

# YY/T 1631.2《输血器与血液成分相容性测定 第2部分：血液成分损伤评定》行业标准编制说明

## 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》，全国医用输液器具标准化技术委员会（SAC/TC 106）归口，由中国医学科学院输血研究所、山东省医疗器械产品质量检验中心等负责制定《输血器与血液成分相容性测定 第2部分：血液成分损伤评定》标准（项目号：N2019058-JN）。

### 2、标准体系

YY/T 1631《输血器与血液成分相容性测定》，分为以下部分：

—第1部分：血液成分残留评定；

—第2部分：血液成分损伤评定；

本部分为YY/T 1631的第2部分。

有关其他方面的输血器的试验将有其他部分的标准。

### 3、工作过程

接到工作指令后，SAC/TC106秘书处于2019年1月4日确定了工作组方案。方案中确定了牵头起草单位为中国医学科学院输血研究所，以及山东省医疗器械产品质量检验中心工作组成员单位。初步明确了分工和下一步的工作计划。标准起草工作组调查收集国内外相关标准和资料，在前期起草/验证工作的基础上，于2019年7月完成了征求意见稿及相关附件，并于2019年7月中旬向全国各地的生产企业、检验、审评、科研、临床等各有关单位和SAC/TC 106技术委员会的全体委员和成员广泛征求意见（为期两个月）。

## 二、标准编制原则及有关内容的说明

### 1、概述

输血器可用于成分血包括红细胞成分血、血浆成分血和血小板成分血等的输注。影响输血器功能的可能因素包括液体管路长度、流速和特性、空隙体积和选择的材料。滴斗内的过滤网的设计和加工尤为重要，输血器之间潜在的重大变异来源包括材料来源、表面积和特性，丝径、网孔大小和均一性。制造商生产的典型输血器是重力型和压力型的，但是可能用于某些特定情况，如新生儿血液成分的输注。但在大多数情况下，生产商提供的说明书中未提及经确认的血液成分的相关信息，生产商未进行充分评估，则使用者需要承担责任进行额外的确认工作，但实际上使用者对普遍使用的输血器的主要性能所知有限。为了改变这种现状，我国新修订的GB8369中增加了血液成分残留和血液成分损伤评定的要求：首次在本领域采用的材料生产的输血器时，应针对所推荐的血液成分范围对输血器进行评定，确保细胞和血浆成分无显著残留和损伤。

修订的 GB 8369 要求应针对所推荐的血液成分范围对输血器予以评定，除了确保输血器对各血液成分相关组分的残留不超过一个成人治疗剂量的 5%外（《输血器与血液成分相容性测定 第 1 部分：血液成分残留评定》中规定了相关方法与要求），还应确保各相关血液成分流经输血器后无显著损伤（或若适用，被激活或未被激活）。对于首次在本领域采用的材料生产的输血器，GB 8369 中只指出评定血液成分损伤宜使用经确认的试验方法对流经输血器前后的血液成分样品进行比较，但未对经确认的试验方法进行制定。为了更好地执行此标准，有必要针对标准中提到的各成分血相关指标的测定制定试验方法学方面的标准，评估流经输血器前后的血液成分的损伤，为 GB 8369 提供有效补充。

YY/T 1631 的本部分所描述的血液成分损伤评定方法，可用来评价输血器与血液成分的相容性，红细胞成分血的损伤以上清液中游离血红蛋白、钾离子显示，血小板成分血的损伤以 pH、涡流、低渗休克反应（HSR）、上清液乳酸脱氢酶、P 选择素（CD62P）在血小板表面上及在上清液的表达、 $\beta$  血栓球蛋白（ $\beta$ -TG）释放、相差显微镜观察血小板形态来显示，血浆成分血的损伤以凝血酶原片段 1,2、纤维蛋白 A、凝血因子 Xlla、凝血酶抗凝血酶复合物（TAT）显示，通过测定流经输血器前后的成分血的变化考察流经输血器前后的血液成分的损伤，适用于输血器与血液成分相容性的评价。

## 2 有关内容的说明

### 关于试验方法的选择

新修订的 GB8369 中关于血液成分残留和血液成分损伤评定的要求中指出：该评定宜使用经确认的试验方法对流经输血器前后的血液成分样品进行比较。标准中只给出了具体的要求，但未规定具体的试验方法。2.1-2.5 即是对试验方法的确认，经确认以下方法适用于测定血液成分损伤。同时按照标准要求对流经输血器前后的血液成分样品进行比较（具体见验证报告），证实以下方法适用。

#### 2.1 红细胞成分血浆游离血红蛋白含量的测定

关于血浆游离血红蛋白含量的测定，中华人民共和国医药行业标准《YY 0329-2009》推荐使用邻联甲苯胺法，其实验原理为：血红蛋白是一种有色蛋白，其分子量为 64.458 KD。经邻联甲苯胺氧化后显色，显色反应分两期：第一期氧化产物呈蓝色，反应在 pH4.6 左右进行，吸收峰在 630nm。第二期氧化产物呈黄色，反应在 pH1.5，吸收峰在 435nm。市售的血浆游离血红蛋白采用的 TBHBA 比色法，其原理是血红蛋白中亚铁血红素有类似过氧化氢酶的作用，过氧化氢经过血红蛋白中亚铁血红素催化 TBHBA 与 4-氨基安替比林生成红色醌亚胺色素，吸收峰为 505 nm。根据显色深度，可测出血浆游离血红蛋白的含量。

两种方法都是比色法，采用的校准品不同，邻联甲苯胺法采用的是按 YY0329 附件 F 制备的 Hb 标准贮存液，是将人全血洗涤离心采用蒸馏水溶血后离心取上清制备，市售的试剂盒采用的校准品是氰化高铁游离血红蛋白。

将样品同时采用两种方法进行检测，每个样品重复检测 3 次，结果如下：

表 1 邻联甲苯胺法检测悬浮红细胞游离血红蛋白实验结果

样品	游离血红蛋白浓度 (mg/L)			X $\pm$ SD (mg/L)	变异系数 CV (%)
	方法 1	方法 2	方法 3		
1	530.65	530.65	503.23	521.51 $\pm$ 15.83	3.04
2	885.48	812.90	841.94	846.77 $\pm$ 36.53	4.31
3	717.74	696.77	683.87	699.46 $\pm$ 17.09	2.44
4	482.26	464.52	450.00	466.59 $\pm$ 16.16	3.47
5	885.48	832.26	830.65	849.46 $\pm$ 31.21	3.67

表 2 比色法检测悬浮红细胞游离血红蛋白实验结果

样品	游离血红蛋白浓度 (mg/L)			X±SD (mg/L)	变异系数 CV (%)
1	126.40	130.36	130.69	129.15±2.39	1.85
2	210.23	217.82	215.84	214.63±3.94	1.83
3	172.94	182.51	181.19	178.88±5.19	2.90
4	139.93	143.89	143.23	142.35±2.12	1.49
5	233.99	237.62	238.61	236.74±2.43	1.03

两种方法的变异系数均小于 5%，具有较好的精密度，但两种方法检测结果存在差异。

## 2.2 浓缩血小板上清液乳酸脱氢酶 (LDH) 的测定

乳酸脱氢酶 (LDH) 是胞质中一种可溶性的酶，当细胞受损或裂解时，酶被释放到周围的上清液中，上清液中 LDH 的活性可用来指示细胞膜的完整性。在验证本标准时，分别采用了进口 abcam 公司和国产南京建成的试剂盒进行了检测，但 abcam 公司的试剂是用于培养细胞毒性的检测，是以 Triton 裂解细胞后的 LDH 为 100%，检测结果以细胞毒性%表示，不能得到具体的 LDH 活性结果，因此不适用于该标准，因此本标准不推荐使用。对国产试剂盒，对方法的精密度进行了考察，随机检测了 6 份血小板上清液样品的 LDH，每个样品检测 3 次，结果如下：

表 3 血小板上清液 LDH 实验结果

样品	LDH (U/L)			X±SD (%)	变异系数 CV (%)
1	390.85	396.08	403.92	396.96±6.58	1.66
2	407.84	377.78	393.46	393.03±15.04	3.83
3	410.46	393.46	410.46	404.79±9.81	2.42
4	373.86	381.70	386.93	380.83±6.58	1.73
5	393.46	396.08	411.76	400.44±9.90	2.47
6	415.69	392.16	407.84	405.23±11.98	2.96

结果显示变异系数均小于 5%，说明该方法具有良好的精密度，且该方法能得到样本具体的活性，适用于本标准中 LDH 的检测。建议选择能检测 LDH 活性的试剂盒或其他等效方法。

## 2.3 血小板涡流的测定

血小板涡流 (swirling) 是由于正常碟形血小板发生光衍射而产生的一种云雾状的现象 (见图1)。该现象与血小板形态密切相关。作为一项非侵入性检查指标，具有操作简便等优点。本标准中将其作为一项定性观测指标，表述为“有”或“无”。但试验需要检验者具有丰富的观察经验，评判结果易受主观因素影响。



## 2.4 P选择素在血小板上清液的表达 (sCD62P) 和β血栓球蛋白 (β-TG) 的释放

某些材料或器械的应用会引起血小板激活，激活的血小板为血栓形成的前期，可以通过各种方式来评价血小板激活。sCD62P和β-TG表征的是血小板颗粒物质的释放，GB16886.4-2003推荐采用酶联免疫法（ELISA法和RIA法）进行检测，我们采用的是ELISA法检测这两项指标，验证结果如下所示：

表 4 血小板上清液 sCD62P 实验结果

样品	sCD62P (ng/mL)			X±SD (%)	变异系数 CV (%)
1	75.90	73.10	70.76	73.25±2.57	3.51
2	60.58	54.58	54.72	56.63±3.42	6.05
3	43.72	47.08	48.16	46.32±2.32	5.00
4	39.74	36.74	32.60	36.36±3.59	9.86
5	41.06	49.24	44.38	44.89±4.11	9.16
6	34.00	34.92	36.34	35.09±1.18	3.36

表 5 血小板上清液 β-TG 实验结果

样品	β-TG (ng/mL)			X±SD (%)	变异系数 CV (%)
1	2.40	1.35	1.17	1.64±0.67	40.77
2	5.89	4.95	3.71	4.85±1.09	22.56
3	0.73	0.62	0.58	0.64±0.08	11.76
4	18.30	18.01	18.08	18.13±0.15	0.84
5	3.93	3.09	2.48	3.17±0.73	23.07
6	-0.62	-0.91	-0.98	-0.84±0.19	-23.04

实验结果显示，六份血小板样本的 sCD62P 测定差异较小（变异系数均小于 10%），且含量都在检测范围内。但 β-TG 测量差异较大（变异系数达到 40%），第六例低于标准曲线浓度范围（2 ng/mL-64 ng/mL），结果为负值。《全国临床检验操作规程》第 4 版给出的人血小板上清 β-TG 参考值为 16.4±9.8 ng/mL，当样本的 β-TG 含量低于正常参考值时，其变异系数也较高。

## 2.5 血小板表面 CD62P 的表达

P-选择素 (GMPI40, CD62P) 存在于静息血小板胞质α颗粒内，血小板活化时，颗粒内糖蛋白阳膜外释放，血小板表达 CD62P。通过流式细胞术多色分析法，结合荧光素标记的单克隆抗体，即可检测血小板膜糖蛋白 CD62P 的表达情况，从而反映血小板活化状态。验证试验中采用了手工汇集浓缩血小板和单采血小板，血小板表面 CD62P 的表达结果如下：

表 6 血小板表面 CD62P 表达率实验结果

样品	CD62P (%)			X±SD (%)	变异系数 CV (%)
1	4.5	5.4	5.1	5.00±0.46	9.17
2	3.4	3.6	3.5	3.50±0.10	2.86
3	5.5	6	5.4	5.63±0.32	5.71

4	3.6	4.3	3.8	3.90±0.36	9.25
5	24.1	24.5	23.6	24.07±0.45	1.87
6	25.5	25.1	24.6	25.07±0.45	1.80

注：其中 1-4 为单采血小板，1-2 保存时间为 3 天，3-4 保存时间为 4 天，5-6 为手工汇集浓缩血小板，保存时间为 2 天。

结果显示，流式方法测定 CD62P 的表达，其变异系数均小于 10%。手工汇集血小板虽然保存时间较短，但血小板表面 CD62P 表达明显高于单采血小板。手工汇集血小板在制备过程中采用了多步离心分离，可能是造成血小板活化较高的原因之一。

## 2.6 新鲜冰冻血浆的凝血酶原片段 1,2 (F<sub>1+2</sub>)、纤维蛋白 A (FPA)、凝血因子XIIa (F XIIa)、凝血酶抗凝血酶复合物 (TAT) 的测定

F<sub>1+2</sub> 和 FPA 升高，表明凝血酶原激活为凝血酶。TAT 复合物升高，说明凝血系统激活和正在生成的凝血酶与循环的抗凝血酶之间复合物的形成。GB16886.4 推荐使用 ELISA 和 RIA 法检测这些指标。在验证试验中，我们采用了双抗夹心法酶联免疫吸附法 (ELISA) 对这些指标进行了检测，验证结果如下表所示：

表 7 新鲜冰冻血浆 TAT 实验结果

样品	TAT ( ng/mL)			X±SD (%)	变异系数 CV (%)
1	7.821	7.855	7.821	7.83±0.02	0.25
2	8.123	7.754	8.426	8.10±0.34	4.15
3	7.184	6.747	7.956	7.30±0.61	8.39
4	4.901	5.371	5.975	5.42±0.54	9.94
5	5.807	5.505	5.572	5.63±0.16	2.82
6	5.639	6.445	6.714	6.27±0.56	8.92

《全国临床检验操作规程》第 4 版给出的正常成人枸橼酸钠抗凝血浆的 TAT 参考值为 (1.0-4.1) ng/mL，TAT 试剂的标准曲线范围为 1.48 ng/mL-120 ng/mL。实验结果显示，当样本的 TAT 含量位于标准曲线范围内时，变异系数小于 10%，方法具有良好的精密度。

纤维蛋白 A (FPA) 采用了不同厂家 (A、B) 的 ELISA 试剂盒进行检测，结果如下：

表 8 A 试剂盒检测新鲜冰冻血浆 FPA 实验结果

样品	FPA ( ng/L)			X±SD (%)	变异系数 CV (%)
1	320.91	318.63	398.24	345.93±45.32	13.10
2	304.99	295.89	393.69	331.52±54.03	16.30
3	370.95	277.69	277.69	308.78±53.84	17.44
4	209.46	282.24	291.34	261.01±44.88	17.19
5	239.03	289.07	245.85	257.98±27.13	10.52
6	484.67	427.81	461.92	458.13±28.62	6.25

表 9 B 试剂盒检测新鲜冰冻血浆 FPA 实验结果

样品	FPA ( ng/mL)	5	X±SD (%)	变异系数 CV (%)
----	--------------	---	----------	-------------

7	0.307	0.31	0.303	0.31±0.00	1.15
8	0.313	0.333	0.315	0.32±0.01	3.44
9	0.231	0.232	0.243	0.24±0.01	2.83
10	0.273	0.296	0.287	0.29±0.01	4.06
11	0.343	0.401	0.376	0.37±0.03	7.79
12	0.221	0.22	0.226	0.22±0.00	1.45

A 试剂盒的标准曲线浓度范围为 30 ng/L -480 ng/L, B 试剂盒的标准曲线浓度范围为 0.156 ng/mL-10 ng/mL, 两种试剂检测的样本的结果均位于标准曲线浓度范围内。B 试剂盒平行检测 3 次的变异系数小于 10%, 精密度优于 A 试剂盒。

凝血酶原片段 1,2 采用了不同厂家 (A、B) 的 ELISA 试剂盒进行检测, 结果如下:

表 10 A 试剂盒检测的新鲜冰冻血浆 F<sub>1+2</sub> 实验结果

样品	F <sub>1+2</sub> ( nmol/L)			X±SD (%)	变异系数 CV (%)
1	0.0055	0.0332	0.0401	0.0263±0.0183	69.63
2	0.0401	0.0401	0.0366	0.0389±0.0020	5.12
3	0.9526	0.8731	1.0494	0.9584±0.0883	9.21
4	0.2648	0.2717	0.2475	0.2613±0.0125	4.77
5	0.4964	0.4964	0.4756	0.4895±0.0120	2.45
6	0.7038	0.7902	0.7694	0.7545±0.0451	5.98

表 11 B 试剂盒检测的新鲜冰冻血浆 F<sub>1+2</sub> 实验结果

样品	F <sub>1+2</sub> ( pg/mL)			X±SD (%)	变异系数 CV (%)
7	198.55	200.36	171.27	190.06±16.30	8.57
8	60.36	47.64	49.45	52.48±6.88	13.12
9	44.00	33.09	36.73	37.94±5.55	14.64
10	173.09	193.09	193.09	186.42±11.55	6.19
11	29.45	27.64	36.73	31.27±4.81	15.38
12	33.09	42.18	45.82	40.36±6.56	16.24

A 试剂盒的标准曲线范围是 0.25 nmol/L-8 nmol/L, 实验结果显示, 当样本的 F<sub>1+2</sub> 含量低于标准曲线浓度范围时, 结果的精密度降低, 变异系数增大, 当样本的 F<sub>1+2</sub> 含量位于标准曲线检测范围之内时, 其变异系数低于 10%。

B 试剂盒的标准曲线范围是 46.875 pg/mL-3000 pg/mL, 当样本的 F<sub>1+2</sub> 含量低于标准曲线检测范围时, 结果的精密度降低, 变异系数增大, 当样本的 F<sub>1+2</sub> 含量位于标准曲线检测范围之内时, 其变异系数低于 10%。

凝血因子 Xlla 是凝血因子 XII 激活后的产物, 其升高表明凝血途径被激活。在验证中我们采用 ELISA 试剂盒对凝血因子 Xlla 的含量进行了检测, 以及采用比色法对凝血因子 Xlla 的活性进行了检测, 结果如下:

表 12 新鲜冰冻血浆 FXlla 实验结果 (ELISA)

样品	FXIIa ( ng/mL)			X±SD (%)	变异系数 CV (%)
1	2.336	1.430	2.098	1.95±0.47	24.02
2	3.957	2.050	4.004	3.34±1.11	33.41
3	9.153	6.960	7.389	7.83±1.16	14.84
4	9.773	9.010	9.201	9.33±0.17	4.26
5	9.344	8.915	10.488	9.58±0.81	8.49
6	10.917	10.392	11.346	10.89±0.48	4.39

表 13 新鲜冰冻血浆 FXIIa 实验结果 (比色法)

样品	FXIIa ( PEU/dL)			X±SD (%)	变异系数 CV (%)
7	40.77	42.75	43.88	42.47±1.58	3.71
8	38.65	39.35	42.61	40.20±2.11	5.26
9	29.02	26.47	28.31	27.93±1.32	4.71
10	45.30	47.85	45.02	46.05±4.26	3.39
11	35.11	30.29	31.43	32.28±8.49	7.80
12	34.68	33.83	30.15	32.89±4.39	7.32

ELISA 方法的标准曲线浓度范围为 1.25 ng/mL-40 ng/mL, 由检测结果可知, 样本的 FXIIa 含量均在标准曲线浓度范围内, 但平行检测 3 次的变异系数不稳定。

比色法检测 FXIIa 活性。该方法平行检测 3 次的变异系数小于 10%, 精密度较好。

### 三、主要试验 (或验证) 的分析、综述报告、技术经济论证, 预期的经济效果。

见验证报告。

### 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。

YY/T XXXX 的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。

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、实施日期等内容)

标准发布后，秘书处挂靠单位-济南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、召开标准宣贯会等形式对该标准的技术内容进行宣贯。通过这些措施，该标准在发布之日后 12 个月的过渡期内，足以完成其贯彻和实施。

**九、废止现行有关标准的建议。**

无。

**十、其他应予说明的事项。**

无。

2019 年 7 月 14 日

济南中心