

中心静脉导管辐射灭菌后的组织相容性评价

刘涛^{1,2} 刘清芳¹

¹ (苏州大学医学部放射医学与公共卫生学院 江苏省放射医学与防护重点实验室 苏州 215123)

² (苏州市吴中区疾病预防控制中心 苏州 215128)

摘要 为探讨辐射灭菌后的医疗产品的安全性,对辐照灭菌后的中心静脉导管进行了细胞毒性、豚鼠迟发型接触性致敏和皮肤刺激试验以评价其组织相容性。辐射灭菌剂量采用 ISO11137-2 标准进行设定。结果表明:经辐照灭菌后的样品无细胞毒性、不会致敏和引起皮肤刺激,符合医疗器械组织相容性实验要求。提示经设定剂量辐照灭菌后的中心静脉导管组织相容性良好。

关键词 辐射灭菌, 中心静脉导管, 组织相容性

中图分类号 R187

中心静脉导管属于血管内管的一种,放置于大静脉中,临床用途甚广如测量中心静脉压,血液透析的管道等。与人体接触的每种材料和最终产品都应考虑其所有潜在的生物学危害^[1],需要进行系统评价。前期的实验证明其生物相容性良好,但对于辐射灭菌后的医用材料是否有毒,对人体可能构成什么危害,也需要评价。本文通过测定辐照灭菌后中心静脉导管的细胞毒性、豚鼠迟发型接触性致敏及皮肤刺激等试验,以评价其组织相容性,为医用材料临床的安全应用提供依据。

1 实验材料与方法

1.1 动物与试剂

中心静脉导管,样品编号: JYE-2010-6023、JYE-2010-6024、JYE-2010-6025,室温下储存。白色豚鼠 30 只,苏州大学实验动物中心提供, [许可证号: SCXK (苏) 2007-2007]; 昆明种小鼠 50 只(雌雄各半) 体重 20–24g, 年龄 8–12 周龄, 苏州大学实验动物中心提供; 新西兰白色纯种家兔 10 只, 体重不低于 2.0kg, 年轻成兔, 苏州大学实验动物中心提供, [许可证号: SCXK (苏) 2007-2007]。L-929 鼠成纤维细胞 (美国细胞培养库中 CCL1 (NCTC 克隆 929)), 80% RPMI1640 培养基 (美国 Gibco 公司), 20% 新生牛血清 (上海华美生物工程公司), 苯酚 (批号: 20080401), 四唑盐 MMT (批号:

YK2009111101), 胎牛血清 (批号: 737396), 胰酶 (批号: 25200), 青霉素链霉素 (批号: 691024), MEM (批号: 723409), 异丙醇 (批号: T20100125), 弗氏完全佐剂, 10% 的十二烷基硫酸钠等。

1.2 仪器

高压灭菌器 (SDWH-048)、CO₂ 培养箱 (SDWH-021)、倒置显微镜 (SDWH-037)、酶联免疫检测仪 (SDWH-312)、电子天平 (SDWH-426) 等。

1.3 钴源

本次实验钴源由苏州大学辐照技术研究所提供。强度为 2.22×10^{15} Bq。吸收剂量的测量及常规剂量监测均按 EN552 规定要求进行。

1.4 辐射灭菌剂量设定

参考文献[1]–[3]等的方法进行。初始污染菌数量检测: 从批号为 JYE-2010-6023、JYE-2010-6024、JYE-2010-6025 样品中各随机抽取 10 件。洗脱液: 0.1% 蛋白胨、0.05 Tween-80 和 0.9% 氯化钠溶液, 每瓶 200 mL。样品处理: 将样品剪成小块, 放入含有洗脱液的烧瓶内。采用旋涡混合器 (2800 次/min), 振荡 2 min。提取液用膜过滤器过滤, 测绘污染菌数。培养条件: 需氧菌 30℃–35℃ 培养 48–72 h; 霉菌 20℃–25℃ 培养 5–7d。培养基 (营养琼脂、霉菌和乙

江苏高校优势学科建设工程资助项目

第一作者: 刘涛, 男, 1978 年 10 月出生, 2001 年毕业于苏州大学公共卫生学院, 现为在读硕士研究生, 主要从事传染病防治相关工作, 主管医师

通讯作者: 刘清芳, Email: qfliu@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2011-11-02, 修回 2012-02-20

醇酸盐培养基):均以标准菌株通过培养基的生长促进实验,经证实性能良好者。检测方法:以平板倾注法进行活菌计数。

1.5 验证剂量的设定

依据初始污染菌数直接查 ISO11137-2 表 5 确定验证剂量,然后以验证剂量的土 10%剂量辐照 100 件样品,以无菌检查法评估,如 100 件产品的无菌检查阳性数不超过 2 件时,验证试验被认为通过,从而确定验证剂量。

1.6 组织相容性实验^[4-6]

1.6.1 细胞毒性试验 参照 ISO10993-5^[7]的方法:细胞毒性测试——体外法,对辐照灭菌后的受试样品进行细胞毒性实验。(1)对照液的制备:阴性对照:高密度聚乙烯+含 10%胎牛血清的 MEM 培养液(37℃ 24 h);阳性对照:含 0.5%苯酚和 10%胎牛血清的 MEM 培养液(37℃ 24 h);空白对照:含 10%胎牛血清的 MEM 培养液(37℃ 24 h)。(2)制备样品浸提液:取灭菌样品按 0.2 g, 1 mL 的比例加入 10%胎牛血清的 MEM 培养液放入培养瓶中,于 37℃放置 24 h 制备样品浸提液,同时,将空白对照、阴性对照和阳性对照分别置于 37℃培养箱中放置 24 h。(3)细胞株:为推荐使用的美国细胞培养库中 CCL1(NCTC 克隆 929 L-细胞系)。(4)细胞培养:将生长旺盛的 L929 细胞培养在含 10%胎牛血清和抗生素(青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μg/mL)的 MEM 培养液中,置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。用 0.5%胰酶(EDTA)消化细胞制备成单细胞悬液,细胞悬液离心(200 g, 3 min),然后将细胞重新分散于培养基中,调整细胞密度为 1×10^5 /mL 的细胞悬液接种到 1 个 96 孔培养板中,每孔 100 μL,置 37℃培养箱中(5% CO₂, 37℃, >90%湿度)培养 24 h。待细胞长成单层后,吸出原来的培养液,分别加入 100 μL 不同浓度的样品浸提液(100%、75%、50%、25%)、空白对照液、阳性对照和阴性对照液(100%)。每组至少做 5 个平行样。(5)细胞形态学观察和细胞毒性评价。

1.6.2 豚鼠迟发型接触性致敏试验 参照 ISO10993-10^[8]方法采用豚鼠最大限度试验,将生理盐水(SC)和芝麻油(SO)样品浸提液各皮内注射 10 只豚鼠,包扎并试图诱发致敏。在恢复期内,10 只受试豚鼠和 5 只对照豚鼠分别采用样品浸提液和空白液进行激发试验(斑贴)。斑贴试验移去 24 和 48 h 后记录各部位得分。按 Magnusson 和 Kligman^[9]分级标准对每一激发部位和每一观察时间皮肤红斑

和水肿反应进行描述并分级。无明显改变、散发性或斑点状红斑、中度融合性红斑、重度红斑和水肿依次记 0-4 分。

1.6.3 皮肤刺激试验 参照 ISO10993-10^[8]的方法,对受试样品进行了皮肤刺激试验。实验前 4-24 h 将家兔背部脊柱两侧兔毛除去(约 10 cm×15 cm),作为实验和观察部位。将含有萃取液的供试样品和对照样品直接接触家兔脊柱两侧的皮肤,然后用绷带固定贴敷至少 4 h。取下敷贴片后 1 h、24 h、48 h、72 h 观察敷贴部位及周围皮肤组织反应,包括红斑、水肿和坏死等记录之。根据红斑、水肿发生情况可记分为 0、1、2、3、4 标准记分等级,仅使用 24 h、48 h 和 72 h 的观察数据进行计算。

1.6.4 植入后局部反应试验 固定家兔,剪去背部上方的兔毛,每侧大约 10 cm×20 cm 的面积。用 75%乙醇清洁暴露皮肤。局麻后,将载有试验样品的穿刺针与表面皮肤呈 45°角插入肌肉,当回抽穿刺针时,用细探针将样品留于肌肉中。每只家兔右侧植入四个试验样品,左侧植入 4 个阴性对照。

完成上述操作后,将家兔送回各自的笼子进行(1)临床观察:植入后第 1、3 和 5 天观察植入点皮肤反应,有无出血、红肿、坏死和试验样品排出等异常现象。(2)解剖观察:分别于二周、六周和十二周后,将家兔无痛处死,解剖并观察植入部位有无皮肤和肌肉异常病变,取出脊柱两侧肌肉,切取包裹试样周围 0.5-1.0 cm 的肌肉组织,置 10%甲醛溶液中固定。(3)组织病理学检查:将固定组织石蜡包埋切片,进行染色,于光学显微镜下观察,比较试验品与对照品周围的组织反应,纤维囊腔厚度,炎症细胞和其他细胞存在情况及试样/组织界面处的其他异常情况。

1.7 统计分析 利用 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 产品初始污染菌及剂量设定

每件产品的平均污染菌数 = $18.5 \times 1.08 = 19.48$ CFU /件。查 ISO11137-2 表 5 得验证剂量为 6.0 kGy (ZSP=1: SAL= 10^{-2})。经验证剂量辐照后,做 100 件产品的无菌检查,其结果均为阴性,验证剂量通过。查表得灭菌剂量为 8.8 kGy, SAL= 10^{-3} 。

2.2 组织相容性试验结果

2.2.1 细胞毒性试验结果 细胞毒性试验各组吸光度值(OD 值),细胞活力比和细胞毒性分级结果见

表1。根据评判标准,细胞活力比小于空白组70%,说明样品具有潜在的细胞毒性,50%的样品至少和100%的细胞活力比相同或者比100%的细胞活力比更高,否则应该重复实验。生长旺盛的L-929细胞与供试样品液混合培养,24 h后,通过MTT方法计算得到100%样品浸提液的细胞活力比为92%。根据细胞毒性标准属1级,提示供试样品对L-929细胞无毒性影响(表1)。

2.2.2 豚鼠迟发型接触性致敏试验 与对照侧注射点刺激反应相比,试验注射点刺激反应不明显,无

红斑、焦痂、水肿表现。皮肤过敏试验激发接触后24、48 h,分别观察试验组和对照组动物激发部位皮肤情况,试验组10只豚鼠均未见皮肤有红斑或水肿(表2),未观察到受试动物的致敏现象。

2.2.3 皮肤刺激试验 试验侧以及对照侧的实验兔皮肤在经过1、24、48和72 h后均没有出现红斑、焦痂和水肿等刺激反应,材料敷贴部位无色素沉着、无出血点、无皮肤粗糙和皮肤菲薄等现象,而且两种供试液的试验侧皮肤反应不超过对照侧皮肤反应,具体见表3。

Table 1 Cytotoxicity test results

Group	OD570“ $\bar{x} \pm s$ ”	Cell viability / %	Classification
Blank	0.807±0.020	100.0	0
Negative control	0.781±0.079	96.5	1
Positive control	0.015±0.001	1.9	4
100% extract of the test sample	0.744±0.031	92.0	1
75% extract of the test sample	0.758±0.013	93.6	1
50% extract of the test sample	0.760±0.023	93.9	1
25% extract of the test sample	0.767±0.007	94.8	1

Table 2 Guinea pig sensitization dermal reactions

Group	Animal number	Topical induction phase	Hours following patch removal/h		Weight/g	
			24	48	Before injection	After experiment
Test group	1	0	0	0	313	366
	2	0	0	0	316	369
	3	0	0	0	315	367
	4	0	0	0	313	365
	5	0	0	0	314	367
	6	0	0	0	313	364
	7	0	0	0	320	375
	8	0	0	0	316	369
	9	0	0	0	318	372
	10	0	0	0	317	371
Negative control	11	0	0	0	319	372
	12	0	0	0	314	367
	13	0	0	0	313	365
	14	0	0	0	311	364
	15	0	0	0	318	372

Table 3 Dermal observations

Rabbit No.	Group		Interval /h			
			1	24	48	72
1	Test	Erythema	0	0	0	0
		Oedema	0	0	0	0
	Control	Erythema	0	0	0	0
		Oedema	0	0	0	0
2	Test	Erythema	0	0	0	0
		Oedema	0	0	0	0
	Control	Erythema	0	0	0	0
		Oedema	0	0	0	0
3	Test	Erythema	0	0	0	0
		Oedema	0	0	0	0
	Control	Erythema	0	0	0	0
		Oedema	0	0	0	0

2.2.4 植入后局部反应试验 3只试验兔临床与解剖观察结果显示,试样与阴性对照均未发现异常,也未见植入物排出。显微镜组织学观察结果:HE染色病理切片,试样/组织界面处未发现纤维囊腔、炎症细胞和其他细胞存在异常情况(见图1)等。经测试,受试组与对照组均未发现临床、解剖和病理学改变,提示受试物对兔肌肉组织无刺激和毒性作用。

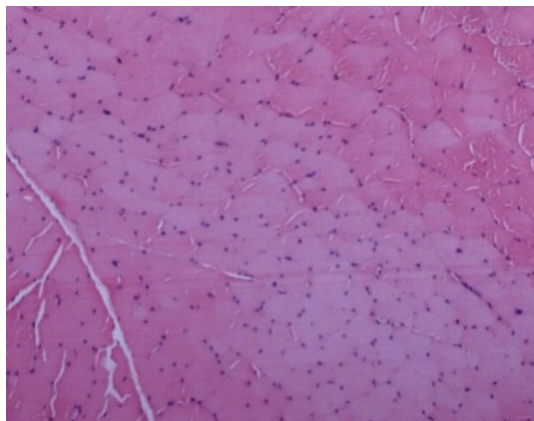


Fig.1 HE staining biopsy, there are not fiber cavities and inflammatory cells and abnormalities of other cells on the samples/tissues interface

3 讨论

组织相容性评价是医疗器械以及材料生物学评价的重要组成部分。本文研究了辐照灭菌后中心静脉导管组织相容性的问题。做了细胞毒性、致敏及皮肤刺激试验。本实验测定中心静脉导管的组织相容性。首先采用体外细胞毒性实验,选用的四唑盐(MTT)法是一种国际标准检测细胞存活和生长的方法,MTT细胞毒性实验是生物材料安全性体外测试的代表,已成为生物材料和医疗器械生物评价体系中最重要指标之一^[8]。其原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源的MTT还原为难溶性的蓝紫色结晶物并沉积在活细胞中,而死亡细胞对MTT不起作用,因此死亡细胞不会被染色。由于MTT结晶物形成量与细胞数呈正比,OD值就能间接反映活细胞数量。通过计算出不同浓度试验材料浸提液作用下的细胞活力比,可以对该材料的细胞毒性作用作出可靠的定量评价^[10]。本实验对中心静脉导管洗提液100%、75%、50%、25%浓度浸提液进行了细胞活力测定,所有样品的细胞毒性均在1级,说明样品无细胞毒性,具有很好的细胞相容性。

致敏试验是将一定量材料或其浸提液与大鼠皮肤接触,以检测材料是否有引起皮肤致敏反应的潜在性。在本实验条件下,受试物对豚鼠未见引起迟

发型接触性皮肤致敏反应的证据。对家兔的皮肤刺激试验结果亦表明受试样品对受试家兔无刺激作用。

4 结论

中心静脉导管经设定剂量辐照灭菌后无细胞毒性、无致敏性、无刺激性,由此说明其组织相容性良好。

参考文献

- 1 Brinston R, Miller A, Deeley C. Developments in radiation sterilization. *J Med Device Technol*, 2008, **19**: 36-37
- 2 Harries J. Practical experience of microbiological validation of sterilization. *J Med Device Technol*, 2003, **14**: 18-21
- 3 ISO11137-2: Sterilization of health care products, Part 2: Establishing the sterilization dose, 2006: 5-16
- 4 方菁巍, 刘清芳. 冠状动脉支架生物相容性的系统评价. *实验动物与比较医学*, 2007(2): 119-122
Fang Jingyi, Liu Qingfang. Systematic evaluation on biocompatibility of coronary stents. *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, 2007(2): 119-122
- 5 李超, 陶树清, 周长林, 等. 纳米羟基磷灰石-40%二氧化锆生物陶瓷材料组织相容性评价[J]. *中国矫形外科杂志*, 2009, **17**(23): 1815-1818
LI Chao, TAO Shuqing, ZHOU Changlin, et al. Histocompatibility evaluation of nano hydroxyapatite-40% zirconia composite bioceramic[J]. *Orthopedic Journal of China*, 2009, **17**(23): 1815-1818
- 6 沈建彬, 刘清芳. 硅凝胶植入物辐照灭菌后组织相容性和致癌毒性研究[J]. *中国消毒学杂志*, 2008, **25**(6): 607-610
SHEN Jianbin, LIU Qingfang. The study on tissue compatibility and carcinogenic toxicity of the radiation sterilized silica-gel breast implants[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2008, **25**(6): 607-610
- 7 ISO10993-5. Biological evaluation of medical devices-part5: Tests for cytotoxicity: In vitro methods[S]. 2009E: 24-28
- 8 ISO10993-10. Biological evaluation of medical devices-part10: Tests for irritation and sensitization[S]. 2006: 5-15
- 9 Magnusson-Kligman maximization test, *Encyclopedic Reference of Immunotoxicology* 2005, Part 14, 422 DOI: 10.1007/3-540-27806-0_944

- 10 Gov Y, Bitler A, Dell'Acqua G, *et al.* RNAIII inhibiting peptide (RIP), a global inhibitor of *Staphylococcus aureus* pathogenesis: structure and function analysis[J]. *Peptides* 2001, **22**(10): 1609-1620

Tissue compatibility inspection of central vein catheter sterilized by radiation

LIU Tao^{1,2} LIU Qingfang¹

¹(School of Radiation Medicine and Public Health, Medical College of Soochow University, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Suzhou 215123, China)

²(Wuzhong district CDC, Suzhou 215128, China)

ABSTRACT In order to inspect the security application of radiation sterilization medical products, the cytotoxicity, guinea pigs delayed contact sensitization and skin stimulation tests were carried out to evaluate the tissue compatibility of central vein catheter sterilized by irradiation and the radiation sterilization doses were set according to the ISO11137-2 criterion. The results show that the radiation sterilized samples had no cytotoxicity, no sensitization and no intracutaneous activation that meet the request of tissue compatibility for medical products. It suggests that the central vein catheter sterilized by radiation with set absorbed dose has good tissue compatibility.

KEYWORDS Radiation sterilization, Central vein catheter, Tissue compatibility

CLC R187