

T/CWDPA

团 体 标 准

T/CWDPA XXX—202X

肉毒梭菌毒素（C、D 型）生产技术规范

Technical specification for the production of clostridium botulinum
toxin (type C and D)

（征求意见稿）

202X - XX - XX 发布

202X - XX - XX 实施

中国西部开发促进会 发 布

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 总体要求..... 1

5 菌种管理..... 2

6 原料、仪器..... 2

7 生产工艺..... 2

8 质量检验..... 5

9 证实方法..... 6

附录 A（资料性） 肉毒梭菌毒素（C、D 型）配方..... 7

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由青海生物药品厂有限公司提出。

本文件由中国西部开发促进会归口。

本文件起草单位：青海生物药品厂有限公司……。

本文件主要起草人：……。

肉毒梭菌毒素（C、D 型）生产技术规范

1 范围

本文件规定了肉毒梭菌毒素（C、D型）生产的总体要求、菌种管理、原料、仪器、生产工艺、质量检验和证实方法。

本文件适用于肉毒梭菌毒素（C、D型）生产。

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 3095 环境空气质量标准

GB 3838 地表水环境质量标准

中华人民共和国兽药典（第七版）（中华人民共和国农业农村部公告 第1017号）

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 总体要求

4.1 基本要求

4.1.1 生产企业应建立完善的质量管理体系，覆盖菌种管理、生产、检验、贮存和运输全过程，并制定相应的管理制度和操作规程。

4.1.2 生产企业应建立生物安全管理体系，配备生物安全管理人员，制定生物安全管理制度和应急预案。

4.1.3 从事肉毒梭菌毒素生产、检验的人员应经过专业培训，考核合格后方可上岗。直接接触毒素的操作人员应定期进行健康检查，并建立健康档案。

4.1.4 生产过程中使用的菌种、毒素应实行专人管理、专库（柜）保存、专册登记，领用和消耗应详细记录，做到账物相符。

4.2 生产环境

4.2.1 厂区空气质量应符合 GB 3095 对二类区的要求。

4.2.2 生产用水应符合 GB 3838 中Ⅳ类水质要求。

4.3 生产车间

4.3.1 菌种储藏间、无菌操作间应与生产车间相对隔离。

4.3.2 种子制备车间应相对隔离并设有可密闭灭菌的传输通道。

5 菌种管理

5.1 基本要求

制造与检验用的菌种为C型肉毒梭菌C62-4菌株、D型肉毒梭菌C62-4菌株。

5.2 形态和生化特征

5.2.1 为革兰氏阳性粗大杆菌，陈旧的培养物呈革兰氏阴性，产生偏端芽孢。

5.2.2 生化特性应符合细菌分类学中C型肉毒梭菌C62-4菌株、D型肉毒梭菌C62-4菌株的特性。

5.3 培养特性

为厌氧菌，在肉肝胃酶消化汤半固体培养基中呈中等生长；在厌气肉肝汤中生长不良或不生长，培养基内加入新鲜生肝块时，生长良好，产气，有臭味；在鲜血琼脂平板上厌氧条件下，37℃培养48 h，菌落为不规则的圆形，直径约3 mm，半透明，边缘不整，有略大于菌落的溶血圈。

5.4 血清学特性

5.4.1 C型肉毒梭菌C62-4菌株用肉毒梭菌定型血清做中和试验，结果应为C型。

5.4.2 D型肉毒梭菌C62-4菌株用肉毒梭菌定型血清做中和试验，结果应为D型。

5.5 毒力

各菌株用加入以无菌操作采取的新鲜生肝块的厌气肉肝汤或肉肝胃酶消化汤培养5 d~7 d的菌液上清液0.000 01 最小致死量~0.000 02 最小致死量，静脉注射体重14 g~16 g小白鼠，应在3 d内死亡。

5.6 基础种子代数

应为1代~10代。

5.7 保存期限

在2℃~8℃下保存期限为10年。

6 原料、仪器

6.1 原料

6.1.1 菌种应符合第5章的规定。

6.1.2 肉肝胃酶消化汤培养基：用于菌液培养。

6.1.3 厌气肉肝汤培养基：用于菌种保存和种子繁殖。

6.1.4 生理盐水。

6.2 仪器

透析器、除菌滤器、无菌灌装机、冷冻干燥机、饵料搅拌机、制粒机等。

7 生产工艺

7.1 工艺流程

工艺流程见图1。

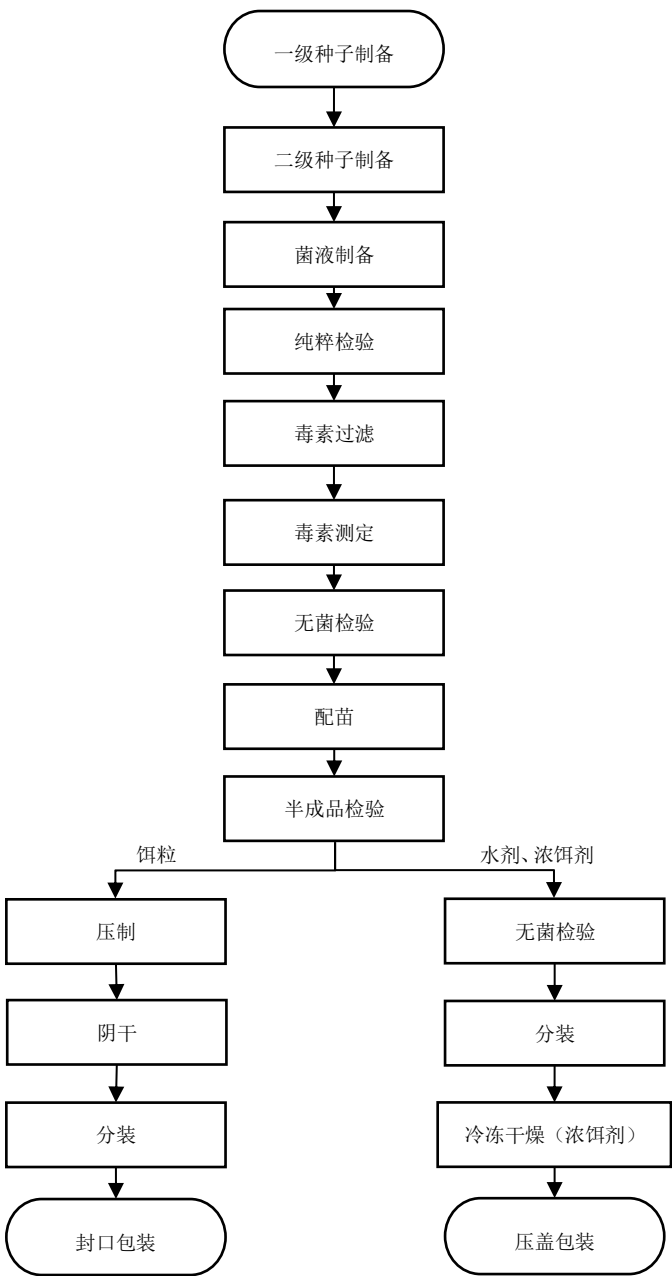


图1 工艺流程图

7.2 一级种子制备

7.2.1 将菌种接种于厌氧肉肝汤或肉肝胃酶消化汤半固体培养基（含 0.05%琼脂，0.5%明胶）中，于 37℃培养 3 d 后，测毒素及涂片镜检。用普通琼脂斜面、厌氧肉肝汤及普通肉汤各 2 管，每管接种 0.2 mL，培养 3 d~5 d，应纯粹，即作为一级种子。

7.2.2 一级种子在 2℃~8℃下保存不超过 15 d。为了便于使用，也可将产芽孢的菌种移植于加新鲜生肝块的厌氧肉肝汤中，在 2℃~8℃下保存，每 3 个月继代培养 1 次，在培养基上继代，不超过 4 代。

7.3 二级种子制备

将一级种子1株~2株，接种于培养基中，置37℃培养3 d~5 d，抽样做纯粹检验，纯粹则作为二级种子。二级种子在2℃~8℃下保存不超过5 d。

7.4 菌液制备

将肉肝胃酶消化汤培养基(含葡萄糖)灌入透析器的培养室，同时将生理盐水溶液灌入细菌培养室，其容量比为10:1，于118℃灭菌40 min，待冷至适宜温度，即以1%种子量(按生理盐水容量计)接入培养室内，在37℃静置培养6 d~8 d。培养过程中培养室应始终保持清洁，结束时从细菌培养室放出菌液。

7.5 纯粹检验

菌液培养完成后，取样接种普通琼脂斜面，加入新鲜肝块、厌气肉肝汤和普通肉汤各1管，每管0.2 mL，在37℃培养7 d，应纯粹。

7.6 毒素过滤

过滤前将pH调整为4.5~6.0，然后用除菌滤器在2℃~8℃下过滤除菌。

7.7 毒素测定

用体重14 g~16 g的小白鼠，静脉注射，每1 mL最小致死量应符合以下要求：

- a) C型肉毒梭菌毒素：不低于300万；
- b) D型肉毒梭菌毒素：不低于3 000万。

7.8 无菌检验

7.8.1 用0.2%明胶缓冲液将毒素恢复原量，分三组混合，用硫乙醇酸盐培养基、改良沙氏培养基及马丁琼脂斜面各2管，每管接种毒素0.2 mL，另用50 mL~100 mL厌气肉肝汤(加新鲜肝块)和马丁肉汤各1瓶，分别接种毒素0.5 mL~1 mL，一支放入25℃温箱，另一支放入37℃温箱，培养7 d后，自厌气肉肝汤、马丁肉汤瓶分别吸取适量培养物移植于加新鲜肝块的肉肝胃酶消化汤、硫乙醇酸盐培养基、马丁琼脂斜面各1管共培养14 d，每批检验两次。

7.8.2 用肉肝胃酶消化汤大管3支(加新鲜肝块)。每管接种毒素1 mL，50 mL~100 mL肉肝胃酶消化汤三角瓶2瓶(加新鲜肝块)，每瓶接种毒素5 mL~10 mL，放入37℃温箱培养14 d。

7.8.3 无菌则判定合格，若有菌生长，该批毒素重新按7.6过滤后再次检验，若仍有杂菌则废弃该批毒素。

7.9 配苗

经无菌检验合格后，按规定的毒价进行配苗，配方参见附录A。

7.10 半成品检验

配苗完成后，取样按7.8做无菌检验，应无菌生长。

7.11 饵粒制备

7.11.1 压制

按产品规格要求压制为符合尺寸大小的颗粒。

7.11.2 阴干

压制后的颗粒在适宜条件下阴干，剩余水分应不大于4%。

7.11.3 分装

按规格要求进行分装。

7.11.4 封口包装

按产品要求进行封口和包装。

7.12 水剂、浓饵剂制备

7.12.1 无菌检验

配毒完成后，取样进行无菌检验，按7.8进行无菌检验，应无菌生长。

7.12.2 分装

经无菌检验合格后，进行定量分装，分装时随时搅拌，使其混合均匀。

7.12.3 冷冻干燥

水剂不进行冷冻干燥。浓饵剂定量分装后进行冷冻干燥，剩余水分应不大于4%。

7.12.4 压盖包装

冻干完成后压盖、包装。

8 质量检验

8.1 检验规则

- 8.1.1 以相同菌种、同一菌液制备的相同规格产品为一批。
- 8.1.2 每批产品应进行检验，检验项目和要求应符合 8.2~8.5 的规定。
- 8.1.3 从每批产品随机抽取不少于 400 g（mL）进行检验。
- 8.1.4 无菌检验每批进行两次，若有菌生长，该批毒素重新过滤除菌后送检，若仍有杂菌则该批产品废弃。其他项目检验结果合格则判该批产品合格，否则判不合格。

8.2 感官检验

应符合表1的规定。

表1 感官检验

项目	C型肉毒梭菌毒素			D型肉毒梭菌毒素
	饵粒	浓饵剂	水剂	浓饵剂
色泽	粉红色	灰白色	褐色	褐色
形态	颗粒	块状固体或粉末	液体	块状固体或粉末

8.3 水分检验

饵粒、浓饵剂产品的水分含量应不大于4%，按《中华人民共和国兽药典（第七版）》的规定进行。

8.4 无菌检验

应无菌生长，按7.8的规定进行。

8.5 毒素检验

8.5.1 小白鼠静注毒力测定

除C型肉毒梭菌毒素饵粒外，其他产品用14 g~16 g的2只健康小白鼠，将样品按使用方法稀释后，每只小白鼠静脉注射0.2 mL，2只小白鼠均在72 h内死亡判定毒力合格。

8.5.2 小白鼠灌服毒力测定

取体重18 g~22 g的5只健康小白鼠，每只灌服0.4 mL含2万MLD（最小致死量）的样品液，5只小白鼠均在20 h内死亡判定毒力合格。

8.5.3 高原鼠兔灌服毒力测定

取体重100 g的5只健康高原鼠兔，每只灌服1 mL含1 000MLD（最小致死量）的样品液，5只高原鼠兔均在144 h内死亡判定毒力合格。

9 证实方法

证实方法包括但不限于以下内容：

- a) 相关信息记录的查阅；
- b) 相关档案材料的查阅；
- c) 现场实际状态的核实。

附 录 A
(资料性)
肉毒梭菌毒素 (C、D 型) 配方

A.1 100 万毒价/mL C 型浓饵剂肉毒梭菌毒素

5000 mL 100万毒价/mL C型肉毒梭菌毒素配方见表A.1。

表A.1 100 万毒价/mL C 型肉毒梭菌毒素配方

成 分	配 比 (体积份/质量份)
毒素液 (100万毒价/mL)	100份
蔗糖	6.25份
明胶	1.25份
注射用水	25份

A.2 3 000 万毒价/g C 型浓饵剂肉毒梭菌毒素饵粒

1000 kg 3 000万毒价/g C型浓饵剂肉毒梭菌毒素饵粒配方见表A.2。

表A.2 3 000 万毒价/g C 型浓饵剂肉毒梭菌毒素饵粒配方

成 分	配 比 (质量份)
毒素水剂 (100万毒价/mL)	8.3份
草粉	6.7份
小麦	50份
玉米	25份
羧甲基纤维素钠	4.2份
食盐	0.8份
品红	适量
食用油	0.8份

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国兽用生物制品规程
-