

鲎试验和家兔法测定 干扰素和白蛋白中内毒素的比较

中国科学院武汉病毒所实验生物制药厂 张奇亚 李 枫

提 要 本文分别用鲎试验和家兔热原法对16批人白细胞干扰素及5批人血浆白蛋白中的内毒素进行了检测。两种方法检测人白细胞干扰素和人血浆白蛋白的符合率分别为81.75%和80%；阴性符合率为100%。

关键词 鲎试验 人白细胞干扰素 人血浆白蛋白 内毒素检测

内毒素是革兰氏阴性菌胞壁中的类脂多糖(LPS)成份,其结构复杂,有多种生物活性,对机体除其免疫原性外,还能引起严重、广泛而复杂的病理变化^[1]。因此,对于生物制品中内毒素的检测是极为重要的。

用家兔热原测试法(Rabbit Pyrogen Test)检测内毒素是多年来一直为国际所通用的法定性方法。但因家兔用于生物制品生产过程中热原质的监测所需时间较长,故应用上受到一定限制。1968年Levin和Bang首次报道的鲎变形血细胞溶解物试验(Limulus Amebocyte Lysate Test "LAL")^[2]是一种检测内毒素的敏感方法。目前这种方法在用于制药工业的原材料、工艺或注射用水等体外热原质检测^[3,4],以及食品卫生检验中正得到广泛的承认。在用于革兰氏阴性菌感染的尿、体液、关节液和血液中的内毒素测定^[5,6],以及某些生物制品,如抗菌素或菌苗中内毒素的检测^[7,8],已取得了一些好的进展。但鲎试剂用于人白细胞干扰素中的内毒素检测还未见有详细报道。我们用家兔热原试验法与鲎试验两种方法,对16批人白细胞干扰素,5批人血浆白蛋白进行了内毒素的检定和比较。

材料和方法

一、兔热原试验法

按中华人民共和国药典(1985年版)二部附录热原检查法^[9]和“1986年11月全国生物制品热原试验修订规程”进行。人白细胞干扰素的静脉注射剂量为每只兔按人每公斤体重临床最大使用量的三倍;人血浆白蛋白的静脉注射剂量按家兔体重3 mg/kg计算。三只兔平均升温不大于0.8℃,其绝对值总和不大于1.5℃者为内毒素阴性,记录为“—”,否则为阳性,记录为“+”。

二、鲎试验法

1. 材料

细菌内毒素工作标准品和鲎试剂均为厦门鲎试剂厂提供,批号分别为890325,890303。

2. 方法

方法和判断标准:按卫生部颁的“细菌内毒素检查法”(试行)有关规定进行。

结果与讨论

一、用兔热原试验(RPT)与鲎试验(LAL)法检测16批人白细胞干扰素和5批

人血浆白蛋白中内毒素的结果分别见表 1 和表 2。

Tab 1. Comparison of RPT and LAL to detect endotoxin in Leukocyte Interferon;

Number of IFN	880922	881017	881118	881123	881205	890108	890112	890216
RPT	+	+	-	-	-	-	-	-
LAL	+	+	-	-	-	+	-	-

Number of IFN	890223	890308	890323	890406	890420	890427	89—①(江)	89—④(江)
RPT	-	-	-	-	+	-	-	-
LAL	-	-	+	-	+	-	-	-

Tab 2. Comparison of RPT and LAL to detect endotoxin in serum albumin;

Number of Serum albumin	880923	890223	890308	890323	890327
RPT	-	-	-	-	-
LAL	+	-	-	-	-

由表 1 和表 2 中可以看出不论是人白细胞干扰素还是人血浆白蛋白, 所有用 RPT 检测内毒素为阴性的检品, 用 LAL 方法检测均为阴性。因此, 用这两种方法检测样品中内毒素的阴性符合率为 100%。这表明, 经鲎试剂检验为阴性的结果是全部符合免热原法检测的结果, 不需复检。但是从上述两个表中, 可以看到 16 批干扰素中, 用免热原法检验为阴性的检品中有 3 批, 而被鲎试验检验为阳性, 占总批量的 18.75%; 在所检验的 5 批白蛋白中, 有一批 RPT 检验为阴性, 而鲎试验检验为阳性, 占总批量的 20%。这表明用这两种方法检测干扰素与白蛋白中内毒素的阳性符合率分别有 81.25% 和 80%。对于用两种方法检测有异议的检品, 以家兔法为准。通过修正鲎试验反应的条件, 可以消除或减少假阳性。

二、保温时间对鲎试验的影响

在同一温度(37℃)条件下, 我们就保温

时间对鲎试验的影响进行了初步探讨(见表 3)。

Tab 3. Effect of keeping temperature for the LAL

Samples	negative positive		880922	890323	890427
	control	control			
RPT			+	-	-
LAL 30min	-	+	+	-	-
45min	-	+	+	+	-
60min	-	+	+	+	-
90min	-	+	+	+	+

从表 3 可见, 当鲎试验的保温时间为 30 分钟时, 所检的三个样品其结果与免热原法完全一致, 但随着保温时间的增加, 检品中出现的阳性结果增多, 直到保温 90 分钟时, 鲎试验所检的样品全部为阳性结果, 初步表明随保温时间延长, 鲎试验的假阳性率上升。

总之, 由于鲎试验用于人白细胞干扰素, 人血浆白蛋白中内毒素的检验与家兔热原法有较高的符合率, 检验所需的时间短, 成本低, 方法简便, 同时随着鲎试剂质量的改进, 敏感性和专一性进一步提高, 这些为鲎试剂在生物制品生产过程中内毒素的监测时提高制品的质量, 减少由于热原质污染带来的损失, 有较高的实用价值。应该指出的是, 确定适宜的试验条件可以有效地提高鲎试验与免热原法的符合率。

参 考 文 献

- [1] 余庆: 医学细菌分子生物学进展 科学出版社
1984年 64—76
- [2] Levin J et al: Thrombos Diathes Haemorrh 1968 19:186
- [3] Weary M: Pharmacy International 1986
99
- [4] 程真: 微生物学免疫学进展 1989 1:42—47
- [5] Iino Y: Acta Otolaryngol 1985 100(1—2),
42—50
- [6] Prior RB et al: J Clin Microbiol 1980 11,
340—320
- [7] 丁绍卿等: 中华微生物和免疫学杂志 1982 1
(3): 141
- [8] Yano S: J Clin Microbiol 1986 23(1): 11
—16
- [9] 中国药典 1985年版 二部附录 86

Between Rabbit Pyrogen Test and Limulus Amebocyte Lysate Test Comparative Studies for Detecting Endotoxin in IFN and Serum Albumin

Zhang Qiya Li Feng

(Bioproducts Factory Wuhan Virology Institute Academia Sanica)

Abstract

The results were reported and comparized on detecting endotoxin in 16 samples of Interferon (IFN) and 5 samples of serum albumin by two methods of Rabbit Pyrogen Test (RPT) and Limulus Amebocyte Lysate Test (LAL). The agreement rates of two detecting results are respectively 81.75% and 80% in the samples of IFN and the samples of serum albumin. Both agreement rates of negative results are 100%. The effect of keeping temperature time on the LAL is investigated, showing that the longer the time is the more the pseudopositive rate is produced.

Key words Limulus Amebocyte Lysate Test (LAL) Interferon (IFN) Serum Albumin Endotoxin Detection.