



中华人民共和国国家标准

GB/T 14233.2—20XX
代替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

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

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

发布

目 次

前 言.....	II
引 言.....	III
1 范围.....	4
2 规范性引用文件.....	4
3 术语和定义.....	4
4 浸提液制备.....	4
5 热原试验.....	5
6 急性全身毒性试验.....	6
7 与血液相互作用试验.....	7
8 细胞毒性试验.....	12
9 致敏试验（最大剂量法）.....	15
10 皮内反应试验.....	15

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是GB/T 14233《医用输液、输血、注射器具检验方法》的第2部分。GB/T 14233已经发布了以下部分：

- 第1部分：化学分析方法；
- 第2部分：生物学试验方法。

本文件代替GB/T 14233.2-2005《医用输液、输血、注射器具检验方法 第2部分：生物试验方法》，与GB/T 14233.2-2005相比，除结构调整和编辑性改动以外，主要技术变化如下：

- 删除了无菌试验（见2005版的第3章）；
- 删除了细菌内毒素试验（见2005版的第4章）；
- 增加了浸提液制备方法（见第4章）；
- 修改了热原试验、急性全身毒性试验、溶血试验、细胞毒性试验、致敏试验、皮内反应试验的浸提液制备方法（见5.5.1、6.5.1、7.2.4、8.5.4.1、9.5.3、10.5.2，2005版的5.5.1、6.5.1、7.4、8.5.4.2、9.5.3、10.5.2）；
- 修改了急性全身毒性试验注射后动物反应观察的时间点（见6.5.3，2005版的6.5.3）；
- 修改了有急性全身毒性反应的结果判定原则（见6.5.4，2005版的6.5.4）；
- 将“与血液（器械）相互作用试验”更改为“与血液相互作用试验”，整合了相关试验，并在“试验步骤和判定原则”引用相关行业标准（见第7章，2005版的附录B）；
- 增加了溶血试验间接接触试验（见7.2.1，2005版的7.1）；
- 修改了溶血试验新鲜稀释抗凝兔血制备方法（见7.2.5，2005版的7.5）；
- 修改了细胞毒性试验用的试剂和浸提介质（见8.2和8.5.2，2005版的8.2和8.5.2），删除了细胞培养常用溶液和培养液制备方法（见2005版的8.4.2和附录C），增加了四唑盐(MTT)染色液的制备方法（见8.4.2）；
- 删除了植入试验（见2005版的第11章）；
- 删除了亚急性（亚慢性）全身毒性试验（见2005版的附录A）。

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用输液器具标准化技术委员会（SAC/TC 106）归口。

本文件起草单位：山东省医疗器械和药品包装检验研究院、。

本文件主要起草人：。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 1993年首次发布为GB/T 14233.2-1993，2005年第一次修订；
- 本次为第二次修订。

引 言

本文件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：风险管理过程中的评价与试验》的基本原则，在GB/T 16886系列标准和中国药典四部中相应试验方法学原理和试验步骤的基础上，根据医用输液、输血、注射器具的特性和生物学评价需求制定而成，因此本文件是与GB/T 16886系列标准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。

对于接触时间超过30 d的持久接触的产品或没有安全应用史的新材料、新工艺制备的产品，还可能需要风险评估的基础考虑更多的评价终点，如亚急性或（亚）慢性毒性、遗传毒性、致癌性、免疫毒性、生殖/发育毒性或其他器官特异性毒性。

GB/T 14233《医用输液、输血、注射器具检验方法》拟由三个部分构成。

- 第1部分：化学分析方法。目的在于给出医用输液、输血、注射器具的化学分析方法。
- 第2部分：生物学试验方法。目的在于给出医用输液、输血、注射器具的生物学试验方法。
- 第3部分：微生物学试验方法。目的在于给出医用输液、输血、注射器具的微生物学试验方法。

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

本文件规定了医用输液、输血、注射器具生物学试验方法。

本文件适用于医用输液、输血、注射器具。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 16886.4 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—2022, ISO 10993-4:2017, IDT）

GB/T 16886.10 医疗器械生物学评价 第10部分：刺激与致敏试验（GB/T 16886.10—2017, ISO 10993-10:2010, IDT）

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—2017, ISO 10993-12:2012, IDT）

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

YY/T 1649.1-2019 医疗器械与血小板相互作用试验 第1部分：体外血小板计数法

YY/T 1649.2-2019 医疗器械与血小板相互作用试验 第2部分：体外血小板激活产物（ β -TG、PF4和TxB2）的测定

YY/T 1770.1 医疗器械血栓形成试验 第1部分：犬体内血栓形成试验

YY/T XXXX 医疗器械凝血试验方法

中华人民共和国药典 四部

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 浸提液制备

4.1 通则

应按照 GB/T 16886.12 中的规定，尽量模拟产品使用过程中所经受的条件(如产品的应用面积、时间、温度等)。模拟浸提时间应不少于产品正常使用时间。当产品的使用时间较长时(超过 24 h)，应考虑采用加速试验条件制备浸提液，但需对其可行性和合理性进行验证。

试验应在最终产品、取自最终产品中有代表性的样品或与最终产品以相同的工艺过程制得的材料、或者以上样品或材料制备的适合的浸提液中进行。

4.2 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。

4.3 浸提容器

除另有规定，浸提应在洁净、化学惰性、密闭的容器中进行。

为确保浸提容器不干扰试验材料浸提液，浸提容器应为：

- a) 硼硅酸盐玻璃试管，其密封盖内衬为惰性材料（如聚四氟乙烯）；
- b) 特定材料和/或浸提程序所需的其他惰性浸提容器。

4.4 浸提介质

浸提时应使用极性和非极性两种浸提介质。在某些器械特定的情况下，仅在一种浸提介质（极性或非极性）中进行浸提可能是适宜的。如果只在一种介质中浸提，则应提供理由。常见的浸提介质有：

- a) 氯化钠注射液；
- b) 新鲜精制植物油（如棉籽油或芝麻油）；

注：本文件各试验中所用新鲜精制植物油推荐采用符合药典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。

- c) 无血清或含血清的哺乳动物细胞培养基。

4.5 样品的选择与制备

推荐在表 1 中选择浸提液制备方法。

表 1 浸提液制备方法

序号	浸提液制备方法	适用产品说明
1	<p>取样品的厚度均匀部分，切成 1cm 长的段，按样品内外总表面积（cm²）与浸提介质（mL）的比为 3：1（或 6:1）的比例加浸提介质，加盖后在 37℃±1℃ 下放置 72h（使用时间不超过 24 h），或置于压力蒸汽灭菌器中，在 121℃±1℃ 加热 1 h（使用时间超过 24 h），冷至室温作为浸提液。</p> <p>取同体积浸提介质置于玻璃容器中，同法制备空白对照液。</p>	体内导管或体外输注管路产品。
2	<p>样品中加浸提介质至公称容量，在 37℃±1℃ 下恒温 72 h（使用时间不超过 24 h），或 70℃±1℃ 条件下浸提 24 h（使用时间超过 24 h）。将样品与液体分离，冷至室温，作为浸提液。</p> <p>取同体积浸提介质置于玻璃容器中，同法制备空白对照液。</p>	容器类产品。
3	<p>取样品，按样品适当重量如 0.1g 或 0.2g^a 加 1mL 的比例加浸提介质，在 37℃±1℃ 下恒温 72 h（使用时间不超过 24 h），或置于压力蒸汽灭菌器中，在 121℃±1℃ 加热 1 h（使用时间超过 24 h）。将样品与液体分离，冷至室温，作为浸提液。</p> <p>取同体积浸提介质置于玻璃容器中，同法制备空白对照液。</p>	不规则产品。
4	<p>取样品，按样品重量（g）或表面积（cm²）加除去吸液量以外适当比例的浸提介质，37℃±1℃ 条件下，浸提 72 h，将样品与液体分离，冷至室温，作为浸提液。</p> <p>取同体积浸提介质置于玻璃容器中，同法制备空白对照液。</p>	吸水性材料的产品。
<p>注 1：温度的选择宜考虑临床使用可能经受的最高温度，若为聚合物，温度应选择在玻璃化温度以下。</p> <p>注 2：当选择细胞培养基为浸提介质时，浸提条件为 37℃±1℃ 下恒温 24 h。</p>		
<p>^a0.1 g/mL 比例适用于不规则形状低密度孔状的固体产品；0.2 g/mL 比例适用于不规则形状的固体产品。</p>		

5 热原试验

5.1 目的

本试验系将产品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

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 °C 干烤至少 2 h, 或 250 °C 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 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 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 3 °C, 实验室温度应为 17 °C~25 °C。

在试验全过程中, 室温变化不大于 3 °C, 防止动物骚动并避免噪音干扰。

5.4.4 试验用家兔

按中国药典四部附录《热原检查法》中规定挑选试验用兔。

5.5 试验方法

5.5.1 供试液制备

按第 4 章规定选择适宜的浸提条件。

5.5.2 试验步骤

按中国药典四部附录《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四部附录《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

本试验系将产品浸提液注入小鼠静脉和腹腔内, 在规定时间内观察小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

氯化钠注射液、新鲜精制植物油。

6.3 主要设备和器具

压力蒸汽灭菌器、电子天平、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°C 30min。

6.4.2 试验动物准备

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

6.4.2.2 每种浸提液用小鼠 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 18g~

19g 的小鼠 10 只。

6.5 试验方法

6.5.1 供试液制备

按第 4 章规定选择适宜的浸提条件。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 24 h、48 h 和 72 h 时称量动物体重。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
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
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，或 3 只或 3 只以上出现体重下降超过 10%，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重普遍下降，则另取小鼠 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 与血液相互作用试验

7.1 通则

根据产品预期临床用途并按照 GB/T16886.4 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。

下列试验从溶血、血栓形成、凝血、血小板、血液学和补体系统 6 个方面对与血液接触器械进行血液相互作用评价。

7.2 溶血试验

7.2.1 目的

本试验系将产品与血液直接或间接接触,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产品。

7.2.2 试剂

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。

7.2.3 主要设备

电热恒温水浴、分光光度计、离心机。

7.2.4 供试品制备

7.2.4.1 间接接触法

按第 4 章规定选择适宜的浸提条件。

7.2.4.2 直接接触法

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

7.2.5 新鲜稀释抗凝兔血制备

根据试验用量由健康家兔心脏采血。取新鲜枸橼酸钠(0.109 mol/L/3.2%)抗凝兔血 8 mL,加氯化钠注射液 10 mL 稀释。

7.2.6 试验方法

供试品组每管加入供试品 5 g,或是按第 4 章规定制备氯化钠注射液的浸提液 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)℃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)℃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。

7.2.7 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:

$$HR = \frac{A - B}{C - B} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

HR —— 供试品溶血率, %;

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。

7.2.8 结果判定

根据产品预期临床用途和产品材料特性确定适宜的合格判定指标。

注:按本试验检验产品时,合格判定指标一般规定为溶血率小于 5%。

7.2.9 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。

7.3 体内静脉血栓形成试验

7.3.1 目的

本试验系将产品植入动物静脉内，以评价供试品在试验条件下血栓形成的潜在性。

7.3.2 试剂

硫喷妥钠或其他麻醉剂、氯化钠注射液、75%乙醇溶液、肝素。

7.3.3 主要设备和器具

压力蒸汽灭菌器、静脉切开手术包。

7.3.4 试验前准备

7.3.4.1 供试品和手术器械采用适宜方法灭菌。

7.3.4.2 试验动物采用成年健康犬或羊至少 2 只。

7.3.5 供试品和对照品制备

供试品和阴性对照样切成约 15cm 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。

7.3.6 试验步骤和结果判定

按照 YY/T 1770.1-2021 进行。

7.3.7 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) 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。

7.4 凝血试验

7.4.1 目的

本试验系将产品与人或动物静脉血液或血浆接触，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。

7.4.2 主要设备和器具

水浴摇床、恒温培养箱、离心机、凝血分析仪和/或酶标仪（根据试验项目选择）、枸橼酸钠抗凝的血液采集管、带盖试管（聚乙烯或聚丙烯材质）等。

7.4.3 试剂

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

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

7.4.4 供试品和对照品制备

阳性对照品可采用天然橡胶或其他适宜材料。阴性对照选择高密度聚乙烯或其它适宜材料，对对照样

品（可选择）与试验产品同类型的上市产品。试验中所用血浆或全血作为空白对照。

7.4.5 试验步骤和结果判定

按照 YY/T XXXX 进行。

7.4.6 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。

7.5 医疗器械与血小板相互作用试验

7.5.1 目的

本试验通过测定与产品与血小板相互作用，以评价供试品对血小板功能的潜在影响。

7.5.2 试剂

新鲜枸橼酸钠抗凝人体全血或新鲜抗凝兔血。

7.5.3 主要设备和器具

血液分析仪、离心机、聚丙烯试管。

7.5.4 试验步骤和结果判定

按照 YY/T 1649.1-2019 和 1649.2-2019 进行。

7.5.6 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) 试验方法；
- d) 各组血小板数或血小板激活产物；
- e) 结果分析与判定。

7.6 血液学试验

7.6.1 目的

本试验系将产品与人或动物血清接触，测定接触产品后血液中的白细胞和红细胞计数值，以判定供试品对血液学的影响程度。

7.6.2 试剂

新鲜枸橼酸钠抗凝人体全血或新鲜抗凝兔血。

7.6.3 主要设备

血液分析仪、带摇床的水浴箱

7.6.4 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 cm²: 0.5mL 或 0.1g: 0.5mL），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 0.5mL，亦可根据试验需要加大血清体积。

7.6.5 对照组设置

阳性对照品可采用黑橡胶、玻璃珠或其他适宜材料。阴性对照选择高密度聚乙烯或其它适宜材料，对照

样品（可选择）与试验产品同类型的上市产品。试验中所用全血作为空白对照。

7.6.6 试验步骤

7.6.6.1 制备试验样品、阳性对照、阴性材料、已上市对照样品（如选择）和空白对照，各平行 3 份。所有材料置于试管中，剪成小块保证最大程度的全血接触，每管中加入适量全血。

7.6.6.2 样品与全血在 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ 水浴中，60r/min 振荡 (1 ± 0.1) h。

7.6.6.3 孵育 1h 后，试管立即置于冰浴中，并立即转移全血至预先冰浴的新的聚丙烯试管中。

7.6.6.4 血细胞分析仪读取白细胞和红细胞值。

7.6.6.5 每管全血测定 2 次。

7.6.7 结果计算和评价

7.6.7.1 计算每管全血重复测定的平均值，报告为 1 个白细胞和红细胞值，且 2 次测定结果的变异系数必须 $\leq 15\%$ 。

7.6.7.1.2 使用人血时，空白对照的白细胞应在 $(4.0 \sim 10.0) \times 10^9/\text{L}$ ，红细胞应在 $(3.5 \sim 5.5) \times 10^{12}/\text{L}$ 范围内。

7.6.7.3 计算每组全血（试验样品、阴性对照、阳性对照、空白对照、已上市对照样品（如选择））的 3 个白细胞和红细胞值的平均值和标准差。每组 3 管全血的白细胞和红细胞值必须在这个平均值的 $\pm 20\%$ 范围内，如果超出 20%，则重新进行试验。

7.6.7.4 按下式计算试验样品、阳性对照、阴性对照、已上市对照样品（如选择）与空白对照的百分比：

$$C(\%) = \frac{A}{B} \times 100\%$$

式中：

A=试验样品、阳性对照、阴性对照或已上市对照样品（如选择）白细胞和红细胞平均值，

B=空白对照白细胞和红细胞平均值，

C=试验样品、阳性对照、阴性对照或已上市对照样品（如选择）白细胞和红细胞平均值与空白对照相比的百分比（%）。

7.6.7.5 阳性对照组的白细胞和红细胞计数值应低于阴性对照或阴性参照材料，且差异具有统计学意义（ $p < 0.05$ ）。

7.6.7.6 试验样品与阴性对照相比的百分比应 $> 80\%$ ，如试验样品与阴性对照相比的百分比 $< 80\%$ ，则与上市对照器械之间的比较有助于判定试验器械/材料是否可能被临床接受或不接受。

7.6.7.7 在用百分比进行结果判断的基础上，可同时考虑采用统计学分析进行评价，试验样品与阴性对照或阴性参照材料采用方差分析方法进行统计学分析，如果 p 值 < 0.05 则认为差异具有统计学意义。如果试验样品与阴性对照或阴性参照材料之间无统计学差异，则认为试验样品通过测试。如果试验样品的结果与阴性对照或阴性参照材料相比降低，且具有统计学差异，则试验样品与上市对照器械之间的比较有助于判定试验器械/材料是否可能被临床接受或不接受。

7.6.8 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) 各管白细胞和红细胞计数值；
- e) 各组白细胞和红细胞计数值；
- f) 各组平均值与空白对照相比的百分比（%）；
- g) 结果分析和评价。

7.7 补体激活试验

7.7.1 目的

本试验系将产品与标准人血清接触，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。

7.7.2 试剂

标准人血清（NHS）、眼镜蛇毒因子（CVF）、酶免疫测定试剂盒。

7.7.3 主要设备

电热恒温水浴箱、酶标仪。

7.7.4 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 cm²: 0.5mL 或 0.1g: 0.5mL），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 0.5mL，亦可根据试验需要加大血清体积。

7.7.5 对照品设置

7.7.5.1 阴性对照（例如：高密度聚乙烯（HDPE））

7.7.5.2 阳性对照（例如：眼睛蛇毒因子）

7.7.5.3 空白对照（未接触材料的血清）

7.7.5.4 已上市对照样品（已合法上市的同类医疗器械），供选择

7.7.6 试验步骤和结果判定

按照 YY/T 0878.3-2019 进行。

7.7.7 试验报告

试验报告中宜给出下列信息：

- h) 供试品名称；
- i) 生产批号；
- j) 试验方法；
- k) 各组吸光度；
- l) 各组 C3a 浓度；
- m) 供试品 C3a 浓度值和（或）百分数；
- n) 结果分析和评价。

8 细胞毒性试验

8.1 目的

本试验系将产品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

胰蛋白酶溶液、MEM 培养基、胎（小）牛血清、四唑盐（MTT）、二甲基亚砷（DMSO）。

8.3 主要设备和用具

超净工作台、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、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 °C，30 min，或置电热干燥箱内 160 °C，2 h。

8.4.2 MTT 溶液制备

MTT新鲜溶于不含酚红的MEM中，浓度为1 mg/mL。溶液采用注射过滤器（孔径≤0.22μm）经无菌过滤法除菌。溶液宜当天使用。

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 48h~72h 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。

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 供试液制备方法按第 4 章的规定。

8.5.5 细胞悬液制备

将已培养 48h~72h 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：

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

式中：

C —— 细胞密度，个/mL；

n —— 计数板四角四大格内细胞总数，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) MTT 比色法：

将配制好的 1×10^4 /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 100 μl，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 20 μl 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 150 μl 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，各组分别按式（3）计算相对增殖率：

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

式中：

RGR —— 相对增殖率，%；

A —— 供试品组（阴性、阳性组）吸光度；

A_0 ——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 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液接种于直径 35mm 培养皿内，每皿 2mL。置 CO_2 培养箱（含体积分数 5%二氧化碳气体） 37°C 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 2mL。每组平行操作 3 皿，置 CO_2 培养箱继续培养 72h。

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。其他类型产品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：按本试验检验产品时，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

本试验系采用产品浸提液与豚鼠皮肤接触，以评价供试品在试验条件下引发致敏反应的潜在性。

9.2 试剂

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/mL~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

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 1g/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

按第 4 章规定选择适宜的浸提条件。同条件制备浸提介质对照液。

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。

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；
- b) 试验部位观察记录；
- c) 结果判定。

10 皮内反应试验

10.1 目的

本试验系将产品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

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℃ 30min。

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

氯化钠注射液、新鲜精制植物油。

10.5.2 供试液制备

按第 4 章规定选择适宜的浸提条件。同条件制备浸提介质对照液。

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。

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) 试验部位观察记分；
 - e) 结果判定。
-