

制药企业质量控制 菌种保存使用技术要求

2025 - 07 - 10 发布

2025 - 10 - 10 实施

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 基本要求 1

5 标准菌株获取 2

6 标准菌株复苏 2

7 菌株保存方法 3

8 菌种活化 4

9 菌种销毁 4

10 记录 4

附录 A（资料性） 常用培养基及培养条件 5

参考文献 6

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、组织实施和监督实施。

山西省市场监督管理局对本文件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（SXS/TC32）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）。

本文件主要起草人：邢瑶瑶、曲萍、牛伟平、武瑞杰、薛跃丽、甘雨鑫、崔小芳、李鹏飞、田小鹏、雷岚芬、邓自新、薛京佩、罗晋萍、赵春燕、贺桥伟。

制药企业质量控制 菌种保存使用技术要求

1 范围

本文件规定了制药企业菌株的获取、复苏、保存、活化和销毁的相关要求。
本文件适用于制药企业菌种的保存和使用。

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。

GB 19489 实验室生物安全通用要求
中华人民共和国药典
药品生产质量管理规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

菌种保存

将菌种用适宜的方法妥善保藏，避免污染、死亡，保持其固有遗传、生理、形态等特性基本稳定的微生物学技术。

3.2

标准菌株

由认可的国内或国外菌种保藏机构保藏，其遗传学特性得到确认和保证的并可追溯的菌株。

3.3

标准储备菌株

将标准菌株在实验室转接一代后得到的一套完全相同的独立菌株。

3.4

工作菌株

由标准储备菌株转种获得的供实验使用的菌株。

3.5

菌种传代

将微生物接种至新鲜培养基上（中）培养。从菌种保藏机构获得的标准菌株为第0代，任何形式的转种均被认为是传代1次。

4 基本要求

4.1 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。

- 4.2 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。
- 4.3 菌种保存和使用过程中应无菌操作，避免污染；使用的器皿应清洁、透明、无破损、无裂痕。
- 4.4 菌种传代用培养基和培养条件见附录 A，也可按照标准菌株所附说明书进行。
- 4.5 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。
- 4.6 菌种的传代和使用应在生物安全控制区进行，生物安全控制区应配备满足要求的生物安全柜、培养箱、冰箱、超低温冰箱、高压蒸汽灭菌器等关键仪器设备。
- 4.7 生物安全控制区应与生产、办公以及样品检验洁净区等分开；并按照《中华人民共和国药典》要求进行日常监测和定期监测；除实验必需用品外，其他与实验无关的物品一律不得在生物安全控制区内存放。
- 4.8 关键仪器设备应定期进行检定校准；高压蒸汽灭菌器按国家有关规定管理并定期检验，阳性高压蒸汽灭菌器应独立配备；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。
- 4.9 关键仪器设备的使用和日常监控应有记录，包含但不限于以下内容：
——应对培养箱、冰箱、超低温冰箱、高压蒸汽灭菌器关键参数(如温度、压力)进行连续观测；
——应定期对生物安全柜进行监测。
- 4.10 应定期对仪器设备进行维护和性能验证，并记录。容易污染微生物的仪器设备应定期清洁和消毒；灭菌设备应定期使用生物指示剂检查灭菌效果，指示剂放在不易达到灭菌的部位。
- 4.11 从事菌种保存与使用的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的教育背景人员要求；检验人员应经过相关培训，培训内容包括实验技术、仪器操作、质量管理、生物安全和卫生等。
- 4.12 非简单压力容器操作人员应持有特种设备作业人员证书。
- 4.13 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。
- 4.14 微生物实验室仅限经批准的人员进入。任何进入生物安全控制区域的人员均应按照规定更衣，无菌工作服应符合《药品生产质量管理规范》的要求。进入洁净区时不应化妆和佩带饰物。

5 标准菌株获取

5.1 获取途径

标准菌株应来自认可的国内或国外菌种保藏机构。

5.2 验收

制药企业应对标准菌株的名称、编号、批号、有效期、包装完整性、数量、说明书等内容进行验收。

5.3 标准菌株保存

按照标准菌株使用说明书要求进行保存。

6 标准菌株复苏

- 6.1 用 75%酒精棉球擦拭标准菌株玻璃安瓿外壁或西林瓶外壁及开口处，待干。
- 6.2 采取适宜方式打开包装：

若为玻璃安瓿，用砂轮或玻璃刀划安瓿上端，用干燥无菌纱布包裹安瓿，掰开。如掰不开，可将安瓿上端划痕处置火焰上灼烧，用无菌吸管吸取少量灭菌水滴于灼烧处，使其骤冷产生裂痕，再用干燥无菌纱布包裹安瓿，掰开。

若为西林瓶，确认西林瓶铝盖上的开口方向，将工具（如剪刀、钳子、镊子等）灼烧灭菌后沿开口方向将铝盖撬开，并将铝盖下的橡皮塞夹出。

6.3 用无菌吸管或注射器吸取适宜液体培养基，注入安瓿或西林瓶内，轻轻震摇使菌块溶解、混匀。吸出内容物分别接种至1支适宜液体培养基和1支适宜固体培养基（平板或斜面均可），置适宜条件下培养。

6.4 液体培养物用于分装制备标准储备菌株，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株才可保存。

6.5 也可按照标准菌株所附说明书进行复苏操作。

7 菌株保存方法

7.1 标准储备菌株保存方法

将标准菌株复苏培养后的液体培养物（标准储备菌株）等份悬浮于抗冷冻的培养基中，并分装于无菌小瓶中，超低温冷冻保存（-80℃）。

7.2 工作菌株保存方法

7.2.1 斜面保存法

- 1) 配制适宜琼脂培养基分装至试管，灭菌后摆放长斜面凝固，斜面长度不应超过试管总长的1/2。
- 2) 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) 在适宜条件下培养。
- 4) 铜绿假单胞菌置室温避光保存，其它菌种置2℃~8℃保存，均应直立放置。

7.2.2 液体石蜡保存法

- 1) 配制适宜琼脂培养基分装至试管，灭菌后摆放长斜面凝固；或配制适宜半固体培养基分装至小试管中，灭菌后直立摆放。
- 2) 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，液面宜高于斜面顶部1cm左右。
- 5) 铜绿假单胞菌置室温避光保存，其它菌种置2℃~8℃保存，均应直立放置。

7.2.3 瓷珠保存法

- 1) 挑取新鲜菌种纯培养物至无菌小瓷珠冻存管。
- 2) 拧紧瓶盖，来回颠倒冻存管四至五次使菌液乳化，制成约3~4麦氏比浊度的菌悬液。不应涡旋振荡。
- 3) 用无菌吸管或注射器将冻存管中的菌悬液吸出。
- 4) 拧紧瓶盖，冻存管置-20℃或-80℃保存。

7.2.4 甘油冷冻保存法

- 1) 挑取新鲜菌种纯培养物至适宜培养基(含 10%~20%甘油)中制成约 3~4 麦氏比浊度的菌悬液。
- 2) 分装至液体菌种保存管中,每管 0.5~1mL。
- 3) 保存管置-20℃或-80℃保存。

8 菌种活化

保存后的菌株需活化后使用,活化方法根据菌种保存方法而定。

- 8.1 斜面保存法保存的菌种:挑取少量菌苔接种至适宜培养基,置适宜条件下培养。
- 8.2 液体石蜡保存法保存的菌种:挑取少量菌苔划线接种至适宜培养基,置适宜条件下培养后,挑取单个菌落再次转种培养后使用。
- 8.3 瓷珠保存法保存的菌种:取出冻存管并用力摇晃,使管内磁珠分散。打开冻存管,用无菌镊子或接种环取出一粒瓷珠,直接放在平板培养基上划线接种或置于适宜液体培养基中,置适宜条件下培养。冻存管应尽可能快地放回原来的保存环境。
- 8.4 甘油冷冻保存法保存的菌种:取出液体菌种保存管置 37℃~40℃水浴中快速解冻。开启保存管,将内容物接种至适宜培养基中,置适宜条件下培养。

9 菌种销毁

将以下菌株经灭菌后无害化处理:

- 9.1 经过确认试验证明已经老化、退化、变异、污染等的菌株;
- 9.2 超过保藏期限的菌株;
- 9.3 解冻使用后的冷冻菌株。

10 记录

- 10.1 应建立菌种出入库记录。记录中应包括(但不限于)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。
- 10.2 应建立菌种传代记录。记录中应包括(但不限于)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、保存条件、销毁处置方式、传代人和传代日期等。
- 10.3 应建立菌种确认记录。记录中应包括(但不限于)以下内容:菌种名称、编号、传代代数、试验过程和结果、确认时间和确认人等。
- 10.4 应建立菌种使用记录。记录中应包括(但不限于)以下内容:菌种名称、编号、传代代数、使用支数、剩余支数,使用人、使用日期等。
- 10.5 记录应归档保存,保存期一般为 6 年。

附录 A
(资料性)
常用培养基及培养条件

A.1 常用培养基及培养条件见表 A.1。

表 A.1 常用培养基及培养条件

菌种名称及编号	培养基	培养条件
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>) 〔CMCC(B)26003〕	胰酪大豆胨液体培养基/胰酪大豆胨琼脂培养基	30～35℃，18～24小时
铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) 〔CMCC(B)10104〕	胰酪大豆胨液体培养基/胰酪大豆胨琼脂培养基	30～35℃，18～24小时
大肠埃希菌(<i>Escherichia coli</i>) 〔CMCC(B)44102〕	胰酪大豆胨液体培养基/胰酪大豆胨琼脂培养基	30～35℃，18～24小时
枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>) 〔CMCC(B)63501〕	胰酪大豆胨液体培养基/胰酪大豆胨琼脂培养基	30～35℃，18～24小时
乙型副伤寒沙门菌(<i>Salmonella paratyphiB</i>) 〔CMCC(B)50094〕	胰酪大豆胨液体培养基/胰酪大豆胨琼脂培养基	30～35℃，18～24小时
生孢梭菌(<i>Clostridium sporogenes</i>) 〔CMCC(B)64941〕	硫乙醇酸盐流体培养基/梭菌增菌培养基	厌氧，30～35℃，24～48小时
白色念珠菌(<i>Candida albicans</i>) 〔CMCC(F)98001〕	沙氏葡萄糖液体培养基/沙氏葡萄糖琼脂培养基	20～25℃，2～3天
黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>) 〔CMCC(F)98003〕	沙氏葡萄糖液体培养基/沙氏葡萄糖琼脂培养基	20～25℃，5～7天

参 考 文 献

- [1] GB/T 27025-2019 检测和校准实验室能力的通用要求
 - [2] GB/T 27476.1-2014 检测实验室安全 第1部分：总则
 - [3] SN/T 2660-2010 食品微生物实验室菌种保藏方法
 - [4] SN/T 2632-2010 微生物菌种常规保藏技术规程
 - [5] 《中华人民共和国药典》（2020年版）四部
 - [6] 《药品生产质量管理规范》（2010年修订）
-