

附 1

药包材细菌回复突变试验方法

本法系在有或无代谢活化系统的条件下,通过观察一定量的供试品溶液诱导组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株和色氨酸缺陷型的大肠杆菌发生回复突变的情况,以评价供试品潜在的致突变性。

试验用菌株 采用 5 种鼠伤寒沙门氏菌突变型菌株进行试验,菌株特性鉴定需符合要求,推荐的菌株组合为:

- a) 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株 TA97 或 TA1537 或 TA97a;
- b) 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株 TA98;
- c) 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株 TA100;
- d) 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株 TA102, 或大肠杆菌 WP2 uvrA, 或 WP2 uvrA(pKM101);
- e) 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株 TA1535。

供试品溶液的制备 取供试品,按照“药包材生物学评价与试验选择指导原则”中生物学试验的要求制备供试品溶液,还可选择与试验体系相容的其他提取溶剂,如二甲基亚砜(DMSO)等。

阴性对照液的制备 采用供试品溶液制备同批号的提取溶剂(不含供试品),以相同的方式制备作为阴性对照液。常用的阴性对照物包括水(或 0.9%氯化钠注射液)、含血清培养基、DMSO 等。通常 DMSO 在培养液中的终浓度不应超过 1.0%,水(或 0.9%氯化钠注射液)不应超过 10%。供试品溶液和阴性对照液应在制备后 24 小时内使用,在试验前应平衡至室温,并确保充分混匀。

阳性对照 按表 1 和表 2 选择阳性对照,当使用 2-氨基蒽作为有代谢活化系统的阳性对照时,2-氨基蒽不能作为所有菌株的唯一阳性对照,还应使用其他阳性对照,如苯并(a)蒽或 7,12-二甲基苯并[a]蒽等。阳性对照应现用现配。

表 1 Ames 试验阳性对照(有代谢活化系统)

化学物	CAS No.
9,10-二甲基蒽或	781-43-1
7, 12-二甲基苯并[a]蒽或	57-97-6
刚果红(用于还原代谢活化法)或	573-58-0
苯并(a)蒽或	50-32-8
环磷酰胺(一水)或	50-18-0, 6055-19-2
2-氨基蒽	613-13-8

表 2 Ames 试验阳性对照(无代谢活化系统)

化学物	CAS No.	菌株
-----	---------	----

叠氮化钠	26628-22-8	TA1535 和 TA100
2-硝基苄	607-57-8	TA98
9-氨基吡啶或 ICR191	90-45-9 或 17070-45-0	TA1537,TA97 和 TA97a
过氧化氢异丙烯	80-15-9	TA102
丝裂霉素 C	50-07-7	WP2uvrA 和 TA102
N-乙基-N-硝基-N-亚硝基 胍或	4245-77-6 或	WP2, WP2 uvrA, 和 WP2 uvrA (pkM101)
N-甲基-N-硝基-N-亚硝基 胍或	70-25-7 或 56-57-5	
4 硝基喹啉 1-氧化物		
呋喃基呋喃酰胺 AF2	3688-53-7	WP2 uvrA (含质粒的菌株)

24
25 **试验方法**
26 在试验中应同时包括阴性对照和阳性对照，且代谢活化和非代谢活化两种测试过程应同时进行。其
27 中，代谢活化系统是经过酶诱导剂处理的肝脏所提取的带有辅助因子和微粒体部分的测试系统。

28 供试品溶液的细菌毒性表现为回变菌落数量减少，微菌落变大，背景菌苔变薄、稀疏或减少。按表
29 3 对细菌回复突变试验中背景菌苔进行分级。对于背景菌苔正常，无细菌毒性的供试液，可以使用 100%
30 浓度的供试品溶液进行试验，不需要梯度稀释。如果 100%浓度的供试品溶液出现细菌毒性或显示出明
31 显的沉淀，以 100%浓度的供试品溶液作为最高浓度组梯度稀释不少于 5 个浓度，浓度范围包括细菌毒
32 性从最大到小或无细菌毒性。

33 **表 3 细菌回复突变试验背景菌苔分级标准**

分 级	类型	特征
1	正常	健康的微小菌落
2	轻度减少	与空白对照相比，背景菌苔明显变薄，微菌落的大小可能略有增加
3	中度减少	与空白对照相比，背景菌苔的显著变薄导致微菌落的大小显著增加
4	重度减少	与空白对照相比，背景菌苔的极度稀疏导致微菌落的大小增加，从而使背景菌苔以孤立菌落的形式肉眼可见。
5	无	平板中大于等于 90%的区域完全缺乏任何背景菌苔
6	被样品颗粒覆盖	由于试验样品颗粒无法准确评价背景菌苔

7	无干扰性沉淀	在平板上有肉眼可见的沉淀物,但沉淀物颗粒总数小于或等于回变菌落数的 10%
8	有干扰性沉淀	在平板上有肉眼可见的沉淀物,但沉淀物颗粒总数大于回变菌落数的 10%

34 制备试验菌液：将菌株接种于含有 5mL 营养肉汤培养基的无菌试管中，在 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 、115r/min
35 条件下振荡培养（10-12）小时至对数增长期，活菌数不少于 1×10^9 个/mL。

36 **方法一：平板掺入法** 融化顶层培养基分装于无菌小试管，每管 2 mL，在 45°C 水浴中保温。供试
37 品组每管加入 0.1 mL 供试品溶液，0.1mL 试验菌液（至少含有 10^8 个活细胞），其中有代谢活化系统组
38 每管加入 0.5 mL 代谢活化系统，无代谢活化系统组每管加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液，每组 3 管，再混匀，
39 迅速将每管溶液分别倒在底层培养基表面，转动平板使顶层培养基均匀分布在底层上，平放固化。阴性
40 对照组分别加入 0.1 mL 阴性对照液，0.1mL 试验菌液（至少含有 10^8 个活细胞），其中有代谢活化系统
41 组每管加入 0.5 mL 代谢活化系统，无代谢活化系统组每管加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液；阳性对照组分别
42 加入表 1 和表 2 列出的阳性物质 0.1 mL，0.1mL 试验菌液（至少含有 10^8 个活细胞），有代谢活化系统
43 组每管加入 0.5 mL 代谢活化系统，无代谢活化系统组每管加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液，其他步骤均同供
44 试品组。全部平板于 37°C 培养箱中倒置培养，48 小时后观察每个平板中回变菌落情况。

45 **方法二：预孵育法** 融化顶层培养基分装于无菌小试管，每管 2 mL，在 45°C 水浴中保温。将 0.5mL
46 供试品溶液或阴性对照或阳性对照与 0.1mL 试验菌液（至少含有 10^8 个活细胞）、0.5mL 代谢活化系统
47 或磷酸盐缓冲液搅拌混匀，在 37°C 下预孵育不少于 20 分钟，每组 3 管，然后与顶层培养基混合并倒在
48 底层培养基表面，转动平板使顶层培养基均匀分布在底层上，平放固化。全部平板于 37°C 培养箱中倒
49 置培养，48 小时后观察每个平板中回变菌落情况。

50 **结果判断** 计算每个平板中回变菌落的数量、平均值和标准偏差。阴性对照组回变菌落数和阳性对
51 照组回变菌落数应在历史对照数据范围内，阳性对照组回变菌落数应至少为阴性对照的 3 倍，否则对不
52 符合的菌株应重新试验。如供试品组的回变菌落数出现有统计学意义的剂量反应性增长或在背景菌苔生
53 长良好条件下，供试品组回变菌落数至少为阴性对照组回变菌落数的两倍或两倍以上即为阳性反应。

起草单位：山东省医疗器械和药品包装检验研究院

联系电话：0531-82682901

复核单位：深圳市药品检验研究院（深圳市医疗器械检测中心）