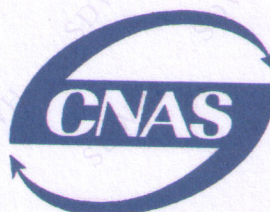




证书编号: 2013100106S



检测
CNAS L2954

苏州大学 卫生与环境技术研究所 最终报告

报告编号: SDWH-M201402361

参照 ISO 10993-5:2009 方法进行
弹性胶带的细胞毒性试验

MTT 法

含 10%胎牛血清的 MEM 浸提液

委托单位

上海锐泉医疗器械有限公司

苏州大学卫生与环境技术研究所

电话: 0512-65880038

传真: 0512-65880034

电子邮箱: sudawei huan@163.com

地址: 中国苏州工业园区仁爱路 199 号

邮编: 215123

<http://yxbfzb.suda.edu.cn>

第 1 页 共 8 页

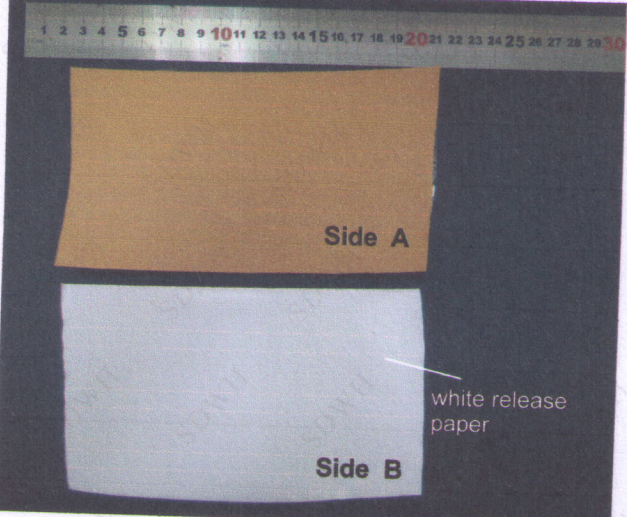
目 录

目 录.....	2
检测报告说明.....	3
试验确认与签名.....	4
1.0 摘 要.....	4
2.0 目 的.....	5
3.0 参考标准.....	5
4.0 执行规范.....	5
5.0 对照和试验样品确定.....	5
6.0 试验系统鉴别.....	5
7.0 试验系统确认.....	6
8.0 给药途径确认.....	6
9.0 试验设计.....	6
9.1 试验和对照样品制备.....	6
9.2 仪器设备.....	6
9.3 试剂.....	7
9.4 试验方法.....	7
9.5 细胞形态结果.....	7
9.6 细胞活力结果.....	7
9.7 统计方法.....	8
9.8 评价标准.....	8
9.9 结 论.....	8
10.0 记录存储.....	8
11.0 保密协议.....	8

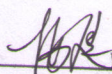
检测报告说明

- 一、对本报告有异议者，请于收到报告之日起十五天内提出复核申请。
- 二、检测报告涂改或无检测专用章无效。
- 三、检测报告无编制人、审核人及检测报告签发人签字无效。
- 四、送样委托检验，本检验机构仅对来样负责。
- 五、未经本检验机构同意，不得部分复制本报告。

试验确认与签名

试验样品	
接样日期:	2014-07-24
试验计划书编号:	SDWH-PROTOCOL-M201402361
试验计划书生效日期:	2014-07-24
试验操作开始日期:	2014-07-30
试验操作结束日期:	2014-08-01
报告完成日期:	2014-08-04

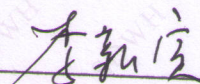
编制:



2014-08-05

日期

审核:



试验负责人

2014-08-06

日期

签发:



授权签字人

2014-08-06

日期

苏州大学卫生与环境技术研究所

检测专用章

(3)

1.0 摘要

试验样品浸提液与生长旺盛的 L929 细胞培养 (37℃, 5% CO₂) 24h 后, 观察细胞形态, 细胞裂解情况, 采用 MTT 法测定供试品的潜在细胞毒性。结果显示 100% 样品浸提液的细胞活力为 80.2%, 对照组结果显示本次试验结果有效。

在本次试验条件下, 样品弹性胶带浸提液对 L929 细胞无潜在毒性影响。

2.0 目的

该试验目的是为了评价试验样品对 L929 哺乳动物成纤维细胞的生物学反应。该测试是根据样品浸提液而设计的。

3.0 参考标准

医疗器械的生物学评价-第 5 部分: 细胞毒性测试-体外法 ISO 10993-5, 2009

医疗器械的生物学评价-第 12 部分: 样品制备和参照样品 ISO 10993-12, 2012

4.0 执行规范

ISO/IEC 17025:2005《检测和校准实验室能力的通用要求》CNAS-CL01 检测和校准实验室能力认可准则 (中国合格评定国家认可委员会实验室认可证书 No.CNAS L2954)
实验室资质认定评审准则 (江苏省质量技术监督局资质认定计量认证证书 CMA 2013100106S)

5.0 对照和试验样品确定

5.1 试验样品名称: 弹性胶带

来样原始状态: 未灭菌

CAS 编号: 未提供

规格: 100mm×50mm

批号: 未提供

性状: 固体

颜色: 肤色

密度: 未提供

稳定性: 未提供

溶解度: 未提供

保存条件: 室温

试验样品材料: 弹力布

包装材质: 未提供

以上试验样品信息是由样品委托单位提供。

浸提液: 含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液

5.2 阴性对照

名称: 高密度聚乙烯

制造商: 美国药典委员会

规格: 3 片装

批号: J0L476

性状：固体

颜色：白色

稳定性：室温下稳定

保存条件：室温

浸提液：含 10%胎牛血清的 MEM 培养液

5.3 阳性对照样品名称：苯酚

制造商：国药集团化学试剂有限公司

规格：500g

批号：T20110909

浓度：0.5%

溶剂：10%胎牛血清的 MEM 培养液

配制日期：2014-07-28

性状：液体

颜色：粉红色

保存条件：4 ± 2 °C

5.4 空白对照样品名称：含 10%胎牛血清的 MEM 培养液

配制日期：2014-07-28

性状：液体

颜色：粉红色

保存条件：4 ± 2 °C

6.0 试验系统鉴别

该试验用小鼠成纤维细胞 L929,细胞系来自美国菌种保存中心。

7.0 试验系统确认

小鼠成纤维细胞 L929 用来检测细胞毒性试验是因为其对试验样品浸提液反应灵敏。

8.0 给药途径确认

试验样品通过浸提液（用一种与试验系统相容的载体浸提）与试验系统接触，被认为是最佳给药途径，也是为标准推荐的。

9.0 试验设计

9.1 试验和对照样品制备

无菌操作按下表的比例（样品：浸提液体积）用含 10%胎牛血清的 MEM 培养液浸提样品，于 37°C，5% CO₂ 培养箱中浸提 24 小时。浸提液立即用于实验。

无菌操作取样			灭菌	惰性容器内 无菌浸提		最终浸提液	
取样比例	取样方式	实际取样	方式	浸提液	条件	pH	是否澄清
6cm ² : 1ml	随机取样， 撕去白色 离型纸	120cm ²	钴 60 25kGy	20ml	37°C，24h	7.4	澄清

同法制备空白对照、阴性对照样品和阳性对照样品。

9.2 仪器设备

高压灭菌器 (SDWH-048) 校正有效期 (2014-12-03);
 CO₂ 培养箱 (SDWH-021) 校正有效期 (2014-11-03);
 CO₂ 培养箱 (SDWH-186) 校正有效期 (2014-09-12);
 倒置显微镜 (SDWH-037);
 钢直尺 (SDWH-463) 校正有效期 (2014-10-27);
 电子天平 (SDWH-056) 校正有效期 (2015-03-20);
 超净工作台 (SDWH-454) 校正有效期 (2014-11-04);
 酶联免疫检测仪 (SDWH-312) 校正有效期 (2014-10-24)。

9.3 试剂

MTT(3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐) (SIGMA, 批号: MKBL6647V);
 胎牛血清 (GiBco, 批号: 1428479);
 胰酶 (GiBco, 批号: 1516530);
 青霉素链霉素 (GiBco, 批号: 1430661);
 MEM (GiBco, 批号: 1301231);
 异丙醇 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20130304)。

9.4 试验方法

试验过程无菌操作;

将 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 (含 EDTA) 消化细胞制备成单细胞悬液, 细胞悬液离心 (200g, 3min), 然后将细胞重新分散于培养基中, 调整细胞密度为 1×10^5 个/ml 的细胞悬液;
 接种上述细胞悬液到 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 小时;

待细胞长成单层后, 吸出原来的培养液, 分别加入 100 µl 不同浓度的试验样品浸提液 (100%、75%、50%、25%)、空白对照液、阳性对照 (100%) 和阴性对照液 (100%), 37℃, 5% CO₂ 培养 24 小时。每组做 5 个平行样;

培养 24h 后, 取出 96 孔板先做细胞形态学观察, 然后吸出原来的培养液, 每孔加 50 µl MTT (1mg/ml), 培养 2 小时, 吸弃上清, 加 100 µl 99.9% 纯度的异丙醇溶解结晶;
 在酶标仪上以 570nm 为主吸收波长, 650nm 为参考波长测定吸光度值。

9.5 细胞形态结果

表 1 细胞形态学观察

组别	接种细胞前	加浸提液前	加浸提液 24h 后
空白对照	个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。	个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。	个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
阴性对照			个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
阳性对照			细胞裂解死亡。
100% 样品浸提液			个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
75% 样品浸提液			个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
50% 样品浸提液			个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
25% 样品浸提液			个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。

表 2 细胞活力%

组别	$\bar{x} \pm s$	细胞活力%
空白对照	0.842±0.026	100.0%
阴性对照	0.860±0.024	102.2%
阳性对照	0.017±0.002	2.0%
100%样品浸提液	0.675±0.005	80.2%
75%样品浸提液	0.691±0.007	82.1%
50%样品浸提液	0.715±0.021	85.0%
25%样品浸提液	0.737±0.017	87.5%

9.7 统计方法

均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$)

细胞活力%=试验(或阳性及阴性)样品组 $[\overline{OD}_{570}-\overline{OD}_{650}]$ /空白对照组 $[\overline{OD}_{570}-\overline{OD}_{650}] \times 100\%$.

9.8 评价标准

50%的样品浸提液至少和 100%的细胞活力相同或者比 100%的细胞活力更高, 否则应该重复试验。
 细胞活力%越低, 潜在的细胞毒性越大;
 细胞活力<空白组 70%, 说明样品具有潜在的细胞毒性;
 100%试验样品浸提液的细胞活力%为最终结果。

9.9 结 论

在本次试验条件下, 样品弹性胶带 浸提液对 L929 细胞无潜在毒性影响。

10.0 记录存储

所有与本次试验有关的原始数据和记录都被保存在指定的 SDWH 档案文件中。

11.0 保密协议

签订检测委托合同即认为双方接受保密协议。