

内毒素的检测与鲎试验(一)

第二军医大学微生物学教研室内毒素研究组 余庆 焦炳华

内毒素为革兰氏阴性细菌及其它一些微生物如衣原体、立克次氏体、螺旋体、单核细胞增多李斯特菌等胞壁中的类脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)成分。内毒素对机体有极为广泛的作用,可影响到机体几乎每一个器官、系统及生物功能。内毒素对机体有多种毒害作用,如热原性,致死作用,白细胞减少及增多,斯氏反应,弥漫性血管内凝血(DIC),骨髓坏死,胚胎骨质耗损,血压下降,血小板凝聚,补体激活, Hageman因子激活,诱导血浆原激活剂,促进前列腺素的合成,抑制糖原异生的关键酶,骨骼肌加速释放氨基酸等等。因此,临床上革兰氏阴性菌感染或脓毒症时,如并发毒血症和内毒素休克,可有许多病理现象出现。最终可因心、肾、肺、肝等功能的衰竭而发生死亡。

由于很小剂量的内毒素即能引起极广泛的生物作用及病理作用,因此,加强对内毒素检测的研究,便成为临床、公共卫生、药检系统等领域的重要课题之一。在临床上,加强对革兰氏阴性菌感染或革兰氏阴性菌菌血症、脓毒症时血清中内毒素检测,有利于及时发现内毒素休克的发生,以迅速采取果断的治疗。在公共卫生及药检系统等方面,对水源、食品、饮料、各种药物及生物制品进行内毒素检测,可严格控制水源水、食品、饮料、各种药物、生物制品中的内毒素含量,以将其控制在可接受的法定水平以下,有利于保证人民的身体健康。

本文结合我们的实际工作,就内毒素的检测,其方法及评价,以及存在的有关问题

等几方面作一介绍,与同志们互相交流和探讨。

一、内毒素的检测

内毒素的检测有传统的家兔热原试验(Rabbit pyrogen test, RT),鲎试验法(Limulus test, LT)以及其它的一些特殊方法。

(一)家兔热原试验法:此方法即将一定量的被检标本静脉注入家兔体内,观察其注射后的发热情况,以决定所检标本中是否有热原存在。RT法为一种定性检测内毒素的方法,应用历史较久。此方法本身有许多的限制,如家兔对内毒素在反应上有个体差异,敏感度不高,不能定量测出内毒素等。

(二)鲎试验法:LT法又称鲎变形细胞溶解物试验(Limulus amoebocyte lysate, LAL),是目前检测内毒素最敏感的方法。它比RT法敏感10~100倍以上,可测出微量的内毒素(0.01~1 ng/ml);用微量光电法及其它的改进方法可测到微微克(pg/ml)的水平。而在RT法中内敏感性高的家兔需注射1.5 ng/kg才能引起发热,而敏感性低的却需注射0.5~10 μg/kg才能引起发热。

LT法可广泛地用于革兰氏阴性菌感染的快速诊断,对患者的血液、尿液及脑脊液可进行直接检查。此法亦可用于检查各种注射剂内是否有内毒素污染。

近十多年来,随着各种先进的手段(如同位素标记技术、新频光电技术、免疫电泳技术等)应用于LT领域,使LT法得到了许多改

进，敏感性又日益提高。此在下面还将详细述及。

(三) 其它检测内毒素的方法: 由于LT法的影响因素甚多, LT法的标化问题 (包括内毒素及鲎试剂的标化, 以及操作程序的标化等) 至今仍未解决, 因此有些人试图另辟途径。化学方法 (如用气相色谱仪检查内毒素中类脂体A上的羟基豆蔻酸), 其特异性较好, 影响因素少, 因此可以较准确地测知标本中的内毒素, 但此法敏感度不高, 且设备、仪器及操作较为复杂, 所以不能广泛应用。由于生物测定法有生物放大作用, 因此敏感性高于化学测定法。另有一点需指出的是, 用化学方法测定内毒素, 不能证明标品中所测得的内毒素是否仍有生物作用, 因此其实际应用意义相应的亦就小了。

其它检测内毒素的特殊方法还有家兔肾上腺皮肤试验, 半数局部斯氏现象皮肤反应预备剂量 (SPD₅₀) 测定, 鸡胚半数致死量 (CELD₅₀) 测定等, 均可用于实验性内毒素的检测, 但敏感性较低, 方法复杂, 差异性亦较大。

总之, 从目前来看, LT法为检测内毒素的最好方法。其主要优点就是敏感性高, 假阳性少, 耗费的试剂量少, 且设备简单, 实验时间短, 适用于临床、卫生事业及药检系统大规模地进行。如能解决好鲎试剂、内毒素及操作程序的标化问题, 则LT法将是检测内毒素的最好方法。

二、内毒素与鲎试剂的反应原理

鲎系海产动物, 生物学分类上属节肢动物门肢口纲剑尾目。在其血液中含有一种特殊的变形细胞 (amoebocyte)。这种变形细胞中含有能被内毒素激活的C因子、B因子、前凝固蛋白, 因此, 内毒素检测LT法的机理即是内毒素通过激活C因子、B因子、前凝固酶, 而使可凝固蛋白变成凝固蛋白 (肉眼可见的凝胶), 从而可以半定量及定量地测知内毒素的含量 (图1)。

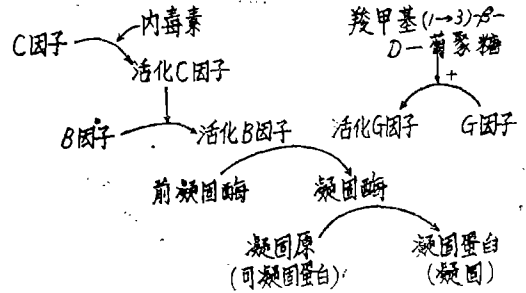


图1 内毒素与鲎试剂的反应原理

日本学者在对可凝固蛋白氨基酸顺序研究的基础上, 发现内毒素激活的凝固酶的作用点为可凝固蛋白的第18(Arg)和19(Ghr)间的肽键, 以及第46(Arg)和47(Gly)间的肽键, 而裂解为A链、B链及C肽。且在切断部位的羧基端氨基酸的结构均为一Gly—Arg, 提出此酶的作用有特异性 (图2)。产色基质内毒素检测法即是据此原理而设计的。

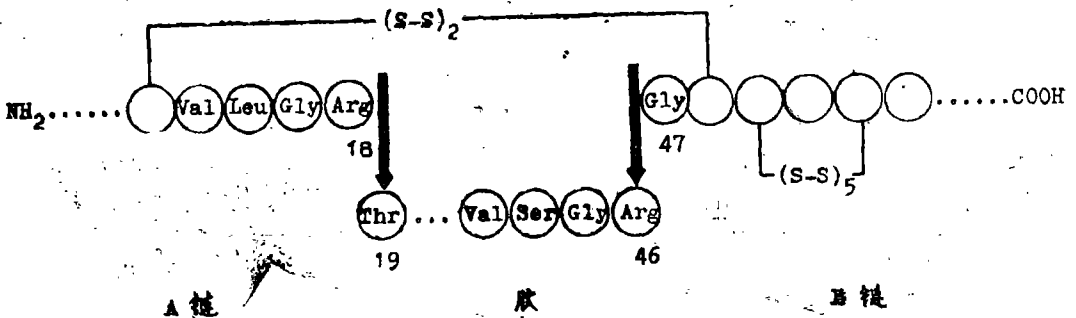


图2 凝固酶作用部位 (箭头示)

一般地讲,内毒素与鲎试剂的反应是非常特异的,因此,LT法的假阳性极少。从革兰氏阳性菌分离出的肽聚糖虽亦能凝固鲎试剂,但其活性比内毒素低1,000~400,000倍。近来发现一种新的合成抗癌剂羧甲基(1→3)-β-D-葡聚糖亦能与鲎试剂起反应。其反应原理即是:鲎试剂中含有一种称为G因子的物质,此抗癌剂能激活鲎试剂中的G因子,而活化的G因子又依次激活前凝固酶、可凝固蛋白,从而形成凝胶(图2)。此外,凝血酶、凝血激酶, Poly I:C, Poly A:U、核糖核酸酶、胰蛋白酶等,亦可凝固鲎试剂而引起假阳性反应。但用氯仿处理此等物质(浸取3~4小时)可以除去这些物质,从而可避免发生假阳性反应。

哺乳类动物血浆中含一种酯酶,它对内毒素有降解及脱毒的作用,故用LT法检测血浆中的内毒素易受此种物质的影响,而造成假阴性结果。为了避免此等因素的影响,在试验前血浆需经过特殊处理。目前共有下述四种方法处理血浆,即稀释加热法、酸化液、氯仿浸取法及凝胶过滤法。我们及其它的一些工作者认为稀释加热法简便易行,效果较好。

在鲎血液中,还有一种称之为抗LPS因子(Anti-LPS-factor, ALF)的蛋白质,其分子量约为15KDa,为一种鲎血抗凝剂,对LPS介导的LT反应有直接的抑制作用。ALF可抑制LPS对LT反应的初始阶段。因此在制备鲎试剂时,应将此物质清除。氯仿浸取法可有效地去ALF。除去ALF及加入Ca⁺⁺(0.02M)可改善鲎试剂的质量,提高敏感性约100倍。

三、各国法定检测内毒素的方法

美国首先将LT法作为检测内毒素的法定方法。在美国药典第20版(1980)的细菌内毒素一项中对LT法亦进行了详细的介绍。继美国以后,许多国家(特别是欧洲国家)

纷纷仿效,亦已将LT法作为检测内毒素的法定方法。现以美国为例,来说明这种法定的LT法。

美国食品药品监督管理局(FDA)对厂家提出了一条准则。FDA认为对于应用于人类的药物、生物制剂、兽用药物及医疗器械必须将LT法作为法定的终产品(end product)内毒素检测方法,厂家只有遵循这个原则并按介绍的方法操作后,其产品才能得到FDA的承认。

LT法作为法定的内毒素检测方法,在进行测定时必需作①测定鲎试剂的敏感性;②抑制与增强试验。

1. 鲎试剂的敏感性

在鲎试验的操作过程中,各个实验室之间必定有差异。检测人员必须应用同一批鲎试剂及同一批内毒素作4~8个稀释度的试验,以2倍倍比稀释以便取得适宜的终点范围作LT。终点内毒素量应以ng/ml表示,然后换算成log值,计算标准差(SD)。如果4个稀释度的SD值小于或等于SD值的99%限值,则此方法是可用的。如SD超过比值,则应采用8个稀释度的试验,计算新的SD值。此时,如SD值仍超过8个稀释度SD的99%上限值,则此方法由于变异太大不能采用。在重新试验前应找出原因并进行纠正。

表1 SD值的99%上限值

倍比稀释次数	Log2	Log10
4	1.214	0.365
8	1.015	0.306

如实验室通过了上述变异试验,则应以一系列浓度的参考标准内毒素(RSE)或对照标准内毒素(CSE)检查鲎试剂的敏感性,如果鲎试剂的敏感性差异不超过标定值的2倍稀释,则认为是满意的。

2. 抑制与增强试验

一种药物含不同浓度的标准内毒素(敏

敏感性以鲎试剂标定)，然后与水中的一系列同种内毒素浓度进行比较。标准系列的内毒素检测结果与药物中的内毒素检测含量进行比较，其差异不应超过两倍稀释浓度。原则说明此种药物有抑制或增强现象。

由不同浓度不同活性要素组成，而其它成分相对恒定的药物，只需测最高和最低浓度即可，如果每种浓度均表明有抑制或增强，则每种浓度均需进行抑制/增强试验。

所有法定的药物检测均需在未稀释或在适当稀释后测定。稀释倍数不能超过最大有效稀释 (Maxium Valid Dilution, MVD)，否则其中的内毒素经稀释后浓度过低而不被LT法检出。MVD的计算公式为：

第一步：先计算最小有效浓度 (MVC)

$$MVC = \frac{\lambda M}{K}$$

λ = 以标准内毒素 (EU/ml) 测定的鲎试剂敏感性

M = 一次应用或在 1 小时内应用的兔或人剂量 (以每公斤体重计算)。M 在这里是最关键的要素。

$$K = 5.0 \text{ EU/kg}$$

第二步：再计算最大有效稀释

$$MVD = \frac{\text{药物的药效}}{MVC}$$

对于以重量/kg为单位应用的药物，药效的表示为mg/ml或单位/ml；对于以体积/kg应用的药物，药效为1.0ml/ml。

如果药物表明有抑制或增强现象，则应服从RT法。此时，RT法仍将是检测药物内毒素含量的适宜方法。至少应检测 3 个生产批次终产品的抑制及增强试验。如果药物的加工制造过程改变，或药物的配方或药物中某种特殊要素的来源改变，则每种药物至少要对 3 种单位重复测定抑制/增强试验。如鲎试剂的生产或鲎试剂批号变更时，至少每种药品要对 1 种单位进行重复测定。

新 洁 尔 灭

阎秀文*综述

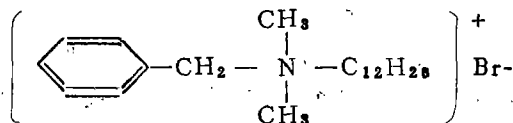
薛广波审校

新洁尔灭 (Bromo-geraminum) 是一种季铵盐类消毒剂。自从1935年问世以来，广泛应用于体温表、便器、痰盂罐、食具、用具、住室、运输工具及医护人员洗手等方面的消毒。因其杀灭繁殖型细菌作用强大，低浓度下对皮肤粘膜毒性轻微，故常以涂沫和浸泡的方式对皮肤粘膜进行消毒，是一种阳离子表面活性杀菌剂。我国自产的 5% 新洁尔灭水溶液，性质稳定、无毒、无味、使用方便，深受欢迎。

一、理化性质

新洁尔灭化学名称为：十二烷基二甲基苯甲基溴化铵，分子式为 $C_{21}H_{33}NBr$ ，分

子量 = 384.46，其结构式如下：



原液是一种淡黄色的胶状物，具有芳香气味、极苦、易溶于水和乙醇、微溶于丙酮、不溶于乙醚。配成溶液后，无色透明、无毒、无臭味、无挥发性、无腐蚀性、性质稳定、耐光、耐热、可长期贮存。

二、杀菌作用

新洁尔灭在水中水解时产生阳性电荷吸附于微生物的表面形成离子微团，并渗入到

*第二军医大学流行病学教研室进修生