



中华人民共和国国家标准

GB/T 14233.2—2005
代替 GB/T 14233.2—1993

医用输液、输血、注射器具检验方法 第 2 部分：生物学试验方法

Test methods for infusion, transfusion, injection equipment for medical use—
Part 2: Biological test methods

2005-11-17 发布

2006-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 无菌试验	1
4 细菌内毒素试验	3
5 热原试验	4
6 急性全身毒性试验	5
7 溶血试验	6
8 细胞毒性试验	7
9 致敏试验(最大剂量法)	10
10 皮内反应试验	11
11 植入试验	11
附录 A (资料性附录) 亚急性(亚慢性)全身毒性试验	14
A.1 目的	14
A.2 试剂	14
A.3 主要设备和器具	14
A.4 试验前准备	14
A.5 试验方法	15
A.6 试验报告	16
附录 B (资料性附录) 与血液(器械)相互作用试验	18
B.1 总则	18
B.2 体内静脉血栓形成试验	18
B.3 全血凝固时间试验	19
B.4 部分凝血激活酶时间(PTT)试验	20
B.5 体外自发性血小板聚集试验	21
B.6 血小板粘附试验	22
B.7 补体激活试验	23
附录 C (资料性附录) 细胞培养常用溶液和培养液制备	25
C.1 平衡盐溶液(BSS)	25
C.2 消化液	25
C.3 四唑盐(MTT)染色液	26
C.4 RPMI 1640 细胞培养液	26

前 言

GB/T 14233《医用输液、输血、注射器具检验方法》分为两部分：

——第1部分：化学分析方法；

——第2部分：生物学试验方法。

本部分为 GB/T 14233 的第2部分。本部分代替 GB/T 14233.2—1993《医用输液、输血、注射器具检验方法 第二部分：生物试验方法》。本次修订对无菌、热原、细菌内毒素三项试验直接引用《中国药典(二部)》中的适用章节，以能与中国药典的最新修订版保持同步；参照 GB/T 16886《医疗器械生物学评价》修改了细胞毒性试验方法；致敏、皮内反应和植入试验直接引用 GB/T 16886《医疗器械生物学评价》；增加了亚急性(亚慢性)全身毒性和血液(器械)相互作用试验方法；取消了产品合格判定指标。

本部分的附录 A、附录 B 和附录 C 均为资料性附录。

本部分由国家食品药品监督管理局提出。

本部分由全国医用输液器具标准化技术委员会归口。

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、天津医用生物材料监测研究中心。

本部分主要起草人：由少华、朱雪涛、刘欣、黄经春、王昕、祝君梅、王科镭、郝树彬。

本部分于 1993 年 3 月首次发布。

引 言

本部分给出的生物学试验方法是根据 GB/T 16886.1《医疗器械生物学评价 第1部分：评价与试验》的基本原则，特别针对医用输液、输血、注射器具的生物学评价需求所设立的。本次修订是在 GB/T 16886《医疗器械生物学评价》和《中国药典(二部)》中相应试验方法学原理和试验步骤的基础上，并根据医用输液、输血、注射器具的特性制定而成，因此本部分是与 GB/T 16886 和《中国药典》方法具有方法学等同性，适用于医用输液、输血、注射器具生物学性能检验的方法标准。

本次修订对无菌、热原、细菌内毒素试验直接引用《中国药典》中的适用章节，并不注明药典的年代号，以能够与《中国药典》的最新修订版保持同步；对 GB/T 16886 中未给出详细试验步骤的试验项目进行了细化，例如细胞毒性、急性全身毒性、亚急性(亚慢性)全身毒性和与血液(器械)相互作用试验；对 GB/T 16886 中已详细给出试验步骤的刺激、致敏和植入试验，本次修订采用直接引用 GB/T 16886 相应部分。

本部分作为试验方法标准，本次修订在正文中取消了产品合格判定指标，但在条注中给出了当前通用的判定指标供参考。相关产品标准在引用本部分时应注意根据产品应用特性规定适宜的合格判定指标。

医用输液、输血、注射器具检验方法

第2部分：生物学试验方法

1 范围

GB/T 14233 的本部分规定了医用输液、输血、注射器具生物学试验方法。
本部分适用于医用输液、输血、注射器具。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 14233 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/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分：评价与试验（GB/T 16886.1—2001，idt ISO 10993-1:1997）

GB/T 16886.4 医疗器械生物学评价 第4部分：与血液相互作用试验选择（GB/T 16886.4—2003，ISO 10993-4:2000，IDT）

GB/T 16886.5 医疗器械生物学评价 第5部分：体外细胞毒性试验（GB/T 16886.5—2003，ISO 10993-5:1999，IDT）

GB/T 16886.6 医疗器械生物学评价 第6部分：植入后局部反应试验（GB/T 16886.6—1997，idt ISO 10993-6:1996）

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 16886.10—2005，ISO 10993-10:2002，IDT）

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 16886.11—1997，idt ISO 10993-11:1993）

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）

中华人民共和国药典 二部

3 无菌试验

3.1 目的

本试验系将医疗器械或其浸提液接种于培养基内，以检验供试品是否有细菌和真菌污染。

3.2 试剂

质量浓度为 9 g/L 的无菌氯化钠溶液、其他符合《中国药典》要求的稀释液和冲洗液。

3.3 主要设备

超净工作台、光学显微镜、恒温培养箱、恒温水浴箱、压力蒸汽灭菌器、电热干燥箱。

3.4 试验前准备

3.4.1 器具灭菌

与供试液接触的所有器具应采用可靠方法灭菌，置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min，或置电热干燥箱内 160℃ 2 h。

3.4.2 无菌室要求

3.4.2.1 无菌室操作台或超净工作台局部应符合洁净度 100 级单向流空气区域要求。无菌室在消毒处理完毕后,应检查空气中的菌落数,方法如下:取直径约 90 mm 培养皿,无菌操作注入融化的营养琼脂培养基约 20 mL,在 30℃~35℃ 培养 48 h 证明无菌后,取 3 只培养皿在无菌室操作台或超净工作台平均位置打开上盖,暴露 30 min 后盖好置 30℃~35℃ 培养 48 h 后取出检查。3 只培养皿上生长的菌落数平均应不超过 1 个。

3.4.2.2 无菌试验过程中应检查空气中的菌落数,方法同上。在试验开始进行时打开培养皿盖,至试验结束后盖好照上法培养,应符合上述要求。

3.5 培养基

用于培养需(厌)气菌和真菌的培养基的制备、培养基灵敏度检查及其他各项要求应符合《中国药典(二部)》附录中《无菌检查法》的规定。

3.6 供试品抑菌性验证试验

对未知或可疑的供试品,在进行无菌试验前,应按照《中国药典(二部)》附录中“无菌检查法”的规定进行方法验证试验,以确认供试品在该试验条件下无抑菌活性或其抑菌活性可以忽略不计。

3.7 试验方法

3.7.1 供试品数量

同一批号 3 个~11 个单位供试品。

注:其他类型医疗器械可根据具体情况参照采用。

3.7.2 浸提介质

质量浓度为 9 g/L 的无菌氯化钠溶液或其他符合《中国药典》要求的稀释液和冲洗液。

3.7.3 供试液制备

优先采用将供试品或其有代表性的各部分直接投入培养基内培养。如供试品不适宜直接投放,可按下列方法制备供试液,应使浸提介质充分洗提供试品的浸提表面。供试液制备应按无菌操作法进行,在制备后 2 h 内使用。

根据供试品具体特性选择下列适用方法:

- a) 管类器具:按管内表面积每 10 cm² 流过管内腔 1 mL 浸提介质,流量约为 10 mL/min。
- b) 容器类器具:容器内已装有液体的可直接抽取容器内液体为供试液;空容器按容器内表面积每 10 cm² 加入浸提介质 1 mL,振摇数次。
- c) 实体类器具:实体类器具按表面积每 10 cm² 加入浸提介质 1 mL,振摇数次。

3.7.4 接种、培养和观察

根据供试品具体特性选择《中国药典(二部)》附录中“无菌检查法”规定的适宜接种方式,以无菌操作法进行。

供试品的培养和观察按《中国药典(二部)》附录中“无菌检查法”的规定。

3.7.5 结果判定

按《中国药典(二部)》附录中“无菌检查法”的规定。

3.7.6 试验报告

试验报告中宜给出下列信息:

- a) 供试品名称;
- b) 生产批号和(或)灭菌批号;
- c) 供试液制备方法;
- d) 接种方式;
- e) 每日观察结果;
- f) 结果判定。

4 细菌内毒素试验

4.1 目的

本试验为《中国药典(二部)》附录“细菌内毒素检查法”中规定的“凝胶法”，系利用鲎试剂与细菌内毒素产生凝集反应的机理，以判定供试品中细菌内毒素的限量是否符合规定。

如经检验证实供试品对细菌内毒素试验有不能排除的干扰作用则不适宜采用本试验。

4.2 试剂

细菌内毒素国家标准品、细菌内毒素工作标准品、鲎试剂、细菌内毒素检查用水。

注：细菌内毒素检查用水系指符合《中国药典(二部)》附录中“细菌内毒素检查法”规定的灭菌注射用水。

4.3 主要设备

超净工作台、恒温培养箱、恒温水浴箱、电热干燥箱、旋涡混合器。

4.4 试验前准备

4.4.1 器具处理

试验所用器皿需经处理除去可能存在的外源性内毒素。玻璃器皿置电热干燥箱内 180℃ 干烤至少 2 h，或 250℃ 干烤至少 30 min。塑料器皿置 30% 双氧水中浸泡 4 h，再用细菌内毒素检查用水充分冲洗后置 60℃ 烘干备用。

4.4.2 鲎试剂灵敏度复核试验

4.4.2.1 当使用新批号的鲎试剂或试验条件发生了任何可能影响检验结果的改变时，应进行鲎试剂灵敏度复核试验。

4.4.2.2 试验步骤按《中国药典(二部)》附录中“细菌内毒素检查法”规定进行。

4.4.3 供试品干扰试验

4.4.3.1 对未知或可疑的供试品初次进行细菌内毒素试验之前应先进行干扰试验，以检验供试品对细菌内毒素试验是否有抑制或增强作用，以及其他影响细菌内毒素试验准确性和敏感性的干扰作用。当鲎试剂、供试品来源、供试品配方或生产工艺有变化或其他任何可能影响细菌内毒素试验结果的试验条件改变时，应重新进行干扰试验。

4.4.3.2 每种医疗器械产品应取 3 批并分别使用不少于两个制造商生产的鲎试剂进行干扰试验。供试液制备按 4.5.3 规定进行。

4.4.3.3 试验步骤按《中国药典(二部)》附录“细菌内毒素检查法”中“凝胶法”规定进行。

4.4.3.4 供试品如对细菌内毒素试验有干扰作用，可选用下列适宜方法排除干扰：

- a) 使用更灵敏的鲎试剂对供试液进行更大倍数稀释；
- b) 采用无热原氨基甲烷缓冲液稀释供试液；
- c) 采用无热原氢氧化钠或盐酸溶液调节供试液 pH 值在 6.0~8.0 范围内；
- d) 采用阳离子缓冲液(MgSO₄ 或 MgCl₂)稀释供试液以调节离子浓度。

4.5 试验方法

4.5.1 供试品数量

同一批号至少 3 个单位供试品。

4.5.2 浸提介质

细菌内毒素检查用水。

4.5.3 供试液制备

根据产品标准规定的细菌内毒素限值确定浸提介质体积，选用下列适宜方法制备供试液：

- a) 管类和容器类器具用细菌内毒素检查用水浸泡器具内腔，在(37±1)℃恒温箱中浸提不少于 1 h；
- b) 小型配件或实体类器具置无热原玻璃器皿内，加入细菌内毒素检查用水振摇数次，在

(37±1)℃恒温箱中浸泡不少于1 h。

供试液贮存应不超过2 h。

注1：浸提介质体积计算公式： $V=L/\lambda$

式中：

V ——浸提介质体积，单位为毫升(mL)；

L ——产品细菌内毒素限值，单位为细菌内毒素单位每件(EU/件)；

λ ——所用试剂灵敏度标示值，单位为细菌内毒素单位每毫升(EU/mL)。

注2：输液、输血、注射器具细菌内毒素限值在产品标准中规定，宜尽可能低。推荐输液、输血、注射器具细菌内毒素限量每件不超过20 EU，与脑脊液接触和胸内应用医疗器械每件不超过2.15 EU。

4.5.4 试验步骤和结果判定

按《中国药典(二部)》附录“细菌内毒素检查法”中“凝胶法”规定进行。

4.5.5 试验报告

试验报告中宜给出下列信息：

- a) 供试品名称；
- b) 生产批号；
- c) 供试液制备方法；
- d) 细菌内毒素限量；
- e) 结果判定。

5 热原试验

5.1 目的

本试验系将医疗器械浸提液注入家兔静脉，在规定的时间内观察家兔体温升高的情况，以判定供试品是否具有潜在的材料致热作用。

5.2 试剂

质量浓度为9 g/L的无菌无热原氯化钠注射液。

5.3 主要设备

超净工作台、电热干燥箱、电热恒温水浴箱、压力蒸汽灭菌器、热原测试仪。

5.4 试验前准备

5.4.1 器具除热原

与供试液接触的所有玻璃器皿置电热干燥箱内180℃干烤至少2 h，或250℃干烤至少30 min。也可采用其他适宜的方法除热原。

5.4.2 测温器具

家兔体温测试应使用精密度为±0.1℃的热原测温仪或肛门体温计。

5.4.3 实验室环境

在试验前1 d~2 d，供试家兔应处于同一温度环境中，实验室和饲养室的温度相差不得大于5℃，实验室温度应为17℃~28℃。

在试验全过程中，室温变化不大于3℃，避免噪音干扰。

5.4.4 试验用家兔

按《中国药典(二部)》附录“热原检查法”中规定挑选试验用兔。每一家兔的使用次数应不超过10次。

5.5 试验方法

5.5.1 供试液制备

按GB/T 16886.12规定选择适宜的浸提条件。

5.5.2 试验步骤

按《中国药典(二部)》附录“热原检查法”中规定进行,家兔注射剂量为 10 mL/kg。

5.5.3 结果判定

供试品经初试或复试后符合《中国药典(二部)》附录“热原检查法”中规定时,均判定无材料致热作用。

5.6 试验报告

试验报告中宜给出下列信息:

- a) 供试品名称;
- b) 生产批号;
- c) 供试液制备方法;
- d) 注射剂量;
- e) 家兔体温记录;
- f) 结果判定。

6 急性全身毒性试验

6.1 目的

本试验系将医疗器械浸提液注入小白鼠静脉和腹腔内,在规定时间内观察小白鼠有无毒性反应和死亡情况,以判定供试品是否具有潜在的急性全身毒性作用。

6.2 试剂

质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜精制植物油。

注:本部分各试验中所用新鲜精制植物油推荐采用符合《美国药典》24 版规定的棉籽油或芝麻油,也可使用其他经验证实无生物学毒性反应的植物油。

6.3 主要设备和器具

压力蒸汽灭菌器、动物天平、皮下注射器。

6.4 试验前准备

6.4.1 器具灭菌

与供试液接触的所有器具置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min。

6.4.2 试验动物准备

6.4.2.1 试验采用健康、初成年小白鼠,同一品系并同一来源,雌鼠无孕,体质量 17 g~23 g。在试验前使小白鼠适应实验室环境。做过本试验的小白鼠不得重复使用。

6.4.2.2 每种浸提液用小白鼠 10 只,随机分为供试品和浸提介质对照两组,每组 5 只。复试时每组取 18 g~19 g 的小白鼠 10 只。

6.5 试验方法

6.5.1 供试液制备

按 GB/T 16886.12 规定选择适宜的浸提条件,每种供试品制备质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液和植物油两种浸提液。同条件制备浸提介质对照液。

6.5.2 供试液注射

6.5.2.1 自尾静脉分别注入氯化钠注射液浸提液和介质对照液,以不超过 0.1 mL/s 的恒定速度注射,注射剂量为 50 mL/kg。

6.5.2.2 由腹腔分别注入植物油浸提液和介质对照液,注射剂量为 50 mL/kg。

6.5.3 注射后动物反应观察

注射完毕后,观察小白鼠即时反应,并于 4 h、24 h、48 h 和 72 h 观察和记录试验组和对照组动物的一般状态、毒性表现和死亡动物数,在 72 h 时称量动物体质量。动物反应观察判定按表 1 规定。

表 1 毒性反应观察

反应程度	症 状
正常,无症状	注射后无毒性症状。
轻微	注射后有轻微症状但无运动减少、呼吸困难或腹部刺激症。
中度	注射后出现明显的腹部刺激症状、呼吸困难、运动减少、眼睑下垂或腹泻(体质量下降至 15 g~17 g 之间)。
重度	注射后出现虚脱、发绀、震颤或严重腹部刺激症状、腹泻、眼睑下垂或呼吸困难(体质量急剧下降,一般低于 15 g)。
死亡	注射后死亡。

6.5.4 结果判定

6.5.4.1 在 72 h 观察期内,试验组动物的反应不大于对照组动物,则判定供试品无急性全身毒性反应。

6.5.4.2 如试验组动物有 2 只或 2 只以上出现中度毒性症状或死亡,则判定供试品有急性全身毒性反应。

6.5.4.3 如试验组动物出现轻微毒性症状,或不超过 1 只动物出现中度毒性症状或死亡,或虽无毒性症状但组内动物体质量普遍下降,则另取小白鼠 10 只为 1 组进行复试,复试结果符合 6.5.4.1 要求,判定供试品无急性全身毒性反应。

6.6 试验报告

试验报告中宜给出下列信息:

- a) 供试品名称;
- b) 生产批号;
- c) 供试液制备方法;
- d) 注射剂量;
- e) 动物反应情况;
- f) 结果判定。

7 溶血试验

7.1 目的

本试验系将医疗器械与血液直接接触,通过测定红细胞释放的血红蛋白量以判定供试品的体外溶血程度。本试验不适用于评价带药剂的器械。

7.2 试剂

草酸钾、质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜抗凝兔血。

注:采集时间不超过 24 h 的新鲜枸橼酸钠抗凝人体全血如经验证确认适用时可替代兔血用于本试验。

7.3 主要设备

电热恒温水浴、分光光度计、离心机。

7.4 供试品制备

7.4.1 由器械各组成部件称取 15 g。管类器具切成约 0.5 cm 长小段;其他类型器具切成约 0.5 cm × 2 cm 条状或相应大小块状。

7.4.2 器械如为低密度材料或其他不适宜采用 7.4.1 规定的样品质量的情况下,可按 GB/T 16886.12 规定的浸提比例制备供试品,切成 7.4.1 规定的尺寸。

7.5 新鲜稀释抗凝兔血制备

根据试验用血量由健康家兔心脏采血。如采血 10 mL,加质量浓度 20 g/L 草酸钾溶液 0.5 mL,制

备成新鲜抗凝兔血。取新鲜抗凝兔血 8 mL,加质量浓度 9 g/L 的氯化钠注射液 10 mL 稀释。

7.6 试验方法

供试品组每管加入供试品 5 g,或是在 7.4.2 的情况下按 GB/T 16886.12 规定的浸提比例加入供试品,再加入氯化钠注射液 10 mL;阴性对照组每管加入氯化钠注射液 10 mL;阳性对照组每管加入蒸馏水 10 mL。每组平行操作 3 管。

全部试管放入恒温水浴中(37±1)°C 保温 30 min 后,每支试管加入 0.2 mL 稀释兔血,轻轻混匀,置(37±1)°C 水浴中继续保温 60 min。

倒出管内液体以 800 g 离心 5 min。

吸取上清液移入比色皿内,用分光光度计在 545 nm 波长处测定吸光度。

7.7 结果计算

供试品组和对照组吸光度均取 3 管的平均值。阴性对照管的吸光度应不大于 0.03,阳性对照管的吸光度应为 0.8±0.3,否则应重新试验。

供试品溶血率按式(1)计算:

$$\text{溶血率} = \frac{A-B}{C-B} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

A——供试品组吸光度;

B——阴性对照组吸光度;

C——阳性对照组吸光度。

7.8 结果判定

根据医疗器械预期临床用途和器械材料特性确定适宜的合格判定指标。

注:按本试验检验医疗器械时,合格判定指标一般规定为溶血率应小于 5%。

7.9 试验报告

试验报告中宜给出下列信息:

- a) 供试品名称;
- b) 生产批号;
- c) 试验方法;
- d) 各组吸光度;
- e) 供试品溶血率;
- f) 结果分析和判定。

8 细胞毒性试验

8.1 目的

本试验系将医疗器械浸提液接触培养细胞,通过对细胞形态、增殖和抑制影响的观察,评价供试品对体外细胞的毒性作用。

8.2 试剂

氯化钠、氯化钾、氯化钙、硫酸镁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氢氧化钠、葡萄糖、酚红、台盼蓝、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、胰蛋白酶、Eagle 培养基、RPMI 1640 培养基、胎(小)牛血清、青霉素 G(钠盐)、硫酸链霉素、乙醇、苯酚、二甲基亚砷(DMSO)。

8.3 主要设备和用具

超净工作台、二氧化碳(CO₂)培养箱、恒温水浴箱、电冰箱、倒置显微镜、光学显微镜、压力蒸汽灭菌器、抽滤瓶、磁力搅拌器、培养板(皿)。

8.4 试验前准备

8.4.1 器具灭菌

与供试液接触的所有器具应采用可靠方法灭菌,置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min,或置电热干燥箱内 160℃ 2 h。

8.4.2 细胞培养液、细胞消化液、平衡盐溶液制备

按附录 C 给出的方法或其他经确认适宜的方法制备。

8.5 试验方法

8.5.1 细胞株

试验用细胞株可采用 ATCC CCL1[NCTC clone 929(小鼠成纤维细胞)]或其他适宜细胞。试验采用传代 48 h~72 h 生长旺盛的细胞。

8.5.2 浸提介质

含血清或无血清细胞培养液、质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液。

8.5.3 对照样品

8.5.3.1 阴性对照样品可采用经确认过的不产生细胞毒性反应的材料,例如高密度聚乙烯。

8.5.3.2 阳性对照样品可采用经确认过的可重现细胞毒性反应的材料,例如用有机锡作稳定剂的聚氯乙烯、质量浓度为 5 g/L 的苯酚溶液或体积分数为 5% 的二甲基亚砷(DMSO)溶液。

8.5.4 供试液制备

8.5.4.1 无菌供试品直接取样制备供试液。未灭菌供试品宜采用与成品相同的灭菌过程或其他适宜方法灭菌。

8.5.4.2 供试液制备方法按 GB/T 16886.5 的规定。

8.5.5 细胞悬液制备

将已培养 48 h~72 h 生长旺盛的细胞用消化液消化后加入细胞培养液,吸管吹打混匀后用血球计数板在显微镜下计数,按式(2)计算细胞密度:

$$C = \frac{n}{4} \times 10^4 \dots\dots\dots(2)$$

式中:

C——细胞密度,单位为个每毫升(个/mL);

n——计数板四角四大格内细胞总数,单位为个。

根据实测细胞密度,加入适量细胞培养液配制成试验要求密度的细胞悬液备用。

注:也可采用浊度仪测定细胞密度。

8.5.6 试验步骤

可选择下列之一方法进行试验:

a) 四唑盐(MTT)比色法

将配制好的 1×10⁴/mL 细胞悬液接种于 96 孔培养板,设空白对照、阴性对照、阳性对照和供试品组,每组各设至少 6 孔,每孔接种 100μL 细胞悬液。置 CO₂ 培养箱(含体积分数 5% 二氧化碳气体)37℃ 培养 24 h 后,弃去原培养液。空白对照组加入新鲜细胞培养液,阴性对照组加入阴性对照品浸提液,阳性对照组加入阳性对照溶液或阳性对照品浸提液,供试品组加入试验样品浸提液,每孔 100μL,置 CO₂ 培养箱继续培养 72 h。

于更换培养液后的 72 h,置显微镜下观察细胞形态。每孔加入 20μL 质量浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液,继续培养 4 h 后弃去孔内液体,加入 150μL DMSO,置振荡器上振荡 10 min,在酶标仪 570 nm 和 630 nm 波长下测定吸光度,按式(3)计算相对增殖率(RGR)。

$$RGR = \frac{A}{A_0} \times 100\% \dots\dots\dots(3)$$

式中:

RGR——相对增殖率，%；

A——供试品组(阴性、阳性组)吸光度；

A₀——空白对照组吸光度。

根据 RGR 按表 2 分级标准判定。阴性对照组的反应应不大于 1 级，阳性对照组至少为 3 级反应。如阴性对照组和阳性对照组反应不成立时应重新试验。

表 2 细胞毒性反应分级

级别	相对增殖率/%
0	≥100
1	80~99
2	50~79
3	30~49
4	0~29

b) 显微镜观察法

将配制好的 1×10^5 /mL 细胞悬液接种于直径 35 mm 培养皿内，每皿 2 mL。置 CO₂ 培养箱(含体积分数 5% 二氧化碳气体)37℃ 培养至近汇合单层细胞形成。

弃去原培养液。阴性对照组加入阴性对照品浸提液，阳性对照组加入阳性对照液或阳性对照品浸提液，供试品组加入试验样品浸提液，每皿各加 2 mL。每组平行操作 3 皿，置 CO₂ 培养箱继续培养 72 h。

置显微镜下观察，按表 3 分级标准判定。阴性对照组应为 0 级反应，阳性对照组至少为 3 级反应。如阴性对照组和阳性对照组反应不成立时应重新试验。

表 3 细胞毒性反应分级

级别	反应程度	反应观察
0	无	细胞形态正常，贴壁生长良好，胞浆内有离散颗粒；无细胞溶解
1	极轻	至多 20% 的细胞呈圆形，疏松贴壁，无胞浆内颗粒；偶见细胞溶解
2	轻微	至多 50% 的细胞呈圆形，无胞浆内颗粒；明显可见细胞溶解和细胞间空区
3	中度	至多 70% 的细胞呈圆形或溶解
4	重度	细胞层几乎完全破坏

注：其他适宜的方法见 GB/T 16886.5。

8.6 结果判定

在阴性对照和阳性对照产生预期反应的情况下，分析判定供试品细胞毒性反应程度。

注 1：本试验推荐的供试液检验浓度为 100%，适用于医用输液、输血和注射器具。其他类型医疗器械亦可根据临床应用情况调整供试液检验浓度，如 100%、75%、50%、25% 等。

注 2：按本试验检验医疗器械时，一般认为可接受的细胞毒性反应为不大于 2 级。

8.7 试验报告

试验报告宜给出下列信息：

- a) 供试品名称；
- b) 生产批号；
- c) 供试液制备方法；

- d) 试验用培养基、细胞株和阴性、阳性及其他对照品；
- e) 试验方法；
- f) 细胞反应和其他情况；
- g) 观察结果；
- h) 结果判定。

9 致敏试验(最大剂量法)

9.1 目的

本试验系采用医疗器械浸提液与豚鼠皮肤接触,以评价供试品在试验条件下引发迟发型超敏反应的潜在性。

9.2 试剂

质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜精制植物油、二硝基氯苯(dinitrochlorobenzene, DNCB)、十二烷基硫酸钠、弗氏完全佐剂。

9.3 主要设备和器具

压力蒸汽灭菌器、电剃刀、皮下注射器、玻璃研钵。

9.4 试验前准备

9.4.1 器具灭菌

与供试液接触的所有器具置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min。

9.4.2 试验动物准备

按 GB/T 16886.10 的规定。

9.4.3 弗氏完全佐剂制备

9.4.3.1 无水羊毛脂与液体石蜡的体积比为 4 : 6(冬季使用比例为 3 : 5)。将无水羊毛脂加热溶解后取 40 mL 置研钵中,稍冷却后边研磨边加液体石蜡,直至 60 mL 液体石蜡加完。置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min,即制备成弗氏不完全佐剂,4℃ 保存备用。

9.4.3.2 在弗氏不完全佐剂中按 4 mg~5 mg/mL 加入死的或减毒的分枝杆菌(如卡介苗或结核杆菌),即得弗氏完全佐剂。

9.5 试验方法

9.5.1 浸提介质

质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜精制植物油。

9.5.2 阳性对照液

质量浓度为 1 g/L 的二硝基氯苯溶液或其他能产生相应阳性反应的液体。

9.5.3 供试液制备

按 GB/T 16886.10 规定选择适宜的浸提条件,每种供试品制备质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液和/或植物油浸提液。

9.5.4 试验步骤和结果判定

按 GB/T 16886.10 规定的“最大剂量致敏试验”进行操作。

9.6 试验报告

试验报告中宜给出下列信息:

- a) 供试品名称;
- b) 生产批号;
- c) 供试液制备方法;

- d) 试验剂量；
- e) 试验部位观察记录；
- f) 结果判定。

10 皮内反应试验

10.1 目的

本试验系将医疗器械浸提液注入家兔皮内,以评价供试品在试验条件下对接触组织的潜在刺激性。

10.2 试剂

质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜精制植物油。

10.3 主要设备和器具

压力蒸汽灭菌器、皮下注射器。

10.4 试验前准备

10.4.1 器具灭菌

与供试液接触的所有器具置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min。

10.4.2 试验动物准备

按 GB/T 16886.10 的规定。

10.5 试验方法

10.5.1 浸提介质

质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜精制植物油。

10.5.2 供试液制备

按 GB/T 16886.10 规定选择适宜的浸提条件,每种供试品制备质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液和植物油两种浸提液。

10.5.3 试验步骤和结果判定

按 GB/T 16886.10 规定的“皮内反应试验”进行操作。

10.6 试验报告

试验报告中宜给出下列信息：

- a) 供试品名称；
- b) 生产批号；
- c) 供试液制备方法；
- d) 试验部位观察记录；
- e) 结果判定。

11 植入试验

11.1 目的

本试验系将医疗器械材料植入动物肌肉或皮下组织内,通过观察植入后试样周围组织反应程度,以评价供试品的生物相容性。

本试验适用于预期与人体内组织接触的、采用非降解聚合物材料制造的医疗器械生物学安全性评价。

注:本试验还可设计为同时对供试品的亚急性(亚慢性)毒性作用进行评价。

11.2 试剂

戊巴比妥钠、硫喷妥钠、2%碘酊、75%乙醇溶液、质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液。

11.3 主要设备和用具

压力蒸汽灭菌器、电热干燥箱、常规外科手术器械、穿刺针。

11.4 试验前准备

11.4.1 器具灭菌

与供试品接触的所有器具置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min 或电热干燥箱内 160℃ 2 h。

11.4.2 试验动物准备

按 GB/T 16886.6 的规定选择适宜的试验动物。

11.4.3 供试品和对照样品制备

按 GB/T 16886.6 的规定制备相应尺寸的皮下或肌肉植入样品。将植入样品清洗干净后沥干,浸入 75%乙醇溶液内浸泡 20 min 或采用其他适宜方法灭菌,植入前用质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液浸洗。

11.5 试验方法

11.5.1 动物麻醉和消毒

动物麻醉可采用质量浓度 30 g/L 戊巴比妥钠或质量浓度 20 g/L 硫喷妥钠,亦可采用其他适宜麻醉剂。按外科常规手术要求以 2%碘酊和 75%乙醇溶液消毒试验区域。

注:推荐的动物麻醉方法:家兔用质量浓度 30 g/L 戊巴比妥钠静脉注射 1.0 mL/kg,或质量浓度 20 g/L 硫喷妥钠静脉注射 1.3 mL/kg~2.5 mL/kg;大白鼠、小鼠和家兔用质量浓度 20 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射 2.3 mL/kg;大白鼠用质量浓度 10 g/L 硫喷妥钠静脉或腹腔注射 5.0 mL/kg~10.0 mL/kg。

11.5.2 试验步骤

根据供试品具体特性选择下列适用方法:

a) 皮下组织植入试验

按 GB/T 16886.6—1996 中第 4 章方法进行,常用动物背部植入。可用手术刀片切开植入点皮肤,用止血钳分离皮下组织,制备约 1 cm~2 cm 的皮下囊植入试样,用医用缝合线缝合皮肤切口。亦可用穿刺针与皮肤成 30°角刺入皮下,取一探条插入针头内将试样推入皮下组织内。

注:套针植入法对试验部位组织的创伤轻微,可降低由于手术创伤造成的对试验结果的干扰。

b) 肌肉植入试验

按 GB/T 16886.6—1996 中第 5 章方法并参照 a)法进行。优先采用套针植入法,可用手术刀片切一很小的切口,亦可直接用穿刺针刺入皮肤内,用探条将试样推入深度约 1 cm~2 cm 的肌肉内。采用手术植入法时,切开植入点皮肤后分离皮下组织和筋膜,用止血钳分离肌肉,将试样推入肌肉内。用医用缝合线缝合肌筋膜和皮肤切口。植入时如有过量出血,应选择另一位置植入。

11.6 结果观察

11.6.1 临床观察

植入后 1 d、3 d 和 5 d 观察植入点皮肤反应,有无出血、红肿和试样排出等异常现象。

11.6.2 解剖观察

根据供试品评价需求确定适宜的植入周期。植入后一般可于 1 周、4 周、12 周、26 周或更长周期时分别无痛处死试验动物,解剖后肉眼观察植入部位组织有无异常病变。切取包裹试样周围约 0.5 cm~1.0 cm 的组织,置质量分数为 10%的甲醛溶液中固定。

注:甲醛溶液用质量浓度为 9 g/L 的氯化钠溶液进行 10 倍稀释。

11.6.3 组织病理学检查

将固定组织石蜡包埋后切片,进行 HE 和 VG 两种染色,在光学显微镜下观察,比较供试品与对照

品周围组织反应,如炎症细胞和其他细胞存在情况、试样周围纤维囊腔形成和试样与组织界面处的其他异常情况。

11.6.4 组织反应分级

11.6.4.1 推荐的炎性反应分级见表4。

表4 炎性反应分级

级 别	炎 性 反 应
0	试样周围未见炎性细胞
I	试样周围仅见极少量淋巴细胞
II	试样周围可见少量嗜中性粒细胞和淋巴细胞,偶见多核异物巨细胞
III	试样周围可见以嗜中性粒细胞浸润为主的炎性反应,并可见组织细胞、吞噬细胞、毛细血管和小血管

11.6.4.2 推荐的纤维囊腔形成分级见表5。

表5 纤维囊腔形成分级

级 别	纤 维 囊 腔 形 成
0	囊壁较薄,由少量胶原纤维和1~2层纤维细胞组成
I	囊壁有变薄而致密趋势,由少量胶原纤维细胞组成,偶见纤维母细胞
II	试样周围形成囊腔结构,主要由纤维母细胞、胶原纤维和少量纤维细胞组成
III	试样周围形成疏松的囊壁,可见毛细血管和纤维母细胞

注:如试验设计为同时对供试品的亚急性(亚慢性)全身毒性作用进行评价,应按照GB/T 16886.11中相关方法和本部分附录A的规定增加相应项目的检查。

11.7 结果判定

分析比较供试品与阴性对照品之间组织反应的差异,综合评价供试品与活体组织间的生物相容性。

注:本试验合格判定指标的确定可在验证的基础上(比如与同类型已经临床认可的器械进行比较)规定医疗器械炎性反应和囊腔形成等级。

11.8 试验报告

试验报告中宜给出下列信息:

- a) 供试品名称;
- b) 生产批号;
- c) 试验方法;
- d) 临床观察情况;
- e) 解剖观察情况;
- f) 组织病理学观察结果;
- g) 结果分析和判定。

附录 A

(资料性附录)

亚急性(亚慢性)全身毒性试验

A.1 目的

本试验系将医疗器械植入动物体内或将医疗器械浸提液注入动物静脉、腹腔或皮下,在大于 24 h 但不超过试验动物寿命的 10% 的时间(如大鼠是 90 d)内,测定器械或其浸提液一次或多次作用或接触对试验动物的影响,以判定供试品是否具有潜在的亚急性(亚慢性)全身毒性作用。

注 1: 本试验可设计成与植入试验结合进行。

注 2: 亚慢性毒性试验延长接触周期可评价慢性全身毒性作用。慢性全身毒性试验试验周期不少于试验动物寿命的 10% 的时间(如大鼠是 90 d 以上)。

A.2 试剂

质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜精制植物油。

A.3 主要设备和器具

压力蒸汽灭菌器、动物天平、皮下注射器。

A.4 试验前准备

A.4.1 器具灭菌

与供试液接触的所有器具置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min。

A.4.2 试验途径选择

试验接触途径应尽可能与器械的临床应用相关,可选择下列适用途径进行试验:

- a) 体内植入适用于植入器械;
- b) 静脉注射适用于直接或间接与血液接触的器械;
- c) 腹腔注射适用于液路器械或与腹腔接触器械;
- d) 皮下注射适用于皮下接触方式有利于评价器械毒性作用时。

A.4.3 试验动物选择

A.4.3.1 体内植入首选家兔。静脉、腹腔或皮下接触首选大白鼠。试验应采用健康、初成年动物,同一品系并同一来源,雌性动物未产并无孕。家兔体质量在 2.0 kg~3.0 kg 范围内;啮齿动物最好在离乳后 6 周龄内,不大于 8 周龄;犬最好 4 月~6 月龄,不大于 9 月龄;试验开始时,所用动物体质量差异应不超过平均体质量的 ±20%。每一试验剂量组需要的动物数量根据试验目的来确定,推荐的动物种属和每剂量组最少动物数量见表 A.1。

表 A.1 动物种属和数量

试验类型	啮齿动物 (如小白鼠、大白鼠)	非啮齿类动物 (如家兔、犬)
亚急性毒性	10 只(雌、雄各 5 只)	4 只(雌、雄各 2 只)
亚慢性毒性	20 只(雌、雄各 10 只)	8 只(雌、雄各 4 只)

注: 亦可根据器械具体应用情况使用单一性别动物,但应说明理由。

A.4.3.2 应在试验前使试验动物适应实验室环境。

A.4.4 试验组设定

A.4.4.1 每一种供试品应设立供试品组和对照组。

A.4.4.2 静脉、腹腔或皮下接触途径的供试品组一般应设高、中、低3个剂量水平组。如根据器械材料成分和结构方面的相关数据预期不会出现毒性反应时,可考虑设定为单剂量组(不低于中剂量组浓度),即限定性试验。

注:推荐的剂量水平设定1:高剂量组——可使动物产生毒性反应但无死亡;

中剂量组——能产生可观察到的微弱毒性反应;

低剂量组——不产生任何毒性症状。

推荐的剂量水平设定2:高剂量组——中剂量组的2倍浓度;

中剂量组——根据GB/T 16886.12的要求制备的浓度;

低剂量组——中剂量组的2倍稀释浓度。

A.4.4.3 对照组分为阴性对照组或试剂对照组,可设定为单剂量组。

A.5 试验方法

A.5.1 供试品(液)制备

A.5.1.1 采用体内植入方式时按GB/T 16886.6和本部分第11章的规定制备适宜的供试样品。

A.5.1.2 采用静脉注射途径时按GB/T 16886.12规定选择适宜的浸提条件,用质量浓度为9 g/L的氯化钠注射液制备器械浸提液。同条件制备浸提介质对照液。

A.5.1.3 采用腹腔和皮下注射途径时按GB/T 16886.12规定选择适宜的浸提条件,根据试验评价目的可用质量浓度为9 g/L的氯化钠注射液和/或植物油制备器械浸提液。同条件制备浸提介质对照液。

A.5.2 试验操作

A.5.2.1 体内植入时按GB/T 16886.6和本部分第11章的规定进行。对照组可植入阴性对照样品,或仅进行与供试品组相同的手术步骤而不植入阴性对照样品。

A.5.2.2 静脉途径接触时,供试品组和介质对照组分别自动物的静脉注入氯化钠注射液浸提液或介质对照液;腹腔或皮下途径接触时,供试品组和介质对照组分别自动物的腹腔或皮下注入氯化钠注射液浸提液或植物油浸提液和介质对照液。单次静脉快速注射时一般在1 min内注射完毕,亦可根据供试液具体情况采用慢速注射,大白鼠静脉注射速度通常不超过2 mL/min。根据评价需求和供试液具体情况确定注射剂量体积,各动物种属最大注射剂量体积见表A.2。

表 A.2 最大注射剂量体积

动物种属	静脉注射体积/ (mL/kg)	腹腔注射体积/ (mL/kg)	皮下注射体积/ (mL/kg)
小白鼠	50	50	50
大白鼠	40	20	20
兔	10	20	10
犬	10	20	2

A.5.3 试验接触周期

A.5.3.1 静脉、腹腔和皮下接触时一般每周7 d进行试验操作,也可根据供试品具体情况每周操作5 d。

A.5.3.2 亚急性全身毒性试验接触周期为14 d~28 d,静脉注射接触时小于14 d。亚慢性全身毒性试验接触周期通常为90 d,但不超过动物寿命期的10%,静脉注射接触时为14 d~28 d。

注:慢性全身毒性试验接触周期一般为6个月~12个月。

A.5.4 动物体质量和饲料、水消耗

试验期间至少每周测量一次动物体质量。试验接触周期超过2周时还需每周测量一次动物饲料和

水的消耗量。

A.5.5 临床观察

A.5.5.1 每日观察和记录供试品组和对照组动物的一般状态,如皮肤、被毛、眼和黏膜改变,以及呼吸、循环、自主和中枢神经系统和行为表现等状况。

A.5.5.2 记录死亡的动物数并及时进行尸检,垂死动物及时隔离并处死。

A.5.6 临床病理学检查

A.5.6.1 应根据供试品预期毒性作用选择下列适宜检查项目:

- a) 试验前和试验接触结束时用检眼镜对高剂量组和对照组动物进行眼科检查,如发现有眼部改变迹象时应检查全部试验动物;
- b) 试验接触周期内和/或接触结束时进行血液学方面的检查,包括:凝血(PT、APTT)、血红蛋白浓度、血细胞比容、血小板计数、红细胞计数、白细胞计数和白细胞分类计数等;
- c) 试验接触周期内和/或接触结束时进行临床血液生化方面的检查,包括:电解质平衡、碳水化合物代谢和肝、肾功能。某些供试品由于其特定的作用模式,可能还需测定:白蛋白、ALP、ALT、AST、钙、氯化物、胆固醇、肌酸酐、GGT、葡萄糖、无机磷、钾、钠、总胆红素、总蛋白、甘油三酯、尿氮、各种酶类等,评价免疫毒性时可考虑测定总免疫球蛋白水平。

注:可根据试验接触周期确定适宜的检查次数,如试验周期为26周时在试验进行到13周时安排检查一次。

A.5.6.2 尿液检验不作为常规检验,仅在预期或观察到有这方面的毒性反应的情况下才考虑进行。检验时在试验接触的最后一周内定时采集(如16 h~24 h)尿液,推荐进行以下项目检验:外观、胆红素、尿糖、酮体、隐血、蛋白、沉渣、比重或渗量、尿量等。

A.5.7 大体病理学检查

A.5.7.1 试验接触结束时,将全部试验动物无痛处死后进行大体尸检,包括体表及体表开孔、头部、胸(腹)腔及内脏等。

A.5.7.2 将试验动物的肝、肾、肾上腺取下后尽快称量其湿质量。根据供试品预期作用途径选择需进一步进行组织病理学检查的器官或组织,取下后置于适宜的固定液中。这些器官和组织包括:肝、肾、肾上腺、脾、心脏、肺,以及供试品作用靶器官、显示有大体损害迹象或尺寸改变的器官和组织及供试品植入部位组织。

A.5.8 组织病理学检查

A.5.8.1 对从高剂量组和对照组试验动物体上取下的器官和组织进行详尽的检查,如高剂量组动物显示毒性损害应对全部动物进行检查。

A.5.8.2 对全部显示有大体损害迹象或尺寸改变的器官和组织进行检查。

A.5.8.3 检查中、低剂量组动物肺脏是否有炎症迹象可提供动物健康状况信息,必要时考虑对动物的肝、肾进行检查。

A.5.9 结果评价

A.5.9.1 列表给出各种试验数据,并采用适宜的统计学方法对数据进行分析评价。

A.5.9.2 分析评价试验接触剂量与毒性反应产生的相关性、异常反应的发生率和严重程度,包括行为和临床性异常、大体损害、显微镜下改变、靶器官的鉴别、死亡率、以及任何其他有意义的一般性和特异性反应。

A.6 试验报告

试验报告中宜给出下列信息:

- a) 供试品名称;
- b) 生产批号;
- c) 试验动物;

- d) 供试品(液)制备方法；
- e) 试验接触方法；
- f) 动物观察数据；
- g) 结果评价。

附录 B

(资料性附录)

与血液(器械)相互作用试验

B.1 总则

下列试验从血栓形成、凝血、血小板、和补体系统 4 个方面对与血液接触器械进行血液(器械)相互作用评价。可根据器械预期临床用途并按照 GB/T 16886.4 的相关要求选择适宜的试验,合格与否的判定也应遵循 GB/T 16886.4 中确定的基本原则。

试验所用阴性对照品应是经临床应用认可的或经确认过的器械或材料。

B.2 体内静脉血栓形成试验

B.2.1 目的

本试验系将医疗器械植入动物静脉内,以评价供试品在试验条件下血栓形成的潜在性。

B.2.2 试剂

硫喷妥钠、质量浓度为 9 g/L 氯化钠注射液、75%乙醇溶液、肝素。

B.2.3 主要设备和器具

压力蒸汽灭菌器、静脉切开手术包。

B.2.4 试验前准备

B.2.4.1 供试品和手术器械采用适宜方法灭菌。

B.2.4.2 试验动物采用成年健康犬或羊至少两只。

B.2.5 供试品和对照品制备

B.2.5.1 供试品和阴性对照样切成约 15 cm 长的段。导管类供试品在试验前至少 24 h,将其两端用硫化硅橡胶封堵。

B.2.5.2 如供试品不适宜直接植入,可将器械材料涂层于直径 1 mm、长 15 mm 的手术缝合线表面,制成试材线。同批号缝合线作为对照样。试验前用 75%乙醇溶液浸泡试材线和对照线 10 min 后,用质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液冲洗沥干备用。

B.2.6 试验方法

B.2.6.1 动物麻醉可静脉注射硫喷妥钠,注射剂量为 20 mg/kg。亦可采用其他适宜的麻醉方法。

B.2.6.2 动物麻醉后除去动物两侧颈静脉处毛发,将动物颈静脉试验区域清洁消毒。用手术刀片切开皮肤和静脉,将供试品和阴性对照样分别插入两侧颈静脉,沿静脉朝心脏方向插入约 12 cm。缝合封闭插口处并用缝合线环绕样品将其体外部分缝合固定在动物皮肤组织上。

B.2.6.3 如为试材线样品则用 18 号注射针分别穿刺上述 2 条静脉,将试材线和对照线经注射针送入两侧静脉约 12 cm。拔出注射针,使样品线飘浮在静脉内,用粘贴胶带将样品体外部分固定在动物皮肤上。

B.2.6.4 根据器械预期临床用途选择 4 h 或 6 h 静脉内留置时间。4 h 或 6 h 后静脉注射肝素,注射剂量为 50 U/kg。动物全身肝素化后 5 min~15 min,静脉注射麻醉剂使动物深度麻醉,经腋窝动脉放血处死动物。切下植入样品的两侧静脉。

B.2.7 结果判定

将植入样品的静脉纵向剖开,肉眼观察植入样品表面和血管内膜表面血栓形成情况。按表 B.1 规定确定器械和对照样血栓形成分级,根据两者间的差异分析判定供试品的抗血栓形成性能。

注:本试验合格判定指标的确定可在验证的基础上(比如与同类型已经临床认可的器械进行比较)规定医疗器械的血栓形成等级。

表 B.1 血栓形成反应分级

血栓形成等级	血栓形成观察
0	无血栓形成(样品插入口处可能会有小血凝块)
1	极轻微血栓形成,如在一处有血凝块或非常薄的血凝块
2	轻微血栓形成,如多处有极小的血凝块
3	中度血栓形成,如血凝块覆盖植入样品长度小于 1/2
4	重度血栓形成,如血凝块覆盖植入样品长度大于 1/2
5	血管闭塞

B.2.8 试验报告

试验报告中宜给出下列信息:

- a) 供试品名称;
- b) 生产批号;
- c) 供试品制备方法;
- d) 试验方法;
- e) 结果观察;
- f) 结果分析与评价。

B.3 全血凝固时间试验

B.3.1 目的

本试验系将器械与动物静脉血液接触,通过观察供试品对凝血时间的影响,以评价供试品是否为内源凝血系统激活物。

B.3.2 主要设备和器具

电热恒温水浴箱、电热恒温干燥箱、硅化注射器、聚丙烯试管。

B.3.3 试验方法

根据供试品特性选择下列之一方法进行试验:

a) 试管法(Lee-White 法)

设供试品组和对照组(空白对照组和/或阴性对照组),每组 3 支内径为 8 mm 的聚丙烯试管。供试品组每支试管内放置切割下的 1 cm 长的供试品(指圆柱形样品。如为其他形状,参照 GB/T 16886.12 规定的浸提比例,应使供试品完全浸泡于 1 mL 血液中);空白对照组只加入 1 mL 血液;阴性对照组同供试品组操作,加入与试验器械同类型的已经临床认可的上市医疗器械试样。全部试管置(37±1)°C 水浴箱内。

从兔静脉采血,用两个硅化注射器抽取,少量血液进入第 1 个注射器后废弃,即刻更换第 2 个注射器,当血液进入第 2 个注射器时即刻开动秒表计时。取血后弃去针头,沿试管壁注入血液 1 mL。将全部试管置(37±1)°C 水浴箱内。

血液离体 3 min 后,每隔 30 s 将第 1 支试管轻轻倾斜至约 30°,直至血液不再流动为止。再以同样方式依次观察各组第 2、3 管,以第 3 管血液凝固时间为凝血时间。

记录各组试管凝血时间。

b) 导管法

供试品制成内径约 3 mm~4 mm、外径约 4 mm~5 mm 的导管,相同尺寸的医用硅橡胶管作为阴性对照管。将各 50 cm 长的供试品管和对照管清洗后沥干备用。

参照 11.5.1 给出的方法麻醉试验家兔,将连接试验导管的静脉针刺入兔颈静脉内,使兔静脉

血液依次充盈 50 cm 长的供试品和对照导管,用止血钳夹住导管两端并开始计时。

试验导管置室温(20℃~25℃)下,分别于开始计时后每隔 5 min 剪取约 5 cm 长的一段导管,放入一个已装有 15 mL 低渗溶液(用 6 mL 质量浓度 9 g/L 氯化钠溶液加 9 mL 蒸馏水配成)的烧杯中,将管内血液全部挤出,观察有无血凝块和血栓条。至出现肉眼可察血凝块为试验终点。

出现肉眼可察血凝块即是试验样品的凝血时间。

B.3.4 结果判定

比较供试品凝血时间与对照品的差异,根据两者间的差异分析判定供试品的抗凝血性能。

注:本试验合格判定指标的确定可在验证的基础上(比如与同类型已经临床认可的器械进行比较)规定医疗器械的凝血时间。

B.3.5 试验报告:

试验报告中宜给出下列信息:

- a) 供试品名称;
- b) 供试品和对照品制备方法;
- c) 试验方法;
- d) 观察记录;
- e) 供试品和对照品凝血时间;
- f) 结果分析与评价。

B.4 部分凝血激活酶时间(PTT)试验

B.4.1 目的

本试验系通过测定与医疗器械接触后的贫血小板血浆的凝血时间,以评价供试品是否为内源凝血系统激活物。

B.4.2 试剂

氯化钙、兔脑浸液、新鲜枸橼酸钠抗凝人体全血或新鲜抗凝兔血、质量浓度 9 g/L 氯化钠注射液。

注:0.1 mol/L 草酸钠溶液或 0.13 mol/L 枸橼酸钠溶液与人体全血或兔血比例为 1:9。

B.4.3 主要设备和器具

电热恒温摇式水浴箱、离心机、血凝仪、聚丙烯试管。

B.4.4 供试品和对照品制备

将供试品和对照品切成试验所需长度清洗沥干备用。

阳性对照品可采用天然橡胶或其他适宜材料。阴性对照品选择与试验器械同类型的上市器械。试验中所用血浆作为空白对照。

B.4.5 试验方法

用于试验的新鲜枸橼酸钠抗凝人体全血或新鲜抗凝兔血采集时间应小于 4 h。将人体全血或兔血以 2 000 g 离心 10 min 分离出贫血小板血浆(PPP),将 PPP 分装于聚丙烯试管中封盖贮存在 2℃~8℃ 或冰浴中。

将供试品和对照品分别插入聚丙烯管中,完全浸泡于同等体积的 PPP 中,置(37±1)℃ 摇式水浴箱中以 60 r/min 与 PPP 接触 15 min。每组各平行操作 3 管。不加试验样品的空白对照管同法操作。

从管中取出试验样品,将 PPP 置于冰浴中试验。每管 PPP 中分别加入等量的兔脑磷脂混悬液(用质量浓度 9 g/L 氯化钠注射液 1:100 稀释)和 0.025 mol/L 氯化钙溶液。用血凝仪分别测定各管凝血时间(s)并计算各组平均凝血时间,按式(B.1)计算各组平均凝血时间占空白对照百分数。

$$BC = \frac{t}{t_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

BC——各组平均凝血时间占空白对照百分数, %

t ——供试品(阴性对照、阳性对照)平均凝血时间;

t_0 ——空白对照平均凝血时间。

B.4.6 结果判定

比较供试品平均凝血时间和占空白对照百分数与各对照品之间的差异,分析判定供试品的抗凝血性能。

注:本试验合格判定指标的确定可在验证的基础上(比如与同类型已经临床认可的器械进行比较)规定医疗器械平均凝血时间占空白对照的百分数。

B.4.7 试验报告

试验报告中宜给出下列信息:

- a) 供试品名称;
- b) 生产批号;
- c) 试验方法;
- d) 各组试管凝血时间记录;
- e) 各组平均凝血时间和占空白对照的百分数;
- f) 结果分析与评价。

B.5 体外自发性血小板聚集试验

B.5.1 目的

本试验通过测定与医疗器械接触后的富血小板血浆中的血小板在不加聚集诱导剂条件下产生的聚集,以评价供试品对血小板功能的潜在影响。

B.5.2 试剂

新鲜枸橼酸钠抗凝人体全血或新鲜抗凝兔血。

B.5.3 主要设备和器具

血小板聚集仪、离心机、聚丙烯试管。

B.5.4 试验方法

用于试验的新鲜枸橼酸钠抗凝人体全血或新鲜抗凝兔血采集时间应小于4 h。将全血以200 g离心10 min,取出上层富血小板血浆(PRP);将吸出PRP后余下的血液以2 000 g离心10 min,取出上层贫血小板血浆(PPP)。

设供试品组和对照组(空白对照组和/或阴性对照组),每组3支内径为8 mm的聚丙烯试管。供试品组每支试管加入1 mL PRP并放置切割下的0.1 g供试品;阴性对照组同供试品组操作,加入与供试品同类型的已经临床认可的上市医疗器械试样;空白对照组只加入1 mL PRP。全部试管封盖置于20℃~25℃室温下与PRP接触1 h。

分别取一定量的PRP和PPP加入到比浊管中,在血小板聚集仪中分别将PRP及PPP的透光度调节为90和10。将PRP在聚集仪中搅拌10 s。测定各组聚集反应。

B.5.5 结果计算

按式(B.2)计算各组血小板最大聚集率(MAR):

$$MAR = \frac{h_1}{h_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.2)$$

式中:

MAR——血小板最大聚集率，%；

h_1 ——距 PRP 基线的高度；

h_0 ——PRP 基线与 PPP 基线之间的高度。

B.5.6 结果判定

比较供试品和对照品之间血小板聚集率差异，分析评价供试品对血小板功能的潜在影响。

注：聚集率大于 20%可确定自发性聚集，提示血小板激活异常现象。本试验合格判定指标的确定可在验证的基础上(比如与同类型已经临床认可的器械进行比较)规定医疗器械血小板聚集率。

B.5.7 试验报告

试验报告中宜给出下列信息：

- a) 供试品名称；
- b) 生产批号；
- c) 试验方法；
- d) 供试品和对照品血小板聚集率；
- e) 结果分析与判定。

B.6 血小板粘附试验

B.6.1 目的

本试验通过测定血小板粘附于医疗器械材料表面的状况，评价供试品对血小板性能的影响，判断试材的抗凝血性能。

B.6.2 试验血源

新鲜枸橼酸钠抗凝人体全血或动物血(羊、兔等)。

B.6.3 供试品和对照品制备

B.6.3.1 取 1 g 直径 0.5 mm 的玻璃珠，填入一根直径 3 mm、长 120 mm 的聚四氟乙烯管中，两端分别用直径 3 mm、长 20 mm 硅橡胶管嵌接。在嵌接处用直径 2 mm、长 2 mm 的聚四氟乙烯管与一层尼龙网(160 目)于聚、硅两管之间，以防玻璃珠漏出。制备 3 个玻璃珠柱为空白对照组。

B.6.3.2 将玻璃珠涂以 2%甲基硅油，按 B.6.3.1 方法制备 3 个涂硅玻璃珠柱，为阴性对照组。

B.6.3.3 将供试品制成微球，称取与对照组面积相同的量，按 B.6.3.1 方法制备 3 个柱，为供试品组。

B.6.3.4 对于不能制备成微球的医疗器械，按照一定比例制备溶液注入上述玻璃珠柱内，充满后驱出多余溶液，2 min~3 min 后通入氮气 20 min，除去残留溶液，反复 2 次，经干燥后制备 3 个柱，为供试品组。

B.6.4 试验方法

用硅化注射器取人或动物静脉血，首先取血液 0.5 mL 各 3 次，接着将血液以 0.5 mL/15s 的速率通过各柱，将通过各柱的血液 0.5 mL，注入含乙二胺四乙酸二钠(EDTA)1 mg 的硅化试管中混匀。

分别对未通过及已通过玻璃珠柱的血液做血小板计数，必要时用扫描电镜观察血小板粘附状况。

B.6.5 结果计算

供试品组和对照组血小板数均取 3 管的平均值，按式(B.3)计算各组血小板粘附率。

$$PA = \frac{A - B}{A} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.3)$$

式中：

PA——血小板粘附率，%；

A——粘附前血小板数；

B——粘附后血小板数。

B.6.6 结果判定

比较供试品组和对照组之间血小板粘附率的差异，分析评价供试品对血小板功能的潜在影响。

注：本试验合格判定指标的确定可在验证的基础上（比如与同类型已经临床认可的器械进行比较）规定医疗器械血小板粘附率。

B.6.7 试验报告

试验报告中宜给出下列信息：

- a) 供试品名称；
- b) 生产批号；
- c) 试验方法；
- d) 各组血小板数和血小板粘附率；
- e) 结果分析与判定。

B.7 补体激活试验

B.7.1 目的

本试验系将医疗器械与标准人血清接触，使用酶免疫测定技术检验补体系统活化期间形成的 C3a 片段，以判定供试品对人血清补体激活作用的程度。

B.7.2 试剂

标准人血清(NHS)、眼镜蛇毒因子(CVF)、C3a 酶免疫测定试剂盒。

B.7.3 主要设备

电热恒温水浴箱、酶标仪。

B.7.4 供试品制备

由器械各组成部件切取试样，不同材料的组件分别测定。与血清接触比例按 GB/T 16886.12 规定并根据器械材料特性确定适宜比例（例如 $3\text{ cm}^2:0.5\text{ mL}$ 或 $0.1\text{ g}:0.5\text{ mL}$ ），应使供试品与血清充分接触。

注：每一试管血清体积一般设置为 0.5 mL ，亦可根据试验需要加大血清体积。

B.7.5 对照品设置

B.7.5.1 阳性生物材料对照品：可采用橡胶检查手套，乳胶是一种高度激活 C3a 的材料，与血清接触比例为 $3.0\text{ cm}^2:0.5\text{ mL}$ 。

B.7.5.2 低活性生物材料对照品：可采用低密度聚乙烯，这是一种低度激活 C3a 的生物材料，与血清接触比例按 GB/T 16886.12 规定。

B.7.5.3 阳性对照用为眼镜蛇毒因子(CVF)：是一种补体系统强激活物，用于确定最大补体活化作用，与血清比例为 $\text{CVF}40\mu\text{L}:0.5\text{ mL}$ 。

B.7.5.4 低浓度 C3a 对照品(C3a 含量小于 200 ng/mL)：为 C3a 酶免疫测定试剂盒中配置，用作对照测定。

B.7.5.5 标准人血清(NHS)：用作激活 C3a 的基线对照。

B.7.6 试验方法

将各组样品分别置于聚丙烯管中，加入适当体积的 NHS，阳性对照(CVF/NHS)和 NHS 对照也置于聚丙烯管中。每组各平行操作 3 管。

全部试管放在 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 水浴中孵育 60 min。在孵育期间至少振摇 1 次以保证血清与样品充分接触。

孵育 60 min 后，将试管置冰浴中以阻止补体的进一步活化。将各组血清移至另外的聚丙烯管中。必要时用样品缓冲液稀释供试品和对照品血清；橡胶检查手套接触血清稀释至 $1:5000$ 和 $1:7500$ ；低密度聚乙烯接触血清稀释至 $1:2000$ 。全部血清样和稀释样保持在冰浴中以阻止补体的进一步活化。

将各组血清移至酶标板上，每组加两孔。在酶标仪上按 C3a 酶免疫测定试剂盒使用说明书操作。在 450 nm 波长处测定各孔吸光度。

B.7.7 结果计算

根据试剂盒自带的标准品系列稀释液（如 $550\text{ 275 ng/mL}\sim 137.5\text{ ng/mL}$ ）的吸收值绘制出标准

曲线。

计算出各组平行操作的两孔吸光度平均值(相对标准偏差±20%),根据该值计算出每一供试品和对照品的 C3a 最终浓度。各组样品的 C3a 浓度以 ng/mL 表示。

在实验室多次验证的基础上确定 CVF(最高激活物)、NHS 对照品和低浓度 C3a 对照品的适宜 C3a 浓度,每次试验上述对照品 C3a 浓度均应在此范围内,否则应查找原因重新进行试验。

注:试验对照品参考 C3a 浓度范围:CVF(最高激活物)产生的 C3a 浓度应大于 50 000 ng/mL;NHS 对照品 C3a 浓度应小于 15 000 ng/mL;低浓度 C3a 对照品应小于 200 ng/mL。

供试品检验结果表述为 C3a 绝对浓度和 C3a 百分数。按式(B.4)计算供试品 C3a 浓度占阳性生物材料对照品 C3a 浓度的百分数:

$$PC = \frac{c_1 - c_0}{c_2 - c_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(B.4)$$

式中:

PC——供试品 C3a 浓度占阳性生物材料对照品 C3a 浓度的百分数,%;

c₁——供试品 C3a 浓度;

c₂——阳性生物材料对照 C3a 浓度;

c₀——NHS 对照品 C3a 浓度。

B.7.8 结果判定

比较供试品 C3a 浓度与各对照品之间的差异,分析评价供试品对人血清补体激活作用的程度。

注:本试验合格判定指标的确定可在验证的基础上(比如与同类型已经临床认可的器械进行比较)规定医疗器械 C3a 浓度值和 C3a 百分数。

B.7.9 试验报告

试验报告中宜给出下列信息:

- a) 供试品名称;
- b) 生产批号;
- c) 试验方法;
- d) 各组吸光度;
- e) 各组 C3a 浓度;
- f) 供试品 C3a 浓度值和(或)百分数;
- g) 结果分析和评价。

附录 C

(资料性附录)

细胞培养常用溶液和培养液制备

C.1 平衡盐溶液(BSS)

C.1.1 按表 C.1 配方准确称量各种试剂。

表 C.1 常用 BSS 配方

单位为克每升

试剂	PBS	Earle	Hanks	D-Hanks
NaCl	8.00	6.80	8.00	8.00
KCl	0.20	0.40	0.40	0.40
CaCl ₂	—	0.20	0.14	—
MgSO ₄ · 7H ₂ O	—	0.20	0.20	—
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	1.56	—	0.06	0.06
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	—	0.14	—	—
KH ₂ PO ₄	0.20	—	0.06	0.06
NaHCO ₃	—	2.20	0.35	0.35
葡萄糖	—	1.00	1.00	—
酚红	—	0.02	0.02	0.02

C.1.2 配制方法

配制 BSS 时应注意避免钙、镁离子的沉淀,下面以 Hanks 液为例说明 BSS 配制步骤:

按表 C.1 配方精确称量试剂,如含水分子与配方不同,应换算后称量。

先将氯化钙溶解在 100 mL 水中,其他试剂依次溶解在 750 mL 水中。

用数滴质量浓度为 56 g/L 的碳酸氢钠溶液溶解酚红。

将氯化钙溶液缓缓倒入上述 750 mL 试剂溶液中,并不时搅动,防止出现沉淀。随即加入酚红溶液后,移入 1 000 mL 容量瓶内,加水至刻度。

分装后置压力蒸汽灭菌器内 115℃ 灭菌 30 min, 4℃ 保存。

注:细胞培养用溶液所用的水均指使用玻璃蒸馏器新鲜制备的三次蒸馏水。

C.2 消化液

C.2.1 胰蛋白酶溶液(质量浓度为 2.5 g/L)

胰蛋白酶粉 2.5 g

D-Hanks 液 1 000 mL

充分搅拌溶解后过滤除菌,分装入瓶,置冷冻箱内保存。使用前置 37℃ 水浴箱内溶解,用质量浓度为 56 g/L 的碳酸氢钠溶液调节 pH 至 7.2 左右。

C.2.2 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)溶液

氯化钠 8.0 g

氯化钾 0.2 g

磷酸氢二钠 1.15 g

磷酸二氢钾 0.2 g

EDTA	0.2 g
水	1 000 mL

将前四种试剂溶解后加入 EDTA,搅拌溶解,过滤除菌或置压力蒸汽灭菌器内 115℃ 灭菌 30 min,分装入瓶,4℃ 保存。

C.3 四唑盐(MTT)染色液

MTT	0.5 g
PBS 液	100 mL

搅拌溶解,置压力蒸汽灭菌器内 115℃ 灭菌 30 min,4℃ 保存。

C.4 RPMI 1640 细胞培养液

RPMI 1640 干粉培养基	规定剂量
碳酸氢钠	规定剂量
L-谷氨酰胺(根据包装袋上说明添加)	规定剂量
水	1 000 mL

将培养基干粉溶于总量 1/3 的水中,搅拌溶解后补加水至 1 000 mL。根据包装袋上说明添加碳酸氢钠和 L-谷氨酰胺,搅拌溶解。加入抗生素,最终浓度为青霉素 100 U/mL,链霉素 100 U/mL。过滤除菌,分装后 4℃ 保存。使用前加入胎牛血清(或小牛血清)100 mL/L,pH 调至 7.2~7.4。