维普资讯 http://www.cqvip.com

除，以减少手术损伤。手术强调整块椎板或分段椎板掀起，尽量不用"蚕蚀"法咬除椎板，这样会对脊髓反复刺激、压迫，导致症状加重[4]。除手术技巧外，病程长短与术后恢复有密切关系，病程越长，恢复越慢，效果越差。

【参考文献】

[1] 呼义文，王全平，王哲，等. 尸体胸椎黄韧带骨化的病理观察[J]. 临床与实验病理杂志，1998，14(2)：117－119.
[2] 盛伟斌，艾尔肯.沙德尔，欧阳甲，等. 胸椎黄韧带骨化症的诊断及外科治疗[J]. 中华骨科杂志，2001，21(8)：457－462.
[3] Matsui H, Katoh Y, Tsuji H, et al. Untreated hypophosphate mic vitamin D resistant rickets with symptomatic ossification of the ligamentum flavum[J] J Spinal Disord, 1991, 4(1): 110－113.
[4] 陈仲强，党耕町，刘晓光，等. 胸椎黄韧带骨化症的治疗方法选择[J]. 中华骨科杂志，1999，19：197－200.

（收稿：2003－06－15） （编辑：蒋登金）

细菌内毒素定量检测的影响因素分析及对策

卫 国，郑 江

【关键词】内毒素；鲎试验
【中图分类号】R155.5 【文献标识码】B 【文章编号】1672－5042(2003)03－0215－02

细菌内毒素检查法（简称鲎试验）是利用鲎血变形细胞制成的鲎试剂与微量内毒素产生凝集反应的现象，作为判断样品中细菌内毒素含量是否符合规定的一种方法。其基本原理是利用微量内毒素激活、活化鲎试剂中的C因子和B因子，使凝固酶原转化为凝固酶，成为凝胶样的凝固蛋白[1]，具有简便、迅速、特异性高及灵敏度高等优点。中国药典1995年版已收载，并对鲎试剂、内毒素标准、试验程序、判断标准等作了规定。

我科引进的EDS-99细菌内毒素检测系统可进行动态比浊法和显色基质法检测内毒素，分别利用细菌内毒素与鲎试剂形成凝胶过程中的浊度变化以及反应过程中产生的凝固酶使特殊底物显色，从而定量测定细菌内毒素，并实现对反应的全过程监控。但细菌内毒素检查法还受到许多因素的影响，为提高细菌内毒素检查的质量，在进行细菌内毒素测定时，还应注意下列问题。

1 实验室应具备的条件

实验室必须具备以下条件：足够的清洁空间，稳固的实验台，内毒素检测系统，室内灭菌设施（紫外灯），百级净化工作台，离心机，恒温水浴箱，旋涡式混合器，冰箱，可调微量移液器等。

2 试剂质量

2.1 鲎试剂灵敏度

为了保证检查结果的准确性，用于试验的鲎试剂应首先核对灵敏度。在实际工作中，发现鲎试剂在符合药典规定标准的前提下，由于生产批号不同，部分鲎试剂的实测灵敏度与标示值有差异，导致检测同一检品时用相同标示值的鲎试剂出现不同结果。因此，实验前应复核鲎试剂产品的灵敏度和自身凝集时间，必要时须对鲎试剂进行标化。

2.2 细菌内毒素标准品

细菌内毒素标准品是用于鲎试验时的对照品。它是用世界卫生组织所提供的内毒素国际标准品来标定的，其单位用EU/ml表示。细菌内毒素标准品效价误差或效价不稳定均可影响实验结果。因此，应对细菌内毒素标准品的效价进行标定。

2.3 检测用水

中国药典规定稀释用的细菌内毒素检查用水应达到在(37±1)℃的条件下与0.03 EU/ml鲎试剂混匀24 h内不产生凝集反应的标准。

3 试验器具

用于鲎试剂的器具必须满足以下条件：便于除热原，计量准确，使用、操作方便，对内毒素无吸附作用。试剂厂家提供的专用微量移液器是一种较理想的计量器具，与之配套的除热原的毛细玻管加样头，加样时可直接伸到试管底部，使分装，加样更加准确、方便，是一种理想的试验器具。它和除热源的塑料加样头联用，较好地解决了实验过程中试剂溶解、混合、分装、加样等操作的计量误差。但塑料加样头去除外源性热原较复杂，在实验中我科采用^{60}Co照射2 h去除热源取得良好的效果，但此法一次性使用成本较高。另外，稀释配制内毒素标准时，必须选用对内毒素无吸附作用的容器，最好采用经硅烷化处理的无热原玻璃器皿。反应管也必须经清洗-泡酸-蒸馏水清洗－250 ℃烘烤1 h以上以彻底除热源。

4 受检样品中可能存在的干扰因素

4.1 多糖

1-3-β-D葡聚糖(10 pg/ml)能激活鲎试剂旁路（G途径），使

作者单位：第三军医大学西南医院综合实验研究中心，重庆 400038

维普资讯 http://www.cqvip.com

常规的内毒素实验呈阳性[2]。

4.2 蛋白质

阳离子蛋白如溶菌酶、核糖核酸酶A及人免疫球蛋白G均能与内毒素形成细菌内毒素-蛋白复合体，对细菌内毒素有显著的屏蔽作用而影响鲎法测定细菌内毒素的结果[3]。此外，血红蛋白与LPS结合可改变LPS的一些物理特性，从而增加LPS的生物学活性及LPS与LAL的作用[4]。人血白蛋白、球蛋白、抗凝血酶Ⅲ均可以激活G因子，造成假阳性结果。

4.3 离子

离子对细菌内毒素测定结果影响较大[5]。一方面，高浓度的离子会引起内毒素的聚集，使内毒素不易解聚；另一方面，鲎试剂中的C因子必须在二价阳离子的参与下才能被激活形成活化C因子，当溶液中存在维生素、添加剂、右旋糖酐-40、抗凝血剂如柠檬酸、肝素时，可能干扰鲎试剂形成凝胶。

5 实验操作

5.1 操作熟练程度

实验操作的正确与否和熟练程度，实验中无菌观念和无菌技术是否运用得当等，均可对实验结果产生很大的影响。因此，在实验中严格按照操作规则和无菌要求进行，减少误差的形成。

5.1.1 鲎试剂的取用　取鲎试剂时，轻弹安瓿，使试剂粉末尽量落于安瓿底部，先用砂轮划痕，拭去玻璃粉末后用酒精灯消毒瓶颈，再将颈部折断，使瓶颈有一个整齐的断口。这一操作应避免异物掉入安瓿造成鲎试剂的污染。

5.1.2 鲎试剂的配制　用微量移液器配除热原枪头，按说明精确吸取所需量鲎试验检查用水，沿瓶壁并缓缓转动安瓿使试剂粉末尽量冲至底部，轻轻旋摇使鲎试剂溶解后，用专用微量移液器配除热原的毛细玻管加样头各取100 μl分装于每支试验管备用。

5.1.3 内毒素标准品的配制　操作时必须准确稀释，且充分振荡使内毒素多聚体裂解，使与鲎试剂反应的疏水基团充分暴露。

5.1.4 操作注意事项　双手避免在安瓿或试管上方来回移动，加样后立即放入反应器中，整个操作过程中应迅速，防止微生物的污染，否则易致假阳性的出现。因气泡会使检测光发生折射，导致检测数据及反应曲线失常，因此，操作过程中应避免气泡的产生。

5.2 混合液的pH值

样品液与鲎试剂混合液的pH值对鲎试验的影响较大，根据国内外资料的报道，最适pH为6.0～8.0[7]。pH值过大或过小均可影响鲎试剂与细菌内毒素的反应，必要时可用无内毒素的HCl或NaOH调节pH值。

5.3 反应温度

温度对鲎试剂的灵敏度影响很大。有实验证明，温度在25～41 ℃内，随着温度的升高，鲎试剂的灵敏度也随着升高；在41～46 ℃之间，温度对灵敏度无明显影响；≥48 ℃会破坏鲎试剂[8]。按照药典的要求，温度控制在(37±1) ℃之间，才可获得理想的结果。遵照此要求，本检测系统自动将温度控制在(37±1) ℃。

5.4 保温反应时间

反应时间是动态浊度法进行定量测定的重要参数，反应时间标志着鲎试剂反应的快慢和样品细菌内毒素的含量多少。实验时应遵守我国药典的保温(60±2) min的时间。延长保温时间，会导致鲎试剂的灵敏度的升高，增加假阳性。

5.5 试验检测过程中应防止试管受到振动

鲎试剂与细菌内毒素形成的凝胶受到振动后易变形而被误判为阴性。因此在检测过程中，反应器要放置在固定不易受到振动的地方，检测过程中不可取出观察。

5.6 阴、阳性对照

我国药典规定鲎试验必须做阴、阳对照，阴性对照的目的是检测内毒素检测用水的质量及实验过程中是否有污染，阳性对照的目的是证实实验条件下鲎试剂的活性，所以在实验过程中，阳性对照如阴性，则试验无效，须重做。

【参考文献】

[1] 孙明洁，陈哲生. 影响鲎试验的物质[J]. 上海医学检验杂志，1994，10(1)：47－48.

[2] Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, et al. Limulus test(factor G) and polysaccharides from fungus[J]. Kansenshogaku Zasshi, 1992, 66(8): 1030－1036.

[3] 苑庆华，唐元泰. 细菌内毒素与鲎试验法[J]. 中国药检药理工作通讯，1997，8(1)：32－33.

[4] Roth RI, Kaca W, Levin J. Hemoglobin: a newly recognized binding protein for bacterial endotoxins(LPS)[J]. Prog Clin Biol Res, 1994, 388(2): 161－172.

[5] James F. Cooper resolving LAL testing interferences[J]. J Parent Sci Tech, 1991, 44(1): 13－15.

[6] 杨耀芳，方学明，杨翊雯. 鲎试剂法对甲硝唑注射液中热原的检查[J]. 安徽中医学院学报，1998，17(6)：50－51.

[7] 袁小波，刘穗. 小议鲎试剂法检测细菌内毒素应注意的问题[J]. 中国药业，1998，7(1)：23－24.

[8] 郭录平. 浅谈影响鲎试验的因素[J]. 中国药学杂志，1996，31(3)：227－228.

(收稿日期：2003－07－03)　(编辑：王　林)