



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

细菌内毒素测定试剂盒

Bacterial Endotoxin Detection Kit

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

请注意本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC 136）归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

引 言

细菌内毒素测定试剂盒的原理是基于《中华人民共和国药典》中的细菌内毒素检查法，系利用鲎试剂来检测或量化由革兰阴性菌产生的细菌内毒素。革兰氏阴性菌脂多糖和细菌内毒素的主要生物毒性组分相同，试剂盒均以鲎试剂为基本原理进行测定，故“革兰氏阴性菌脂多糖测定试剂盒”也适用于本标准。

细菌内毒素测定试剂盒

1 范围

本标准规定了细菌内毒素测定试剂盒的要求、试验方法、标志、标签、使用说明书、包装、运输和贮存等内容。

本标准适用于以鲎试剂光度法为原理进行定量检验所使用的检测试剂（盒），其可对人血清、血浆中内毒素进行定量检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 29791.2 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息（标示）第2部分：专业用体外诊断试剂

3 要求

3.1 外观

应根据产品的包装特点规定适当的外观要求。一般应有试剂盒各组份组成、性状；内、外包装、标签清晰等的要求。

- a) 试剂盒应组份齐全，内、外包装均应完整，标签清晰；
- b) 液体试剂无渗漏；冻干组份呈疏松体，复溶后液体澄清（无肉眼可见颗粒、无沉淀）。

3.2 装量

应符合如下要求之一：

- a) 对于无需抽提直接加样测试的单人份液体试剂，液体试剂的净含量偏差应不超过 $\pm 5\%$ ；
- b) 对于多人份液体试剂，液体试剂的净含量应不少于标示值。

3.3 准确度

- a) 相对偏差：应不超过 $\pm 20\%$ ；
- b) 回收率：应在 $80\% \sim 120\%$ 的范围内。

3.4 线性

生产企业应规定试剂盒的线性区间，并符合如下要求：

- a) 试剂盒线性区间上限应不低于 0.16EU/mL ，下限应不高于 0.04EU/mL ；
- b) 线性相关系数 r 应不小于 0.980 ；

注：若企业采用质量单位，则需明确指出质量单位与EU单位之间的换算关系。

3.5 空白限

空白限应不高于 0.02EU/mL 。

3.6 检出限

检出限应不高于0.03EU/mL。

3.7 重复性

重复测试至少2个浓度水平的样本，所得结果的变异系数应不大于10%。

3.8 批内瓶间差（干粉或冻干试剂）

同批次10瓶试剂间的测试值无显著性差异。

3.9 批间差

批间差应不大于15%。

3.10 分析特异性

制备浓度150pg-200pg/mL的真菌(1-3)- β -D葡聚糖溶液作为干扰物质，加入干扰物质前后的检测浓度差值的绝对值应不超过空白限。

3.11 稳定性

可选用以下方法之一进行验证：

- a) 效期稳定性：生产企业应规定试剂盒的有效期。取到效期后一定时间内的试剂盒检测其准确度、线性、空白限、检出限、重复性、批内瓶间差、分析特异性等，应符合3.3~3.8、3.10的要求；
- b) 热稳定性：取效期内的试剂盒在37℃条件下放置制造商声称的储存时间，检测其准确度、线性、检出限、重复性、批内瓶间差等，应符合3.3~3.8、3.10的要求。

注1：热稳定性不能用于推导产品有效期，除非是采用基于大量的稳定性研究数据建立的推导公式；

注2：根据产品特性可选择 a), b)方法的任意组合，但所选用方法宜能验证产品的稳定性，以保证在效期内产品性能符合标准要求。

4 试验方法

4.1 外观

在自然光下以正常视力或矫正视力目视检查，应符合3.1的要求。

4.2 装量

用通用量具测量，应符合3.2的要求。

4.3 准确度

建议按如下优先顺序，采用下列方法之一测定试剂盒的准确度，应符合3.3的要求：

a) 相对偏差

试剂（盒）测试可用于评价常规方法的有证参考物质（CRM）或其它公认的参考物质 3 次，按公式（1）计算相对偏差（B%）。如果 3 次结果都符合 3.3 a) 要求，即判为合格。如果大于等于 2 次的结果不符合，即判为不合格。如果有 1 次结果不符合要求，则应重新连续测试 20 次，并分别按照公式（1）计算相对偏差，如果大于等于 19 次测试的结果符合 3.3 a)的要求，则准确度符合 3.3 a) 的要求。

$$B = \frac{M - T}{T} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

M — 测试结果；

T — 有证参考物质标示值。

b) 回收试验

在阴性样本基质中加入一定体积的标准溶液(所加标准溶液与阴性样本基质之间的体积比例应不大于 1: 20, 加入标准溶液后样本浓度在临界值附近), 各重复检测 3 次, 取均值。根据公式 (2) 计算回收率 R, 结果应符合 3.3 b) 的要求。

$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

R — 回收率；

C — 阴性样本基质中加入标准溶液后的浓度；

V_0 — 阴性样本基质的体积；

V — 加入标准溶液的体积；

C_0 — 阴性样本基质的检测浓度；

C_s — 标准溶液的浓度。

4.4 线性

用接近线性区间下限的低浓度样本稀释接近线性区间上限的高浓度样本, 混合成至少5个稀释浓度 (x_i)。用试剂盒分别测试以上样本, 每个稀释浓度测试3次, 分别求出每个稀释浓度检测结果的均值 (y_i)。以稀释度 (x_i) 为自变量, 以检测结果均值 (y_i) 为因变量求出线性回归方程。按公式 (3) 计算线性回归的相关系数 (r), 结果应符合3.4的要求。

$$r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad \dots\dots\dots(3)$$

4.5 空白限

用试剂盒测试空白样本(包括缓冲液、细菌内毒素检查用水等), 重复测试20次, 得出20次测量结果, 计算其平均值 ($\bar{x}$) 和标准差 (s), $\bar{x} + 2s$ 应不大于空白限值。

4.6 检出限

制造商应提供试剂盒的空白限、检出限及参考区间等相关信息。根据制造商提供的信息, 对5份浓度近似检出限的低值样本进行检测, 每份样本检测5次, 对检测结果按大小进行排序。低于制造商提供的空白限数值的检测结果的数量应小于等于3个, 即可认为制造商提供的空白限、检出限的设置基本合理, 结果应符合3.6的要求。

4.7 重复性

用试剂盒测试至少两个浓度水平的样本，各重复测试10次，计算测量值的平均值($\bar{x}$)和标准差(s)。根据公式(4)计算变异系数(CV)，结果应符合3.7的要求。

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中：

CV — 变异系数；

s — 10次测量结果的标准差；

$\bar{x}$ — 10次测量结果的平均值。

样本的选择可参考临界值，代表正常值和异常值水平。

注：正常值选择检测浓度低于临界值30%范围以内，异常值选择检测浓度高于临界值30%范围以内。

4.8 批内瓶间差

a) 对于单人份试剂，不适用；

b) 对于多人份试剂，抽取10个样品，每个样品在重复条件下测试3次（2人份试剂测试2次），考虑测量系统随时间等因素引起的随机变异，3次/2次测量采用不同的顺序进行，例如1、3、5、7、9、2、4、6、8、10、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、2、4、6、8、10、1、3、5、7、9/1、3、5、7、9、2、4、6、8、10、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1。按照公式(5)～公式(11)计算 F 。

$$\bar{x}_i = \sum_{j=1}^n x_{ij} / n_i \quad \dots\dots\dots (5)$$

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \bar{x}_i / m \quad \dots\dots\dots (6)$$

$$N = \sum_{i=1}^m N_i \quad \dots\dots\dots (7)$$

$$SS_1 = \sum_{i=1}^m n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2 \quad \dots\dots\dots (8)$$

$$SS_2 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \quad \dots\dots\dots (9)$$

$$MS = \frac{SS}{f} \quad \dots\dots\dots (10)$$

$$F = \frac{MS_1}{MS_2} \dots\dots\dots (11)$$

式中：

$\bar{x}_i$ — 每个样品的测试平均值；

$\bar{x}$ — 全部样品测试的总平均值；

N — 测试总次数；

SS — 方差；

MS — 均方；

f — 自由度；

F — F 检验值。

若 $F <$ 自由度为(f_1 , f_2)及给定显著性水平 α (通常 $\alpha=0.05$)的临界值 $F_\alpha(f_1$, f_2) , 则表明样品内和样品间无显著性差异。

4.9 批间差

用3个不同批号的试剂盒测定临界值附近的样本, 每个批号测试3次, 分别计算每批3次检测的均值 $\bar{x}_i$ ($i=1, 2, 3$)及3批检测结果的总均值, 按公式(12)、公式(13)计算批间相对极差(R)。结果应符合3.9的要求。

$$\bar{x}_T = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \bar{x}_3}{3} \dots\dots\dots (12)$$

$$R = \frac{\bar{x}_{\max} - \bar{x}_{\min}}{\bar{x}_T} \times 100\% \dots\dots\dots (13)$$

式中：

$\bar{x}_{\max}$: $\bar{x}_i$ 中的最大值；

$\bar{x}_{\min}$: $\bar{x}_i$ 中的最小值。

4.10 分析特异性

在阴性样本基质中加入一定体积的真菌(1-3)- β -D葡聚糖溶液(所加溶液与阴性样本基质之间的体积比例应不大于1: 20, 加入溶液后样本真菌(1-3)- β -D葡聚糖浓度在150pg-200pg/mL), 各重复检测3次, 取均值。计算加入干扰物质前后的内毒素检测浓度差值的绝对值, 结果应符合3.10的要求。

4.11 稳定性

可选用以下方法进行验证：

a) 效期稳定性：取到效期后一定时间内的试剂盒按照4.3~4.8、4.10方法进行检测, 应符合3.11 a)

的要求；

- b) 热稳定性试验：取有效期内的试剂盒在37℃条件下放置制造商声称的储存时间，按照4.3～4.8、4.10方法进行检测，应符合3.11 b)的要求。

5 标识、标签和使用说明书

应符合 GB/T 29791.2的规定。

6 包装、运输和贮存

6.1 包装

包装应符合以下要求：

- a) 试剂盒的包装应能保证免受自然和机械性损坏；
- b) 如适用，包装内应附有使用说明书及产品检验合格证，试剂盒应按生产企业的要求包装。

6.2 运输

试剂盒应按生产企业的要求运输。

6.3 贮存

试剂盒应在生产企业规定条件下保存。

参 考 文 献

- [1] GB/T 26124-2011 临床化学体外诊断试剂（盒）
 - [2] GB/T 29791.1 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息（标示） 第1部分：术语、定义和通用要求
 - [3] YY/T 0466.1 医疗器械 用于医疗器械标签、标记和提供信息的符号 第1部分：通用要求
 - [4] CLSI EP17-A, Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline
 - [5] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础. 上海科学技术文献出版社, 2003
 - [6] 尚红. 全国临床检验操作规程. 人民卫生出版社, 2015
-