



1540

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1465.6—2019

医疗器械免疫原性评价方法 第6部分：用流式细胞术测定 动物脾脏淋巴细胞亚群

Immunogenic evaluation method of medical devices—
Part 6: Determination of animal spleen lymphocyte subsets by flow cytometry

2019-07-24 发布

2020-08-01 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。

本部分为YY/T 1465的第6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。

本部分由国家药品监督管理局提出。

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：山东省医疗器械产品质量检验中心、北京市医疗器械检验所。

本部分起草人：侯丽、孙晓霞、戴政宁、贺学英、王蕊。

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 中给出了医疗器械与人体接触可能产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 的本部分提供了流式细胞术测定实验动物脾脏淋巴细胞亚群的方法,为医疗器械/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6部分：用流式细胞术测定 动物脾脏淋巴细胞亚群

1 范围

YY/T 1465 的本部分规定了用流式细胞术测定动物脾脏淋巴细胞亚群的方法。
本部分适用于评价医疗器械/材料诱导产生的免疫应答。

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：样品制备与参照材料

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 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

分化抗原 **cluster of differentiation; CD**

不同谱系细胞在分化、成熟、活化过程中，出现或消失的细胞表面标志，通常用单克隆抗体来识别。

3.2

前向散射光 **forward angle light scatter; FALs/ FSC/ Fs**

光学检测器在入射光的正前方所收集的低角度光信号，与细胞或颗粒的大小和表面积有关。

3.3

侧向散射光 **side scatter; SSC**

光学检测器在入射光的直角处所收集的细胞散射的光信号，与细胞或颗粒的内部和表面结构复杂程度有关，如细胞质颗粒性、膜不规则性及核形等。

3.4

荧光强度 **fluorescence intensity**

结合到细胞或颗粒上的荧光素的量。荧光信号的通道数越大，提示荧光强度越强。在恰当的条件下，荧光强度与单个细胞和特定荧光素相结合的位点数相关。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

APC:别藻蓝蛋白

BSA:牛血清白蛋白

CFA:完全弗氏佐剂

FCM:流式细胞术

FITC:异硫氰酸荧光素

PBS:磷酸盐缓冲液

PE:藻红蛋白

PerCP:多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物

5 试剂

5.1 市售 PBS:pH 7.2~7.4。

5.2 市售 BSA。

5.3 市售 CFA。

5.4 溶血素。宜使用与仪器相匹配的溶血素(内含固定液),并严格按照使用说明和注意事项进行操作。如果使用没有固定作用的溶血剂(如氯化铵和低渗缓冲液等),荧光抗体染色后标本需要保存在 4℃,并在 1 h 内完成上机检测。

5.5 与流式细胞仪相匹配的市售荧光微球光路质控品。

5.6 荧光素标记的单克隆抗体。抗体是淋巴细胞亚群分析的关键步骤,宜考虑所选抗体对细胞的反应性。推荐使用商品化组合抗体的体外诊断试剂。如实验室自己准备组合单抗,宜在每次试验前新鲜配制。组合抗体中每一种抗体都需要分别滴定以明确其噪声与阳性信号的最佳分离滴度,并检测作为组合抗体使用和作为组合抗体的成分之一单独使用的平均荧光强度和阳性率,其可比性标准偏差需在均值 ± 2 之内。

6 流式细胞术测定动物脾脏淋巴细胞亚群

6.1 实验原理

FCM 是一种以流式细胞仪为检测手段,可以快速、准确、客观地同时检测单个生物微粒的多项特性,并加以定量的技术。利用流式细胞仪在细胞分子水平上通过单克隆抗体能够对单个脾脏淋巴细胞进行多参数、快速的定量分析。

6.2 实验动物

6.2.1 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。

6.2.2 动物的种属和要求

常用的实验动物为小鼠。本部分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平均体重

的±20%。推荐每种性别至少采用3只小鼠。

如选用其他种属动物,宜对其适宜性进行说明。

6.3 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/材料中可能存在的免疫原多为大分子物质,所选试验样品制备方法的有效性予以说明。

6.4 试验分组

试验分组包括:

- a) 阴性对照组(溶剂对照或假手术组);
- b) 阳性对照组(已知可引起阳性反应的抗原物质):推荐采用 BSA 作为阳性对照物。

注:取 3 mg BSA 与 9 mL PBS(pH 7.4)混匀,再与 CFA 按 1:1(体积比)混匀成乳液,每只动物背部皮下注射 0.12 mL,每周注射 1 次。也可采用其他经确认的接触剂量及方式。

- c) 试验样品组。

注 1:可用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:可根据产品预期用途及人体临床使用来选择试验剂量、免疫频次和试验周期,同时考虑实验动物的耐受量,试验样品可采用多剂量组进行试验。推荐设计高、中、低 3 个剂量浓度,且剂量组设定时包括人体临床使用的最大剂量。

6.5 推荐试验步骤

6.5.1 制备脾细胞混悬液

无菌取 BALB/c 小鼠脾脏,加入培养基研磨得到细胞混悬液,离心去除培养基。按照所用溶血素说明书裂解红细胞。每管中加入 2 mL PBS,重悬细胞后,350g 离心 5 min,离心后弃上清,用 PBS 调节脾细胞浓度到 1×10^7 个/mL。

6.5.2 样本染色处理

按照符合 FCM 性能指标的荧光素标记的单克隆抗体(以下简称“抗体”)组合处理待测样本并做好标记(见表 1),同时设置好空白对照、抗体单标对照以及同型对照管。不同类型的 FCM 可根据其性能指标设置适宜的样品染色处理步骤。

- a) 空白对照:以 PBS 替代抗体加入流式管中,用以仪器分析时调节本底的电压以及荧光强度,并与同型对照一起衡量染色体系的正误;
- b) 抗体单标对照:对两种及以上抗体组合分析时,需根据抗体使用说明书通过抗体单标对照调整流式细胞仪的荧光补偿;
- c) 同型对照:以与检测抗体同亚型、同来源、同标记的免疫球蛋白代替抗体加入流式中,用以消除非特异性染色部分,并与空白对照一起衡量染色体系的正误,并可以在直方图以及散点图中确定阴性阳性群体分界位置;
- d) 向各流式管中加入相应标记抗体:各抗体按照符合 FCM 性能指标的抗体染色方案(见表 1)设置的混合项,配制成符合细胞标记要求的抗体混合体系加入流式管中;

注:根据流式管中淋巴细胞的浓度和数量,严格按照操作说明书设置抗体用量,调整淋巴细胞和抗体的最佳比例。

- e) 取调节好浓度的脾细胞悬液加入各样本的流式管中 100 μL /管,充分混合均匀,室温避光反应 20 min~30 min;每管中加入 2 mL PBS 重悬细胞后,350g 离心 5 min,离心后弃上清;
- f) 每管中加入 0.5 mL PBS 重悬细胞后,在 4 $^{\circ}\text{C}$ ~10 $^{\circ}\text{C}$ 下避光放置,待上机检测,检测前混匀细胞。

注:如抗体标记后的淋巴细胞当天长时间不能检测,脾细胞悬液中可加入 2%血清,但上机前宜离心并重新用不含血清的 PBS 重悬细胞后上机。若当天不能及时检测,宜用细胞固定液(如 0.1%~2.0%多聚甲醛或甲醛缓冲液)按照试剂的说明书对该淋巴细胞进行固定处理,固定后细胞避光置于 4 $^{\circ}\text{C}$ ~10 $^{\circ}\text{C}$,宜于 96 h 内离心去除固定液并用不含血清的 PBS 重悬细胞后上机检测。如时间过久,论证并说明检测结果的可靠性。

表 1 推荐流式抗体组合

编号	组别	抗体组合
1	空白对照	加入与检测抗体同体积的 PBS
2	同型对照 1	IgG FITC/IgG2a PE/CD45 PerCP/IgG2b APC
3	检测组合 1	CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC
4	同型对照 2	IgG FITC/Hamster IgG PE/CD45 PerCP/IgG2a APC
5	检测组合 2	CD3 FITC/CD69 PE/CD45 PerCP/CD19 APC
6	同型对照 3	IgG FITC/Hamster IgG PE/CD45 PerCP/IgM APC
7	检测组合 3	CD3 FITC/CD69 PE/CD45 PerCP/CD49b APC

6.5.3 数据获取

按下述操作步骤获取试验数据:

- a) 在流式细胞仪上开启流式细胞仪专用分析软件,开启 FSC vs SSC 散点图,用于显示淋巴细胞群体,通过调节仪器电压等参数使细胞位于合适位置并可排除碎片干扰;
- b) 开启含 CD45 的散点图,圈定 CD45⁺ 的淋巴细胞群;
- c) 分别开启含有目的抗体检测通道的散点图,并限定其获取的细胞为 CD45⁺ 的淋巴细胞群;
- d) 设置数据存储位置并设定仪器条件;
- e) 按照流式细胞仪操作规范,对仪器进行检查等上机检测前准备;
- f) 调节仪器测定参数:用空白对照调节电压,使未染色细胞的自发荧光应完全在阴性区域,所使用的检测通道内荧光直方图的淋巴细胞阳性率<2%,双荧光散点图内的未染色细胞位于散点图的左下象限内;用抗体单标对照调节荧光补偿;调节完毕,进行上样测试,并获取数据;
- g) 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。

7 质量控制

为保证所得结果的可靠性,宜至少每月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,需要重新建立散色光和荧光参数的靶值,并累计质控数据。

8 数据分析

记录各组小鼠脾脏淋巴细胞亚型的检测值(%),结果以“平均值±标准差”的形式记录。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。已知阳性抗原用于确认测试系统运行是否正常。

9 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。

参 考 文 献

- [1] Gratama JW, Kraan J, Keeney M, et al. Enumeration of immunologically defined cell populations by flow cytometry; Approved Guideline-Second Edition (H42-A2). Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007, 27(16):18-23.
- [2] Paxton H, Bendele T. Effect of time, temperature, and anticoagulant on flow cytometry and hematological values. *Ann N Y Acad Sci.* 1993, 677:440-443.
- [3] Calvelh T, Denny TN, Paxton H, et al. Guideline for flow cytometric immunophenotyping: a report from the national institute of allergy and infectious diseases. Division of AIDS. *Cytometry.* 1993, 14:702-714.
- [4] Gelman R, Wilkening C. Analyses of quality assessment studies using CD45 for gating lymphocytes for CD3(+)4(+)%. *Cytometry.* 2000, 42(1):1-4.
- [5] McCoy JP, Jr., Carey JL, Krause JR. Quality control in flow cytometry for diagnostic pathology. I. Cell surface phenotyping and general laboratory procedures. *Am J Clin Pathol.* 1999, 93; S27-S37.
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
医疗器械免疫原性评价方法
第 6 部分:用流式细胞术测定
动物脾脏淋巴细胞亚群
YY/T 1465.6—2019

*

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)68533533 发行中心:(010)51780238
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 14 千字
2019 年 8 月第一版 2019 年 8 月第一次印刷

*

书号: 155066·2-34359 定价 18.00 元



YY/T 1465.6—2019

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