

谢活动、化学反应、光学作用、气体扩散等方式一直在进行,而这些因素又会直接影响血气标本的实验结果。贮存时间越长,离体血细胞的代谢活动和气体扩散等因素会直接影响标本的 pH 值、PaCO₂ 和 PaO₂,且检测前时间越长,影响就越大。所以血气标本采集后,应立即送检,一般小于或等于 30 min。如若不能立即测定,可先存贮在 4 ℃ 的冰箱,且存贮时间不宜超过 2 h,测定前应在室温状态下放置数分钟平衡室温,尽可能减少因温度引起的气体溶解度的差异来提高血气分析结果的准确性和可靠性,从而为临床提供准确的实验结果。

动脉血气分析往往作为危重症患者的监测指标,其准确性、及时性就显得非常重要。动脉血气标本的采集和送检不同于其他标本,在实验前的影响因素非常多,做好血气分析实验前的质量控制,严格把关做好标本测定前的各个环节,为实验结果的准确提供保证,以便更好地指导医师对患者病情的监护。

• 检验科与实验室管理 •

医疗器械体外细胞毒性试验相关标准的比较及有关内容的商榷

于 婷,曲守方,黄 杰,孙 楠,黄清泉[△]

(中国食品药品检定研究院医疗器械检定所,北京 100050)

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.06.069

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2015)06-0858-03

八十年代末,国际标准化组织成立了 TC194 医疗器械生物学评价技术委员会,研究制定“生物材料和医疗器械生物学评价标准”,相继推出了 ISO 10993 系列标准。

中国是从 70 年代后期开始研究生物材料和医疗器械的生物学评价,1983 年由以中国药品生物制品检定所为主的研究单位对生物材料生物学评价试验项目选择(短期)和试验方法进行了研究。1987 年卫生部根据研究结论,正式发布 WS5-1-87 标准,为国内开展生物材料和医疗器械的生物学评价提供了依据。1997 年卫生部以卫药发(1997)第 81 号文,发布《生物材料和医疗器械生物学评价技术要求》。为使中国医疗器械生物学评价与国际接轨,1997 年国家技术监督局将 ISO 10993 部分转化为国家标准,发布了 GB/T 16886-1997 医疗器械生物学评价标准,GB/T 16886 现已成为国内评价医疗器械生物安全性的最重要标准之一。然而,由于中国的医疗器械一直是分专业归口管理,因此除 GB/T 16886 外,还有按专业制定的生物学评价标准,如:医用输液输血注射器具类、医用有机硅材料类以及口腔医疗器械类等标准。

体外细胞毒性试验是医疗器械生物学评价体系中最常用的检测指标之一,它是一类在离体状态下模拟生物生长环境,检测医疗器械和材料接触机体组织后生物学反应的体外试验。ISO 10993-5 为细胞毒性试验(体外),相应的 GB/T 16886.5 为体外细胞毒性试验。上述各专业标准中也均有体外细胞毒性试验。因此,如何理解和评价 GB/T 16886 与各专业标准的异同,又如何正确实施这些标准,是医疗器械生物学评价与检验人员和医疗器械制造商所共同关注的问题。下面笔者将就这些问题进行一一论述,并展开讨论。

1 体外细胞毒性试验相关标准的发布与制修订时间

国内医疗器械生物学评价标准中,关于体外细胞毒性试验

参考文献

- [1] 叶文仙,徐贵全.动脉血气分析结果的影响因素[J].中国医药导报,2010,4(7):200-201.
- [2] 丛玉隆.临床实验室分析前质量管理及对策[J].中华检验医学杂志,2004,27(8):487.
- [3] 侯振江,张静.血气分析标本采集与质量控制[J].中国误诊学杂志,2011,34(11):8529-8530.
- [4] 王璇,申丽红,陈永德.动脉血气分析的质量控制[J].国际检验医学杂志,2012,33(13):1639-1641.
- [5] 李惠兰.血气分析标本质量的影响因素[J].中国当代医药,2011,7(18):95-99.

(收稿日期:2014-10-17)

相关标准主要有以下几个。(1)GB/T16886.5-1997《医疗器械生物学评价 第 5 部分:体外细胞毒性试验》由 ISO 10993-5 标准转化而成,目前已为 GB/T 16886.5-2003^[1]代替;(2)GB/T 16175-1996《医用有机硅材料生物学评价试验方法》,目前已为 GB/T 16175-2008^[2]代替;(3)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》,目前已为 GB/T 14233.2-2005^[3]代替;(4)YY/T 0127.9-2001《口腔材料生物学评价第 2 单元,口腔材料生物试验方法 细胞毒性试验:琼脂覆盖法及分子滤过法》,目前已为 YY/T 0127.9-2009《口腔医疗器械生物学评价第 2 单元:试验方法细胞毒性试验:琼脂扩散法及滤膜扩散法》^[4]代替。这些标准的发布与实施标志着国内医疗器械领域的体外细胞毒性试验已经普遍开展,并具有相当水平。

2 各标准的修订分析及异同

GB/T 16886.5-1997 是由国家药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心起草,归口于全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会。2003 版经技术修订取代 1997 版,其主要修订内容除了试验方法中有一些细微改动,如增加近汇合的名词解释、浸提温度增加了“±2 ℃”、对浸提预处理情况不再详细描述,只要求在报告中体现具体操作过程、细胞系的储存条件等之外,提出样品制备按 GB/T 16886.12-2000《医疗器械生物学评价 第 12 部分:样品制备与参照材料》(idt ISO 10993-12:1996),并且明确各试验的用途,如浸提液试验用于细胞毒性定性和定量评价;直接接触试验用于细胞毒性定性和定量评价;间接接触试验用于细胞毒性定性评价。该标准中,将细胞毒性反应分级分为 0~3 级,即无、轻微、中度和重度。

GB/T 16175-1996 是由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和上海生物材料研究测试中心起草,

[△] 通讯作者,E-mail:qqwho686@126.com。

归口于全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会。2008 版标准给出的试验方法也是在 GB/T 16886《医疗器械生物学评价 第 5 部分:体外细胞毒性试验》标准中相应试验方法学原理和试验步骤的基础上,并根据医用有机硅材料的特性制定而成,因此该标准是与 GB/T 16886 标准方法具有方法学等同性、仅适用于医用有机硅材料生物学评价的方法标准。2008 版对 GB/T 16886 标准中细胞毒性评价未给出详细试验步骤的试验项目进行了细化,主要差异是修改了浸提液和直接接触试验,并且提出也可采用其他等效的符合 GB/T 16886.5 要求的细胞毒性试验,即不局限于此标准中提出的方法,相当于一种开放性标准。此外,2008 版中亦不再详细描述材料浸提液的制备过程等,指出参照 GB/T 16886.5 的规定。2008 版对细胞毒性反应分级进行了调整,由 0~5 级更改为 0~4 级,增加对试验中细胞毒性反应的描述及程度的划分(由无至重度)。

GB/T 14233.2-1993 是由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和天津医用生物材料监测研究中心起草,归口于全国医用输液器具标准化技术委员会。目前为 2005 版。在 2005 版中特别指出,其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,因此该部分是 GB/T 16886 方法具有方法学等同性,仅适用于医用输液、输血、注射器具生物学性能检验的方法标准。并且该次修订对 GB/T 16886.5 细胞毒性试验中未给出详细试验步骤的试验项目进行了细化。此外,2005 版中不再详细描述供试液的灭菌或消毒过程、细胞悬液的具体制备过程,仅做一般描述,并且其细胞形态描述与 1993 版亦有差别。

YY/T 0217.9-2001 是由国家食品药品监督管理局北大医疗器械质量监督检验中心起草,归口于全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会(SAC/TC 99),于 2001 年首次发布,2008 年第一次修订,2009 版标准的技术内容基本等同采用 ISO 7405:2008《牙科-牙科医疗器械生物学评价》中的第 6.2 条琼脂扩散试验和第 6.3 条滤膜扩散试验。本标准与 2001 版相比,主要变化如下:标准名称改为《口腔医疗器械生物学评价第 2 单元:试验方法细胞毒性试验:琼脂扩散法及滤膜扩散法》;对标准编辑格式进行了改变;对琼脂扩散法中细胞反应的描述做了改变,褪色指数和溶解指数分别分级评价;在滤膜扩散试验中取消了一种琥珀酸脱氢酶染色液配制方法。

3 各标准的异同介绍

上述 3 个分专业的现行标准,均以 GB/T 16886 为基础,并根据各具体专业特性修订而成,因此与 GB/T 16886 方法具有方法等同性,并且对 GB/T 16886.5 中未给出详细试验步骤的试验项目进行了细化,更具有可操作性。

这 4 个标准的主要区别点在于应用范围、试验方法和细胞毒性判定及分级。GB/T 16886 是由 ISO 10993 转化过来的标准,是中国评价医疗器械生物安全性的最重要标准之一,标准项目需要面对所有医疗器械,因此内容较全面而广泛。其他分专业标准的修订均以此为基础,既不脱离 GB/T 16886 的原则,又各有特色。具体分析如下:(1)GB/T 16886-2003 面对的对象是所有医疗器械的浸提液,和/或与之接触的供试品,而分专业标准所针对的对象,则是通过标题也能明确本标准包含的材料范围,如医用有机硅材料、医用输液、输血、注射器具、口腔材

料等。(2)根据检测对象的不同,采用的试验方法也就相应的有所不同。GB/T 16886-2003 标准中提供了很多方法的可能性,未限定用何种方法,但同时也指出,根据试验材料特性选择下列试验中的一种或多种适宜方法进行评价。包含浸提液试验、直接接触试验、间接接触试验(含琼脂扩散试验和滤膜扩散试验),最终细胞毒性的检测和评价可采用定性或定量方法进行,可用客观的方法对细胞数量、蛋白总量、酶的释放、活体染料的释放和还原或其他可测定参数进行定量测试。而各分专业标准中的试验方法,则针对该专业器械特点,选用适合方法,不再大而全,而是提供了具体的评价方法。比如医用有机硅材料的体外细胞毒性试验,是将试验样品接触培养细胞,通过对细胞形态、增殖和抑制影响的观察,评价试验材料对体外细胞的毒性作用,根据产品特征,不进行间接接触试验。而医用输液、输血、注射器具标准中则只对浸提液进行检测,不做直接或间接接触试验;在口腔医疗器械标准中则只对通过琼脂或琼脂糖扩散后或通过醋酸纤维素滤膜扩散后的非特异性细胞毒性进行检测。(3)在细胞毒性的分级上,GB/T 16886-2003 与 YY/T 0217.9-2009 分为 0~3 级,而 GB/T 16175-2008 和 GB/T 14233.2-2005 按细胞相对增殖度(RGR)分为 0~4 级,按细胞形态分别为 5 级。(4)此外,在其他方面,4 个标准亦有异同点:比如对阴性、阳性对照均未强制规定,样品制备方法也未做具体描述,统一按照 GB/T 16886-2003 进行制备;对于细胞系,GB/T 16886 建议是优先采用已建立的细胞系并应从认可的贮源获取推荐的细胞系,在需要特殊敏感性时,只能使用直接由活体组织获取的原代细胞、细胞系和器官型培养物,但需证明其反应的重现性和准确性。而另外 3 个标准首选 ATCC CCL1[NCTC clone 929(小鼠成纤维细胞)],其次是 ATCC CCL2(Hela)(人上皮细胞系)等或其他适宜细胞;在培养基方面,GB/T 16886 和 YY/T 0217.9-2009 对培养基的条件进行了描述,但未强制规定何种培养基,而 GB/T 16175-2008 和 GB/T 14233.2-2005 是首选 RPMI 1640,其次是或其他经确认适宜的方法制备的培养基;在细胞悬浮液方面,GB/T 16886 仅进行常规描述,而其他三个标准均给出了明确的细胞浓度,只不过 GB/T 16175-2008 与 GB/T 14233.2-2005 要求配成 1×10^4 /mL 细胞悬液,而 YY/T 0217.9-2009 中要求配成 2.5×10^5 /mL 细胞悬液。除 GB/T 14233.2-2005 中对细胞悬液的制备方法进行了详细描述外,其他 3 个标准都只是一笔带过。

4 体外细胞毒性标准具体实施时遇到的问题及体会

在实际工作中,感觉在标准实施时,业内人士对标准存在不同的理解,而不同的理解使得在选择不同的试验方案,可能导致截然不同的结果,这将为医疗器械的安全使用埋下隐患。因此在对上述标准进行分析比较的同时,对标准实施中存在的一些问题与同行进行切磋。

4.1 方法的选择 由于材料的多样性,置入机体环境中的变异性,材料与机体作用的复杂性等因素,因此根据试验材料本身理化特征及其用途,选择哪种方法进行体外细胞毒性评价,不同的试验人员可能有不同的选择。通常会碰到这样的情况:采用不同标准或同一标准不同方法,可能得到的结果不一致。朱碧君等^[5]在《一次性使用无菌注射器细胞毒性检测》一文中提到,抽取 37 家生产企业的不同规格的一次性使用无菌注射器样品,分别参照 GB/T 14233.2-2005 和 ISO 10993-5-2009 进行细胞毒性试验。结果显示,细胞毒性反应级别有较大的不

同。再比如,采用浸提液试验检测某医疗器械体外细胞毒性试验时,结果不合格,怎么办?可改做直接接触试验或者琼脂扩散试验等。哪个方法结果合格,就用哪种方法。这样做合理不合理?看似不合理,然而根据标准,这种做法也是无可非议的,因为各标准本来就未强制规定必须采用哪种方法,各方法在同等条件下都有效,都可采用。这是日常检验工作中可能会遇到的情况。

要解决这个问题,笔者认为,首先应重点宣贯 GB/T16886《医疗器械生物学评价第 1 部分:试验选择指南》和各分专业标准,理解其应用范围和原则。当一个评价项目具有多个试验方法时,应考虑试验的原理、灵敏性、可选性、可定量性、重现性、试验材料的适用性及其局限等因素以进行选择。例如,浸提液法适合检测溶出物的毒性;直接接触法对材料的细胞毒性敏感性最高,可测出材料微弱的细胞毒性;间接接触法中的琼脂扩散试验适合于毒性大的大批量材料筛选,滤膜扩散试验适合于小分子量毒性材料的评价。再比如,医用纱布等做琼脂覆盖较好,体内循环做浸提液法中的 MTT 法较好。以上各种方法因其原理及方法不同,各有其特点,应根据试验材料本身理化性质、毒性作用强弱及其用途正确的选择试验方法。但同时也要清楚地认识到,针对不同产品、各种情况下如何确定评价项目,将是一个不断研究和逐步深入认识的过程。

4.2 试验样品的制备 医疗器械种类繁多,形状各异、并且大多数医疗器械不能在溶剂中溶解,因此试验样品的选择和制备的标准化具有很大难度,宜遵守以下选择原则:首先最好直接用医疗器械作为试验样品,其次可选择医疗器械成品中有代表性部分或者相同配方材料的有代表性样品进行试验。以上都不行的时候,可采用以上样品制备浸提液进行试验。在采用医疗器械成品或有代表性部分作试验样品时,如果器械是由不同材料组成,还应考虑到不同材料的相互作用和综合作用。但应认识到用浸提液作为试验样品所得结果是有一定局限性的。多数情况下,新材料中所含的毒性物质是未知的,其溶出性和稳定性也多为未知。因此,理论上不存在适用于所有材料的高效率的浸提条件。在制备医疗器械浸提液时,所用浸提介质和浸提条件应最好与最终产品的性能和临床使用情况相适应,并与试验方法的可预见性(如试验原理、敏感性等)相适应。

但是在具体试验实施过程中,可选的浸提介质、浸提条件有多种,那么浸提液浓度多大适宜?通过选择较高稀释比例得到的合格结果,这样的结果可信程度有多大?此外,浸提液的 pH 和渗透压、抗生素的使用、血清与细胞培养基、浸提液间的反应等等,这些都是需要注意的试验细节问题,必须通过合理反复的试验和大量的数据来论证。

4.3 细胞毒性与安全的关系 是不是无体外细胞毒性的医疗器械一定安全,而有则不安全,不能应用于临床呢?仅在标准 YY/T 0217.9 中提到,在对从细胞毒性试验得到的数据进行解释时必须考虑到本试验系统的局限性;即一个具有细胞毒性的材料,并非不可使用,但考虑材料的具体应用时应对数据进行解释。

早在十多年前,在一些注册检验工作中,出现过这样的情况:有些医疗器械本身是有细胞毒性的,但当时一般要求细胞毒性这一项应为无细胞毒性,为了通过审评拿到注册证,通常会在试验方法的选择上、供试液的浸提比例或供试液的浓度方面做一些选择和变化。现在,对于有细胞毒性的一些医疗器械产品,大家的观念都在逐渐转变,不论是企业、检测机构,还是审评机构,不再认为只有无细胞毒性的医疗器械才是安全的,比如消毒水,宫内节育器,含纳米银的医疗器械,这些产品都是有细胞毒性的,不再认为这些有细胞毒性就是不安全的。但必须注意的是,要控制其细胞毒性的大小,要让其收益大于风险。因此,笔者认为仅根据医疗器械的细胞毒性反应判定产品能否用于临床是不适宜的,对医疗器械细胞毒性可接受水平的判定应该建立在风险与收益评价的基础之上。

4.4 细胞毒性评定分级 这 4 个标准中,2 个标准是分 4 级,从无到重度,2 个标准是分 0~4 级(共 5 级),从无到重度,中间加了“极轻(微)”。并且这 4 个标准在对相同或相似的细胞毒性判定方面,也存在着一些细微的不同,出现“轻微、轻度、极轻微、极轻”等类似词语。同为体外细胞毒性试验标准,细胞毒性分级程度和级数是否应保持一致,此级与彼级说法不一致也易产生混淆,同为中度、中度是否等同等等?笔者认为,GB/T 16886 由 ISO 10993 转化而来,其他 3 个标准的制修订又以 GB/T 16886 为基本原则,是否可以将分级与 GB/T 16886 保持一致。

体外细胞毒性试验是医疗器械产品注册必须进行的安全性评价项目之一,也是很多药物或化学品进行毒性及疗效筛选的常用手段,在保障医疗器械产品安全性和有效性方面最大限度地发挥了作用。然而在标准的执行过程中,出现了上述需要值得商榷的一些问题,这些问题有待各级医疗器械检验人员及专家学者们的共同努力,为真正实现患者的用械安全做出贡献。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T16886. 5-2003 医疗器械生物学评价 第 5 部分:体外细胞毒性试验[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [2] 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. GB/T 16175-2008 医用有机硅材料生物学评价试验方法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [3] 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. 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[S]. 北京:中国标准出版社,2005.
- [4] 国家食品药品监督管理局. YY/T 0127. 9-2009 口腔医疗器械生物学评价 第 2 单元:试验方法细胞毒性试验:琼脂扩散法及滤膜扩散法[S]. 北京:中国医药科技出版社,2009.
- [5] 朱碧君,袁兴东,罗丹,等. 一次性使用无菌注射器细胞毒性检测[J]. 科技广场,2012,133 (12):251-253.

(收稿日期:2014-12-01)