

细菌内毒素检查凝胶限度试验在医疗器械领域的具体应用

栾庆玲 刘婧莹 张文世 隋馨 孙长春
吉林省医疗器械检验研究院 吉林 长春 130000

【摘要】：目的：探究细菌内毒素检查凝胶限度试验在医疗器械领域的具体应用。方法：选取输液器和不同规格的注射器为代表的医疗器械作为研究对象，通过列举具体检验计算过程，解析凝胶限度试验在医疗器械细菌内毒素限量检查中的具体应用。结果：输液器和注射器阳性对照管凝胶生成良好，不从管壁脱落；供试品阳性对照管凝胶生成良好，不从管壁脱落；阴性对照管无凝胶生成，供试品组管无凝胶生成。结论：细菌内毒素检查法中凝胶限度试验应用在医疗器械领域中可以有有效的对医疗器械进行细菌内毒素的限量检查，该方法能够有效的监测医疗器械以及生物材料中的以细菌内毒素为主的热原物质，降低临床热原反应的发生率。

【关键词】：细菌内毒素检查；医疗器械；输液器；注射器

Application of Bacterial Endotoxin Test Gel Limit Test in the Field of Medical Devices

Qingling Luan Jingying Liu Wenshi Zhang Xin Sui Changchun Sun
Jilin Medical Device Inspection and Research Institute Jilin Changchun 130000

Abstract: Objective: To explore the specific application of bacterial endotoxin test gel limit test in the field of medical devices. Methods: The medical devices represented by infusion sets and syringes of different specifications were selected as the research objects, and the specific application of gel limit test in the bacterial endotoxin limit test of medical devices was analyzed by listing the specific inspection and calculation process. Results: The positive control tubes of infusion sets and syringes produced good gel and did not fall off from the tube wall; The gel of the positive control tube of the test article is generated well and does not fall off from the tube wall; No gel was generated in the negative control tube, and no gel was generated in the test tube group. Conclusion: The application of the gel limit test in the bacterial endotoxin test can effectively limit the detection of bacterial endotoxins in medical devices. This method can effectively monitor pyrogen substances in medical devices and biological materials, which are mainly bacterial endotoxins, and reduce the incidence of clinical pyrogen reactions.

Keywords: Bacterial endotoxin examination; Medical instruments; Infusion set; Injector

细菌内毒素试验 (Bacterial Endotoxins Test, BET) 自 1968 年由美国学者 Bang 和 Levin 正式建立, 该法又称作鲎试验, 即 Limulus Test。细菌内毒素 (endotoxin) 是革兰氏阴性菌细胞壁外壁层上的一种特有结构, 它的分子结构是脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS), 它由脂质 A、核心寡聚糖、和 O-特异性多糖链组成。脂质 A 耐热, 是内毒素的毒性部分; 特异性多糖具有抗原性, 是革兰氏阴性菌的菌体抗原。而一些如注射器、输液器、静脉输液针、植入物、眼内透镜等医疗器械, 是在日常临床和手术过程中经常使用到的医疗器械, 更是在手术过程中与人体体内接触, 如这类器械所携带的热原物质细菌内毒素含量超标, 就容易导致患者感染, 使得病情加重。因此, 用细菌内毒素检查法检测医疗器械细菌内毒素限量合格与否则极其重要。

细菌内毒素检查法, 系利用鲎试剂来检测或量化由革兰氏阴性菌产生的细菌内毒素, 以判断供试品中细菌内毒素的限量是否符合规定的一种方法^[1]。其主要原理为: 通过利用微量内毒素激活、活化鲎试剂中的 C 因子以及 B 因子, 使得凝固酶原转化为凝固酶, 进而成为凝胶样的凝固蛋白。而鲎试剂 (Limulus/Tachypleus Amebocyte Lysate) 系鲎的血液变形细胞 (amebocytes) 溶解物制成的无菌冷冻干燥品。美洲鲎试剂缩写为 LAL, 东方鲎试剂 (国产鲎试剂) 缩写为 TAL。细菌内毒素检查法包括两种方法, 即凝胶法和光度测定法, 供试品检测时, 可使用其中任何一种方法进行

试验, 当测定结果有争议时, 除另有规定外, 以凝胶限度试验结果为准^[1]。所以, 本文主要以输液器和不同规格注射器为代表, 通过列举具体检验计算过程, 解析凝胶限度试验在医疗器械细菌内毒素限量检查中的具体应用。按药典规定, 设置供试品组、供试品阳性对照组、阳性对照组、阴性对照组, 通过凝胶管中凝胶形成情况, 来检查受试品细菌内毒素限量是否符合规定。现将具体应用报道如下。

1 资料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 主要仪器

净化工作台, 生产厂家, 苏州新区枫桥净化设备厂; 规格型号, YJ-1450S/DB;

电热鼓风干燥箱, 生产厂家, 上海一恒科学仪器有限公司; 规格型号, DHG--9145A;

高压灭菌器, 生产厂家, 德国 IRM; 规格型号, GW100;

漩涡混合器, 生产厂家, 上海医大仪器厂; 规格型号, XW-80A;

恒温箱, 生产厂家, 德国 IRM; 规格型号, IH250;

移液器, 生产厂家, Eppendorf; 规格型号, 100-1000 μ l;

移液器, 生产厂家, Eppendorf; 规格型号, 20-200 μ l。

1.1.2 主要试剂

鲎试剂：生产厂家，湛江安度斯生物有限公司；灵敏度，0.25EU/mL，规格，0.65mL；

细菌内毒素国家标准品：生产厂家，中国食品药品检定研究院；规格，9000EU/支；

细菌内毒素工作标准品：生产厂家，中国食品药品检定研究院；90EU/支；

细菌内毒素检查用水：生产厂家，湛江安度斯生物有限公司；规格，50mL/瓶。

1.1.3 其他用具

无热原凝集管（10mm×75mm）、烧杯、试管架、封口膜、计时器、酒精纱布、砂轮等。

1.2 方法

1.2.1 内毒素标准溶液的制备

取细菌内毒素工作标准品一支，轻弹瓶壁，使粉末落入瓶底，再用砂轮在瓶颈上部轻轻划痕，75%（V/V）乙醇棉球擦拭后启开，防止玻璃屑落入瓶内。将细菌内毒素工作标准品用细菌内毒素检查用水 1mL 溶解，用封口膜将瓶口封严，置漩涡混合器上混合 15 分钟，制得浓度为 90EU/mL 内毒素标准溶液。随后稀释，取 0.3mL 内毒素标准溶液加上 2.7mL 细菌内毒素检查用水，制得浓度为 9EU/mL 内毒素标准溶液；再取 0.3mL 内毒素标准溶液加上 2.4mL 细菌内毒素检查用水，制得浓度为 1EU/mL 内毒素标准溶液；再对倍稀释制成所需浓度的细菌内毒素标准溶液，如 2.0λ 的细菌内毒素标准溶液。每稀释一步，均需漩涡混合器上混合 30 秒。

如使用细菌内毒素国家标准品，按如上操作，加入 1mL 细菌内毒素检查用水复溶后得到浓度为 9000EU/mL 得内毒素标准溶液，同上法梯度稀释可得到 900EU/mL、90EU/mL、9EU/mL、1EU/mL 以及所需浓度的内毒素标准溶液。

1.2.2 鲎试剂的准备

在制备内毒素标准溶液的同时，取 0.65mL/支的鲎试剂 5 支轻弹瓶壁，使粉末落入瓶底，用砂轮在瓶颈上轻轻划痕，75%（V/V）乙醇棉球擦拭后启开备用，防止玻璃屑落入瓶内，每支加入 0.65mL LBET 水复溶后，使内溶物充分溶解，避免产生气泡。分别取 0.1mL 分配到 10 mm×75mm 凝集管中，共 28 管，置试管架上，每列 2 管，备用。当所用鲎试剂规格为 0.1mL/支时，仅需用 0.1mL 细菌内毒素检查用水复溶，备用即可。

1.2.3 供试液制备

（1）输液器浸提液制备方法：按无菌操作要求，取输液器 3 套，每套输液器内腔注入 10mL 细菌内毒素检查用水，反复振荡 5 次后两端密封，置 37°C 恒温箱中浸提 1h。取出后将供试液汇集至一无热原玻璃器皿中，备用。

（2）注射器浸提液制备方法：按无菌操作要求，取注射器至少 3 支，抽取细菌内毒素检查用水至总刻度容量，将芯杆拉回到外套开口处，液体来回振洗两次、封闭。37°C 恒温箱中浸提 1h。取出后将供试液汇集至一无热原烧杯中，备用。

1.2.4 方法学确认

（1）试验内毒素限值的确定

在进行试验之前，必须确定产品在试验条件下的试验内毒素限值。试验内毒素限值定义为某一产品浸提液中可能存在的内毒素最大允许浓度，它与产品内毒素限值相关^[2]。具体方法参见 YY/T 0618-2017 中附录 B 确定产品内毒素限值，本文中不做具体赘述。

一旦确定了产品内毒素限值，试验内毒素限值可按式

（1）计算：

$$\text{医疗器械试验内毒素限值 (EU/mL)} = \frac{KN}{V} \quad (1)$$

式中，K：每一器械内毒素允许量（产品内毒素限值）；N：供试器械数量；V：样品组合中的浸提液总量，单位为毫升（mL）^[2]。

（2）最大有效稀释倍数（MVD）的确定

产品有时可能干扰细菌内毒素试验（抑制/增强），通常采用内毒素检查用水或其他适宜稀释剂稀释产品浸提液的方法减轻干扰，因为稀释也会对可能存在的内毒素稀释，因此要有一个允许稀释限度。最大有效稀释倍数按式（2）计算：

$$\text{MVD} = \frac{\text{试验内毒素限值}}{\lambda} \quad (2)$$

式中，试验内毒素限值见式（1）；λ：经认定的鲎试剂标示灵敏度（凝胶法）。

（3）凝胶限度试验

按《中华人民共和国药典》2020 年版四部 1143 细菌内毒素检查法中凝胶限度试验中的“表 2 凝胶限度试验溶液的制备”^[1]进行供试品溶液 A、供试品阳性对照液 B、阳性对照液 C 和阴性对照液 D 的制备。使用稀释倍数为 MVD 并且已经排除干扰的供试品溶液来制备溶液 A 和 B。分别取 A、B、C、D 液各 0.1mL，加入到已复溶的鲎试剂平行管中，置 37°C 恒温箱中 1h，观察结果。

将试管从恒温器中轻轻取出，缓缓倒转 180°，若管内形成凝胶且凝胶不变形、不从管壁滑脱者为阳性；若未形成凝胶或形成的凝胶不坚实、变形并从管壁滑脱者为阴性。保温和拿取试管过程应避免受到振动，造成假阴性结果^[1]。

结果判断：若阴性对照溶液 D 的平行管均为阴性，供试品阳性对照溶液 B 的平行管均为阳性，阳性对照溶液 C 的平行管均为阳性，试验有效。若溶液 A 的两个平行管均为阴性，判定供试品符合规定。若溶液 A 的两个平行管均为阳性，判定供试品不符合规定。若溶液 A 的两个平行管中的一管为阳性，一管为阴性，需进行复试。复试时溶液 A 需做 4 支平行管，若所有平行管均为阴性，判定供试品符合规定，否则，判定供试品不符合规定^[1]。

1.2.5 细菌内毒素检验

（1）输液器细菌内毒素检验

输液器细菌内毒素限量每件不超过 20EU^[3]，每套输液器用 10mL 浸提，取 3 套输液器试验，输液器试验内毒素限值（EU/mL）= 2EU/mL，使用灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试剂进行检验，计算 MVD=8 倍。按本文中 1.2.4.3 凝

胶限度试验进行试验，试验液分组如下：

供试品溶液 A：8 倍供试品稀释液；

供试品阳性对照液 B：含 0.5EU/mL 标准内毒素的 8 倍供试品稀释液；

阳性对照液 C：浓度为 0.5EU/mL 的标准内毒素溶液；

阴性对照液 D：细菌内毒素检查用水。

(2) 注射器细菌内毒素检验

注射器细菌内毒素限量每支应不超过 20EU^[3-4]，使用灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试剂进行检验，1mL 注射器的试验内毒素限值 = 20EU/mL，MVD=80 倍；同法计算，2mL 注射器的试验内毒素限值为 10EU/mL，MVD 为 40 倍；5mL 注射器的试验内毒素限值为 4EU/mL，MVD 为 16 倍；10mL 注射器的试验内毒素限值为 2EU/mL，MVD 为 8 倍；20mL 注射器的试验内毒素限值为 1EU/mL，MVD 为 4 倍。数据计算完毕后，按本文中 1.2.4.3 凝胶限度试验进行试验。

另外，当使用的鲎试剂灵敏度不同，对应的最大有效稀释倍数亦不同，试验前仍需重新计算，如某供试品，限值为 0.5 EU/mL，使用灵敏度为 0.125 EU/mL 的鲎试剂进行检验，计算 MVD=4 倍。

2 结果

阴性对照溶液 D 的平行管均为阴性，输液器与不同规格注射器的各自供试品阳性对照溶液 B 的平行管均为阳性，阳性对照溶液 C 的平行管均为阳性，本次试验有效。输液器与注射器细菌内毒素检验结果见下表。

表 1 输液器与注射器细菌内毒素检验结果

分组	供试品溶液 A		供试品阳性对照 B		阳性对照 C		阴性对照 D	
	管 1	管 2	管 1	管 2	管 1	管 2	管 1	管 2
输液器	-	-	+	+	+	+	-	-
1mL 注射器	-	-	+	+				
2mL 注射器	-	-	+	+				
5mL 注射器	-	-	+	+				
10mL 注射器	-	-	+	+				
20mL 注射器	-	-	+	+				

参考文献：

- [1] 中华人民共和国药典：2020 年版·四部 / 国家药典委员会编。—北京：中国医药科技出版社，2020。5 ISBN978-7-5214-1599-5。
- [2] 孙令晓，王昕，朱丽丽，姜华，何红兵，吴旭君。中华人民共和国医药行业标准 YY/T0618-2017《医疗器械细菌内毒素试验方法常规监控与跳批检验》。—北京：中国标准出版社，2017.11155066•2-32516。
- [3] 由少华，朱雪涛，刘欣，黄经春，王昕，祝君梅，王科镭，郝树彬。中华人民共和国国家标准 GB/T14233.2-2005《医用输液，输血，注射器具检验方法第二部分：生物学试验方法》。—北京：中国标准出版社，2006.4
- [4] 高亦岑，夏欣瑞，李君，王海银，熊荣荣，田兴龙，丁彪，花松鹤。中华人民共和国国家标准 GB15810-2019《一次性使用无菌注射器》。—北京：中国标准出版社，2019.10155066•1-63458。

注：“-”，结果阴性；“+”，结果阳性。

3 讨论

众所周知，有很多医疗器械仪器设备或者器件针头等直接与人体甚至体内接触，尤其是在日常或手术过程中所用到的输液、输血、注射器具等医疗器械，如果未做无菌无热原处理就直接应用于人体手术，将会增加临床热原反应的发生率，威胁病患的生命健康。而细菌内毒素检查凝胶限度试验在实际应用的过程中，具有简单、便捷、快速、灵敏等优势，且已被中国药典收载，并对鲎试剂、内毒素标准品、试验程序以及判断标准等指标做出了明确的规定，相应的行业标准中，也对细菌内毒素检查法做了详细阐述，此方法目前广泛应用于医疗器械领域。但在细菌内毒素检查法中试验内毒素限值和最大有效稀释倍数会因选用的鲎试剂灵敏度不同，具体计算数据也会有所改变，导致相应的试验操作发生变化。细菌内毒素凝胶限度试验在具体应用中有一定的灵活性，这和医疗器械的整体性特点是分不开的，当某些医疗器械所用浸提原液的用量发生变化时，对应的试验内毒素限值和最大有效稀释倍数也会发生相应变化，具体的计算公式在中国药典和相应的国家行业标准中均有详细记载，以指导此项检验方法学习人员进行研究学习。

我们在日常细菌内毒素检验工作中，除了要对试验方法熟练掌握外，在试验操作过程中也要考虑到各种影响因素，比如试验中用到的相关器具需要除热原、所用的移液器、恒温箱需要计量校准，才能降低试验器具带来的误差或结果影响，同时所用器具需要满足对于内毒素无吸附作用。另外，如果试验人员操作的熟练程度不够，也会影响试验操作的正确性，因此，有必要对试验人员定期进行培训和实际操作训练，提升相关工作人员的操作熟练度，最大程度的降低误差。

综上所述，本文所列举输液器和注射器的具体检验计算过程，展示了凝胶限度试验在医疗器械细菌内毒素限量检查中的具体应用，同时也体现了细菌内毒素检查法中凝胶限度试验在医疗器械领域的应用中，可以有效的对医疗器械进行细菌内毒素的限量检查，该方法能够有效的监测医疗器械以及生物材料中的以细菌内毒素为主的热原物质，降低临床热原反应的发生率。