

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.11.021

## 内毒素定量检测仪的研究\*

向天雨,王惠来<sup>△</sup>

(重庆医科大学附属大学城医院 401331)

**[摘要]** **目的** 利用压电晶体在液相环境中阻尼效应(非质量效应),研究能定量、高灵敏度、低检测限、快速的内毒素生物传感检测系统。**方法** 通过对石英晶体传感探头表面的光滑处理和亲水性处理得到性能(消除质量负载影响、提高液固耦合效应)更好的传感器探头,提高测量的稳定性和重复性,降低测量的检测下限。利用 CPLD 器件和 LabView 软件将整个测量系统做成一种微型的自动化的内毒素检测系统,实现测量数据的自动采集、分析和结果显示。**结果** 不同浓度的内毒素与频移最终稳定值存在良好的线性关系。**结论** 通过建立的频移数据,能够准确、方便地得到内毒素浓度。

**[关键词]** 内毒素类;压电石英晶体;传感器;试剂;特征值

**[中图分类号]** Q819

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)11-1506-02

### Study on endotoxin quantitative detector\*

Xiang Tianyu, Wang Huilai<sup>△</sup>

(University-Town Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop a quantitative, highly sensitive, low detection limit and fast endotoxin(ET) biosensing detection system by utilizing the piezoelectric crystal's damping effect(non-mass effect) in the liquid phase environment. **Methods** The sensor probe of better performance (eliminating the quality load effects and improving the liquid-solid coupling effect) was obtained by using the smoothing processing and hydrophilic processing of a quartz crystal sensor probe surface, thus the stability and repeatability of measurement were increased and the low detection limit of measurement was decreased. The whole measurement system was made into a miniature and automated endotoxin detection system by using CPLD device and LabView software to realize the automatic collection, and analysis and results display of measurement data. **Results** The good linear relationship existed between different concentrations of endotoxin and the stable value of frequency shift. **Conclusion** By the established data of frequency shift, the endotoxin concentration can be obtained accurately and conveniently

**[Key words]** endotoxins; piezoelectric quartz crystal; sensor; limulus reagent; eigenvalue

内毒素是革兰阴性杆菌生长时释放或死亡时裂解出来的细胞壁脂多糖(LPS)成分<sup>[1]</sup>,极低浓度的内毒素就会影响某些细胞的正常生理活动,导致人体或动物严重的炎症反应<sup>[2]</sup>。重症革兰阴性菌感染引起的内毒素血症、全身炎症反应综合征(SIRS)、多脏器功能衰竭综合征,其病死率一直居高不下<sup>[3]</sup>。造成患者最后的死亡在一定程度上是由于缺乏可靠、快速和准确的内毒素浓度检测,以便迅速采取合理的治疗措施。近年来国内外报道革兰阴性菌感染有逐年增加的趋势,故快速诊断革兰阴性细菌所致的败血症和内毒素血症已被越来越重视。内毒素定量检测不仅有助于鉴别是否为细菌感染,还能提示感染严重程度,具有极其重要的临床价值<sup>[4]</sup>。目前内毒素检测方法主要以鲎实验法(LT)为主<sup>[5]</sup>,存在费时、定量性差、操作繁琐、自动化程度低及受主观因素影响大等缺点<sup>[6]</sup>。基于光学原理的内毒素测量方法克服了上述缺点,但同时也存在诸如体积大需要复杂的装置,或者需要标记以及智能化程度低等缺点<sup>[7]</sup>。为了满足临床定量检测内毒素的需求,以及对药物、水源、食品、医疗器械及生物制品等进行内毒素定量检测,严格控制其内毒素含量<sup>[8]</sup>,研究一种定量、无需标记、灵敏度高、检测下限低、便于携带的智能型内毒素检测系统仍是非常有价值的。本测量系统主要由传感器、信号处理电路(包括频率计数器、接口电路、串行通信电路)、测量软件 3 部分组成。

### 1 测量系统的构建

#### 1.1 传感器部分 设计传感器振荡电路、频率计数器及频率

计数器与计算机接口电路。拟制成的传感器由传感探头(压电石英晶片)和测量池构成,结构见图 1。

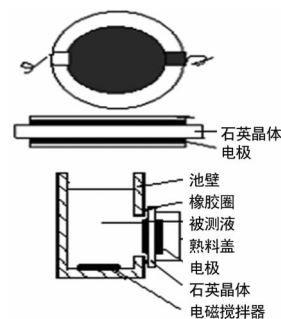


图 1 传感器结构

这一部分的重点是晶体表面的光滑处理和亲水性处理,测量池体积约为 0.4 mL,池壁由不锈钢材料做成。石英晶体一面的塑料盖用硅橡胶密封。电磁搅拌器是为了防止内毒素在溶液中容易聚集。电极之间有个电阻发热,保持测量池的温度在 35℃ 左右,在此温度下的频率响应最大最快。

**1.2 信号处理电路部分** 信号处理电路由石英晶体振荡电路、频率计数电路和串口通讯接口电路组成,见图 2。其中,振荡电路采用集成门 74LS04 组成;频率计数电路和串口通讯电路采用 ALTERA 公司的复杂可编程逻辑处理器(CPLD)构建。在 MAXPLUSII 编程环境下,用 Verilog HDL 硬件编程

\* 基金项目:渝中区科学技术委员会科技攻关项目(20110205);渝中区科委科技服务民生项目(20110606)。 作者简介:向天雨(1974—),副教授,博士,主要从事医学信息技术的研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: 804225405@qq.com。

语言编程在 CPLD 中同时实现频率计数和串口通讯功能。通讯接口电路采用 MAX232 芯片构成。整个电路由于采用 CPLD 组成,所以系统非常小巧。适合于携带和野外测试。这种系统比传统的基于单片机的系统具有抗干扰性能好、集成度高以及易于升级等优点。电路中采用高频变压器,保证具有很好的稳定性和很强的起振能力。同时采用双晶片可以抵消外界环境温度、湿度和电磁干扰,保证测量的稳定性和重复性,见图 3。

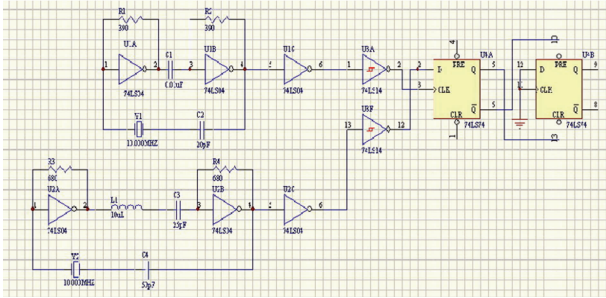


图 2 传感器信息处理电路

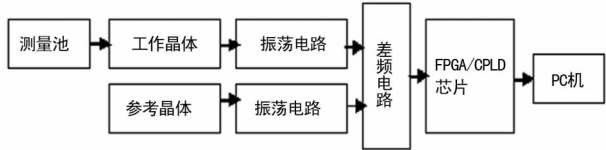


图 3 传感器的振荡电路

**1.3 测量软件部分** 利用 LABVIEW 2010 集成的大量串口通讯、数据采集、数据分析和实时图形显示功能模块,开发基于图形化的测量软件,主要内容包括:串口通讯控制、数据采集、数据平滑、数据滤波、数据微分、数据定时、数据显示、结果分析等功能块。LABVIEW 由 2 部分组成:程序前面板(控制面板)、程序框图。程序前面板主要是设置输入量和显示输出量,且用来模拟真实仪器的前面板;程序框图采用 G 编程语言编写。软件设计中增加了对传感器响应内毒素浓度的实时频率变化曲线的定时捕捉,定时捕捉,通过曲线的微积分处理、数据的傅立叶变换、平滑、统计等处理从而在频率响应曲线中寻找出最能体现内毒素浓度的特征信号(特征值)。

2 实验步骤

**2.1 传感器探头的处理** 由于传统的石英晶体传感器检测系统采用手工记录的方式,无法获得传感器对内毒素的实时动态响应曲线,所以出现标定内毒素浓度与频率变化关系的不准确和标定方法的单一。本文先对石英晶体电极表面抛光处理,以减小表面的裂缝和凹坑带来的液体质量负载效应对测量的影响,从而减小误差;然后进行表面亲水性处理,利用金的接触角大约为 78°左右,改变接触角可以更有利于液固耦合,从而提高测量的灵敏度的特性。本研究通过旋转涂覆法将聚苯乙烯溶液均匀的涂覆到电极表面,选用聚苯乙烯是因为该材料具有很高的剪切模量。由于聚苯乙烯为疏水性材料,将其放到紫外灯下照射一定时间可以得到亲水性很强的表面,通过高温烘烤即可得到表面更光滑、亲水性更好的表面。

**2.2 内毒素的配置** 实验中,把内毒素配成浓度为 20 ng/mL 的溶液然后分别稀释为以下几组。10~100 ng/mL,梯度为 10 ng/mL;1~10 ng/mL,梯度为 1 ng/mL;100 pg/mL~1 ng/mL,梯度为 100 pg/mL;10~100 pg/mL,梯度为 10 ng/mL;1~10 pg/mL,梯度为 1 pg/mL;0.10~1.00 pg/mL,梯度为 0.1 pg/mL;0.01~0.10 pg/mL,梯度为 0.01 pg/mL。每梯度溶液取 0.9 mL,分成 3 等分,对每一个浓度的样品做 3 次实验进行传感器的稳定性和重复性的分析,频移值取其平均值作为

测量结果。为了避免上次测量结果对下次测量结果的影响,待频率稳定后(10~18 min),在下次测量前均用 0.11 mol/L 的盐酸和去内毒素水清洗 3 次以确保晶体表面没有黏附物质。

**2.3 数据记录并处理** 将配置好的内毒素溶液分别分次加入到测量池,接通电源观察并记录测量系统显示屏上频移数据,并把这些不同内毒素浓度与相同量的鲎试剂混合液中传感器的实时频率变化曲线中的数据汇成曲线,找出一个最佳量与内毒素浓度的对应关系,并以此制作标定曲线见图 4、5。

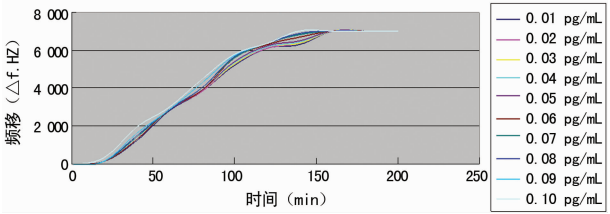


图 4 0.01~0.10 pg/mL 各浓度的曲线图

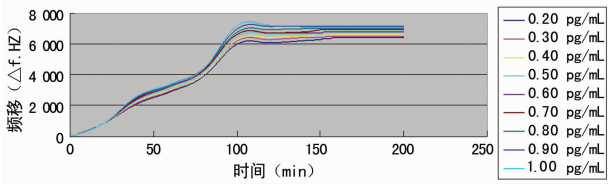


图 5 0.20~1.00 pg/mL 各浓度的曲线图

3 实验结果及处理

根据频率实时响应曲线,可以观察到主要测试参数:各浓度内毒素引起的频移最后稳定在一个特殊值;频移稳定值对应一个特定的检出时间;在内毒素浓度大于 0.10 pg/mL 时,频移最终稳定值与弄存在良好的线性关系;在浓度低于 0.10 pg/mL 一下时,最终的频移都稳定在 7 000 左右,所以此时用最终频移稳定值无法定量测量浓度,而且时间很长。在不考虑时间的情况下,只考虑频移与浓度的关系,见图 6、7。

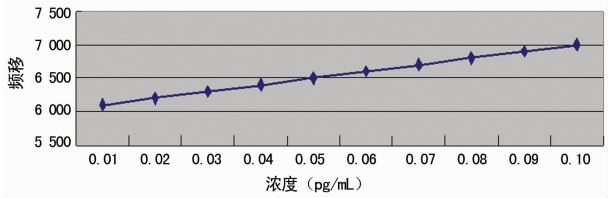


图 6 浓度范围在 0.01~0.10 pg/mL 浓度与频移的关系图

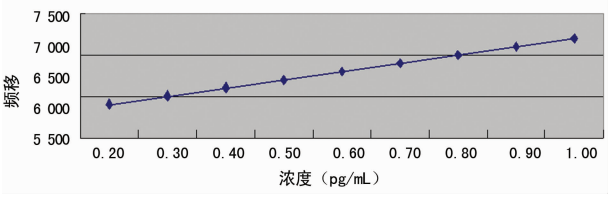


图 7 浓度范围在 0.20~1.00 pg/mL 浓度与频移的关系图

4 结 论

根据各区段浓度与频移的折线图可以看出,浓度和频移在误差范围内存在很好的线性关系。通过实验手段,建立不同浓度的内毒素对应的频移最终稳定值的对应关系。通过软件部分,把这种关系通过图形化的可视化界面展现出来,在实际测量中就能实现快速、准确,智能化的得到待测的值。所以,本检测系统基本上是一款具有定量、无需标记、灵敏度高、检测下限低、便于携带特点的智能型内毒素检测系统,能够满足临床的需要,也能满足其他各行各业对内毒素的检测<sup>[9-10]</sup>。

**3.2 抗菌药物使用情况** 2011 年时,我国抗菌药物临床应用现状是:医疗机构住院患者抗菌药物应用的比例在 70%左右,门诊患者抗菌药物应用比例也高达 20%,我国每 100 例住院患者使用量约为 85DDD/天,高于国外情况,与世界卫生组织(WHO)所期望的目标也相去甚远。住院感染患者细菌学检查比例大致在 20%左右,且细菌学检查时机大多在应用抗菌药物之后,甚至长期应用抗菌药物治疗效果不佳时才进行细菌学检查<sup>[5-7]</sup>。笔者对 2011 年重庆市抗菌药物临床应用的调查,与文献报道相符:门诊处方抗菌药物使用率 21.6%,住院患者抗菌药物使用百分率 70.3%,住院患者抗菌药物使用强度 61.3 DDD,住院患者抗菌药物送检率仅 24.48%。说明重庆市抗菌药物应用情况与全国相同,存在诸多不合理。

**3.3 专项整治,成效显著** 重庆市卫计委按照国家卫计委的总体要求,依据 2011—2013 年专项整治活动方案及相关法律法规,督促重庆市各医疗单位特别是二级以上医院合理使用抗菌药物<sup>[8-12]</sup>。重庆医科大学附属第一医院特别重视抗菌药物的合理应用,制定了多种措施确保国家专项整治方案的实施:如实行临床药师制,要求临床药师与院感科一起,到各临床科室宣讲抗菌药物合理应用,并开创性地实施“合理用药听证会”制度;逐级签署责任状,包括使用强度、使用率、送检率、I 类切口预防用药相关要求等,对超标的科室及个人实行诫勉谈话,对多次超标者扣罚科主任及医生奖金等措施。在多种措施制度下,本院在 2012 年国家卫计委抗菌药物专项整治活动检查中,医院总体评分 300 分中共获得 230 分的成绩,名列重庆市第一。重庆市卫计委委派重庆医科大学附属第一医院专家到重庆市各级医院进行抗菌药物合理应用宣讲,推广该院整治经验。从 2012—2014 年重庆市加入重庆分网的医院所获得的数据看,重庆市抗菌药物专项整治成效显著,各项指标均达到国家要求。

据国家卫计委抗菌药物临床应用监测网数据显示,2015 年上半年各项不合理指标有抬头趋势,说明抗菌药物合理应用任重而道远。

参考文献

[1] 郝少君.持续综合干预对规范临床应用抗菌药物的效果分析[J].中国消毒学杂志,2015,32(6):637-638.  
[2] 刘丽萍,杨雅茹,胡伟,等.抗菌药物临床使用现状分析

[J].中华医院感染学杂志,2013,23(15):3729-3731.  
[3] 魏万宏,周志楠,李小芳,等.河南省二级以上综合医院抗菌药物使用现状分析[J].中国卫生事业管理,2014,5:341-343.  
[4] 李耘,刘健,薛峰,等.卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarin)2007—2008 年报告[J].中国临床药理学杂志,2011,27(5):323-334.  
[5] 刘斌,沈维青,刘柏林.抗菌药物的临床合理应用分析[J].中华医院感染学杂志,2014,24(11):2670-2674.  
[6] 肖永红.我国临床抗菌药物合理应用现状与思考[J].中国执业药师,2011,8(4):4-9.  
[7] 吴锡娟,陈有法,徐瑾,等.医院抗菌药物专项整治活动的实施效果分析[J].中华医院感染学杂志,2014,24(20):5540-5542.  
[8] 卫生部,国家中医药管理局,总后勤卫生部.关于施行《抗菌药物临床应用指导原则》的通知[EB/OL].(2004-08-19)[2016-12-02].<http://www.moh.gov.cn/zyygj/s3573/200804/bce426067d714541a9ed77cb26e74ccc.shtml>.  
[9] 卫生部.卫生部办公厅关于抗菌药物临床应用管理有关问题的通知[EB/OL].(2009-03-23)[2016-12-02].<http://www.moh.gov.cn/zyygj/s3585u/200903/e3f77fdb63244b4383f69ae7766fac57.shtml>.  
[10] 卫生部.抗菌药物临床应用管理办法(卫生部令第 84 号)[EB/OL].(2012-04-24)[2016-12-02].<http://www.moh.gov.cn/zyygj/s3585u/200903/e3f77fdb63244b4383f69ae7766fac57.shtml>.  
[11] 卫生部.卫生部办公厅关于继续深入开展全国抗菌药物临床应用专项整治活动的通知[EB/OL].(2012-03-05)[2016-12-02].<http://www.moh.gov.cn/mohyzs/s3586/201203/54251.shtml>.  
[12] 卫生部.关于进一步开展全国抗菌药物临床应用专项整治活动的通知[EB/OL].(2013-05-06)[2016-12-02].<http://www.nhfp.gov.cn/zhuzhan/xwfbh/201305/e1a64829a869405e9d378191d00d860b.shtml>.

(收稿日期:2016-12-08 修回日期:2017-01-23)

(上接第 1507 页)

参考文献

[1] Fujita Y, Tokunaga T, Kataoka H. Saline and buffers minimize the action of interfering factors in the bacterial endotoxins test[J]. Anal Biochem, 2011, 409(1):46-53.  
[2] Ochiai M, Yamamoto A, Naito S, et al. Applicability of bacterial endotoxins test to various blood products by the use of endotoxin-specific lysates[J]. Biologicals, 2010, 38(6):629-636.  
[3] 盛凤仙,熊可强,王惠之,等.动态浊度法鲎试验用于检测人凝血因子Ⅷ制品中细菌内毒素的研究[J].药实践杂志,2012,30(2):107-114.  
[4] 王红芳,王捧英,施靖,等.细菌内毒素的临床生物学作用及其拮抗剂研究进展[J].河北医药,2013,35(5):759-761.

[5] 周筱莉.我国细菌内毒素检查法的应用进展[J].中国医药导报,2010,7(23):232-236.  
[6] 邱娟,盛振斌.细菌内毒素检查法的应用进展[J].临床合理用药杂志,2011,4(9):128-129.  
[7] 肖鲲,李建华,吴文静,等.动态浊度法检测细菌内毒素试验假阳性结果原因分析[J].中国输血杂志,2012,6(3):115-118.  
[8] 李荣,吴玲.动态浊度法检测乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液中的细菌内毒素[J].中国药房,2012,8(9):189-192.  
[9] 许海彦,张君成,徐巍巍,等.罗库溴铵注射液细菌内毒素的检查[J].煤炭与化工,2010,33(4):59-61.  
[10] 陈丹丹.过滤和离心对热原实验影响的初步研究[J].生物医学工程与临床,2011,15(5):417-419.

(收稿日期:2016-12-19 修回日期:2017-02-15)