

附件. 新增附录 支原体检验法 (指示细胞培养法) (标准草案)

支原体检验法 (指示细胞培养法)

本方法适用于生产用细胞、血清等原辅材料的支原体检验。

1 溶液的配制

1.1 二苯甲酰胺荧光染料(Hoechst 33258)浓缩液 称取二苯甲酰胺荧光染料 5mg, 加入 100ml 不含酚红和碳酸氢钠的汉氏液 (Hank's 液) 中, 室温磁力搅拌 30~40 分钟, 使完全溶解, -20℃ 以下避光保存。

1.2 二苯甲酰胺荧光染料工作液 使用无酚红和碳酸氢钠的汉氏液 (Hank's 液) 将二苯甲酰胺荧光染料浓缩液稀释至终浓度为 0.25~0.5µg/ml。

1.3 固定液 乙酸:甲醇 (1:3) 混合溶液。

1.4 封片液 量取 0.1mol/L 枸橼酸溶液 22.2ml、0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液 27.8ml、甘油 50.0ml 混匀, 调节 pH 值至 5.5。

2 培养基、指示细胞及阳性对照菌种

2.1 DMEM 完全培养基。

2.2 DMEM 无抗生素培养基。

2.3 指示细胞 Vero 细胞, 应纯净。

2.4 阳性对照 滑液支原体 (*Mycoplasma synoviae*) 编号 CVCC 2960, 猪鼻支原体 (*Mycoplasma hyorhinis*) 编号 CVCC 361。

3 检查法

3.1 样品处理 每批细胞取样 5 支, 将冻存管中的细胞悬液混合后复苏, 应至少培养 7 日, 期间用 DMEM 无抗生素培养基至少继代 1 次, 每代培养面积不低于 75cm², 取已长满且 3 日未换液的细胞培养上清液作为待检样品; 检测血清等原辅材料时, 用 DMEM 无抗生素培养基 10 倍稀释后直接作为待检样品。

3.2 指示细胞准备 将培养的 Vero 细胞单层经消化后, 制成细胞悬液, 接种 6 孔细胞培养板, 置 36~38℃、含 5% CO₂ 培养箱中培养, 待长成良好 Vero 细胞培养板后备用。

3.3 接种与培养 取出长成良好 Vero 细胞培养板, 吸弃培养液, 分别加入等体积待检样品、阳性对照菌种 (当检测禽源细胞时, 用滑液支原体作为阳性对照; 当检测非禽源细胞及血清等原辅材料时, 用猪鼻支原体作为阳性对照), 每个样品接种 1 孔, 每孔至少 2ml, 置 36~38℃、含 5%CO₂ 培养箱中培养 3~5 日, 按常规方法消化传代 1 次, 分别接种至含盖玻片的 6 孔细胞培养板, 每个样品各接种 2 孔。同时用 DMEM 无抗生素培养基替代样品, 同法操作, 作为阴性对照。将接种后的 6 孔 Vero 细胞培养板置 36~38℃、含 5%CO₂ 培养箱中培养 3~5 日。

3.4 染色 取出培养板, 吸弃培养板孔中的培养液, 用 PBS (0.01mol/L, pH 值 7.2~7.4) 洗涤细胞单层 1 次, 加入固定液 5ml, 置室温放置 5 分钟, 吸弃固定液, 加入固定液 5ml 固定 10 分钟, 吸弃固定液, 使盖玻片在空气中自然干燥, 加二苯甲酰胺荧光染料 (或其他 DNA 染料) 工作液 5ml, 加盖, 室温避光放置 30 分钟, 吸弃染液, 每孔用纯化水 5ml 进行洗涤, 洗 3 次后使盖玻片于空气中干燥, 取洁净载玻片加封片液 1 滴, 分别将盖玻片面向下盖在封片液上制成封片。用荧光显微镜观察。

4 结果判定

4.1 当阴性对照接种的 2 孔指示细胞的细胞核均仅出现蓝绿色荧光, 阳性对照接种的 2

孔指示细胞的细胞核均出现蓝绿色荧光以及大小不等、不规则的荧光着色颗粒时，检验结果成立。

4.2 如被检样品接种的 2 孔指示细胞，只要有 1 孔细胞核出现蓝绿色荧光以及大小不等、不规则的荧光着色颗粒，则判定该样品支原体阳性。

起草说明：

1. 本附录方法参考了《欧洲药典》11.0 版 2.6.7 和 2020 年版《中国药典》四部附录 3301，制定了新增附录支原体检验法（指示细胞培养法）。作为生产用细胞、血清等原辅材料的支原体检验的补充方法，本方法具有操作简便、检验周期短、方法敏感、结果判定直观等优点。本附录标准属于首次起草。

2. 关于支原体检验法（指示细胞培养法）的适用范围，《欧洲药典》11.0 版 2.6.7 和 2020 年版《中国药典》四部附录 3301 明确要求，指示细胞培养法用于主细胞库、工作细胞库、病毒种子批的支原体检查。考虑到血清等原辅料样品不会影响指示细胞形成病变或对判定结果产生影响，因此，本标准适用范围定为生产检验用细胞及血清等原辅材料的支原体检验。

3. 关于指示细胞的种类，参考《欧洲药典》11.0 版 2.6.7 和 2020 年版《中国药典》四部附录 3301，指示细胞培养法操作规程中均要求使用无污染的 Vero 细胞或其他传代细胞作为指示细胞。因此，本标准将指示细胞定为无污染的 Vero 细胞。

4. 关于供试品接种量，《欧洲药典》明确待检样品的接种量为 1ml，《中国药典》要求待检细胞上清液样品的接种量为 2ml。考虑到细胞上清液不会影响指示细胞形成病变或对判定结果产生影响，因此将供试品接种量定为 2ml。

5. 关于待检样品数量，《中国兽药典》三部附录 3308 支原体检验法要求每批制品（毒种）取样 5 瓶。考虑到支原体检验抽样要求一致，细胞参照毒种抽样要求，因此将标准中待检样品数量定为 5 支。

6. 关于接种后观察时间，《欧洲药典》推荐接种后培养至少 3 日，指示细胞培养物至少传代 1 次，末次传代后培养 3~5 日，因此标准参照《中国药典》规定：接种后培养 3~5 日，指示细胞培养物至少传代 1 次，培养 3~5 日进行染色。

7. 关于阳性质控菌种，《中国兽药典》三部附录 3308 要求“检测禽类疫苗时用滑液支原体作为对照，检测其他疫苗时用猪鼻支原体作为对照。”参考以上要求将阳性对照菌种定为猪鼻支原体与滑液支原体。

8. 关于判定标准，《欧洲药典》和《中国药典》对标准判定描述基本为：“显微镜下比较待检样品与阴性和阳性对照的视野，检查细胞核外荧光。支原体会在指示细胞胞质上产生针尖状或丝状荧光。它们还可能在细胞间隙中产生针尖状或丝状荧光。对多个显微镜视野进行检查，如果不存在典型的支原体荧光，则待检样品符合要求。如果阳性对照未显示典型的支原体荧光，则该检验无效。如果阴性对照显示典型的支原体荧光，则该检验无效。”参考以上要求将结果判定描述为“当阴性对照接种的 2 孔指示细胞的细胞核均仅出现蓝绿色荧光，阳性对照接种的 2 孔指示细胞的细胞核均出现蓝绿色荧光以及大小不等、不规则的荧光着色颗粒时，检验结果成立；如被检样品接种的 2 孔指示细胞，只要有 1 孔细胞核出现蓝绿色荧光以及大小不等、不规则的荧光着色颗粒，则判定该样品支原体阳性。”

9. 依据 2025 年第 11 次审查会，鉴于附录 3502 生产用细胞标准（已经公示标准）中 1.2 项、2.2 项和 3.2.2 项下引用到“支原体检验法（指示细胞培养法）”，会议原则同意作为附录标准刊载，但需要标准牵头人尽快完成方法验证，并附上验证报告和标准草案一并上报药典办，验证结果满意就可以进入公示。随后，牵头人依据会议意见及时安排，按照验证方案进

行了支原体检验法（指示细胞培养法）的验证试验，主要验证了方法的检测敏感度和方法的检出准确率，经两个部门的 7 名检验员协同比对验证，支原体检验法（指示细胞培养法）的灵敏度、准确度均符合预期要求，具备良好的稳定性、准确性和适用性。验证结果满意（验证报告略）。

国家药典委员会