



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1939—2024

医疗器械细菌内毒素试验方法 重组 C 因子法

Test for bacterial endotoxins of medical devices—Recombinant factor C method

2024-07-08 发布

2025-07-20 实施

国家药品监督管理局 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会(SAC/TC 248)归口。

本文件起草单位：山东省医疗器械和药品包装检验研究院、中国食品药品检定研究院、辽宁省医疗器械检验检测院。

本文件主要起草人：孙令骁、邵安良、余洋、秦越、王小蕾、王诗琪。

引 言

细菌内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁的重要成分,通常由多糖 O 型抗原、核心低聚糖和类脂 A 组成,其中类脂 A 是内毒素的生物活性中心。从临床角度看,内毒素引起的脓毒症、脓毒性休克和多器官衰竭是死亡率较高的全身性疾病。在自然界中,革兰氏阴性菌广泛分布于水(江河和海洋)、空气、土壤和人体中,医疗器械制造过程中的高压蒸汽灭菌、辐照和气体灭菌能够杀灭细菌,但不能灭活内毒素。由于细菌内毒素广泛存在于自然界中,性质稳定并且可以穿透常规的除菌滤膜,因此很难预防细菌内毒素污染。

目前凝胶法和光度测定法是医疗器械细菌内毒素试验最主要的试验方法之一,该方法具有较高的灵敏性、特异性、准确性和经济性,但该方法需要使用大量的鲎血来生产鲎试剂,而东方鲎已成为我国的二级保护动物,因此继续推广使用凝胶法和光度测定法不利于鲎资源的保护和发展。重组 C 因子法是细菌内毒素检查法的一种补充方法,该方法的推广使用,可保护生态环境、减缓鲎资源枯竭速度,且本法不存在 G 因子旁路干扰,具有较高的专属性。

医疗器械细菌内毒素试验方法

重组 C 因子法

1 范围

本文件描述了利用重组 C 因子法检测医疗器械中细菌内毒素含量的试验方法。

本文件适用于对医疗器械进行细菌内毒素的检测。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

C 因子 factor C

鲎试剂中一种对细菌内毒素敏感,且能选择性识别内毒素的蛋白。

3.2

重组 C 因子 recombinant factor C

鲎试剂中的 C 因子(3.1)通过基因重组技术在真核细胞中表达的重组蛋白。

4 试验原理

重组 C 因子法是利用重组 C 因子试剂与内毒素反应过程中的荧光信号变化而测定内毒素含量的方法,重组 C 因子与细菌内毒素结合后被激活,由无活性的蛋白酶原转变成具有生物活性的蛋白酶,识别并催化下游荧光底物产生荧光信号,荧光信号的强度和内毒素浓度成比例。分别测量重组 C 因子试剂和供试品溶液孵育前后的荧光值并校正,通过标准曲线计算出供试品中细菌内毒素的含量。

5 主要设备

荧光酶标仪或多功能酶标仪、电热干燥箱、旋涡混合器等。

6 试剂和材料

细菌内毒素国家标准品或细菌内毒素工作标准品(以下简称“内毒素标准品”)、重组 C 因子试剂盒、细菌内毒素检查用水、移液器、吸头、微孔板。

注 1: 重组 C 因子试剂盒中一般包括重组 C 因子酶溶液、荧光底物、缓冲液等试剂。

注 2: 试验所用耐热器具常用干热灭菌法,用电热干燥箱(250 ℃、至少 30 min)去除可能存在的外源性内毒素;塑料器具如微孔板、与移液器配套的吸头等,选用标明无热原或内毒素含量 <0.005 EU/mL 的器具。

7 供试品溶液的制备

以细菌内毒素检查用水为浸提介质,根据医疗器械的细菌内毒素限值确定浸提介质最大体积。按照公式(1)计算浸提介质最大体积。

$$V = \frac{L}{\lambda} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

V —— 浸提介质最大体积,单位为毫升每件(mL/件);

L —— 产品细菌内毒素限值,EU/件;

λ —— 标准曲线上最低的内毒素浓度(不应低于所用重组 C 因子试剂的标示检测限),EU/mL。

浸提条件一般选择(37±1)℃浸提不少于 1 h,视供试品具体性状,按照如下合适的方法进行供试品溶液的制备。

- a) 采用细菌内毒素检查用水浸泡供试品内腔的方法制备供试品溶液。若存在内腔不易浸泡等情况,宜将供试品剪碎或拆散处理,保证细菌内毒素检查用水充分接触供试品内部。
- b) 将供试品与患者直接或间接接触部分置于无热原玻璃器皿内,必要时可将供试品剪碎或拆散处理,加入细菌内毒素检查用水振摇数次。

供试品溶液贮存不应超过 2 h。对于结构组成复杂的供试品,宜对其拆解后分别进行浸提,收集浸提液,即得供试品溶液。对于液体类产品,宜直接将液体作为供试品溶液。部分供试品溶液制备方法见相应的产品标准,如 GB 18671、YY/T 1282 等。必要时,可使用适宜的酸、碱溶液或缓冲液调节供试品溶液(或其稀释液)的 pH,所用溶剂、酸碱溶液及缓冲液应不含内毒素和干扰因子。

8 试验步骤

8.1 仪器增益调节

荧光酶标仪的荧光信号被转换为电子信号,可使用增益设置或灵敏度设置对该电子信号进行“调谐”。当检测到的信号过弱时,调高仪器的增益/灵敏度设置,或当信号过强时,则调低仪器的增益/灵敏度设置。

重组 C 因子试剂批次改变时,进行仪器增益调节。相对荧光单位(RFU,一种表示荧光信号强弱的单位)的对数与增益的对数相关。因此,可通过分析 0.5 EU/mL 的重复测量值来确定最佳增益。

使用细菌内毒素检查用水将内毒素标准品配制成 0.5 EU/mL 的溶液,加入微孔板中,至少 3 个平行孔,于(37±1)℃的温度下预孵育至少 5 min 后取出,每个孔加入说明书规定比例的重组 C 因子试剂,设置好激发/发射波长后进行孵育,在时间点零时和反应终点时对每孔使用几种不同增益值进行检测。

用反应终点时的 RFU 减去在时间点零时的 RFU 得到 Δ RFU 值,计算平行孔的平均 Δ RFU 值,根据 Δ RFU 值选择最佳增益值。

示例: 荧光酶标仪的 RFU 范围一般为 0~999 99,0.5 EU/mL 内毒素标准品推荐的 RFU 范围为 1 000~10 000,1 000~10 000 的 RFU 范围对应的对数范围是 3~4,对数中点是 3.5。因此,0.5 EU/mL 对应的 Δ RFU 大约为 3 500,选择 Δ RFU 数值接近 3 500 的增益值即为最佳增益值。

8.2 标准曲线的可靠性试验

8.2.1 当使用新批号的重组 C 因子试剂或重组 C 因子法试验条件有任何可能会影响检验结果的改变时,应进行标准曲线的可靠性试验。将内毒素标准品用细菌内毒素检查用水溶解,在旋涡混合器上混匀

15 min 或参照标准品说明书中要求的混匀时间进行操作,制成至少 3 个浓度的稀释液(相邻浓度间稀释倍数不应大于 10),最低浓度不应低于所用重组 C 因子试剂的标示检测限。每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀 30 s 或参照标准品说明书中要求的混匀时间进行操作,每一浓度至少做 3 个平行孔。使用内毒素检查用水作为阴性对照(细菌内毒素含量小于 0.005 EU/mL 的灭菌注射用水),阴性对照应设置不少于 2 个平行孔。

8.2.2 按照重组 C 因子试剂说明书的要求向微孔板中相应的孔内加入一定体积的阴性对照和内毒素标准品,于(37±1)℃的温度下预孵育至少 5 min,取出微孔板,按说明书要求将试剂盒中各试剂按比例混合,每个孔加入一定体积的重组 C 因子试剂,设置好激发/发射波长,读取时间零点的荧光值后进行孵育,孵育完成后再次读数。当阴性对照的 RFU 小于标准曲线的最低点时,可将数据进行线性回归分析。如选择线性回归分析结果,标准曲线的相关系数(r)的绝对值应大于或等于 0.980,试验方为有效。否则重新试验。

8.3 干扰试验

为了确定供试品溶液是否会干扰内毒素和重组 C 因子的反应,进行新产品的内毒素检查试验前应进行干扰试验。选择标准曲线中点或一个靠近中点的内毒素浓度(设为 λ_m),作为供试品干扰试验中添加的内毒素浓度。按表 1 制备溶液 A、溶液 B、溶液 C 和溶液 D。

表 1 干扰试验溶液的配制

编号	内毒素浓度	被加入内毒素的溶液	平行孔数
溶液 A ^a	无	供试品溶液	至少 2
溶液 B ^b	标准曲线的中点(或附近点)的浓度(设为 λ_m)	供试品溶液	至少 2
溶液 C ^c	至少 3 个浓度(最低一点设定为 λ)	细菌内毒素检查用水	每一浓度至少 2
溶液 D ^d	无	细菌内毒素检查用水	至少 2

^a 浸提介质体积不超过公式(1)中浸提介质最大体积的供试品溶液。

^b 加入了标准曲线中点或靠近中点的一个已知内毒素浓度的,且与溶液 A 有相同稀释倍数的供试品溶液。

^c 用于制备标准曲线的内毒素标准品溶液(相邻浓度间稀释倍数不应大于 10),最高浓度和最低浓度应在重组 C 因子试剂的检测限内。

^d 阴性对照。

将试验溶液加入微孔板内,按照 8.2.2 的操作步骤进行试验,按所得线性回归方程分别计算出溶液 A 和溶液 B 的内毒素含量 C_t 和 C_s ,再按公式(2)计算该试验条件下的回收率(R)。

$$R = (C_s - C_t) / \lambda_m \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中:

R ——回收率;

C_s ——溶液 B 的内毒素含量,EU/mL;

C_t ——溶液 A 的内毒素含量,EU/mL;

λ_m ——溶液 B 中加入的标准曲线的中点(或附近点)的内毒素浓度,EU/mL。

当内毒素的回收率在 50%~200%之间,则认为在此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用。

当内毒素的回收率不在上述指定的范围内,若供试品溶液在小于最大浸提体积的情况下对试验有干扰,应对供试品进行不超过最大浸提体积的进一步稀释,除此之外还可通过其他适宜的方法(如过滤、

中和、透析或加热处理等)排除干扰后再重复干扰试验,应确保所选择的处理方法能有效地排除干扰且不会使内毒素失去活性。

当重组 C 因子试剂、产品的配方、结构组成、生产工艺改变或试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时,重新进行干扰试验。

8.4 检查法

按照 8.3 的操作步骤进行试验,获得供试品溶液反应终点和时间零点的 RFU 值。

9 结果计算和评价

9.1 结果计算

反应终点和时间零点的 RFU 的差值为 ΔRFU ,计算平行孔的平均 ΔRFU ,并用阴性对照进行校正,按照公式(3)计算细菌内毒素浓度。

$$\lg(Y) = A \times \lg(X) + B \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

Y —— ΔRFU ;

A ——直线斜率;

X ——细菌内毒素浓度, EU/mL;

B ——直线截距。

注:公式由建立标准曲线获得。

9.2 结果评价与解释

9.2.1 试验应符合以下三个条件方为有效:

- a) 系列溶液 C 的结果应符合标准曲线的相关系数(r)的绝对值大于或等于 0.980 的要求;
- b) 用溶液 B 中的内毒素浓度减去溶液 A 中的内毒素浓度后,计算出的内毒素的回收率在 50%~200% 的范围内;
- c) 阴性对照溶液 D 的 RFU 小于标准曲线最低点的 RFU。

9.2.2 若供试品溶液所有平行孔的平均内毒素浓度乘以稀释倍数后,小于规定的内毒素限值,判定供试品符合规定。若大于或等于规定的内毒素限值,判定供试品不符合规定。

10 试验报告

试验报告中应包含下列信息:

- 供试品名称、规格型号和批号;
- 供试品溶液制备方法;
- 试验条件和试验步骤;
- 试验结果;
- 结果评价;
- 结论。

参 考 文 献

- [1] GB 18671 一次性使用静脉输液针
 - [2] YY/T 0618 医疗器械细菌内毒素试验方法 常规监控与跳批检验
 - [3] YY 1282 一次性使用静脉留置针
 - [4] 中华人民共和国药典
-