



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0606.14—2014

组织工程医疗产品 第 14 部分:评价基质及支架免疫反应的 试验方法:ELISA 法

Tissue engineered medical products—
Part 14: Standard practice for evaluation of immune responses of
substrate and scaffolds products: ELISA tests

2014-06-17 发布

2015-07-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布



前 言

YY/T 0606《组织工程医疗产品》已经或计划发布以下部分：

- 第2部分：术语；
- 第3部分：通用分类；
- 第4部分：皮肤替代品(物)的术语和分类；
- 第5部分：基质及支架的性能和测试；
- 第6部分：I型胶原蛋白；
- 第7部分：壳聚糖；
- 第8部分：海藻酸钠；
- 第9部分：透明质酸钠；
- 第10部分：修复或再生关节软骨的植入物的体内评价；
- 第12部分：细胞、组织、器官的加工处理指南；
- 第13部分：细胞自动计数法；
- 第14部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：ELISA法；
- 第15部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：淋巴细胞增殖试验；
- 第16部分：保存指南；
- 第17部分：外源性因子评价指南；
- 第18部分：海藻酸盐凝胶固定或微囊化指南；
- 第19部分：修复和替代骨组织植入物骨形成活性的体内评价指南；
- 第20部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：细胞迁移试验；
- 第24部分：可吸收生物材料植入试验评价规范；
- 第25部分：动物源性生物材料DNA残留量测定法：荧光染色法；
- 第26部分：聚合物支架微结构评价指南。

本部分为YY/T 0606的第14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。

本部分由中国食品药品检定研究院归口。

本部分起草单位：中国食品药品检定研究院。

本部分主要起草人：方玉、杜晓丹、郭婷婷、杨晓芳、王春仁、奚廷斐。

组织工程医疗产品

第 14 部分:评价基质及支架免疫反应的 试验方法:ELISA 法

1 范围

YY/T 0606 的本部分规定了评价组织工程医疗产品基质或支架所致哺乳动物体液免疫反应的试验方法:ELISA 法。

本部分适用于组织工程医疗产品基质或支架的生物学评价。

注:本标准所述试验虽然也可以用于人体标本的检测或用于研究目的,并可为临床追踪提供数据,但并非对人体状况的诊断性检测。

除本部分所选方法外,可采纳其他等效方法。

并非所有的材料和应用均需要按照本部分进行检测,因此应仔细考虑本部分中方法的适用性。在实施本部分推荐的试验前,应考虑 GB/T 16886.1 或管理部门所推荐的试验结果所提示的信息。

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:评价与试验

GB/T 16886.6 医疗器械生物学评价 第 6 部分:植入后局部反应试验

GB/T 16886.10 医疗器械生物学评价 第 10 部分:刺激与迟发型超敏反应试验

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种

YY/T 0606.3 组织工程医疗产品 第 3 部分:通用分类

YY/T 0606.5 组织工程医疗产品 第 5 部分:基质及支架的性能和测试

ISO/TS 10993.20 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(Biological evaluation of medical devices—Part 20:Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

基质 substrate

组织工程医疗产品中作为细胞或生物分子生长、支持或输送载体的原材料。

3.2

支架 scaffold

促进替代、修复或再生组织的细胞或生物活性因子迁移、结合或输送的支持物、释放载体或基体。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSA:牛血清白蛋白

ELISA:酶联免疫吸附实验

HRP:辣根过氧化物酶

IgA:免疫球蛋白 A

IgD:免疫球蛋白 D

IgE:免疫球蛋白 E

IgG:免疫球蛋白 G

IgM:免疫球蛋白 M

PBS:磷酸盐缓冲液

PBS/T:磷酸盐缓冲液,室温 20

5 体液免疫反应产物的检测

5.1 材料和检测标本

基质/支架(以下统称为材料)中的已识别成分,以依据 GB 16886.12 制备的材料浸提液均可作为免疫学实验材料。

注:当采用材料浸提液作为实验材料时,应依据 GB 16886.12 进行浸提条件的验证性进行。

用于 ELISA 检测的标本,应依据 GB 16886.16 和 GB 16886.10 进行的刺激及致敏试验或植入试验的动物血液、器官组织等作为检测标本,也可采用其他来源的患者血液和活检标本。亦可以用各种抗原免疫动物(如小鼠)的血液作为检测标本。在符合本标准的试验中是等同的,但必须在报告中注明;也可采用其他来源的标本。

5.2 试剂及耗材

建议尽量采用商品化试剂盒,包括购买含已包被抗原或抗体的微孔板之全组分试剂盒或购买制造商组合的包被用抗体和酶标抗体。

固相支持物:推荐使用聚苯乙烯微孔板(聚苯乙烯可以吸附蛋白质和大多数碳水化合物,特别是当蛋白质和碳水化合物溶解在 pH 8~9 的缓冲液中时)。对其品牌没有特别的推荐,但应在报告中注明来源。其他材料通常也可以吸附。固体材料可以用作固相支持物,但应注意选择合适的非特异性结合对照。

5.3 试验设计

5.3.1 实验设计中应包含对照孔。推荐:

- 试剂对照:无抗原孔,至少一式 2 孔;
- 阴性对照:未接受实验材料的实验动物血清,每个标本至少一式 2 孔;
- 阳性对照:如果有已知的阳性抗血清,应使用该血清,每个标本至少一式 2 孔。

5.3.2 定量检测时,标准溶液应至少有 3 个浓度,每个浓度至少一式 2 孔,同时应设缓冲液对照,至少一式 2 孔。

5.3.3 样品检测建议采用两个稀释浓度,或通过预试验确定 1 个适宜的样品稀释度。每个浓度至少一式 2 孔。

5.4 推荐操作步骤

5.4.1 抗原包被

将免疫原性物质溶解于水基质的溶液中,调节 pH 在 8.5~9.5 之间,或不产生沉淀的最高 pH。推荐使用碳酸盐/或磷酸盐缓冲液。免疫原性物质的终浓度可为 0.5 mg/mL(按 GB/T 16886.12 制备的浸提液可用于本试验,可能的情况下应将 pH 调节至 8.5~9.5,以不产生沉淀为限)。

除试剂对照孔外,每孔加上述成分 100 μ L,在湿润的环境中,室温(18 $^{\circ}$ C~22 $^{\circ}$ C)或 37 $^{\circ}$ C 条件下温育 1 h,4 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 放置过夜。用 PBS/T 洗板至少 3 次。用封闭缓冲液(由 PBS/T 加蛋白质组成,例如:1% 明胶、卵白蛋白或血清)至少洗两次以封闭其结合位点,降低背景。封闭后的板可立即使用或冷藏备用。

注:如果组织工程支架产品中含有残留血清成分,应注意标本中存在的抗血清成分的抗体可能与封闭缓冲液中的蛋白质发生交叉反应,而造成假阳性结果。在选择试剂盒或自行配置封闭液时应注意其中用于封闭非特异性结合位点的蛋白质的种类,并应对实验结果进行验证。

5.4.2 标本检测

5.4.2.1 加入 100 μ L 适当的样品(样品应有两个稀释浓度(或通过预试验确定 1 个适当的样品稀释度)和试剂对照。室温或 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h~2 h 后,用 PBS/T 充分洗涤。

5.4.2.2 在所有孔中加入适当的经酶标记的抗血清(推荐采用碱性磷酸酶标记)。这些抗血清可以通过商业途径获得,或由制造商直接进行标记。建议采用直接抗相应种属实验动物的 IgG、IgM、IgA 的多价抗血清,而不应使用异性抗血清。室温或 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h~2 h 后,用 PBS/T 充分洗涤。

5.4.2.3 各孔加入 100 μ L 适当的底物(抗血清的标记物)。底物对标记酶的特异性以及正确的使用浓度的相关信息应参考底物说明书。在适当的波长下读取光密度值(波长由底物决定)。

5.4.3 数据分析

将实验组血清样本的光密度值与对照样品比较,若二者的差值大于对照组标准差的 2 倍时,可视为明显增高或降低。如果有已知浓度标准品的测定结果,则可通过标准曲线进行比较。

6 对半抗原物质的反应

6.1 半抗原物质检测

半抗原物质(低分子量物质)引起的免疫反应与前述抗原物质类似,但在检测方法学上有很大的不同,因此需要分别论述。

注:由材料降解、磨损或洗脱产生的小分子引起的免疫反应是生物相容性中非常重要的问题。低分子量物质可与宿主的组织或蛋白质结合而变为具有免疫原性。尚不清楚是否仅仅将 5 项下的方法进行简单的修正就可应用于半抗原物质所引起的免疫学反应的检测。首先必须用某种载体包被 96 孔板,以结合半抗原。对大多数半抗原而言,白蛋白是合适的载体(以白蛋白作为载体对大多数半抗原都是适宜的)。

6.2 推荐操作步骤

6.2.1 每孔加入 100 μ L 载体(推荐使用 BSA 0.5 mg/mL),室温或 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h~2 h 后,4 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 放置过夜。用 PBS/T 充分洗板。

6.2.2 每孔加入 100 μL 含半抗原的溶液,以 PBS 作为阴性对照。室温孵育 1 h~2 h。用包被液(含明胶的 PBS/T)充分洗板。

6.2.3 同 5.4.2.2~5.4.2.3。

6.3 数据分析

将实验组血清样本的光密度值与对照组比较,若二者的差值大于对照组标准差的 2 倍时,可视为明显增高或降低。如果有已知浓度标准品的测定结果,则可通过标准曲线进行比较。

7 非抗原相关的免疫刺激

7.1 非抗原相关免疫反应

已知有多种物质可以刺激产生非抗原相关的免疫反应,特别是油脂、凝胶以及胶体悬浮液。这种免疫刺激反应不一定是有害的,还有可能是有利的。但材料或其浸提液引起非抗原相关的免疫反应能力应被证明。

在进行动物实验时,应分为非相关抗原(如 BSA)加材料组和非相关抗原不加材料组。并分别在 7 d~10 d、21 d 和 8 周时检测抗体水平,可以采用 5.1 所述方法进行检测。

7.2 实验设计分组

可按下述方案分组:

- a) 对照组动物仅接受抗原;
- b) 试验组动物接受抗原与材料/浸提液混合物,或者试验组动物一侧接受抗原,另一侧接受材料/浸提液;
- c) 以下对照组属推荐采用:
 - 1) 生理盐水组(动物仅接受生理盐水,无材料或浸提液,无抗原)。
 - 2) 材料或浸提液组(动物仅接受材料或浸提液,无抗原)。
 - 3) 抗原加佐剂组(动物接受抗原和已知佐剂,例如福氏完全佐剂或 Titer Max)。

7.3 检测

分别在刺激后 7 d~10 d、21 d 和 8 周时检测抗体水平,可以采用 5.4 所述方法进行检测。

注:上述试验可用空斑形成试验替代,或在上述试验的基础上附加空斑形成试验。以绵羊红细胞(SRBC)作为非相关抗原,在用 SRBC 免疫至少 4 天后取脾脏细胞。

7.4 结果分析

将各组的抗体反应与对照组[7.2a)]比较,确定是免疫刺激还是免疫抑制。

参 考 文 献

- [1] ASTM F1905-98(2003) Standard Practice for Selecting Tests for Determining the Propensity of Materials to Cause Immunotoxicity.
- [2] ASTM F1906-98(2003) Standard Practice for Evaluation of Immune Responses In Biocompatibility Testing Using ELISA Tests, Lymphocyte, Proliferation, and Cell Migration.
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
组 织 工 程 医 疗 产 品
第 14 部分:评价基质及支架免疫反应的
试验方法:ELISA 法
YY/T 0606.14—2014

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 9 千字
2014 年 9 月第一版 2014 年 9 月第一次印刷

*

书号: 155066·2-27333 定价 18.00 元



YY/T 0606.14—2014

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107