母浸出粉	5.0 g
无水葡萄糖	5.0 g
L-半胱氨酸盐酸盐（或L-胱氨酸）	0.5 g

氯化钠	2.5 g
琼脂	12.0 g
纯化水	加至 1000 ml

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 1.0 mol/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

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

（灭菌后 pH 值为 7.1~7.5）

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℃灭菌 30 分钟。

2.1.2 培养基的质量控制

使用的培养基应符合以下检查规定，可与制品的检验平行操作，也可提前进行该检测。

2.1.2.1 性状

2.1.2.1.1 硫乙醇酸盐流体培养基：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 酪胨琼脂培养基：淡黄色固体。

2.1.2.1.3 胰酪大豆胨液体培养基：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的 pH 值为 6.9~7.3。

2.1.2.2.2 酪胨琼脂培养基的 pH 值为 6.9~7.3。

2.1.2.2.3 胰酪大豆胨液体培养基的 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℃，另 5 支（瓶）置 23~25℃，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）		
金黄色葡萄球菌（ <i>Staphylococcus aureus</i> ）	CVCC2086	ATCC6538
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> ）	CVCC1180	CMCC（B）64941

真菌 (Fungi)		
白假丝酵母 (亦称白色念珠菌) (<i>Candida albicans</i>)	CVCC3597	ATCC10231
巴西曲霉 (黑曲霉) [<i>Aspergillus brasiliensis</i> (<i>Aspergillus niger</i>)]	CVCC3596	ATCC16404

2.1.2.4.2 培养基接种：用 0.1% 蛋白胨水将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌、白假丝酵母的新鲜培养物制成每 1.0 ml 含菌数小于 50 CFU 的菌悬液；用 0.1% 蛋白胨水将巴西曲霉的新鲜培养物制成每 1.0 ml 含菌数小于 50 CFU 的孢子悬液。取每管装量为 9.0 ml 的硫乙醇酸盐流体培养基 10 支，分别接种 1.0 ml 含菌数小于 50 CFU/ml 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和生孢梭菌，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；取酪胺琼脂培养基小管斜面 10 支，分别接种 1.0 ml 含菌数小于 50 CFU/ml 金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌，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；取每管装量为 7.0 ml 的胰酪大豆胨液体培养基 10 支，分别接种 1.0 ml 含菌数小于 50 CFU/ml 白假丝酵母、巴西曲霉，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。

2.1.2.4.3 结果判定：接种管 3/3 有菌生长，阴性对照管无菌生长，判该培养基微生物促生长试验符合规定。

2.2 活菌纯粹检验 用适于本菌生长的培养基。

3 检验方法及结果判定

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斜面各 2 管，每支 0.2 ml，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 0.2 ml，1 支置 35~37℃ 培养，1 支置 23~25℃ 培养，另取 0.2 ml，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 0.2 ml，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 0.2 ml，1 支置 35~37℃ 培养，1 支置 23~25℃ 培养，另取 0.2 ml，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 0.2 ml，1 支置 35~37℃ 培养，1 支置 23~25℃ 培养，另取 0.2 ml，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 1.0 ml 时，不做处理，直接取样进行检验；当样品的装量小于 1.0 ml 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 1.0 ml 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 1.0 ml 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 1.0 ml 的，取处理好的样品 1.0 ml，样品（原）装量小于 1.0 ml 的，取其处理好的样品的全部内容物，接种 50 ml TG 培养基，置 35~37℃ 培养，3 日后吸取培养物，接种 TG 小管和 GA 斜面各 2 支，每支 0.2 ml，1 支置 35~37℃ 培养，1 支置 23~25℃ 培养，另取 0.2 ml，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 1.5 ml 时，不做处理，直接取样进行检验；当样品的装量小于 1.5 ml 时，适宜的稀释液稀释至 1.5 ml。

3.2.2.1.2 冻干制品样品的处理 当样品的原装量大于 1.5 ml 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 1.5 ml 时，用适宜的稀释液复溶至 1.5 ml，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 0.2 ml，1 支置 35~37℃ 培养，1 支置 23~25℃ 培养，另用 1 支 TSB 小管，接种 0.2 ml，置 23~25℃ 培养，均培养 5 日，应纯粹。

4 结果的判定

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。