ICS 11.060.10
C33

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0127.9—2009
代替 YY/T 0127.9－2001

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

Biological evaluation of medical devices used in dentistry
Part 2: Test method
Cytotoxicity tests: Agar diffusion test and filter diffusion test

2009-12-30 发布　　2011-06-01 实施

国家食品药品监督管理局　发布

中国医药科技出版社 防伪标识

前　言

本标准是口腔医疗器械生物学评价系列标准中的一项标准。

口腔医疗器械生物学评价系列标准中的第一单元，YY/T 0268:2008《牙科学　口腔医疗器械生物学评价　第1单元:评价与试验》是口腔医疗器械生物学评价与试验项目的选择，为指南性标准。

该系列标准的第二单元是口腔医疗器械具体生物试验方法。共分为如下几部分：

1. YY/T 0127.1—93　口腔材料生物试验方法　溶血试验

2. YY/T 0127.2—2009　口腔医疗器械生物学评价　第2单元：试验方法　急性全身毒性试验：静脉途径

3. YY/T 0127.3—1998　口腔材料生物学评价　第2单元:口腔材料生物试验方法　根管内应用试验

4. YY/T 0127.4—2009　口腔医疗器械生物学评价　第2单元:试验方法　骨埋植试验

5. YY/T 0127.5—1999　口腔材料生物学评价　第2单元:口腔材料生物试验方法　吸入毒性试验

6. YY/T 0127.6—1998　口腔材料生物学评价　第2单元:口腔材料生物试验方法　显性致死试验

7. YY/T 0127.7—2001　口腔材料生物学评价　第2单元:口腔材料生物试验方法　牙髓牙本质应用试验

8. YY/T 0127.8—2001　口腔材料生物学评价　第2单元:口腔材料生物试验方法　皮下植入试验

9. 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

10. YY/T 0127.10—2009　口腔医疗器械生物学评价　第2单元：试验方法　鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames试验)

11. YY/T 0127.11—2001　牙科学　用于口腔的医疗器械生物相容性临床前评价　第2单元:口腔材料生物试验方法　盖髓试验

12. YY/T 0127.12—2008　牙科学　口腔医疗器械生物学评价　第2单元:试验方法　微核试验

13. YY/T 0127.13—2009　口腔医疗器械生物学评价　第2单元:试验方法　口腔黏膜刺激试验

14. YY/T 0244—1996　口腔材料生物试验方法　短期全身毒性试验:经口途径

15. YY/T 0127.14—2009　口腔医疗器械生物学评价　第2单元：试验方法　急性经口全身毒性试验

16. YY/T 0127.15—2009　口腔医疗器械生物学评价　第2单元:试验方法　亚急性和亚慢性全身毒性试验:经口途径

本标准为YY/T 0127系列标准的第9部分。

本标准是对YY/T 0217.9—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》的修订。

本版标准的技术内容基本等同采用ISO 7405:2008《牙科学－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。

本标准根据 ISO 7405:2008 重新起草。个别地方进行了少量编辑性修改,使之更具可操作性。修改之处在标准正文的右侧以竖线标出。并增加了资料性附录 A 和附录 B,以便于与 ISO 7405:2008 比较。

本标准与 YY/T 0217.9－2001 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”。

——标准编辑格式进行了改变。

——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。

本标准从实施之日起,同时废除并代替 YY/T 0217.9－2001《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》。

本标准由国家食品药品监督管理局提出。

本标准由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会(SAC/TC 99)归口。

本标准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负责起草。

本标准主要起草人:林红、郝鹏、李盛林、张研。

本标准于 2001 年首次发布。于 2008 年第一次修订。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——YY/T 0127.9－2001

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

1 范围

本标准规定了口腔医疗器械的细胞毒性试验方法:琼脂扩散法及滤膜扩散法。

本标准用于检测口腔医疗器械在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。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 16886.5 医疗器械生物学评价 第5部分:体外细胞毒性试验(GB/T 16886.5—2003,ISO 10993-5:1999,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—2005,ISO 10993-12:2002,IDT)

YY/T 0268—2008 牙科学 口腔医疗器械生物学评价 第1单元:评价与试验

3 琼脂扩散法

3.1 目的

本试验用于检测口腔医疗器械在通过琼脂或琼脂糖扩散后的非特异性细胞毒性。本试验不适用于不能通过琼脂或琼脂糖扩散的可沥滤物。

3.2 细胞系

选用已建立细胞系的成纤维细胞系或上皮细胞系[如来源自美国典型菌种保藏中心(ATCC)的细胞系,ATCC CCL1(NCTC clone 929)(小鼠成纤维细胞)或ATCC CCL2 (Hela)(人上皮细胞系)等]。应在记录中注明细胞系的编码。如适用,还应在记录中注明对选用的细胞系的描述和定义,以及选用合理性的论证。

3.3 培养基,试剂和设备

选用符合选定细胞系生长要求的培养基,过滤法灭菌。配制双倍浓度的细胞培养基(2×),过滤法灭菌。配制3%琼脂或琼脂糖,高压蒸汽灭菌。

临用前制备活体染色液,将1%水溶性中性红存贮液以1:100的比例用0.01 mol/L磷酸盐缓冲溶液[如Dulbecco's磷酸盐缓冲液]稀释。中性红溶液应避光保存。选用直径90mm～100mm的培养皿进行细胞培养。

3.4 试样制备

试样制备见YY/T 0268—2008第6条。根据GB/T 16886.5的规定,可选用材料浸提液和/或材料本身进行试验。

a) 固体材料：制成直径约 5mm 的圆形试样。一面光滑以保证与覆盖的琼脂紧密接触。

b) 固化类的材料：将刚调和的材料填入内径 5mm，高 2mm 的环形模具中。在记录中注明模具的材质。当测试新鲜调和状态的材料时，应在填入材料之前将环形模具置于琼脂层上。如测试不同固化时间的材料时，应使材料充填至与环形模具边缘平齐，并在温度 37°C±2°C，相对湿度 90%±10%的环境下固化直至试验开始。

c) 液体材料或材料浸提液：吸取 0.01 mL 液体于直径为 5 mm 的圆形超细硼硅玻璃纤维滤纸或其他载体上，置于琼脂上。

注 1：合适的惰性模具材料可以是玻璃或聚四氟乙烯(PTFE)。

注 2：适用的滤纸可从预滤器制备。

3.5 对照样本

使用阳性对照，阴性对照和参照材料(见 GB/T 16886.12)。

3.6 试验步骤

培养细胞直至达到其对数生长期末。用生长培养基配制成 2.5×10^5 细胞/mL 细胞悬液，吸取适量细胞悬液于足够数量的培养皿中，每个培养皿加入 10 mL 细胞悬液。在 37℃±2℃含 5%(体积分数) CO_2 饱和水蒸气环境下孵育 24 h。如使用了不同的培养条件，应进行论证。

将已灭菌的琼脂或琼脂糖在水浴中加热至 100℃，然后冷却至 48℃。将 1 份琼脂或琼脂糖与 1 份新配制的预热至 48℃的 2×生长培养基混合，使琼脂培养基的最终浓度为 1×生长培养基。吸出每一培养皿中的生长培养基，加 10 mL 新制备的保持在 48℃的琼脂或琼脂糖培养基。

待琼脂或琼脂糖培养基在室温下凝固(约 30 min)后，加入 10 mL 中性红活体染色液并在暗处保存 15 min～20 min(有中性红时，培养基应避光保存，否则将损害细胞)。吸除多余的中性红溶液。

若适用，每个培养皿中放置适量的试样和对照材料。每个样本间尽量保持合适的距离(>20mm)。将培养皿于 37℃±2℃含 5%(体积分数)CO_2 的饱和水蒸气环境下孵育 24 h。每一试验材料至少应检查四个平行样(即：每一试验材料至少检查两个培养皿)。通常在每一培养皿中至少放置两个试样。若使用了浸提介质，还应放一个浸提介质对照。每个样本尽量彼此远离，并远离培养皿壁。

3.7 评价指标

用有显微标尺的倒置显微镜观察试验材料和对照材料的周围褪色区域，并按表 1 和表 2 指标计算每一试样的褪色指数和溶解指数。

表 1 褪色指数

褪色指数	描述
0	试样周围和试样下方未发现褪色
1	只在试样下方有褪色
2	褪色区边缘距试样边缘小于 0.5cm
3	褪色区边缘距试样边缘在 0.5cm～1.0cm 范围内
4	褪色区边缘距试样边缘大于 1.0cm
5	整个培养皿褪色

表 2 溶解指数

溶解指数	描述
0	未发现细胞溶解
1	小于褪色区面积 20%的细胞溶解
2	褪色区面积 20%～40%的细胞溶解
3	褪色区面积 40%～60%的细胞溶解
4	褪色区面积 60%～80%的细胞溶解
5	大于褪色区面积 80%的细胞溶解

计算每一试验材料的褪色指数和溶解指数的中值，若试样的四个平行样的指数值在0～3范围内相差2个单位，应重复试验，但指数为4或5，则不需重复试验。检测浸提液时，应从含试样的浸提介质的指数中值减去浸提介质的指数中值作为试样的指数。若作为对照的浸提介质的指数中值＞1，则应选用其他浸提介质重复试验。

注：阴性对照中细胞层完整，为有效的试验。

3.8 结果评价

在结果评价时，应考虑试验中收集的所有信息，尤其是试验与对照组间结果的任何差异。细胞反应是依据至少4个平行试验的褪色指数和溶解指数的中值。应分别根据两个指数按表3对细胞反应进行分级。

表3 细胞反应(褪色指数和溶解指数分别分级)及细胞毒性说明

分级	细胞反应	细胞毒性说明
0	0	无细胞毒性
1	1	轻度细胞毒性
2	2～3	中度细胞毒性
3	4～5	重度细胞毒性

检测报告中应包含结果评价。

注：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。

3.9 试验记录

试验记录中应包括全部操作的记录，所得全部结果以及结果评价所需的其他任何数据。也包括试验材料制备及使用方法的详细情况以及材料的批号(适用时)。

4 滤膜扩散试验

4.1 目的

本标准用于检测口腔医疗器械在通过醋酸纤维素滤膜扩散后的非特异性细胞毒性。

4.2 细胞系

选用已建立细胞系的成纤维细胞系或上皮细胞系[如来源自美国典型菌种保藏中心(ATCC)的细胞系，ATCC CCL1(NCTC clone 929)(小鼠成纤维细胞)或ATCC CCL2 (Hela)(人上皮细胞系)等]。应在记录中注明细胞系的编码。如适用，还应在记录中注明对选用的细胞系的描述和定义，以及选用合理性的论证。

4.3 培养基，试剂和设备

按3.3规定的方法制备培养基和琼脂或琼脂糖。制备琥珀酸脱氢酶染色液或非特异性水解酶染色液。

4.3.1 琥珀酸脱氢酶染色液的制备：

先制备琥珀酸脱氢酶存贮液：

a) 琥珀酸盐溶液：琥珀酸钠13.6g，pH 7.6的0.2 mol/L磷酸盐缓冲液100 mL；

b) 氯化硝基四氮唑蓝溶液：氯化硝基四氮唑蓝100 mg，pH 7.6的0.2 mol/L磷酸盐缓冲液100 mL；

c) 吩嗪硫酸甲酯溶液：吩嗪硫酸甲酯4mg，新配制的蒸馏水10 mL。

取 1mL 琥珀酸盐溶液，9 mL 氯化硝基四氮唑蓝溶液及 1 mL 吩嗪硫酸甲酯溶液混合制备成琥珀酸脱氢酶染色液。

4.3.2 非特异性水解酶染色液的制备：

用非特异性水解酶染色时，制备荧光素二乙酸酯存贮液，即在 1 mL 丙酮液中加入 5 mg 荧光素二乙酸酯。使用时取 20μL 存贮液加入到 100 mL 磷酸盐缓冲液（如 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液）中。

使用标称内径 60mm 的培养皿进行细胞培养。

使用直径 47mm，孔径 0.45μm 的醋酸纤维素和硝酸纤维素混合滤膜。

4.4 试样制备

试样制备见 YY/T 0268－2008 第 6 条。根据 GB/T 16886.5 的规定，可选用材料浸提液和/或材料本身进行试验。

a) 固体材料：制成直径约 5mm 的圆形试样。一面光滑以保证与滤膜紧密接触。试样的重量不超过 3.5g。

b) 固化类的材料：将刚调和的材料填入内径 5mm，高 2mm 的环形模具中。当测试新鲜调和状态的材料时，应在填入材料之前将环形模具置于滤膜上。如测试不同固化时间的材料时，应使材料充填至与环形模具边缘平齐，并在温度（37±2）℃，相对湿度（90±10）%的环境下固化直至试验开始。试样的重量不超过 3.5g。

c) 液体材料或材料浸提液：吸取 0.01 mL 液体于直径为 5 mm 的圆形超细硼硅玻璃纤维滤纸或其他载体上，置于滤膜上。

注 1：合适的惰性模具材料可以是玻璃或聚四氟乙烯（PTFE）。

注 2：适用的滤纸可从预滤器制备。

4.5 对照样本

使用阳性对照，阴性对照和参照材料（见 GB/T 16886.12）。

4.6 试验步骤

培养细胞直至达到其对数生长期末。用生长培养基配制成 2.5×10^5 细胞/mL 细胞悬液。

在足够数量的培养皿底部放置灭菌的醋酸纤维素滤膜。吸取细胞悬液，于每一培养皿中放置6mL。另取一皿，加不含细胞的培养液 6 mL 作为空白对照。在 37℃±2℃含 5%（体积分数）CO_2 饱和水蒸气培养箱中培养 24 h。如使用了不同的培养条件，应进行论证。

吸取保存在 48℃的新制备的琼脂或琼脂糖培养基（见 3.6）5 mL 于足够数量的新的空培养皿中，并在室温下使其凝固。

从经过 24 h 培养含醋酸纤维素滤膜的平皿中吸除多余的生长培养液。用 37℃±2℃的磷酸盐缓冲液（如 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液）清洗滤膜，取出滤膜，放于琼脂或琼脂糖培养基表面，细胞面朝下。

在每一平皿的滤膜上放 3～5 个试样。在含 5%（体积分数）CO_2 饱和水蒸气培养箱中于 37℃±2℃继续孵育培养 2h 和 24h。应保证试样与滤膜表面紧密接触。在培养 2h 和 24h 后评价细胞毒性。若适用，每个平皿中放阳性与阴性对照各一个。另外增设一个含单层细胞但无试验材料的滤膜和一个不含细胞但接触试验材料的滤膜作为空白对照。

使用浸提液时，还应设浸提介质对照。

每一试样至少有四个平行样（每一试验材料至少检查两个培养皿）。

孵育后，去除试样，轻轻将滤膜与琼脂或琼脂糖分开，取出滤膜。

可选用下面方法 A 或方法 B 用细胞化学方法评价细胞酶活性减少的面积。

a) 方法 A

按 Barka 和 Anderson(1963 年)的方法显示琥珀酸脱氢酶活性(酶分类 1.3.99.1)。用琥珀酸脱氢酶染色液浸泡滤膜,在 37℃±2℃培养箱中孵育 3h。测量前用蒸馏水冲洗滤膜,空气干燥。

注:可将滤膜在冲洗前用 10%中性甲醛溶液浸泡 15min,以固定细胞。

b)方法 B

用非特异性水解酶染色液浸泡滤膜,在 4℃下孵育 30 min,显示非特异性水解酶。在紫外光下检查滤膜。

4.7 细胞损害评价

可选用下面 a)或 b)法评价细胞的损害:

a) 测量褪色区面积(如通过图像分析系统)或

b) 按表 4 分级。

表 4 细胞损害评价

分级	滤膜染色观察	褪色面积
0	整个滤膜染色密度无变化	无
1	染色密度减少区或未染色区的直径小于试样(5mm)	$<20mm^2$
2	未染色区直径为 5～7mm	$20mm^2$～$40mm^2$
3	未染色区直径>7mm	$>40mm^2$

注:阴性对照样本下方的滤膜及对照滤膜经琥珀酸脱氢酶染色后应呈均匀的深蓝色,经非特异性水解酶染色呈浅绿色。无细胞的对照滤膜可评价试样对滤膜可能产生的影响。

4.8 结果评价

在结果评价时,应考虑试验中收集的所有信息,尤其是试验与对照组间结果的任何差异。按表 5 对被试物分级。

表 5 被试物分级

细胞损害指数	细胞毒性评价
0	无细胞毒性
1	轻度细胞毒性
2	中度细胞毒性
3	重度细胞毒性

检测报告中应包含结果评价。

注:在对从细胞毒培养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。

4.9 试验记录

试验记录中应包括全部操作的记录,所得全部结果以及结果评价所需的其他任何数据。也包括试验材料制备及使用方法的详细情况以及材料的批号(适用时)。

附 录 A
（资料性附录）

本标准章条编号与 ISO 7405：2008 章条编号对照一览表

本标准章条编号	对应的国际标准章条编号
3	6.2
3.1	6.2.1
3.2	6.2.2
3.3	6.2.3
3.4	6.2.4
3.5	6.2.5
3.6	6.2.6
3.7	6.2.7
3.8	6.2.8
3.9	6.2.9
4	6.3
4.1	6.3.1
4.2	6.3.2
4.3	6.3.3
4.4	6.3.4
4.5	6.3.5
4.6	6.3.6
4.7	6.3.7
4.8	6.3.8
4.9	6.3.9

附 录 B
（资料性附录）
穿刺器与输血插口适配性

本标准与 ISO 7405:2008 技术性差异及其原因

本标准的章条编号	技术性差异	原因
3.2	增加举例“ATCC CCL1(NCTC clone 929)(小鼠成纤维细胞)或 ATCC CCL2 (Hela)(人上皮细胞系)等”	增加可操作性
3.3	取消原文“选用 6 孔培养板(直径 35mm)或直径 50mm～100mm 的培养皿进行细胞培养。”中的 6 孔培养板(直径 35mm)。改为 90mm～100mm 培养皿	与后面样品间隔(＞20mm)描述矛盾。采用国内常用培养皿尺寸
3.4	试样制备由“6.1”改为“YY/T 0268－2008 第 6 条” C)中增加“或其他载体上”	与国内标准统一，并参考国内常用材料，增加可操作性
3.6	在第二段中增加“使琼脂培养基的最终浓度为 1×生长培养基”和“保持在 48℃。” 在第四段中增加“通常在每一培养皿中至少放置两个试样。若使用了浸提介质，还应放一个浸提介质对照。每个样本尽量彼此远离，并远离培养皿壁”	增加可操作性
4.2	增加举例“ATCC CCL1(NCTC clone 929)(小鼠成纤维细胞)或 ATCC CCL2 (Hela)(人上皮细胞系)等”	增加可操作性
4.4	试样制备由“6.1”改为“YY/T 0268－2008 第 6 条”	与国内标准统一
4.6	增加“另取一皿，加不含细胞的培养液 6 mL 作为空白对照”	增加可操作性

中华人民共和国医药
行业标准
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
YY/T 0127.9—2009
*
中国医药科技出版社出版发行
北京市海淀区文慧园北路甲22号
邮政编码：100082
网址 www.cmstp.com
电话：发行：010－62227427　邮购：010－62236938
三河市腾飞印务有限公司印刷
各地新华书店经销
*
开本 880×1230　1/16　印张 0.75　字数 20千字
2011年5月第一版　2011年5月第一次印刷
*
书号：145067·68　定价 15.00元

如有印装差错　由本社发行部调换
版权专有　侵权必究
举报电话：(010)62214756