



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

生物技术 分析方法 生物制造过程中基于风险考虑的微生物快速检测方法选择与确认

Biotechnology — Analytical methods — Risk-based approach for method selection and validation for rapid microbial detection in bioprocesses

(ISO 24190:2023)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

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××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

生物技术 分析方法 生物制造过程中基于风险考虑的微生物快速检测方法选择与确认

1 范围

本文件为细胞治疗产品制造中快速微生物检测方法的选择和验证提供了指导、框架和基于风险的方法。

本文件提供了一个灵活的基于风险的框架，用于检测细胞治疗产品和细胞中间体中的微生物污染。

本文件提供了与细胞治疗产品制造相关的一般要求和风险，并灵活地解决每种独特细胞治疗产品的特定制造工艺的差异。

本文件主要讨论细胞治疗产品制造中的无菌测试。本文件适用于其他细胞衍生治疗产品的生产。

本文件重点介绍用于过程中和最终产品测试的快速微生物测试方法（RMTM）。

本文件不包括细胞治疗产品制造中的病毒测试。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

ISO 和 IEC 在以下地址维护用于标准化的术语数据库：

-ISO在线浏览平台：<https://www.iso.org/obp>

-IEC Electropedia：可在 [https:// www . electropedia.org/](https://www.electropedia.org/)

3.1

验收标准 acceptance criteria

数值限制、范围或满足所述测定的预定义性能的其他属性或变量。

注1：验收标准由用户要求规范（3.30）指定。

3.2

准确度 accuracy

测量精度、测量量值与被测物分配量值之间的一致性

注1：测量精度这个概念不是一个数量，也没有给出一个数值。当测量误差较小时，可以说测量更加准确。

注2：术语测量精度不应用于测量真实度，术语测量精度也不应用于测量精度，然而，这与这两个概念相关。

注3：测量精度有时被理解为归因于被测量的测量数量值之间的一致性程度。

[来源：ISO 16140-1:2016, 2.2]

3.3

分析灵敏度 analytical sensitivity

测量指示的变化与被测量值的相应变化的商

注1：分析灵敏度不应用于表示检出限（3.8）或定量限，也不应与诊断灵敏度（3.9）相混淆。

[来源：ISO 18113-1:2022, 3.2.4, 修改-删除了承认的术语测量程序的灵敏度。条目注释1至3已删除。条目注释4重新编号为条目注释1。]

3.4

分析特异性 analytical specificity

测量系统使用规定的测量程序为一个或多个被测量提供测量结果的能力，这些测量结果彼此不依赖，也不依赖于正在进行测量的系统中的任何其他量。

注1：缺乏分析特异性称为干扰分析。

注2：分析特异性不应与诊断特异性（3.10）相混淆。

注3：ISO/IEC 指南 99:2007 使用术语选择性来表示此概念，而不是特异性。

[来源：ISO 18113-1:2022, 3.2.5, 已修改 - 删除了承认的术语测量程序的选择性。条目注释被替换。]

3.5

无菌（程序） aseptic

用于排除微生物污染的条件和程序

[来源：ISO 18362:2016, 3.3, 修改-无菌取代无菌技术作为术语。]

3.6

细胞治疗产品 cellular therapeutic product

含有细胞作为活性物质的产品

例如细胞和基因治疗产品、组织工程产品、药品。

注1：用于基因治疗的细胞生产的产品包含在细胞治疗产品的定义中，因为细胞不一定是所有基因治疗的活性物质。

注2：重组蛋白不包括在细胞治疗产品的定义中。

[来源：ISO 20399:2022, 3.9, 已修改 - 从定义中删除用于细胞治疗或基因治疗。]

3.7

设计确认 design qualification

DQ

验证流程（3.32）所提议的检测设施、设备或系统规范满足用户需求规范（URS）（3.30）的期望

[来源：ISO 11139:2018, 3.220.1, 修改-添加了缩写术语DQ和测定的。用户要求规范（URS）取代了预期用途。]

3.8

检测限 detection limit

检测限 通过给定测量程序获得的测量量值，规定假阳性概率为 α ，假阴性概率为 β 。

注1：IUPAC 建议 α 和 β 的默认值等于 0.05。

注2：有时会使用缩写 LOD。

注3：检测限不鼓励使用术语灵敏度。

[资料来源：ISO/IEC 指南 99:2007, 4.18]

3.9

诊断敏感性 diagnostic sensitivity

体外诊断检查程序识别特定疾病与疾病相关的目标标记物存在的能力。

注1：也定义为已知存在目标标记物的样本中的阳性百分比。

注2：诊断敏感性以百分比（数字分数乘以 100）表示，计算方法为 $100 \times \text{真阳性值 (TP) 的数量} / \text{真阳性值 (TP) 的数量} + \text{假阴性值 (FN) 的数量}$ 或 $100 \times \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})$ 。该计算基于一项研究设计，其中每个受试者仅抽取一个样本。

注3：对于微生物检测，诊断灵敏度代表被正确检测到的目标微生物的比例。

[资料来源：ISO 18113-1:2022, 3.2.17, 修改-识别目标标记的存在替换为有阳性结果。删除条目注释1的第二句。条目注释3已替换。]

3.10

诊断特异性 diagnostic specificity

体外诊断检查程序识别不存在与特定疾病或病症相关的目标标记物的能力。

注1：也定义为已知不存在目标标记物的样本中的阴性百分比。

注2：诊断特异性以百分比（数字分数乘以 100）表示，计算方法为 $100 \times \text{真阴性值 (TN) 的数量} / \text{真阴性值 (TN) 的数量} + \text{假阳性值 (FP)}$ 或 $100 \times \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})$ 。该计算基于一项研究设计，其中每个受试者仅抽取一个样本。

[来源：ISO 18113-1:2022, 3.2.18, 修改—认识到不存在与……相关的目标标记被替换为具有与不存在相关的阴性结果。注解第二句 [来源：ICH Q2(R1) [11]]

3.11

假阴性 false negative

检测方法显示为阴性的结果（3.15），但随后被证明含有目标微生物。

[来源：ISO 13843:2017, 3.14, 修改ISO 13843:2017, 3.14, 修改—“微生物”替换为“有机体”。]

3.12

假阳性 false positive

检测方法显示为阳性的结果（3.19），但随后证明不含目标微生物。

[来源：ISO 13843:2017, 3.15, 修改—“微生物”替换为“有机体”。]

3.13

适用性 fit for purpose

符合预定用途的预定要求

[来源：ISO 20387:2018, 3.24, 修改—“符合预定用途”和条目注 1 删除。]

3.14

安装确认 installation qualification

IQ

通过客观证据确定化验仪器安装的工艺设备和辅助系统的所有关键方面均符合经批准的用户要求规格（URS）的过程（3.30）

[来源：ISO 11139:2018, 3.220.2, 修改—增加了“化验仪器”，“用户要求规格（URS）”替换了“规格”。]

3.15

阴性 negative

根据方法程序的规定，表示在特定测试部分中不存在被分析物的测试结果

[来源：ISO 16140-1:2016, 3.220.2; ISO 16140-1:2016, 2.43, 修改—“阴性”取代“阴性检测结果”。“未检测到被分析物”替换为“未检测到被分析物”，“方法”前的“定性”删除。]

3.16

核酸扩增技术 nucleic acid amplification techniques

NAT

从一个原始模板体外合成多份 DNA 或 RNA 的生物化学和分子生物学方法。

注1：NAT 的特点是存在反转录、扩增方法和测定类型（定性或定量）。

注2：扩增方法的例子有 PCR 和等温扩增（NEAR、TMA、LAMP、HAD、CRISPER、SDA）。

3.17

运行确认 operational qualification

OQ

获取和记录已安装设备在按照操作程序使用时在预定限度内运行的证据的过程

[来源：国际标准化组织 11139:2018, 3.220.3] 3.

3.18

性能确认 performance qualification

PQ

通过客观证据确定化验过程在预期条件下始终产生符合所有预定用户要求规格（URS）的结果的过程（3.30）

[来源ISO 11139:2018, 3.220.4, 修改——在“过程”前添加“化验”，“结果”替换“产品”，“用户要求规格（URS）”替换“要求”。]

3.19

阳性 positive

测试结果，表明在方法程序所规定的特定测试部分中存在被分析物。

注1：当参照方法或替代方法提供的初步阳性检测结果需要进一步检测来确认时，该检测结果可视为推定阳性检测结果。如果该方法的程序所规定的进一步检测证实检测结果确实呈阳性，则该检测结果可视为确证阳性检测结果。

[来源：ISO 16140-1:2016, 2.50, 修改——“阳性”取代“阳性检测结果”。]

3.20

精确度 precision

在特定条件下，对相同或相似的物体进行重复测量所获得的指示值或测量值之间的一致程度。

注1：测量精度通常用数字表示，如标准偏差、方差或特定测量条件下的变异系数。

注2：例如，“规定条件”可以是重复性测量条件、中间精度测量条件或再现性测量条件（见 ISO 5725-1）。

[来源：ISO/IEC 指南 99:2007: ISO/IEC 指南 99:2007, 2.15, 修改——用“精度”代替“测量精度”。条目注释 3 和 4 删除]。

3.21

确认 qualification

为证明公用设施、设备和方法适合其预期用途并能正常运行而开展的活动。

注1：设备或工艺或两者的鉴定一般包括安装鉴定（3.14）、运行鉴定（3.17）和性能鉴定（3.18）。

[来源：ISO 11139:2018, 3.18: ISO 11139:2018, 3.220, 修改——“方法”后删除“或模式”。]

3.22

微生物快速检测方法 rapid microbial test method

RMTM

与使用直接接种和培养板的传统目视观察法相比，可使用户更快获得微生物检测结果的分析方法。

注1：一般是指与传统方法相比大大缩短时间（如几小时或几天）。

3.23

参照物 reference material

参照规定的特性，具有足够的均匀性和稳定性，经确定可用于测量或检查标称特性的材料。

[来源：ISO/IEC 指南 99:2007: ISO/IEC 指南 99:2007, 5.13, 修改——缩写词“RM”，条目注释和示例已删除。]

3.24

风险评估 risk assessment

风险识别、风险分析和风险评估的整体过程

[来源：ISO 指南 73:2009, 3.4.1] 3.24 风险评估

3.25

风险控制 risk control

通过决策和措施将风险降低到或维持在规定水平内的过程

[来源: ISO 14971:2019, 3.21]

3.26

基于风险的方法 risk-based approach

根据先前的数据分析并按照生物安全等级确定活动优先次序的方法

3.27

稳健性 robustness

衡量一种测试方法不受方法参数微小但故意的变化影响的能力, 并显示其在正常使用过程中的可靠性

衡量一种检测方法不受检测方法参数微小但故意的变化影响的能力, 以及在正常使用过程中提供其可靠性的指标。

[来源: ICH Q2(R1) ICH Q2(R1) [11]]

3.28

保质期 shelf life

在特定条件下保存的产品在生产后保持其特定属性的时间段。

[来源: ISO 1382:2020, 3.485, 修改ISO 1382:2020, 3.485, 修改—删除了“储存期”一词。删除“产品”前的“材料或”, 增加“是”。]

3.29

无菌(状态) sterility

无存活微生物的状态 (3.33)

注1: 在实践中, 无法证明不含微生物的绝对声明。

[来源: ISO 11139:2018, 3.274]

3.30

用户需求 user requirement specifications

URS

用户的特定需求或一般需求未涵盖的需求

3.31

验证 validation

通过提供客观证据, 认定已满足特定预期用途或应用的要求。

[来源: ISO 9000:2015, 3.8.13, 已修改一条目注释已删除]。

3.32

确认 verification

通过提供客观证据, 确认特定要求已得到满足。

[来源: ISO 9000:2015, 3.8.12, 已修改一条目注释已删除。]

3.33

活的微生物 viable microorganism

样品中至少有一个属性是活的(如新陈代谢活跃、能够繁殖、拥有完整的细胞膜, 并有能力恢复这些功能)的微生物, 其定义基于预期的测量目的。

4 一般性考量

在患者给药之前，应对细胞治疗产品进行微生物污染测试。许多此类产品依赖活细胞的活性来产生治疗效果。活细胞不能最终灭菌，需要依靠无菌技术和封闭系统制造的结合来确保最终产品的无菌性。^{[35][36][37][38]}

选择快速方法时，应考虑以下因素：

- a) 样品的保质期；
- b) 可用于测试的样品体积；
- c) 待测样品数量；
- d) 采集样品的步骤；
- e) 得出结果的时间；
- f) 待检测的微生物；
- g) 如何区分活微生物和非活微生物；
- h) 区分样品中已鉴定微生物的能力。

此外，重要的是要考虑进行测试的资源的可利用性，例如经过培训的人员和所需的仪器。

注1：取样可能会将微生物污染引入制造过程。

注2：可用于测试的材料数量可能有限，特别是对于自体细胞治疗产品。在某些情况下，可以生产平行细胞治疗产品来评估微生物污染。

注3：测试方法可能需要特定的培训和经验才能进行和分析。

建议考虑添加细胞上清液（例如 培养液、洗涤液、冷冻原液）代替细胞含液进行无菌检测，解决细胞产品小样品无法取样检测的问题。

5 微生物污染风险管理

5.1 生产过程中的风险管理

应采用基于风险的方法来确定细胞治疗产品生产过程中微生物污染的检测方法。这种方法应考虑到细胞起始材料的来源和收集方法^{[1][2][3][4]}。

细胞治疗产品微生物污染的潜在来源包括但不限于细胞起始材料、原材料和消耗品以及生产环境。

血液透析产品是最常见的细胞起始材料来源。微生物污染的来源可能与皮肤消毒不彻底、用于收集和储存血液透析产品的工具包和包装袋的无菌故障以及技术人员/操作人员失误有关。捐献者菌血症也可能成为无细胞疗法产品的污染源。

试剂、辅助（原材料）材料中的微生物污染和传染性病毒以及对辅助材料的建议在 ISO 20399 中有所描述。消耗品应预先灭菌并一次性使用，以降低微生物污染的风险^[6]。

细胞加工/制造应在封闭系统或适当的洁净室（例如 ISO 6 至 ISO 7）中进行，以防止微生物污染。

注：开放式或台式工艺会增加空气和可能未经充分清洁或消毒的表面污染的风险。

附件 A 概述了 RMTM 风险评估中需要考虑的一些一般因素。在需要进行风险评估的细胞治疗产品制造中使用 RMTM 的一些关键决策中需要考虑的详细要点可在附件B、C、D 和 E中找到。^{[6][7]}

环境控制可以最大限度地减少微生物污染的风险。环境控制的例子有：

- 消毒程序；
- 高效颗粒空气过滤（HEPA）和气流；
- 着装程序；
- 无菌技术；
- 洁净室程序和分类（根据 ISO 14644-1）。

制定风险控制时要考虑的要点包括但不限于：

- a) 输入材料：
 - 1) 收集过程和捐赠者选择（见附件 B）；
 - 1) 自体或同种异体，新鲜或冷冻；
 - 2) 条件；
- b) 符合 ISO 20399 的辅助材料和消耗品（预灭菌、一次性使用等）；
- c) 环境因素；
- d) 设备；
- e) 工艺步骤：
 - 1) 封闭式或开放式工艺步骤；
 - 2) 细胞库；
 - 3) 培养培养或扩增；
 - 4) 纯化；
 - 5) 最终产品；
- f) 控制策略（见附录 C）；
- g) 监测（见附录 C）；
- h) 储存、包装和管理（见附录 D）；
- i) 过程中和最终发布测试（见附录 E）。：

5.2 微生物检测的风险管理

在细胞治疗产品生产过程中使用风险评估方法进行微生物快速检测，可以限制微生物快速检测系统验证的风险。这通常以确定用户需求规格（URS）为基础。

注：以下文件讨论了风险评估，并就如何在制造过程中实施风险评估提供了一般指导：

- ISO 31000；
- ISO 13022；
- ISO 指南 73。

6 选择合适的检测方法

6.1 总述

明确的用户需求和对测定预期用途的清晰理解指导具有生物相关性和足够性能（例如分析灵敏度、分析特异性、精密度、准确性、稳健性）的测定设计，以实现后续决策（适合于预期目的或适合目的）。

为了确定或开发适当的检测方法检测细胞治疗产品中的微生物污染，应建立并记录测试目标。例如，检测与定量。如果需要进行测试来检测和识别“每种”细菌或真菌污染物，则应使用测序方法。如果需要进行测试来确定某些参考微生物或有限的药典微生物列表的分类或数量分辨率 [35][36][37][38]，则多重 PCR 或类似的靶向方法是最合适的。

适当的检测设计应包括检测方法的规格和确保测量质量和结果再现性的策略。这可包括重复测量、使用样本随机化以减少偏差，以及纳入适当的测量控制。

适当的测定设计还应包括确保适当的分析灵敏度以及确定和记录的检测限的方法。还应确定并记录测量的不确定度。

该测定应对测量目标具有较高的分析特异性，而不会受到细胞制剂中其他成分的显著干扰。

测定的预期用途应指导测量的适用要求。应考虑测量的不确定度。

为了确定适当的检测方法,用户应评估测试所需微生物的数量和类型问题。应确定识别所需的范围。应评估是否需要确定活微生物细胞和非活微生物细胞。

测定应该足够稳健,以便结果不会受到用户为预期目的定义的测量过程中的微小变化(例如温度波动、微小的样品处理波动)的显著影响。

该测定对于测量目标应足够稳健,以便结果不会受到细胞制剂其他成分(例如血清浓度、保存剂的存在)的微小变化的显著影响。当使用非药典方法时,替代方法应产生与药典方法相同或更好的结果[35][36][37][38]。

6.2 测定选择

选择方法时要考虑的要点包括但不限于,方法是否: [5] [9]

- a) 基于合理的基本科学原理;
- b) 可检测所有需要检测的微生物;
- c) 能够按照所需的分类水平识别所有此类微生物;
- d) 如有必要,可以重复地定量此类已鉴定的微生物;
- e) 可检测感兴趣浓度范围内的分析物;
- f) 对于预期用途具有足够的分析特异性和分析灵敏度;
- g) 能够满足特定的方法性能标准;
- h) 具有充分的质量保证(QA)和质量控制(QC);
- i) 可以使用现成的设备进行;
- j) 使用适当的资源;
- k) 具有足够的稳健性;
- l) 解决所需的专业知识水平(例如 技术敏感领域,需要专门培训);
- m) 包含质量保证的必要方面(如校准设备、培养基质量、培养条件、扩增子质量、序列数据质量);
- n) 解决生物安全问题(例如 处理测试病原体的特定生物安全实践的必要性);
- o) 满足预期用途的特定要求(例如 对于含有来自无法通过制造过程灭菌的起始材料的细菌的材料适当测试参数);
- p) 考虑患者群体内的临床状况和自然细胞变异;
- q) 是一般微生物检测方法或特定微生物检测方法;
- r) 适合检测细菌、真菌和支原体;
- s) 可以区分活微生物和非活微生物。

6.3 套件或系统选择

在发布测试中,套件或系统供应商应进行适当的质量评估,并应遵循测试套件制造商的指南或 ISO 13485(如果适用)。套件或系统应附有适用的验证文件和服务。

如果制造商使用 RMTM 的外部套件或系统供应商,则在选择套件或系统供应商时应考虑以下几点:

- a) 所需的套件或系统供应商的 QA 认证;
- b) 套件或系统供应商采用的质量保证标准(例如 ISO 9001);
- c) 审核历史和计划(即 监管机构、制药公司或认证机构的审核);
- d) 套件或系统供应商的经济可行性;
- e) 测试方法可信度的参考文献(即 当前用户列表、科学出版物或认证);
- f) 套件或系统供应商提供的技术支持服务;
- g) 套件或系统供应商提供的文档(即 评估和验证文件)。

6.4 各种测试类型的注意事项

微生物测试是基于风险的，因此用户可以根据其预期用途选择首选技术，并平衡各种相互竞争的URS，包括得出结果的时间、特异性、检测限、样本量和产品属性。

微生物污染检测选项的推荐方法包括：

- a) 完成批次后，记录包括无菌操作的步骤（例如，无菌操作）。手动补充细胞培养基），并取样以筛查微生物污染（即 过程中测试）；
- b) 应在最后步骤之前取样，取样时间应反映所采用的筛选方法，例如 放行前 48 小时至 72 小时进行基于生长的污染检查，或更短时间进行更快速的微生物测试（即 替代成品测试）；
- c) 最终产品可以接受药典或基于生长的微生物测试，并在测试完成之前发布，如果测试结果呈阳性（即，如果测试结果呈阳性，则通知负责治疗患者的临床医生）传统的成品测试）；
- d) 最终产品应使用快速微生物测试进行微生物污染测试，并在成功完成测试后放行（即 实时成品测试）。

表 1 描述了这些不同的发布测试策略和检测选项。

有关各种 RMTM 类型规范的更多信息和指南，请参见附录 H。

表1

技术	测试依据	监测选项	可行与否
革兰氏染色法	细菌细胞的差异染色法	最终产品检测	无
USP<71>无菌性测试	在大豆酪蛋白消化液和硫代 乙酸盐培养基中生长	最终产品测试	是
呼吸	专有有氧呼吸产生二氧化碳	过程监控、定时释放前测 试、最终产品测试	是
核酸法	核酸扩增	最终产品的快速放行测试	无
流式细胞术	活体染色	最终产品的快速放行测试	是
固相细胞数术	活体染色	最终产品的快速放行测试	是
三磷酸腺苷(ATP)生物发光	大豆酪蛋白消化液和液体硫 代乙酸盐培养基中会产生ATP	过程监控、定时释放前测 试、最终产品测试	是

6.5 用户要求规范

6.5.1 概述

应确定与 RMTM 相关的 URS。URS 取决于第 4 条中概述的因素。附件 B、C、D、E、F 和 G 提供了有关需要考虑的因素的信息。

6.5.2 速度（检测时间）

在对患者给药之前，应对细胞治疗产品进行适当的微生物污染测试。所选方法应在适当的时间范围内提供结果，通常与细胞治疗产品的短保质期相关。这样可以进行充分的测试审查，而不会延迟细胞治疗产品的发布。 [16]

在 3 天至 4 天或更短的时间内获得结果的微生物测试优于需要 7 天至 14 天获得结果的测试。

注1：对于非冷冻细胞产品，无菌测试通常会在 1 天内得出结果。

注2：对于冷冻细胞产品，可接受的验证方法可能需要 7 天到 14 天。

注3：对于典型的冷冻复苏细胞产品，首选测试时间为 1 小时以内。

注4：对于产品罐装之前的细胞培养过程，首选测试时间为 1 天内。

6.5.3 样品体积

样品通常是在每次测试的基础上定义的，采样频率要求基于污染的可能性。可用于微生物测试的样品量根据生产批量大小/体积和每个产品单元的体积而变化。选择的测试方法应考虑可用于测试的样品体积。细胞治疗产品通常是单批或小批量；因此，只有少量可用于微生物测试。

6.5.4 过程中与最终发布测试

根据所采用的制造过程的长度，对过程中样品和最终产品样品进行的分析可能会有所不同。由于使用直接接种、膜过滤和培养平板的传统目视观察方法的周期时间长，微生物测试很难作为过程控制进行。用于过程中测试和最终发布测试的 URS 可能有所不同。应使用基于风险的方法来定义过程中测试和最终产品测试的要求。过程中测试应作为任何变更控制程序的一部分进行（例如培养基交换或添加生长因子后）。

6.5.5 特异性

应明确区分表征与微生物存在或不存在相关的能力的分析特异性和与测量中物种鉴定相关的分析特异性。 [17][18][19]

诊断特异性的数学表达如公式（1）所示：

$$R_{TN} = [N_{TNC}(N_{TNC} + N_{TPI})] \dots \dots \dots (1)$$

其中

R_{TN} 是真负率；

N_{TNC} 为正确检测阴性的样本数；

N_{TPI} 是错误检测呈阳性的样本数。

微生物学方法的诊断特异性传统上是通过使用纯阳性和阴性对照培养物来证明的。应仔细选择适当的靶标和非靶标对照培养物。

在开发任何新的微生物方法时，应定义适当的目标和非目标对照培养物或用于验证和常规质量控制的其他标准。 [12] 在稳健的方法中，应该可以在包含潜在数百万非目标生物体的复杂基质中辨别出单一目标微生物。用于分析特异性验证的微生物的选择应符合相关的微生物学群体。

6.5.6 灵敏度

诊断灵敏度的数学表达如公式（2）所示：

$$R_{TN} = N_{TNC} / (N_{TNC} + N_{TNI}) \dots \dots \dots (2)$$

其中

R_{TN} 为真阳性率；

N_{TNC} 为正确检测出阳性的样本数；

N_{TNI} 是错误检测为阴性的样本数量。

每个制造商应进行风险评估，以确定环境监测计划的类型并确定产品测试策略的可接受性。有关环境监测的更多信息请参见附件一。

7 验证

7.1 一般概念

对于定量测量，验证可以包括但不限于： [12][17][18][19][20]

a) 分析灵敏度；

- b) 分析特异性;
- c) 定量限度;
- d) 线性;
- e) 准确性;
- f) 精度;
- g) 稳健性;
- h) 耐用性
- i) 再现性。

对于定性测量验证可以包括但不限于:

- 诊断特异性;
- 检测限;
- 耐用性;
- 稳健性;

在适当的时候, RMTM 应该与传统方法进行比较。RMTM 验证计划应考虑样品是从制造过程中的哪个步骤中取出的、可能干扰测试准确性的样品成分以及可用于测试的样品体积。含有抗生素或抗真菌试剂的细胞培养基会干扰结果;因此,应进行抑菌、抑菌研究。

应证明测定满足细胞治疗产品应用所需的预定义方法性能标准。 [21]

应使用代表性样品进行测定验证和验证。

当要测量特性未知的细胞样品时,应首先进行测试方法的鉴定。

可以使用多变量方法来评估各种因素对方法性能的影响。 [21]

示例实验设计可以结合操作参数的识别以及测试样品中的潜在变化。

实验室实验设计和分析的合理且适当的统计方法应纳入验证方案的设计中。

注1: 正确验证的指南可以在 ISO 5725 系列、ICH Q2(R1) [11]、ISO/IEC 17025 和 ISO/TS 23565 中找到。

注2: 维护实验室文件,包括从所有必要的测定中获得的完整数据,以确保符合既定的规范和标准。

注3: 定义定量测定控制空间时,细胞测量可能具有以下属性,需要进一步考虑:

- 存在无参考资料的情况;
- 测量样品的量难以保证;
- 测量目标不稳定;
- 无法明确确定被测物体的状态。

7.2 验证微生物的选择

RMTM 应使用与细胞治疗产品和制造方法相关的微生物进行测试。

用于验证的微生物和样品的示例属于以下几个类别:

- a) 革兰氏阴性菌;
- b) 革兰氏阳性菌;
- c) 需氧菌;
- d) 厌氧菌;
- e) 酵母;
- f) 真菌;
- g) 起始原料中检测到的分离株;
- h) 通过过程中测试或初步细胞治疗产品测试期间检测到的分离株;
- i) 通过生产设施环境监测检测到的分离株;
- j) 来自能代表低营养和高压力环境生产区的分离株;

- k) 来自持续暴露于高营养生长培养基的商业来源的微生物；
- l) 生长缓慢的细菌。

验证应包括有氧和无氧条件下生长的研究，特别是对于在封闭系统中制造的细胞治疗产品。

7.3 方法验证的质量设计

测试样品的成分应能够代表 RMTM 打算测试的细胞治疗产品样品。需要考虑的一些测试参数包括细胞浓度、培养基和添加剂，以及具有抑菌或抑真菌作用的防腐剂和抗菌剂。应测试几种基质组合物，以验证同一细胞治疗产品的多种样品类型的方法。

RMTM 的应用应针对过程中使用和细胞培养生产中的最终细胞治疗产品进行验证。细胞培养基可以在过程中的不同阶段含有抗生素，其中可以含有保存剂以及更高的细胞浓度。因此，细胞生产的不同步骤应单独验证，因为它们的成分不同。

为了验证市售测试系统的性能，应在规定的测定条件下使用特征微生物进行研究，并将结果与供应商提供的结果进行比较，以显示足够的性能。

在验证研究设计中，应使用适当的对照来评估被测材料产生假阳性或假阴性结果的可能性。这将取决于产品基质、添加剂和防腐剂以及样品的独特特性。建议使用含有细胞治疗产品成分但不含细胞的额外阳性和阴性对照。

7.4 再验证方法

当细胞治疗产品制造（包括配方）发生任何变化或 RMTM 发生任何可能抑制或增强活微生物检测的变化时，应完成重新验证。[22] 初始验证可以通过设计包含已知或提议的变化（例如，最坏情况，矩阵方法）。只要过程发生变化，可能会抑制（例如添加抗菌剂）或增强活微生物的检测，就应重新验证 RMTM。

使用最难检测的微生物验证测试方法后处理的关键参数或细胞治疗产品的变化，可以作为需要重新验证该方法的指示。

7.5 系统验证

系统验证应涵盖整个过程，从决定更改测试程序的任何方面到持续使用。它应包括以下阶段：[23]

- a) URS；
- b) 设计资质（DQ）；
- c) 安装资质（IQ）；
- d) 操作资格（OQ）；
- e) 性能鉴定（PQ）。

7.6 在验证中使用参照物

当有适当的有证标准物质可用时，应将其用于测试方法的验证。

当没有合适的经过认证的标准物质时，可以使用内部标准物质。内部标准物质应均匀且稳定，并具有适当的保质期。应定期验证其既定属性。

适当时可以使用参考材料作为测量的比较对照。

验证中参考材料的使用应记录在案。当测试的预期用途是检测和识别样品中的任何细菌和真菌污染物时，参考材料是合适的。

注：可能存在没有合适的参考材料可用于验证的情况。在这些情况下，可以应用替代方法。例如，对于细胞计数，可以应用 ISO 20391-2 中描述的实践。

7.7 目标验证参数的验收标准

验收标准应符合：

- a) 预期用途；
- b) 仪器的验证；
- c) 计算机化支持平台；
- d) 与药典方法相比新技术的验证； [35]
- e) 通用试验方法；
- f) 测试方法规范。

当测试方法规范与测量的预期用途不兼容时，应重新考虑测试方法。基于重新考虑的变更可以包括仪器、试剂或方案或其中多项的变更。 [24]

验收标准可以根据外部要求预先定义（例如 内毒素水平测试）。

验收标准可以是：

- 定量或定性；
- 由性能指数或 URS 或两者定义；
- 根据科学论文定义；
- 由当地法规定义。

验收标准应在验证之前确定、建立并记录。文件应包括理由和理由，并应包含足够的信息以允许评估结果。

如果 RMTM 涉及细菌生长并且生长受到抑制，则需要进行修改（例如 应在测试方法中增加稀释度、额外的膜过滤器清洗、添加灭活剂，以优化回收率。

用于进行无菌测试的培养基应无菌。如果 RMTM 涉及细菌生长，则应证明培养基具有促进生长的作用。

验证不应只是对新方法或细胞治疗产品进行研究。相反，验证应涵盖整个过程，从决定改变微生物检测计划的某些方面开始，一直持续到日常使用。因此，验证从一开始就开始，验证计划的设计应包括实施新测试方法所需的过程的每个阶段。采用这种方法可以确保在进入后续阶段之前考虑并记录过程中的每个步骤，从而简化和加快新方法的引入。 [25]

7.8 精确度

根据规定的条件，精密度可分为方法重复性、中间精密度和重现性。在单一实验室验证的框架内，应确定方法的重复性和中间精度。

7.9 检测限度

检测限测量建立了最佳条件下的基线检测值。它是在规定的实验条件下可以检测到但不一定定量的样品中微生物的最低数量。

注1：菌落计数方法能够检测大样本中的单一目标微生物。在此方法中，当未检测到微生物时，结果报告为未检测到。当病原体难以培养时，可能会出现假阴性检测。一个重要的例子是幽门螺杆菌的意外培养。如果 RMTM 独立于培养物，则菌落计数不适用。

细胞疗法的检测限应根据行业需求、适当性和患者安全来确定。当地法规可以适用。这应该通过适合目的的方法来确定。 [25]

注2：如果用户不知道预期检测限在哪里，一个好的策略是首先进行试点研究，在每个浓度下进行几次重复并覆盖更广泛的浓度范围，然后进行大量的后续研究来估计检测限。在很窄的浓度范围内复制。

7.10 准确度

通常，考虑到该方法产生的多个结果的平均值，可以提高准确性。有四种通用方法可以获得真实数量值的适当估计：

- a) 使用有证标准物质；
- b) 与高阶参考测量程序获得的结果进行比较（ISO 17511 中提供了更多信息）；
- c) 使用加标样品进行回收率实验；
- d) 与实验室间比较试验结果的比较。

准确性对于重复性和再现性至关重要。使用适当的校准器可以提高准确性。精度指南可在 ISO 5725-2 中找到。

7.11 稳健性

微生物方法的稳健性是衡量其不受方法参数微小但故意变化影响的能力的指标。在稳健性检验过程中，应考察相关方法参数的微小偏差对方法性能和测量结果的影响。应监测可能影响方法结果的相关方法参数，包括但不限于临界试剂浓度、仪器操作参数和孵育温度。

7.12 耐用性

耐用性是指在各种正常测试条件（例如不同的分析人员、试剂、批次）下测试同一样品时所达到的方法的再现性。

应在制造过程中评估 RMTM 的耐用性。。

8 微生物快速检测的使用和应用

8.1 样品的数量和类型

确定样本数量的因素应包括但不限于：

- a) 待测样品的类型；
- b) 每个工作班次的样品数量；
- c) 测试方法扩展到过程中其他类型样品的能力；
- d) 样品的价值；
- e) 所需样品的体积；
- f) 患者群体内的自然变异量。

样品应代表整个批次和加工条件。应取样：

- 无菌加工操作的开始、中间和结束时；
- 加工过程中有干涉或有偏离；
- 在制造过程中污染风险增加的任何点之后。

8.2 测试环境

无菌测试的某些方面特别重要，包括测试环境的控制、了解测试限制以及在阳性测试结果后调查制造系统中的污染源。

测试实验室环境应以与无菌灌装操作所使用的无菌条件相当的方式维护设施和控制。测试设施或对照的无菌条件差或不足可能会导致假阳性结果。 [26]

比无菌测试明显更好的生产设施和控制可能会导致错误地将阳性无菌测试结果归因于有缺陷的实验室，即使测试的产品实际上可能是非无菌的。因此，制造缺陷可能不会被发现。

隔离器（例如 应使用手套箱、用于无菌测试的层流罩），以最大程度地减少假阳性测试结果的可能性。

8.3 灵敏度

为了帮助确定使用哪种测试方法，诊断敏感性需要考虑的要点包括但不限于：

- a) 所需应用所需的诊断灵敏度水平；
- b) 所需的分析灵敏度水平取决于被替换的测试方法的当前规范（例如，传统平板计数和浊度方法的检测限可能 $< 10 \text{ CFU/ml}$ ）；
- c) 检出限与药典方法的比较；
- d) 针对预期应用的评估结果；
- e) 测试批次之间差异的检测。

8.4 分析特异性（微生物检测）

为帮助确定使用哪种检测方法，在分析特异性方面应考虑的要点对包括：根据所需的应用，评估新型检测方法需要检测或识别哪些微生物（更多信息见附件 A）。这一决定应以药典测试方法[35] 生成的历史数据为基础，并以研究和生产过程中收集的信息为补充。

8.5 可比测试数据

为了帮助确定使用哪种测试方法，可比测试数据应考虑的要点对包括但不限于：

- a) 证明可比测试数据的能力所需的要求；
- b) 旨在反映新颖、更敏感技术需求的验证研究和验收标准。

如果 RMTM 基于可以轻松证明可比较数据的技术，则可以使用第 7 条中详述的验证研究和验收标准。

为了帮助确定使用哪种测试方法，需要考虑的操作员资格等级应包括但不限于：

- RMTM 操作的复杂性；
- 进行检测和解释结果所需的技能水平；
- 相关实验室人员的教育背景和经验；
- 要求人员具备背景的各个领域（即 分析化学、核酸生物化学、计算机技能）。

9 对阳性无菌结果的调查

应制定对阳性无菌结果进行调查的计划（例如，通过重复检测或进行二次检测，或两者兼而有之来确认检测结果）。如果微生物污染检测结果呈阳性，生产商应调查污染源。请参阅负责监督细胞治疗产品的地方监管机构的要求。 [11][12][13] [14]

针对结果不满意的计划应包括确定原因是制造还是测试。 识别计划的一些示例可以包括：

- 重复进行原始测试；
- 进行二次测试以确认结果。

二次测试的确定中应涉及的一些因素是：

- 分析灵敏度；
- 诊断灵敏度；
- 诊断特异性。

当重复试验中发现微生物生长，表明受检样品不符合无菌试验要求时，应重复原始试验或进行二次试验。

为了宣布非无菌试验无效，应明确证明试验失败与所检查的产品无关。

宣告检验无效的可能原因：

- a) 无菌检验设施的微生物监测数据显示错误；
- b) 对相关测试过程中使用的测试程序的审查发现了错误；
- c) 在阴性对照中发现微生物生长；
- d) 在确定从测试中分离出的微生物的身份后，该物种（或这些物种）的生长可以明确地归因于用于进行无菌测试程序的材料或技术或两者的缺陷。

如果样品不符合要求，则应重新进行风险评估。该计划还可以包括：

- 对制造过程中特定步骤相关的风险水平进行调查；
- 进行调查以评估污染原因或微生物。

10 培训

执行无菌检测的人员应具备该任务的资格并接受培训。应制定书面计划以保持人员培训的最新情况并确认可接受的无菌测试实践。

如有必要，应由受过适当学科专门培训的人员根据测试方法（例如，测试方法）对相关因素进行基于风险的评估。微生物学、分子生物学、免疫学）以及微生物数据的解释。对于原材料，评估应考虑产品所经历的加工、当前的测试技术以及所需质量的材料的可用性。

应制定资格认证计划来培训人员按照既定协议进行测试。

11 文档

验证研究的详细方案和实验设计应记录在案。文档中包含的项目示例：

- a) 所用仪器和套件的品牌和型号以及相关设置；
- b) 具有适当单位和不确定度的测量结果；
- c) 设备校准记录；
- d) 样品制备程序和条件；
- e) 数据分析程序；
- f) 取样时间和得出结果的时间。

应建立并记录进行测试的标准操作程序（SOP），以确保遵循适当的测试参数。验证研究和数据分析产生的数据应记录下来并提供给适当的人员。

12 检测报告

测试结果应记录在案，并应包含在细胞治疗产品的批次记录中。测试报告应包含足够的细节，以便对测试结果进行独立评估。[28]如果可能，数据应该是可查找的、可访问的、可互操作的和可重用的（公平）。ISO 20691 和 ISO/TR 3985 提供有关数据管理的资源。

检测报告应包括但不限于以下内容：

- a) 样品；
- b) 使用的国际标准（包括其出版年份）；
- c) 使用的方法（如果标准包括多种方法）；
- d) 结果，包括对解释如何计算结果的条款的引用；
- e) 任何偏离程序的情况；

f) 观察到的任何异常特征；

g) 测试日期。

进一步报告要素的示例包括但不限于以下内容：

——数据分析程序；

——所用仪器和套件的品牌和型号以及相关设置；

——样品来源（制造过程中的步骤）。

附录 A
(资料性)
识别微生物污染的典范框架

确定在生物样品中适当使用快速微生物检测需要考虑许多不同的因素。 基于风险评估的彻底方法选择用于确定生物制品中快速微生物检测的开发要求和使用方法。

第 5 条概述了对风险评估的影响。

本附件将帮助快速微生物测试设计者和用户在制定和使用适当的测试方法风险评估计划时考虑可能相关的因素，见图 A.1。

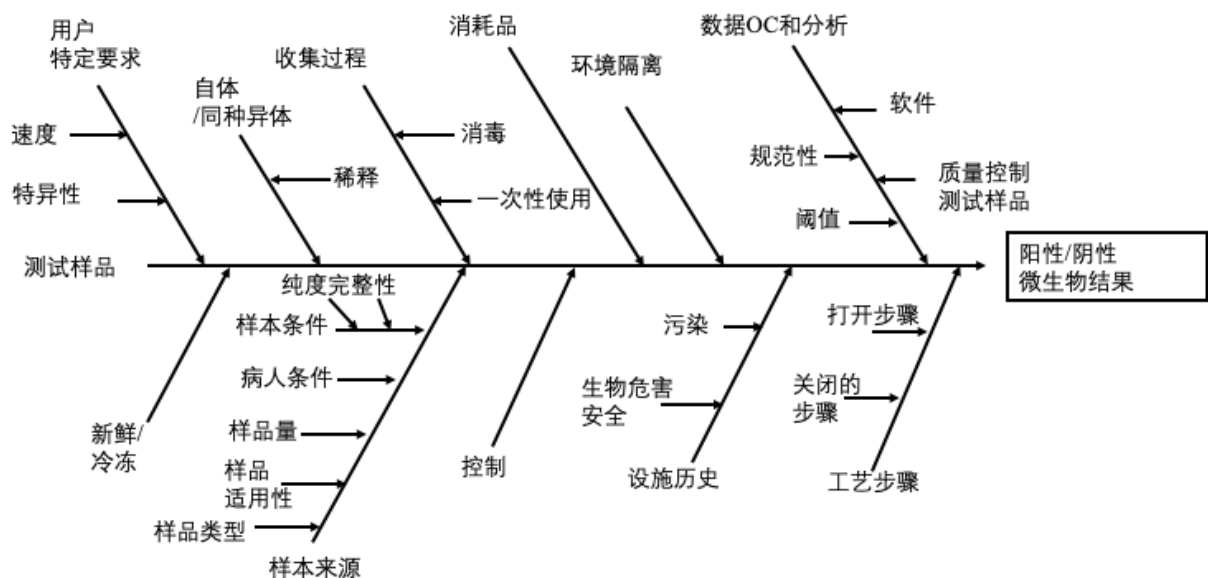


图 A.1 — 因果图 — 全过程不确定性，有助于使用和开发快速微生物检测方法的风险评估

注：中心箭头代表从测试样本到结果的过程。 进入实验进展的分支描述了在确定生物制品中快速微生物测试的开发和使用考虑风险评估的来源。

附 录 B

(资料性)

与输入材料相关的细胞治疗产品的风险分析——供体选择

表B.1 与输入材料相关的细胞治疗产品的风险分析 — 供体选择

输入材料	风险识别	风险评级	风险缓解/关键过程控制
捐献者资格	自提捐献	低	捐献者面谈；医疗体检
	异体捐献	中到高	
细胞来源	外周血	低	皮肤消毒；在采集过程中转移前10毫升
	脂肪组织	中到高	手术套件
	骨髓	高	
	脐带血	中度	孕产妇风险筛查；引导分娩；使用脊髓检索技术人员
收集过程	微生物入侵概率高的系统	高	消除“开放式”系统
	微生物侵入概率低的系统	低	推广“封闭式”系统
当患者有预先存在的微生物感染时，可能会很高。			

附 录 C

(资料性)

与输入材料相关的细胞治疗产品的风险分析 – 细胞转化和扩增

附 录 D 与输入材料相关的细胞治疗产品的风险分析 – 细胞转化和扩增[6]

输入材料	风险识别	风险评级	风险缓解/关键过程控制
一次性耗材	开放（例如转移袋，滚筒袋，盒式磁带）	高	无菌，一次性消耗品
	封闭	低	
细胞库	污染	中	无菌、支原体和传染性病原体筛查
转染（导）	病毒和细菌载体	低到中	感染病原体筛查；无菌灌装/无菌检测”
细胞扩增	多重无菌操作	低到中	生物安全柜、限制进入屏障系统和隔离器系统；生物负荷监测
培养基	胎牛血清和其他成分	低到中	来源认证；偶然因子筛查；终端灭菌（巴氏灭菌、化学处理或辐照）
微载体	免疫磁珠	低	终端消毒
公用设施	药用级水	中	符合良好生产规范；微生物监测‘内毒素监测’
	压缩气体	中	使用点的无菌过滤
设施	密封舱	低到中	BSC、隔离器、RABS等
	工艺隔离步骤		高风险遏制步骤的专用工作区域的标签考虑、步骤之间的适当消毒、工艺流程和暖通空调级联
	人流和物流		明确界定、物理隔离或程序化的隔离出入口；材料转移消毒程序；充分保护无菌材料的转移
细胞采集	胰蛋白酶、胶原酶、DNase/RNase、限制性限制性内切酶生长因子、细胞因子、单克隆抗体)	低到中	终端灭菌；使用非动物衍生材料
细胞存储解决方案	缓冲液；生理盐水；表面活性剂；低温保护剂	低	无菌过滤

附 录 E

(资料性)

细胞治疗产品相关输入材料的风险分析——包装、储存和管理

表D.1 细胞治疗产品与投入材料有关的风险分析-包装、储存和使用[6]

输入材料	风险识别	风险评级	风险缓解/关键过程控制
包装	静脉注射（IV）袋	低	辐照灭菌；无菌转移，容器封闭完整性
存储	环境温度；制冷；温度；冷冻/冷藏	低	冷冻储存应包括液氮蒸汽而不是液氮
运输	冷藏或冷冻	低	在液氮中冷冻运输或受控冷藏运输
捐献者/接收者	仅异体	中到高	疫苗接种；抗生素治疗前后

附 录 F
(资料性)

细胞治疗产品生产监控实践的风险分类

表E. 1 细胞治疗产品生产监控实践的风险分类[6]

制造环境	空气洁净度标准	环境监测频率	环境监测行动水平 (CFU)	无菌过程模拟要求	微生物检测
洁净室生物安全柜	ISO 5/ISO 7	每班/每名操作员	<1/<5	最初3批/半年	最初的3个批次/半年一次的过程中和最终产品测试
分类区域内的屏障系统	ISO 5/ISO 7	每班	<1/<5	最初3批/半年	最初的3个批次/半年一次的过程中和最终产品测试
开放式隔离系统	ISO 5/ISO 7	每班	<1/<5	最初3批/半年	最初的3个批次/半年一次的过程中和最终产品测试
封闭式隔离系统	ISO 5/ISO 8	周期性	<1/<50	最初3批/半年	最终产品测试
无手套、机器人、隔离系统	ISO 5/ISO 8	无	无	无	无

附录 G

（资料性）

微生物快速检测方法的验证

G.1 总则

当使用商业套件时，制造商可以执行某些验证要素并向用户提供信息。然而，根据所使用的设备和测试的目标（样品），用户可以获得不同的结果。因此，用户可以使用自己的设施来确认制造商的验证结果。当测量样品与制造商验证的样品不同时，这一点尤其重要。可以通过感兴趣的目标来确认试剂盒的检测限和重现性。当用户的样品制备或测量方法与仪器制造商规定的方法不同时，应采用仪器所采用的方法进行验证。此外，当制造商无法提供有关试剂盒试剂的信息时，需要采取对策，从制造商处获取有关如何在需要时修改试剂盒生产的信息。如果试剂盒的试剂成分发生变化，用户可根据需要确认修改后的试剂盒对目标微生物的检测限和检测精度与之前的试剂盒相当。

方法验证显示对附录 G 中列出的微生物物种具有足够的分析和诊断灵敏度。这里，从用户的设施环境、产品来源和患者给药地点的角度来选择物种。

测试包括 100 CFU 或更少的阳性对照（运行对照）和阴性对照。用于阳性对照测试的微生物菌株是从官方或适当认可的机构获得的少量传代的微生物菌株，并进行适当处理。使用前确定接种单位。当使用细胞悬液作为测试样品时，对细胞对检测微生物的效果进行初步测试。用于初步测试的细胞悬浮液确认不含细菌/真菌。细胞悬浮液本身用作阴性对照，掺有测试微生物的细胞悬浮液用作阳性对照。另一方面，当细胞样品的上清液用作测试样品时，方法验证意味着所采用的方法能够完全检测含有细胞的样品中的微生物污染。

分析程序的方法验证最重要的参数是分析和诊断特异性以及检测限。此外，还应对分析程序的稳健性进行评估。验证范围被确定为从样品制备到检测的完整程序。

当商业试剂盒和仪器用于部分或全部分析程序时，制造商已涵盖的记录的完整验证数据可以替代用户的验证数据，并且不需要用户的完整验证。尽管如此，套件和仪器相对于其预期用途和用户测试系统的性能由用户证明（例如，特异性、检测限）。

在验证分析或诊断特异性或检测限期间的各个阶段使用以 CFU/ml 为单位评估浓度的参考菌株。在常规测试应用过程中，微生物参考菌株或使用参考菌株校准浓度的测试样品用作阳性对照。在测试中，用于验证程序的微生物包含在样品制备中。对于评价参数，评价三个参数：特异性、检测限和稳健性。

G.2 检测限

单个分析程序的检测限是样品中可检测到的目标的最低量，但不一定定量为精确值。为了确定检测限，需要为分析程序确定一个正截止点。阳性截止点是每体积样品中可在 95% 的测试运行中检测到的目标（细菌细胞、核酸、ATP 等）。为了确定阳性截止点，在不同日期对经过表征和校准（CFU）微生物参考菌株或国际标准品的稀释系列进行测试，以检查测试运行之间的差异。

为了验证检测限，可以使用附录 G 中列出的微生物种类。这些物种代表了在用于生产生物技术/生物产品的哺乳动物培养细胞污染物的出现频率、系统发育关系以及培养和生产过程中使用的动物源成分方面的最佳选择。该列表仅用于方法验证，不用作常规测试中的阳性运行对照。

为了建立检测限，从评估浓度（CFU/ml 等）的未稀释微生物制备适当的稀释系列（10 倍或 10^{-0.5} 倍稀释），并针对每个稀释进行执行。根据显示检测限的稀释因子，将测试样品中 CFU 的最小数量确定为阳性截止点。对于从附件 G 中描述的参考菌株中选择的每个微生物菌株，至少测试三个独立的 10

倍稀释系列，每个稀释度有足够数量的重复，以给出每个稀释度总共 24 个测试结果，以便能够对结果进行统计分析。

EXAMPLE 实验室可以在不同天测试三个稀释系列，每个稀释有八个重复，在不同天测试四个稀释系列，每个稀释有六个重复，或者在不同天测试六个稀释系列，每个稀释有四个重复。

为了将稀释次数保持在可管理的水平，进行初步测试以获得阳性截止点的初步值（即给出阳性信号的最高稀释度）。然后可以在确定的初步截止点周围选择稀释范围。然后可以使用适当的统计评估来计算在 95% 的测试运行中可检测到的微生物浓度（CFU/ml 等）。这些结果还可以用于评估分析程序的可变性。

如果提出替代方法来取代传统的培养方法，则系统可以检测到每个微生物参考物种的目标样品中添加的 10 CFU。

G.3 稳健性

分析程序的稳健性是衡量其不受方法参数微小但故意变化影响的能力的指标，并表明其在正常使用期间的可靠性。在开发阶段考虑稳健性评估。该评估证明了分析程序在方法参数故意变化方面的可靠性。

例如，对于核酸检测，方法参数的微小变化可能至关重要。然而，当试剂浓度发生微小变化（例如，测试MgCl₂、引物、脱氧核糖核苷酸。还可以评估提取套件或提取程序的修改以及不同的热循环仪类型。

附 录 H
(资料性)

用于验证快速微生物检测方法的微生物

拥有一份微生物清单可用于验证用于细胞疗法的快速微生物测试。

表 G.1 提供了用于验证细胞疗法中快速微生物测试的微生物的非排他性列表。

有关表 G.1 中给出的微生物物种和菌株的更多信息，请参阅关于细菌的参考文献 [30] 和 [31]，以及关于酵母和霉菌的参考文献 [32]、[33] 和 [34]。

表G.1 用于验证的微生物

编号a、b、c、d	种名	菌株	类型	更多潜在来源
1	巴西曲霉	ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83, NBRC 9455	酵母和霉菌	环境/空气
2	枯草芽孢杆菌斯氏亚种 (<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>)	ATCC 6633, CIP 52.62, NBRC 3134, NCIMB 8054	好氧兼性细菌	环境/空气
3	白色念珠菌	ATCC 10231, IP 48.72, NBRC 1594, NCPF 3179	酵母和霉菌	特定流程/支气管
4	生孢梭菌	ATCC 11437, CIP 100651, NBRC 14293, NCIMB 12343, ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532	厌氧性细菌	环境/空气
5	铜绿假单胞菌	ATCC 9027, CIP 82.118, NBRC 13275, NCIMB 8626	好氧兼性细菌	环境/水
6	金黄色葡萄球菌	ATCC 6538, CIP 4.83, NBRC 13276, NCIMB 9518, NCTC 10788	好氧兼性细菌	特定流程/皮肤
7	痤疮表皮菌	ATCC 11827 NBRC 107605	厌氧性细菌	特定流程/皮肤

编号a、b、c、d	种名	菌株	类型	更多潜在来源
8	大肠杆菌	ATCC 8739, CIP 53.126, DSM 1576, NBRC 3972, NCIMB 8545	好氧兼性细菌	特定流程/肠子
9	膝黄微球菌	ATCC 10240, NBRC 13867	好氧兼性细菌	环境/空气 特定流程/皮肤
10	嗜根考克氏菌	ATCC 9341, NCIMB 8553, NBRC 3232, NBRC 12708	好氧兼性细菌	环境/空气 特定流程/皮肤
11	表皮葡萄球菌	ATCC 12228, CIP 68.21, DSM 1798, NBRC 12993	好氧兼性细菌	特定流程/皮肤
12	肺炎链球菌	ATCC 33400, CIP 102911, DSM 20566, NBRC 102642, NCTC 7465	好氧兼性细菌	特定流程/ 呼吸系统
13	化脓性链球菌	ATCC 19615, CIP 1042.26, NCIMB 13285	好氧兼性细菌	特定流程/咽
14	鲍曼不动杆菌	ATCC 19606, CIP 70.34, DSM 30007, JCM 6841, NBRC 109757, NCTC 12156	好氧兼性细菌	环境/水, 特定流程/尿液
15	醋酸钙不动杆菌	ATCC 23055	好氧兼性细菌	环境/水
16	缺陷假单胞菌	ATCC 19146, DSM 1635, NBRC 14213, NCIMB 11091	好氧兼性细菌	环境/水
17	扭脱甲基杆菌	ATCC BAA-2500, NBRC 15911	好氧兼性细菌	环境/水
18	荧光假单胞菌	ATCC 17386, NBRC 15842	好氧兼性细菌	环境/水
19	桔青霉	ATCC 9849, CBS 342.61, IMI 61272,	酵母和霉菌	环境/空气

编号a、b、c、d	种名	菌株	类型	更多潜在来源
		NBRC 6352, NRRL 756, QM 1226		
20	嗜水气单胞菌	ATCC 7966, CIP 76.14, DSM 30187, JCM 1027, NCTC 8049	好氧兼性细菌	环境/水
21	嗜肺军团菌	ATCC 33152, CIP 103854, DSM 7513, JCM 7571, NCTC 11192	好氧兼性细菌	环境/水
22	单核细胞增生李斯特菌	ATCC 15313, CIP 82.110, DSM 20600, NCTC 10357	好氧兼性细菌	特定流程/动物
23	肠道沙门氏菌肠亚种	ATCC BAA-2162, CIP 80.39, DSM 4224, NBRC 100797, NCTC 6017	好氧兼性细菌	特定流程/肠道
24	肠道沙门氏菌鼠伤寒亚种	ATCC 13311, CIP 58.58, JCM 1652, NCTC 74 ATCC 14028 NBRC 105726	好氧兼性细菌	特定流程/肠道
25	肺炎支原体	ATCC 15531 NBRC 14401	好氧兼性细菌	环境/皮肤
26	生殖支原体	ATCC 33530 DSM 19775	好氧兼性细菌	环境/皮肤
27	人支原体	ATCC 27545 NBRC 14850	好氧兼性细菌	环境/皮肤
28	口腔支原体	ATCC 23714 NBRC 14477 NCTC 10112	好氧兼性细菌	环境/皮肤
29	猪鼻支原体	ATCC 17981 NBRC 14858 NCTC 10130	好氧兼性细菌	环境/皮肤
a 编号 1 至 6: 药典[美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、日本药典(JP)] 规定的微生物种类和菌株.				

编号a、b、c、d	种名	菌株	类型	更多潜在来源
b	编号 7 至 12: 可能被在制品操作人员污染的人源性微生物.			
c	编号 13 至 18: 可能被土壤和水等环境污染的微生物.			
d	编号 19 至 23: 典型病原微生物.			

附录 I (资料性) 微生物快速检测方法

I.1 基于序列的方法

分子（基于核酸）方法是快速微生物检测的平台，可以检测挑剔的病原体 and 不可培养的病原体、发现新的微生物类型以及污染物的基因型分析。此类技术越来越多地用于快速检测无法在体外或在常见培养条件下生长的微生物。基于 PCR 的检测专门针对感兴趣的微生物。基于扩增子的测序测定可以检测和识别数千种微生物，而无需事先了解样品中可能存在哪些物种。更广泛地说，宏基因组学是一种有前途的分子方法，它利用下一代测序（NGS）技术对样本中的任何/所有微生物进行非靶向检测。尽管有这些好处，但基于 NGS 的方法比基于核酸的检测方法相对更昂贵且更慢，并且通常需要专家分析和软件。一般而言，基于核酸的测定的主要限制是此类方法可以为活的和非活的微生物提供阳性结果。检测到微生物 DNA 并不一定等同于存在可行的传染原，这会使患者面临感染的风险。

I.2 固相细胞仪

在固相细胞计数中，样品通过膜过滤。保留的细胞用荧光团标记，并用激光扫描膜以识别和计数荧光细胞。[27]

尺寸排阻色谱（SEC）是一种基于尺寸和形状的分离方法，并通过紫外（UV）荧光或光散射检测器进行检测。SEC 可能是一种周转时间为 5 分钟至 10 分钟的在线方法，但样品在分析前需要纯化。

I.3 倾斜纳米阵列

倾斜纳米阵列（SNA）是一种基于芯片的技术，使用有角度的纳米过滤器进行基于尺寸的分离。通过荧光进行检测。SNA 连续运行且检测限非常低。[28] 这项新兴技术尚未针对 RMTM 目的进行验证。

I.4 光谱分析和偏最小二乘法

光谱分析和偏最小二乘（PLS）化学计量学技术的结合已被证明在蛋白质杂质的定量方面具有广阔的前景。通过结合用于检测的二极管阵列和用于分析的 PLS，可以在线分析共洗脱蛋白质。[29]

I.5 基于生物发光的测试

一些微生物测试使用基于生物发光的技术。通常，这些技术基于 ATP 检测。这种简单且相对直接的测定使用 ATP 作为可行微生物污染的指标。它测量在分子 ATP 存在的情况下荧光素酶将荧光素转化为氧化荧光素时发出的光量，并设计为与存在的 ATP 量成正比。该技术非常灵敏且快速（4 小时内）。还开发了放大 ATP 方法，以进一步缩短获得结果的时间。基于 ATP 的方法足够灵活，实际上可以使用任何参数组合，只要 ISO 24190:2023(E) 产品和介质都不具有显着水平的 ATP 或以其他方式干扰酶促反应，并且所选的方法条件满足药典要求。目前，通过基于 ATP 的方法进行微生物检测已用于食品和饮料生产；因此，这些测试方法有可能快速适应再生医学疗法。基于该技术的测试已开发用于商业用途。

I.6 质谱技术

质谱（MS）是一种通过测量离子质荷比来识别分析物的分析技术，是一个主要平台。由于技术进步，包括用于电离材料的各种离子源、用于分离离子的分析仪和检测器功能的可用性，基于 MS 的测试

变得越来越强大。近年来，多发性硬化症也变得更加容易获得和负担得起。无论是在样品数量还是测试速度方面，MS 往往都具有良好到优异的吞吐量。MS 方法的常见挑战包括需要简短的培养步骤以及需要建立可靠的库来进行鉴定。MS 通常与分离技术（例如液相色谱（LC））结合使用，以物理方式分离样品混合物中的特定成分。LC-MS 可以清楚地识别污染微生物，但需要大量的样品制备和分析。缩短样品制备时间以及自动化数据处理是 LC-MS 方法开发的最新趋势。基质辅助激光解吸/电离飞行时间（MALDI-TOF）是另一种 MS 方法，它使用基质中的激光能量吸收样品，以最小的碎片从较大分子中产生离子。MALDI-TOF 仪器特别适合用于高通量工业 QC 设置或过程中测试，因为它是自动化的、使用小样本量且具有高通量。

1.7 流式细胞术

流式细胞术是另一个有前途的快速微生物检测平台。在流式细胞术中，理想情况下，样品中的悬浮细胞一次通过激光束一个细胞，并且检测细胞表面或细胞内的细胞散射光或荧光分子发射，或两者兼而有之。单参数流式细胞仪已被证明适用于快速检测成品中的少量微生物污染物。还可以通过流式细胞术进行快速细胞分选，以分离微生物污染物以进行进一步分析。诸如此类的基于流程的方法需要专家进行样品制备和分析。目前，大多数流式细胞术测试在分析前需要一到两天的潜伏期以富集污染物。只有当微生物污染物能够在这些条件下分裂时，污染物的富集才能成功；否则，这些可能不会被发现。流式细胞术结果与产品质量、保质期和失效日期之间的高度相关性可以为产品的快速阳性释放建立现实的质量控制标准。结果的可重复性以及工业条件下获得的标准平板计数方法经过验证的相关性使流式细胞术成为产品和过程质量控制的有前景的预测方法。

1.8 使用翻译后修饰的 LC-MS

液相色谱质谱（LC-MS）是一种联用技术，首先分离消化的蛋白质（LC），然后分析肽（MS）。LC-MS 提供定量信息，但需要大量的样品制备和分析。缩短流程以及自动化数据处理是 LC-MS 方法开发的最新趋势。目前，很少有其他技术能够产生类似质量的数据。通过以最少的样品制备直接分析蛋白质生物药物的自上而下和中下的 LC-MS 方法可以代表未来的趋势，它将提供与蛋白质形式相关的直接信息，而不是从蛋白质的肽片段中提取信息。[30]

1.9 结合亲和力测定

另一种 RMTM 基于酶联免疫吸附测定（ELISA），这是一种检测特异性抗体-抗原相互作用的结合亲和力测定。ELISA 通常使用 ISO 24190:2023(E) 96 孔板格式进行，简单、快速、便宜且适合自动化。然而，ELISA 无法识别低至物种水平的微生物污染，只能识别检测中包含的具有独特设计探针的预选微生物。除了这些更成熟的方法之外，其他新兴技术，例如基于荧光共振能量转移（FRET）的方法也具有作为快速微生物测试平台的潜力。所有这些领域都正在进行研究，以开发和验证可用于再生医学产品制造的新型微生物测试方法。

表 H 中给出了指导使用用户要求规范确定特定微生物检测方法的更多信息

表H.1 每种快速微生物检测方法的特点

技术	测定类型a、b、c、d	利弊	速度	检测目标	特征	样品制备	成本
基因测序	鉴定	p	如果可以对主要样本进行测试，则12小时后得出结果	可能检测与抗生素易感性相关的基因			
		c	一些方法需要培养步骤（例如，如果需要2天的培养步骤，则结果需要3天）；其他人则没有，支持直接从原始样本进行测序	使用基于扩增子的PCR和测序，特定的细菌（16S，rpoB）和真菌（ITS，18S，25-28S）基因通常被靶向用于微生物鉴定	需要反映细菌和真菌多样性的全面、有代表性的序列参考数据库，以及最新的分类学	需要一个库进行比较	可能比其他方法更贵
核酸检测	定性定量	p	不一定需要培养步骤	可能检测与抗生素易感性相关的基因	分析灵敏度高，分析特异性高，可提供多种试剂盒		
		c		只检测特定的生物体，将检测非活性的微生物（不确定的假阳性率），检测活的但不可培养的（VBNC）微生物	干扰制剂赋形剂影响聚合酶反应		
基质辅助激光解析电离飞行时间质谱	鉴定	p			高分析特异性	更简单的样品制备	低运行成本
		c	需要培养步骤（例如，如果需要2天的培养步骤，则需要3天的结果）			需要一个库进行比较	

技术	测定类型a、b、c、d	利弊	速度	检测目标	特征	样品制备	成本
ATP荧光	定性	p	不一定需要培养步骤		高分析灵敏度，高分析特异性活力测定，可提供多种试剂盒		
		c		可检测非微生物ATP（不确定假阳性率），可检测活的不可培养的VBNC微生物			
使用翻译后修饰的LC-MS	鉴定	c					需要专家准备和分析
结合亲和力测定（免疫学方法）	鉴定	p	快速检测	可以特异性检测病原微生物			
		c		仅检测特定微生物		需要大量微生物	
流式细胞术	定量	p	如果可以对临床样本进行检测，则12小时后得出结果		直接细胞计数、活力测定		
		c			需要一个高精度的设备	需要一定数量的微生物	需要专家准备和分析
固相细胞术	定量	p	不需要培养直接检测单个微生物		活性测定，可以过滤生长抑制剂等添加剂，可以通过荧光显微镜进行验证		
		c		不能检测孢子，可以检测活的不可培养的VBNC微生物，不能			可能很贵

技术	测定类型a、b、c、d	利弊	速度	检测目标	特征	样品制备	成本
				应用于高粘性或颗粒材料			
微菌落	定性、定量	p			诊断特异性高，可通过药典方法轻松验证		
		c	可能需要5天或更长的检测期才能证明测量样本呈阴性				
呼吸（CO2检测）	定性	p			分析特异性高，假阳性率低	更简单的样品制备，可以通过药典方法轻松验证	
		c	可能需要7天或更长的检测期才能证明测量样本呈阴性	高浓度抗生素导致假阴性		无法应用于大容量样本	
<p>p：利</p> <p>c：弊</p> <p>a：定性：适用于最终产品的放行测试</p> <p>b：定量：适用于过程监测的微生物限度检测</p> <p>c：鉴定：适用于鉴定微生物种类</p> <p>d：微菌落：检测微菌落有几种方法。使用荧光标记、ATP 生物发光和阴影成像</p>							

附录 J

(资料性)

环境监测

基于风险的方法纳入了环境监测。

环境监测包括建立强有力的监测计划、对关键区域和高流量区域进行采样以及微生物计数和回收率的趋势分析。

为了监测趋势，对分离株进行微生物类型鉴定。建议的分离株鉴定的分类水平是可变的。在只需确定是否发生污染且产品无法生存的情况下，将微生物鉴定到属水平就足够了。然而，应变水平应可用于跟踪案例之间的潜在关系（例如，特定菌株在多个地点的交叉污染）、混合环境的控制水平以及微生物的潜在来源。

注：非无菌产品制造商可以降低频率来监测环境，并期望获得更高的回收率。