ICS 11.040.01
C 30

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0878.1—2013

医疗器械补体激活试验 第1部分：血清全补体激活

Test for complement activation of medical devices—
Part 1:Serum whole complement activation

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 0878 的总标题是《医疗器械补体激活试验》，包括以下部分：

——第 1 部分：血清全补体激活；

——第 2 部分：替代途径补体激活；

——第 3 部分：经典途径补体激活。

有关其他方面的补体激活试验将有其他部分的标准。

本部分为 YY/T 0878 的第 1 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

YY/T 0878 的本部分参考 ASTM F1984—1999《固体材料血清内全补体激活试验的标准规范》制定。

本部分与 ASTM F1984—1999 相比，存在以下差异：

——对 ASTM F1984—1999 进行了编辑性修改，删除了部分不适用的资料性内容；

——增加了前言部分；

——增加了附录 A 试剂和缓冲液制备。

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：上海生物材料研究测试中心；中国医学科学院输血研究所。

本部分主要起草人：乔春霞、王科镭、刘成虎、丁婷婷、孙皎、王红。

引　言

GB/T 16886.4 中给出了医疗器械/材料血液相容性的试验方法以及试验的选择策略，但只给出了选择原则。YY/T 0878 的本部分是体外全补体激活作用的具体试验方法，可作为 GB/T 16886.4 中医疗器械/材料补体激活试验的补充。

作为血液的重要组分，补体系统激活后产生的效应分子将直接影响医疗器械/材料的血液相容性。补体不适当的激活可能会导致机体的严重急/慢性反应。YY/T 0878 的本部分所描述的体外全补体激活作用的评定方法，可用来筛选医疗器械/材料是否具有潜在补体激活作用。

医疗器械补体激活试验
第1部分：血清全补体激活

1 范围

YY/T 0878的本部分给出了医疗器械体外全补体激活作用的试验方法，本方法适用于固态样品。

本部分中，“血清”和“补体”可通用，意指将血清用作补体来源。

本部分未涉及单一补体成分的功能、修饰或消耗以及来源于血浆的补体。

注：非固态样品在使用本方法时，宜确定方法的适用性。

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 16886.4 医疗器械生物学评价 第4部分：与血液相互作用试验选择

3 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.4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。

Ab：抗体(溶血素)

BBS：巴比妥缓冲液

BBS-G：巴比妥缓冲液-明胶

BBS-GM：巴比妥缓冲液-钙镁离子明胶

C'：已激活补体

EDTA：乙二胺四乙酸二钠盐二水合物

HS：人血清

PVDF：聚偏氟乙稀

RBC：红细胞

5 绵羊RBC的制备

5.1 将市售的绵羊红细胞(SRBC)保存在Alsever溶液中，4 ℃贮存。贮存超过8周或者目测检查第二次清洗的上清液当中有血红蛋白时，将细胞废弃。

注：所有离心操作均在4 ℃条件下进行。除特别说明，所有的试剂、试管和细胞制剂均在冰上保存。

5.2 将5 mL SRBC在1 000g下离心10 min。

5.3 将细胞沉淀悬浮于 10 mL 冷 BBS-G-EDTA 中，37 ℃孵育 10 min。离心并使细胞沉淀重新悬浮于 10 mL 冷 BBS-G-EDTA 中。

5.4 细胞离心后，将上清液废弃(首次清洗)，并使细胞沉淀重悬于 10 mL 冷 BBS-GM 中。重复进行两次(共计 3 次清洗)。

5.5 通过分光光度计或血液分析仪的测定，用冷的 BBS-GM 工作液调配得到 10 mL 浓度为 1.5×10^8 个/mL的 BBS-GM SRBC 悬液(如用分光光度计进行调配，约 1 体积上步制备的细胞悬液加入 24 体积 BBS-GM 工作液，在 412 nm 波长下，光径为 1.0 cm，吸光度为 0.56 相当于 1.5×10^8 个/mL 的细胞浓度)。

5.6 经过清洗、稀释的 RBC 冰上放置，至少可使用 12 h。

6 血清(补体)的吸收

6.1 宜使用人类补体，因为不同物种补体激活效能存在差异，而且试验材料将被应用于人体。人血清作为补体源的一种，可从生物制品供应商处购买，并且一般标示为试剂级补体。

6.2 为去除人血清中自然产生的抗 SRBC 溶血抗体，可采用 SRBC 吸附人血清异嗜抗体的方法，虽然大多数情况下，如果细胞用溶血素进行最佳致敏，人血清中异嗜抗体的数量不足以影响两者之间的反应。详细步骤见 6.3～6.8。

6.3 新鲜人血清或市售的人血清均在－70 ℃贮存。最好使用新鲜血清，因为冻干剂的补体活性一般不如新鲜血清。

6.4 血清在冰上解冻，或用冷(4 ℃)的无内毒素的蒸馏水复溶(若为冻干剂)。

6.5 为避免本步骤中补体被激活，所有操作均在冰上进行，且试剂和细胞均冰冷处理，4 ℃条件下以 1 000g 进行离心。

6.6 按 0.1 mL RBC/2.5 mL 血清的比例，将冷血清与冷的、已清洗的压积绵羊 RBC 混合，冰上孵育 10 min 后，4 ℃条件下 1 000g 离心 10 min。小心地将上清液转移到一个新的、冰上放置的容器中。

6.7 重复 6.6 的步骤两次。

6.8 将吸附后的人血清按 0.5 mL～1.0 mL 等分试样(便于一次试验使用)贮存在冷的、带锁扣盖的微量离心试管内，－70 ℃保存直到使用。等分试样宜在冰上解冻，且在解冻当日使用，并不宜再次冷冻。

7 最佳溶血素浓度的测定

7.1 为了节省贵重试剂和避免前带效应，最佳溶血素的浓度测定是必要的。购买的市售抗绵羊 RBC 的兔血清(溶血素)解冻后，或用无内毒素的蒸馏水复溶(若为冻干剂)后，在 56 ℃条件下热灭活30 min，并等分成适宜体积，－70 ℃贮存直到使用。

7.2 将 ϕ13 mm×100 mm 一次性玻璃试管，放置在冰浴中的试管架上，加入 0.1 mL，浓度为 1.5×10^8 细胞/mL 的已清洗绵羊 RBC。如需要对试验结果进行统计学分析，则每种条件下宜采用 3 支相同试管。否则，两支甚至单只试管就足够了。仅向一组 3 支相同试管中加入 0.1 mL 冷 BBS-GM(无 RBC 对照，作为补体背景颜色)。

7.3 对盛有 RBC 的试管，向一组 3 支试管中分别加入 1.1 mL 冷蒸馏水(完全裂解对照)，向另一组中加入 0.1 mL BBS-GM(无溶血素对照)，其余各组试管中分别加入 0.1 mL 1∶2 系列稀释的溶血素(试验)。推荐抗体稀释度在 1∶400 与 1∶25 600之间。向无 RBC 对照试管中再加入 0.1 mL BBS-GM。

7.4 轻微摇动每支试管，快速混合重新悬浮细胞，将试管架放置在 37 ℃水浴，孵育 10 min，然后再放回到冰浴中。

7.5 向两组加入抗体试管的一组中加入 1.0 mL 冷 BBS-GM(无补体对照)。除全部裂解对照组试管外,向其余所有试管中加入 0.5 mL 冷 BBS-GM,然后再加入 0.5 mL 稀释至 1∶100 或 1∶200 的吸附过的人血清(补体)。

注:对于特定量的人血清,1∶100 或 1∶200 稀释度宜提供足够的补体活性。同时,无溶血素(只有补体)对照组中的裂解百分率宜不超过 10%。若 1∶100 稀释度的补体中的裂解百分率超过 10%,则采用 1∶200 的稀释度。若无溶血素对照组仍超过 10%时,则需要用不同量的血清进行试验。

7.6 手工摇动试管悬浮细胞,然后将试管架放置在 37 ℃的水浴中孵育 1 h,间歇性摇动试管,使细胞保持在悬浮状态。

7.7 1 h 后,将试管架置于冰上。然后将冷的试管在 4 ℃条件下 1 000g 离心 10 min,将上清液轻轻移入相应编号的 13×100 mm 玻璃试管中。

7.8 在 412 nm 波长处测量上清液的吸光度。每支试验管和对照管的裂解百分率的计算是用其在 412 nm处的吸光度减去无 RBC 对照的吸光度(指 3 支相同试管的平均值),然后除以完全裂解对照值(指 3 支相同试管的平均值),再乘以 100%,见式(1)。

$$\text{裂解百分率}=\frac{\text{试验吸光度}-\text{无 RBC 对照吸光度}}{\text{全部裂解吸光度}}\times 100\% \quad \cdots\cdots(1)$$

7.9 每种条件的最终裂解百分率表示为每组 3 支相同试管的 3 个裂解百分率的 $\bar{x}\pm SD$。

7.10 绘制特异性裂解百分率与对应的溶血素浓度倒数的滴定曲线。在滴定曲线的平稳段取刚进入平台区溶血素浓度的两倍浓度值,用于随后的致敏 RBC 测定(最佳溶血素浓度)。每次使用前将贮存的溶血素重新稀释。

8 全补体滴定测定最佳血清稀释度

8.1 若需要对结果进行统计学分析,则在每种条件下,宜用 3 支 13×100 mm 的一次性玻璃试管对全部条件重复测定 3 次。否则,两支甚至单支试管就足够了。试管提前进行编号,条件包括完全裂解、无补体(无 C')、带有和不带有溶血素的试验组(稀释人血清-HS)以及无 RBC(使用最高浓度血清的补体背景颜色对照)。所有试剂、试管和操作均在冰冷条件下,试管架上的试管放置于冰浆中。

8.2 除无 RBC 的试管以外,将清洗过的 RBC 加入所有试管中(0.1 mL/管的 1.5×10^8 细胞/mL 悬浮液)。无 RBC 试管中加入 0.1 mL 冷缓冲液。

8.3 向完全裂解试管中加入 1.1 mL 蒸馏水。向无 C' 的试管中和带有溶血素的试验管中加入0.1 mL 最佳浓度的溶血素(见 7.10),向无 RBC 试管中加入 0.1 mL 冷 BBS-GM。摇动所有试管,重悬细胞,在 37 ℃水浴中孵育 10 min 后,重新放回到冰上。

注:也可制备一大批用于一周所有试验计划的溶血素致敏的红细胞。上述细胞按 5×10^8/mL 的浓度制备,4 ℃存放,每次使用前进行清洗,若发生溶血,则制备新的致敏细胞。使用这些致敏细胞,无需再向各个试管中添加溶血素,从而简化试验。未致敏的 RBC 可用作非特异性裂解的对照。

8.4 除了完全裂解试管之外,将最大体积为 1.0 mL 的冷 BBS-GM 加入所有试管中,并加入最大体积 0.5 mL 的稀释血清(见 8.5)进行还原。向无 C' 试管中加入 1.0 mL BBS-GM。

8.5 冷血清用冷 BBS-GM 稀释至所需浓度(具有最小激活作用)。建议在 1∶50～1∶300 之间先进行 HS 测试。向除了完全裂解试管和无 C'试管以外的所有试管中加入 0.5 mL 稀释血清,宜用 BBS-GM 将每支试管的终体积加至 1.2 mL。

8.6 试管按 7.6～7.9 中所述进行处理。

8.7 特定量人血清的最佳稀释度确定为非特异性裂解(HS+RBC,无溶血素抗体)≤10%,而特异性裂解在 20%～80%之间[全部裂解(RBC+Ab+HS)减去非特异性裂解],即:特异性裂解在补体滴定曲线的直线段。试验中大量吸附的人血清的典型最佳稀释度为 1∶200,体积为 0.5 mL。

9 步骤 A——材料与人血清接触

9.1 粉末

注 1：用醋酸纤维素作为粉末的实例。用典型的台式临床离心机进行离心不足以将与补体共同孵育的粉末制成球状。因此，需要进行过滤操作，同时需要加做适当的对照。

9.1.1 将冷的、已吸附的人补体放入冰上放置的 ϕ13 mm×100 mm 一次性玻璃试管的底部，0.1 mL/试管。测定过程最少需要 4 只试管，分别标为 M(材料)、NM(无材料对照)、I_1(冰 1，过滤对照)、I_2(冰 2，最大补体活性对照)。

注 2：其他对照可能包括具有相同单位表面积，或其他相似的材料，或具有补体活化作用的阳性对照的其他材料间的比较，如：酵母聚糖、或热凝集丙种球蛋白(HAGG)或其组合体。

9.1.2 将 M 和 NM 试管的上半部分用手加热，避免粉末因湿润附着在试管壁上。将确定数量的粉末加入试管底部 0.1 mL 的血清中，如 6 mg 粉末，使其刚好被液体浸没。在不混合的情况下，将两支试管放入 37 ℃的水浴中，孵育 1 h。I_1 和 I_2 仍放在冰上。

9.1.3 准备 3 支针筒式过滤器。建议采用低蛋白结合的过滤器，如：0.22 μm 孔径的亲水性 PVDF 膜。每只过滤器用 2.0 mL 冷 BBS-GM 进行冲洗，并用空气排出残留液体，放置在冰上的架子上待用。

9.1.4 1 h 的孵育结束时，将 M 和 NM 试管重新放回到冰上，立即向每支试管中加入 4.9 mL 冷 BBS-GM(1∶50 稀释的接触血清)，吹吸混匀，确保血清与缓冲液的充分混合。

9.1.5 将试管在 4 ℃条件下 2 000g 离心 10 min。吸取 3 mL 液体，并通过单独的、装配好的 0.22 μm 针筒式过滤器过滤至另一个新的冷试管中。

9.1.6 然后将每支试管中的内容物在冷试管中稀释至最佳人血清稀释度(见 8.7)，并放置在冰上。宜在 1 h 内测定血清的补体活性(见第 10 章)。

9.2 纤维或片状固体

9.2.1 固体纤维或片状材料对全补体激活作用的测定方法与 9.1 中粉末采用的方法基本相同，不同的是：确定数量的纤维或材料(mg 量，刚好被 0.1 mL 血清完全浸没)首先放置在室温中的 ϕ13 mm×100mm 试管中，然后向 M、NM 、I_1 和 I_2 试管中加入 0.1 mL 血清，并立即将 M 和 NM 试管放入 37 ℃的水浴中，I_1 和 I_2 放置在冰上。将 M 和 NM 试管放置 1 h 后，立即从 37 ℃水浴中取出，同样放置在冰上。

9.2.2 若供试材料不漂浮，或 2 000g 离心后能形成坚固的球状体时，则可略去过滤步骤和 I_1 对照。

9.3 测定规模和供试条件

9.3.1 上述常规设计方案可对不同量的材料进行试验，形成剂量效应曲线，或对等量材料在 37 ℃条件下的不同时间点的反应(时间进程)进行试验，或比较不同材料间的 C' 激活作用。

注：当材料的大小或形状无法在 ϕ13 mm×100 mm 的一次性玻璃试管中进行试验时，与材料接触的血清也可以不是 100 μL。

9.3.2 由于对每一条件来说，宜测定其特异性溶血%，因此需测定全溶血%(Ab+RBC+HS)和非特异性溶血%(RBC+HS)，且每种条件测定 3 次，同时建议每个技术人员一次试验中测定试验样品的总数不超过 10 个(从而不超过约 100 只试管的最终测定规模)。

10 步骤 B——补体缺失的血清测定

10.1 步骤 B 用于测定先前已与材料接触的血清(步骤 A)的全补体活性的可能消耗情况。

10.2 所有条件均测定3次，每种条件下采用3支 ϕ13 mm×100 mm 一次性玻璃试管。试管提前进行编号。所有条件包括完全裂解、无补体(无C')、带有和不带有溶血素(每组3支试管)的试验组(稀释人血清-HS)以及无RBC(最高浓度血清)。所有试剂、试管和操作均在冰冷条件下进行。

10.3 加入已清洗的RBC，然后按8.2和8.3的要求加入溶血素。

10.4 向无C'试管中加入1.0 mL BBS-GM，除"完全裂解"试管以外，向其余全部试管中加入0.5 mL冷BBS-GM，然后从材料与血清接触步骤中的试验试管或对照试管中各取0.5 mL冰中存放的稀释至最佳浓度的人血清(见8.7)，分别加入到3支装有溶血素致敏RBC的试管中，同时分别加入到3支装有未致敏RBC的试管中。

10.5 然后将试管按7.6～7.9的步骤进行处理。

11 试验结果和数据分析

11.1 与保存在冰中的血清(I_2)相比较，37 ℃时对不与材料接触的血清(NM试管)进行孵育，可能会导致补体溶血活性的降低。若需要过滤时(冰1试管作为对照，I_1)，也会在 I_1 中看到补体溶血活性比 I_2 显著降低。

11.2 步骤A中宜至少对材料进行3次重复试验，并对得到的3支接触试管，在步骤B中分别进行3次重复测定。这样做的目的，在于证明造成显著差异的原因在于不同条件的作用方式不同，而非试管间的测量误差。若存在微小差异时，则需将步骤A中每一条件下重复制备的试管数量增至5管或更多。

11.3 步骤B中对照溶血活性的显著消耗表明步骤A中试验材料对全补体的激活作用。

11.4 使用适当的统计学方法进行分析，如：方差分析(ANOVA)，当 $p \leqslant 0.05$ 时，认为有显著的溶血差异。可用条线图表示每一条件下的平均值和标准偏差。

附 录 A
（资料性附录）
试剂和缓冲液制备

A.1 试剂

Alsever 溶液：葡萄糖 2.05 g，柠檬酸钠 0.80 g，NaCl 0.42 g，溶于 100 mL 双蒸水中。

A.2 缓冲液

A.2.1 缓冲液，推荐使用巴比妥（佛罗钠）缓冲液。也可以采用已被证明不会激活补体的其他缓冲液体系，如 TRIS。“水”全部是指无内毒素的蒸馏水。

A.2.2 5×BBS 贮存液（巴比妥缓冲液），将 20.75 g NaCl 和 2.545 g 巴比妥钠（5,5-二乙基巴比妥酸钠）加入约 400 mL 水中制备。用 1 mol/L HCl 调整 pH 至 7.35，然后在容量瓶中加至最终体积为 500 mL。

A.2.3 钙镁离子溶液，将 2.0 mol/L $MgCl_2$ 溶液（将 40.66 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 加入 100 mL 无内毒素的蒸馏水中）和 0.3 mol/L $CaCl_2$ 溶液（将 4.41 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 加入 100 mL 无内毒素的蒸馏水中）按 1∶1（体积比）的比例混合制备，这些溶液可在 4 ℃稳定存放一个月。

A.2.4 BBS-GM 工作溶液，需使用前新鲜制备，将 0.25 g 明胶溶入 50 mL 无内毒素的蒸馏水中，轻微加热并搅拌。将明胶溶液加入 50 mL 5×BBS 贮存液和 0.25 mL 钙镁离子溶液中，加水至约 200 mL，调整 pH（使用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH）至 7.35，然后在容量烧瓶中加水至最终体积为 250 mL。

A.2.5 BBS-G 工作溶液，制备方法同上，但不加入钙镁离子溶液。

A.2.6 10×EDTA 贮存液（0.1 mol/L EDTA $Na_2 \cdot 2H_2O$），将 7.44 g EDTA $Na_2 \cdot 2H_2O$ 加入160 mL 水中，调整 pH（使用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl）至 7.65，然后在容量烧瓶中加水至体积为 200 mL。

A.2.7 BBS-G-EDTA（用于清洗前制备 RBC），在容量烧瓶中将 10 mL 10×EDTA 贮存液加入90 mL BBS-G 溶液中。

参 考 文 献

[1] Giclas, P.C., "Complement Tests," Manual of Clinical Laboratory Immunology, fifth edition, eds N.R. Rose, E.C. de Macario, J.D. Folds, H.C. Lane, and R.M. Nakamura, ASM Press, 1997, pp. 181-186

[2] Gee, A.P., "Molecular Titration of Components of the Classical Complement Pathway," Methods in Enzymology, Vol 93, Immunochemical Techniques, eds J.J. Langone, H.V. Vunakis, Academic Press, 1983, pp. 339-375

[3] United States Drug Enforcement Agency, Washington, DC

[4] Lin, W-Q., White, Jr., K.L., "Complement Assays to Assess Immunotoxicity," Methods in Immunotoxicology, Vol I, eds G.R. Burleson, J.H. Dean, and A.E. Munson, Wiley-Liss, 1995, pp. 357-375

中华人民共和国医药
行业标准
医疗器械补体激活试验
第1部分：血清全补体激活
YY/T 0878.1—2013
*
中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室：(010)64275323 发行中心：(010)51780235
读者服务部：(010)68523946
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
2014年2月第一版 2014年2月第一次印刷
*
书号：155066·2-26371 定价 18.00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)68510107

YY/T 0878.1-2013