



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1465.2—2016

医疗器械免疫原性评价方法 第2部分：血清免疫球蛋白和补体 成分测定(ELISA法)

**Immunogenic evaluation method of medical devices—
Part 2: Serum immunoglobulin and complement component detection
(enzyme-linked immunoadsorbent assay)**

2016-01-26 发布

2017-01-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

YY/T 1465《医疗器械免疫原性评价方法》分为两个部分：

——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)。

本部分为 YY/T 1465 的第2部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意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。

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

本部分由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会(SAC/TC 248)归口。

本部分起草单位：国家食品药品监督管理总局济南医疗器械质量监督检验中心、中国食品药品检定研究院医疗器械检定所、四川医疗器械生物材料和制品检验中心。

本部分起草人：盖潇潇、尹玉霞、王昕、陈亮、许建霞、袁墩、梁洁。

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。血清总免疫球蛋白水平和补体水平可以揭示机体的体液免疫状态,反映机体发生体液免疫应答的水平。YY/T 1465 的本部分中采用了酶联免疫吸附试验法测定血清免疫球蛋白和补体成分水平,为医疗器械/材料激发机体免疫应答潜能提供了具体的试验方法。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 2 部分：血清免疫球蛋白和补体成分测定(ELISA 法)

1 范围

本部分给出了用酶联免疫吸附试验法测定血清免疫球蛋白和补体成分的方法,适用于医疗器械/材料诱导产生的免疫应答产物的评价。

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 16886.1 医疗器械生物学评价 第 1 部分:风险管理过程中的评价与试验

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

GB/T 16886.20 医疗器械生物学评价 第 20 部分:医疗器械免疫毒理学试验原则和方法

3 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.20 界定的术语和定义适用于本文件。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ELISA:酶联免疫吸附试验

IgG,IgM:免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M

PBS:磷酸盐缓冲液

BSA:牛血清白蛋白

CFA:完全弗氏佐剂

5 实验动物

5.1 总则

所有的动物试验应在经国家认可机构批准并符合实验室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。

5.2 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 BALB/c 小鼠,SPF 级,6 周龄~

8 周龄,雌雄各半。如选用其他品系小鼠,宜对其适宜性进行说明。正式试验前要将动物至少饲养 5 d 以适应实验室环境。试验动物宜标明种属、品系、来源、性别、体重和/或周龄。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平均体重的 $\pm 20\%$ 。

6 试验原理

将血清与包被于微孔板内的抗体(一抗)共孵育,形成抗原抗体复合物。加入标记有辣根过氧化物酶并能与该抗原抗体复合物结合的抗体(二抗),通过清洗将液相中未结合的游离成分去除,最后加入底物,利用辣根过氧化物酶与底物的显色反应来判定试验结果。

7 实验程序

7.1 样品制备

根据 GB/T 16886.12 的原则、制备试验样品。只要可能,医疗器械都应在“备用”状态下进行试验。

7.2 剂量水平的选择

7.2.1 宜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给予的频次。

7.2.2 宜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,试验物质宜采用多剂量组进行试验。推荐至少采用高、中、低 3 个剂量浓度,1 个阴性对照组和 1 个阳性对照组。剂量组设定时宜考虑人体临床拟用的剂量。

7.3 动物处理

宜根据器械的特点和预期临床使用部位采用原位接触法。对于难以模拟临床使用接触的器械,宜对所选择的接触方式进行论证。如采用样品浸提液进行试验,应设立相应的浸提介质处理对照组。

7.4 试验分组

- a) 阳性对照组:推荐采用 BSA 作为阳性对照物。取 3 mg BSA 与 9 mL PBS(pH 7.4)混匀,再与 CFA 按 1:1 体积混匀成乳液,每只动物背部皮下注射 0.12 mL,每周注射 1 次。共免疫 4 次。10 只/组。
- b) 试验样品组:取试验样品,按适宜方法给予实验动物,10 只/剂量组。
- c) 阴性对照组:除了不用试验物质进行处理以外,与试验组的实验动物进行相同的操作和处理方式,10 只/组。

7.5 试验周期

宜根据预实验的结果确定试验样品的观察周期。预实验的试验方式与主试验相同,一般至少取 3 只实验动物进行预实验。

7.6 血清的制备

宜根据器械的临床预期使用方式和预实验的结果来确定试验用血清的取材时间。将小鼠外周血收集于 1.5 mL 的离心管中。室温放置 30 min 后,600 g 离心 20 min,收集上层血清即刻使用或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

注 1:采集血液时尽量使血液滴入管内,避免血液随着管壁流下,这样可以有效避免溶血现象。

注2：根据机体对BSA的免疫反应周期，推荐分别于注射开始后1周、4周和12周时采集各组试验小鼠血液。

7.7 血清免疫球蛋白的检测

7.7.1 试验方法

推荐使用市售的ELISA试剂盒，并按试剂盒操作说明进行检测。

注：考虑到几种免疫球蛋白在血清中的分布量，一般推荐检测IgG和IgM。只有在免疫系统发生严重紊乱后，免疫球蛋白IgG或IgM的量才会发生明显改变。

7.7.2 数据分析

记录各组小鼠血清免疫球蛋白的检测值。结果以平均值和标准差形式记录。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。

7.8 血清补体成分的检测

7.8.1 试验方法

推荐使用市售的ELISA试剂盒，并按试剂盒操作说明进行补体成分检测。也可使用其他经确认的试验方法。

注：补体成分C3是补体系统中的关键分子，一般推荐检测活化裂解产物C3a。

7.8.2 数据分析

记录各组小鼠血清补体成分的检测值。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。

8 试验报告

试验报告中应包含下列信息：

- 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) 试验动物的品系、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。

参 考 文 献

- [1] ASTM F1905. Standard Practice For Selecting Tests for Determining the Propensity of Materials to Cause Immunotoxicity
 - [2] Burleson GR, Dean JH, Munson AE. Methods in Immunotoxicology. Wiley-Liss, New York, 1995
 - [3] Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Current Protocols in Immunology. NY, John Wiley, 1992
 - [4] Price CP, Newman DJ. Principles and Practice of Immunoassay. Stockton Press, NY, 1991
 - [5] Wild D. The Immunoassay Handbook. Stockton Press, 1994
-