

YY/T 1465.7《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》标准编制说明

一、工作简况

1. 任务来源

根据食药监办械管〔2019〕23号文《国家药监局综合司关于印发2019年医疗器械行业标准制修订项目计划的通知》确定的标准制修订工作计划，由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会归口，山东省医疗器械产品质量检验中心等负责制订YY/T 1465.7《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》方法标准（项目编号：N2019067-JN）。

2. 工作过程

在接到标准制定任务后，标准起草工作组认真研究，于2019年3月召开首次视频工作组会议，召集共同验证单位确定工作组讨论稿和标准验证方案。在分析验证结果和对标准内容进行充分讨论后，工作组于7月初完成并发出征求意见稿。

3. 标准体系

YY/T 1465的总标题是医疗器械免疫原性评价方法，包括以下部分：

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。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的论据。

标准修订工作组按照GB/T 1.1—2009的规则制定本部分。

1、医疗器械中免疫原的来源

免疫原即医疗器械中所含有的，可以刺激机体发生免疫应答的异源性物质。

蛋白质作为免疫原性物质的可能性最大，其次是多糖，核酸和脂质等。小分子量的物质通常没有免疫原性，然而，它们可以通过与宿主蛋白结合并改变蛋白的构象来获得免疫原性。对于医疗器械而言，聚合材料、陶瓷制品及金属材料可能具有的溶出物、磨损或可降解部分能够与宿主蛋白结合。生物源性的材料，如胶原，天然乳胶蛋白，白蛋白和动物组织等都可以刺激机体发生免疫应答。

2、国际上对医疗器械免疫毒性评价的要求

医疗器械中所含的免疫原性物质是导致其免疫毒性的原因。对于免疫毒性评价的要求，各国的要求不尽相同。欧盟法规部门为免疫毒理学评定提供两个选择方案：或通过流式检测淋巴细胞表面标志物及自然杀伤细胞（NK）活性或是评价针对某一 T 细胞依赖性抗原的抗体应答反应。2002 年，FDA 出台了一份名为“企业指南：研究性新药的免疫学评价”的文件，该文件中要求在临床前动物研究中缺乏免疫相关变化证据的情况下，无需进行免疫功能试验。我国在 2010 年等同转化了国际标准 ISO/TS 10993-20: 2006，该标准为医疗器械免疫毒理学试验提供指南，但缺少具体的试验方法。

3、流式细胞仪工作原理

流式细胞仪(Flow cytometer 简称 FCM)是一项集激光技术、电子物理技术、光电测量技术、计算机技术以及细胞荧光化学技术、单克隆抗体技术为一体的新型高科技仪器。它可以快速测量、存贮、显示悬浮在液体中的分散细胞的一系列重要的生物物理、生物化学方面的特征参量。在免疫学研究领域，FCM 以快速、灵活及定量等特点被广泛地应用于基础研究和临床治疗的各个方面，尤其是与单克隆抗体技术的结合，使其在免疫分型、分选、免疫监测、免疫细胞的系统发生及特性研究等方面发挥了重要的作用，成为现代免疫学研究不可缺少的工具。

4、流式液相多重蛋白定量技术原理及优势

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。与传统的ELISA检测相比，流式液相多重蛋白定量技术对样本量需求小，特别是珍贵样本获取困难，利用该技术可大大缓解样本量的难题；可同时对样本中多个目标蛋白进行检测，具有一定的经济性并且大大减少时间与人的消耗；检测灵敏度高检测范围更宽。

5、技术指标的选择

5.1 试验动物的选择

本标准中推荐选用 BALB/c 小鼠作为试验动物。BALB/c 品系为白化的近交系试验动物，广泛应用于肿瘤学、生理学、免疫学、核医学和单克隆抗体等研究中。也可选择其他适宜的近交系试验动物。

5.2 试验剂量的选择

为了充分反映材料的免疫原性，建议对材料进行梯度测试，即采用不同剂量组进行试验，以得出免疫应答的剂量-效应关系。

三、主要实验（或验证）的分析、综述报告、技术经济论证，预期的经济效果。

本次验证选择在临床使用上可能会引起免疫反应的产品，植入 BALB/c 小鼠皮下部位，通过流式液相多重蛋白定量技术研究其在体内发生降解后是否对小鼠机体免疫系统产生影响，验证试验方法的可行性、可靠性。具体见验证工作总结报告。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况。

无。

五、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系。

本部分与有关的现行法律、法规和强制性国家标准无冲突和交叉。

六、重大分歧意见的处理经过和依据。

无。

七、行业标准作为强制性行业标准或推荐性行业标准的建议。

该标准为方法标准，供使用者选择参考，建议作为推荐性行业标准。

八、贯彻行业标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）

本标准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，适用于评价医疗器械对机体潜在的免疫原性作用。因为标准中规定的检测方法经国内多家机构验证，并可以开展该标准中试验，建议自发布之日后12个月开始实施。标准发布后，秘书处挂靠单位——山东中心将在标准实施日期前采用在网页上开辟该标准宣贯专栏、公布标准宣贯资料、召开标准宣贯会等形式对该标准的技术内容进行宣贯。

九、废止现行有关标准的建议。

无。

十、其他应予说明的事项。

无。

标准起草工作组

2019年7月