



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0878.2—2015

医疗器械补体激活试验 第2部分：血清旁路途径补体激活

Test for complement activation of medical devices—
Part 2: Serum alternative pathway complement activation

2015-03-02 发布

2016-01-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

YY/T 0878《医疗器械补体激活试验》拟分部分出版,目前计划发布如下部分:

- 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:血清经典途径补体激活。

本部分为 YY/T 0878 的第2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、国家食品药品监督管理局北京医疗器械质量监督检验中心、国家食品药品监督管理局天津医疗器械质量监督检验中心。

本部分主要起草人:乔春霞、王科镭、朱丽丽、姜华、王辉、王蕊。

引 言

GB/T 16886.4 中给出了医疗器械或材料血液相容性试验的选择策略。本部分是体外旁路途径补体激活作用的具体试验方法,可作为 GB/T 16886.4 中医疗器械或材料补体激活试验的补充。

YY/T 0878.1 为固体材料全补体激活试验提供了指南,但是没有区分经典途径和旁路途径。本部分为血液接触固体医疗器械或材料旁路途径补体激活的特异性试验,可用来筛选固体医疗器械或材料潜在的补体激活作用。

医疗器械补体激活试验
第 2 部分：血清旁路途径补体激活

1 范围

YY/T 0878 的本部分给出了医疗器械体外旁路途径补体激活作用的试验方法。
本部分适用于固态样品。
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
YY/T 0878.1 医疗器械补体激活试验 第 1 部分：血清全补体激活

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 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本文件。
Ab：抗体(溶血素)(Antibody, hemolysin)
BBS：巴比妥缓冲盐(Barbital buffered saline)
BBS-G：巴比妥缓冲盐-凝胶(Barbital buffered saline-gelatin)
BBS-G-EGTA/Mg(Mg Buffer)：巴比妥缓冲盐-含 EGTA 和 Mg^{2+} 凝胶(镁缓冲液)(Barbital buffered saline-gelatin EGTA Mg^{2+})
BBS-GM(*Ca Buffer*)：巴比妥缓冲盐-金属盐凝胶(钙缓冲液)(Barbital buffered saline-gelatin metals)
C’：补体(Complement)
C4(-)：无 C4 活性的豚鼠血清(GPS C4-deficient guinea pig serum)
注：如从遗传学不能产生 C4(补体的第 4 组分)的豚鼠获得的血清。
EDTA：乙二胺四乙酸，二钠盐：二水合物(Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt; dihydrate)
EGTA：乙二醇双氨乙基醚四乙酸，四钠盐[Ethylene glyco-bis(b-aminoethyl ether)-N, N, N8, N8-tetraacetic acid, tetrasodium salt]

YY/T 0878.2—2015

HAGG:热凝集丙种球蛋白(Heat aggregated gamma globulin)

HS:人血清(Human serum)

I:不加材料的含血清对照试管,冰上保存(Control tube with serum but no material, kept on ice)

M:加试验材料的含血清试管(Tube containing serum plus a test material)

NM:不加材料的含血清试管(Tube containing serum but no material)

PVDF:聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene fluoride)

RBC:红细胞[Red blood cell(s)]

5 绵羊和兔 RBC 的制备

5.1 去纤维蛋白兔 RBC 和保存在奥尔塞氏(Alsever's)溶液中的绵羊 RBC 均在 4 °C 条件下储存。绵羊 RBC 在保存 8 周后,或第 2 次洗涤上清中含有肉眼可见血色素(红色)时需丢弃(因为大多数 RBC 寿命的原因,它们会对补体裂解更敏感,同时自然裂解也增加)。兔 RBC 比绵羊 RBC 更易碎,应在保存 4 周后,或第 2 次洗涤上清中含有肉眼可见血色素(红色)时丢弃。

注:所有的离心应在 4 °C 条件下进行。除了另有说明,所有试剂,试管和细胞制剂都需置于碎冰或冰浴中保持冰冷状态。

5.2 在 4 °C 条件下,将 5 mL 绵羊或兔 RBC 在 1 000 g 下离心 10 min。

5.3 将细胞沉淀悬浮于 10 mL 冷 BBS-G-EDTA 中,37 °C 孵育 10 min。离心并使细胞沉淀重新悬浮于 10 mL 4 °C 的 BBS-G-EDTA 中。

5.4 离心细胞,丢弃上清(洗第 1 次),细胞沉淀重悬于 10 mL 冰冷的 BBS-GM 中(钙缓冲液)或 BBS-G-EDTA/Mg(镁缓冲液)中(用于吸收血清的细胞用钙缓冲液清洗;用于步骤 B 检测旁路途径补体消耗的细胞,用镁缓冲液清洗和悬浮)。重复 2 次(总共洗 3 次)。

5.5 用分光光度计法对细胞数量进行调节(当浓度为 2.0×10^8 RBC/mL,波长为 412 nm、光程为 1.0 cm 时,1 体积清洗后的压积 RBC 加入 24 体积 BBS-GM 或 BBS-G-EGTA/Mg,绵羊 RBC 吸光度为 0.75,兔 RBC 的吸光度为 1.30)或用血球计数仪计数。制备 10 mL 4 °C 下 BBS-GM 或 BBS-G-EGTA/Mg 中浓度为 2.0×10^8 细胞/mL 的细胞悬液。

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 虽然在血液接触医疗器械材料旁路途径补体激活时,人血清优于豚鼠血清。但有遗传缺陷的人血清却不易获得。用抗体柱吸附法消耗补体成分的人血清不适用于该试验原因有以下两个:

- 特异性成分去除不完全,因此还会存在经典途径激活;和
- 柱材料可激活旁路途径,降低功能性活性。遗传缺陷 C4 豚鼠来源的血清[C4(-)GPS]没有经典途径补体活性但完全能胜任旁路途径补体激活。

在检测生物材料补体激活作用时,虽然滴度不同(与人血清相比,裂解相同兔 RBC 所需 C4(-)GPS 的浓度较大)[5],但 C4(-)GPS 可与人血清具有相近的生物补体激活效果(见表 1 中琼脂糖凝胶² 举例)。因此,C4(-)GPS 适合作为检测人类全血中旁路途径激活的补体成分以及裂解产物的确定性免疫测定的筛选试验。C4(-)GPS 适用于从生物公司购买的补体源,通常标记为试剂级补体。

6.2 可用绵羊 RBC 和兔 RBC 吸收血清以清除自发产生的抗绵羊 RBC 和抗兔 RBC 溶血性抗体。

6.2.1 将购买的 C4(-)GPS 储存于 -70 °C。

6.2.2 将血清在碎冰上解冻或用冰水(如为冻干剂)复溶。

表 1 镁缓冲液中的兔 RBC 在人血清中或 C4(-)GPS 中
在 37 ℃ 条件下与 100 μL 的琼脂糖凝胶²CL-4B 接触 1 h 的裂解百分率^a

琼脂糖凝胶 ² CL-4B ^b [HS/C4(-)GPS]	HS 制备液 1 ^c	HS 制备液 2 ^d	C4(-)GPS ^e
50/12.5	3.3±1.2	3.4±1.7	6.5±2.6
25/6.25	14.2±0.6	11.8±0.8	21.3±3.3
12.5/3.13	23.6±5.2	19.6±2.8	20.1±0.9
6.25/1.57	33.2±2.8	29.4±3.8	27.3±1.4
0/0[37 ℃ 对照]	49.9±0.2	45.3±4.6	41.3±0.7
0/0[冰对照]	51.4±1.6	52.9±0.7	58.4±0.5
<p>^a 3 个复管的均值±标准偏差。</p> <p>^b 所示体积为加入到 100 μL 的人体血清或 C4(-)GPS 的琼脂糖凝胶²CL-4B 的体积。</p> <p>^c 人全血清[Quidel(NHSC)], 镁缓冲液 1 : 8 稀释。</p> <p>^d 重组冻干人血清[Sigma(S1764)], 镁缓冲液 1 : 4 稀释。</p> <p>^e 全豚鼠血清, C4 缺陷[Sigma(C1038)], 镁缓冲液 1 : 3 稀释。</p>			

- 6.2.3 所有的操作都在冰浴中进行,试剂和细胞也需在 4 ℃ 放置。在 4 ℃ 条件下,1 000 g 离心,全部操作在冰冷条件下进行是非常关键的,以避免该阶段补体的激活。
- 6.2.4 按 0.1 mL 压积 RBC/2.5 mL 血清的比例,将冷血清和 4 ℃、钙缓冲液洗涤的以 1 : 1 体积混合的绵羊和兔压积 RBC 通过缓慢摇晃混合,冰上孵育 10 min,4 ℃ 条件下,1 000 g 离心 10 min。将上清液小心转移至冰上放置的新器皿中。
- 6.2.5 重复 6.2.4 的步骤两次。
- 6.2.6 吸收的 C4(-)GPS 以 0.5 mL~1.0 mL(方便 1 次试验使用)储存于冰冷的带盖微型离心管中, -70 ℃ 保存直至使用。使用当天在碎冰或冰浴中融解,不能重复冻存。

7 全补体滴定确定最佳血清稀释度

- 7.1 一般每种条件采用一支试管或两支试管,如需要对结果进行统计学评价,所有条件宜进行 3 个平行检测,即每种条件都用 3 支 13 mm×100 mm 圆底一次性使用玻璃试管。各试管预先编号。条件包括“全部裂解”、“无补体(只有 RBC,无 C’)”、“试验[有或无溶血素的稀释 C4(-)GPS]”和“无 RBC(血清颜色,补体颜色对照,用最高浓度的血清)”。所有试剂、试管和操作需在 4 ℃ 条件下进行,试管应放置于冰浴中放置的试管架上。
- 7.2 按 7.3~7.4 准备两组试管。一组试管内加入镁缓冲液洗涤的绵羊 RBC 和稀释血清;另一组试管内加入镁缓冲液洗涤的兔 RBC 和稀释血清。
- 7.3 将镁缓冲液洗涤的 2.0×10⁸ 细胞/mL RBC 悬液加入到除“无 RBC”管以外的所有试管中,每管加入 0.05 mL。由于加入的细胞体积相对于试管很小,宜仔细将准确体积的细胞悬液加入到每个试管的底部中央。“无 RBC”管加入 0.05 mL 4 ℃ 的镁缓冲液。
- 7.4 在 4 ℃ 条件下,用 4 ℃ 的镁缓冲液将 HS 或 C4(-)GPS 稀释到所需浓度(用最小摇动)。首次试验推荐血清稀释度为 1 : 2~1 : 20 之间。直接将 0.05 mL 稀释的血清加入到每个试验试管的底部。“无补体”管加入 0.05 mL 不含血清的镁缓冲液。“全部裂解”管加入 0.05 mL 蒸馏水代替缓冲液。
- 7.5 用手摇动各试管使细胞悬浮,放入试验管架后再置 37 ℃ 水浴 1 h,间歇摇动(每隔 15 min)保持细胞悬浮状态。
- 7.6 水浴 1 h 时,将试管架在冰浴中放置。所有试管加入相同体积 4 ℃ 的镁缓冲液(如果离心后上清

YY/T 0878.2—2015

液移到微孔板上读数,只需加入 0.4 mL/管即可;如果通过分光光度计读数,需加入 1.1 mL/管)。冷试管需在 4℃条件下,1 000 g 离心 10 min,上清液倒入与之有相应编号的 13 mm×100 mm 玻璃试管中或直接放入微孔板内进行读板扫描。

注:虽然上清液可以放入微孔板内读数,但旁路途径补体激活试验本身不能在微孔板中进行,因为塑料可能直接激活旁路途径。

7.7 在 412 nm 波长处检测上清液的吸光度,对每个试验管和对照管计算裂解百分率。计算方法是通过减去 412 nm 波长处“无 RBC”对照管(3 个试管的均值),也就是减去较大稀释度管的吸光度值,再除以全部裂解对照管(3 个试管的均值)的值,乘以 100。

$$\eta = \frac{A_1 - A_2}{A_3} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

- 式中:
- η ——裂解率,%;
 - A₁——试验管吸光度;
 - A₂——无 RBC 对照管吸光度;
 - A₃——全部裂解管吸光度。

7.8 各条件的最终百分裂解用 3 组重复试验的均值±1 SD 表示。

7.9 对特定批血清的最佳稀释度,即在该稀释度下血清与材料作用后能按步骤 B 检测出兔 RBC 裂解。对于绵羊 RBC,最佳稀释度定为裂解百分率小于等于 5%,而对于兔 RBC,裂解百分率则定为 40%~80%之间(即裂解是在补体滴度曲线的线性部分)。对于一批吸收后的冻干人血清,典型的最佳稀释度为 1:4[常用来证实 C4(-)GPS 是人体血清的良好替代品。见表 1],加入的检测体积为 0.05 mL。对于一批吸收后的人全血清,典型的最佳稀释度为 1:8。对于一批吸收后的全 C4(-)GPS,典型的最佳稀释度为 1:3。

8 程序 A—材料与 C4(-)GPS 接触

8.1 材料制备

8.1.1 使用琼脂糖凝胶²CL-4B (cross-linked 4% beaded agarose,交联后的 4%珠状琼脂糖)作为与患者血液接触医疗器械(如抗体消耗 antibodydepleting 柱)中使用的固体材料的实例。琼脂糖凝胶²CL-4B具有直径为 40 μm~165 μm 的湿珠,对球状蛋白质的分离范围(相对分子质量)在 60 000~20 000 000之间,对右旋糖酐的分离范围在 30 000~5 000 000 之间。在 2℃~8℃条件下,在含 20%乙醇的悬液中储存,不冻结。琼脂糖凝胶²CL-4B 是一种补体旁路途径的中等强度的激活剂,可用来作为阳性对照材料。其他可激活旁路途径的材料也可使用(见第 10 章)。

注:琼脂糖凝胶²CL-4B 离心时会形成一个分离的沉淀。对于使用临床典型台式离心机离心不足以形成沉淀的材料,与补体一起孵育后,就需要在有适当的控制条件下经过一个过滤步骤。8.1.2~8.2.5 中提供的步骤是专门为琼脂糖凝胶²CL-4B 设计的,当然,其他材料也可用相同的方式检测。其主要目标是以下列方式将已知量的材料与 100 μL 的最小体积血清接触:

- a) 材料与血清接触表面最大;和
- b) 接触后材料与血清易于分离,以便于随后的补体对兔 RBC 的旁路途径激活检测。任一满足这些条件的材料与血清接触方式都是合适的。例如,对于易于与血清分离的材料,用 13 mm×100 mm 的圆底直式玻璃试管可能比琼脂糖凝胶²CL-4B 所需的斜式玻璃离心管更适宜。

8.1.2 通过用钙缓冲液清洗 5 次制备检测用琼脂糖凝胶²CL-4B。将一定量的储备的琼脂糖凝胶²CL-4B(对于适宜的检测,1.4 mL 就足够了)加入到冰上放置的塑料离心管中。琼脂糖凝胶²CL-4B 的加入量事先测定,以得到 5 次清洗后的体积。用移液管加入 10 mL 4℃的钙缓冲液,加入时用足够的向下喷射力使琼脂糖凝胶²CL-4B 充分混悬。混悬液在 4℃条件下,1 000 g 离心 10 min,将接近沉淀物以上

的上清液抽出。再重复操作 4 次,最后一次清洗后,小心取出沉淀上部所有剩余的液体,加入与沉淀等体积的钙缓冲液(这种情况为 800 μL)。将琼脂糖凝胶²CL-4B 悬液在碎冰上放置直到使用。

8.1.3 充分混合 1 : 2 稀释的琼脂糖凝胶²CL-4B 悬液,将合适体积的液体移入一系列一次性使用 15 mL 玻璃离心管底部,以将所需体积的球粒加入每个试管(如 25 μL 、12.5 μL 、6.25 μL ,和 3.17 μL 液珠)。锥形玻璃离心管能在离心后使上部液体全部取出而不破坏琼脂糖凝胶²CL-4B 沉淀,即使是非常小的体积。所有加材料的试管(M),不加材料(NM)37 $^{\circ}\text{C}$ 对照试管,和不加材料的冰对照试管(I)都加入 1.0 mL 钙缓冲液,必需确保无少量琼脂糖凝胶²CL-4B 粘附于试管壁。所有试管都在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,1 000 g 离心 10 min,小心移走沉淀上部的液体。盖住各试管口,碎冰中 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置直到加入血清。

8.2 材料与未稀释的 C4(-)GPS 孵育

8.2.1 将 200 μL 吸收的、未稀释、4 $^{\circ}\text{C}$ 保存的 C4(-)GPS 加到冰上放置 15 mL 锥形玻璃离心管(M 管)底部琼脂糖凝胶²CL-4B 沉淀物上,加入 NM 对照试管中和冰对照试管中。本例中,用 200 μL 而不用最小量的 100 μL 血清是为了保证稀释后有足够的体积用于步骤 B 中检测。通过倾斜试管为材料与血清提供足够的接触面积(见 8.2.3)。如果对其他类型的材料使用了 13 mm \times 100 mm 玻璃试管,可能无法通过倾斜试管的方法增加接触面积(这种情况下,就需要较多的血清来增加与材料的接触面积)。

注:检测最少需要 3 个试管,标记为 M(材料)、NM(无材料,37 $^{\circ}\text{C}$ 对照管)和 I(冰,最大补体活性对照管)。对于统计学评价,宜至少使用 3 组试管。另外,除了 I 和 NM 外,还可能使用其他对照,包括一个与其他旁路途径补体激活材料进行比较的对照(具有相同的单位面积或其他合适的可测量参数)、一个旁路途径补体激活的阳性试剂对照(如酵母聚糖或菊粉)或一个旁路途径补体激活的阴性试剂对照(如经典途径激活补体的热凝集人丙种球蛋白(HAGG)),或两者都用。如何用酵母聚糖和 HAGG 作为对照的更多细节讨论见第 10 章。

8.2.2 用一只 100 μL 去除尖端以提供较大孔径(以便能快速混合琼脂糖凝胶²CL-4B 球粒)的移液管,通过四次吸上和排下悬液的方式快速并小心地将各试管内液体混匀。先从 I 开始,接着是 NM,最后是 M 管,使该混匀操作由低浓度到高浓度依次进行。

8.2.3 除了 I 管,其他所有试管立即封口,放入试管架,倾斜 10 $^{\circ}$ ~15 $^{\circ}$,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水中孵育,使得试管尖部没入水中,顶部斜靠在水浴边缘。这样,琼脂糖凝胶²CL-4B 不会在血清中形成致密沉淀,从而使其与血清有最大的接触面积。将 I 管于碎冰上放置。

8.2.4 孵育 1 h 时,将 M 和 NM 管放回冰上。立即通过加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 BBS-G-EGTA/Mg[镁缓冲液]的方式,将每管内 200 μL C4(-)GPS 稀释到最佳检测浓度(例如,如果用于在 1 : 3 稀释度下检测,每管内需加入 400 μL 的镁缓冲液)。用不同的巴斯德玻璃吸管将每管内液体吸上和排下,确保血清和缓冲液充分混合。

8.2.5 所有试管都在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,1 000 g 离心 10 min。将移液管头插入液体中间高度位置,抽出 400 μL 液体移入碎冰上放置的另一标记的玻璃试管中。在 1 h 内检测血清的补体活性(见第 9 章)。

8.3 纤维或固体片材

除了需将一定量(以毫克计,正好能被最少 0.1 mL 的血清完全覆盖)的纤维或片材预先室温下放入 13 mm \times 100 mm 玻璃试管中以外,固体纤维或片状材料的全补体激活试验与 8.2 中琼脂糖凝胶²CL-4B 的过程相似。随后将 0.1 mL 的 4 $^{\circ}\text{C}$ 血清分别加入 M、NM 和 I 管中。立即将 M 管和 NM 管放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,同时将 I 管碎冰上放置。1 h 时将 M 管和 NM 管从 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中取出,碎冰上放置。

8.4 检测规模和试验条件

8.4.1 前面所述的一般检测模式可被用于试验不同量的材料得出剂量-反应曲线、相同量的材料在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下接触不同时间段、或比较不同材料的补体激活。

8.4.2 推荐检测样本的总量不超过 100 管最终分析所需的样本数。

9 程序 B——程序 A 中补体旁路途径激活的血清检测

9.1 程序 B 用于检测预先已经与材料接触(程序 A)血清可能的旁路途径补体激活。在程序 B 中,用材料接触血清 M 与无材料 37 °C 的对照 NM 相比,镁缓冲液中兔 RBC 裂解下降来检测程序 A(补体组分从血清中清除)中旁路途径补体激活。

9.2 所有条件宜进行 3 个平行检测,即每个条件使用 3 只 13 mm×100 mm 一次性使用玻璃试管。试管预先编号。条件包括“全部裂解”、“无补体”、“试验”和“无 RBC”。所有试剂、试管和操作都在碎冰上或冰水中放置和进行。

9.3 兔 RBC 先用镁缓冲液清洗,调节浓度为 2×10^8 /mL(第 5 章)加入到所有试管中(0.05 mL/管),“无 RBC”管除外。“无 RBC”管加入 0.05 mL 4 °C 的镁缓冲液。

9.4 “无补体(只有 RBC)管”加入 0.05 mL 的镁缓冲液。全部裂解管加入 0.05 mL 水。然后,从经材料接触程序(第 8 章),并为检测兔 RBC 已经稀释到最佳浓度的试验管或对照管(冰上放置)中各取 0.05 mL 血清,分别加入 3 个相应标记的含兔 RBC 试管中。

9.5 各试管按 7.5~7.9 所述进行操作。

10 必要的对照

10.1 在各程序 B 检测(第 9 章)中的对照包括:“全部裂解”、“无补体”(无血清时,缓冲液中 RBC 的裂解背景)、“无 RBC”、和“无材料”(“只有 37 °C”或 NM,在程序 A 中不加材料)。另外,在有些点宜将绵羊 RBC 和兔 RBC 同时试验来证实在程序 B 的镁缓冲液条件中使用的标准血清批未发生非特异性裂解。

10.2 程序 A(见第 8 章)中使用除“无材料”以外的对照可以包括:

- 一个已知的阳性材料如琼脂糖凝胶²CL-4B(第 8 章);
- 一个已知的阴性材料(使用无试验材料的玻璃试管即可);
- 一个阳性试剂(如酵母聚糖或菊粉),和;
- 一个阴性试剂(如热凝集人丙球蛋白 HAGG)[6]。

10.3 酵母聚糖 A(酿酒酵母的细胞壁成分)可用作旁路途径补体激活的标准阳性对照,并在 4 °C 保存。将 10 mg 酵母聚糖加入到 1.0 mL 的钙缓冲液中,再系列稀释成 1/10 和 1/100 的稀释液。分别取这 3 个溶液 10 μ L(分别含 100 μ g、10 μ g 和 1 μ g 酵母聚糖)各加入盛有 100 μ L 血清的玻璃试管中,以便与试验材料进行比较。其他试管加入不含酵母聚糖的 10 μ L 的镁缓冲液。这些量的酵母聚糖宜产生全部、部分和微弱的旁路途径补体活性清除(尽管百分清除率会由血清批次不同而发生变化)。离心会使酵母聚糖形成致密的沉淀,因此程序 A 后其上部覆盖的血清易于分离。酵母聚糖悬液宜在每个试验前新鲜制备。当程序 B 中使用最终稀释的血清做检测时,宜对这 10 μ L 额外体积用缓冲液加以补偿。

10.4 HAGG 的制备:人丙种球蛋白(源自克隆片段 II、III) 4 °C 储存。将 10 mg 人丙种球蛋白加入盛有 1.0 mL 室温 BBS 的玻璃试管中。轻轻混合并室温放置 10 min 后,宜形成无沉淀的透明液体。再将该制备液置 63 °C 水浴 20 min。孵育后,将该液体冰上放置,取 0.1 mL 在 -70 °C 条件下保存,得到 100 μ g/10 μ L 的储备液。将 10 μ L 解冻后的 HAGG 加入与实验材料平行设置的血清中作为阴性对照物质(不激活旁路途径,只激活经典途径)。虽然这一剂量的 HAGG 可通过经典途径消耗补体(可使用 YY/T 0878.1 进行观察),但在 C4(-)GPS 中不宜发生消耗。

11 结果报告 and 数据分析

11.1 因为一些补体蛋白质是温度敏感性的(见表 1 中举例),放置在 37 °C 的血清对照管(NM 管)中免

RBC 裂解率比放置在冰上的血清对照管(I 管)为低。如果程序 A 后需要进行过滤将材料全部去除,需对第 2 个冰上放置的无材料血清管(I₂)进行相同操作来加以控制,可能会看到 I₂ 管比 I 管中的补体活性有明显降低。

11.2 在程序 B 中,来自程序 A 的各管都进行 3 个平行检测,以检测程序 A 各管间的显著性差异($p \leq 0.05$,使用合适的统计学方法,如方差分析),特别是当各条件之间差异很小时,程序 A 中每种条件可能至少需要 3 个平行管。因此,为了获得统计学差异,材料需在程序 A 进行 3 个平行试验,程序 B 中的 3 个接触管中每个管需再进行 3 个平行检测。

11.3 程序 B 中 M 管中溶血活性与 NM 管相比显著降低表示程序 A 中试验材料通过旁路途径激活补体(消耗补体成分)。

11.4 通过适当的统计学试验(如方差分析)计算, $p \leq 0.05$ 时,被认为溶血活性具有显著性差异。结果可以条线图形式呈现各条件的均值和标准差。

附 录 A
(资料性附录)
试剂和缓冲液制备

A.1 试剂

奥尔塞氏(Alsever)溶液:葡萄糖 2.05 g,柠檬酸钠 0.80 g,氯化钠(NaCl)0.42 g,溶于 100 mL 双蒸水中。

A.2 缓冲液

A.2.1 按确定的方案制备缓冲液[1][2]。水为蒸馏的无内毒素水。推荐使用巴比妥缓冲液。如果能证明不激活补体,也可使用其他缓冲系统(如 TRIS) [4]。除非有其他说明,溶液可在 4 °C 条件下存放一个月。

A.2.2 5 倍 BBS(巴比妥缓冲盐)储存液制备:将 20.75 g 氯化钠(NaCl)和 2.545 g 巴比妥盐(5'-二乙基巴比妥酸钠)溶入约 400 mL 水中。用 1 mol/L 盐酸调节 pH 至 7.35,然后在容量瓶中定容至 500 mL。

A.2.3 金属溶液制备:制备 2.0 mol/L 氯化镁溶液(40.66 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于水,终体积为 100 mL),和 0.3 mol/L 氯化钙溶液(4.41 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于水,终体积 100 mL),并将两种溶液以 1:1(体积比)混合。

A.2.4 钙缓冲液(BBS-GM 工作液)制备:将 0.25 g 凝胶(gelatin)(A 型:猪皮,大约 300 Bloom,如从 Sigma 购买的[G-1890])溶入 50 mL 水中,缓慢加热和搅拌。在容量瓶中向该凝胶溶液加入 50 mL 5 倍 BBS 储存液中,再加入 0.25 mL 金属溶液,加水至约 200 mL,用 1 mol/L 盐酸溶液或 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.35,然后定容至 250 mL。钙缓冲液中含有 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} ,可使补体经典和旁路途径补体发生激活。

A.2.5 同样方法制备 BBS-G 工作液,但是不加金属溶液。

A.2.6 10 倍 EDTA 储存液(0.1 mol/L disodium dehydrate EDTA)制备:在容量瓶中将 7.44 g $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (磷酸氢二钠 EDTA $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)加入约 160 mL 水中,用 1 mol/L 盐酸溶液或 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.65,定容至 200 mL。

A.2.7 0.1 mol/L EGTA (4 钠盐 $\text{EGTA} \cdot 4.5 \text{H}_2\text{O}$) 制备:在容量瓶中将 4.683 g 4 钠盐 EGTA 加入约 80 mL 水中,用 1 mol/L 盐酸溶液或 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.35,定容至 100 mL。

A.2.8 BBS-G-EDTA(用于冲洗前制备 RBC)制备:在容量瓶中将 10 mL 10 倍 EDTA 储存液加入盛有 90 mL BBS-G。

A.2.9 镁缓冲液(BBS-G-EDTA/Mg 工作溶液)制备:将 0.25 g 凝胶溶入 50 mL 水中,缓慢加热并搅拌。在容量瓶中将凝胶液加入 50 mL 5 倍 BBS 储存液、0.625 mL 2.0 mol/L 氯化镁、4 mL 0.1 mol EGTA,加水约至 200 mL,用 1 mol/L 盐酸溶液或 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.35,定容至 250 mL。镁缓冲液中 EGTA 可结合 Ca^{2+} 。 Mg^{2+} 的存在允许旁路途径激活的发生,而 Ca^{2+} 的缺失则阻止经典途径的激活。

附 录 B

(资料性附录)

说 明

B.1 本标准主要目的是描述一种简单的、便宜的功能性试验来筛选血液接触固体材料血清旁路途径补体激活。YY/T 0878.1 为固体材料全补体激活试验提供了指南,但是没有区分经典途径和旁路途径。本标准作为血液接触固体生物材料旁路途径补体激活的首选专用试验[7]。材料体外旁路途径激活补体预示着该材料体内激活补体的潜能。虽然血清与材料体内接触的血浆不完全相同,但是由加抗凝剂的采集后血液制备的血浆不宜用于本标准,因为抗凝剂会干扰补体的激活。

B.2 C4 遗传缺陷的豚鼠血清不能通过经典途径激活补体。因此,如果一种材料能在 C4(-)GPS 中消耗补体活性,则补体激活一定是通过旁路途径发生的。由于兔细胞,不像用于经典途径分析的绵羊细胞那样,缺乏膜结合型旁路途径抑制分子[7],所以用含 EGTA 和过量 Mg^{2+} 的缓冲液中的兔 RBC 来检测 C4(-)GPS 接触一种材料后的补体消耗。另外,经典途径需要 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ,而旁路途径只需要 Mg^{2+} 。因此,含优先结合 Ca^{++} 的 EGTA 且有过量 Mg^{++} 的缓冲液,也确保了兔细胞的裂解只是因为旁路途径激活。(在程序 A 中向人血清中加入 EGTA 和含过量 Mg^{++} ,不能在本步骤中排除经典途径激活,因为这给出了与该试剂用于缓冲液稀释血清时结果的本质性差异。)

B.3 众所周知,补体激活是宿主重要的防御机制[8][9]。然而,血液接触器械的材料成分造成的补体激活可能对宿主产生伤害或导致器械出现故障[6][10][11]。虽然多年来补体学一直是研究的热点领域,但是慢性局部补体激活对材料/器械功能以及病人健康实际影响的重要性还未完全清楚。

B.4 许多研究者已经开发了全补体功能活性试验、消耗特异性补体成分试验、或产生特异性补体裂解产物[1][2][4][12][13][14]试验。其他确认过的试验方法也可以取代本标准所描述的功能性旁路途径补体消耗检测。如果对单个补体途径成分进行免疫学检测,宜考虑补体消耗是由于材料非特异性结合所致,还是由途径激活所致。

B.5 本标准中所给出的步骤可用作常规的筛选步骤。它不被描述为是所有材料在所有应用中的最敏感的或最专用的检测补体激活潜能的步骤。对发现了激活旁路途径的材料为进一步分析,可能涉及人血清的使用和用于检测补体途径成分的减少或确定补体途径所特有的裂解产物(如 Bb 和 C4d)的免疫分析。消耗补体成分后的人血清是不适用的,因为与遗传缺陷 C4(-)GPS 相比,免疫吸收所导致的补体消耗可能导致如下问题:

- a) 经典途径活性水平降低不完全,和;
- b) 导致旁路途径补体滴度下降的旁路途径的直接激活。

B.6 弱性的旁路途径微激活物质,仍可能产生足够量的相关裂解产物(C3a、C5a 等),在体内导致局部炎症反应。这可能不会因全补体活性的明显改变而受到影响。在评价试验材料的血液相容性时,可将本步骤获得的结果与其他试验结果一起使用。

参 考 文 献

- [1] Giclas, P.C., "Complement Tests," Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th ed, N.R. Rose, E.C. de Macario, J.D. Folds, H.C. Lane, and R.M. Nakamura, eds., 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, J.J. Langone, and H.V. Vunakis, eds., Academic Press, 1983, pp. 339-375.
- [3] United States Drug Enforcement Agency, Washington, DC.
- [4] Lin, W-Q., and White, Jr., K. L., "Complement Assays to Assess Immunotoxicity," Methods in Immunotoxicology, Vol I, G.R. Burleson, J.H. Dean, and A.E. Munson, eds., Wiley-Liss, 1995, pp. 357-375.
- [5] Tanaka, S., Kitamura, F., and Suzuki, T., "Studies on the Hemolytic Activity of the Classical and Alternative Pathway of Complement in Various Animal Species," 1987, Complement 4: 33-41.
- [6] Chenoweth, D.E., "Complement Activation Produced by Biomaterials," 1986, Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 32:226-232.
- [7] Platts-Mills, T.A.E., and Ishizaka, K., "Activation of the Alternative Pathway of Human Complement by Rabbit Cells," Journal of Immunology, 1974, 113:348-358.
- [8] Sakamoto, M., Fujisawa, Y., Nishioka, K., "Physiologic Role of the Complement System in Host Defense, Disease, and Malnutrition," Nutrition 14:391-398, 1998.
- [9] Law, S.K.A., Reid, K.B.M., Complement, second edition, Oxford University Press, 1995
- [10] Kazatchkine, M.D., Carreno, M.P., "Activation of the Complement System at the Interface Between Blood and Artificial Surfaces," Biomaterials, 9:30-36, 1998
- [11] Hakim, R.M., "Complement Activation by Biomaterials," Cardiovasc. Pathol. 2:187S-197S, 1993
- [12] McLean, R.H., Welch, T.R., "Complement" Handbook of Human Immunology, eds M. S. Leffell, A.D. Donnerburg, and N.R. Rose, CRC Press, pp. 267-318, 1997
- [13] Labarre, D., Montdargent, B., Carreno, M-P., Maillet, F., "Strategy for In Vitro Evaluation of the Interactions between Biomaterials and Complement System," J. Applied Biomat. 4: 231-240, 1993.
- [14] Complement Methods and Protocols, ed B.P. Morgan, Humana Press, 2000

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
医疗器械补体激活试验
第 2 部分：血清旁路途径补体激活
YY/T 0878.2—2015

*

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(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址：www.gbl68.cn

服务热线：400-168-0010

010-68522006

2015 年 9 月第一版

*

书号：155066·2-28779

版权专有 侵权必究



YY/T 0878.2-2015