



鲎试剂 (LAL) PYROAGENT™ 和 PYROAGENT™ Plus

美国许可证编号1775。翻译版本请登录www.lonza.com获取

目录

章节	页码
1 既定用途	2
1 警告	3
1 检测说明	3
2 原理	4
2 所供试剂和储存条件	4
3 未提供的材料和设备	7
4 样品采集和制备	8
4 试剂制备	9
5 检测程序和解释	11
6 确认标签声明	12

章节	页码
7 测定未知溶液的内毒素	14
7 样品抑制	15
8 国际用户须知	18
8 参考资料	18

重要须知：请在检测前阅读本手册。

既定用途

本产品用于人用和动物用注射药物、生物制品及医疗器械的体外最终产物内毒素检测。本产品不可用于临床样品的内毒素检测，也不可用于辅助诊断人体疾病。鲎试剂 (LAL) 试验是一种用于检测革兰阴性细菌内毒素的定性试验。将所提供的LAL与LAL试剂检查用水复溶，然后与待测溶液等比例混合。孵育后，如含有内毒素，则发生凝胶反应；如无内毒素，则不发生凝胶反应。

药典概述了进行以下活动的必要程序：

1. 设定药品和医疗器械的内毒素限值
2. 验证LAL在最终产品内毒素检测中的作用
3. 制定常规检测方案¹⁰

本文所述程序均依照药典指导规则进行制定。

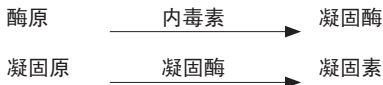
警告

仅用于体外诊断。PYROGENT™ 试验不可用于检测人的内毒素血症。按照药典中有关人用和动物用注射药物、生物制品和医疗器械的最终产品检测指导规则进行使用时，可采用USP家兔热原检测法取代LAL检测法¹⁰。

检测说明

Bang¹观察到，使用LAL检测内毒素，鲎的革兰氏阴性感染导致致命性血管内凝血。Levin和Bang^{2,3}之后证明，这种凝血反应是由于内毒素和一种可凝固蛋白质在鲎血液的循环变形细胞中相互作用导致的。开发出适合于鲎血液的抗凝剂后，Levin和Bang⁴用清洗过的变形细胞制备了一种溶解物，它是一种对内毒素极为敏感的指示剂。Solum^{5,6}和Young、Levin和Prendergast⁷纯化并表征了LAL的可凝固蛋白质，并证明了与内毒素的反应将是酶促反应。

原理



革兰氏阴性细菌内毒素催化了LAL中酶原的活化⁷。初始活化速率由内毒素的浓度决定。活化后的酶(凝固酶)水解了也存在于LAL中的凝血蛋白(凝固原)内的特定化合键。水解后，产生的凝固素自行联合，并形成凝胶状胶块。

所供试剂和储存条件

冻干的鲎试剂

[F245-06, F245-125, E209-06, E209-125, E209-25, E194-03, E194-06, E194-125] **贴黄色标签的试剂瓶**

一种用马蹄蟹(鲎)的循环变形细胞制备的标准化溶解物，用于检测USP参考标准内毒素的标示浓度(EU/ml)。

含有缓冲的单价和二价阳离子。在真空中将裂解物冻干和密封，用于与LAL试剂检查用水复溶。请仅在使用前一刻用水复溶。

冻干(非复溶)的LAL应在2-8°C的温度下冷藏储存。应注意避免使溶解物暴露于37°以上的温度中。长时间暴露于37°以上温度或遭受强光的溶解物可能会变黄和/或不可溶解。应将出现上述特征的溶解物丢弃。

复溶后的鲎试剂溶液可在2-8°C的温度下储存24小时。如需长时间储存, 可将复溶后的鲎试剂溶液储存于-10°C 或更低的温度下。仅进行一次冻结和解冻。储存期间, 应防止溶解物受到光照。应在复溶后的四周内使用。使用前, 按照下表与LAL试剂检查用水进行复溶:

PYROGENT™ LAL 试剂	检测次数/瓶	所需的LAL 试剂 检查用水
F245-06	16	1.8 ml
F245-125	16	1.8 ml
E209-06	50	5.2 ml
E209-125	50	5.2 ml
E209-25	50	5.2 ml
E194-03	50	5.2 ml
E194-06	50	5.2 ml
E194-125	50	5.2 ml

E. 大肠杆菌内毒素 055:B5，冻干(7360)贴红色标记的试剂瓶来自E大肠杆菌株055: B5的纯化内毒素冻干制剂。按照下面说明制备的每个试剂瓶可为用户提供对照标准内毒素(CSE)，已经使用当前的USP参考标准内毒素(RSE)和封闭批次的鲎试剂，按照本文所述程序确定了对照标准内毒素的效价。适当的RSE/CSE比率和由此产生的CSE效价在检验证明书(CoA)中提供。可登陆www.lonza.com/coa获取该检验证明书。

该CSE制剂具有确定的效价，如果实验室正在按照本插页中规定的程序使用指定批次的鲎试剂，则该CSE制剂可替代USP RSE用于质量控制的所有方面。

复溶前，将试剂瓶储存在2-8°C温度下。与5.0 ml LAL试剂检查用水复溶。如下例所示，用RSE/CSE比率计算效价(单位是EU/ml)：效价(EU/ml) = RSE/CSE比率(单位EU/ng)X __ ng/瓶 ÷ 5.0 ml/瓶。

将复溶后的试剂瓶在2-8°C温度下储存长达4周时间。仅根据需要的量，从该试剂瓶中制备1.0 EU/ml 稀释液。参阅“试剂制备”章节。稀释后的内毒素制剂的储存和使用时间不得超过1天。

警告：内容物致热。不可用于人体。

注：仅配备鲎试剂的试剂盒中不包括内毒素，但需使用内毒素。

未提供的材料和设备

1. LAL 试剂检查用水 (#W50-640或等效物)。LAL 试剂检查用水与细菌内毒素检测(BET)用水等效。
2. 移液管，1 ml、5 ml、10 ml 和100 微升，无内毒素。
3. 10 × 75 mm 玻璃反应管，无内毒素 (#N201、#N205或等效物)(见消毒程序的样品采集和制备)。
4. 13 × 100 mm 玻璃稀释管，无内毒素 (#N207或等效物)(见消毒程序的样品采集和制备)。
5. 氢氧化钠0.1N，或盐酸0.1N，溶于LAL试剂检查用水中，以便在必要时调节样本的pH值。
6. 内毒素标准品(与LAL匹配的对照标准内毒素)。
7. 加热块或非循环热水浴($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)。
8. 试管架。
9. 计时器。
10. 旋涡混合器。

样品采集和制备

必须注意避免发生微生物或内毒素污染。与样品或检测试剂接触的所有材料必须无内毒素。将干净的玻璃器皿和材料在250°C温度下加热30分钟，使其无内毒素。应适当注意，防止无热原材料受到后续的环境污染。

根据经验，大多数经过消毒、独立包装的塑料移液管和移液管吸头都是没有内毒素的。但在常规使用前，应对这些材料进行检测。

可能需要使用无内毒素的氢氧化钠和盐酸^{8,9}，将样品的pH值调节到6.0-8.0之间。务必测定等分样品的pH值，以免被pH电极污染。请勿调节无缓冲的溶液。

待测样品必须储存在所有细菌活动受到抑制或内毒素水平可能随时间逐渐增加的情况下。例如，将样品在2-8°C的温度下储存不超过24小时，并冷冻超过24小时。最终用户有责任验证容器和储存条件是否适合其样品。

若LAL溶解所用稀释剂的容器之前已经打开，或者该容器并非由龙沙提供，则必须对稀释剂进行单独检测，以确定其是否受到内毒素污染。

试剂制备

使用前，使试剂温度自然上升到室温。

1. 制备LAL。

注意：请仅在使用前一刻补水解冻，加水复溶。

- A. 在可检测16次的试剂瓶中添加1.8 ml LAL 试剂检查用水，或在可检测50次的试剂瓶中添加5.2 ml LAL试剂检查用水，复溶冻干溶解物。轻柔地充分搅拌至少30秒。请勿摇晃，否则溶解物会起泡沫。
- B. 复溶后的鲎试剂可在2-8℃温度下储存长达24小时，不会发生灵敏度损失。可将复溶后的鲎试剂分成更便于储存的量，并在低于-10℃的温度下储存长达四周时间。冷冻的液态鲎试剂应在使用前解冻。仅进行一次冻结和解冻。

2. 制备E. 大肠杆菌CSE。

注：不建议使用塑料管稀释内毒素。

- A. 用5.0 ml LAL试剂检查用水对内毒素瓶进行复溶。
- B. 漩涡混合内毒素瓶至少15分钟。

- C. 用LAL 试剂检查用水将内毒素浓度稀释为1.0 EU/ml。这通过将复溶后的内毒素稀释为1/X实现，其中X是CoA中规定的CSE效价(单位EU/ml)。使用上述X，通式为0.1 ml复溶后的内毒素用0.1 (X-1)ml 的LAL试剂检查用水稀释。

X的示例为 = 21 EU/ml:

用0.1 (21-1)稀释0.1 ml内毒素 = 2.0 ml LAL 试剂检查用水。

旋转60秒，然后再继续。

- D. 使用1.0 EU/ml 内毒素溶液，制备一个连续的2倍稀释系列(不包括鲎试剂溶液灵敏度)，如下例中所示。应先将各稀释液应涡旋60秒，然后再继续下一个稀释。

与0.125 EU/ml灵敏度的鲎试剂溶液使用的稀释系列

管编号	水(ml)	加入水中的量	内毒素浓度
1	1.0	1.0 ml, 从1.0 EU/ml	0.5 EU/ml
2	1.0	1.0 ml, 从管 1	0.25 EU/ml
3	1.0	1.0 ml, 从管 2	0.125 EU/ml
4	1.0	1.0 ml, 从管 3	0.06 EU/ml
5	1.0	1.0 ml, 从管 4	0.03 EU/ml

检测程序和解释

每个试剂盒应包含CSE的连续2倍稀释液，不包括标记溶解物的灵敏度、试样的稀释液，LAL试剂检查用水（作为阴性对照）。为了避免出现微生物或内毒素污染，小心将0.10 ml的标准品、样品或检查用水转移到适当的10 × 75 mm反应管中。

在每个以空白开始的管中添加0.10 ml 复溶后的鲎试剂溶液，然后从内毒素最低浓度移动到最高浓度。在每个管中添加鲎试剂溶液后，应立即对内容物进行彻底混合，并将管放在一个 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 非循环热水浴或干热浴中。每次进行内毒素稀释时均应按照该程序进行。未知试样必须与CSE并行运行。可通过在单个稀释中进行是/否试验，或通过一系列稀释进行定量试验来完成该检定。孵育时间应从各管放入 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 浴中的时间开始确定。在规定的读取结果时间之前，不得将检测管从孵育中取出或中断。孵育60分钟（ ± 2 分钟）之后，小心将各管取出，并倒置 180° 。

1. 若形成一个在倒置管时保持瞬间不变的坚实凝胶，则表示是阳性反应。
2. 若倒置后没有形成固体凝块，则表示是阴性反应。鲎试剂溶液的浊度或粘度可能增加。这被视为一个阴性结果。
3. 应在各列中将各管中的反应记录为阳性或阴性。

确认标签声明

每个LAL试剂瓶均标有使用USP RSE得出的鲎试剂溶液灵敏度，以内毒素单位表示。

作为最初内部验证的一部分，每位用户应使用效价已知的内毒素标准品对标记的鲎试剂溶液灵敏度进行重新验证。

制备CSE连续2倍稀释液，不包括标记的鲎试剂溶液灵敏度。每个稀释液以及阴性水对照应进行四次重复检测。进行一小时孵育后，记录阳性和阴性结果。端点稀释被确定为仍然产生阳性结果的内毒素的最后稀释。

检测结果 - 凝胶法

标记的鲎试剂溶液灵敏度= 0.125 EU/ml

重复测定	内毒素稀释(EU/ml)						端点
	0.50	0.25	0.125	0.06	0.03	H ₂ O	
1	+	+	+	-	-	-	0.125
2	+	+	+	-	-	-	0.125
3	+	+	+	+	-	-	0.06
4	+	+	+	-	-	-	0.125

通过确定端点的几何平均数，计算鲎试剂溶液灵敏度。各端点值被转换为 \log_{10} 。取各个 \log_{10} 值的平均值，鲎试剂溶液灵敏度取该平均对数值的 antilog_{10} 。

计算几何平均数端点

端点(EU/ml)	Log对数 ₁₀ 端点
0.125	-0.903
0.125	-0.903
0.06	-1.222
0.125	-0.903

平均数 = -0.983

Antilog_{10} 平均数 = 0.10 EU/ml

可接受标记鲎试剂溶液灵敏度一半到两倍的变化。

测定未知溶液的内毒素

要测定未知溶液中的内毒素浓度，对样品的连续2倍稀释液进行测试，直到到达端点。如前所述，计算几何平均稀释倍数，并乘以标记的鲎试剂溶液灵敏度。

测定未知溶液中的的内毒素浓度

标记的鲎试剂溶液灵敏度= 0.125 EU/ml

重复测定	样品稀释					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-

端点	Log ₁₀ 端点
1/8 (0.125)	-0.903
1/16 (0.0625)	-1.204

平均数= -1.054

Antilog₁₀ 平均数 0.088= 1/11.4

内毒素浓度=鲎试剂溶液灵敏度 × 端点稀释

$$= 0.125 \text{ EU/ml} \times 11.4 = 1.4 \text{ EU/ml}$$

样品抑制

LAL反应以酶为媒介，因此，其拥有最佳的pH范围，以及特定的盐和二价阳离子要求。有时，试样可能将这些最佳条件改变到鲎试剂溶液对内毒素不灵敏的程度。样品抑制LAL检测的阴性结果并不一定表示没有内毒素。

一开始应对每种样品进行筛选，确定是否有样品抑制。使用样品作为稀释剂，在LAL试剂检查用水中制备一系列2倍内毒素稀释液和类似的一系列内毒素稀释液。使用标准程序对平行的各系列进行检测。在孵育结束时，记录阳性和阴性结果，并计算两个系列内毒素稀释液的几何平均数端点。据说，如果内毒素的几何平均数端点在标记的鲎试剂溶液灵敏度的1/2到2倍之间，则没有样品抑制。

见下页中的示例。

样品抑制试验

标记的鲎试剂溶液灵敏度=0.125 EU/ml

内毒素		内毒素稀释(EU/ml)				
		0.50	0.25	0.125	0.06	0.03
在检查用 水中	1	+	+	+	-	-
	2	+	+	+	-	-
	3	+	+	+	+	-
	4	+	+	+	-	-

几何平均数端点 = 0.10 EU/ml

在样品A中	1	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-
	3	+	+	+	-	-
	4	+	+	+	-	-

几何平均数端点 = 0.15 EU/ml
非抑制

在样品B中	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-

几何平均数端点 = 0.50 EU/ml
抑制

克服样品抑制的最简单方法是稀释。计算试样中的内毒素总浓度时，必须考虑稀释因数。作为确定样品非抑制性稀释的快速筛选方法，制备一系列稀释增加的样品，含有相当于溶解物灵敏度2倍的内毒素浓度峰值。使用标准程序对每个峰值的样品稀释进行检测。克服了样品抑制后，显示阳性结果。酸性或碱性极强的样品可能需要进行pH和稀释度调节，以便完全克服样品抑制。

国际用户须知

如果其它监管机构采用了其它性能标准，应满足这些标准，以便在其管辖范围内实现合规。

参考资料

1. Bang, F.B. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 98:325–351 (1956).
2. Levin, J. and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 115:337 (1964).
3. Levin, J. and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 115:265–274 (1964).
4. Levin, J. and F.B. Bang. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thrombos. Diath. Haemorrh.* 19:186–197 (1968).
5. Solum, N.O. Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells. *Thrombos. Diath. Haemorrh.* 23:170–181 (1970).
6. Solum, N.O. The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule. *Throm. Res.* 2:55–70 (1973).
7. Young, N.S., J. Levin, and R.A. Prendergast. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism. *J. Clin. Invest.* 51:1790–1797 (1972).
8. Nachum, R., A. Lipsey and S.E. Siegel. *Eng. J. Med.* 289:931–934 (1973).
9. Cooper, J.F., H.D. Hochstein and E.B. Seligman, Jr. *Bull. Parent. Drug Assoc.* 26:153–162 (1972).

10. United States Pharmacopeial Convention. General Chapter <85> Bacterial Endotoxins Test. *United States Pharmacopeia* (USP).
11. European Directorate for the Quality of Medicines. Chapter 2.6.14 Bacterial Endotoxins Test. *European Pharmacopoeia* (EP).
12. Ministry of Health, Labour, and Welfare, General Chapter 4.0.1 Bacterial Endotoxins Test. *Japanese Pharmacopoeia* (JP).
13. U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, "Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers" (June 2012).

注释

注释

www.lonza.com/pharmabiotechchina

检验证明书: www.lonza.com/coa

联系方式

客户服务: +86 21 6340 3488
+86 013071208275
lbs.china@lonza.com
科学支持: +1 301 898 7025
scientific.support@lonza.com

Lonza Walkersville, Inc. – Walkersville, MD 21793

除非另作说明,本文中所有商标均为龙沙集团有限公司或其子公司的商标。本文所含内容均认为是正确的,符合最新科学技术知识。但我们并未对其准确性或因使用这些信息而出现的结果做明示或暗示的担保。买方承担所有使用和/或处理方面的风险。任何用户必须自行决定,保证龙沙集团或其子公司提供的产品、信息与建议 (i) 符合既定工艺或用途, (ii) 符合环境、健康和法规, (iii) 不会侵犯任何第三方的知识产权。

© 2015年Lonza. 版权所有,保留所有权利。
00528202 PN283/N284/N288-10-CN 10/15
RT-MN010_CN
