

中华人民共和国医疗行业标准

YY/T 0127.10—2009
代替 YY/T 0127.10—2001

口腔医疗器械生物学评价 第2单元：试验方法 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验 (Ames 试验)

Biological evaluation of medical devices used in dentistry—
Part 2: Test method—Salmonella typhimurium reverse mutation assay
(Ames mutagenicity test)

2009-06-16 发布

2010-12-01 实施



国家食品药品监督管理局 发布

前 言

《口腔医疗器械生物学评价》系列标准中的第1单元,YY/T 0268—2008《牙科学 口腔医疗器械生物学评价 第1单元:评价与试验》是口腔医疗器械生物学评价与试验项目的选择,为指南性标准。

YY/T 0127《口腔材料生物学评价 第2单元 试验方法》分为以下几部分:

- YY/T 0127.1—1993 口腔材料生物试验方法 溶血试验;
- YY/T 0127.2—×××× 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 急性全身毒性试验:静脉途径;
- YY/T 0127.3—1998 口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 根管内应用试验;
- YY/T 0127.4—1998 口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 骨埋植试验;
- YY/T 0127.5—1999 口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 吸入毒性试验;
- YY/T 0127.6—1998 口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 显性致死试验;
- YY/T 0127.7—2001 口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 牙髓牙本质应用试验;
- YY/T 0127.8—2001 口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 皮下植入试验;
- YY/T 0127.9—2001 口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 细胞毒性试验(琼脂覆盖法及分子滤过法);
- YY/T 0127.10—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames 试验);
- YY/T 0127.11—2001 牙科学 用于口腔的医疗器械生物相容性临床前评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 盖髓试验;
- YY/T 0127.12—2008 牙科学 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 微核试验;
- YY/T 0127.13—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 口腔黏膜刺激试验;
- YY/T 0127.14—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 急性经口全身毒性试验;
- YY/T 0244—1996 口腔材料生物试验方法 短期全身毒性试验:经口途径。

本部分为 YY/T 0127 的第10部分。

本部分代替 YY/T 0127.10—2001《口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames 试验)》。

本部分与 YY/T 0127.10—2001 相比,主要变化如下:

- 标准名称改为:《口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames 试验)》;
- 规范性引用文件做了相应修改;

- 浸提液剂量由 200 mg/mL 改为最高剂量；
- 受试样品由五个剂量改为至少三个剂量。分为最高剂量组、1/2 最高剂量组和 1/4 最高剂量组；
- 增加对固化类材料样品制备要求：“对于固化类材料，考虑固化状态材料的诱变性时，建议采用固化 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 的试样进行试验。即试样固化后放于室温下，密封保存 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。也可根据其使用特点选择何时进行试验，但在报告中应予以注明”；
- 由于多氯联苯在国内、国外已经不再使用，因此将“多氯联苯”改为“苯巴比妥与 3-甲基胆蒎或 β -苯丙黄酮”作为诱导剂。

本部分的附录 A 为规范性附录。

本部分由国家食品药品监督管理局提出。

本部分由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会归口。

本部分由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负责起草。

本部分主要起草人：林红、李盛林、付嘉、王衣祥、郝鹏。

本部分于 2001 年首次发布。于 2009 年第一次修订。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- YY 0127.10—2001。

口腔医疗器械生物学评价

第2单元:试验方法

鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验 (Ames 试验)

1 范围

YY/T 0127 的本部分规定了口腔医疗器械鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验方法。

本试验用于测定可引起沙门氏杆菌基因置换和/或移码突变的口腔材料所诱发的依赖于组氨酸(his⁻)的菌株产生不依赖于组氨酸(his⁺)的基因突变。为检测口腔医疗器械的诱变性试验之一。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 YY/T 0127 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB 7919—1987 化妆品安全性评价程序和方法

GB 15193.4—2003 鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验

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(GB/T 16886.12—2005,ISO 10993.12:2002,IDT)

3 仪器

3.1 实验室常用设备。

3.2 洁净工作台,恒温培养箱,恒温水浴,低温高速离心机,低温冰箱(—80℃)或液氮罐等。

4 培养基和试剂的制备

培养基和试剂的制备见附录A。

5 菌株准备、鉴定和贮藏

5.1 菌株

采用组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌共四株——TA97、TA98、TA100、TA102。

5.2 菌株贮存

菌株贮存在加有二甲基亚砜的(光谱纯)新鲜细菌培养液中,其体积比为0.09:1,混合后分装于小试管或菌种管内,经干冰丙酮液(—75℃)或液氮(—196℃)速冻,在—80℃冰箱或—196℃液氮中长期贮存。

5.3 增菌培养

从冷冻贮存菌株管中刮取细菌置5 mL 营养肉汤培养基中,经37℃振荡(100次/min)培养10 h~12 h,活菌数应达10⁹/mL(OD₆₀₀≈0.4)。细菌培养液从37℃取出后,应立即放入4℃中备用。试验需用当天孵育好的新鲜细菌。

5.4 菌株鉴定

5.4.1 组氨酸需求(his⁻)试验

凡组氨酸营养缺陷型试验菌株只能在补充组氨酸的培养基上生长,而在缺乏组氨酸的培养基上不能生长。

鉴定方法:在底层培养基平皿表面加入 0.5 mmol/L L-组氨酸 0.1 mL 和 0.5 mmol/L D-生物素 0.1 mL。用 L 棒铺开。对照平皿只加生物素不加组氨酸。用白金耳浸细菌培养液,在对照平皿和含有组氨酸/生物素的平皿表面分别平行划线。四株细菌可划在同一个平皿上,经 37℃ 孵育 24 h 后,观察细菌生长情况。试验菌株在含组氨酸平皿上生长,在对照平皿上不应生长。

5.4.2 脂多糖屏障缺陷鉴定(rfa 突变)

粗糙型突变的微生物,其细胞表面一层脂多糖屏障已经破坏,因此一些大分子物质能穿过菌膜进入菌体内而抑制其生长。野生型菌株或含 gal 缺失的菌株则不受影响。

鉴定方法:分别将每种细菌培养液 0.1 mL 加到 45℃ 2 mL 顶层培养基试管内,混匀后倾倒入营养琼脂培养基平皿表面,使其均匀分布。待固化后,取直径为 6 mm 无菌滤纸圆片浸 1 mg/mL 结晶紫溶液 10 μL,放到平皿中央。经 37℃ 孵育 24 h 后,围绕圆纸片出现透明的抑菌环(直径大约 14 mm),说明此菌存在深粗型(rfa)突变。TA97、TA98、TA100、TA102 均有抑菌环。野生型鼠伤寒杆菌无抑菌环。

5.4.3 对紫外线敏感性鉴定(uvrB 修复缺陷型的鉴定)

具有 uvrB 修复缺陷型的试验菌株,在紫外线照射后仍能照常生长,借此证明 uvrB 突变的存在。

鉴定方法:用白金耳浸细菌培养液,在营养琼脂培养基平皿表面平行划线,四株细菌可划在同一平皿上。用黑纸覆盖平皿一半,在距离 33 cm 处用 15 W 紫外线杀菌灯照射平皿 8 s,经 37℃ 孵育 24 h 后观察结果。对紫外线敏感的菌株(TA97、TA98、TA100)只在未照射过的一半平皿上生长。而具有 uvrB 修复缺陷型的菌株(TA102)在紫外线照射(未盖黑纸的另一半平皿)后仍能生长。

5.4.4 抗氨苄青霉素(PKM101)试验(菌株 R 因子丢失鉴定)

含 R 因子的试验菌株对氨苄青霉素具有抗性。R 因子不稳定容易丢失,从而使试验菌株丧失 R 因子的特性,故需鉴定 R 因子是否存在。

鉴定方法 1:用白金耳浸细菌培养液,在含氨苄青霉素平皿表面平行划线,四株细菌可划在同一平皿上。还应选用一个无抗性因子的菌株,以测定氨苄青霉素的效应。经 37℃ 孵育 24 h 后,无抗性因子菌株不应生长。

鉴定方法 2:用白金耳浸细菌培养液,在营养琼脂培养基平皿表面平行划线,四株细菌可划在同一平皿上。将沾有氨苄青霉素溶液的滤纸条与划线交叉放置,37℃ 孵育 24 h。如滤纸条周围细菌生长正常,说明试验菌株具有 R 因子。

5.4.5 四环素(PAQI)抗性的鉴定

鉴定方法 1:用白金耳浸细菌培养液,在含氨苄青霉素/四环素平皿表面平行划线,四株细菌可划在同一平皿上。经 37℃ 孵育 24 h 后,对四环素有抗性的 TA102 菌株能生长,对四环素无抗性的菌株不生长。

鉴定方法 2:用白金耳浸细菌培养液,在营养琼脂培养基平皿表面平行划线,四株细菌可划在同一平皿上。待干后,吸取四环素(8 mg/mL)溶液与菌株划线处交叉划线,37℃ 孵育 24 h。对四环素有抗性的 TA102 菌株能生长,其他菌株不生长。

5.4.6 自发回变数(his⁺)的测定

在小试管中加入融化的顶层培养基 2 mL,分别加入待测菌株的菌液 0.1 mL,迅速在高速液体混合器上混匀,倾倒在已固化的底层培养基平皿上,使其均匀分布。待固化后,经 37℃ 孵育 48 h,计数全部菌落数。一个菌株应做 2~3 个平皿,以便计算平均菌落数。必要时可重复试验,以保证回变菌落数值在一个恒定的范围。各试验菌株的自发回变数分别为:TA97(97~180);TA98(15~60);TA100(75~200);TA102(240~360)。加过 S-9 的菌株,自发回变数稍有增加。

5.4.7 对阳性突变剂的敏感性鉴定

使用已知阳性对照剂,检查试验菌株的敏感性是否降低,其方法同7。

6 代谢活化剂[大鼠肝微粒体酶(S-9)]的诱导和制备

6.1 大鼠肝微粒体酶(S-9)的诱导

选用体重 150 g~200 g 的健康雄性 S-D 大白鼠或体重 110 g~150 g 的 Wistar 大鼠。将苯巴比妥与 3-甲基胆蒎或与 β -萘黄酮溶于玉米油中。可用下述三种方法之一进行诱导:

- 苯巴比妥作诱导剂时,大鼠的剂量为 80 mg/kg;小鼠的剂量为 160 mg/kg。ip, QD, 连续 5 d。末次注射后 24 h 处死。处死前不必禁食。
- 3-甲基胆蒎:大鼠为 20 mg/kg;小鼠为 40 mg/kg, ip, QD, 连续 3 d 最后一次注射后 24 h 处死。处死前不必禁食。
- 联合诱导:经口或腹腔注射 80 mg/kg 苯巴比妥钠和 80 mg/kg β -萘黄酮,连续 3 d。处死前 16 h 停止饮食,但可自由饮水。

6.2 切取肝脏

处死的大鼠经过无菌处理,打开腹腔,用 20 mL 0.15 mol/L 氯化钾溶液(4℃)进行肝门静脉灌注后,小心分离并将肝脏完整取出,整个过程应在无菌室中进行。离体以后的肝脏始终保持 4℃以下无菌操作。

6.3 S-9 的制备

制备 S-9 的一切器皿均应消毒,全部操作在冰水浴中进行。

肝脏称重后,在 0.15 mol/L 氯化钾溶液中洗涤数遍。每克重肝脏加 0.15 mol/L 氯化钾溶液 3 mL。用剪刀剪碎肝脏,放入组织匀浆机中,以 4 000 r/min 匀浆 2 min。将匀浆液放入低温 0℃~4℃高速离心机上,以 9 000 g 离心 10 min,其上层液即 S-9。

6.4 S-9 贮存

吸取 2 mL 上层液分装于小试管或安瓿中。在密封的条件下,用干冰丙酮液速冻后,贮存于-80℃冰箱或液氮容器中。保存期不超过 1 a。

6.5 S-9 鉴定

S-9 制备后,应进行下列测定:

- 无菌检查;
- 蛋白含量测定(Lowry 法);每毫升蛋白含量应不超过 40 mg;
- 细胞色素 P-450 测定。

S-9 活力以标准致癌物进行测定。

6.6 S-9 的剂量选择

首先使用标准浓度的 S-9 混合液,测定其对已知阳性致癌物的生物活性,确定最适用量。如果是阴性结果,还应使用高浓度的 S-9 混合液重新试验。

6.7 S-9 混合液制备:见附录 A 中的第 A.8 章。

7 受试样品的制备和剂量选择

7.1 试样制备可选用生理盐水、二甲基亚砜(DMSO)或其他溶剂(毒性剂量以下),无论选用何种溶剂,均应无诱变性。将材料制备成溶液、混悬液或浸提液。

浸提液制备按 GB/T 16886.12 规定的方法进行。对于固化类材料,考虑材料在固化状态的诱变性时,建议采用固化后 24 h $\pm$ 2 h 的试样进行试验。即试样制备后放于室温下,密封保存 24 h $\pm$ 2 h。也可根据其使用特点选择何时进行试验,但在报告中应予以注明。

7.2 受试样品剂量选择预试验 用菌株 TA100 进行预试验(操作程序应与正式试验一致),以了解受试样品对细菌的毒性。

决定受试样品的最高剂量的标准是细胞毒性和溶解度。细胞毒性表现是：平皿中回复突变菌落数减少，背景菌苔变清晰，40倍显微镜下背景菌苔稀疏，体积增大等。毒性大的受试样品，选择有轻微毒性的剂量作为试验的最高剂量。毒性小、溶解度高的受试样品，最高剂量溶液 50 mg/mL，混悬液 100 mg/mL。对于无法制备成溶液或混悬液的材料，制备成浸提液。最高剂量浸提液浓度不低于 400 mg/mL。

7.3 受试样品正式试验剂量分组 每种受试样品至少设三个剂量组。分为最高剂量组、1/2 最高剂量组和 1/4 最高剂量组。

8 诱变试验方法

一次试验最少设三个受试样品剂量组(见 7.3)及阴性(溶媒)对照组和阳性对照组，代谢活化和非代谢活化两种测试过程应同时进行。试验结果在有背景菌苔存在情况下，计算每个平皿的回变菌落数，并需重复试验 1~2 次。

8.1 预培养法

分别取 0.1 mL 受试样品液、0.5 mL S-9 混合液(需代谢活化时加。不需代谢活化时加 0.5 mL 不含 S-9 的磷酸缓冲液)，0.1 mL 细菌培养液。将三者移入无菌小试管内混合，在 37℃ 振荡培养 20 min，再加入 2 mL 顶层培养基，混匀后倾倒在底层培养基平皿上，使之均匀分布。待固化后，将平皿翻转，经 37℃ 孵育 48 h 观察结果。

8.2 平板掺入法

将含 0.5 mmol/L 组氨酸生物素的顶层培养基 2 mL 分装于小试管中，45℃ 恒温水浴中保温，每管再依次加入 0.1 mL 受试样品液、0.1 mL 细菌培养液和 0.5 mL S-9 混合液(需代谢活化时加。不需代谢活化时加 0.5 mL 不含 S-9 的磷酸缓冲液)，混匀后倾倒在底层培养基平皿上并使之均匀分布。待固化后，将平皿翻转，经 37℃ 孵育 48 h 观察结果。

9 结果评定

记录试验组和对照组的每一平皿的回变菌落数，每个试验组的回变菌落数以平均值和标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。

受试样品的回变菌落数高于阴性对照回变菌落数的二倍以上，并有剂量-效应关系或某一个或某几个剂量点的可重复性，并有统计学意义的阳性反应，则判为诱变阳性。

附 录 A

(规范性附录)

培养基和试剂的制备

A.1 顶层培养剂

琼脂	1.2 g
氯化钠	1.0 g
蒸馏水	200 mL

加热溶化后,加入 0.5 m mol/L 组氨酸-生物素溶液 20 mL。121 °C 104 kPa 20 min 高压灭菌。

A.2 底层培养基

琼脂	7.5 g
蒸馏水	465 mL

121 °C 104 kPa 20 min 高压消毒后,趁热(80 °C)在其内依次加入 50X(V-B)培养基 E 10 mL 和 40%葡萄糖溶液 25 mL,混匀,按每皿 30 mL 倒平皿,凝固固化后倒置于 37 °C 培养箱中 24 h~48 h。

A.3 Vogel-Bonner(V-B)培养基 E(50X)

硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.0 g
枸橼酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	10 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	50 g
磷酸氢铵钠($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	17.5 g
加蒸馏水至	100 mL

先将后三种溶解后,再加入硫酸镁,待完全溶解后,分装于锥形瓶里,121 °C 104 kPa 20 min 高压消毒。

A.4 40%葡萄糖溶液

称取 40 g 葡萄糖,加入蒸馏水至 100 mL,115 °C 69 kPa 20 min 高压消毒。4 °C 保存。

A.5 营养肉汤培养基

牛肉膏	2.5 g
胰胨(或混合蛋白胨)	5.0 g
氯化钠	2.5 g
磷酸氢二钾	1.0 g
蒸馏水	500 mL

加热溶解,调 pH 至 7.4,121 °C 104 kPa 20 min 高压消毒。4 °C 保存。

A.6 营养肉汤琼脂培养基

琼脂粉	10 g
肉汤培养基	500 mL

加热溶化或,调 PH 至 7.4,121 °C 104 kPa 20 min 高压消毒后,倒斜面或平皿。用于菌株鉴定、细菌活力鉴定或常规试验用菌株保存。

A.7 0.5 mol/L 组氨酸-生物素溶液

D-生物素(相对分子质量 244.3) 30.9 mg
 L-组氨酸盐(相对分子质量 191.7) 24.0 mg
 加蒸馏水至 250 mL
 121 °C 104 kPa 20 min 高压消毒。4 °C 保存。

A.8 S-9 混合液配制

按每毫升 S-9 混合液计算,见表 A.1。

表 A.1 S-9 混合液配制

成 分	标准浓度	高浓度
大鼠肝 S-9	40 μ L	100 μ L
0.4 mol/L $MgCl_2$ + 1.65 mol/L KCl 盐溶液	20 μ L	20 μ L
0.2 mol/L 6-磷酸葡萄糖	25 μ L	25 μ L
0.2 mol/L 辅酶 II	20 μ L	20 μ L
0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)	500 μ L	500 μ L
无菌蒸馏水	395 μ L	335 μ L
注:上述各成分按比例混匀,置冰浴中待用。		

A.9 $MgCl_2$ -KCl 盐溶液(1.65 mol/L KCl + 0.4 mol/L $MgCl_2$)

氯化钾(KCl) 61.5 g
 氯化镁($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) 40.7 g
 蒸馏水加至 500 mL
 121 °C 104 kPa 20 min 高压消毒。

A.10 0.2 mol/L 辅酶 II (NADP)溶液

NADP(相对分子质量 765.4) 459.24 mg
 蒸馏水(无菌) 3 mL
 无菌条件下配制,分装于 EP 管中, -20 °C 保存。

A.11 0.2 mol/L 6-磷酸葡萄糖(G-6-P)溶液

G-6-P 钠盐(相对分子质量 304.1) 182.46 mg
 蒸馏水(无菌) 3 mL
 无菌条件下配制,分装于 EP 管中, -20 °C 保存。

A.12 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)

磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) (31.2 g/L) 120 mL
 磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) (71.6 g/L) 880 mL
 121 °C 104 kPa 20 min 高压消毒。4 °C 保存。

A.13 0.15 mol/L 氯化钾溶液

精确称取氯化钾 11.18 g,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,121 °C 104 kPa 30 min 高压消毒,冷却后冰箱

保存,用于 S-9 制备。

A. 14 氨苄青霉素溶液(8 mg/mL)

称取三羟氨青霉素 80 mg,加入 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL。无菌配制,4 ℃ 保存。

A. 15 0.1%结晶紫溶液

称取结晶紫 10 mg,加 10 mL 无菌水,4 ℃ 保存。

A. 16 四环素溶液(8 mg/mL)

称取四环素 40 mg,加入 0.02 mol/L 盐酸溶液 5 mL,用于四环素抗性试验。无菌配制,4 ℃ 保存。

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
口 腔 医 疗 器 械 生 物 学 评 价
第 2 单 元：试 验 方 法
鼠 伤 寒 沙 门 氏 杆 菌 回 复 突 变 试 验
(Ames 试 验)

YY/T 0127.10—2009

*

中 国 标 准 出 版 社 出 版 发 行
北 京 复 兴 门 外 三 里 河 北 街 16 号

邮 政 编 码：100045

网 址 www.spc.net.cn

电 话：68523946 68517548

中 国 标 准 出 版 社 秦 皇 岛 印 刷 厂 印 刷

各 地 新 华 书 店 经 销

*

开 本 880×1230 1/16 印 张 0.75 字 数 16 千 字

2009 年 12 月 第 一 版 2009 年 12 月 第 一 次 印 刷

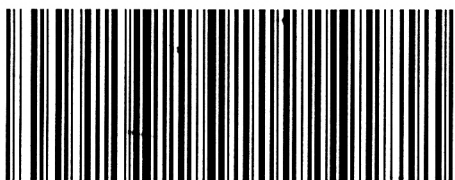
*

书 号：155066·2-20057 定 价 16.00 元

如 有 印 装 差 错 由 本 社 发 行 中 心 调 换

版 权 专 有 侵 权 必 究

举 报 电 话：(010)68533533



YY/T 0127.10—2009