

存档标准曲线（ASC）在细菌内毒素检测中的意义和应用

鲎试剂卡片的前世今生

2003年以前，内毒素检测是一项耗时费力的实验室检测项目，涉及到繁杂的试剂、标准品和大量的移液工作，因此，Charles River的科学家们提出开发一种现代化检测方法，以简化检测流程，并节省实验室空间。Endosafe™ LAL鲎试剂卡片由此诞生。该项技术克服了众多障碍，无需用户进行繁琐的试剂复溶与内毒素标准品制备等准备工作，将检测试剂和准备工作集成于一个卡片内，不但易于使用，还提升了检测速度。卡片内含有精准量的鲎试剂、显色底物和内毒素标准品，其组合形式符合药典中细菌内毒素检测（BET）章节对成品放行检测的要求。存档标准曲线（archived standard curve, ASC）是卡片技术的基础，不仅省去了用户制备内毒素标准品稀释液的麻烦（标准品稀释是造成检测偏差和错误的公认原因之一），还可大幅减少开展内毒素检测所需的各项培训、节省操作空间。

卡片技术最先在研发场景中被使用，后于2006年获得美国食品和药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）许可（生物制品许可证编号：1197），准许用于成品放行检测。该项许可和批准推动了卡片技术在业内的广泛应用，以及被全球主要药典接受，有药典称其为一项“证实适用的检测技术”。随着PTS系统和LAL卡片技术的应用日益广泛，我们又推出了可扩展的迭代产品Multi-cartridge System (MCS™) 多通道检测系统与Nexus 200™全自动检测

系统，以满足市场对高通量、自动化和减少人工操作的需求。

鲎试剂卡片并不是首个尝试使用存档标准曲线的BET细菌内毒素检测系统。存档标准曲线（ASC）的使用可以追溯至上世纪80年代推出的首台商用动态BET酶标仪。在设备厂商出版的文章中，Michael E. Dawson博士如此写道，“因此，没有必要对每组样品或每天都制备并分析一条标准曲线。内毒素浓度可以通过之前的标准曲线参数进行计算，前提是在测试时包含了合适的对照。我们把先前制备的标准曲线称作‘存档标准曲线’。”¹随着使用ASC的动态检测系统的发展，FDA在现已废止的1987年《鲎试剂用于人或动物肠外用、生物制品和医疗器械的最终产品内毒素检测验证指南》²和1991年《人用和兽用药品及生物制品临时指南》³中，都提到了ASC的使用，及其当时ASC用于成品常规放行检测所需的合适对照。1987年验证指南规定，“对于显色法和终点浊度法，如果检测实验室已经证明标准曲线的一致性，则无需每组检测都制备内毒素系列标准品”，以及“对于动态浊度法，如果检测实验室已经证明标准曲线的一致性，则无需每天或在确认最终产品污染情况时建立标准曲线”。（1987年时动态显色法尚未开发出来，因此这份于1987年发布的验证指南只提到了动态浊度法。）到1991年FDA发布关于动态法鲎试剂检测的临时指南时，动态显色法已经问世，并被涵盖于该指南中的如下规定：“对于动态检测法，如果检测实验室已

经证明标准曲线的一致性，则无需每天建立标准曲线”。

标准曲线一致性证明

那么，检测实验室应该如何证明标准曲线的一致性呢？1991年临时指南规定，“通过对连续3个检测日生成的标准曲线（至少3条标准曲线）上的数据点进行回归分析，确定标准曲线的一致性。如果相关系数 r 符合附录A中标准，则证明标准曲线具有一致性，该标准曲线即为存档标准曲线”。附录A中规定，“相关系数 r 的绝对值应大于等于0.980”。因此，如果检测实验室可以连续3天生3条标准曲线，且相关系数 r 的绝对值都大于等于0.980，则可以使用ASC。每条ASC仅对特定批次组合的鲎试剂和内毒素工作标准品（CSE）有效，如果其中任一材料发生变化，则需重新建立ASC。

存档标准曲线ASC的历史演变

那么为什么后来ASC的使用并没有广泛的普及？回答这一问题前，需要分析使用ASC所需的对照，并综合考虑当时BET中普遍存在的差异和变数，其中某些差异和变数至今仍然存在。首先，我们深入剖析一下使用ASC所需的对照。一旦实验室达到标准并建立起存档标准曲线，根据当时的要求，需要在日常的检测中加上浓度和ASC中点相同的内毒素标准品对照。使用ASC计算时，该内毒素标准品对照的平均内毒素浓度必须在理论值的 $\pm 25\%$ 范围以内。虽然这听起来不算苛刻，但事实证明，实际操作比看起来困难得多。由此也引出了当年BET中普遍存在的差异和变数。时至今日，各种差异性仍在细菌内毒素检测中有非常大的影响。分析人员及技术之间的差异，所用配件以及酶标仪之间的差异，都令ASC的应用充满挑战。许多实验室都落入了一个陷阱——安排技术最有经验的检测人员建立ASC，然后期望技术生疏的检测人员能够准确使用完成对照 $\pm 25\%$ 的标准目标。其他一些人则选择从至少3条曲线中提取数据并合成一条曲线，再将具体数据手动输入所用软件之中。但无论选择何种方式，问题都始终存在，即生成这些存档

曲线所用的内毒素标准品储液、稀释系列、制备技术、涡旋时间、所用耗材等都与常规检测中所用的标准品对照不同，因此要用标准品对照达成 $\pm 25\%$ 的目标并不容易。当时的酶标仪技术也会影响检测结果。早期动态BET酶标仪的温度均匀度比不上如今的现代化仪器，往往会放大分析人员之间的操作差异性。所有这些问题都会导致无效对照情况经常出现，需要重复多次才能获得有效的检测结果。而当时使用ASC的目的是降低成本和节省时间，我们也就不难理解，为何各大实验室感到挫败并最终没有选择ASC，转而选择在每次检测的同时制备标准曲线。

Endosafe™卡片技术的ASC又有何不同？

Charles River卡片技术中所用的ASC与早期那些所谓的ASC有何不同？为何比每次检测实时生成的标准曲线更加可靠？

标准曲线差异仍是导致BET检测无效的最常见原因之一。上世纪八九十年代就已存在的各种差异如今依然存在。没有哪两位分析人员会一模一样，标准曲线制备方法也不会每次完全相同，自然就会造成标准曲线以及内毒素报告值之间出现不同。不过，目前对标准曲线的唯一监管标准是，相关系数 r 的绝对值必须大于等于0.980。只要符合这一要求，标准曲线就可以视为有效并适合使用。但仅此一项标准就足够了吗？根据药典细菌内毒素检查章节规定，满足此项标准确已足够，但事实是否真的如此？为证明这一点，我们需要了解标准曲线的使用方法及其影响。

动态检测方法利用标准曲线量化样本中的内毒素含量。方法是以标准品中内毒素浓度的对数值为X轴，以其反应时间（光密度增加至预设值所需的时间）的对数值为Y轴绘制标准曲线。由于样本中内毒素含量未知，故需通过将反应时间带入标准曲线上来求得该样本的内毒素浓度。标准曲线斜率和/或Y轴截距稍有变化就会影响未知样本的检测结果，因此标准曲线必须精准可靠。不幸的是，线性度只是一个内部校验标准，不能保证标准曲线精准可靠。原因如图1“有效标准曲线之间的差异示例”所示。同一位分析

师连续5天使用同批次鲎试剂、内毒素工作标准品和制备方法制作了5条标准曲线。所有标准曲线的r绝对值都介于0.9917至1.0之间，符合统一的细菌内毒素检查有效性标准。当把同一样本的反应时间带入全部5条标准曲线后，却得出了5个截然不同的检测结果。究竟哪个结果才是正确的？我们又该如何证明？当然，没有哪个实验室会用同一样本来比对5条标准曲线，那么我们如何确定由任一给定标准曲线得出的报告结果都精确可靠呢？请记住，所有5条标准曲线的r值都完全符合标准，那么，仅凭r值是否就可以判定标准曲线的质量？当然不行，如果不借助外部参照，r值不能单独作为衡量标准曲线质量的标准。

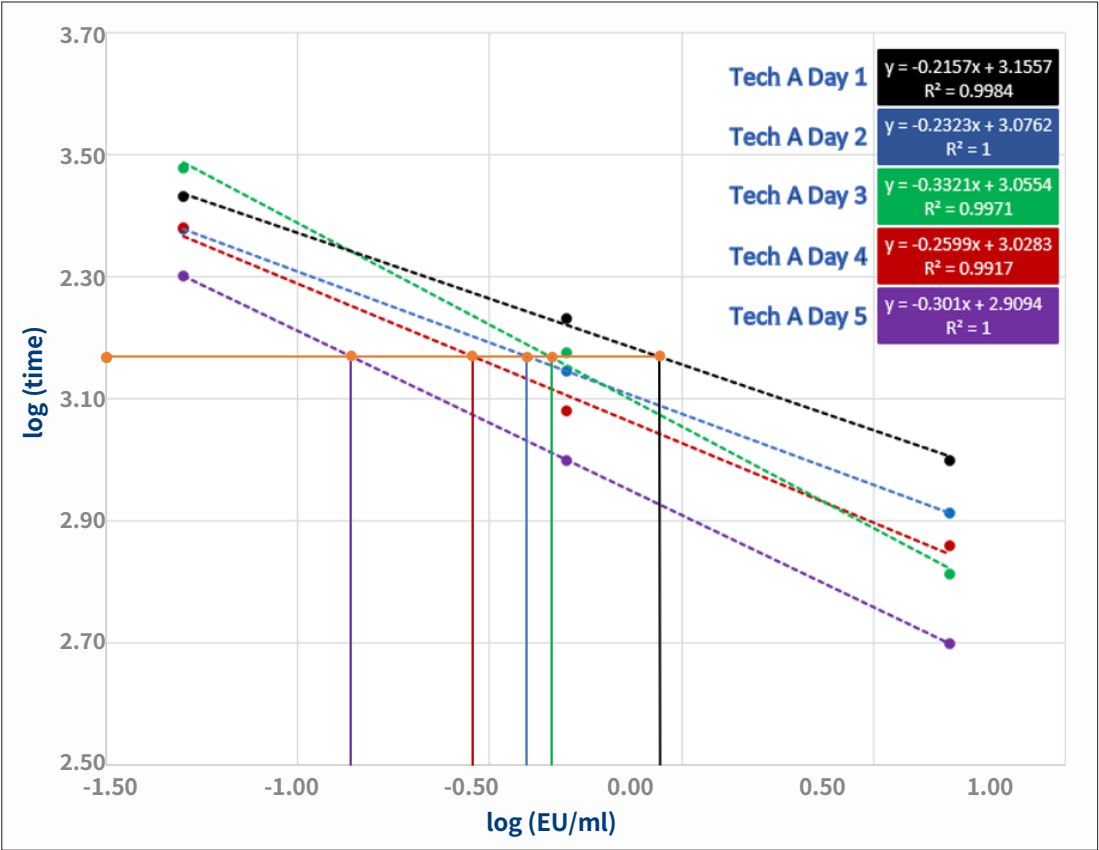


图1：有效标准曲线之间的差异示例

存档标准曲线结合外部参照而不是单纯依靠r值评估标准曲线的精度和准确性，是应对这一难题的可靠解决方案。Charles River卡片技术所采用的ASC也正是通过两项外部参照确保存档标准曲线精确可靠。首先需要生成一条候选存档标准曲线。具体方法是从同批次鲎试剂卡片中挑选15张卡片，批次的前中后段各选5张。然后制备三种不同浓度的内毒素参考标准品（RSE），一式十份，再用选出的15张卡片进行检测，用得出的数据绘制一条标准曲线。该标准曲线的r绝对值必须大于等于0.990，比协调的细菌内毒素检查章节的r值标准更加严格。从该批次鲎试剂卡片中另挑选15张，用细菌内毒素检测用水进行检测，以评估阳性对照和阴性对照结果。同批次各部分（批次前中后）卡片的阳性对照的检测平均浓度必须在总体浓度平均值的±25%以内，所有阴性对照结果必须为阴性。由于阳性对照标准品在卡片生产时已预制在卡片内，故与用于制作标准曲线的RSE是分别制备的，这意味着它是评估ASC是否精准可靠的第一项外部参照。如果上述外部参照有效，则对标准曲线的精度和准确性作

进一步评估。

第二轮评估需从所用同批次卡片中选取45张。并重新制备三个不同浓度的RSE，保证其浓度介于ASC浓度范围之内。检测要求每份RSE溶液的检测值都必须落在相应浓度的总体平均值的±15%以内。重要的是，利用外部制备的内毒素溶液挑战ASC的精度和准确度时，必须使用RSE。用各15张的鲎试剂卡片检测确定的高、中、低三个浓度的RSE溶液。所有45张卡片的检测结果都必须符合样本和加标变异系数（%CV）以及加标回收率的全部适用性标准。3个确定浓度的RSE溶液的检测值都不得超出BET检测的可接受限值范围（图2：ASC精度和准确度测试示例）。此为确认ASC精度和准确度的第二项外部参照。

全部挑战实验都通过，则ASC验证合格，该批次鲎试剂卡片才适合用于放行检测。卡片技术的严格程度远超过其他BET方法的审查，能够让卡片技术用户充满信心，确信其用于样本分析的ASC绝对精准可靠。

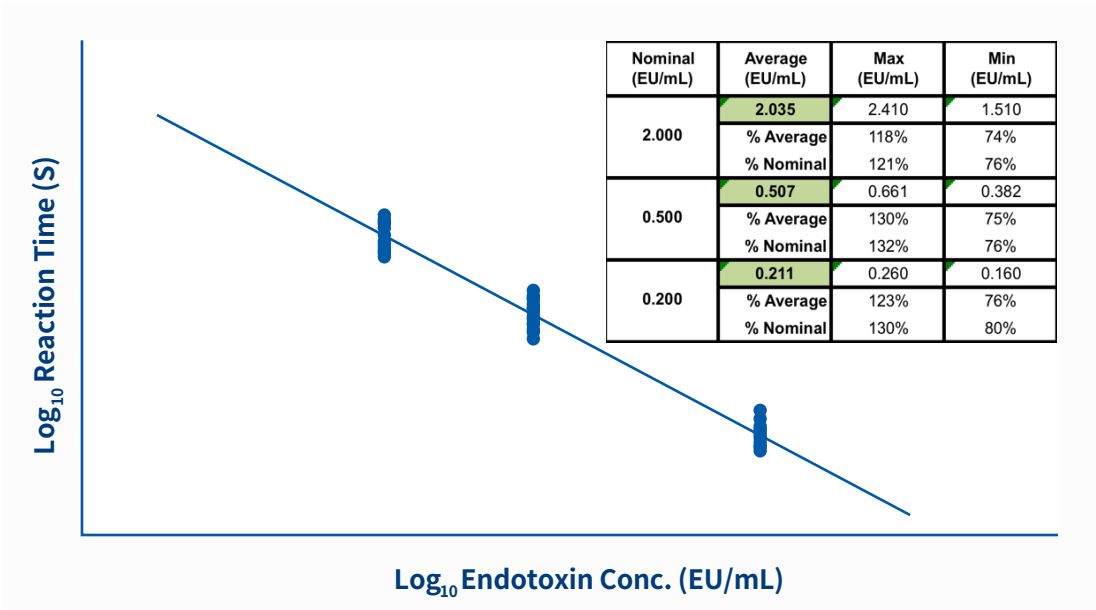


图2：ASC精度和准确度测试示例

如图3（同批次ASC一致性示例）所示，由于同批次每张鲎试剂卡片都使用同一ASC，因此若采用与示例1相同的方式，连续5天使用同批次5张卡片检测同一样本，只要测得的反应时间相同，则每张卡片都会报告相同的内毒素浓度值。卡片技术去除了操作中的各项差异，可以有把握地保证内毒素报告值准确无误。由此，对ASC的各种疑虑已被消除。

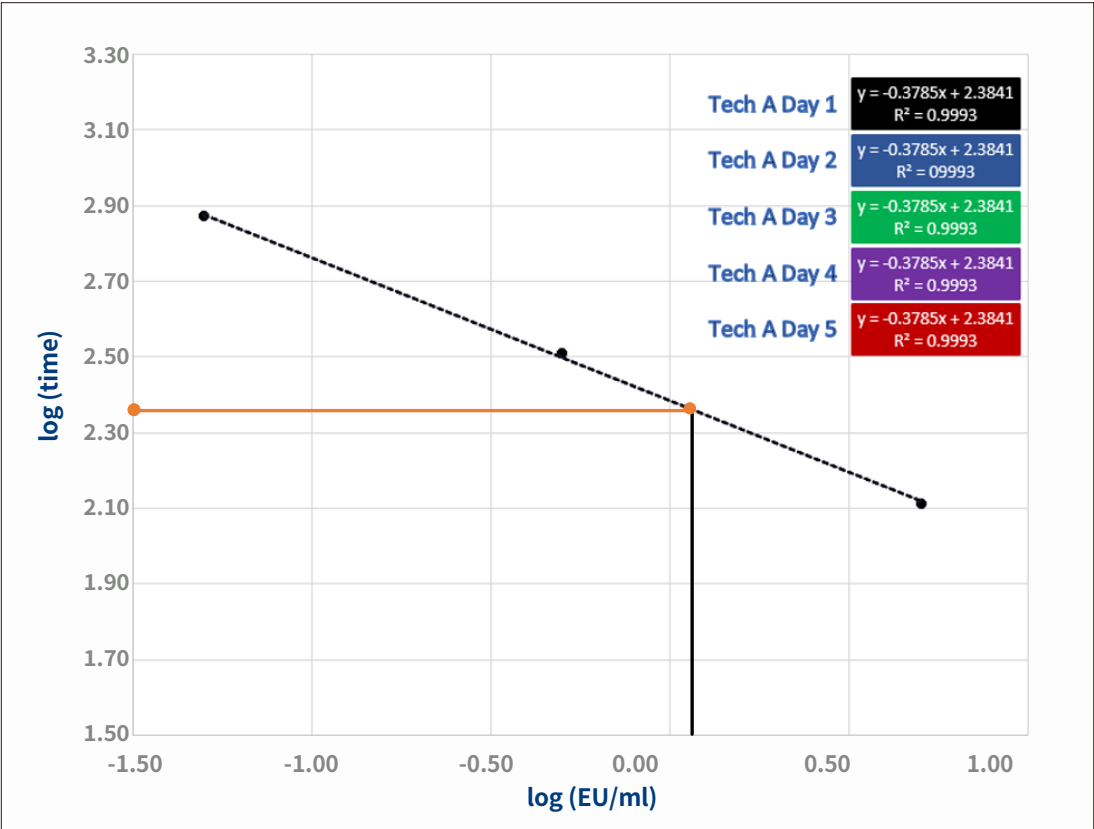


图3：同批次ASC一致性示例。

当外部参照足以证明ASC的精度和准确度时，ASC便可消除普通标准曲线（需在每次检测时新鲜制备并使用）带来的差异性以及对人们的怀疑。Charles River卡片技术采用纳升级制造控制系统，并通过毫秒级仪器进行混合控制和精准温度调节，能够保证所用ASC精确可靠。鲎试剂卡片的ASC信息以校准码形式提供，每批次不同。将校准码输入卡片检测系统后，软件会通过算法将其转换为具体的ASC数据，这些数据会显示在每批次卡片的分析证书（CoA）和检测报告上，“特定批次分析证书”如图4所示。系统会将校准码与同时输入的卡片批号关联并保存起来，这意味着每批次仅需输入一次校准码，之后每次输入与之关联的批号时，软件就会自动检索校准码。批号和校准码都可通过条形码读取器读取，以进一步降低出错风险。

The user of this document is responsible to confirm that this certificate matches the product of interest.

charles river

Endosafe® - PTS™ Cartridges
Certificate of Analysis

Reorder Code: PTS2001F Cartridge Lot #: 3779121 Expiration Date: Oct 2025

Calibration Code: 115346703128 RSE Lot #: HOK354

Archived Standard Curve Range: 1.0 EU/mL Standard Curve Linearity: -0.998

Standard Curve Mean Reaction Times: 1.0 EU/mL 153 seconds
0.1 EU/mL 405 seconds
0.01 EU/mL 887 seconds

Archived Spike Concentration: 0.102 EU/mL Negative Control: PASS

This lot of PTS Cartridges has been tested and meets Quality Control testing requirements for an archived curve, negative controls, and positive product control results.

Store cartridges at 2-25°C. Allow the unopened foil pouch to reach room temperature (20-25°C) for a minimum of 8 hours prior to opening. Refer to Package Insert. Cartridges should be used immediately once the foil pouch seal has been opened. Cartridges are for single-test use only.

CAUTION: DO NOT FREEZE THE CARTRIDGES

Qualified Analyst: M. Slay Date: 11 Oct 2023
Reviewed By: D. E. H. Date: 11 Oct 2023

Charles River Laboratories, Inc.
1023 Wappon Road, Suite 43-B
Charleston, SC 29407, USA

CHA-COA-00010 [3] This document was printed on 11-Oct-2023 1:13 PM Page 1 of 1

图4：特定批次分析证书（CoA）

鲎试剂卡片现已纳入Charles River“产品质量季度监督”计划，该计划还包括经FDA许可的其他产品，如动态浊度（KTA）试剂、动态显色（KCA）试剂和凝胶法试剂等。根据该计划，Charles River必须向FDA提交前一季度生产的所有批次鲎试剂卡片清单，其中包括货号、批号、产品说明、生产日期和最终处置情况。Charles River还必须从前一季度生产的每种货号的鲎试剂卡片中挑选其中一批最终包装样品提交给FDA，并附上注明所有适用测试结果的批放行检查方案。此外，公司还保留实时稳定性数据，且进行了超出标示产品保质期以外的内部研究，以确保鲎试剂卡片和ASC持续稳定。

近年来，随着卡片技术和ASC的成功，市面上也出现了其他使用近似于ASC解决方案的检测系统。具体方式是利用微孔板或盘预装内毒素标准品，以此减轻检测实验室制备标准曲线的负担，但仍需依赖检测实验室在每次检测时准确复溶试剂，且仍然易出现由标准曲线引起的检测差异。因此在这些使用近似ASC方案的系统中，仅凭r值仍然可能无法保证标准曲线的质量。不过这也证明，由于消除标准曲线的内在差异性充满挑战，业内日益希望摒弃由检测实验室自制内毒素标准曲线的做法，而将ASC作为未来检测的标准方法。

卡片技术消除了ASC应用初期导致其没有普及的各项障碍，使得ASC在全球范围内得到成功应用，进而提高了产品质量和患者安全。作为全球最大、最具科学实力的药物研发公司和领先的BET试剂供应商，Charles River凭借深厚的研发实力和内毒素检测研究经验，研究构建了能真正实现ASC的检测系统。

References

1. LAL Update, Use or the LAL-4000 for Product Testing, Michael E. Dawson, Ph.D., June 1986
2. FDA Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices, 1987
3. FDA Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologicals, 1991

charles river

查士利华微生物应用技术(上海)有限公司
sales-msshanghai@criver.cn | www.criver-microbial.cn
客服热线: 021-39739888

