



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0879.2—2015

医疗器械致敏反应试验 第 2 部分：小鼠局部淋巴结试验 (LLNA) BrdU-ELISA 法

Test for hypersensitivity of medical devices—
Part 2: Murine Local Lymph Node Assay (LLNA): BrdU-ELISA method

2015-03-02 发布

2016-01-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

YY/T 0879《医疗器械致敏反应试验》拟分部分出版,目前计划发布如下部分:

——第1部分:小鼠局部淋巴结试验(LLNA);

——第2部分:小鼠局部淋巴结试验(LLNA)BrdU-ELISA法。

.....

本部分为 YY/T 0879 的第 2 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

本部分由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会(SAC/TC 248)归口。

本部分起草单位:国家食品药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心、国家食品药品监督管理局北大医疗器械质量监督检验中心、四川医疗器械生物材料和制品检验中心。

本部分起草人:孙立魁、林振华、林红、张金、袁曦、贾莉芳。

引 言

YY/T 0879.1 中使用放射性掺入胸腺嘧啶核苷或尿嘧啶核苷的方法来检测医疗器械的致敏潜能,可用来部分替代 GB/T 16886.10 中规定的豚鼠致敏试验。但是在放射性物质的购买、使用或废物处理有困难的地区,该试验的使用受到了一定的限制。本部分是对 LLNA 方法的改进,为非放射性的,并已经过国际间独立的科学盲评小组确认、评审,并推荐作为有一定局限性的用于识别皮肤致敏物质的试验方法。

与 YY/T 0879.1 相似,本部分研究皮肤致敏的诱导阶段并提供适用于剂量反应评定的定量数据。并且,可以不使用对 DNA 有放射性的标记,消除了放射性职业暴露和废物处理问题。同时,本部分比皮肤致敏试验中豚鼠的使用量要少,不需要皮内致敏反应的挑战诱导阶段的激发。并且不需要像豚鼠最大剂量试验一样使用佐剂,减少了动物的痛苦。更符合 GB/T 16886.2 的要求。

本部分不一定适用于所有的试验物质。比如对某些金属试验时,发现由于表面含有某些皮肤刺激物(如表面活性物质)而这一物质又是可溶性的,就会使结果呈假阳性。另外,某些类别的试验物质或含有表明作为潜在混杂因素的官能团的物质可能还需要使用豚鼠致敏试验。同时,YY/T 0879.1 中识别出的局限性同样也适用于本部分。在使用本部分之前,实验室宜考虑所有可获得的试验物质的信息,包括试验物质的名称和化学结构、理化特性、任何其他体外或体内毒性试验结果和结构相关的毒理学数据,以确定本部分是否适用于供试物质,并有助于供试物剂量的选择。

除此之外,当刺激指数(SI)在 1.6 和 1.9 之间时,宜考虑临界阳性结果的可能性。然而,由于使用相同的数据组来设定 SI 值并用来计算该试验的识别能力,所描述的结果可能会高估实际的识别能力。

医疗器械致敏反应试验
第 2 部分：小鼠局部淋巴结试验
(LLNA) BrdU-ELISA 法

1 范围

YY/T 0879 的本部分给出了医疗器械或材料致敏反应的试验方法。
本部分预期为豚鼠致敏试验提供一个替代性方法，具有一定的局限性，在使用前，宜对方法的适用性进行确认。

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/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第 1 部分：风险管理过程中的评价与试验
GB/T 16886.2 医疗器械生物学评价 第 2 部分：动物福利要求
GB/T 16886.10 医疗器械生物学评价 第 10 部分：刺激与迟发型超敏反应试验
GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第 12 部分：样品制备与参照样品

3 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.2 和 GB/T 16886.10 界定的术语和定义适用于本文件。

4 试验原理

医疗器械中的致敏剂可诱导作用位点的引流淋巴结内淋巴细胞的增殖。该增殖与所使用的致敏剂的剂量和致敏潜能成比例，从而提供了一种简单的获取定量测量致敏性的方法。BrdU 是胸腺嘧啶核苷的类似物并可掺入增殖细胞的 DNA 之中。通过酶联免疫吸附试验(ELISA)方法测量试验动物耳部引流淋巴结内掺入 BrdU 的量来指示增殖细胞的数量增加，并用试验组与对照组的平均增殖量之比(SI)来评价增殖情况，可确定待测物质的致敏潜能。

5 试验方法的描述

5.1 动物种属的选择

本试验选择的动物种属为小鼠。CBA/JN 是优先推荐的品系。宜使用成年未生育过且未受孕的雌性 CBA/JN 小鼠，8 周龄~12 周龄。在试验开始时，动物体重应不超过平均体重的±20%。当有充分数据证实在本试验中无品系和/或性别特异性差异时，也可以选择其他品系或雄性动物，如 BALB/c 品系。

YY/T 0879.2—2015

5.2 动物的准备

所有的动物试验应在经国家认可机构批准并符合实验室动物福利全部适用法规的实验室内进行,并且还应符合 GB/T 16886.2 的要求。随机选择动物,进行个体标记(但不能进行耳部标记),并于试验前在实验室条件下适应至少 5 d。试验前检查所有动物以确保无明显的皮肤损害。

5.3 试验溶液的制备

宜根据 GB/T 16886.12 的原则,制备试验溶液。液体试验物质可直接使用或稀释使用。对于医疗器械中常见的不溶性物质,宜用适宜的溶剂进行加严浸提,以溶出所有的组分。试验物质宜当日制备,除非有稳定性数据说明贮存的可接受性。

6 可靠性检查

6.1 阳性对照是通过用已进行充分表征的致敏试验物质来证实试验的适宜性,该物质具有适宜的可重复的高致敏性。当需要证实实验室成功进行每个试验的能力并能开展实验室内重复性和实验室间再现性评价时,推荐每次试验都有阳性对照(后称同期阳性对照),以免为满足因周期性使用阳性对照而可能引起的追加动物试验的要求。

6.2 对于经常进行试验(频率不少于每月一次)并具有长期开展阳性对照数据来证实具有获得可重复的和准确的阳性结果能力的实验室,可以周期性地(间隔 ≤ 6 个月)进行阳性对照试验。在期望给出增殖超过阴性对照的接触水平下,阳性对照宜产生阳性反应, $SI \geq 1.6$ 。阳性对照剂量的选择宜以不产生严重皮肤刺激或系统毒性为宜并且诱导反应具有可重复性(如 $SI > 14$ 被认为是严重反应)。

6.3 虽然阳性对照试验物质宜在已知能激发持续反应的介质中进行试验(如,丙酮:橄榄油体积比为 4:1),但可能有某些法规要求试验样品在非标准的介质(临床/化学相关的成分)中进行试验。如果阳性对照试验物质与供试验物质是在不同的介质中进行的,宜针对阳性对照单独设一个介质对照组。

7 对照样品的选择

7.1 阳性对照

推荐使用的阳性对照试验物质是:丙酮体积:橄榄油体积为 4:1 的混合液中含 25% 的己基肉桂醛(CAS[101-86-0])和 25% 丁子香酚(CAS[97-53-0])。也可使用其他经过充分论证的阳性对照试验物质。

7.2 阴性对照

与试验样品组所使用的浸提介质批号相同,不加试验样品同条件制备。

8 试验程序

8.1 动物数量和剂量水平

8.1.1 试验样品应为液体、悬浮液、凝胶或膏状物,此类样品可应用于小鼠的耳部。一般情况下,应采用所制备的最高浓度的化学溶液、悬浮液或浸提液。如需要可检验系列剂量(稀释液)。全身毒性和重度局部皮肤刺激会使试验结果无效,因此应避免这些反应。在某些情况下,可能需要进行预试验。

8.1.2 试验应设置一个或多个试验组、一个阴性对照组和一个阳性对照组。每组至少使用四只动物。

当试验采用周期阳性对照时,宜特别考虑进行阳性对照的多剂量试验。除了不用试验物质进行处理以外,对照组的实验动物宜与试验组的实验动物进行相同的操作和处理方式。

8.1.3 如需要检验系列剂量时,宜从适宜的系列浓度中选择连续剂量,如 100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%和 0.5%等。系列浓度的选择宜加以科学论述。在选择三个连续的浓度时,宜考虑所有现有的试验物质的毒理学信息(如急性毒性和皮内刺激)、结构和理化信息(和/或试验物质结构相关),使得最高浓度无全身毒性和/或严重的局部皮肤刺激。当缺乏这些信息时,宜进行预筛选试验。

8.1.4 介质不宜干扰试验结果或使试验结果发生偏倚,并建立在试验物质最大溶解度的基础之上,以获取试验物质在应用中的最高浓度。推荐的介质为丙酮与橄榄油体积比为 4 : 1 的混合液、N,N-二甲基甲酰胺、甲基酮、丙二醇和二甲基亚砷,也可使用其他经过科学论证的溶剂。宜特别注意加入适宜的溶解剂,以确保使亲水性物质溶入介质系统,使其能湿化皮肤但又不会马上流失。因此,避免使用完全水性介质。

8.2 预筛选试验

8.2.1 当缺少确定试验最高剂量的信息时,宜进行预筛选试验以确定适宜的试验剂量水平。当缺少引起全身毒性和/或严重局部皮肤刺激的浓度剂量信息时,预筛选试验的目的是为主试验中最大剂量水平的选择提供指南。对于液体试验物质,最大试验剂量水平宜为 100%试验物质;对于固体/悬液,则最大试验剂量水平宜为最大可能的浸提浓度。

8.2.2 除了没有对淋巴结增殖的评定和每组使用动物较少以外,预筛选试验在与主试验相同的条件下进行。推荐每个剂量组使用 1 只~2 只动物。

8.2.3 每日观察所有动物的任何全身毒性或应用部位的局部刺激的临床体征。实验开始前和结束时(第 6 天)记录体重。观察每只小鼠双耳的红斑情况并用表 1 进行记分。在第 1 天(处理前)、第 3 天(第 1 次处理后大约 48 h)和第 6 天用厚度仪进行耳厚度测量(如千分尺或测厚仪)。另外,第 6 天,以人道方式处死动物后,可以用耳打孔机进行耳厚度加权测量。任何一天测量得到红斑记分≥3 和/或耳厚度增加≥25%就表明严重局部刺激。选择预筛选试验系列浓度中下一个不引起全身毒性和/或严重局部皮肤刺激的较低的剂量作为主试验最高剂量。

注 1: 除了耳部厚度增加 25%以外,试验组小鼠耳部厚度与对照组相比有统计意义的增加也曾经被用来识别 LLNA 中的刺激剂。然而,当耳部厚度增加小于 25%时可能会发生有统计意义上厚度增加的情况,但这种情况的厚度增加尚未与严重刺激有关联。

注 2: 当作为整体评定的一部分时,下列临床观察也预示全身毒性:神经系统功能改变(如竖毛、共济失调、震颤和抽搐);行为改变(如好斗、理毛行为改变、活动量显著变化);呼吸模式改变(如呼吸深度和频率的改变,如呼吸困难、喘气和肺罗音),以及食物和水消耗量的改变等,因此也可以预示主试验中使用的最大剂量水平。另外,在评价中宜考虑无活力和/或无反应性体征和超过轻微或瞬时疼痛和痛苦的任何临床体征、或从第 1 天~第 6 天体重减少超过 5%、死亡率。宜以人道方式处死濒死动物或具有严重疼痛和痛苦体征的动物。

表 1 红斑记分

观 察	记 分
无红斑	0
极轻微红斑(仅能察觉)	1
明显红斑	2
中度到重度红斑	3
重度红斑(鲜红)到焦痂形成不能进行红斑分级	4

YY/T 0879.2—2015

8.3 主试验时间表

本试验的时间表如下：

- a) 第 1 天：单独识别和记录每只动物的体重和任何临床观察结果。在每只小鼠耳部涂敷 25 μL 适宜稀释度的试验物质、介质或阳性对照。
- b) 第 2 天和第 3 天：记录每只动物的任何临床观察结果。在每只小鼠耳部涂敷 25 μL 适宜稀释度的试验物质、介质或阳性对照。
- c) 第 4 天：不作处理。
- d) 第 5 天：腹腔注射 0.5 mL (5 mg/鼠) 的 BrdU (10 mg/mL) 溶液。
- e) 第 6 天：记录每只动物体重和任何临床观察结果。在 BrdU 注射后大约 24 h，以人道方式处死动物。从小鼠耳部剪除引流淋巴结并分别对每只动物的引流淋巴结在磷酸盐缓冲液中进行处理。为进一步观察主试验中的局部皮肤反应，试验方案中可包括其他观察指标，如耳部红斑或耳厚度测量等（解剖时通过千分尺或测厚仪测量）。

8.4 细胞悬液的制备

对于每只小鼠，剪除双侧淋巴结，用机械的方式使其轻轻挤过 74 μm (200 目) 不锈钢网，以使其分解的方式或其他可接受技术（如使用一次性塑料棒和 70# 尼龙网）来制备成淋巴结细胞 (LNC) 单细胞悬液。本试验中淋巴结细胞悬液的制备步骤非常重要，因此每位操作者都宜具备熟练的操作技术。另外，阴性对照组小鼠淋巴结非常小，因此小心操作对避免人为因素对 SI 值的影响非常重要。在每次试验中，淋巴结细胞悬液的靶体积宜调整至一个最佳体积（如 CBA/JN 小鼠大约 15 mL）。该最佳体积是基于使阴性对照组得到 0.1~0.2 的平均吸光度。

8.5 细胞增殖的测定（淋巴细胞 DNA 中 BrdU 的测量）

用市售的 ELISA 试剂盒测量 BrdU。将 100 μL 的淋巴结细胞悬液加入平底微孔板各孔中，平行制备 3 份。在 LNC 固定和变性后，每孔加入 anti-BrdU 抗体进行反应。随后洗去 anti-BrdU 抗体，加入基质溶液进行反应使之产生色原体。然后按说明书推荐的波长测量吸光值。宜使所有的实验条件达到最佳。

9 结果观察和处理

9.1 临床观察

宜至少每天仔细观察一次每只动物的任何临床体征和作用部位的局部刺激或全身毒性，并记录并保存每只小鼠所有的观察结果。试验方案中宜包括出现全身毒性、严重局部皮肤刺激或皮肤腐蚀小鼠需安乐处死的快速识别准则。

9.2 体重

宜按 7.3 在试验开始和人道方式处死时测量每只试验动物的体重。

9.3 结果的计算

每组处理结果以平均刺激指数 (SI) 表示。SI 等于每个试验组和阳性对照组的平均 BrdU 标记指数除以阴性对照组的平均 BrdU 标记指数。阴性对照组的平均 SI 值为 1。

BrdU 标记指数：

$$B = (A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)$$

式中：

- B ——BrdU 标记指数；
- A₁ ——发射波长吸光度；
- A₂ ——空白发射波长吸光度；
- A₃ ——参考波长吸光度；
- A₄ ——空白参考波长吸光度。

10 统计学分析

收集每个小鼠的个体数据,选择适宜的统计学分析方法进行统计学分析。如选择系列剂量试验,则对数据中存在的剂量-反应关系和程度进行统计学分析。任何统计学评定都可以包含剂量-反应关系的评价和试验组适当调整后的比较(如剂量组与阴性对照组的成对比较)。统计学分析可以包括,线性回归或威廉姆斯试验来评定剂量-反应趋势,以及用 Dunnett’s 试验进行成对比较。在选择一种统计学方法时,研究者宜注意可能存在的方差不一致和其他可能需要数据转换或非参数统计分析的相关问题。

11 结果的解释

- 11.1 当 SI≥1.6 时认为是阳性结果。然而,处于临界情况时(SI 值在 1.6~1.9 之间),也可用阴性对照和阳性对照的剂量反应关系的密切性、统计学意义和一致性程度来确定结果是否为阳性。
- 11.2 对于 SI 在 1.6~1.9 之间的临界阳性反应,宜考虑附加的信息,如剂量-反应关系、全身毒性或严重刺激的证据和 SI 值的统计学(适用时),来确定其是否为阳性结果。还宜考虑试验物质的各种特性,包括其是否与已知皮肤致敏剂具有结构关系,是否导致小鼠严重皮肤刺激以及观察到的剂量-反应特性。

12 数据和报告

12.1 数据

宜以表格形式汇总单只动物的 BrdU 标记指数值,组平均 BrdU 标记指数/动物,有关误差术语(如标准差、标准误)以及每一剂量组相对于阴性对照组的平均 SI。

12.2 试验报告

试验报告宜包含下列信息：

- a) 试验物质和对照试验物质：
 - 1) 识别信息(如 CAS 号,如适用;来源、纯度、已知的杂质和批号);
 - 2) 物理性质和理化特性(如挥发性、稳定性、溶解性);
 - 3) 成分和成分的相对百分含量(如有配方)。
- b) 介质：
 - 1) 识别信息(纯度;浓度,如适用;使用的体积);
 - 2) 浸提介质选择的说明。
- c) 试验动物：
 - 1) 动物的来源;
 - 2) 动物的微生物状况,已知时;

- 3) 动物的数量和年龄;
 - 4) 动物的来源、饲养条件、饲料等。
- d) 试验条件:
- 1) ELISA 试剂盒的来源、批号和制造商的质量保证/质量控制数据(抗体敏感性和特异性以及检测限);
 - 2) 试验物质制备和应用的详细信息;
 - 3) 剂量选择的论证(包括预筛选实验的结果,如进行);
 - 4) 所使用的介质和试验物质的浓度,以及所使用的试验物质的总量;
 - 5) 饲料和水质量的详细信息(包括饲料类型/来源、水源);
 - 6) 处理和制样方案的详细信息;
 - 7) 毒性的检测方法;
 - 8) 考虑阳性或阴性研究准则;
 - 9) 任何方案偏离的详细信息和偏离对研究设计和结果影响的解释。
- e) 可靠性检查(必要时):
- 1) 上一次可靠性检查结果的总结,包括试验物质、浓度和所使用供试液的信息;
 - 2) 实验室的同期和/或以前阳性对照和本次阴性对照数据;
 - 3) 如果没有同期阳性对照,最近一次周期阳性对照的实验室报告以及实验室不进行同期阳性对照的详细论证报告。
- f) 结果:
- 1) 试验开始和人道方式处死时每只小鼠的体重;每个处理组的平均值和标准差;
 - 2) 应记录毒性体征和发作的时间段、包括每只动物耳部涂敷部位的刺激反应,如适用;
 - 3) 每个处理组中每只小鼠的 BrdU 标记指数和每个处理组的 SI 值;
 - 4) 每个处理组中每只小鼠的 BrdU 标记指数的平均值和标准差,以及每个处理组中离群值分析的结果;
 - 5) 试验组和对照组各组内动物间相应变异性分析结果;
 - 6) 剂量-反应关系,如适用;
 - 7) 统计学分析,如适用。
- g) 结果的讨论:
- 简要说明结果、剂量-反应分析和统计学分析(如有),附以试验物质是否宜被认为的皮肤致敏剂的结论。
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
医疗器械致敏反应试验
第 2 部分:小鼠局部淋巴结试验
(LLNA) BrdU-ELISA 法

YY/T 0879.2—2015

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址:www.gb168.cn

服务热线:400-168-0010

010-68522006

2015 年 8 月第一版

*

书号:155066·2-28778

版权专有 侵权必究



YY/T 0879.2-2015