



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104704369 B

(45)授权公告日 2018.05.25

(21)申请号 201380052504.1

(22)申请日 2013.10.07

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104704369 A

(43)申请公布日 2015.06.10

(30)优先权数据

61/710908 2012.10.08 US

61/710898 2012.10.08 US

61/710990 2012.10.08 US

61/710903 2012.10.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.04.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/063645 2013.10.07

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/058758 EN 2014.04.17

(73)专利权人 通用电气公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 P.C.梅兰森 V.森达雷桑
R.D.戈德克 S.邓

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 徐晶 林森

(51)Int.Cl.

G01N 33/579(2006.01)

B01L 3/00(2006.01)

(56)对比文件

JP 昭61-93958 A,1986.05.12,

EP 0957366 A,1999.11.17,

JP 2004212120 A,2004.07.29,

KOTARO MITSUMOTO ET.AL..novel

endotoxin assay by laser light-scattering
Particle-counting method.《JOURNAL OF
CLINICAL LABORATORY ANALYSIS》.2009,第23卷
(第2期),摘要、第118页左栏第三段到右栏第2
段、第120页、图1、4.

审查员 胡玉连

权利要求书2页 说明书11页 附图3页

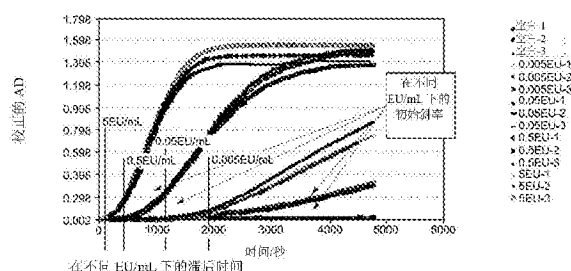
(54)发明名称

用于检测低水平的LAL反应物质的灵敏快速
方法

(57)摘要

本发明提供了用于测量流体样品中的LAL反
应物质浓度的方法和系统。它们包括使水性样品
与检测试剂接触,以形成制备样品。可测量制备
样品的物理性质,以获得制备样品的至少一个样
品测量特征。随后可使用曲线拟合,以基于样品
测量和在溶液的物理质量的至少一种标准物测
量与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立的
关联,预计水性样品在未来的特定时间将具有的
LAL反应物质的浓度。样品测量的质量可使用历
史数据和/或标准物测量加以验证。

从空白到 5 EU/mL 的内毒素水平,在 37°C 下温育 10 分钟,
用 NaOH + DGC 清洗



1. 一种用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的方法,所述方法包括:

- (a) 使所述水性样品与检测试剂接触,以形成制备样品;
- (b) 测量所述制备样品的物理性质,以获得所述制备样品的至少一个样品测量特征;和
- (c) 使用曲线拟合以:

基于所述样品测量和在溶液的物理性质的至少一种标准物测量与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立的关联,预计所述水性样品在未来的特定时间将具有的所述LAL反应物质的浓度;和

使用历史数据和/或所述标准物测量验证所述样品测量的质量;

其中所述物理性质是非线性性质,所述非线性性质选自由反应动力学组成的组并且至少一种反应选自由内毒素反应、葡聚糖反应及其组合组成的组。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述物理性质是选自由下述组成的组中的光学性质:透光率、吸光度、浊度、光散射、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、化学发光、荧光、随着时间过去的吸光度的磁共振、至吸光度中的固定变化的时间、随着时间过去的吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述样品测量的所述质量使用所述非线性性质加以验证。

4. 根据权利要求1所述的方法,所述方法还包括包括所述反应的级联起始的至少一个表观时间延迟作为所述曲线拟合步骤中的变量。

5. 一种用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的方法,所述方法包括:

- (a) 使所述水性样品与检测试剂接触,以形成制备样品;
- (b) 测量所述制备样品的物理性质,以获得所述制备样品的至少两个样品测量特征;和
- (c) 基于所述样品测量和在溶液的物理性质的至少三个标准物测量的非线性行为与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立的关联,预计所述水性样品在未来的特定时间将具有的所述LAL反应物质的浓度;

其中所述物理性质是非线性性质,所述非线性性质基于在所述检测试剂和LAL反应物质之间的反应的已知反应动力学;

其中至少一种反应选自由内毒素反应、葡聚糖反应及其组合组成的组。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述物理性质是选自由下述组成的组中的光学性质:透光率、吸光度、浊度、光散射、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、化学发光、荧光、随着时间过去的吸光度的磁共振、至吸光度中的固定变化的时间、随着时间过去的吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度。

7. 一种用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的系统,所述系统包括:

- (a) 存储器;和
- (b) 与所述存储器可操作地连接的处理器,其中所述处理器按程序工作,以:
 - (I) 接收至少一个输入,所述输入包括样品测量,其中所述样品测量是所述水性样品的测量的物理性质特征;
 - (II) 使用曲线拟合来生成至少一个输出,所述输出包括:

基于所述样品测量和在溶液的物理性质的至少一种标准物测量与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立的关联,所述水性样品在未来的特定时间将具有的所述LAL反应物质

的预计浓度;和

验证的样品测量,其中所述样品测量的质量使用历史数据和/或所述标准物测量加以验证;和

(III) 报告所述输出和/或将所述输出储存于所述存储器中;

其中所述物理性质是非线性性质,所述非线性性质选自由反应动力学组成的组;

其中至少一种反应选自由内毒素反应、葡聚糖反应及其组合组成的组。

8. 根据权利要求7所述的系统,所述系统还包括与所述处理器可操作地连接的光阅读器。

9. 根据权利要求7所述的系统,其特征在于,所述物理性质是选自由下述组成的组中的光学性质:透光率、吸光度、浊度、光散射、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、化学发光、荧光、随着时间过去的吸光度的磁共振、至吸光度中的固定变化的时间、随着时间过去的吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度。

10. 根据权利要求7所述的系统,其特征在于,所述处理器还按程序工作,以包括所述反应的级联起始的至少一个表观时间延迟作为所述曲线拟合步骤中的变量。

11. 一种用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的系统,所述系统包括:

(a) 存储器;和

(b) 与所述存储器可操作地连接的处理器,其中所述处理器按程序工作,以:

(I) 接收至少一个输入,所述输入包括至少两个样品测量,其中所述样品测量是所述水性样品的测量的物理性质特征;和

(II) 使用在溶液的物理性质的至少三个标准物测量的非线性行为与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立的关联,以生成至少一个输出,所述输出包括基于所述样品测量,所述水性样品在未来的特定时间将具有的所述LAL反应物质的预计浓度;和

(III) 报告所述输出和/或将所述输出储存于所述存储器中;

其中所述物理性质是非线性性质,所述非线性性质基于在所述检测试剂和LAL反应物质之间的反应的已知反应动力学;

其中至少一种反应选自由内毒素反应、葡聚糖反应及其组合组成的组。

12. 根据权利要求11所述的系统,所述系统还包括与所述处理器可操作地连接的光阅读器。

13. 根据权利要求11所述的系统,其特征在于,所述物理性质是选自由下述组成的组中的光学性质:透光率、吸光度、浊度、光散射、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、化学发光、荧光、随着时间过去的吸光度的磁共振、至吸光度中的固定变化的时间、随着时间过去的吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度。

用于检测低水平的LAL反应物质的灵敏快速方法

技术领域

[0001] 本发明涉及测定水性样品中的LAL反应物质浓度的领域。更具体而言,本发明涉及LAL反应物质测量方法和系统。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本专利申请享有下述专利申请的利益:于2012年10月8日提交并且名称为MICROFLUIDIC BACTERIA ENDOTOXIN TESTING METHOD AND APPARATUS的美国临时专利申请序列号61/710,908;于2012年10月8日提交并且名称为CENTRIPETAL MICROFLUIDIC PLATFORM FOR BACTERIAL ENDOTOXIN TESTING的美国临时专利申请序列号61/710,990;于2012年10月8日提交并且名称为SENSITIVE AND RAPID METHOD FOR DETECTION OF LOW LEVELS OF ENDOTOXINS USING LAL REAGENTS的美国临时专利申请序列号61/710,898;以及于2012年10月8日提交并且名称为MICROPLATES PRELOADED WITH ENDOTOXIN DETECTION REAGENTS WITH CALIBRATION MEANS的美国临时专利申请序列号61/710,903。所有上文列出的专利申请均以引用的方式并入本文。

背景技术

[0004] 微生物污染例如革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母和真菌可在人中引起严重疾病,甚至死亡。当人们变得被革兰氏阴性菌感染时,该细菌可产生诱导发热的细菌内毒素或内毒素分子。即使当不存在微生物时,内毒素分子也可成为污染源。内毒素分子可为危险的,导致中毒性休克或甚至对人是致命的。

[0005] 在某些行业尤其是制药行业、医疗装置行业和食品行业中的制造商必须满足某些标准,以确保它们的产品不含微生物或内毒素污染。这些行业需要关于内毒素存在的频繁、准确和灵敏的测试,以满足多种安全标准,例如由美国食品与药品管理局或环境保护局(Environmental Protection Agency)设定的安全标准。

[0006] 目前,已开发使用来自鲎的血细胞裂解物的多种测定,用于检测被测试样品中或样品上的内毒素存在。当血细胞裂解物暴露于内毒素时,将发生凝固。血细胞裂解物是由多个鲎物种的血淋巴产生的变形细胞裂解物,所述多个鲎物种包括鲎属(Limulus)、东方鲎属(Tachypleus)和褐鲎属(Carcinoscorpius)物种。常用的变形细胞裂解物由鲎属的血淋巴产生,被称为鲎变形细胞裂解物("LAL")。

[0007] 使用LAL的常规测定包括凝胶凝固测定、终末点浊度测定、动力学浊度测定、终末点生色测定和动力学生色测定。关于这些测定和所使用标准的更多信息可在美国药典("USP")第85章"Bacterial Endotoxins Test"("BET")、日本药典4.01"Bacterial Endotoxin Test"、欧洲药典2.6.14"Bacterial Endotoxins"及其他等价国家药典中找到。另外的国际统一的药典信息可在ICH Q4B Annex 14"Bacterial Endotoxin Test General Chapter"中找到。关于医疗装置中的内毒素测试,信息可在USP第161章"Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices"和ANSI/AAMI ST72"Bacterial endotoxins-Test methods,routine monitoring,and alternatives to batch testing"

中找到。

[0008] 典型的生色和浊度BET测定在孔板中运行,其中吸光度测量通过设计为运行24、96和384孔板的读板器进行。在所有这些情况下,动力学测定需要测量达到指定起始光密度(吸光度)所需的时间。因此,吸光度值对于在单块平板中测试的所有样品和标准物以定期间隔进行测量。随着反应进行,光密度(“OD”)随着时间增加,但不能期望实际测量等于确切指定的起始光密度。对于连续测量的数据需要数据分析,以便计算样品的光密度在其下达且经过指定起始值的时间。此类分析通常涉及在具有小于和大于指定起始值的测量值的两个连续时间标记数据点之间的简单线性内插,或者对接近指定起始值的更多数据点集合的线性或非线性曲线拟合。达到起始OD所需的时间与内毒素浓度反相关,使得低水平的内毒素的测试必然需要更长的测定时间。对于测量与空白(阴性对照)相区分的0.005EU/mL,这通常为一小时或更久,取决于LAL试剂的制造商和类型。

[0009] 浊度测定通常需要比生色测定更久的时间,所述生色测定使用与生色底物结合的可比较的LAL试剂。引入在405nm处具有吸光度峰的生色底物的生色测定可以终末点模式或动力学模式进行。在生色测定中,在405nm处测量的光密度的时间依赖性显示在其期间OD保持接近于零的基本初始期,通常称为“初始滞后时间”。初始滞后时间随后为其中OD开始上升的时期,或“初始斜率”。随着内毒素浓度增加,初始滞后时间变得更短,而OD响应的初始斜率随着内毒素浓度而增加。终末点模式使内毒素水平与在指定时间实现的在405nm处的OD关联。动力学模式使内毒素水平与实现在405nm处的指定起始OD所需的时间关联,所述指定起始OD通常定义为OD=0.2。终末点测定和动力学测定均具有长运行时间,通常大于60分钟,以便获得空白对照和0.005EU/mL或0.001EU/mL的所需检测下限之间的分辨。

[0010] 在其中测定结果需要快速获得的情况下,会因此期望具有在较早时间与的内毒素浓度可靠关联的数据分析方法。像这样,已开发几种方法以在较早时间评估内毒素浓度。

[0011] 一种方法是动态光散射方法,其比目前执行的静态光散射方法更快速地获得来自浊度测定的结果。另一种方法使用仪器,所述仪器使用与时间函数差分法和多系列差分法结合的用于浊度测定的光散射测量,以使测定时间与内毒素浓度关联。另一种方法使用内毒素浓度与在浊度测定中检测的散射光的初始增长率的关联。尽管所有这些方法均可减少获得给定样品的内毒素浓度所需的时间,但它们均依赖预计的关联或线性方法。这些方法也不允许用户使数据与美国药典要求或标准关联。此外,这些方法无一能够警告用户测量中的异常。

发明内容

[0012] 惊讶地发现监控LAL和内毒素反应的反应动力学允许用户在预测可能存在于样品中的任何内毒素的浓度之外验证或评价在样品分析中是否存在异常。一些OD响应例如滞后时间、初始斜率、随着时间过去吸光度斜率的变化速率和针对时间测量的吸光度的最大斜率等,与给定样品中的内毒素浓度良好关联。另外,对于其中达到阈值吸光度所需的时间与内毒素浓度关联的动力学测定,惊讶地发现随着收集吸光度数据,起始时间的预测在动态基础上是可能的。这允许内毒素浓度比达到指定吸光度阈值所需的实际时间更早地计算出来。用于此类预测的策略取决于用于校正的内毒素标准物的浓度范围。相应地,本发明公开了即使在低内毒素浓度下也灵敏快速的方法。该方法可与任何光度法包括浊度和生色方法

一起使用。

[0013] 在一个实施例中,本发明公开了用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的方法。该方法可包括使水性样品与检测试剂接触,以形成制备样品。可测量制备样品的物理性质,以获得制备样品的至少一个样品测量特征。随后可使用曲线拟合,以基于样品测量和在溶液的物理性质的至少一种标准物测量与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立的关联,预计水性样品在未来的特定时间将具有的LAL反应物质的浓度。样品测量的质量可使用历史数据和/或标准物测量加以验证。

[0014] 在另一个实施例中,物理性质可为光学性质。合适的光学性质包括但不限于透光率、吸光度、浊度、光散射、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、化学发光、荧光、随着时间过去的吸光度的磁共振、至吸光度中的固定变化的时间、随着时间过去的吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度。

[0015] 在另外一个实施例中,物理性质可为非线性性质,例如反应动力学。样品测量的质量可使用非线性性质加以验证。反应动力学的类型包括但不限于内毒素反应、葡聚糖反应及其组合。在另一个实施例中,该方法还可包括包括反应的级联起始的至少一个表观时间延迟作为曲线拟合步骤中的变量。

[0016] 在本发明的另一个实施例中,本发明公开了用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的方法,该方法包括使水性样品与检测试剂接触,以形成制备样品。可测量制备样品的物理性质,以获得制备样品的至少两个样品测量特征。可预计水性样品在未来的特定时间将具有的LAL反应物质的浓度。预计的浓度可基于样品测量和在溶液的物理性质的至少三个标准物测量的非线性行为与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立的关联。

[0017] 在另一个实施例中,物理性质可为光学性质。合适的光学性质包括但不限于透光率、吸光度、浊度、光散射、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、化学发光、荧光、随着时间过去的吸光度的磁共振、至吸光度中的固定变化的时间、随着时间过去的吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度。

[0018] 在另外一个实施例中,物理性质可为基于在检测试剂和LAL反应物质之间的反应的已知反应动力学的非线性性质。合适的反应包括但不限于内毒素反应、葡聚糖反应及其组合。

[0019] 在本发明的另一个实施例中,本发明公开了用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的系统。该系统可包括存储器和与存储器可操作地连接的处理器。该处理器可按程序工作,以接收包括样品测量的至少一个输入。样品测量可为水性样品的测量的物理性质特征。该处理器还可按程序工作,以使用曲线拟合来生成至少一个输出。该输出可包括基于样品测量和关联的水性样品在未来的特定时间将具有的LAL反应物质的预计浓度。该关联可在溶液的物理性质的至少一种标准物测量与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立。该输出还可包括经验证的样品测量,其中验证样品测量的质量。质量可使用历史数据和/或标准物测量加以验证。该处理器还可按程序工作,以报告输出和/或将输出储存于存储器中。在另外一个实施例中,该系统还可包括与处理器可操作地连接的光阅读器。

[0020] 在系统的另一个实施例中,物理性质可为光学性质。合适的光学性质包括但不限于透光率、吸光度、浊度、光散射、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、化学发光、荧光、随着时间过去的吸光度的磁共振、至吸光度中的固定变化的时间、随着时间过去的吸光度的最大

斜率和在固定时间后的吸光度。

[0021] 在另外一个实施例中,物理性质可为非线性性质,例如反应动力学。合适的反应包括但不限于内毒素反应、葡聚糖反应及其组合。在另一个实施例中,该处理器还可按程序工作,以包括反应的级联起始的至少一个表观时间延迟作为曲线拟合步骤中的变量。

[0022] 在本发明的另一个实施例中,本发明公开了用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的系统。该系统可包括存储器;和与存储器可操作地连接的处理器。该处理器可按程序工作,以接收至少一个输入。该输入可包括至少两个样品测量,其中所述样品测量是水性样品的测量的物理性质特征。该处理器可使用在溶液的物理性质的至少三个标准物测量的非线性行为与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立的关联,以生成至少一个输出。该输出可包括水性样品在未来的特定时间可具有的LAL反应物质的预计浓度。该处理器还可按程序工作,以报告输出和/或将输出储存于存储器中。在另外一个实施例中,该系统还可包括与处理器可操作地连接的光阅读器。

[0023] 在另一个实施例中,物理性质可为光学性质。合适的光学性质包括但不限于透光率、吸光度、浊度、光散射、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、化学发光、荧光、随着时间过去的吸光度的磁共振、至吸光度中的固定变化的时间、随着时间过去的吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度。

[0024] 在另外一个实施例中,物理性质可为非线性性质。非线性性质可基于在检测试剂和LAL反应物质之间的反应的已知反应动力学。合适的反应包括但不限于内毒素反应、葡聚糖反应及其组合。

附图说明

[0025] 图1显示了本发明的一个实施例,其中标记了在多个内毒素浓度时的初始滞后时间和初始斜率。

[0026] 图2是来自空白水的生色动力学LAL测定的数据流图表。

[0027] 图3显示了空白水的预计起始时间。

[0028] 图4显示了有中断的数据流。

[0029] 图5显示了关于正常和异常数据流的Pearson's r 。

具体实施方式

[0030] 在说明书中几个频繁使用的术语可如下定义。下述定义预期帮助理解本发明,并且不预期使本发明限制于如本文使用的术语。“预测”或“预计”意指评价数量在未来的指定时间将具有的量级。预计可通过本领域普通技术人员已知的任何方法实现,所述方法包括但不限于任何线性或非线性方法,其以这样的方式处理数据,使得信息得到维持并且关于数据在未来时间的行为可作出合适的预测。预计方法包括但不限于曲线拟合和外推及其组合。

[0031] “曲线拟合”意指计算最紧密接近给定数据或给定数据集的曲线。合适的曲线拟合方法包括但不限于使用函数来拟合数据,使用基于使用的反应系统的已知反应动力学的函数,使用幂曲线来拟合数据,使用具有时间偏移的幂曲线,过滤数据以消除噪声或取样效应,变换数据(例如转换为对数),使用最小二乘法,使每个数据点与权重关联以使得点对最

终拟合的显著性基于数据点的权重,基于数据在其下获得的点处的数据内含有的信息计算数据点的权重,基于历史数据计算权重,选择数据流的一部分,曲线拟合源自数据的值(例如曲线拟合数据的斜率或二阶导数)及其组合。

[0032] “外推”意指估计在大于或小于在其下函数值已知的所有点的点处的函数。合适的外推法包括但不限于使用其中分析基于已知函数的参数方法,使用非参数方法,由有限数据系列的回归获得值,由有限数据系列的曲率或其他动态行为获得值,由数据的任何变换包括所有逻辑和数学变换获得值及其组合。

[0033] “生色起始时间”是指定光谱的光吸收或密度改变指定量花费的时间间隔。“生色光密度”是在固定时间后指定光谱的吸收。“生色光密度变化速率”是随着时间过去在吸收中的最大变化。“浊度起始时间”是指定光谱的光散射的量或由于光散射的表观光密度变化改变指定量花费的时间间隔。“浊度水平”是在固定时间后指定光谱的光散射的量或由于光散射的表观光密度变化。“浊度变化速率”是随着时间过去在光散射的量中的最大变化,或由于光散射的最大表观光密度变化

[0034] 由在反应完成前获取的数据预测LAL和内毒素反应的结果基于其动力学行为。这依次又基于它的化学途径,即通过先前步骤活化的酶级联。结果通过幂函数或具有延迟的幂函数紧密估计。此类分析还可用于确定数据流是否来自正常反应,或是否发生异常情况例如气泡形成并且测定应被否决。

[0035] LAL试剂是酶原(当活化时变成酶的蛋白质)、相关因子和抑制剂的混合物。由于它由其收集的蜚群体中的变化和制备中的差异,每个批次均是独特的。主要组成成分是因子C,所述因子C通过内毒素活化并且变成经酶活化的因子C,所述经酶活化的因子C依次又活化因子B。经活化的因子B活化前凝固酶,所述前凝固酶依次又引起凝固蛋白原的凝固(用于浊度测定)或颜色的变化(用于生色测定)。

[0036] 酶级联的动力学在“The Kinetics of Enzyme Cascade Systems”中,通过Hemker和Hemker在The Procedures of the Royal Society, B(Biological Sciences), 173, 411-420 (1969)中讨论。对于其中活化酶稳定的开放级联,最简单的模型具有作为时间的幂函数形成的产物。

[0037] $[P] = at^b + [P_0]$

[0038] 其中P是级联产物(生色指示剂或凝固的凝固蛋白原); P_0 是初始水平;t是反应时间;并且a和b是常数。

[0039] 实际上,反应动力学更复杂。因子C的活化可来自内毒素与多个活化位点的结合,其中中间产物结合改变结构和以后的键合亲和力。该变构调节延迟因子C的活化,其自身可简单建模为经过相对短的时间段,内毒素由经活化的因子C的替换。整个过程可建模为大致等价于该转变发生花费的平均时间的延迟。不存在来自该第一步骤的内毒素浓度的“扩增”,但在以后步骤中产生的酶全部由于连锁反应而快速增加。

[0040] 存在LAL活化的两个途径。一个途径是内毒素途径且具有三个级联步骤。因此,内毒素途径的反应动力学大约是三阶幂函数。第二途径是通过因子G的葡聚糖途径。葡聚糖途径仅具有一个级联步骤,并且反应动力学更接近于线性函数。在许多样品中,将不存在可检测的葡聚糖,并且反应动力学将是内毒素途径的那种,或更高阶幂函数。在更复杂的样品中,两个途径均被活化,其中动力学变得更复杂。能够通过其动力学标记分开两者的活性,

但行业公认的实现这点的方法是通过以化学方式抑制途径之一。

[0041] 然而,惊讶地发现监控内毒素和葡聚糖动力学标记两者可用于确定哪种行为是“正常的”,而哪种可通过其他因素例如光路中的移动颗粒或增长的气泡引起。这允许用户在预测可能存在于样品中的任何内毒素或葡聚糖的浓度之外,验证数据或评价在样品分析中是否存在异常。

[0042] 如本文使用的“验证”意指证实分析的质量,确认分析的质量,或建立分析或分析进展的确定性。当验证分析和/或样品测量的适合性时,可使用美国药典方法,其中至少两个阳性对照(在校正范围中间处用LAL反应物质掺料的样品)、三个阴性对照(空白)以及由制造商或美国药典指定的任何其他参数。阳性产物对照掺料必须满足美国药典要求(50%-200%掺料获益率),阴性对照(最低水平和空白之间的差异,其中空白具有更低的响应水平)以及制造商规格(例如在0.005EU/mL样品和空白之间的差异,或关于某些标准物的起始时限)。如果这些分析是成功的,则它们验证系统和试剂正按规范操作,并且样品测量是“经验证的”。验证数据流意指数据流的行为统计上对应于基于历史测量数据的预期行为或在检测试剂和LAL反应物质之间的反应的已知反应动力学。这显示数据流通过基于LAL反应在分析室中的变化生成,而不是基于一些异常例如气泡在室或光路中的变化生成。最终该区分自身将通过对不同试剂和批次的多重测试和诱导的异常加以验证,以证实其操作,包括但不限于样品临界光学性质空白读数、混合的样品/试剂/任选的LAL反应物质、初始光学读数、临界光学性质的变化和变化速率的平滑性、与理论预期变化拟合的紧密性、关于数据的噪声水平的期望值等等。如果测试结果看起来不正确,则测试过程可被停止并且可发送错误信息,而不产生LAL反应物质测量结果。同样地,如果测试结果作为输出出现,则测试结果和或样品测量是“经验证的”。

[0043] 还惊讶地发现一些OD响应,例如随着时间过去的吸光度、起始时间、随着时间过去吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度,与给定样品中的内毒素浓度良好关联。相应地,本发明公开了即使在低内毒素浓度下也灵敏快速的方法。该方法可与任何光度法包括浊度和生色方法一起使用。

[0044] 在一个实施例中,本发明公开了用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的方法。该方法可包括使水性样品与检测试剂接触,以形成制备样品。可测量制备样品的物理性质,以获得制备样品的至少一个样品测量特征。随后可使用曲线拟合,以基于样品测量和在溶液的物理性质的至少一种标准物测量与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立的关联,预计水性样品在未来的特定时间将具有的LAL反应物质的浓度。样品测量的质量可使用历史数据和/或标准物测量加以验证。

[0045] 在另一个实施例中,物理性质可为光学性质。合适的光学性质包括但不限于透光率、吸光度、浊度、光散射、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、化学发光、荧光、随着时间过去的吸光度的磁共振、至吸光度中的固定变化的时间、随着时间过去的吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度。

[0046] 在另外一个实施例中,物理性质可为非线性性质,例如反应动力学。样品测量质量可使用非线性性质加以验证。反应动力学的类型包括但不限于内毒素反应、葡聚糖反应及其组合。在另一个实施例中,该方法还可包括包括反应的级联起始的至少一个表观时间延迟作为曲线拟合步骤中的变量。

[0047] 在本发明的另一个实施例中,本发明公开了用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的方法,该方法包括使水性样品与检测试剂接触,以形成制备样品。可测量制备样品的物理性质,以获得制备样品的至少两个样品测量特征。可预计水性样品在未来的特定时间将具有的LAL反应物质的浓度。预计的浓度可基于样品测量和在溶液的物理性质的至少三个标准物测量的非线性行为与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立的关联。

[0048] 在另一个实施例中,物理性质可为光学性质。合适的光学性质包括但不限于透光率、吸光度、浊度、光散射、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、化学发光、荧光、随着时间过去的吸光度的磁共振、至吸光度中的固定变化的时间、随着时间过去的吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度。

[0049] 在另外一个实施例中,物理性质可为基于在检测试剂和LAL反应物质之间的反应的已知反应动力学的非线性性质。合适的反应包括但不限于内毒素反应、葡聚糖反应及其组合。

[0050] 本发明可在计算机上执行,所述计算机包括CPU、主存储器、I/O资源和用户界面例如显示器、手动操作的键盘、鼠标和打印机。任选地,显示器可为触摸屏。计算机可为手提式装置。相应地,本发明还公开了用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的系统。计算机可与光阅读器可操作地连接。在一个实施例中,光阅读器(未示出)包括固定的光学部件。固定的光学部件可包括低成本LED和光电二极管。阅读器可包括带通滤波器,以增加光学测量的准确度。阅读器还可被调节或电子调制(electronically chopped),以提供光学噪声的减少、拒绝环境光和拒绝杂散光。阅读器还可包括多路光学部件,使得监控点矩阵可具有用于每行或每列的单一部件,并且使用时间多路阅读方案以降低部件成本。光学部件例如窗、暗视场、光圈、透镜、反射镜或扩散器还可并入微流体液筒自身内,以提供光路的一部分或增加系统的稳定性或灵敏度。

[0051] 合适的阅读器可使用或执行多种光学传感方法和测量,包括但不限于透射、吸收、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、浊度、散射光、化学发光和荧光。

[0052] 感测的光可具有单一波长或光谱带,或多重波长或带。多重光带可用于增加信号或减少干扰和噪声。例如,在多个频率下监控光密度变化可减少不稳定样品颜色的干扰。使用的感测方法可能能够远程感测流体中的变化,包括更复杂的光学方法例如拉曼光谱、磁共振和表面等离子体共振,以及非光学方法例如电容、粘度、磁性、声波阻力和声波折射。

[0053] 在本发明的另一个实施例中,本发明公开了用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的系统。该系统可包括存储器和与存储器可操作地连接的处理器。该处理器可按程序工作,以接收包括样品测量的至少一个输入。样品测量可为水性样品的测量的物理性质特征。该处理器还可按程序工作,以使用曲线拟合来生成至少一个输出。该输出可包括基于样品测量和关联的水性样品在未来的特定时间将具有的LAL反应物质的预计浓度。该关联可在溶液的物理性质的至少一种标准物测量与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立。该输出还可包括经验证的样品测量。样品测量的质量可使用历史数据和/或标准物测量加以验证。该处理器还可按程序工作,以报告输出和/或将输出储存于存储器中。报告可为在上文描述的显示器上的视觉显示。报告还可为来自如上所述的打印机的打印输出。在另外一个实施例中,该系统还可包括与处理器可操作地连接的光阅读器。光阅读器可对处理器提供包括至少一个样品测量和/或至少一种标准物测量的输入。

[0054] 在系统的另一个实施例中,物理性质可为光学性质。合适的光学性质包括但不限于透光率、吸光度、浊度、光散射、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、化学发光、荧光、随着时间过去的吸光度的磁共振、至吸光度中的固定变化的时间、随着时间过去的吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度。

[0055] 在另外一个实施例中,物理性质可为非线性性质,例如反应动力学。合适的反应包括但不限于内毒素反应、葡聚糖反应及其组合。在另一个实施例中,该处理器还可按程序工作,以包括反应的级联起始的至少一个表观时间延迟作为曲线拟合步骤中的变量。

[0056] 在本发明的另一个实施例中,本发明公开了用于测量水性样品中的LAL反应物质的浓度的系统。该系统可包括存储器;和与存储器可操作地连接的处理器。该处理器可按程序工作,以接收至少一个输入。该输入可包括至少两个样品测量,其中所述样品测量是水性样品的测量的物理性质特征。该处理器可使用在溶液的物理性质的至少三个标准物测量的非线性行为与其中的LAL反应物质的已知浓度之间建立的关联,以生成至少一个输出。该输出可包括水性样品在未来的特定时间将具有的LAL反应物质的预计浓度。该处理器还可按程序工作,以报告输出和/或将输出储存于存储器中。在另外一个实施例中,该系统还可包括与处理器可操作地连接的光阅读器。

[0057] 在另一个实施例中,物理性质可为光学性质。合适的光学性质包括但不限于透光率、吸光度、浊度、光散射、光密度、颜色、颜色值、色调、光谱、化学发光、荧光、随着时间过去的吸光度的磁共振、至吸光度中的固定变化的时间、随着时间过去的吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度。

[0058] 在另外一个实施例中,物理性质可为非线性性质。非线性性质可基于在检测试剂和LAL反应物质之间的反应的已知反应动力学。合适的反应包括但不限于内毒素反应、葡聚糖反应及其组合。

[0059] 本文公开的方法使用统计关联,开放式方法,其显示使样品的测量与已知的内毒素浓度或源自这些测量的因子关联的统计上有效的方法,以预计其中内毒素浓度未知的内毒素浓度。此类测量可包括诸如起始时间、随着时间过去的吸光度的最大斜率和在固定时间后的吸光度的测量。另外的测量或因子可包括但不限于时间对光密度、时间对被过滤光密度(滤波器-使用多种方法以减轻变化或噪声对信号的作用,在这种情况下,随着时间过去的光密度,最简单的是求平均值和“数据平滑化”方法(包括数字滤波器、区段回归和拒绝异常值)、响应的斜率、过滤了的响应的斜率、响应的二价导数、被过滤响应的二价导数、响应的更高阶导数、被过滤响应的更高阶导数、响应的曲率(以其最简单的形式,为多种导数的关系)、被过滤响应的曲率、来自对响应进行曲线拟合的方程式的因子(例如,对于简单回归,为截距)、来自对过滤了的响应进行曲线拟合的方程式的因子、其他数据流因子例如导出值斜交、积分总和或矢积、来自对基于指定权重的响应进行曲线拟合的方程式的因子及其组合。如上所述,数据集或每个数据点可指定权重,使得点对最终拟合的显著性基于数据点的权重。权重可基于因素进行指定,所述因素包括但不限于显著性、变化、信息流和凭经验测试。

[0060] 另外,数据的质量可通过对随着时间过去的响应进行曲线拟合来进行评估。合适的曲线拟合方法包括先前列出的方法。

[0061] 在另一个实施例中,本发明公开了用于以预测方式分析来自基于LAL的测定的数

据的方法。预测可包括监控光学响应针对时间的动态线性斜率。线性斜率可在从测定开始到目前时间的所有数据点上进行测量。在另一个实施例中,线性斜率可在目前时间之前的更小数目的连续数据点上进行测量。选择的连续数据点数目可基于所需内毒素检测范围而改变。在另一个实施例中,可使用至少三个连续数据点来测量斜率。在另外一个实施例中,斜率可用超过三个但小于七个连续数据点进行测量。作为另外一种选择,连续数据点的数目大于七。

[0062] 在另外一个实施例中,测量的线性斜率可对于随着时间过去测量的三个或更多个连续数据点的最近收集的集合不断更新。线性斜率的阈值可与内毒素水平关联。线性斜率的阈值的范围可为约0.00001至约0.00005光密度单位/秒。

[0063] 线性曲线拟合或更高阶曲线拟合算法可应用于在斜率达到预定阈值后的原始光学响应数据。作为另外一种选择,曲线拟合算法可应用于在原始响应达到指定起始值百分比后的原始响应数据。

[0064] 关于阈值光学响应的预测起始时间可基于样品容器的几何形状重新定义。例如,阈值OD值对于在典型的96孔板实验中的动力学生色测定设为0.2。OD值可对于其他几何形状例如当使用微流体液筒时适当地重新定义。

[0065] 预测的起始时间可使用线性或更高阶函数进行计算,以拟合原始响应数据。在另一个实施例中,预测的起始时间可随时间不断更新,并且根据预测中的适当汇聚标准报告。在另外一个实施例中,预测的起始时间与内毒素水平关联,并且检查响应的线性,与测量的起始时间一样。在另外一个实施例中,预测的起始时间对于相同样品的重复进行计算。预测的起始时间还可对于来自相同样品的阳性掺料回收实验的重复进行计算。在另外一个实施例中,预测的起始时间对于用于校正的标准物的重复进行计算。预测的起始时间还可对于对照掺料回收实验进行计算,以验证计算的校正方程式。在另外一个实施例中,动态线性斜率计算和预测的起始时间计算用于验证收集的光学响应数据的质量。例如,验证光学响应数据的质量可在数据中发现异常。此类异常可通过多种条件引起,所述条件包括但不限于由于原位气泡形成在光学响应数据中的中断、反应孔与阅读器光路的未对准、或样品阅读器中的间断性/系统性机械故障。

[0066] 实例

[0067] 关联方法

[0068] 下述实例描述了LAL测量测试的关联方法。还描述了LAL测量测试程序和这些测试程序的结果。样品如动力学生色方法中制备。对于该方法,水性内毒素溶液以多个浓度(0.005内毒素单位(“EU”)/ml、0.05EU/ml、0.5EU/ml和5EU/ml)进行制备。还制备不含任何内毒素的溶液或空白且用作对照溶液。随后使溶液在37℃下温育10分钟。在温育后,将每个内毒素浓度和空白分配(一式三份)到用NaOH和脱氧胆酸盐清洁的样品支架中。

[0069] 随后使用分光光度计经过一小时在405nm处测量每个样品的光密度或吸光度。还测量了起始时间或每个标准物达到0.2的吸光度所需的时间。使用Perkin Elmer 1420多标记计数器记录测量。一旦所有测量均收集且记录,就标绘随着时间的样品吸光度变化。

[0070] 在多个浓度下的OD响应的初始滞后时间和初始斜率得自曲线且显示于图1中。这些初始滞后时间和初始斜率可与给定样品中的内毒素浓度良好关联。相应地,可使用这些初始滞后时间和初始斜率生成校正曲线。

[0071] 当样品以与用于生成校正曲线的样品相同的方式进行处理时,生成的校正曲线可用于测量目标样品中的内毒素浓度。

[0072] 预计和验证

[0073] 如上所述,监控内毒素和葡聚糖动力学标记两者允许用户在预测可能存在于样品中的任何内毒素或葡聚糖的浓度之外,验证或评价在样品分析中是否存在异常。实际的级联反应还具有抑制每种酶的一种或多种因素。内毒素级联是4步级联,而葡聚糖级联是2步级联。然而,内毒素和葡聚糖反应两者均具有影响其动力学的抑制因素。在鲎中,这些因素阻止凝固直至达到阈值时,这使得它们对于分析系统是不期望的,因为阈值限制灵敏度。试剂处理的一部分是去除这些因素,所述因素由于制造商和批次而改变。对动力学的作用最简单建模为对每种反应的次序的分数调整。实际上,确切程度并不重要,因为可使用多种数学技术,其利用其中反应动力学是模型的幂函数的行为。

[0074] 这些简化模型可用于指定用于测定的早期解答的待拟合的函数,以验证数据流通过LAL反应而不是一些异常或错误而生成,并且确定响应是否是统计上相似的。虽然通过使得它们更复杂而始终可制备更代表实际行为的模型,但具有更有限的变量集合的更简单模型的优点使得这些成为此类数学分析优选的模型。

[0075] 实例-用于预计起始时间的幂曲线函数

[0076] 对于生色或浊度动力学测定,均随着时间过去测量光密度。用作内毒素水平的量度的起始时间是在其下LAL反应已在光密度或吸光度中改变指定量的时间。通常,该时间通过在其期间超过该水平的测量点之间的内插进行计算。当反应仍未达到其终末点,但已显示由其初始状态的足够变化以与本底噪声相区分时,它的结果可与幂函数拟合,以预计它的未来表现,包括起始时间。

[0077] 预计未来反应表现可通过获得从在其下响应大于由噪声带来的正常变化的点到它最后记录的值的的数据区段来完成,并且将光学响应中的变化和时间转换为对数。幂函数在对数-对数转换后是线性的,因此与这些数据的最佳线性拟合可用于拟合它们。权重可基于几个方案给予这些数据的拟合,包括其对最终结果的显著性。

[0078] 图2是来自在具有3.1mm径长的10uL小室中的空白水的生色动力学LAL测定的数据流的图表,其中吸收值每30秒进行测量。用于内毒素水平的校正和计算的起始时间是光密度变化达到0.1吸收单位花费的时间。该阈值在约4500秒(75分钟)时超过。因为数据是略微有噪声的,所以不同内插方法给出略微不同的答案,其中4514秒是其平均值。

[0079] 预计起始时间可通过使最后20个数据点(10分钟读数)与幂曲线拟合进行预计,其中使用时间和吸收变化两者的对数值的线性回归且解答拟合曲线达到阈值的点。所得的预计起始时间显示于图3中

[0080] 同样如图3中所示的实线代表4514秒起始时间阈值 $\pm 1.0\%$ 且形成误差带。预计起始时间(具有菱形符号的线)在3000秒后的误差带内。使用对于至少2个连续读数大于0.999的皮尔森积差相关系数("Pearson's r"),预计起始落入在分析3300秒时的误差带内。因此,分析时间减少超过1200秒或20分钟。此外,诱导的误差小于平行运行的相同空白测试的正常变化(通常超过2%),以及用于正常或空白水分析的适当精确的答案。

[0081] 实例-具有延迟的幂曲线

[0082] 使用用于终末点预计的幂函数的简单但更准确的变化是包括由于内毒素水平转

变为因子C活性的级联起始的表观时间延迟,和级联步骤延迟。因为每一个批次将是不同的,所以固定时间延迟的不如可改变的时间延迟受到期望。

[0083] 此方法涉及拟合其中时间延迟是另外的变量的方程式。这使分析基本上复杂化,从而导致不能代数解答的方程式。更简单的方法是计算不连续时间延迟偏移数据流,且使用Pearson's r和在其中它们跨越范围最平衡分布的残差平衡来确定哪个具有最佳拟合。

[0084] 如上的相同数据集可用时间延迟进行测试,或在取对数转换前从实际时间中扣除0、30、60、90、120、150、180、210和240秒的时间。在1200秒时间后,使用Pearson's r和残差平衡两者的最佳拟合用120秒延迟偏移实现。对于四舍五入至4530秒的起始时间值,Pearson's r值标准在2610秒时满足。这是1920秒或32分钟减少。

[0085] 如果使用90或150秒延迟,则结果有点不太准确,但相似。为此,已发现测试紧密间隔的延迟时间不是必要的,并且大致间隔例如30秒是合适的。发现“最佳”延迟时间不如获得代表性稳定拟合重要,所述拟合将有效减少噪声同时维持信号。

[0086] 实例-数据流验证

[0087] 如果函数良好描述数据流,则更新的数据点将引起拟合函数在解答上的会聚。如果解答不会聚,则函数未良好描述数据。这可用作就有效性检查数据流的较简单方法之一。

[0088] 例如,如果其中光密度变化和时间两者的数据均已转换为对数且与简单幂函数拟合,则斜率和截距的顺次解答之间的差异应随着时间过去变得更小。如果斜率和截距解答不变得更小(会聚),则数据流被非级联效应破坏。可将极限置于来自历史数据的会聚,并且如果此类极限以统计上不太可能的方式被超过,则测定可因此被拒绝。

[0089] 为了验证数据流,将异常加入如上相同的数据集中。异常是来自在相似小室中的不同测定的实际光学异常,其中颗粒、气泡或一些其他现象破坏光路。如果没有破坏,则随着时间进展,对于20个点(10分钟)的拟合的数据流的Pearson's r会聚至1.00。具有破坏,则它开始如图4中的数据流所示立即偏离。因此,可设置1.00的Pearson's r的极限值,以区分对应于正确反应动力学的数据和对应于异常的数据。这在如图5中所示的“正常”和“异常”数据流中可见。

[0090] 该书面说明书使用例子包括最佳模式来公开本发明,并且还允许本领域任何技术人员实施本发明,包括制备且使用任何装置或系统且执行任何引入的方法。本发明的专利范围通过权利要求限定,并且可包括本领域技术人员想到的其他例子。如果此类其他例子具有并非不同于权利要求的文字语言的结构元件,或如果它们包括与权利要求的文字语言具有非实质差异的等价结构元件,则它们预期在权利要求的范围内。

从空白到 5 EU/mL 的内毒素水平，在 37°C 下温育 10 分钟，
用 NaOH + DOC 清洁

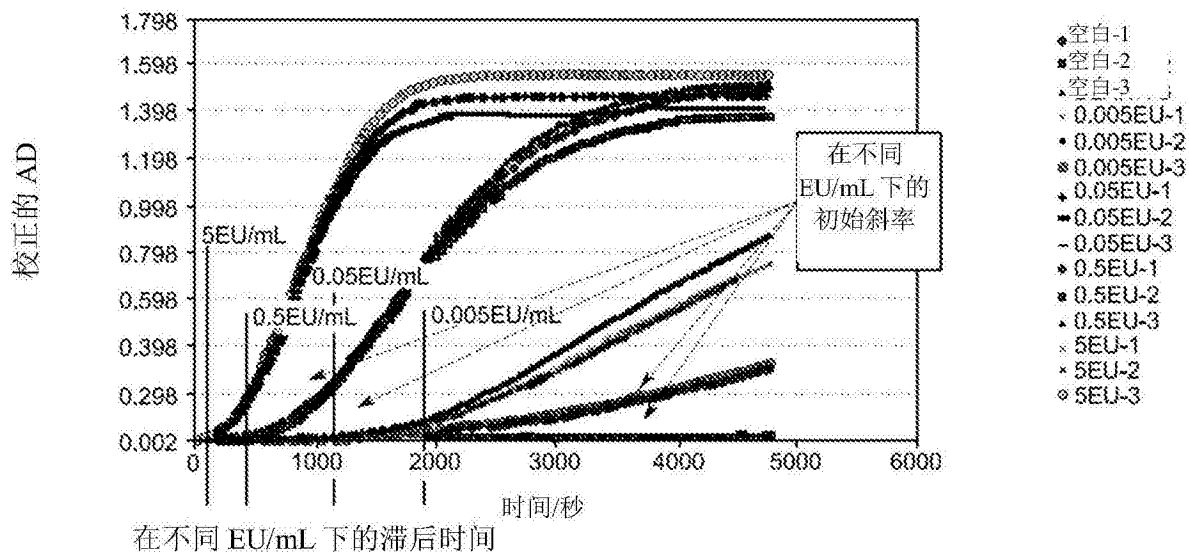


图1

空白水的 LAL 测定

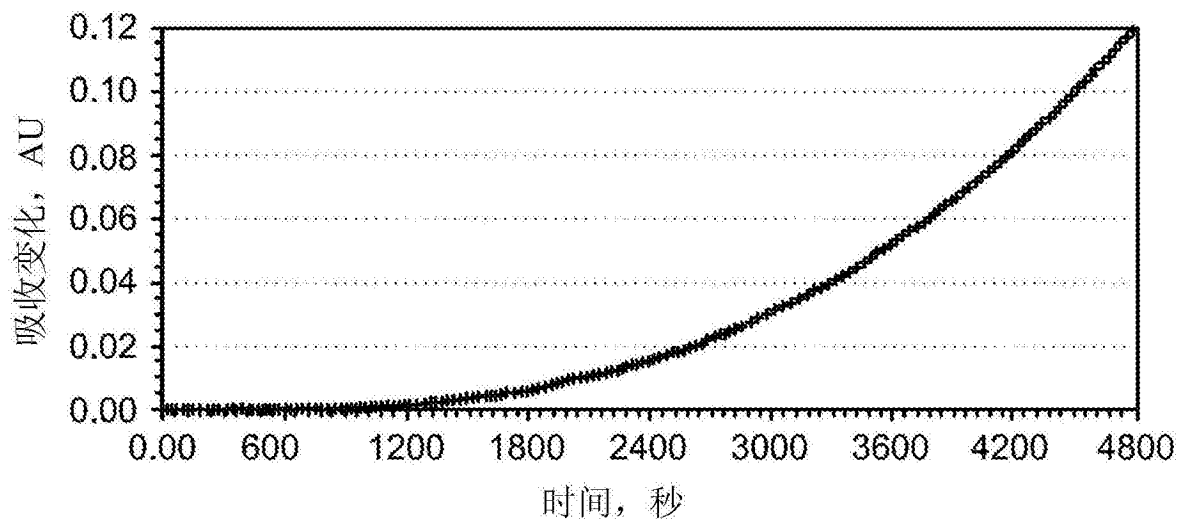


图2

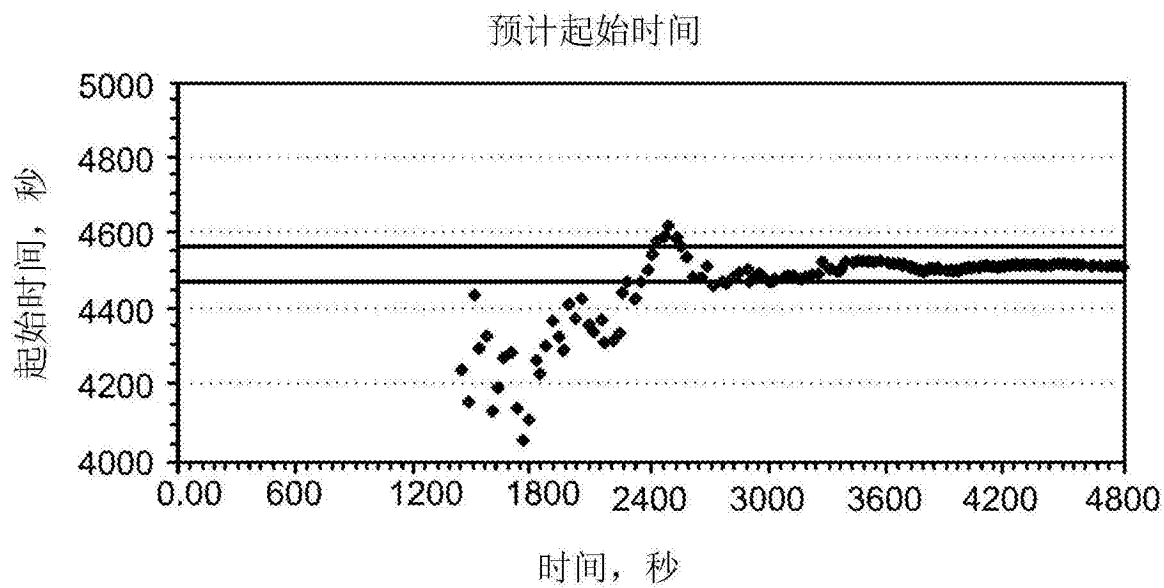


图3

含异常的空白水的 LAL 测定

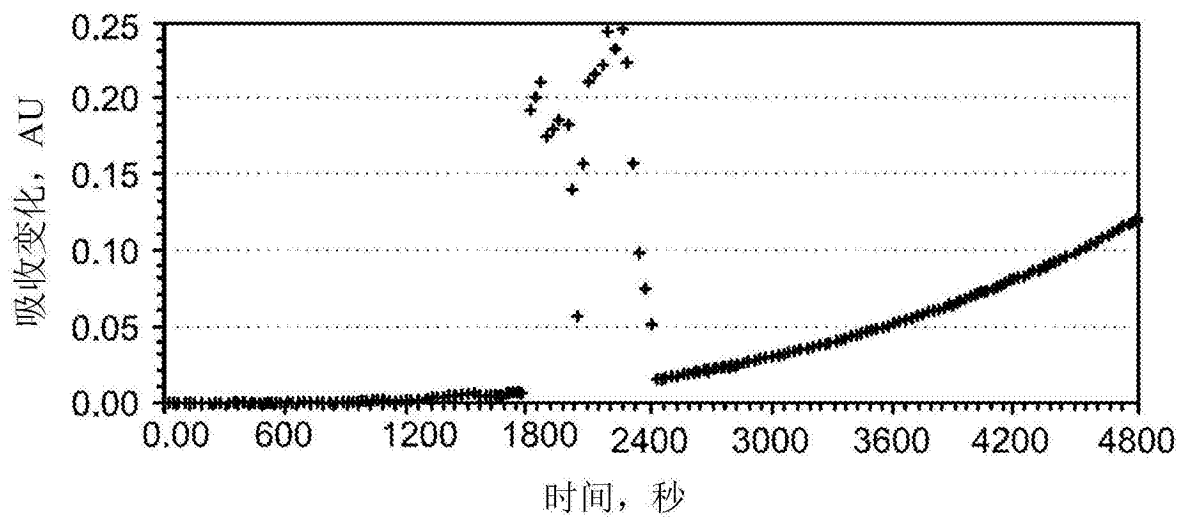


图4

关于两个数据流的 PEARSON'S R

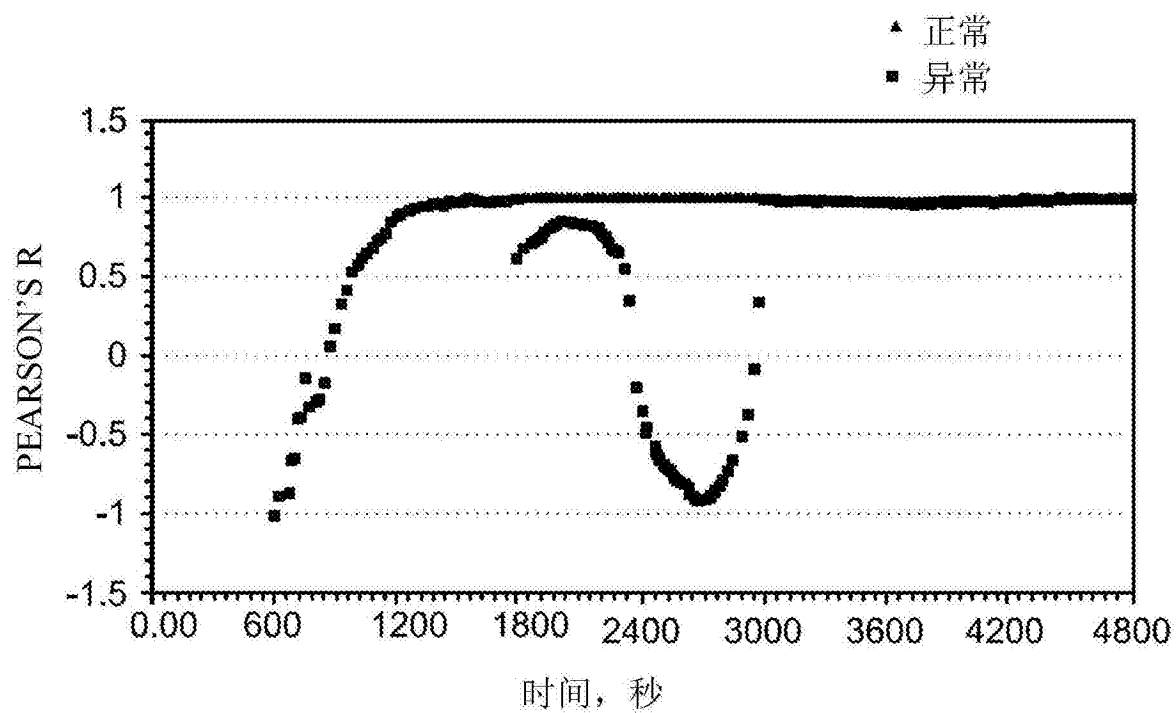


图5