

细菌内毒素检查法超标结果的处理方法

裴宇盛, 蔡彤, 张国来, 高华

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要 内毒素检测结果超过质量标准规定(OOS)的情况在日常检测中不可避免。通过风险因素分析法,结合大量实际工作经验,对产生OOS的原因进行了逐项分析和研究,包括质量标准与计算、实验操作、材料与仪器等因素。针对内毒素检查的特性,设计决策流程图确定验证OOS方案。确定了所有类型的风险因素产生原因和解决方法,建立了用于回顾细菌内毒素OOS的风险因素鱼骨图和用于验证OOS结果的决策流程图。按建立的方法进行验证处理OOS,能够使内毒素检测结果更加科学严谨。

关键词 细菌内毒素检查法;质量管理;超过质量标准规定

超过质量标准规定(out of specification, OOS)是指按一个实验规程操作得到的不符合所建立质量标准的结果,简称超标结果或OOS。细菌内毒素检查法是药品检验中应用十分广泛的一项检测技术,被世界各国药典所收录^[1-2]。该方法与热原检查法是检验注射剂热原污染的法定方法。

由于在中国细菌内毒素检测每年超过100万批次,在日常检测中药品生产企业、药品检验机构会面临大量OOS结果。且细菌内毒素检查法的OOS具有一定特殊性,表现在2个方面:首先,由于内毒素检查是一种生物测定法,检测结果重现性较化学方法差。其次,细菌内毒素污染是不均匀的。根据国家食品药品监督管理局于2006年发布的《药品质量监督抽验管理规定》第四章第二十六条规定:“不得受理国务院药品监督管理部门规定的其他不宜复验的项目,如重量(或装量)差异、无菌、热原(细菌内毒素)等。”明确细菌内毒素属于不得复验的检测项目。

基于以上特点,内毒素检测的OOS是个较难处理的问题。根据文献检索,研究分析如何科学处理细菌内毒素检查法OOS结果在国内外均罕有报道。建立科学的OOS分析处理方法十分必要。如何分析OOS结果得到准确可靠的内毒素检查结果是质量控制的关键。本细菌内毒素实验室在2012年通过WHO PQ认证,每年检验超过3000批次,本文结合本实验室日常检验和质量管理经验,根据OOS产生的原因,对质量标准与计算、实验操作、材料与仪器、内毒素OOS特殊性、供试品本身内毒素含量不合格等因素逐一进行分析研究,总结所有的需要回顾的风险因素制定符合内毒素特点的OOS决策流程图。

1 质量标准与计算

当出现OOS结果时,最首要回顾使用的质量标准是否准确,是否是现行有效的质量标准。该步骤容易被忽视,但却至关重要。其次回顾实验相关的计算是否准确无误。包括最大有效稀释倍数(maximum valid dilution, MVD)的计算和稀释步骤的计算等。这些步骤如果出现错误最容易被发现,根据回顾结果确定是否能够推翻实验结论而重新实验。

供试品进行方法学验证是供试品能否使用细菌内毒素检查的基础^[3]。该项回顾是为了确定该品种是否进行过干扰实验,以及该品种从原理上是否适合进行细菌内毒素检查。没有通过干扰实验的品种得到的OOS,不能排除是干扰作用的增强结果。

生产工艺中存在其他非细菌内毒素污染可能性时,不适宜使用细菌内毒素检查法。有时虽然通过了干扰实验,但是如果确定干扰实验设计不够合理,仍建议将此种OOS结果判定为“无法判断”或者“方法不适用”。

2 实验操作

当出现OOS结果时,回顾实验操作是研究实验结果是否可靠的重点之一。内毒素检测过程中,最主要的实验操作是稀释,可以通过测量剩余稀释液体积来验证实验操作是否存在错误。如果能够完全回顾清楚,可以推算出实验结果的真实值留作进一步实验参考。其次回顾混匀时间是否足够,如果存在错误,则之前的实验结果记为无效。

不同来源的内毒素标准品使用方法不完全相同,主要表现在复溶体积、混匀时间和分装保存等方面,仔细核对使用

收稿日期:2016-01-20;修回日期:2016-07-06

基金项目:国家科技重大专项项目(2015ZX09303001)

作者简介:裴宇盛,助理研究员,研究方向为药检药理,电子邮箱:pysh@nifdc.org.cn;高华(通信作者),研究员,研究方向为药检药理,电子邮箱:huag55@

163.com

引用格式:裴宇盛,蔡彤,张国来,等.细菌内毒素检查法超标结果的处理方法[J].科技导报,2017,35(10):71-75;doi:10.3981/j.issn.1000-7857.2017.10.009

标准品使用和保存是否达到了说明书的要求。

不同厂家生产的鲎试剂使用方法也有一定差别,如溶解体积与加样方法,部分进口鲎试剂就与国产鲎试剂有很大区别。仔细核对使用鲎试剂说明书,确保正确使用。此外还要回顾是否使用了正确灵敏度的鲎试剂。

供试品可能是药品生物制品或者医疗器械的浸提液等,在进行检验中,是否仔细阅读供试品说明书,正确配置了供试品,防止了在检测取样中产生污染。如发现取样方法不科学或上述其他问题,均应重新取样实验。

光度测定法使用的仪器软件各有不同,需要严格按照仪器说明书进行操作,如果使用了未经验证的软件或程序进行计算,将数据导入经过验证的或专业内毒素检测软件计算实验结果。

3 材料与仪器

3.1 鲎试剂

鲎试剂灵敏度复核与标准曲线有效性验证:药典中规定,使用新批号鲎试剂进行检测前,必须进行鲎试剂灵敏度复核或标准曲线可靠性实验。如未进行该项实验,应补做该项目,如果该批试剂复核或标准曲线可靠性检测结果为不通过,则使用该批试剂得到的不合格实验结果应判为无效。

3.2 内毒素检查用水

考察鲎试剂与检查用水是否匹配。实验用的内毒素检查用水一般应使用鲎试剂生产厂配带的或使用中国食品药品检定研究院,以下简称“中检院”,生产的内毒素检查用水。如果是用了不同厂家鲎试剂和水进行内毒素检测产生了不合格结果,建议判定实验无效,最好选择配套的试剂重新进行。

考察内毒素检查用水本底值。在中国药典中规定,光度测定法使用的内毒素检查用水内毒素含量应低于0.005 EU/mL,凝胶法应小于0.015 EU/mL^[9]。应确保使用的内毒素检查用水能够满足上述要求,否则会出现内毒素检查用水引入的内毒素量引起供试品出现不合格。

3.3 细菌内毒素标准品

考察鲎试剂与内毒素标准品的匹配。鲎试剂作为一种特殊的生物试剂,其效价用内毒素进行标定赋值。细菌内毒素标准品有国际标准品、各国内毒素国家标准品和各国生产的细菌内毒素工作标准品。经过本实验室溯源研究,细菌内毒素国际标准品、美国USP标准品、欧洲EP标准品、英国BP标准品为同一原料,统一协作标定赋值,其量值具有可替代性。日本的国家标准品原料菌株与国际标准品不同,经过标定量值可以溯源到国际标准品。中国的细菌内毒素国家标准品,菌株与国际标准品、日本国家标准品均不相同,为中国自主研发,经过标定量值可以溯源到国际标准品。

由于细菌内毒素标准品消耗量大,各国均研制内毒素工作标准品作为日常使用。标准品的一项重要作用就是用于标定或者复核鲎试剂的灵敏度。在美国鲎试剂是由美国食

品药品监督管理局(FDA)进行批签发制度管理,鲎试剂的灵敏度具有保障,因此美国FDA并不生产内毒素工作标准品,而是由鲎试剂生产厂家提供。美国的鲎试剂厂家生产的细菌内毒素工作标准品采用浮动效价标定,即同一个内毒素工作标准品对应每一批鲎试剂都有一个可能完全不同的效价值,其效价浮动范围可能超过50%~200%。在使用进口鲎试剂进行检验时,一定要使用对应的内毒素工作标准品进行检验才能得到准确的实验结果。

在中国,鲎试剂并非如同美国按照批签发制度进行质量控制,中检院生产细菌内毒素工作标准品,有约束用于药品检验的鲎试剂质量的作用。因此在处理不合格检品时,使用的内毒素标准品最好为内毒素国家标准品或中检院发放的工作标准品,不应使用鲎试剂厂家提供的工作品,国内有些厂家也采用浮动效价法,因此更不能使用不同生产厂家的鲎试剂和工作品进行内毒素检测。

3.4 耗材及器具清洁

耗材主要包括无热原吸头、无热原酶标板和试管以及移液管。无热原吸头和酶标板应有无热原标识和内毒素检测结果^[9],特别要注意检测结果应能达到要求,否则内毒素检测结果无效。

移液管等按照经验证的清洁洗刷操作规范进行,并按药典要求进行干烤。否则内毒素检测结果无效。

过程中用到的一切化学试剂如乙醇等溶剂,必须进行内毒素的含量测定。有些供试品需要特殊处理,如有机试剂溶解,助溶剂助溶等,使用的溶剂,都要进行细菌内毒素含量检测。由于内毒素会逐一叠加,当处理条件复杂、使用溶剂较多时,则可能出现内毒素叠加使本底值过高造成的阳性结果。实验耗材本身也含有微量内毒素,耗材试剂的内毒素叠加也可能造成阳性结果,避免此类问题发生的方法是通过空白对照实验来确定本底值的含量,对结果进行科学评估。

3.5 仪器

恒温水浴在使用过程中水容易被污染,应定期更换水。水浴温度应经过计量检验,计量结果在药典要求的范围内,否则内毒素实验结果无效。

光度测定法使用的仪器的波长和温度应通过计量校准,否则内毒素检测结果无效。

如果上述项目仅仅通过回顾不能得到确定的结果,则需要设计对应的实验来验证是否存在问题。完成了对自身实验室的回顾,如果条件允许,对供试品出厂的实验记录、结果也进行回顾分析。这样可以帮助理解生产厂的内毒素质量控制水平。

4 基于内毒素检查特性的OOS结果验证

在实际工作中,并不会仅通过回顾就确定发不合格报告,而是通过一些验证性实验来使不合格结果准确可靠。盲目重新实验往往会得到无规律的实验结果。反而会使结论判断陷入困境。内毒素检测有自身的特性,经过本实验室研

究,内毒素检查中无法通过回顾排除的因素包括:假阳性结果、鲎试剂的结果差异、鲎试剂特异性、不均匀污染、方法间差异。由于不均匀污染跟抽样等因素有关,不能仅仅通过实验确定,而方法间差异药典中有明确规定采用凝胶限度法仲裁,因此在这两方面OOS的结果验证中一般可不考虑。

4.1 假阳性结果

在细菌内毒素检测中,最主要的假阳性是由于G因子旁路干扰导致。鲎试剂除了能和细菌内毒素发生反应之外,其中含有G因子旁路,还可以同β葡聚糖发生反应而产生“假阳性”结果。可以使用去G因子鲎试剂,或屏蔽了G因子的鲎试剂或重组C因子鲎试剂检测同一支样品,对比实验结果,如产生了较大差距,则可推断可能存在G因子旁路干扰。近年来,有专门用于检测β葡聚糖的试剂,使用这类试剂能够检测出待测样品中的β葡聚糖含量,也可证明存在葡聚糖干扰。

4.2 结果差异

在检验中,有可能使用了多种鲎试剂进行检验,而结果间存在差异,这是由于鲎试剂的灵敏度存在支间差异、批间差异、灵敏度间差异、鲎试剂厂家间差异造成的。鲎试剂是一种生物制剂,其误差较大,但是以上4种差异都应该在药典规定的标示灵敏度的50%~200%范围之内,转化成检测值间比值则为25%~400%。

该种结果作为质检部门来说可以根据具体情况采取以下几种策略:1) 从严;2) 遵循生产厂家所选择的鲎试剂;3) 参考其他实验结果,如家兔热原实验或者人单核细胞活化实验;4) 更换方法为家兔法。最好能够研究出不同鲎试剂厂家的细微工艺差别对药品处方中那些成分产生了怎样的不同影响,如缓冲能力细微差别与药品处方中的酸碱物质反应,导致样品与鲎试剂混合液酸碱度稳定在不同范围导致产生结果差异。

4.3 内毒素与鲎试剂反应的特异性

不同的鲎试剂结果差异大于50%~200%范围的情况在实际检测中也会出现。这种情况称为鲎试剂的特异性。由于在最初建立内毒素检查法时,必须建立一个标准内毒素,然而内毒素在自然界种类太多,只能选择一个代表性的内毒素作为标准物质。内毒素检查法是一种生物测定法,不同质的内毒素与鲎试剂的反应特性是不同的,造成了结果产生较大差异。虽然不同质的内毒素反应结果差异大,但是结果的重复性很好。表现为同一支供试品,不同鲎试剂灵敏度产生较大的结果差异大于50%~200%;同一支供试品,不同厂家鲎试剂检测结果差异大于50%~200%;同一支供试品,使用光度测定法时,不同的稀释倍数检测值差异大于50%~200%。

在这种情况下,作为质量控制部门,可以根据具体情况采取以下几种策略:1) 从严;2) 遵循供试品生产厂家所选择的鲎试剂(进口检验);3) 参考用多个厂家的鲎试剂试验的实验结果(3取2)。参考家兔热原实验或者人单核细胞活化实验;4) 更换方法为家兔法。由于是内毒素检查法方法缺陷所以策略不分优劣。不同单位根据自己的具体情况制定相应的标准作业程序(SOP)并执行就可以得到实验结论。

5 供试品本身内毒素含量不合格

在内毒素检测中,供试品内毒素过高产生的OOS是符合内毒素检测目的的结果,完成了所有OOS结果回顾和验证后,若确定是供试品内毒素过高产生的OOS。即对供试品出具不合格报告,并保留所有相关资料。

6 决策流程图设计

实际的OOS可能是上述所有情况的综合结果,需要逐一排查才能确定。将上述需要回顾的风险点绘制成鱼骨图(图1),对所有因素进行整体考虑分析,根据鱼骨图可以看出材

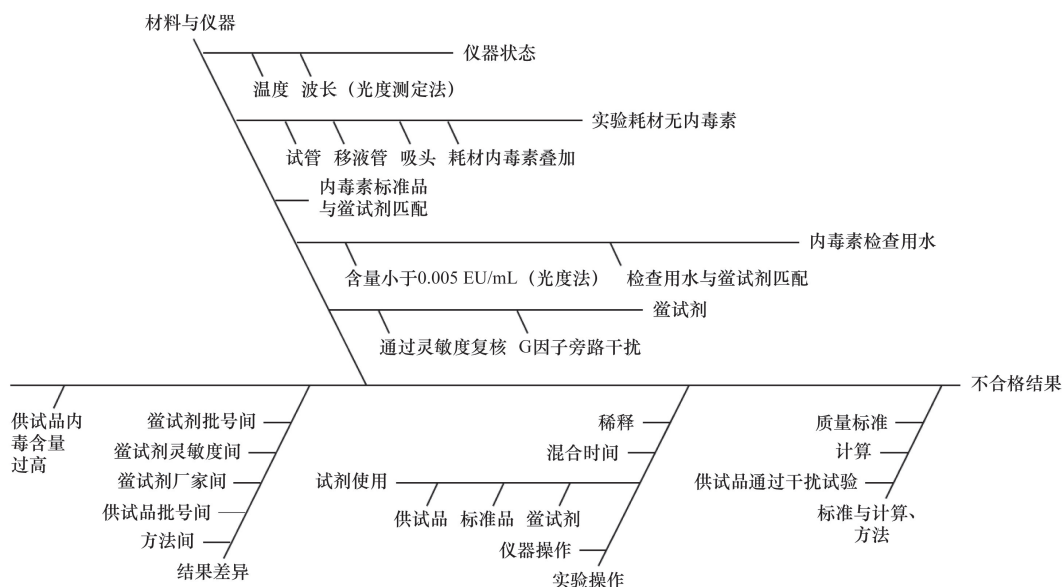


图1 细菌内毒素检测OOS结果风险因素鱼骨示意

Fig. 1 Fishbone Diagram for OOS of bacterial endotoxin test

料与仪器在图中所占比例较大,因素较多而且复杂,其次是实验操作的回顾,这两项有时候还需要补充实验进行推理验证。供试品通过干扰实验的研究数据为前期研究资料。鲎试剂是内毒素检测的专用试剂,因此在其中多个项目中都有涉及。图1可以直观了解到内毒素检测产生OOS的所有因

素,实际遇到OOS情况按照图中所列项目逐一排查。

对于OOS的结果验证,给出了决策流程图(图2),不同单位根据自己的目的与需求,按照鱼骨图和决策流程图梳理思路,制定合理的标准操作规范并执行就可以得到实验结论。找到相应原因,帮助内毒素检测实验室实施质量管理,作出

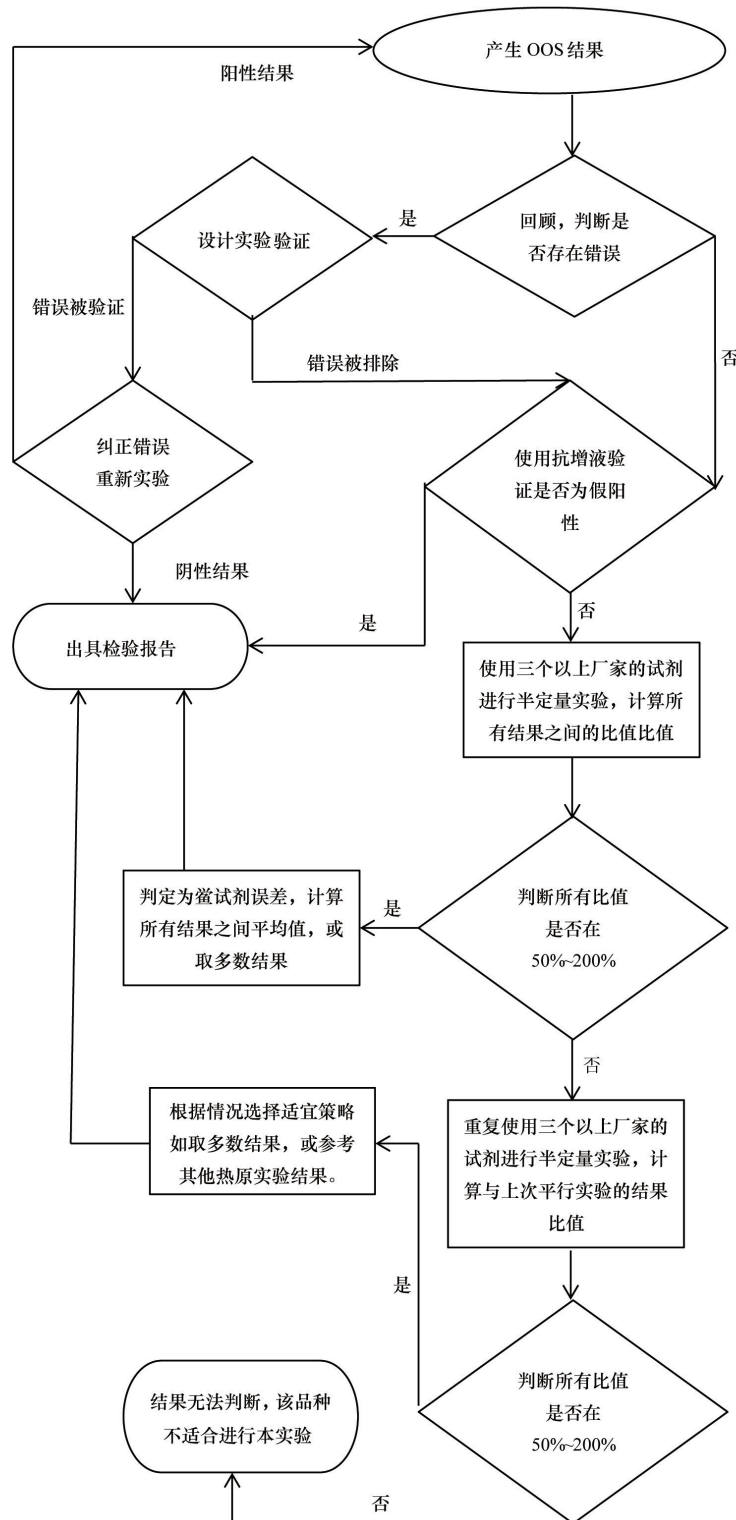


图2 细菌内毒素检测OOS决策流程

Fig. 2 Decision tree for OOS of bacterial endotoxin test

科学判断,获得准确的细菌内毒素检测结论。

7 结论

在日常检测 OOS 时,可以通过质量标准与计算、实验操作、材料与仪器等因素的检查来核实 OOS 产生的原因。针对其他因素引起的假阳性结果、鲎试剂的结果差异、鲎试剂特异性、不均匀污染,方法间差异等可以通过从严实验、更换实验方案等方法进行处理。为帮助研究人员确定所有类型的风险因素产生原因和解决方法,建立了用于回顾细菌内毒素 OOS 的风险因素鱼骨图和用于验证 OOS 结果的决策流程图。按风险因素鱼骨图进行回顾分析并按决策流程图进行验证试验处理 OOS,能够使内毒素检测结果更加科学严谨。

参考文献(References)

[1] The European Pharmacopoeia Commission. Europe pharmacopoeia 7.0

[S]. France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe, 2010.

[2] The United States Pharmacopoeial Convention. United States pharmacopoeia[S]. The United States of America: The United States Pharmacopoeial Convention, 2013.

[3] Pei Y, Cai T, Gao H, et al. Comparison of result judgment algorithm of test for interfering factors in the bacterial endotoxins test among Chinese, Japanese, European, American, and Indian pharmacopoeias[J]. Chinese Medical Journal, 2013, 127(15): 2784-2788.

[4] 国家药典委员会. 中国药典 2010 年版 2 部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.

The Chinese Pharmacopoeia Commission. China Pharmacopoeia 2010 Vol II[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010.

[5] Pei Y, Cai T, Gao H, et al. Application of WHO GPCL quality management concept in laboratories for bacterial endotoxin detection[J]. Chin Pharm Affairs, 2013, 27(7): 693-699.

Solutions to treatment for out of specification of bacterial endotoxin test

PEI Yusheng, CAI Tong, ZHANG Guolai, GAO Hua

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract A series of scientific methods are established to confirm the out of specification (OOS) result which is inevitable in daily detection for bacterial endotoxin test. According to the risk factor analysis and work experience, the causes of OOS results are analyzed and details of quality standard and calculation, experimental operation, materials, instruments, etc. are studied. Based on the characteristics of bacterial endotoxin test, a decision flow chart is designed to determine the validation scheme for OOS. All types of causes and solutions for risk factors are determined, and the risk factor fishbone diagram to review OOS and a decision-making flowchart to verify OOS results are established. This work makes the endotoxin test results more scientific and rigorous by using the fish bone diagram of risk factors to review and analyze the causes of OOS and by following the decision-making flow chart to confirm the result.

Keywords bacterial endotoxin test; quality management; out of specification

(责任编辑 田恬)