



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3882—2014

化学品 皮肤致敏试验 局部淋巴结法： BrdU-ELISA

Chemicals—Skin sensitization—Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA

2014-01-13 发布

2014-08-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准技术性内容与联合国经济合作与发展组织(OECD)化学品测试方法 442B(2010)《皮肤致敏试验:局部淋巴结法:BrdU-ELISA》(Skin sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA)内容基本一致。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:蒋静、王艳、李小林、邱璐、栾慎顺、卞丽娜、张丽婷。

化学品 皮肤致敏试验 局部淋巴结法： BrdU-ELISA

1 范围

本标准规定了动物皮肤致敏试验的试验原理、试验准备、试验步骤、观察、结果计算、数据和报告。
本标准适用于检测化学品，包括纳米级和微粒级化学品对皮肤的致敏性检测。

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 14924.1 实验动物 配合饲料通用质量标准

GB 14925 实验动物 环境及设施

3 术语、定义和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于本文件。

3.1

准确性 accuracy

检测方法结果和公开参考值一致性程度。它是测量试验方法程序和适用性。此术语通常也作“一致性”，表示与正确试验结果的相同程度。

3.2

基准测试物 benchmark test substance

一种致敏或非致敏的物质，用来作为标准与检测物比较。基准测试物应具有以下属性：来源稳定可靠；与被检测物质在分类上结构和功能相似；物理/化学属性清楚；已知作用有支持数据；已知预期反应。

3.3

假阴性 false negative

某检测物被某检测方法错误地鉴定为阴性或没有活性，而实际上它是阳性或有活性的。

3.4

假阳性 false positive

某检测物被某检测方法错误地鉴定为阳性或有活性的，而实际上它是阴性或没有活性。

3.5

危害 hazard

不利于健康或生态效益的能力。只有在充足暴露水平才出现不利影响。

3.6

实验室间可重复性 inter-laboratory reproducibility

不同的有资质的实验室范围内测量，使用相同方法检测相同测试物，可产生定性的和定量的相似结果。实验室间的可重复性在预验证和验证过程中确定，它表示某检测可在实验室间成功转移的程度，同时也指实验室间的可重复性（between-laboratory reproducibility）。

3.7

实验室内可重复性 intra-laboratory reproducibility

确定同一实验室有资质的人在不同时间使用指定方法可成功复制结果的程度。同时也指实验室内可重复性。

3.8

偏离 outlier

偏离是在一群中的一个随机样本的某个观察值明显不同于其他值。

3.9

质量保证 quality assurance

与试验室检测标准、要求、记录保存程序和数据转换的准确性有关管理方法,由独立于这些检测的个人进行评估。

3.10

可靠性 reliability

使用相同方法进行,某检测方法可在实验室内和实验室间可重复进行的程度的测量。计算实验室内和实验室间的重复性进行评估。

3.11

皮肤过敏 skin sensitization

当易感个体局部暴露于可产生诱导作用的化学过敏原产生的免疫学过程,可引起皮肤免疫反应形成接触过敏。

3.12

刺激指数 stimulation index; SI

用于评价测试物皮肤过敏性的计算方法,即处理组增殖与同步溶剂对照组的比率。

3.13

检测物 test substance

使用本方法检测的任何物质,包括单一化合物或多成分组成(如终产品,配合物)。检测制剂时,应考虑到某些制定规章的当局只要求检测终产品制剂。但也有要求检测某产品制剂活性成分。

4 试验原理

LLNA: BrdU-ELISA 基本原理是致敏物能够诱导接触位点淋巴结内淋巴细胞增殖,细胞增殖与致敏物的剂量和致敏力成正比,可对致敏性进行简单定量。通过比较试验组和溶剂对照组的平均增殖获得增殖数。试验组平均增殖和同步载体对照组的比率,即 $SI \geq 1.6$ 时,判定检测物为皮肤致敏物。本方法通过检测 BrdU 含量计算耳淋巴结中增生细胞数量。BrdU 是一种胸苷类似物,可以合成进入增生细胞的 DNA。使用过氧化物酶标记的 BrdU 特异性抗体进行 ELISA 检测合成的 BrdU。加入底物后,过氧化物酶与底物反应,产生有色产物,使用微量板读数器在特定吸光度下进行量化。

5 试验准备

5.1 动物选择

首选成年雌性 CBA/JN 小鼠、BALB/C 小鼠,8~12 周龄,体重变化不超过平均体重的 20%。如果有其他证据证明反应中不存在明显的种系和性别差异,其他种系或雄性动物也可使用。

5.2 饲养和环境

按 GB 14924.1 和 GB 14925 的要求进行。小鼠应群养。实验动物房温度为 $(22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C})$ 。除清洁期间,相对湿度最低 30%,且不超过 70%,最好保持在 50%~60%。人工照明,12 h 明暗交替。采用常规实验室饲料,自由饮食。

5.3 动物准备

随机选择动物,独立标记(不能使用任何形式耳标),试验前至少分笼饲养 5 天适应实验室环境。试验前检查所有动物,保证没有明显的皮肤损伤。

5.4 检测物溶液的准备

固体检测物涂抹小鼠耳朵前应溶解或悬浮于溶液或载体,必要时进行稀释。液体检测物可直接涂抹,或在给药前稀释。不溶物,如通常所见的医疗装置,在涂抹小鼠耳朵前应在适当的溶剂中进行放大抽提,释放所有可抽提成分后检测。除非有数据证明其稳定,否则检测物应每天制备。

载体选择不能影响检测结果,并且最大化溶解度以获得适当的溶液或混悬液。推荐溶剂为丙酮:橄榄油(4:1,体积比, AOO),二甲基甲酰胺(*N,N*-dimethylformamide),2-丁酮(methyl ethyl ketone),丙二醇(propylene glycol),和二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO),如果有科学依据,其他溶剂也可以。在某些情况下,可能要使用临床相关溶剂或检测物的商品形式作为补充对照。特别要注意使用增溶剂保证亲水物质进入溶剂系统,皮肤湿润后不会立即挥发。避免使用全水型溶剂。

5.5 可靠性检查

阳性对照的致敏检测物应充分反应出可重复并可量化的致敏力,证明检测的准确性。阳性对照应在暴露水平产生阳性 LLNA:BrdU-ELISA 反应,预期 $SI > 1.6$ 。阳性对照的剂量选择不引起原发性皮肤刺激或系统毒性,诱导具有再现性但不宜多(如 $SI > 14$ 被认为过多)。首选的阳性对照为溶于丙酮:橄榄油(4:1,体积比)的 25%乙基肉桂醛(CAS 号 101-86-0)和 25%丁香酚(CAS 号 97-53-0)。也可以是满足以上条件的其他阳性对照物。

试验使用同步阳性对照,证明其可靠性。如果实验室定期进行本试验(如每月至少进行一次),并且已建立历史阳性数据库证明有能力准确重复阳性对照结果,可使用定期阳性对照(如间隔 ≤ 6 个月)。在合理的时间周期内(如一年内)至少有 10 个独立试验的阳性对照获得一致的阳性结果,可认为有能力。

如果 LLNA:BrdU-ELISA 程序上发生变化(如检测人员变化,检测方法中材料或试剂变化,检测设备变化,检测动物来源变化)时,通常要设立同步阳性对照,并在试验报告中记录。

6 试验步骤

6.1 动物数量和剂量水平

6.1.1 动物数量

每个检测物最少 3 个剂量组,加一个阴性对照组(检测物溶剂)和一个阳性对照组(同步或近期的),每一剂量组至少使用 4 只动物。使用非同步阳性对照时应考虑检测多剂量阳性对照。对照组动物与实验组动物同步处理。

6.1.2 剂量水平

剂量组通常选自适当剂量系列,如 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5% 等。科学选

择剂量系列,在选择 3 个连续浓度时,考虑检测物(或结构上与检测物相关的)所有已有的毒理学信息(如急性毒性和皮肤刺激)和结构及理化信息,在不产生系统毒性和原发性皮肤刺激的同时,使用最高浓度。如果没有这些信息,需要进行预试验。

6.2 预试验

如果没有检测物的最高剂量信息,进行预实验确定适当的剂量水平进行 LLNA; BrdU-ELISA 试验。如果没有引起系统毒性和原发性皮肤刺激浓度的相关资料,预实验确定试验最大剂量水平。最大测试剂量应该是液体检测物原液或固体检测物的饱和溶液或悬浮液。

除了不进行淋巴结增殖评估和各剂量组使用更少动物外,预实验条件与正式试验相同。建议各剂量组使用 1 只或 2 只动物。每日观察所有小鼠的系统毒性临床症状和涂布点原发刺激。记录试验前和试验结束时(第 6 天)小鼠体重。观察每只小鼠两侧耳朵的红斑,根据表 1 评分。第 1 天(开始前),第 3 天(约首次涂药后 48 h),和第 6 天使用厚度测量仪测量耳厚。第 6 天人道处死动物后,使用耳打孔重量测定仪确定耳厚度。任何一天测得红斑分数大于等于 3 或耳厚增加大于等于 25%判定为原发性刺激。正式试验的最高剂量应为预实验浓度系列中较低的剂量,不能引起系统毒性和/或原发性皮肤刺激。

表 1 红斑评分

观察	得分
无红斑	0
轻微红斑(勉强可见)	1
明显红斑	2
中度-重度红斑	3
严重红斑(紫红色)至结痂形成	4

作为综合评估一部分,以下临床观察可证明系统毒性,用于确定正式试验最大剂量水平:神经系统功能变化(如 pilo-erection,共济失调,震颤和抽搐);行为变化(如好斗,清洁活动变化,活跃度显著变化);呼吸系统变化(如呼吸频率和强度变化,如呼吸困难,喘气和罗音),饮食变化。此外,在评价中应考虑呆滞或迟钝,重于轻微或瞬间疼痛的症状,1~6 天体重减少大于 5%,及死亡的症状。垂死动物和出现严重疼痛的动物应人道处死。

6.3 主要试验步骤

6.3.1 第 1 天

记录每个动物的体重和临床表现。将 25 μ L 工作浓度的受试物、载体、或同步 PC 涂抹于小鼠双耳背部。

6.3.2 第 2 天和第 3 天

重复第 1 天的涂抹。

6.3.3 第 4 天

不处理。

6.3.4 第 5 天

腹腔注射 0.5 mL(5 mg/ 鼠)BrdU 溶液(10 mg/mL)。

6.3.5 第 6 天

记录每个动物的体重和临床表现。注射 BrdU 24 h 后人道处死动物。取每只小鼠的耳淋巴结,在 PBS 中单独处理。淋巴结识别和解剖示意图见附录 A。同时记录耳红斑评分和耳厚度(用厚度标尺或解剖时打孔称重测量)。

6.4 细胞悬液制备

通过 200 目不锈钢网或其他可用的制备单细胞悬液技术(如一次性塑料槌压碎淋巴细胞, #70 尼龙网筛过滤)机械分离,制备每个小鼠双侧淋巴结细胞的单细胞悬液。淋巴结细胞悬液的制备过程在此分析中十分关键,每个操作者应预先掌握这一技能。此外,阴性对照动物的淋巴结较小,操作要小心,防止对 SI 值产生人为影响。在各试验中,淋巴结细胞悬液的终体积应调至固定的最佳体积(约 15 mL)。最佳体积的阴性组平均吸收值在 0.1~0.2。

6.5 测定细胞增殖(淋巴细胞 DNA 中 BrdU 含量测定)

使用市售 ELISA 试剂盒测定 BrdU。100 μ L 淋巴结细胞悬液分 3 次加到平底微孔板孔中。固定和降解淋巴结细胞后,每一孔加入 BrdU 抗体使其反应。然后,洗去 BrdU 抗体,加入底物溶液,显色。370 nm 作为测定波长,492 nm 作为参考波长。

7 观察

7.1 临床观察

每日至少观察一次每只小鼠的临床症状、涂布点的原发刺激和系统毒性。统计每只小鼠的观察内容。监测计划应包括快速鉴定小鼠有无系统毒性、原发性皮肤刺激或安乐死后皮肤腐蚀的标准。

7.2 体重

试验开始和人道处死前称量每个动物体重。

8 结果计算

每个试验组的结果表示为平均 SI。SI 为试验组和阳性对照组中每只小鼠平均 BrdU 标记指数除以溶剂或 VC 组平均 BrdU 标记指数。

BrdU 标记指数定义为:

$$\text{BrdU 标记指数} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS 空白}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS 空白}_{\text{ref}}) \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ABS_{em} ——测试孔发射波长的吸光度;

$\text{ABS 空白}_{\text{em}}$ ——空白孔发射波长的吸光度;

ABS_{ref} ——测试孔参考波长的吸光度;

$\text{ABS 空白}_{\text{ref}}$ ——空白孔参考波长的吸光度。

$\text{SI} \geq 1.6$ 时,可认为是阳性。但是,在判定边界结果(如 SI 值介于 1.6 和 1.9 之间)为阳性时,同时使用剂量反应关系强度,统计显著性,以及溶剂或载体和阳性对照反应的一致性。

SI 在 1.6 和 1.9 之间的边界阳性,需要考虑补充信息,如剂量反应关系,系统毒性或原发性刺激,必

SN/T 3882—2014

要时用 SI 值和统计显著性确认此类结果。同时应考虑检测物的不同特性,包括是否与已知皮肤刺激物存在结构相关,是否会引起小鼠原发性皮肤刺激等,以及观察到的剂量反应的本质。这些应另外详细说明。

9 数据和报告

9.1 数据

以表格形式汇总单个动物 BrdU 标记指数值,组/动物平均 BrdU 标记指数,相关误差项(如 SD, SEM),以及每个剂量组与溶剂/载体对照组比较的平均 SI。

9.2 检测报告

检测报告应包括以下信息:

9.2.1 检测物和对照检测物

检测物和对照检测物的信息应包括以下各项:

- 鉴定信息(必要时 CAS 号;来源;纯度;已知杂质;批号);
- 物理性质和理化特性(如挥发性,稳定性,可溶性);
- 如果是混合物,其组成和各成分的相对百分浓度。

溶剂/载体:

- 鉴定信息(必要时纯度,浓度,使用体积);
- 载体选择原因;

9.2.2 试验动物

试验动物信息应包括以下各项:

- 小鼠来源;
- 如果知道,动物的微生物状态;
- 动物的年龄和数量;
- 动物来源,饲养环境,饮食,等;

9.2.3 试验条件

试验条件应包括以下各项:

- ELISA 试剂盒的来源、批号和生产者质量保证/质控数据(抗体敏感性和特异性,及检测限制);
- 试验物准备和敷用的细节;
- 剂量选择的原因(如果有预试验,附结果);
- 载体和试验物的使用浓度,试验物使用的总量;
- 饲料和水质量信息(包括饮食类型/来源,水源);
- 处理和取样时间表情况;
- 毒性检测方法;
- 判定阳性或阴性的标准;
- 所有偏离情况,并说明偏离对实验设计和结果的影响。

9.2.4 可信度检查

可信度检查应包括以下各项：

- 最后的可信度检查结果摘要，包括检测物，使用的浓度和载体信息；
- 检测实验室同步和/或过去阳性对照，和同步阴性（溶剂/载体）对照数据；
- 如果没有同步阳性对照，最近的定期阳性对照数据和实验室报告，描述过去阳性对照数据以证明不进行同步 PC 的理由；

9.2.5 结果

结果描述应包括以下各项：

- 试验开始和人道处死时单个小鼠体重；同时包括每个试验组的平均数和相关误差项（如 SD，SEM）；
- 毒性发作过程和症状，包括每个动物所有的攻毒位点的皮肤刺激；
- 每个试验组单个小鼠 BrdU 标记指数和 SI 值表；
- 每个试验组 BrdU 标记指数平均数和相关误差项（如 SD，SEM）和每个试验组外部分析结果；
- SI 和变率，考虑试验组和对照组动物间差异；
- 剂量反应关系；
- 必要时，统计分析；

9.2.6 结果讨论

结果讨论应包括：简要的结果评价，剂量反应分析，必要时统计分析，得出检测物是否为皮肤致敏物的结论。

附 录 A
(规范性附录)
小鼠耳淋巴结解剖示意图

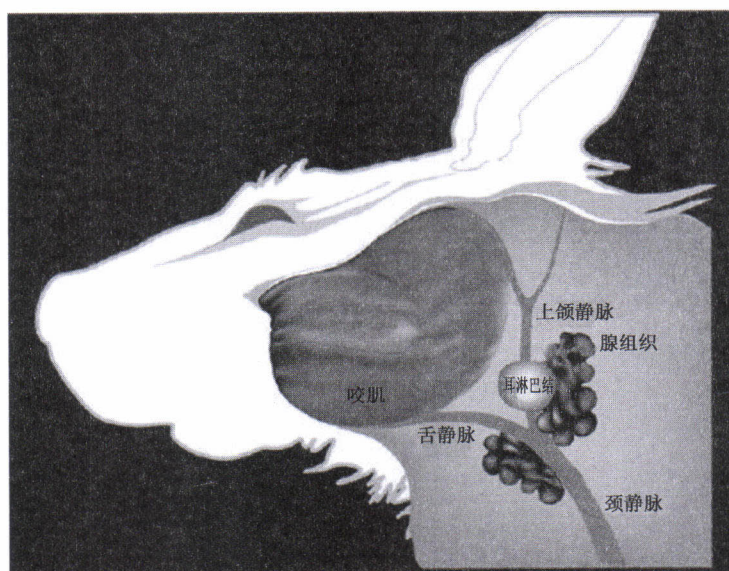


图 A.1 小鼠头部侧面解剖图

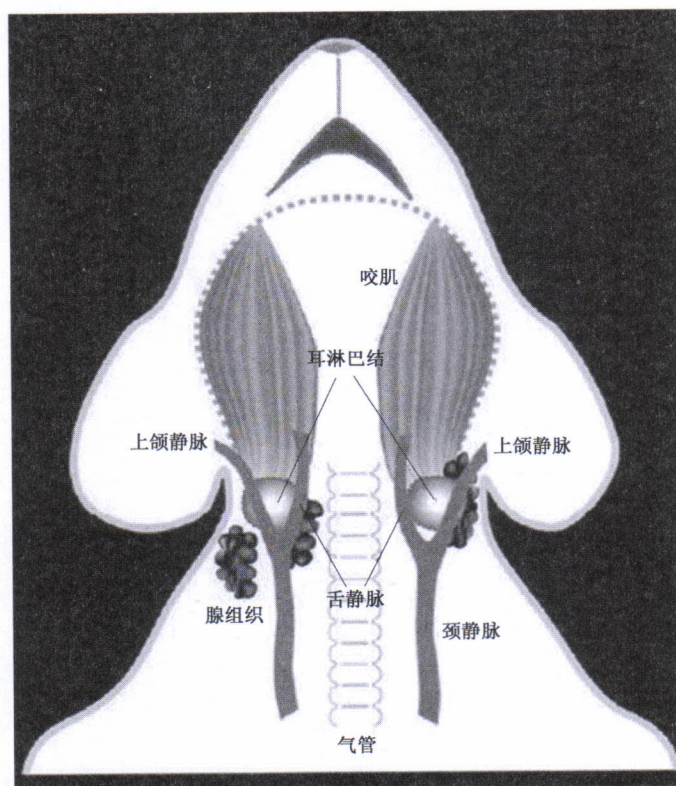


图 A.2 小鼠头部竖解剖图