

# 试剂应用与进展

司海韵

湛江安度斯生物有限公司主编 2001年第2期(总第8期)

2001年9月28日

## 目 录

鲎试验的临床应用进展综述 .....	1
细菌内毒素与血液透析综述 .....	7
一种新型的人血液细菌内毒素检测试剂盒 .....	14

## 鲎试验的临床应用进展综述

湛江安度斯生物有限公司 研究与发展部

关键词: 鲎试验 临床检验 内毒素血症

### 1、鲎与鲎试验简介

鲎——一种在地球上生存了2亿多年的海洋生物,历经沧海桑田,风采依旧,其胚胎发育仍重演着三叶虫的形态,鲎与在德国 Eichstatt 发现的距今约1.5亿年前的鲎化石比较,形态上没有本质的变化,可谓“活化石”:鲎是如此的古老,但它也不是现存的任何生物的祖先,它和我们人类一样,位于进化树的枝叶末端,其怪异的外型真是独一无二,能够和它算上亲戚的生物同样是生物界的异类,一个是蜘蛛,另一个是蝎子。

鲎在漫长的进化、生存过程形成了一套完善的免疫系统,2亿年的免疫实践足以证明了它的有效性,鲎循环系统中的阿米巴细胞是免疫活动的重要担负者,阿米巴细胞内的免疫因子

主要分3类,1、凝固酶体系,2、抗菌肽类,3、内毒素中和蛋白及凝集素。相应的主要生理作用是:1、与内毒素或 $\beta$ -葡聚糖反应形成凝胶阻止微生物(革兰氏阴性细菌和真菌)扩散,2、杀灭微生物,3、中和内毒素或 $\beta$ -葡聚糖。海洋细菌为革兰氏阴性细菌(GNB),鲎阿米巴细胞内还没有发现针对革兰氏阳性细菌的免疫机制<sup>[1]</sup>将阿米巴细胞分离,在体外制备的鲎阿米巴细胞裂解物简称为鲎试剂,鲎试剂最初使用美洲鲎(Limulus Polyphemus)制备,因此缩写成为LAL,至日本与中国采用中国鲎(Tachypleus Tridentatus)制作鲎试剂,TAL即应蕴而生。

鲎试验的创始人 Levin J 即试图检测血液内毒素;血浆内毒素的检测分两个部分,一是鲎试验,二是血浆/全血的预处理,可供选择的鲎试验法有十几种,其中仅凝胶法、显色法和比浊法有商品化的鲎试剂支持,血浆/全血的预处理方法也有十几种,成熟的方法有:新高氯酸法、稀

释加热法、碱试剂法和硝酸法等,至今,仅日本厚生省批准两个鲎试验试剂盒用于血浆内毒素的检测。

## 2、鲎试验的方法

定量鲎试验的主要方法是显色法、动态比浊法和动态显色法(见表1),显色法是应用鲎试剂水解模拟底物产生对硝基苯胺(PNA),用光电检测法检测内毒素,比浊法则是直接检测凝固蛋白的浊度变化;用于临床检验的鲎试验方法要求是灵敏、定量,血液的内毒素含量较低,正常人血浆低于 $3\text{pg/mL}$ ,内毒素血症的临床决定水平为 $10\text{pg/mL}$ ( $0.03 \sim 0.1\text{EU/mL}$ )<sup>[2]</sup>,血液经预处理后通常会稀释 $5 \sim 10$ 倍,实际检测至少需要 $1\text{pg/mL}$ ( $0.003 \sim 0.01\text{EU/mL}$ )的检测灵敏度,显色法和比浊法都可以提供一个定量的内毒素检测,以ES-Test为例,其重复性试验的cv值小于10%,准确度的回收率在75~125%范围;鲎试验的自动化还没有达到生化、免疫分析的水平,鲎试验采用的仪器有两类,恒温型酶标分析仪和试管式内毒素检测仪,酶标分析仪的检测是批量进行的,采用空气对流加热微量反应板,反应板内温控均一性的最低要求是 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ,最好在 $\pm 0.2^\circ\text{C}$ 内,内毒素检测仪不必按批量进行,所采用的传导式加热的温控更加均一(见表2)

表1:国外应用于临床检验的几种主要商品化鲎试剂

试剂	生产商	试剂类型	专一性	检测范围	方法
Toxicolor	生化学	TAL	E/G	0-50pg/mL	C
Endospeccy	生化学	TAL	E	0-50pg/mL	C
Gluspeccy	生化学	TAL	G	0-300pg/mL	C
HS-test	和光(Wako)	TAL	E/G	0.5-1,000pg/mL	KT
ES-test	和光	TAL	E	0.5-1,000pg/mL	KT
Glucan Test	和光	TAL	G	0-10,000pg/mL	KT
B-G Star	Maruha	TAL	G	0-50pg/mL	C
KQCL	惠特克	TAL	E/G	0.001-10EU/mL	KC
Pyrochrom	ACC	TAL	E/G	0.005-1EU/mL	C
Coatest	Chromogenix	TAL	E/G	0.06-12EU/mL	C

注:生化学的内毒素控制物 $1\text{ng} = 2.9\text{EU}$ ,和光的内毒素控制物 $1\text{ng} =$

$8\text{EU}$ ,美国FDA(药典)的参考内毒素标准EC-6(Lot-G)的 $1\text{ng} = 10\text{EU}$ ,EC-2的 $1\text{ng} = 5\text{EU}$ ;E为内毒素,G为 $\beta$ -葡聚糖;C为显色法,KT为动态比浊法,KC为动态显色。

表二:国外用于鲎试验的几种主要的仪器

仪器名称	制造商	类型	内毒素分析软件
Well Reader SK-601	生化学	P	ET-603, PL603
KQCL-System	惠特克	P	WinKQCL
iEMS	LabSystem	P	Genesis
Elx-808IU	Biotek	P	Biolise, KC-4
ThermoMAX	Molecular Device	P	Softmax
Spectra Thermo	Tecan	P	Magellan
Toxinometer	和光	T	Txmster
ATI-320	Lab Kinetics	T	ATI-log
Kinetix	ACC	T	Pyros

注:P为微量反应孔式酶标分析仪,T为试管式内毒素检测仪

## 3. 血浆/全血的预处理

血液内毒素的检测主要是检测血浆或者是全血,不采用血清,因为纤维蛋白会结合内毒素,使内毒素降低,内毒素会吸附在血小板上,用于检测内毒素的血浆为富含血小板的血浆(PRP),贫血小板的血浆(PPP)同样贫内毒素,分离血浆的离心速率通常是 $1,500 \sim 2,000\text{g}$ ,40s或 $100 \sim 150\text{g}$ ,10~15min,PRP血浆/全血的预处理方法<sup>[3][4][5][6]</sup>见图1至图4;检测 $\beta$ -葡聚糖时,新高氯酸法处理的血浆可以兼用于 $\beta$ -葡聚糖检测,稀释加热法的处理液、碱试剂则需要改良,稀释加热法的处理液TritonX-100浓度为0.2%,还含有0.002%多粘菌素B,碱试剂的配方为 $0.3\text{mol/LUKOH}$ 、 $0.15\text{mol/LUKCl}$ 、0.1% Polybrene;碱试剂法与新高氯酸法比较省略了离心,与稀释加热法比较省略了加热,处理步骤更为简单,因此也形成了多个碱试剂专利配方,经改进的碱试剂法处理的血浆可同时用于检测内毒素和 $\beta$ -葡聚糖。

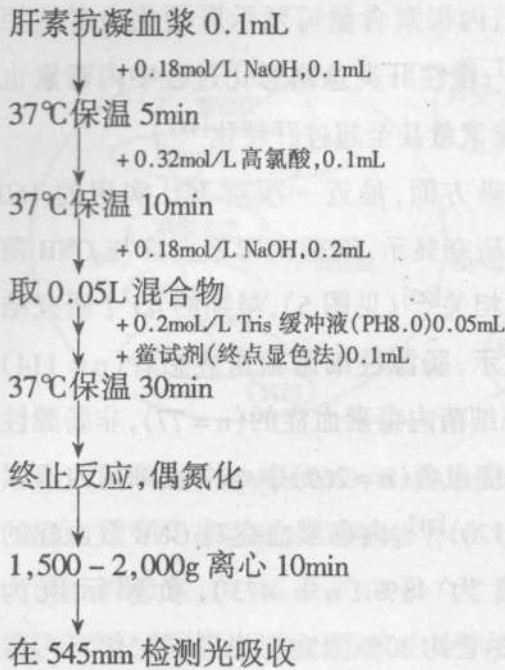


图 1: 新高氯酸法:

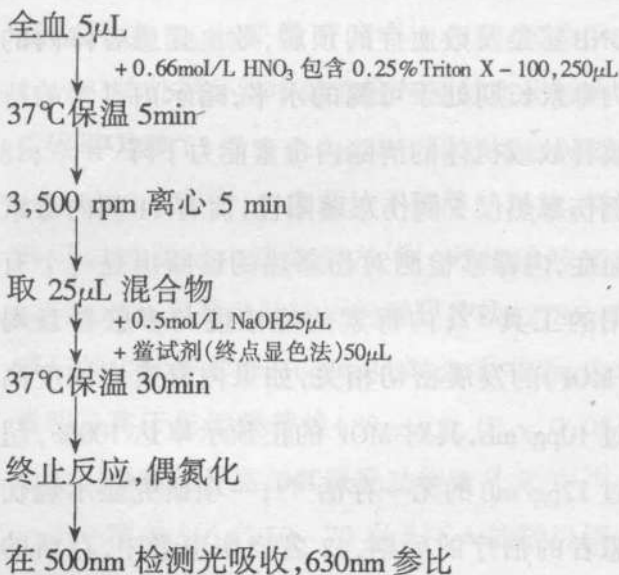


图 2: 全血硝酸处理法

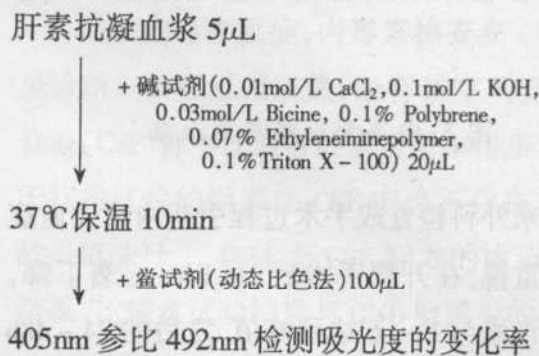


图 3: 碱试剂法

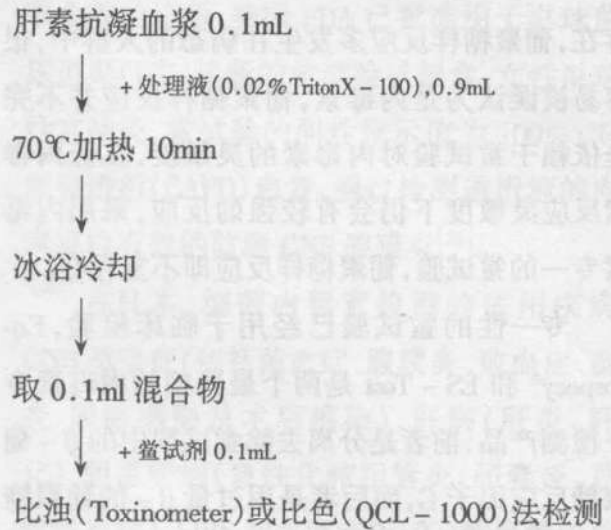


图 4: 稀释加热法

#### 4. 检测的专一性

由于鲎试剂可以被 β-葡聚糖激活, 纤维素透析膜溶解的微量(1→4)-β-D-葡聚糖或香菇多糖的(1→3)-β-D-葡聚糖成分均可以激活鲎试验反应; 因此使用纤维素膜进行血液透析的患者或接受抗肿瘤多糖治疗的患者可能有非内素的阳性反应, 在肝癌的肝切除或其他消化器官手术后的血液显示出短暂的鲎试验增强, 研究证实是由止血棉纱引起的<sup>[7]</sup>, 同理, 深度真菌感染的患者因为真菌的代谢产物 β-葡聚糖的作用也会有非内毒素的阳性反应; 另一类非内毒素反应则与 β-葡聚糖没有关系, 是血液中的内源性因子引起的葡聚糖样的反应, 接受人工心肺机进行体外循环(CBP)的患者<sup>[8]</sup>, 接受食道血管曲张手术的患者<sup>[9]</sup>, 均会产生不同程度葡聚糖样反应, 有报道表明这种反应与患者体内的细胞因子如: 白细胞介素 IL-6、IL-8 的升高有关<sup>[10]</sup>; 腹动脉瘤手术的患者也有葡聚糖样反应, 同时伴随磷酸激酶升高<sup>[11]</sup>, 健康人的静脉血偶尔也会表现出葡聚糖样反应, 而动脉

血则不会<sup>[12]</sup>,肝硬化患者有时也会有葡聚糖样反应<sup>[13]</sup>,这些现象证实了内源性鲎试验因子的存在,葡聚糖样反应多发生在病态的人群中,很容易被误认为是内毒素,葡聚糖样反应并不完全依赖于鲎试验对内毒素的灵敏度,在低内毒素反应灵敏度下仍会有较强的反应,采用内毒素专一的鲎试验,葡聚糖样反应即不复存在。

专一性的鲎试验已经用于临床检验,Endospecy<sup>®</sup>和ES-Test是两个最典型的内毒素专一检测产品,前者是分离去除鲎试剂中的 $\beta$ -葡聚糖反应因子G,而后者是用过量 $\beta$ -葡聚糖抑制因子G被激活,其他的内毒素专一产品也多是采用因子G抑制物来实现专一性;另一方面,鲎试验也为 $\beta$ -葡聚糖的检测提供了一种有效的方法,用于间接判断深度真菌感染<sup>[14]</sup>,特别是分辨细菌性和真菌性败血症,传统的真菌培养法鉴别真菌感染需要几天时间,而鲎试验只需要60~90min,Gluspecy和 $\beta$ -Glucan Test对深度真菌感染的 $\beta$ -葡聚糖临床决定水平分别是20pg/mL、11pg/mL,相应的 $\beta$ -葡聚糖检测试剂也达到pg级的检测灵敏度。

### 5. 内毒素检测的临床应用

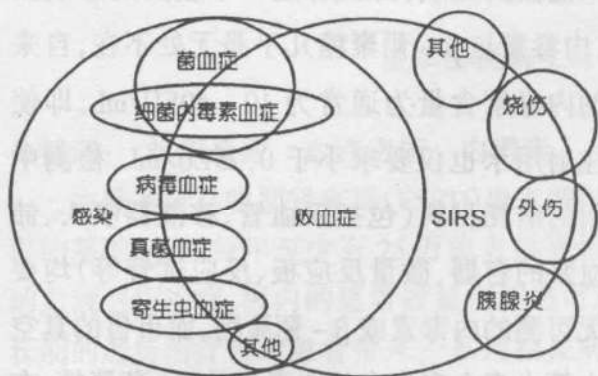
血液内毒素的检测主要用于内毒素血症的诊断,内毒素血症在一定程度上可以诱发、加剧或预示其他疾病发展;内毒素血症可以导致中性粒细胞在肺部微循环中聚集及急性肺损伤<sup>[15]</sup>;酒精肝及非酒精肝硬化患者的内毒素中和能力(ENC)均下降,ENC的下降与细菌内毒素血症的发生有一定关系<sup>[16]</sup>,内毒素血症与酒精肝患者的单核细胞/巨噬细胞的细胞因子反应增强相关,内毒素可能是酒精肝的重要病理因素<sup>[17]</sup>;肝硬化患者的内毒素含量随着病情的恶

化而升高,内毒素含量可预示肝硬化患者的短期预后<sup>[18]</sup>;慢性肝炎急剧恶化过程中内毒素也升高,内毒素量甚至超过肝硬化<sup>[19]</sup>。

在感染方面,最近一项对ICU病房的160名患者的研究显示,细菌内毒素血症与GNB菌血症显著相关<sup>[20]</sup>(见图5),早期的45个研究结果统计显示,肠源性细菌菌血症患者( $n=114$ )中68%患细菌内毒素血症的( $n=77$ ),非肠源性细菌菌血症患者( $n=269$ )中45%患细菌内毒素血症( $n=120$ )<sup>[21]</sup>,内毒素血症对GNB败血症的正预示者为48%( $n=473$ ),负预示值为99%<sup>[22]</sup>,尽管约30%菌血症患者同时伴有内毒素血症,但内毒素血症不能预示GNB菌血症、GNB感染及败血症的预后,败血症患者体内的内毒素长期处于可测的水平,暗示内毒素的持续释放或机体的清除内毒素能力下降<sup>[23][24]</sup>;18例伤寒热仅5例伤寒菌阳性,而有11例内毒素血症,内毒素检测对伤寒热的诊断是一个有用的工具<sup>[25]</sup>;内毒素的峰浓度与多脏器衰竭(MOF)的发展密切相关,如果内毒素峰浓度高过10pg/mL,其对MOF的正预示率达100%,超过12pg/mL的无一存活<sup>[26]</sup>;一项研究显示烧伤患者的治疗的后期,42名烧伤患者中,存活的25人中仅11人血浆内毒素超过9.8pg/mL,而死亡的患者临床末期的内毒素均超过9.8pg/mL<sup>[27]</sup>。

图5:内毒素血症与菌血症

近来外科检查或手术过程引起内毒素血症也广受重视,在开腹手术后1h,ENC显著下降,同时内毒素与IL-6达到峰值,之后的24~48h内,CRP、SSA、 $\alpha_2$ 巨球蛋白和 $\alpha_1$ 抗胰蛋白酶升高达到峰值<sup>[28][29]</sup>;微创介入诊疗同样伴有内毒素



ACCP/SCMC(1992), 稻田捷也修饰(1993)

血症,胃穿孔患者的腹腔镜修补术与开腹手术比较,内毒素、IL-6及CRP没有差别<sup>[30]</sup>;结肠镜检查也会引起显著内毒素血症,在ENC下降5min后,在血浆中即检查到肠源性细菌,同时,凝血氧烷 B<sub>12</sub>也开始升高<sup>[31]</sup>;心肺旁路手术(CPBS)体外循环池中的血液与动脉血比较内毒素显著升高(3.5 ± 0.5pg/mL和0.8 ± 0.2pg/mL;P < 0.05)<sup>[32]</sup>,内毒素从下腔静脉释放,类固醇可以减弱的内毒素释放<sup>[33]</sup>;冠状动脉搭桥(234ng/L),冠状动脉搭桥与瓣膜替换(278ng/L)或与颈动脉手术(321ng/L)的联合手术后,内毒素明显高于单瓣膜替换(89ng/L), (P < 0.05),患者内毒素的升高与其胃肠功能紊乱有关<sup>[34]</sup>。

一项对516名50-79岁老年人的随机调查研究显示,吸烟的老年人若同时患内毒素血症,将面临更大的患动脉粥样硬化的风险<sup>[35]</sup>。

除了内毒素血症,内毒素检查在GNB脑膜炎诊断方面已经很成熟,经脊髓穿刺获得的脑脊液(CSF)标本比血液的成份简单得多,血液中干扰鲎试验的因素在CSF中也不存在,根据文献报道统计了4884个CSF标本的内毒素检查结果,比较鲎试验结果与GNB脑膜炎的符合率,52例假阴性,17例假阳性,灵敏度为93.0%。选择性为99.4%,而培养法或革兰氏染色法的灵敏度、选择性均不及鲎试验;此外鲎试验还应

用于淋球菌性尿道炎、中耳炎、化脓性关节炎、眼炎等的诊断,美国FDA已批准用于淋球菌性尿道炎(UTI)诊断的鲎试验试剂盒,女性淋球菌性宫颈炎,鲎试验的阴性预示值为100%;对于腹膜透析(CAPD)患者,通过检测透析液的内毒素可以有效的监测GNB腹膜炎<sup>[36]</sup>。

在日本,细菌内毒素检测的适用疾病有GNB感染症(包括菌血症、腹膜炎、败血症、脑膜炎、尿路感染及术后感染)、肝病(肝炎、肝硬化)、胆道疾病(急性化脓性胆管炎、胆囊炎、总胆管结石症)、SIRS和血液透析;β-葡聚糖的检测也初步用于深度真菌感染症的诊断。

## 6. 面临的问题

首先是内毒素标准的不统一,每一种细菌都有特定的内毒素结构及分子量,其生物学效价也因内毒素的来源和不同提取、纯化方法而异,因此内毒素的标准物只是一个参考标准,药品检验领域已经形成了完善的内毒素标准物体系,如:USP的LotG、EP的BRP-3、JP的UKT-B和中国的981,WHO也建立了内毒素的IS,编号为IS94/580,在内毒素临床检验中采用内毒素标准物来源则较为广泛,以菌株种类划分,有*E. Coli O<sub>111</sub>:B<sub>4</sub>*,*E. Coli O<sub>55</sub>:B<sub>5</sub>*,*E. Coli O113*和*S. abortus equi*等,以商业来源划分有Sigma、Difco、Pyroquant、FDA等,除参考药典或FDA标准外,以其他内毒素为标准的检验多以内毒素理论重量为标准,在不同标准下检测的内毒素重量值是否一致还有待验证,美国药典从内毒素标准EC-2开始使用生物学效价——内毒素单位(EU),此后的内毒素标准均延续EC-2生物学效价,而日本在临床检验方面至今仍采用重量单位,虽然同为日本的两个鲎试剂制造商,生化学与和

光都采用*E. coli* O<sub>III</sub>:B<sub>4</sub> 内毒素作为标准物,但是其生物学效价也不同,生化学的 1ng 内毒素相当于 2.9EU,和光的 1ng 内毒素相当于 8EU,而对于内毒素血症的检测却统一采用 10pg/mL 的临床决定水平。

其次是检测结果的有效性,目前,仅有两个日本公司的试剂盒在日本获准用于临床检验,美国 FDA 批准了至少 6 个厂商的鲎试剂用于药品检验,而没有一个血液的临床检验许可证;药品检验主要提供一个内毒素的安全控制,ICH 最新的细菌内毒素检查法对准确性的要求为回收率在 50~200% 范围<sup>[37]</sup>,对灵敏度、精确度均无要求,统计显示,早期的显色法对细菌内毒素血症检测的灵敏度(62%)比凝胶法(51%)仅改善了 11%<sup>[21]</sup>;当然检测的灵敏度、精确度和准确度不仅与鲎试剂有关,还与血浆/全血的处理方法、检测仪器、检测方法有关;影响有效性的另一个因素是干扰,如:黄疸对直接的 PNA 显色法会有干扰,磺胺类药物会干扰偶氮化的显色法,而血浆的非特异性浊度对比浊法会有干扰,反应容器及试验材料对鲎试验也有干扰,普通玻璃、聚丙烯塑料会吸附内毒素,为避免容器对内毒素的吸附,玻璃的材质首选硼硅酸盐,塑料首选聚苯乙烯,普通的鲎试剂可以与  $\beta$ -葡聚糖与内毒素反应,在检测其一时另一个就可视为一个重要的干扰因素,例如:内毒素血症与系统性炎症反应综合症(SIRS),非专一性鲎试验的结果显示内毒素血症与 SIRS 广泛相关,而内毒素专一性鲎试验结果显示内毒素血症仅与一部分 SIRS 相关(见图 5),很显然,专一性的鲎试验为

临床检验所必须;污染也是一个重要的影响因素,内毒素与  $\beta$ -葡聚糖几乎是无处不在,自来水的内毒素含量通常为 10~50EU/mL,即使是注射用水也仅要求小于 0.25EU/mL,检测中使用的消耗材料(包括采血管、移液器吸头、储存血浆的容器、微量反应板、反应试管等)均要求无可测的内毒素或  $\beta$ -葡聚糖,而市售的真空采血管大多含有太多的内毒素及  $\beta$ -葡聚糖,在没有经过筛选之前不能供鲎试验采血用,玻璃容器可以在 250℃、1h 灭活内毒素及  $\beta$ -葡聚糖,而一次性塑料耗材仅少数几个厂商有无内毒素或无  $\beta$ -葡聚糖的保证,多数塑料耗材须经鲎试验的验证其无可测毒素及  $\beta$ -葡聚糖,并且对鲎试验没有干扰后方可使用。

## 7. 展望

内毒素血症在临床上也是一种常见症,而鲎试验仍然是检测内毒素的首选方法,其他方法如:血凝法为定性方法,SDS-PAGE 银染法灵敏度低,间接测定细胞因子的方法既复杂、耗时又昂贵,当然鲎试验也有其他的改进方法,如 ELISA 法、荧光探针法等,这些方法尚处于实验室阶段,没有商品化的产品支持,现在,内毒素血症的治疗也逐渐受到关注,特别是传统中医的清热解毒治疗方法对内毒素血症的治疗也起到了一定的疗效<sup>[38]</sup>,在此前提下,内毒素检测的需求会日益增长,在技术上解决上述的问题也并不难,毕竟已经有相对成熟的产品和方法可以借鉴。

# 细菌内毒素与血液透析综述

湛江安度斯生物有限公司 研究与发展部

**关键词:** 热原反应 血液透析 内毒素

血液透析是晚期肾衰竭(ESRD)患者赖以生存的基础,美国每年至少有 25 万患者接受长期的血液透析治疗,国内的患者数量也相当可观,长期的透析治疗也给患者带来一系列相关病症风险,热原反应是其中之一,本文首先回顾透析史上几例典型的热原事件,再对透析液的微生物标准进行总结,接下来简述透析器对内毒素(ET)的排除性能及透析液中内毒素的排除方法,最后介绍血液透析与细菌内毒素血症的关系及血液内毒素的清除方法。

## 1. 血液透析的热原反应

**1.1. 热原反应与透析液的内毒素** 在 1974 年 7 月 24 日至 8 月 19 日间,美国华盛顿特区的一个透析中心发生一起热原反应事件,70 个患者中有 23 人有寒战、发烧、低血压等 49 项症状,尽管血液透析系统中仅存在较低的革兰氏阴性细菌(GNB)污染,但透析液的内毒素污染水平却很高,由此导致患者的细菌内毒素血症和明显的症状,引起内毒素升高的原因是自来水水源的藻类水平升高<sup>[1]</sup>;疾病控制中心(CDC)通过对此次热原反应事件调查发现细菌的繁殖和内毒素水平及热原反应有着密切的联系,热原反应与细菌浓度直接相关,细菌数小于 10cfu/mL 则没有热原反应发生,同样内毒素小于 5EU/mL 也没有热原反应发生;医疗器械协会(AMMI)旋即制定了透析液的微生物标准,细菌数小于 2,000cfu/mL,内毒素小于 1ng/mL(EC-2 的 1ng = 5EU)但 CDC 的调查并没有考虑到人体长期处于低浓度内毒素环境中的影响。

血液滤过用电解质溶液的内毒素要求更加严格,在线血液滤过 4h 后,患者体温的升高与透析液的内毒素相关( $r = 0.48, p < 0.05$ ),内毒素的显著性水平为 1.0EU/ml,检测透析液中 1.

0EU/L 内毒素成为必须,三种鲎试剂(LAL)Endospey<sup>®</sup>(生化学)、ES-single(和光)和 QCL(惠特克)分别用于透析液的检测,透析液分别加入大肠杆菌(*E. coli*)内毒素、沙门氏菌内毒素,获得 50、100 和 150EU/L 浓度,蒸馏水中也加入上述内毒素,作线性回归分析,有效的回收率为 0.75~1.25 之间,Endospey<sup>®</sup> 没有显示出干扰,QCL 对 *E. coli* 内毒素无干扰,对沙门氏菌内毒素显示出增强,ES-single 对两种内毒素均缺乏敏感;稀释透析液会影响 QCL 和 ES-single 的回收率,而对 Endospey 没有影响,而且只有 Endospey<sup>®</sup> 可以检测 1.0EU/L 内毒素<sup>[2]</sup>,由此可见,检测透析液的内毒素需要更好相容性,更加灵敏的 LAL。

检测内毒素通常采用 LAL 方法,LAL 应用于药品检验一样,环境内毒素通常高 LAL 反应性而低致热性,在以下试验中,碳酸氢盐透析液内的内毒素、乙群痢疾杆菌内毒素和 *E. coli* 内毒素经鲎试验标准化再进行体外诱导全血产生 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的试验,10 名透析患者的血样中加入 *E. coli* 或乙群痢疾杆菌内毒素获得 0.1、1 和 10ng/mL 及透析液内毒素获得 1 和 10ng/mL 浓度,经孵育后,分离血浆分析细胞因子,透析液内毒素比 *E. coli* 或乙群痢疾杆菌内毒素诱导细胞因子的活性低 10-100 倍<sup>[3]</sup>,但作为安全控制 LAL 仍是最快捷、经济和方便的。

近来发现内毒素(ET)可能并不是透析液中唯一的重要热原质,蚕试剂(SLP)可以被肽聚糖(PG)、 $\beta$ -葡聚糖激活,SLP 与 LAL 的结合可以定量检测革兰氏阳性细菌(GPB)的污染,为透析液提供更加准确的微生物分析,胞壁酰二肽(MDP)用作 PG 的活性参考标准;9 个透析中心的 54 个透析液样品在无菌条下取自以下 4 个位点:1)反渗透单元,2)混合配液单元,3)多透析

液控制台,4)单人透析液控制台;细菌内毒素污染采用显色法 LAL(CLAL)、凝胶法 LAL、SLP 方法,人外周血单核细胞(PBMC)来自 10 名健康人和 10 名血液透析患者,分别用 ET、MDP、DT + MDP 或污染的透析液孵育 24h,ELISA 法检测培养液上清内的 IL-1Ra、IL-1 $\beta$  和 TNF-a,在 1、2 位点没有检测到 PG,中央供给和单独配制的透析液在透析器的透析液入口处检测到 PG,位点 3、4 的各 18 个样品分别有 7 个、3 个样本检测到 PG,平均值分别是  $4.1 \pm 6.1\text{ng/mL}$ ,  $3.3 \pm 4.6\text{ng/mL}$ ,有单独 PG 的污染、也有 PG 与 ET 同时存在的,PBMC 的 IL-1Ra、IL-1 $\beta$  和 TNF-a 的升高与 MDP 浓度正相关,MDP + ET 诱导 PBMC 产生细胞因子的活性是 ET 或 MDP 单独作用的 5~10 倍,ET 和 MDP 存在协同作用,PG 可能是透析液中更重要的热原质<sup>[4]</sup>。

**1.2 热原反应与抗凝剂** 透析液并不是唯一的热原来源,1978 年 11 月 23 日至 12 月 2 日,美国南部的一个透析中心的 16 名患者发生了 23 次热原反应,无死亡,有 10 人需要留院观察,患者的血培养为阴性,透析开始后的 1.1、1.6、3.6h 患者相继出现寒战(75%)、恶心呕吐(30%)、发烧(90%),病历记录显示上述症状仅发生于使用肝素抗凝剂的患者,分析透析使用的肝素盐溶液,细菌计数多达  $7.4 \times 10^5/\text{mL}$ ,内毒素更高达  $1,300\text{ng/mL}$ ,不动杆菌也被发现,而用于配制肝素盐溶液的瓶装肝素钠和未开启的袋装生理盐水则没有检测到内毒素,污染是在本透析中心发生的,肝素盐溶液的配制、使用被纠正后,接下来的 400 多次透析无一发生热原反应<sup>[5]</sup>。

**1.3. 热原反应与透析器的清洗** 在 1987 年 7 月 1 日至 13 日,伊利诺州的一个透析中心,16 名患者发生 18 例热原反应事件,该事件与透析器的复用有关,用于清洗透析器及稀释消毒剂的水中内毒素高过  $6\text{ng/mL}$ ,细菌数多于  $10^4\text{cfu/mL}$ ,停止使用复用透析器后,热原反应降低到事件之前的水平<sup>[6]</sup>1992 年 2 月,22 名门诊透析患者发生热原反应,经调查,透析器血液室的内毒素

高达  $120.8\text{EU/mL}$ ,平均  $52.8\text{EU/mL}$ ,透析用水也超过  $200\text{cfu/mL}$ ,而热原反应前的透析器无可测内毒素<sup>[7]</sup>。

**1.4. 热原反应与杀菌剂的使用** 1988 年 4 月 4 日至 20 日,11 名透析患者发生 9 例热原反应和 5 例细菌内毒素血症,所有患者均使用经复用的透析器,使用复用透析器所发生的热原反应明显高于新透的器(4.5%和 0%, $P = 0.03$ ),透析器使用 2.5% Renalin 杀菌剂清洗消毒,12 个储存的透析器内的 Renalin 浓度变化很大(0.9~4.2%),内毒素浓度则从 0~246ng/mL, Renalin 低于 1.0%的内毒素明显高于 Renalin 浓度较高的( $P = 0.01$ ),进一步分析发现, Renalin 在容器的上部浓度为 1.4%,低部为 3.5%,暗示热原反应的发生是因为杀菌剂没有混合均匀<sup>[8]</sup>。

**1.5 热原反应与透析机的清洗** 在一个透析中心内的 11 名患者发生 6 起 GNB 菌血症和 7 次热原反应,该事件与透析器的复用无关,而与透析器有关,5 号透析器的热原反应事件显著高于其他透析器,(8/13 和 221/1151, $P < 0.001$ ),与一个型号透析机也有关,该透析机显著高于其他透析机(10/13 和 581/1151, $P = 0.05$ ),该透析机优先使用 5 号透析器( $P < 0.01$ ),而且也没有按厂商的建议加热消毒,用于配制透析液和清洗透析器的纯水也没有达到 AAMI 的要求<sup>[9]</sup>。

## 2. 透析液的微生物评价标准

内毒素已经是非经肠道药品的一个重要控制指标,人体的内毒素阈剂量为  $5\text{EU/kg}\cdot\text{h}$ ,对于人均体重为 60kg 的中国人,内毒素阈剂量也可以用  $300\text{EU}/\text{人}\cdot\text{h}$  表示,对于连续透析 4h 的患者,内毒素的最大限量是  $1,200\text{EU}/\text{人}\cdot\text{h}$ ,注射用水(WFI)的内毒素限值为  $0.25\text{EU/mL}$ ,日本、欧洲对透析用水的内毒素要求已经与 WFI 一致(见表 1),日本透析协会的最终达成目标是  $0.1\text{EU/mL}$ ;欧洲药典(EP)指南中四种与透析相关品种项对内毒素作了如下规定:稀释浓缩用水( $0.25\text{IU/mL}$ ),血液透析液( $0.5\text{IU/mL}$ ),血液滤过用溶液( $0.25\text{IU/mL}$ ),腹膜透析液( $0.5\text{IU/}$



mL)。

表一 透析用水的微生物限度

组织	微生物限度 (cfu/mL)	内毒素 (EU/mL)
欧洲药典(1997年)	<100	<0.25
欧洲透析与移植护理协会(EDTNA)和 欧洲肾护理协会(ERCA)	<100	<0.25
日本透析治疗协会	<100	<0.25
AAMI RD62 (2001/5/27)	<200	<2
加拿大	—	<1

注:1IU=1EU

AAMI的透析液微生物标准已经成为最低标准,法国要求透析液微生物在200cfu/mL以下,而且无假单孢菌;血液滤过用电解质溶液的通用要求是无菌,内毒素的最低标准是0.25EU/mL,法国卫生部要求血液滤过用电解质溶液的内毒素小于0.05IU/mL;AMMI RD62的文件对纯水系统的设计、维护和监测作了详尽的阐述,用于配制透析液的纯水微生物限度为小于200cfu/mL,内毒素小于2IU/mL,但对于日常监控,微生物达到50cfu/mL、内毒素达到1IU/mL时就应该采取清洗行动,当纯水用于配制血液滤过液时,须采用注射用水的标准;EDTNA/ERCA不仅采用了EP的微生物限度检测法检测纯水的微生物,而且强调了检测的频率,检测的频率应基于历史数据,有长期的历史记录,而且微生物一直处于低水平,检测频率可以相对较低(如:一月一次),相反,历史记录很少或无,或者微生物水平处于边缘,检测频率应提高(如:一周一次),低营养琼脂被推荐用于微生物培养。

AMMI和CDC规定透析液和水至少每月进行一次培养,培养条件为37℃、48小时,该条件与30℃、72h低温长时间比较没有显著差别,但碳酸氢盐透析液及其浓缩液在胰酶解大豆琼脂比在标准琼脂上获得更好的细菌回收<sup>[10]</sup>。

### 3. 透析液及透析用水的微生物调查

透析液的内毒素及微生物的标准虽然建立,但一些调查显示许多透析中心的透析液、透

析用水质量并不乐观,现行的所有透析液微生物标准对酵母、真菌指标都没有限定,这也是将来需要进一步完善的。

日本对透析液的随机调查结果显示(见表2),10个透析设施中的透析液基本上符合AMMI的要求,但其中使用设施F的患者中有发热反应的案例<sup>[11]</sup>。

表2 日本的11个肾透析设施的透析液内毒素浓度调查(EU/L)

设施	内毒素浓度(M±s)	范围	样本数
设施A	167±110	94~606	17
设施B	3±2	2~4	8
设施C	13±15	2~48	8
设施D	61±29	7~97	8
设施E	206±114	43~367	8
设施F	2467±868	1540~5020	16
设施G	83±14	50~113	16
设施H	46±26	15~95	16
设施I	27±5	22~44	16
设施J	98±37	47~232	32

对美国中部51个透析中心的随机抽取纯水及透析液,在使用一个高灵敏度的培养基检测,仅35.3%的水样和19%的透析液样品符合AMMI的200或2,000cfu/mL标准,内毒素、细菌的污染与纯水系统的类型、没有关系,细菌、内毒素、真菌之间也没有关系,10%及64%的纯水样本中发现酵母和真菌,30%及70%的透析液样本中发现酵母和真菌,虽然这两种微生物的污染量比细小很多,但其污染率较高,应当给予关注<sup>[12]</sup>。

瑞典的45个透析单位的39个中采集透析液样本,使用CLAL检测内毒素,在周末透析中心关闭前的采取的样本通常内毒素更高,输送反渗透纯水的管道长度似乎影响污染的程度,59%的设施显示出低的内毒素平均水平(<25ng/L),而18%设施内毒素水平偏高(<100ng/L)<sup>[13]</sup>。

希腊所有透析中心的原水、纯水样品进行微生物分析和内毒素检测,全部170对水样采用CLAL分析,内毒素浓度从0~30EU/mL,30.6%的透析中心内毒素超过5EU/mL,内毒素污

染样品与其他样品比较,总异养菌、大肠杆菌、肠球菌、假单孢菌均显示出较高的水平,总异养菌、肠球菌显菌,而原水的内毒素与去离子系统有关<sup>[14]</sup>。

西德的 30 透析中心 17.8% 的水样不符合 AMMI 的标准,细菌和真菌超过 200 cfu/mL,11.7% 的透析液样品超过 2,000cfu/mL,透析液的内毒素量变化较大,透析用水是 0~95EU/mL,透析液是 0~487EU/mL,12.2% 的透析用水和 27.5% 的透析液超过 5EU/mL<sup>[15]</sup>。

#### 4. 内毒素污染与排除

内毒素是 GNB 细胞壁外膜成分,分子量大于  $10^4$ ,在  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  存在下内毒素可形成大于  $10^5$  的聚团,在表面活性剂作用下,内毒素聚团分散,内毒素也因此变化多端;透析通过超滤、弥散、对流作用清除血液内的毒素,分子量在 30,000 以下的中小分子都可以获得有效的清除,在透析的同时,透析液内的内毒素也有进入血液的风险;透析用水需要从原水中清除化学毒素和生物毒素,中国药典至今只认可蒸馏的方式生产注射用水,尽管在美国药典、EP 中认可反渗透(RO)的方式,透析用水多采用 RO 方式制备,原水经活性炭脱氯,再经 RO 装置有效的排除细菌及内毒素,理论上,无论内毒素还是细菌对于 RO 来说都可以达到充分的清除,但不幸的是还是有微生物逃逸进入 RO 膜的出水侧,微生物主要原因是微生物透过松动的 O 形环或其他密封件、膜的缺陷处生长的微生物因压力变化导致迁移或出水管的逆向污染等方式进入出水侧,在 RO 纯化水装置内发现的 GNB 包括假单孢菌、产黄杆菌、肠杆菌、产碱杆菌等,纯水系统的任何部分(包括膜、管道等)都可供细菌附着、生长(如绿脓杆菌可在总碳量为  $25\mu\text{g}/\text{mL}$  的水中生长),并在其表面形成生物垢膜(Biofilm),生物垢膜一旦形成很难消失,如果纯水系统缺乏清洗或清洗的频率不够,那么细菌与内毒素将会升高至危险的水平;另一方面,维护良好的 RO 系统,RO 纯水可以达到细菌数  $< 10^2\text{cfu}/\text{mL}$ ,内毒素  $< 0.25\text{IU}/\text{mL}$ ,经超滤可以达到  $< 10^{-1}$

cfu/mL,  $< 0.03\text{IU}/\text{mL}$ ,再增加一步超滤可实现  $< 10^{-6}\text{cfu}/\text{mL}$ ,  $< 0.03\text{IU}/\text{mL}$ <sup>[17]</sup>。

4.1 透析器对内毒素的通透性 评价透析器通透性的试验多采用超滤内毒素的方法,在透析液室施以高浓度内毒素溶液,再检测血液室的内毒素量,比浊法鲎试验检测 11 套透析器或血液滤过装置对内毒素的通透性,结果显示内毒跨膜向透析液室、或向血液室的扩散是对称的<sup>[18]</sup>;内毒素的检测通常采用放射性标记、LAL 或 PBMC, LAL 检测跨膜的内毒素似乎缺乏活性;内毒素跨膜后,刺激单核细胞产生细胞因子,而单核细胞会吸附在血液室透析膜上的,这加强了内毒素的作用,试验表明,在透析的 60 分钟内,人单核细胞对再生纤维素的自发性附着明显高于 AN69 膜( $28 \pm 2\%$  和  $11 \pm 2\%$ ),内毒素、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6(不包括 IL-4)和血小板活化因子(PAF)的刺激可以增强单核细胞对 AN69 膜的附着( $28 \sim 30\%$ ),相反单核细胞对再生纤维素膜的附着不能被上述因素增强,自发性和刺激性附着均可被 SDZ-63072——一种 PAF-Ra 所显著减弱,显示出 PAF 在附着的过程中起中介的作用,再生纤维素可直接刺激单核细胞合成 PAF,而内毒素和细胞因子刺激单核细胞合成 PAF,使单核细胞附着于 AN69 膜,从而减弱了膜的生物相容性<sup>[19]</sup>,增强了跨膜内毒素的作用。

内毒素可透过铜仿(CU)膜、聚酰胺(PAN) AN69 和聚砜膜(PS),试验中采用了脑膜炎奈瑟氏菌、假单孢菌和一个生长在透析液内细菌的内毒素,内毒素经纯化再进行<sup>3</sup>H 标记,透析 5 分钟内就发现<sup>3</sup>H 标记的内毒素跨膜透过,1h 后透过 0.1~1% 的<sup>3</sup>H 标记的内毒素,跨膜的内毒素分子量没有发生改变,<sup>3</sup>H 标记的内毒素在透析液中剩余 40~70%,少量的内毒素吸附在 CU 膜上,吸附量与透析液中内毒素浓度正相关,鲎试验不能检测出跨膜的 LPS,但跨膜 LPS 却表现出诱导 IL-1 的活性<sup>[19]</sup>;使用<sup>125</sup>I 标记的 E. coli M-LPS 与 10mg/ml 未标记的内毒素混合,测试 3 种高通透性合成膜, CU、AN69(PAN) 和 PS F-

60,在透析进行 15min 后即在血液室测到放射性,随时间延长,放射强度分别达到透析液初始放射强度的 6.7%(CU),10.3%(PAN)和 10.3%(PS),在血液室使用白蛋白溶液可以降低放射放射性(7.3%,PS 膜),透析 30min 后,使用 SDS-PAGE 分析血液室溶液的 LPS,银染和放射自显影都显示出几条低分子量带,可能是 LPS 碎片,透析液室的 LPS 诱导血浆 IL-1、TNF 的活性升高与循环透析接触 CU、PAN 和 PS 膜的正常人血中提取的单核细胞培养液的相当<sup>[21]</sup>;不论 LPS 是以完整的分子还是分子碎片形式透过透析膜,上述实验证实了 LPS 可以透过 CU、PAN 和 PS 膜,而且表现出生理活性。

*E. coli* LPS 80 EU/mL 不动杆菌滤液内毒素 80EU/mL 测试 4 种高效中空纤维透析器,聚酯聚合物合金膜(PEPA)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、PAN 和 PS 的排除内毒素性能(见表 3),LAL 检测内毒素滤过透析器的活性,结果显示疏水膜对内毒素分子的高吸附能力<sup>[21]</sup>;聚砜膜一直被认为可以有效截留内毒素及内毒素片段,血液透析用的小孔膜(PS400)和血液滤过用的大孔膜(PS600)分别进行内毒素通透性测试,内毒素溶液使用含有  $10^3 \sim 10^4$  cfu/mL 假单孢菌的透析液,经修饰的 CLAL 分析内毒素含量至少为 100pg/mL 的,透析前后透析液的内毒素量没有变化,而使用 PS600 则显示出血清鲎试验的活性,从  $1.3 \pm 1.5 \sim 3.8 \pm 2.0$  pg/mL ( $n = 15, P < 0.01$ ),5 个患者(33.3%)在透析后超过 5pg/mL,小孔透析膜对内毒素缺乏通透性,而大孔过滤膜则有内毒素透过,这可能归因于膜的反向扩散/过滤的作用<sup>[22]</sup>;但不同厂商的 HF 聚砜膜对内毒素的截留能力也不同,两种标准透析器 PN1913 和 Premus1350 用于测试,在透析液内内毒素逐步递增,检测血液室的内毒素浓度,相对于 F-60 对内毒素的低通透性,当透析液中内毒素浓度分别  $> 10$  ng/mL(PN1913)、 $> 0.5$  ng/mL(Premus1350),大约透析液的 0.5% 内毒素浓度在血液室被检测到<sup>[23]</sup>。

表 3:滤膜过内毒素量 EU/mL

内毒素种类	FEPA	PMMA	PAN	PS
<i>E. coli</i> LPS	未检测到	未检测到	$6.4 \pm 0.4$	$10.3 \pm 1.1$
不动杆菌滤液	未检测到	$3.7 \pm 0.4$	$16.5 \pm 1.5$	$20.7 \pm 1.4$

体外试验证明了内毒素存在跨膜的潜在风险,高效、高流量透析的应用增加了对内毒素的担心,当然并不是所有的透析膜都有可检测的内毒素通透性,即使是高效高流量透析膜,含内毒素、脂质 A 的生理盐水溶液用于测试 HF 透析膜 F-60, Fresenius AG) 的通透性,动态鲎试验用于检测内毒素,经过 10 小时的循环,没有发现内毒素或脂质 A 从膜的任何一侧透过透析膜<sup>[24]</sup>;透析膜(如: F4, E3, Acepal 1300, Altraflux, F40, Polyflux110, Filtral 12, F 60)对绿脓杆菌的 LPS, *E. coli* 的脂质 A 呈现也非通透性,同样透液培养的绿脓杆菌及合成的脂质 A 都没能通过透析膜,其中 PS 和 PAN 对内毒素有最高的吸附能力<sup>[25]</sup>;调查 3 个透析中心在 12 个月的热原反应与高效高流量透析器的关系,传统透析器、高效和高流量膜的总共 26,877 次透析,有 18 名患者发生 19 次热原反应(0.7%),其中传统膜 0.5%(7/13, 123),高效膜 0.9%(9/11, 345),高流量膜 1.2%(3/2, 409) ( $P = 0.21; \chi^2$  试验),三种透析膜没有显著的差别,调查期间,透析液微生物(平均 1,900cfu/mL)轻微超过 AMMI 标准,但水小于 200cfu/mL<sup>[26]</sup>。

4.2 超滤法排除内毒素 在透析液进入透析器之前进行超滤,可以显著改善透析液的质量,15 名患者使用未超滤的透析液透析 4 周,再使用经超滤的透析液,使用未超滤透析液的细菌菌落数在透析前为  $1.34 \times 10^5$  /mL,透析后为  $2.9 \times 10^3$  /mL,内毒素的变化很大,从低于 1EU/mL 到高过 10EU/mL,经聚酰胺中空纤维超滤的透析液细菌数小于 0.03/mL,内毒素小于 0.5EU/mL,使用超滤透析液的患者体内的 IL-1、TNF 的水平显著低于未超滤<sup>[27]</sup>;聚酰胺膜经长期使用仍能保持良好的性能状态,膜面积为  $2\text{m}^2$  的超滤器循环超滤被绿脓杆菌滤液污染(内毒素 5 ~ 48EU/mL) 碳酸氢盐透析液 240h (500mL/

min), 鲎试验和 PBMC 监测内毒素、脂质 A 和其他诱生细胞因子的细菌碎片, 超滤后的透析液鲎试验结果为  $< 0.005 \sim 0.034 \text{ EU/mL}$ , IL-1 的 PBMC 试验结果低于检测极限 ( $20 \text{ pg/mL}$ ), 而超滤前为  $27 \sim 63 \text{ pg/mL}$ , 聚酰胺超滤器是高效的排除透析液内毒素的系统, 单一滤器可使用  $240 \text{ h}$ <sup>[28]</sup>。

污染的碳酸氢钠浓缩液 ( $479,000 \text{ cfu/mL}$ 、 $39,800 \text{ pg/mL}$ ), 经中央配液装置超滤获得的透析液含  $9.2 \text{ cfu/mL}$  细菌和  $17.8 \text{ pg/mL}$  内毒素, 透析机的独立配液装置超滤获得的透析液含  $0.001 \text{ cfu/mL}$  细菌、 $0.19 \text{ pg/mL}$  内毒素, 使用超滤的透析液后, 在 303 名患者的 28,007 次透析中发生 9 例热原反应 ( $0.3\%$ ), 之前未超滤的热原反应率为  $0.7\%$  ( $P = 0.046$ )<sup>[29]</sup>; 聚砜中纤维用于过滤碳酸氢盐浓缩液, 超滤可以将细菌与内毒素从  $288,330 \text{ cfu/mL}$ 、 $42,804 \text{ pg/mL}$  降低到  $0.47 \text{ cfu/mL}$ 、 $109 \text{ pg/mL}$ , 单患者系统超滤的透析液其细菌和内毒素从  $15,889 \text{ cfu/mL}$ 、 $1,746 \text{ pg/mL}$  降低到  $0.003 \text{ cfu/mL}$ 、 $0.109 \text{ pg/mL}$ <sup>[30]</sup>。

PS 中空纤维超滤器 (ETF609, NISSHO Co) 用绿脓杆菌 PA103 的滤液测试其对内毒素的排除性能, PBMC 检测透析液 IL-1 $\beta$  的诱导活性, LAL 检测内毒素, 超滤前分别是  $5,035 \pm 394 \text{ pg/mL}$ 、 $4,167 \pm 1,079 \text{ pg/mL}$ , 超滤后没检测到 IL-1 $\beta$  的诱导活性、内毒素  $12 \pm 2 \text{ pg/mL}$ <sup>[32]</sup>。

**4.3 内毒素污染的预防措施** 研究发现, 水系统的微生物限度经常超过 EP 的限度, 原水  $20.0\%$  ( $n = 25$ ), 离子交换后  $66.7\%$  ( $n = 12$ ), 反渗透后  $33.3\%$  ( $n = 18$ ), 内毒素量分别是原水  $0.56 \sim 9.10 \text{ EU/mL}$ , 离子交换后  $0.13 \sim > 9.49 \text{ EU/mL}$ , UV 杀菌步骤对保持水质还是有一定帮助, 反渗透后  $< 0.03 \text{ EU/mL}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  的消除需要离子交换与反渗透的结合, 在 3 个处理厂的离子交换水中发现汞污染, 可能归因于二次污染, 铝、铜、锌离子也被发现, 可能归与水所触的材料引起的<sup>[33]</sup>。

生物垢膜是透析系统中污染的一个主要来源, 通过一个泵连续向血液透析系统供给 GNB、

GPB 和内毒素来建立生物垢膜, 试验确定, 1) 形成生物垢膜的必须细菌数为  $1,000 \text{ cfu/mL}$ , 这个细菌数对于 AMMI 和加拿大标准是许可的, 2) 非内毒素细菌 (葡萄球菌) 与内毒素同时存在时, 生物垢膜将内毒素转化为微囊结构, 滤器不易除去内毒素, 3) 消毒剂 (如: 次氯酸钠、甲醛、过氧化氢) 对生物垢膜的效果比对静态微生物的要低<sup>[34]</sup>; 生物垢膜以固定在有机聚合物基底表面的微生物构成, 几个型号的透析系统管道被调查, 扫描电子显微镜检查  $2 \text{ mm}^2$  的管道内表面证实管道覆盖有生物垢膜, 垢膜组合包括细菌、藻类、多种沉积物及多糖复合物; 将不同长度、内径的管道浸入注射用水超声清洗  $1 \text{ h}$  分离生物垢膜,  $37^\circ\text{C}$  培养  $48 \text{ h}$ , 有活菌被检测到, 透析机内的水管路、浓缩透析液管路和透析液管路的生物垢膜均被分析, 管道内总细菌数有  $10^3 \sim 10^6/\text{cm}^2$ , 内毒素水平从  $1 \sim 12 \text{ EU/cm}^2$ , 化学需氧量 (COD) 从  $53$  至  $234 \text{ mg/cm}^2$ ; 因此, 清洗的目标是清除、中和生物垢膜<sup>[35]</sup>; 次氯酸钠、甲醛、Di-alox ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CHOOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  混合物) 通常用于清洁透析管路, 强酸电解质的清洗效果似乎更好,  $200 \text{ ppm}$  盐酸, 交替使用  $1\%$  醋酸清洗透析管路, 管路很快清洁, 在细菌被清除的同时, 内毒素也被灭活, 经过在 4 年多的使用没有其他的问题出现<sup>[36]</sup>。

对热原污染的忧虑的增加导致和在线透析/滤过系统的开发, 被测试系统装备有二级聚砜过滤系统, 污染 Ecoli O:26B:6 ( $3 \times 10^9 \text{ cfu/mL}$ ) 的碳酸氢盐浓缩液用于测试系统的性能 ( $n = 6$ ),  $3 \text{ h}$  的测试期间, 输入的透析液细菌数维持在  $10^6 \text{ cfu/mL}$  以上, 内毒素在  $30 \sim 300 \text{ ng/mL}$ , 相应的在第一级滤器的输入端检测到至少  $5.4 \times 10^9 \text{ cfu/mL}$ ,  $30,000 \text{ ng/mL}$ , 而所有过滤后输出的透析液则没有细菌生长, 内毒素低于  $0.003 \text{ ng/mL}$ ; 装备一级过滤系统的装置在经过 18 个月的临床试用后, 没有滤膜失效发生, 透析流量维持在  $511 \pm 17 \text{ mL/min}$  ( $n = 70$ )<sup>[37]</sup>; 一种在线透析系统 ONLINEplus 不仅可以在线制备灌注液, 而且能够清洗体外血循环系统, 对于污染内毒素、其

他热原质的不纯净透析液也能够使其安全,用污染的透析液测试该系统,透析液含有  $7.5 \times 10^4 \pm 10^5$  cfu/mL 的细菌,比浊法检测为  $14.1 \pm 7.7$  IU/mL、显色法检测为  $9.256 \pm 3,000$  IU/mL 的内毒素,细胞因子诱导活性为  $20,827 \pm 3,082$  pg IL-IRa/MioWBC;在 5 周的测试期内,在灌注液中没有检测到污染物质,符合 EP 的无菌要求<sup>[38]</sup>;另外,对 6 个透析中心的 30 台在线血液滤过系统(HDF)使用的二级超滤系统进行为期 6 个月的评价,微生物安全性评价(菌落数、内毒素、细胞因子诱导活性)在每月最后一次使用后进行,在评价期间没有热原反应事件发生,透析液细菌及内毒素分别为  $< 1 \sim 895$  cfu/mL、 $0.0028 \sim 4.6822$  IU/mL,与  $0.25$  IU/mL 的限值比较,置换液仅为  $0.0014 \sim 0.0281$  IU/mL<sup>[39]</sup>,在线析系统提高了透析的安全性。

### 5. 细菌内毒素血症与血液透析

虽然透析产生的热原反应在近 10 年来已经很少发生,但透析过程中的一些症状似乎与内毒素有关,血液透析、血液过滤、肾病保守治疗患者及其他不同程度的肾衰竭患者和健康人对照组的血清内毒素用 CLAL 检测,结果分别为  $40 \pm 4.7$  ng/L、 $19 \pm 7.5$  ng/L、 $17 \pm 2.5$  ng/L、 $7 \pm 0.6$  ng/L,血液透析患者与健康人对照组的内毒素有显著差异( $P < 0.001$ )<sup>[40]</sup>;上述试验显示出细菌内毒素血症与透析相关,接下来的试验显示血液透析患者很少有细菌内毒素血症,使用两种鲎试验——传统的显色法鲎试验(CCLT)和内毒素专一鲎试验(EST)检测 87 名血液透析患者的血清内毒素,所有使用再生纤维透析器的患者均表现出 CCLT 增强,EST 却没有显著的增强,使用 EST 检测全部 87 名患者,仅 6 名是细菌内毒素血症,细菌内毒素血症患者患肝硬化、

感染或更加严重的疾病,透析前或透析过程中一些患者的普通发热也没有显示出高内毒素水平;由于纤维透析器存在 LAL-RM,用 EST 检测透析患者的血液内毒素更加实用<sup>[41]</sup>;因此,在检测透析患者的血液内毒素时,透析器的材质和鲎试验的专一性必须加以考虑。

另一方面血液透析对内毒素血症的治疗却表现出良好的前景,15 名脓毒血症休克患者(A 组)血液透析使用固定化多粘菌素 B 纤维(PMX-F),另外 10 名同样疾病的患者(B 组)接受传统的透析治疗,20 名非脓毒血症休克患者(C 组)使用 PMX-F,另外 20 名健康人对照(D 组),放免法检测血浆内皮素,Endospeccy<sup>®</sup> 检测内毒素,结果 A 组的存活率(67%)高于 B 组(30%),A 组在 PMX-F 治疗后内毒素显著下降(治疗前  $36.4 \pm 8.2$  pg/mL,治疗后  $10.6 \pm 3.8$  pg/mL,  $P < 0.01$ );治疗前 A 组( $58.6 \pm 9.8$  pg/mL)、B 组( $56.8 \pm 7.8$  pg/mL)的内皮素显著高于 C 组( $P < 0.001$ )、D 组( $P < 0.001$ )C 组( $11.2 \pm 3.2$  pg/mL)显著高于 D 组( $2.6 \pm 0.6$  pg/mL,  $P < 0.01$ );透析后 C 组( $10.9 \pm 3.0$  pg/mL)没有显著变化,A 组( $11.4 \pm 3.6$  pg/mL)显著降低( $P < 0.01$ ),B 组没有改变,内皮素可能与脓毒血症休克有关,而 PMX-F 可以有效的降低内毒素和内皮素<sup>[41]</sup>;一种新的内毒素吸附体材料,聚环乙亚胺(PEI)固定化于大孔纤维质珠上,体外测试其对内毒素的移除能力,多粘菌素 B 也被固定在同样的载体上用于试验对照,测试溶液含有  $100$  ng/mL E. coli 055: B5 内毒素,CLAL 显示 PEI 与多粘菌素 B 一样可以完全从血浆或水中的移除内毒素,而 PEI 比多粘菌素 B 具有更好的生物相容性,为细菌内毒素血症的治疗提供了新的可能<sup>[43]</sup>。

# 一种新型的人血液细菌内毒素检测试剂盒

湛江安度斯生物有限公司 冯聚锦

鲎试验法(又称 LAL 法或 TAL 法)是目前主要采用的检测血液细菌内毒素的最好方法。应用鲎试验法检测血液内毒素的方法有很多种,如按使用的试剂分类,有动态比浊法、动态比色法、终点比色法等;按样品处理的方式分类,主要有稀释加热法、氯仿提取法、高氯酸法等。采用不同的方法,检测的特异性、准确性,灵敏度以及简便程度等方面有较大差异。

湛江安度斯生物有限公司研究开发了一种新型的拥有自主专利技术的人血液细菌内毒素检测试剂盒。这种新型的试剂盒与国外同类试剂盒比较,具有明显的技术先进性,其主要技术特点如下:

## 一、特异性

鲎试验法所使用的反应试剂是鲎试剂(LAL 或 TAL)。普通鲎试剂含有一 G 因子反应旁路,使某些非内毒素物质也能与鲎试剂反应。研究已证明,人血液中的某些成分或受到  $\beta$ -葡聚糖污染的血液能激活鲎试剂的 G 因子旁路。因此,如果使用普通鲎试剂作血液内毒素检测试剂,其结果是非特异性的。新型血液内毒素检测试剂盒使用封闭 G 因子旁路的特异性鲎试剂作为检测试剂,只专一与细菌内毒素反应,使检测具有非常强的特异性。

## 二、准确性

要准确地检测出血液的内毒素含量,最大障碍就是如何消除血液的复杂成分对检测的干扰。为此,研究人员建立多种样品预处理的方法。新型试剂盒采用经改良的稀释加热法处理

样品:使用特殊制备的血液稀释剂稀释样品,再经 75℃ 水浴 10 分钟加热,即可以使样品对检测的干扰被彻底消除,且对样品自身所含的内毒素无任何破坏。实验证明,即使加入微量至 0.002Eu/ml(约 2pg/ml)的标准内毒素到未处理的血液样品中去,经处理后检测,加入的标准内毒素仍然能够 100% 回收。

目前报道的血液内毒素检查方法,都是先用标准内毒素建立标准曲线,再利用标准曲线去测量样品的内毒素含量。这种方法的缺陷在于建立标准曲线的反应条件与实际检测样品的反应条件不一致。这种反应体系的差异必然会导致检测结果准确性的偏差。新型检测试剂盒采用独一无二的系统偏差模型法专利技术建立标准曲线,使所有反应处于同一反应体系内进行,使得检测结果更加精确可靠。

## 三、灵敏度

据文献报道,正常人血浆的内毒素水平在 3pg/ml 左右。如果按标准内毒素的生物效价折算,3pg/ml 约相当于 0.03Eu/ml。为了消除血浆样品对检测的干扰,血浆一般都需要稀释 10 倍作检测。这样如果要检测出血浆中 3pg/ml(0.03Eu/ml)的内毒素水平,检测的灵敏度(即标准曲线的最低内毒素浓度)至少要达到 0.003Eu/ml。

在动态比浊法或动态比色法定量测定上,要提高检测的灵敏度,通常是靠使用更高灵敏度的鲎试剂或延长反应时间来实现。但仅靠鲎试剂本身的灵敏度来提高检测灵敏度的作用有

限;延长反应时间会使检测精确度下降且影响检测效率。新型检测试剂盒使用特殊的生物效应放大技术,大大提高了检测的灵敏度及精确度,标准曲线相关系数 $|r| > 0.999$ ,能够在 50

分钟内定量地检测到血浆中低至 0.002EU/ml 浓度的细菌内毒素。使用新型试剂盒作血液内毒素检测,正常人血浆的内毒素水平小于 3pg/ml ( $< 0.03\text{EU/ml}$ )。

图 1:新型血液检测盒的动力学反应曲线

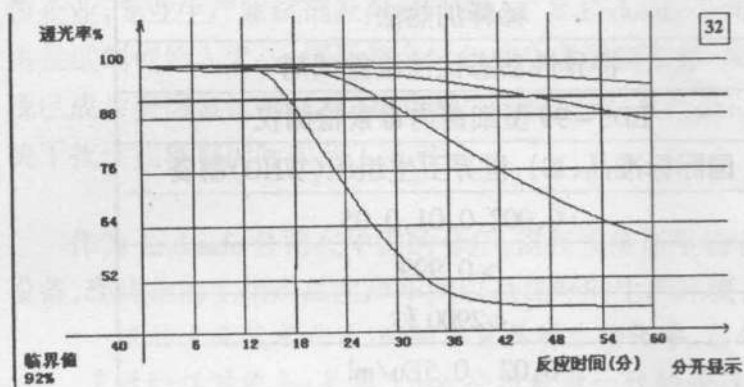
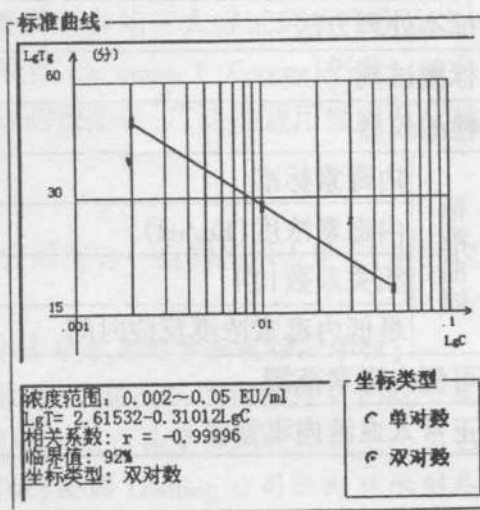


图 2:新型血液检测盒的标准曲线



#### 四、简便实用性

作为临床检测的一种方法,除要求精确、灵敏及特异性外,还要求简便实用,效率高。与文献报道的各种血液内毒素检测方法比较,新型试剂盒在简便实用方面同样有明显的优势。

##### 1. 样品采集及处理

在各种的血液内毒素检测方法中,最繁琐耗时的实验操作几乎都花在样品的采集及处理上。相比之下,新型试剂盒在样品采集及处理上却简便得多,只需要如下四个步骤即可完成:

静脉采血 (1.0ml) → 分离血浆 (1500rpm/5 分钟) → 样品稀释 (1:10 稀释) → 水浴加热 (75℃/10 分钟) → 内毒素检测

##### 2. 标准曲线

在定量分析中,一般都要求实验者在自己的实验室建立标准曲线。标准曲线相当于一把尺子,准确与否直接关系到检测结果的精确性。

在血液内毒素检测的实验中,标准曲线制作得是否精确与实验操作水平有很大关系,需要较多时间的培训与实践。

新型试剂盒不要求用户自己制作标准曲线,而是根据试剂盒的批号直接提供相应的标准曲线给用户,同时给用户若干支系统验证管。用户使用该系统验证管可以很容易地验证在自己的实验室是否适合使用试剂盒配置的标准曲线。这样既节省了用户大量的时间及试剂费用,又保证了检测的精确性。系统验证管还可以作为检测系统的定期校验手段。

##### 3. 试剂盒配置

从方便使用的角度考虑,新型试剂盒配备了血液内毒素检测所需的全部消耗性器具,从采血瓶、样品稀释瓶甚至反应试管等等一应俱全。采血瓶及样品稀释瓶中已配制有抗凝剂及稀释剂,用户只需按照使用说明书进行“傻瓜型”操作即可,十分方便!

五、新型试剂盒技术特性一览表

项 目		技 术 特 性
检测标准		人血浆
标本检测浓度		1:10 稀释
稀释剂		血浆专用稀释剂
标本处理方法		稀释加热法
标测试剂		特异性动态比浊法鲎试剂
检测仪器		EDS-99 型细菌内毒素检测仪
标准曲线	内毒素标准	国际标准品 (IS), 世界卫生组织 (WHO) 制备
	内毒素浓度 (Eu/ml)	0.002, 0.01, 0.05
	相关系数  r	> 0.999
	最低内毒素浓度反应时间	< 2900 秒
可测内毒素范围		0.02 ~ 0.5Eu/ml
正常人血液内毒素值		< 0.03Eu/ml

小资料

细菌内毒素检测试剂盒技术特性

项 目	检 测 盒 种 类		
	临床人血液	冻干人血浆 医药工业人血浆	人血清白蛋白
样品	血浆	血浆	血浆
标本检测浓度	1:10 稀释	1:10 稀释	2%
稀释剂	专用	专用	专用
标品处理方法	加热法	加热法	无须特殊处理
鲎试剂	动态浊度法鲎试剂	抑制 G 因子旁路的动态浊度法鲎试剂	抑制 G 因子旁路的动态浊度法鲎试剂
细菌内毒素定量检测仪	EDS-99 型	EDS-99 型	EDS-99 型
标准曲线	内毒素标准	国际标准内毒素	国际标准内毒素
	内毒素浓度 (Eu/ml)	0.002, 0.01, 0.05	0.01, 0.05, 0.25
	相关系数  r	> 0.999	> 0.998
	最低内毒素浓度反应时间	< 2900 秒	< 3200 秒
可测内毒素范围	0.02 ~ 0.5	0.1 ~ 2.5	0.1 ~ 5.0
正常人血液内毒素值	< 0.03Eu/ml	—	—



## 湛江安度斯生物有限公司简介

湛江安度斯生物有限公司是由美国著名的鲎试剂企业 C R Endosafe 公司在华投资建立的高科技企业,专业生产鲎试剂及配套产品。C R Endosafe 公司是美国著名的三大鲎试剂生产企业之一,由鲎试剂创始人之一、国际知名的权威学者詹姆斯弗·库珀博士(Dr. James F·Cooper)创建。该公司现已成为美国鲎试剂(LAL)市场最大的供应商,其产品以良好的稳定性,广泛的适用性以及优越的抗干扰性能享誉国际医药工业界。

作为 Endosafe 公司在中国的分厂,湛江安度斯生物有限公司拥有一流的技术人才,先进的仪器设备,现代化的生物产品生产车间以及良好的生产环境:

·一流的专业人才:65%职员具有生物化学、药学、冷冻等专业的学士或硕士学位;

·先进的仪器设备:美国 Vivtis 公司最新一代的冷冻干燥机,控制产品残余水份 < 1% (中国标准 5%),确保试剂在三年有效期内非常稳定;日本 Wako 公司的细菌内毒素检测仪控制生产工艺和辅助标定试剂,确保每一批产品质量的均一性及标定的准确性;美国 Lovning 公司的超纯水制备系统,使生产的无热原超纯水的水质纯度(电阻率) > 10M $\Omega$  - cm,内毒素含量 < 0.001Eu/ml;美国 Cozzoli 公司安瓿自动分装、充氮拉丝封口系统,取代落后的安瓿熔封工艺,确保分装的精确度(<  $\pm$  1%)及封口的严密性。

·现代化的生物车间及良好的生产环境:500M<sup>2</sup> 洁净度 10 万 ~ 100 级的生物车间,确保试剂的无菌性。

多年以来,湛江安度斯公司为促进中国鲎试剂的应用与发展作出了巨大的努力和贡献:

·中国药典细菌内毒素检查法所增添的内容,如干扰试验的应用,旋涡混合器的使用、定量检测技术的应用等,均是本公司积极倡议的结果;

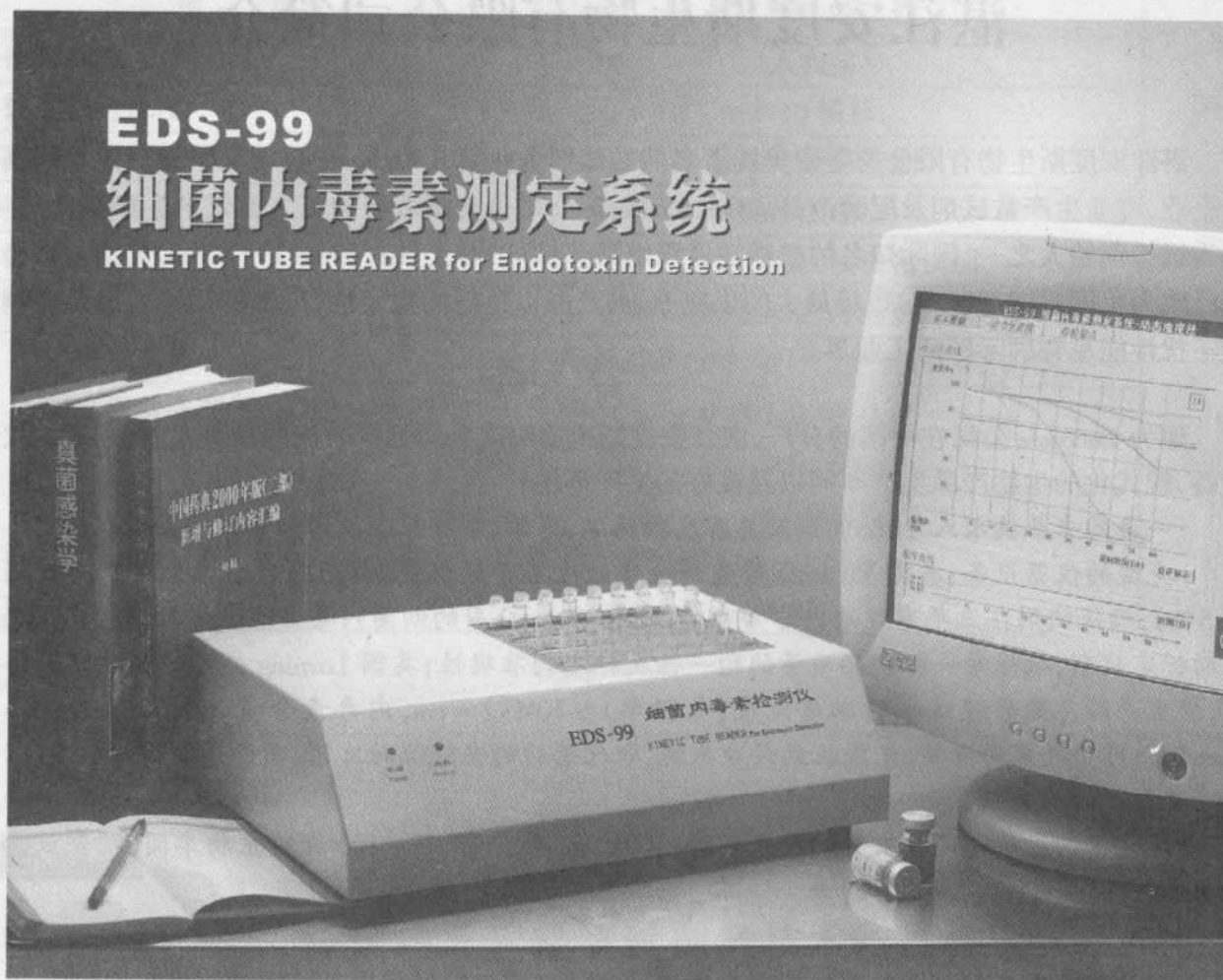
·中国第一批鲎试剂的国家参考品是由我公司于 94 年制备生产;现用的第二批参考品在中检所组织的公开招标之下,我公司又是一举夺标,于 98 年成功地制备出产;

·现用的内毒素国家标准品 Lot98 - 1(9000Eu 效价)也是在本公司分装生产;

·1995 年世界卫生组织(WHO)邀请全球 13 个国家 26 名专家参与第二批内毒素国际标准品的协作标定研究,本公司的冯聚锦高级工程师荣幸受邀,并受到 WHO 的表彰,中国同时被邀请参与研究的还有中检所周海钧所长、夏振民研究员;

·应美国药典公约组织(USPC)、美国食品药品监督管理局(FDA)以及 C R Endosafe 公司的邀请,国家药典会、中检所有关人员一行四人由本公司冯聚锦总经理陪同于 98 年 1 月 16 ~ 27 日,对美国进行了为期 10 天的访问考察。此行对我国的内毒素检查法与国际接轨有很大的促进作用。

湛江安度斯公司严格实施 GMP 及 ISO9002 标准管理,采用 Endosafe 公司的先进工艺技术生产高品质的中国鲎试剂(TAL),产品面向中国及全球市场。本公司将一如既往地全力为用户提供全方位的技术支持和尽善尽美的售后服务。



## EDS-99

# 细菌内毒素测定系统

KINETIC TUBE READER for Endotoxin Detection

### 特点

- 世界上第一台“三法集一”的细菌内毒素测定仪，适用于动态浊度定量法、动态显色定量法以及凝胶限量法细菌内毒素检查。
- 作动态浊度定量法测定的同时可获得凝胶限量法结果；作凝胶法检查时可观察动态反应曲线。
- 更灵敏、更准确、更快速，30~40分钟可完成反应，检查范围达0.001~100Eu/ml。
- 强大的软件功能，全自动智能式数据处理，“傻瓜”型操作设计，安装简便，易学易会。



**你只要把试管插入，其它的由我来做！**

### 用途

- 人用及兽用注射药品、生物制品及医疗器械的细菌内毒素(热原)检查。
- 医药生产过程细菌内毒素水平的监测与控制，杜绝终产品内毒素检查不合格造成的经济损失。
- 临床人体液(血液、尿液、腹水、脑脊液)细菌内毒素检测，对临床诊断及治疗具有指导意义。

# 湛江安度斯生物有限公司鲎试剂系列产品目录

凝胶法鲎试剂			内毒素检测用辅剂		
B-109	0.1ml/支	10支/盒	F-101	稀释剂I(阳离子调节剂)	4.0ml/支
B-115	0.5ml/支	10支/盒	F-102	稀释剂II(PH调节剂)	4.0ml/支
B-116	1.2ml/支	8支/盒	F-103	抗增液(G因子抑制剂)	0.6ml/支
B-117A	2.2ml/支	8支/盒	内毒素指示剂(干热验证)		
B-117B	2.2ml/瓶	10瓶/盒	F-104A	2,000Eu/支	10支/盒
B-104	5.2ml/瓶	10瓶/盒	F-104B	10,000Eu/支	10支/盒
特异性鲎试剂			临床内毒素检测系列		
B-309	0.1ml/支	10支/盒		人血液内毒素检测盒	10人份/盒
B-315	0.5ml/支	10支/盒		人体液内毒素检测盒	10人份/盒
动态浊度法鲎试剂			实验操作器械		
KT-116	1.2ml/支	8支/盒	S-101	精密可调移液器	200-1000 $\mu$ l
KT-117	2.2ml/瓶	10瓶/盒	S-103	精密可调移液器	50-250 $\mu$ l
动态显色法鲎试剂			S-111	无热原吸头	1000 $\mu$ l
KC-117	2.2ml/瓶	10瓶/盒	S-113	无热原吸头	250 $\mu$ l
KC-118	3.2ml/瓶	10瓶/盒	S-301	无热原空安瓿	5ml
内毒素工作标准品			S-302	无热原空安瓿	2ml
E-103	1.0Eu/支	10支/盒	S-303	无热原空瓶	10ml
E-102A	10Eu/支	10支/盒	S-501	无热原玻璃毛细管	0.1ml
E-102B	50Eu/瓶	10瓶/盒	S-502	无热原玻璃毛细管	0.2ml
E-101	液体内毒素	1.0ml/支	S-202	旋涡混合器	XW-80A型
内毒素检查用水			S-401	试管浮板	10孔
W-106	2.0ml/支	10支/盒	S-601	干式恒温反应仪	32孔
W-105	5.0ml/支	10支/盒	动力学定量检测系统		
W-104	50ml/瓶		K-002	EDS99内毒素检测仪	32孔
W-103	100ml/瓶				

销售电话:0759-3380671(直线)

0759-3391071、3391072、3380672 转 8989、8899

开户行:中国银行湛江分行霞海支行

帐号:825201410800

## EDS99 细菌内毒素测定系统

EDS99 细菌内毒素测定系统是由湛江安度斯生物有限公司与北京金山川科技发展有限公司联合研制开发的新一代内毒素定量测定系统,是融合现代光电技术、计算机技术及生物技术的产物。该系统已于 2000 年通过了广东省科委组织的科技成果鉴定,并获得国家重点新产品证书和湛江市科技成果进步奖。

EDS99 实现了“一机三法”,即同一台仪器可用于内毒素的动态比色、动态比浊和凝胶法测定,而且在做动态比浊测定的同时还可以得到凝胶法测定的结果;可直接测定的内毒素范围为 100 ~ 0.001EU/ml,检测极限达 0.001EU/ml,比传统凝胶法至少灵敏十倍,检测时间可缩短 20 ~ 30 分钟。测试比较表明,EDS99 的各项技术性能已达到或超过国内外同类仪器的水平,其比色法测定性能已达到美国 Bio-Tek 的 Elx-808 测定仪的性能,比浊测定的性能已超过日本的 Toxinometer ET-201 测定仪。经广东省医疗器械产品质量监督检验中心检测,全部性能指标均达到设计要求,并符合中国药典 2000 年版对细菌内毒素定量检查的法规要求。

EDS99 细菌内毒素测定系统已由湛江正杰科学仪器有限公司(湛江安度斯公司与北京金山川公司合资建立)正式批量生产并投放市场,经过中国药品生物制品检定所等单位的使用表明:该系统设计合理,操作方便,具有定量、快速、灵敏、准确以及范围广泛等特点。

湛江安度斯公司为 EDS99 内毒素测定系统提供质量稳定、性能优越的鲎试剂支持,同时对细菌内毒素定量检查法的建立提供技术咨询和服务。

规格	检测范围	灵敏度	检测时间	备注
100-1	100-10000 EU/ml	100 EU/ml	10-20 min	动态比色法
100-2	100-10000 EU/ml	100 EU/ml	10-20 min	动态比浊法
100-3	100-10000 EU/ml	100 EU/ml	10-20 min	凝胶法
100-4	100-10000 EU/ml	100 EU/ml	10-20 min	动态比色法
100-5	100-10000 EU/ml	100 EU/ml	10-20 min	动态比浊法
100-6	100-10000 EU/ml	100 EU/ml	10-20 min	凝胶法
100-7	100-10000 EU/ml	100 EU/ml	10-20 min	动态比色法
100-8	100-10000 EU/ml	100 EU/ml	10-20 min	动态比浊法
100-9	100-10000 EU/ml	100 EU/ml	10-20 min	凝胶法

湛江安度斯生物有限公司

《鲎试剂应用与进展》编辑组

地址:湛江市人民大道中 38 号 邮 编:524022 电话:(0759) 3391071、3391072 转

网址: <http://www.zacb.com> 电子信箱: Email: ZACB@pub.zhanjiang.gd.cn