



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0879.1—2013

医疗器械致敏反应试验 第 1 部分：小鼠局部淋巴结试验(LLNA) 放射性同位素掺入法

Test for sensitization of medical devices—
Part 1: Murine local lymph node assay (LLNA) : Radioisotope
incorporation method

2013-10-21 发布

2014-10-01 实施



国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

YY/T 0879 的总标题是《医疗器械致敏反应试验》，包括以下部分：

——第1部分：小鼠局部淋巴结试验(LLNA)放射性同位素掺入法；

有关其他方面的致敏反应试验将有其他部分的标准。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

YY/T 0879 的本部分参考 ASTM F 2148-2007《使用小鼠局部淋巴结试验(LLNA)评价迟发型接触性超敏反应的标准规范》制定。

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。

本部分主要起草单位：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。

本部分参加起草单位：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、上海生物材料研究测试中心。

本部分主要起草人：孙立魁、侯丽、刘成虎、韩建民、孙皎、陆华。

引 言

医疗器械的材料组分、加工助剂或清洗及灭菌残留物都可能诱发机体发生超敏反应。GB/T 16886.10中推荐了三种测定医疗器械潜在皮肤致敏性的动物试验,包括豚鼠最大剂量试验(GPMT)、封闭式贴敷试验(Buehler 试验)和小鼠局部淋巴结试验(LLNA)。GB/T 16886.10 未给出 LLNA 方法步骤。

目前国际间已接受 LLNA 为豚鼠试验的唯一替代试验用于检验单一化学物,为化学物的首选测定法。与豚鼠致敏试验相比,LLNA 具有以下优点:

- a) 试验周期短。LLNA 总周期为 7 天,而豚鼠致敏试验则需要 24 天。
- b) 所需试验动物较小。相比之下,LLNA 更符合 GB/T 16886.2 中动物福利要求。
- c) LLNA 能得到刺激的定量反应数据,而非主观评价,可用于剂量效应的测定,并提供可进行统计学分析的客观数据。

与豚鼠致敏反应相似,LLNA 也是首选用于单一化学物致敏潜能的检测。LLNA 检测了初期(诱导)的致敏过程,而豚鼠致敏试验则检测了后期(激发)的致敏过程。对不能渗透皮肤的某些金属和高分子量试验样品出现假阴性、假阳性的情况,可能需要豚鼠试验来评价其潜在的致敏性。YY/T 0879 的本部分中需要使用放射性同位素。因此,鼓励寻找放射性同位素的替代品,当新方法得到确认后,YY/T 0879 的本部分即可采用。

医疗器械致敏反应试验

第1部分:小鼠局部淋巴结试验(LLNA)

放射性同位素掺入法

1 范围

YY/T 0879 的本部分给出了医疗器械/材料致敏试验的检测方法。

本部分预期为豚鼠致敏试验提供一个替代性方法,尤其适用于只接触完好皮肤的医疗器械/材料。然而,当评定金属材料或用于深部组织或损伤表面医疗器械产品/材料的致敏反应时,仍然推荐使用豚鼠致敏试验。

本部分只适用于能浸入皮肤的低分子量化学物,该吸收的化学物或代谢物可结合于大分子物质,如蛋白质以形成免疫原性复合物。

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 16886.11 医疗器械生物学评价 第11部分:全身毒性试验

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 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AOO:丙酮橄榄油溶液(4:1 体积比)

DMSO:二甲基亚砷

DNCB:2,4 二硝基氯苯

ICCVAM:机构间替代方法评价协调委员会

PBS:磷酸盐缓冲液(pH 7.2)

TCA:5%三氯乙酸

^3H -TdR: ^3H -胸腺嘧啶核苷, $7.4 \times 10^{10} \text{ Bq/mm} (2 \text{ Ci/mM})$ (PBS 中); ^{125}I IUDR- ^{125}I 放射性尿嘧啶核苷

5 试验样品的制备

5.1 宜根据 GB/T 16886.12 推荐的原则制备试验样品。所有固体材料应进行浸提。应使用极性溶剂(水性)和非极性(非水性或有机)溶剂,如 DMSO 或 AOO 等进行浸提。

5.2 非刺激性液体试验样品和凝胶应直接使用。刺激性液体应根据液体试验样品的溶解度,使用极性或非极性溶剂进行稀释,直到溶液没有刺激性。

5.3 全水溶液不适用于耳部。因此,宜在每 10 mL 极性对照和试验溶液中加入 0.05 g 羟乙基纤维素以辅助溶液在耳部存留。

5.4 用于浸提的试验样品宜与器械最终使用的表面相一致。

5.5 样品应按照终产品灭菌的方法进行灭菌。

5.6 宜注意制样过程中不要污染样品,推荐使用无菌技术操作。

注: LLNA 检验化学物一般采用剂量效应方式。医疗器械供试样品可能为浸提液,这种情况下仅有单剂量用于试验,一般可检验未稀释的浸提液。不过,当浸提液含有高毒性成分时,毒性在 LLNA 中可导致阴性反应。因此在 LLNA 中检验高毒性浸提液(见 GB/T 16886.5)时,推荐采用剂量效应方式和稀释浸提液。

6 阳性对照的制备

6.1 非极性阳性对照——称取 0.025 g 的 DNCB 并放入烧瓶中。加入足量的 DMSO 完全溶解 DNCB,加入 DMSO 补足 10 mL。盖住并摇晃烧瓶直到获得均匀的溶液。阳性对照的剂量以临床观察中不产生全身毒性为宜。

6.2 极性阳性对照——中性福尔马林可购买市售商品。(或用 PBS 稀释甲醛,甲醛体积为总体积的 1/10。稀释方法:在 10 mL 的烧瓶中放入 1 mL 的甲醛。加入足量的 PBS 混合这两种溶液,另加 PBS 补足 10 mL,盖住并摇晃烧瓶直到获得均匀的溶液。)

6.3 极性溶液不适用于耳部。因此,本试验中,在每 10 mL 极性阳性对照溶液中加入 0.05 g 羟乙基纤维素以辅助溶液在耳部存留直到吸收。

6.4 对所有需要浸提的样品,按照 GB/T 16886.12 制备极性和非极性浸提液(推荐使用 DMSO 或 AOO,但也可使用 ICCVAM 文件所列出的其他浸提介质)。

注:在经常进行 LLNA 时,在 6 个月或更长时间内的阳性反应具有良好的一致性,宜至少每 6 个月进行一次阳性物对照实验。

7 动物处理

7.1 动物选择与饲养

宜使用 7~12 周龄、健康、未孕的雌性 CBA/Ca 或 CBA/j 小鼠。体重差异应低于平均体重的 20%。其他适宜的实验动物品系如 BALB/c 也可使用,但宜进行论证。根据处理分组,每笼 5 只饲养。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。

7.2 试验前动物准备

第 1 天,检查并标记每组动物(不能使用耳部标记法)。精确称量每只小鼠的体重。

7.3 供试液处理动物

7.3.1 阳性对照组、阴性对照组和试验样品组至少使用 5 只小鼠。受试动物每日双耳背部局部给予

25 μL 供试液,连续3天。对于只有极性供试液组,宜在处理前用丙酮擦拭耳背部皮肤,以帮助其吸收。

7.3.2 试验中,除了液体试验物质,应包括:极性和非极性阳性对照,极性和非极性浸提介质对照,试验样品的极性浸提液和试验样品的非极性浸提液。

7.3.3 对于液体试验物质,应包括:极性和非极性阳性对照,液体试验样品,和适用于液体样品特性的极性或非极性浸提介质对照。

7.3.4 浸提液应在制备后24 h内使用,并宜室温贮存。第2天和第3天分别处理,间隔 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

表1描述了每天的试验内容。

7.3.5 每日观察每只小鼠试验部位的局部刺激征象以及全身毒性征象(见GB/T 16886.10和GB/T 16886.11)。如果怀疑器械/材料为刺激物,建议采用2只小鼠进行预试验。

表1 LLNA 操作时间表

天数 d	操作
<1	制备第1天使用的浸提液并准备第2天和第3天的浸提液
1	小鼠称重、标记并用试验样品处理耳部
2	观察小鼠并记录任何毒性或刺激体征,处理耳部
3	观察小鼠并记录任何毒性或刺激体征,处理耳部
4	观察小鼠并记录任何毒性或刺激体征
5	观察小鼠并记录任何毒性或刺激体征
6	第3天处理小鼠后 $72\text{ h}\pm 3\text{ h}$,制备放射性同位素,观察小鼠的毒性或刺激体征、称重并静脉注射放射性同位素、注射后 $5\text{ h}\pm 54\text{ min}$,处死小鼠并制备淋巴结细胞,细胞沉淀18 h
7	制备细胞 放射性计数 数据分析

注:以下步骤到8.3.2直到沉淀18 h的步骤需要至少8 h才能完成,实验室应具备这种条件。

7.4 放射性同位素示踪物的制备

7.4.1 制备工作浓度的 ^3H -TdR $2.96\times 10^6\text{ Bq/mL}$ ($80\text{ }\mu\text{Ci/mL}$)(体积分数),或用含 10^{-5} mol/L 氟脱氧尿苷的PBS制备 $2.96\times 10^5\text{ Bq/mL}$ ($8\text{ }\mu\text{Ci/mL}$)的 ^{125}I -IUDR。每只小鼠注射250 μL 。应附上所有使用放射性物质的标准警示信息。实验室应有操作放射性物质的资质并且所有人员经过适宜的培训并取得合格证书。

7.4.2 将0.8 mL的 $3.7\times 10^7\text{ Bq}$ (1.0 mCi/mL) ^3H -TdR[特定活性为 $7.4\times 10^{10}\text{ Bq/(mmol/L)}$] 2.0 Ci/(mmol/L)]放入一静置烧瓶中。加入无菌PBS至10 mL。盖紧并充分混匀。

7.4.3 确认稀释液的浓度。在200 mL的烧瓶中用水将0.08 mL $2.96\times 10^6\text{ Bq/mL}$ ($80\text{ }\mu\text{Ci/mL}$)的 ^3H -TdR稀释至200 mL。盖紧颠倒混匀几次。在闪烁管中加入两份1 mL的样品。每管加入10 mL的闪烁液,混合形成涡流,并在液闪计数器上计数。每管计数3次并计算平均值,计算浓度。每分钟计数(cpm)和每分钟衰变数(dpm)之间的转换如下式:

$$\text{dpm} = \frac{\text{cpm}}{\text{十进制计数效率}}$$

为了验证 ^3H -TdR工作溶液,测定其与 $2.96\times 10^6\text{ Bq/mL}$ ($80\text{ }\mu\text{Ci/mL}$)的接近程度。最终稀释液中含 $1.18\times 10^3\text{ Bq}$ ($0.032\text{ }\mu\text{Ci}$)。因为 $1\text{ }\mu\text{Ci}=2\,220\,000\text{ dpm}=3.7\times 10^4\text{ Bq}$,所以 $0.032\text{ }\mu\text{Ci}=71\,040\text{ dpm}=$

1.18×10^3 Bq。因此:

$$\text{工作溶液的 Bq}(\mu\text{Ci}) = \frac{\text{平均 dpm}}{71\ 040\ \text{dpm}} \times 2.96 \times 10^5\ \text{Bq}(80\ \mu\text{Ci})$$

调整所需溶液。如使用 ^{125}I -IUDR,需进行相似的验证。

7.5 原位标记

第6天(耳部最后一次处理后 $72\ \text{h} \pm 3\ \text{h}$),精确记录每只小鼠的体重。使用 $1.0\ \text{mL}$ (不大于25标准刻度)带针注射器于每只小鼠一侧尾静脉注射 $250\ \mu\text{L}$ 含 $7.4 \times 10^5\ \text{Bq}(20\ \mu\text{Ci})$ ^3H -TdR 或 $7.4 \times 10^4\ \text{Bq}(2\ \mu\text{Ci})$ 的 ^{125}I -IUDR 的无菌 PBS。

8 淋巴结收集和淋巴结细胞制备

注1:本部分所有器具和溶液都宜作为放射性物质来对待。

注2:如果研究者不熟悉淋巴结的位置,可参照 ICCVAM 文件中的图谱、小鼠解剖书籍或使用染色试验来定位合适的淋巴结。建议小鼠耳部皮内组织注射 $0.1\ \text{mL}$ 2% 的伊文思蓝, $5\ \text{min} \sim 10\ \text{min}$ 后处死小鼠。解剖小鼠暴露淋巴结。

8.1 动物处死

注射放射性同位素 $5\ \text{h} \pm 45\ \text{min}$ 后处死小鼠。

8.2 摘取耳部引流淋巴结

从处死后小鼠体内摘取每只小鼠双侧耳部引流淋巴结。

8.3 制备每只小鼠耳部淋巴结细胞的单细胞悬液(LNC)

8.3.1 收集每只小鼠双侧引流淋巴结,并放入盛有 $1\ \text{mL} \sim 3\ \text{mL}$ PBS 的标记试验管中。用小剪刀将单只小鼠的淋巴结剪碎或直接放在200目筛网上轻轻研磨,收集入 $15\ \text{mL}$ 的试管中。用 $2\ \text{mL} \sim 6\ \text{mL}$ 的 PBS 冲洗筛网以便将细胞碎片转移至试管中,重复操作1次,将试管中液体补足至 $10\ \text{mL}$ 。

注:如使用 ^{125}I 作为标记物,可不制备单细胞悬液,直接用 γ -计数器进行计数。

8.3.2 在 $2\ ^\circ\text{C} \sim 8\ ^\circ\text{C}$ 条件下, $190\ \text{g} \sim 200\ \text{g}$ 离心样品 $10\ \text{min}$ 。丢弃上清并预留 $1\ \text{mL} \sim 2\ \text{mL}$ 。轻轻混匀细胞沉淀,用 PBS 补足至 $10\ \text{mL}$,涡旋震荡重悬。重复离心清洗步骤至少2次。最后1次清洗后,丢弃上清,并将细胞重悬于 $3\ \text{mL}$ 冰冷的5% TCA 中,在 $2\ ^\circ\text{C} \sim 8\ ^\circ\text{C}$ 条件下沉淀 $18\ \text{h} \pm 1\ \text{h}$ 。

8.4 放射活性的测量

8.4.1 在 $2\ ^\circ\text{C} \sim 8\ ^\circ\text{C}$ 条件下, $190\ \text{g} \sim 200\ \text{g}$ 离心沉淀细胞悬液 $10\ \text{min}$ 。丢弃上清液并加入 $1\ \text{mL}$ 新鲜制备的5%的 TCA,涡旋震荡混匀。

8.4.2 将细胞悬液转移入一标记的含 $10\ \text{mL}$ 液闪液的试管中,盖紧,充分震荡混匀。

8.4.3 制备2个试剂空白对照来测量 ^3H -TdR 的背景水平。加入 $10\ \text{mL}$ 液闪液和 $1\ \text{mL}$ 5% 的 TCA 并充分混合。

8.4.4 擦拭所有试管的外部并放入液闪计数器。使试管暗适应 $30\ \text{min}$,每管计数3次。

9 结果

9.1 通过液闪计数器来测量每分钟每只小鼠 ^3H -TdR 的掺入水平,并用 cpm/小鼠来表示。或用 γ -计

数仪来计数 I^{125} IUDR 的掺入水平。用 cpm 值除以 ^3H -TdR 的计数效率来得到 dpm。计算每只小鼠的每管 3 次测量的 dpm 算术平均值,并减去试剂对照的 dpm 平均值。以 dpm/小鼠表示,见 7.4.3。

$$\text{真实}_{\text{dpm}} = \text{测量}_{\text{dpm}} - \text{背景}_{\text{dpm}}$$

9.2 计算每组 5 只小鼠 dpm 的算术平均值(\bar{X})和标准偏差(SD)。用试验样品组的平均 dpm 与阴性对照的 dpm 之比来计算刺激指数(SI)。

10 结果的评价和试验报告

10.1 应用统计学方法来评价试验结果。 t 检验适合于参数数据,曼-怀氏秩和检验适合于非参数数据。与阴性对照组相比, $p < 0.05$ 被认为有统计学意义。

10.2 如果以下标准满足,则认为试验有效:

每个阳性对照的 $SI \geq 3$ 且显著大于供试液对照。

阳性对照的平均值与阴性对照的平均值相比,具有统计学意义。

10.3 试验报告应包括每只小鼠的体重数据、dpm 值、每组小鼠的平均值和标准偏差以及与供试液对照相比得出的每组小鼠的 SI。应识别与供试液对照有显著统计学差异的值。

10.4 供试试验样品 $SI \geq 3$ 被认为是致敏物。应使用统计学方法(t 检验或曼-怀氏秩和检验)来帮助评价试验结果。

10.5 应对试验方法中给出的选择进行说明(如使用的浸提介质或放射性同位素)。

10.6 应分析实验开始和结束时每只小鼠的体重,特别是在评价浸提液毒性时,应注意体重的任何改变并将其包括在结果分析中。