



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0878.3—2019

医疗器械补体激活试验 第 3 部分：补体激活产物 (C3a 和 SC5b-9)的测定

Test for complement activation of medical devices—Part 3: Assay for the
product of complement activation (C3a and SC5b-9)

2019-07-24 发布

2020-08-01 实施

国家药品监督管理局 发布

前 言

YY/T 0878《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：血清旁路途径补体激活；
- 第 3 部分：补体激活产物(C3a 和 SC5b-9)的测定。

本部分为 YY/T 0878 的第 3 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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。

本部分由国家药品监督管理局提出。

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。

本部分起草单位：山东省医疗器械产品质量检验中心、四川大学(四川医疗器械生物材料和制品检验中心)。

本部分主要起草人：刘成虎、范春光、梁洁、袁曦、李秋。

引 言

GB/T 16886.4 中给出了医疗器械/材料血液相容性试验的选择策略,YY/T 0878 的本部分是体外补体激活产物的具体试验方法,可作为 GB/T 16886.4 中医疗器械/材料补体激活试验的补充。

医疗器械/材料与血液接触后,可能激活血液中的补体系统,产生效应分子导致机体的严重急、慢性反应,同时影响医疗器械/材料的血液相容性。C3a 为补体 C3 分子激活后形成的小分子物质,可以介导机体的急性炎症反应。SC5b-9 是补体系统激活后产生的共同末端产物 C5b-9 与血清中的 S 蛋白形成的亲水的、无裂解细胞活性的大分子片段或无溶解细胞膜活性的大分子片段。通过检测 C3a 分子或 SC5b-9 分子的含量,可以反映出血清中补体系统的激活情况。YY/T 0878 的本部分所描述的体外补体激活产物的测定方法,可用来评价医疗器械/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3部分:补体激活产物 (C3a 和 SC5b-9)的测定

1 范围

YY/T 0878 的本部分规定了用酶联免疫法测定血液中补体激活产物(C3a 和 SC5b-9)的方法。

本部分适用于体外对医疗器械/材料补体激活潜能的评价。

本部分建立的试验体系适用于人血清或抗凝血浆。若使用动物血液,经论证其适宜性后进行试验。

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

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分:样品制备与参照材料

3 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.4 和 GB/T 16886.12 界定的术语和定义适用于本文件。

4 试验原理(以 C3a 为例)

应用双抗体夹心(ELISA)法测定血清或抗凝血浆中 C3a 水平。用纯化的大鼠 C3a 抗体包被微孔板制成固相抗体,再往包被单抗的微孔中依次加入人血清或抗凝血浆。然后再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的 C3a 抗体,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物四甲基联苯胺(TMB)显色。TMB 在 HRP 的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅与血清或抗凝血浆中的 C3a 的浓度呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算血清或抗凝血浆中人 C3a 的浓度。

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 人 C3a 或 SC5b-9 试剂盒,应由有资质的供应商提供并经过验证。

5.1.2 新鲜健康人血清或抗凝血浆。

注:试验结束后按相关规定处理血液及血液接触后的物品。

5.2 试验对照

5.2.1 阴性对照[例如:高密度聚乙烯(HDPE)]。

5.2.2 阳性对照(例如:天然乳胶、醋酸纤维素、眼镜蛇毒因子、酵母聚糖 A 或菊糖)。

5.2.3 空白对照(未接触材料的血清或抗凝血浆)。

注 1: 一种材料或试剂可能并不能同时激活补体产生明显的 C3a 和 SC5b-9 阳性结果,因此各实验室可以根据实际情况选择适合的阳性对照。如眼镜蛇毒因子、酵母聚糖 A 或菊糖可能诱导 C3a,酵母聚糖 A 或菊糖可能诱导 SC5b-9 出现阳性结果。本部分中的阴性对照和阳性对照仅为推荐,使用者对所选择试验对照的适用性进行确认后,可根据实验室实际情况选择适宜的对照。

注 2: 如需要时,可选择已上市的同类医疗器械作为对照样品。

注 3: 空白对照的 C3a 或 SC5b-9 含量如有异常波动时,注意试验的有效性。

6 仪器和试验器具

6.1 酶标仪、恒温培养箱、水浴摇床、离心机、制冰机等。

6.2 不含抗凝剂或含促凝剂的血液采集管,用于制备血清。含抗凝剂(3.2%,0.109 mol/L 的枸橼酸钠)的血液采集管,用于制备抗凝血浆。或参照试剂盒要求选用合适的采血管。

6.3 移液管。

7 样品制备

制备试验样品、阴性对照、阳性对照、空白对照和已上市对照样品(如选择),各平行制备 3 份。按 GB/T 16886.12 的要求制备试验样品,将样品或材料剪成小块以保证血清或抗凝血浆能完全覆盖试验样品。

注: 可采用其他接触比例,如 GB/T 16886.12 推荐的接触比例的 1.5 倍或 2.0 倍,理论上这样会增加测试材料对补体激活反应的敏感性。在加以说明并阐述理由后,还可采用其他模拟临床使用或能对潜在危害进行适当测定的比例。

8 试验步骤

8.1 血清或抗凝血浆的制备

8.1.1 血清的制备

用不含抗凝剂或含促凝剂的血液采集管收集的血液,于 4 °C 静置 30 min,然后在 4 °C 条件下(1 500±50)g 离心 10 min,取上清液即为血清,在冰上放置,备用。也可根据试剂盒要求分离和保存血清。

8.1.2 抗凝血浆的制备

用含抗凝剂的血液采集管收集的血液,在 4 °C 条件下(1 500±50)g 离心 10 min,取上清液即为抗凝血浆,冰上放置,备用。也可根据试剂盒要求采集血液、分离和保存抗凝血浆。

注: 确保选择的抗凝剂不会对测试样品所引起的补体激活产生影响。

8.2 试验步骤

8.2.1 将试验样品、阴性对照、阳性对照和对照样品(如选择)分别放入相应的试管中,按比例加入血清或抗凝血浆。空白对照为未接触材料的血清或抗凝血浆。每组平行 3 管。

8.2.2 所有试管在 $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 的水浴中振荡孵育 $(60\pm 5)\text{min}$,推荐的振荡转速为 60 r/min。

8.2.3 轻轻混合每一试管,转移全部血清或抗凝血浆至另一对应标记的试管中,在冰上放置。

8.2.4 按试剂盒说明书进行 C3a 或 SC5b-9 的检测。

注:根据实际情况,可适当稀释检测样品。

9 结果计算

9.1 根据试剂盒要求绘制标准曲线,计算 r^2 和拟合曲线的方程式。

9.2 计算每管中 C3a 或 SC5b-9 的含量。

9.3 分别计算 3 管试验样品、阴性对照、阳性对照、空白对照和已上市对照样品(如选择)的 C3a 或 SC5b-9 含量平均值。

9.4 阳性对照和试验样品中 C3a 或 SC5b-9 含量与阴性对照的含量进行统计学分析, $p<0.05$ 为具有统计学意义。

9.5 试验样品、阴性对照和阳性对照的平均值除以空白对照的平均值或已上市对照样品(如选择)的平均值。按式(1)计算与空白对照或已上市对照样品(如选择)的百分比。

$$c = \frac{c_A}{c_B} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

c_A —— 试验样品、阴性对照、阳性对照的 C3a 或 SC5b-9 含量平均值;

c_B —— 空白对照或已上市对照样品(如选择)的 C3a 或 SC5b-9 含量平均值;

c —— 试验样品、阴性对照、阳性对照与空白对照或已上市对照样品(如选择)中 C3a 或 SC5b-9 平均含量的百分比, %。

10 试验有效性

10.1 相关指标应符合试剂盒的要求。

10.2 阳性对照的含量应高于阴性对照,且差异具有统计学意义($p<0.05$)。

10.3 阴性对照与空白对照相比的百分比应在 80%~120% 范围内。

11 结果评价

11.1 如采用统计学分析进行结果评价,试验样品应与空白对照或阴性对照进行比较,如差异有统计学意义,则与已上市器械进行比较有助于判断试验样品的结果是否可接受。

11.2 如采用百分比进行结果评价,试验样品与空白对照相比的百分比应在 80%~120% 范围内,如试验样品与空白对照相比的百分比小于 80% 或大于 120%,则与已上市器械进行比较有助于判断试验样品的结果是否可接受。

12 试验报告

试验报告应至少包含以下信息：

- a) 试验样品的描述；
- b) 阴性对照、阳性对照、对照样品(如选择)的描述；
- c) 试剂盒信息；
- d) 试验步骤；
- e) 结果记录；
- f) 试验结果；
- g) 结果评价。

参 考 文 献

- [1] GB/T 14233.2—2005 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
 - [2] 黄嘉,程莉萍,乐以伦,等.血液净化材料在体外静态接触血浆时血浆中 C3a des Arg 生成的研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2000,17(4): 385-389.
-