

ICS 11.100.20

C 30



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1465.7—201X

医疗器械免疫原性评价方法 第7部分：流式液相多重蛋白定量技术

Immunogenic evaluation method of medical devices —Part 7: Liquid phase multiplex protein quantification technique by flow cytometry

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

(本稿完成日期：2019.7.8)

在提交反馈意见时，请将你所知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局

发布

前 言

YY/T 1465《医疗器械免疫原性评价方法》分为以下部分：

- 第1部分：体外T淋巴细胞转化试验；
- 第2部分：血清免疫球蛋白和补体成分测定 ELISA法；
- 第3部分：空斑形成细胞测定 琼脂固相法；
- 第4部分：小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验 半体内法；
- 第5部分：用M86单克隆抗体测定动物源性医疗器械中 α -Gal抗原清除率；
- 第6部分：用流式细胞术测定动物脾脏淋巴细胞亚群；
- 第7部分：流式液相多重蛋白定量技术。

本部分为YY/T 1465的第7部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本部分由国家药品监督管理局提出。

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。

本部分由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会（SAC/TC248）归口。

本部分起草单位：。

本部分主要起草人：

引 言

免疫应答是机体的一种重要的防御机制。医疗器械作为外源性物质，在与人体接触后，通过多种途径影响机体免疫系统的免疫应答，特别是针对动物源性医疗产品、同种异体产品和组织工程医疗制品等。虽然医疗器械/材料与免疫系统的相互作用可能产生不同的免疫应答，但大体上可分为两种类型，即体液免疫应答和细胞介导免疫应答。目前，还无法判定医疗器械或材料刺激产生的免疫应答对宿主有利还是有害，因此，应用医疗器械/材料进行免疫应答研究来获取相关的信息是非常重要的。

GB/T 16886.20中给出了与人体接触医疗器械可能发生的免疫反应和潜在免疫毒性反应的指南，但缺少具体的试验方法。YY/T 1465系列标准预期为GB/T 16886.20的实施提供具体的试验方法。YY/T 1465的本部分提供了利用流式液相多重蛋白定量技术同时对样本中多种可溶性蛋白定量检测的方法，为评价医疗器械/材料激发机体免疫应答潜能提供具体的试验方法，可作为GB/T 16886.20中免疫毒理学试验中的一项可供选择的方法标准。其他经确认适用的方法也可以采用。

医疗器械免疫原性评价方法 第7部分：流式液相多重蛋白定量技术

1 范围

YY/T 1465的本部分给出了利用流式液相多重蛋白定量技术同时对样本中多种可溶性蛋白定量检测的试验方法，适用于对医疗器械/材料诱导机体产生免疫应答的评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分：动物福利要求

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

3 流式液相多重蛋白定量技术

3.1 实验原理

流式液相多重蛋白定量技术，是基于荧光微球技术与“双抗体夹心”液相检测技术的结合，可以实现多种可溶性蛋白同时定量检测。微球分别标记有不同强度的荧光，每一种微球分别耦联对应目标抗原的捕获抗体，特异性捕获样品中或标准品中的目的蛋白，捕获微球、目的蛋白与加入的检测抗体形成双抗体夹心的“三明治”结构复合物，利用流式细胞仪对该复合物的荧光强度进行检测。同时，通过标准品绘制标准曲线，可实现同时对待测样本中多种可溶性蛋白的定量检测。

3.2 实验动物

3.2.1 总则

所有的动物实验应在经国家认可机构批准并符合实验动物福利全部适用法规的实验室内进行，并且还应符合GB/T 16886.2的要求。

3.2.2 动物的种属和要求

常用的实验动物为小鼠。本部分中推荐使用未进行过试验的健康的 BALB/c 小鼠，SPF 级，6~8 周龄。正式试验前要将动物至少饲养 5 d 以适应实验室环境。实验动物宜标明种属、品系、来源、性别、体重和周龄。试验开始时，动物的体重差异宜控制在最小范围，每只动物的体重不能超过同性别动物平均体重范围的±20%。推荐每种性别至少采用 3 只小鼠。

如选用其它种属动物，宜对其适宜性进行说明。

3.3 样品制备

按照GB/T 16886.12的原则进行试验样品制备。

注：医疗器械/材料中可能存在免疫原多为大分子物质，予以说明所选用试验样品制备方法的有效性。

3.4 试验步骤

3.4.1 试验分组

(1) 阴性对照组（溶剂对照或假手术组）；

(2) 阳性对照组（已知可引起阳性反应的抗原物质）：例如采用牛血清白蛋白（BSA）作为阳性对照物。

注：BSA作为阳性对照物，推荐的操作为取3 mgBSA和9mL磷酸盐缓冲液（pH=7.4）制成混合溶液。充分混匀后，取3 mL混合溶液与3 mL完全弗氏佐剂等体积混合。取0.12 mL混悬液注射到小鼠皮下。也可采用其他经确认的接触剂量及方式。

(3) 试验样品组。

注1：参考现有的免疫学研究数据以及关于受试物或相关物质的毒代动力学方面的信息来选择相应的剂量范围以免造成过度的毒性反应。这些信息也可有助于确定剂量的频次。

注2：根据产品预期用途及人体临床拟用的剂量来选择试验剂量及免疫频次，同时考虑实验动物的耐受量，试验样品采用多剂量组进行试验。推荐设计高、中、低三个剂量浓度，且剂量组设定时考虑人体临床拟用的剂量。

3.4.2 接触处理

根据样品的临床预期使用选择与实验动物合适的接触方式。

3.4.3 样本收集

宜根据器械的临床使用情况和预实验的结果来确定试验样本的取材时间。以血清样本为例，取材时将小鼠外周血收集于带盖离心管中。室温静置1 h~2 h后，1200 g离心10 min，收集上层血清即刻使用或-20 °C条件下分装保存备用。

注：采集血液时尽量使血液滴入EP管内，避免血液随着管壁流下，以避免可能出现的溶血现象。

3.4.4 样本中蛋白定量操作过程

根据下列操作步骤进行检测，具体的操作步骤参照所购试剂盒的操作说明书。

- 按照试剂盒说明书要求对标准品进行梯度稀释，将梯度稀释的标准品分别加入对应标记的检测管中；
- 根据试剂盒说明书要求，选择适宜的稀释倍数对待测样本进行稀释，稀释完成后分别加入对应标记的检测管中；
- 将捕获微球加入到所有标准品/样本检测管中（加入前应充分涡旋微球，加入微球的过程中应不断吹打，注意避免微球的沉降），随后向所有检测管中加入带有荧光标记的检测抗体；
- 根据试剂盒说明书要求选择适宜的抗体孵育条件，如避光室温震荡孵育，保证抗原抗体充分反应；
- 孵育结束后，离心弃上清；将检测管中样本重悬，准备上机检测。

3.4.5 数据获取

根据下列步骤进行仪器调试并获取试验数据，具体步骤采用所购试剂盒所推荐的数据进行。

- 在流式细胞仪上开启流式细胞仪分析软件，设置数据存储位置并设定仪器条件。根据试剂盒操作说明，创建一个FSC vs SSC散点图，并在其中设门（gate），再创建待测荧光散点图；

- b) 机器液流速度设为低速 (Low)，在 FSC vs SSC 散点图中确保可见微球，调节机器，排除碎片干扰，并调节门的范围，确保将微球覆盖；
- c) 调节完毕，保存设置，进行上样测试，并获取数据；
- d) 逐管获取完数据后，按照仪器管理规范进行仪器维护，并做好记录。

4 质量控制

为保证所得结果的可靠性，宜至少每月或检测时以荧光微球光路质控品监测仪器设置、峰值通道、监测仪器状态的变异系数(CV)、标准差、荧光分辨率和荧光补偿等数据，当这些数据出现偏倚或仪器被维修保养后,需要重新建立散射光和荧光参数的靶值，并累计质控数据。

5 数据分析

利用标准品的所得标准曲线，分析待测样本中各目标蛋白的检测值并记录。根据数据分布情况选择适宜的统计学方法，结合数据生物学意义进行试验结果判定。阳性对照组用于确认测试系统运行是否正常。

6 试验报告

试验报告中应至少包含下列信息：

- a) 试验样品名称、规格型号和批号；
 - b) 试验和对照样品制备方法；
 - c) 实验动物的品系、年龄和体重；
 - d) 试验条件和试验步骤；
 - e) 试验结果；
 - f) 结果评价；
 - g) 结论。
-