YY/T 0616.7《一次性使用医用手套 第7部分：抗原性蛋白质免疫学测定方法》标准编制说明

一、工作简况

1. 任务来源

根据食药监办械管〔2019〕23号文《国家药监局综合司关于印发2019年医疗器械行业标准制修订项目计划的通知》确定的标准制修订工作计划，由山东省医疗器械产品质量检验中心归口，山东省医疗器械产品质量检验中心等单位负责制订YY/T 0616.7《一次性使用医用手套 第7部分：抗原性蛋白质免疫学测定方法》方法标准（项目编号：N2019071-JN）。

2. 工作过程

在接到标准制定任务后，标准起草工作组认真研究，于2019年3月召开首次工作组会议，召集共同验证单位确定工作组讨论稿和标准验证方案。在分析验证结果和对标准内容进行充分讨论后，工作组于7月初完成并发出征求意见稿。

3. 标准体系

YY/T 0616的总标题为《一次性使用医用手套》，由以下部分组成：

第1部分：生物学评价要求与试验；

第2部分：测定货架寿命的要求和试验；

第3部分：用仓储中的成品手套确定实际时间失效日期的方法；

第4部分：抗穿刺试验方法；

第5部分：抗化学品渗透持续接触试验方法；

第6部分：抗化疗药穿透试验方法；

第7部分：抗原性蛋白质免疫学测定方法；

.....

本部分为YY/T 0616的第7部分。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据。

标准修订工作组按照GB/T 1.1—2009的规则制定本部分。

1. 概述

医护人员在工作中，可能会接触到某些对健康人群产生危害的化学品，如各种消毒剂（如双氧水）、化学药品（如各类化疗药物）等。因此，医护人员通常要在日常工作中，特别注意佩戴防护用品，如医用手套，以避免皮肤直接接触化学品而带来的潜在危害。医用手套主

要包括一次性使用灭菌橡胶外科手套、一次性使用医用橡胶检查手套等，按原料材质的不同通常分为天然橡胶胶乳手套与合成橡胶手套两大类。天然橡胶手套中含有的天然橡胶胶乳蛋白，能诱发I型超敏反应，引起皮肤局部荨麻疹，也可引发过敏性鼻炎和哮喘的症状。

为减少医护人员和病人对天然橡胶胶乳手套产生过敏反应，需要建立对天然橡胶胶乳手套橡胶蛋白含量的测定。本标准在参考 ASTM 6499-16 标准的基础上，建立了一套适用于手套材料的天然橡胶胶乳蛋白标准试验方法。

通过试验结果及分析，测得医用天然橡胶胶乳手套材料中天然橡胶胶乳蛋白的含量，以评价天然橡胶胶乳手套的致敏性。蛋白含量越低，则说明致敏性越低，对人体的伤害越小。医护人员可用以上参数值来直观比较医用手套材料优劣，有针对性地进行选择。

2. 标准中相关内容的解释

2.1 试验原理

本试验基于免疫学抗原抗体结合反应基本原理，采用抑制 ELISA 法进行试验。由于抗原抗体结合具有高度特异性，这使我们能对天然橡胶胶乳手套中含有的少量天然橡胶胶乳蛋白抗原进行检测。该方法是利用了多克隆抗血清检测 NRL 蛋白，具有 ELISA 技术中抗原抗体反应的特异性和敏感性优点，通过抑制性 ELISA 方法定量检测橡胶胶乳蛋白抗原。

2.3 天然橡胶胶乳 (Natural Rubber Latex, NRL) 蛋白

天然橡胶胶乳手套中蛋白质主要分为四大类：（1）参与橡胶生物合成，并对橡胶生物合成具有调控作用的酶和蛋白质，这是橡胶蛋白的主要组成部分，包括橡胶转移酶、氧化还原因子 (REF) 和小橡胶粒子蛋白 (SRPP) 等；（2）与橡胶凝絮和胶乳凝固有关的蛋白质，如橡胶粒子膜 22ku 受体糖蛋白等；（3）对人具有致敏作用的过敏蛋白，如 Hevb3；（4）其他功能未知蛋白，如多聚遍在蛋白 (Ubiquitin) 等。不同橡胶树品系之间存在某些橡胶粒子膜蛋白表达含量上的差异。但是，在所有的橡胶粒子膜蛋白中，占比最大的是 REF 和 SRPP。因此，使用标准蛋白比色法对天然橡胶产品中的蛋白水平进行定量，可能产生假阳性结果。而采用免疫学测定方法能够特异性地检测致敏性 NRL 蛋白的相对含量，更具实际意义。

2.4 抑制 ELISA 法的质量保证

2.4.1 酶标板

酶标板在加工过程中因工艺不同或受其他因素的影响而造成吸附性能的极大差异，甚至完全丧失吸附能力。因此，每批样品试验前，必须经过实验室鉴定，鉴定的方法和标准是对每批购置的酶标板抽样，用 0.2 μ g/mL 纯化的天然橡胶胶乳蛋白进行包被，经洗涤后加酶标记抗天然橡胶胶乳抗原蛋白抗体进行反应，再经孵育洗涤，加底物显色终止反应后，测定

OD 值。一般认为，全板中每两孔间 OD 值的误差不超过 10%为合格。

2.4.2 抗原抗体的选择

根据美国材料与试验协会(American Society for Testing and Materials, 简称 ASTM) “工业标准物质 (IRM) 的制备、试验、验收和文件编制”，工业标准物质 (IRMS) 用于 ASTM 委员会 D11 管辖范围内的多种试验方法。工业标准物质 (IRM) 913 是根据 ASTM D6499 的程序，用于涂层抗原和参考标准的天然橡胶胶乳 (NRL) 蛋白质参考抗原的名称。有关该材料评估的详细信息，请参阅研究报告 ASTM D11-1094。工业标准物质 (IRM) 914 是天然橡胶胶乳 (NRL) 蛋白质标准抗血清的名称，按照 ASTM D 6499 的程序用作标准抗血清。有关该材料评估的详细信息，请参阅研究报告 ASTM D11-1094。

ASTM 6499-12 中描述了天然橡胶胶乳蛋白的制备与相应抗体的制备过程。标准中提到蛋白抗原可以通过提取橡胶材料或产品中的天然橡胶胶乳蛋白，但是，由于不同天然橡胶材料或产品中所含的天然橡胶胶乳蛋白的种类和含量有很大差异，导致蛋白提纯后差异性增大，因此推荐使用商品化的天然橡胶胶乳蛋白标准物质进行实验。ASTM6499-16 已推荐使用 IRM-913。同时，用 NRL 蛋白作为抗原免疫诱导家兔产生的抗 NRL 抗血清，由于动物间的个体差异，需要对每批抗体进行滴度分析，同时进行预实验验证抗体浓度和抗原包被浓度，得到相应匹配比例。由于每次试验过程都有差异，因此推荐使用市售抗原进行实验。ASTM6499-16 已推荐使用 IRM-914。

2.4.3 抗原包被浓度

用抗原包被固相载体时选择的浓度要适当。如浓度太高，则低效价抗体可能测不出来，或包被过量形成多层抗原吸附，在操作过程中可能脱落从而降低敏感性和可重复性。用最适稀释度抗原包被固相载体，不仅经济实惠，而且可以克服前带现象。推荐采用单项滴定法确定最佳抗原包被浓度。其方法是，将抗原进行一系列稀释后包被酶标板，再用一定稀释度的抗体进行孵育后洗涤，再加酶结合物进行反应，经孵育洗涤后，加底物溶液显色，终止反应后分别测定 OD 值，选择 OD 值 ≥ 1.0 的抗原稀释度为最适包被浓度。影响抗原包被的因素除浓度外，与时间、温度、pH 均有关系。温度高（如 37℃、45℃或 56℃），包被时间可缩短，温度低可延长包被时间。本标准中采用 4℃包被过夜再用 3%脱脂牛奶的封闭条件，使抗原吸附得更加完全且均匀。本标准中推荐抗原最佳包被浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （正常在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间）。

3. 主要参考文献

- 1) GB/T16886.20-2015《医疗器械生物学评价 第20部分：医疗器械免疫毒理学试验原则和方法》；
- 2) G95-1《医疗器械免疫毒性试验指导原则》1995年；
- 3) ASTM F1905-98(2003)《选择测定材料引起免疫毒性性能试验的标准规范》；
- 4) ASTM F1906-98(2003)《生物相容性试验中ELISA试验、淋巴细胞增殖和细胞迁移免疫应答评价的标准规范》；
- 5) 杜晓丹等, BSA作为动物源性医疗器械细胞免疫检测阳性对照物的研究 药物分析杂志 2010, 30(7)；
- 6) 孟春等, BSA免疫动物过程中抗原抗体亲和动力学特性的研究 免疫学杂志 2007, 23(2)；
- 7) ASTM D6499-16 Standard Test Method for The Immunological Measurement of Antigenic Protein in Natural Rubber and its Products.
- 8) ASTM D11-1094 Industry Reference Materials.

三、主要实验（或验证）的分析、综述报告、技术经济论证，预期的经济效果。

本次验证主要是通过抑制ELISA方法检测天然橡胶胶乳手套中橡胶蛋白含量。经验证发现，此方法可科学评价不同天然橡胶胶乳手套中胶乳蛋白含量的高低。具体见验证工作总结报告。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况。

无。

五、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系。

本部分与有关的现行法律、法规和强制性国家标准无冲突和交叉。

六、重大分歧意见的处理经过和依据。

无。

七、行业标准作为强制性行业标准或推荐性行业标准的建议。

该标准为方法标准，供使用者选择参考，建议作为推荐性行业标准。

八、贯彻行业标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）

一次性使用医用天然橡胶胶乳手套中抗原性蛋白质的测定方法，适用于一次性使用医用天然橡胶胶乳手套中抗原性蛋白质的评价。标准中规定的检测方法经国内多家机构验证，并可以开展该标准中试验，建议自发布之日起12个月开始实施。标准发布后，秘书处挂靠单位-济南中心将在标准实施日期前采用在网页上开辟该标准宣贯专栏、公布标准宣贯资料、召

开标准宣贯会等形式对该标准的技术内容进行宣贯。

九、废止现行有关标准的建议。

无。

十、其他应予说明的事项。

无。

标准起草工作组

2019年7月

征求意见稿