



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1649.2—2019

医疗器械与血小板相互作用试验 第2部分：体外血小板激活产物 (β -TG、PF4 和 TxB2)的测定

Test method for interactions of medical devices with platelet—
Part 2: In vitro platelet activation products (β -TG, PF4 and TxB2) assay

2019-10-23 发布

2020-10-01 实施

国家药品监督管理局 发布

前 言

YY/T 1649《医疗器械与血小板相互作用试验》，包括以下部分：

——第1部分：体外血小板计数法；

——第2部分：体外血小板激活产物(β -TG、PF4 和 TxB₂)的测定。

本部分为 YY/T 1649 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、四川大学(四川医疗器械生物材料和制品检验中心)。

本部分主要起草人：乔春霞、王国伟、袁曦、梁洁、郑利萍。

引 言

对血小板及其激活状态的评价有许多方法,但与血液接触的医疗器械和材料的评价最常用的方法是简单的血小板计数法和血小板颗粒物质的释放法。YY/T 1649 的本部分是体外血小板激活试验的具体试验方法,可作为 GB/T 16886.4 中医疗器械/材料与血小板相互作用评价的补充。

作为血液的重要组分,血小板对于防止出血起关键作用。接触器械/材料后血液中血小板颗粒物质的升高,表明血小板被激活,将直接影响医疗器械/材料的血液相容性。YY/T 1649 的本部分所描述的体外血小板激活产物的测定方法,可用来评价医疗器械/材料对血小板潜在的粘附和激活作用。

医疗器械与血小板相互作用试验

第 2 部分:体外血小板激活产物 (β -TG、PF4 和 TxB2)的测定

1 范围

YY/T 1649 的本部分规定了在体外对医疗器械/材料进行血液相容性评价时,医疗器械/材料与血小板相互作用的体外血小板激活试验方法。本标准适用于医疗器械/材料表面血小板粘附性能和激活潜能的评价。

本部分中建立的试验体系适用于人血。若使用动物血液,可在论证其适宜性的基础上进行试验。

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 16886.4 医疗器械生物学评价 第 4 部分:与血液相互作用试验选择

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

3 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.4、GB/T 16886.12 界定的术语和定义适用于本文件。

4 概述

当医疗器械/材料与人血接触后,血液中颗粒物质的升高可能是医疗器械/材料引起或促进出血或血栓形成的诱因。如果血小板颗粒物质与对照相比显著升高,则表明医疗器械/材料有激活血小板的潜能。常见的血小板颗粒物质主要包括 β -血栓球蛋白(β -TG)、血小板第 4 因子(PF4)和血栓素 B2(TxB2)等。

5 试验原理(以 β -TG 为例)

ELISA 试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中人 β -TG 水平。用纯化的 β -TG 抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入 β -TG,再与辣根过氧化物酶(HRP)标记的 β -TG 抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物四甲基联苯胺(TMB)显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 β -TG 呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中人 β -TG 浓度。

6 试剂和材料

6.1 试剂

6.1.1 人 β -TG、PF4 和 TxB2 ELISA 试剂盒,应由有资质的供应商提供并经过验证。

6.1.2 新鲜健康抗凝人全血。

注 1: 为了防止穿刺时引起的血小板激活,采集的第一管血推荐弃之不用,建议采集的血液在 4 h 之内使用。试验结束后按相关规定处理血液及血液接触后的物品。

注 2: 为了排除溶血引起的干扰,可以考虑选择富血小板血浆 (PRP) 进行试验,并对适宜性进行验证。

6.2 试验对照

6.2.1 阴性对照[例如:高密度聚乙烯(HDPE)]。

6.2.2 阳性对照(例如:胶原蛋白、凝血酶、壳聚糖、ADP 等)。

6.2.3 空白对照(未接触材料的血液)。

注 1: 一种材料或试剂往往并不能同时诱导所有颗粒蛋白产生阳性结果,因此各实验室可以根据实际情况选择适合的阳性对照。如胶原蛋白和凝血酶可能诱导 PF4 和 TxB2 的释放,壳聚糖及适当剂量的 ADP 可能诱导 β -TG 的释放。本部分中的阴性对照和阳性对照仅为推荐,使用者对所选择试验对照的适用性进行确认后,可根据实验室实际情况选择适宜的对照。

注 2: 如需要时,可选择已上市的同类医疗器械作为对照样品。

7 仪器和试验器具

7.1 酶标仪、恒温培养箱、水浴摇床、离心机和制冰机等。

7.2 带盖试管。如试管的材料是促血栓形成的(如玻璃),则会对试验产生潜在的干扰。因此,推荐使用聚乙烯或聚丙烯材质试管。

7.3 血液采集管。含 3.2% (0.109 mol/L) 枸橼酸钠或参照试剂盒要求选用合适的采血管。

7.4 移液管(非玻璃管)。

8 样品制备

制备试验样品、阴性对照、阳性对照和对照样品(如选择),各平行 3 份。按 GB/T 16886.12 的要求制备试验样品,将样品或材料剪成小块以保证血液能完全覆盖试验样品。空白对照同时平行制备 3 份。

注: 增加接触比例理论上会增加测试材料对血小板激活反应的敏感性,可采用其他接触比例如 GB/T 16886.12 推荐的接触比例的 1.5 倍或 2.0 倍。加以说明并阐述理由后,可采用其他模拟临床使用或能对潜在危害进行适当测定的比例。

9 试验步骤

9.1 抗凝人全血,颠倒混匀后室温保存备用。

9.2 将试验样品、阴性对照、阳性对照和对照样品(如选择)放入试管中,按比例在每支试管中加入全血。空白对照为未接触材料的血液。可选择在接触血液前,用相同比例的 0.9% 氯化钠注射液预湿每一试管中的材料,室温静置 30 s,加入血液前移除所有 0.9% 氯化钠注射液。每组平行 3 管。

9.3 所有试管在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的水浴中震荡孵育 $(60 \pm 5)\text{min}$,适宜的转速为 60 r/min。

9.4 孵育 1 h 后,每个试管中加入终浓度为 5 mmol/L 的 EDTA 来终止反应。通常是在 1.0 mL 的人

全血中加入 0.01 mL 的 EDTA(500 mmol/L)来达到适宜的终浓度。

9.5 轻轻混合每一试管,转移全部血液至另一相应标记的试管中,于 1 500g 离心 10 min,取上层贫血小板血浆(PPP)用于检测。也可以根据试剂盒要求制备和保存血浆。

9.6 按试剂盒说明书进行操作。

注:根据实际情况,可能需要将检测样品进行适当稀释。

10 结果计算

10.1 根据试剂盒要求绘制标准曲线,计算 r^2 值和拟合曲线的方程式。

10.2 计算每管中血小板颗粒物质的含量。

10.3 分别计算 3 管试验样品、阴性对照、阳性对照、空白对照和对照样品(如选择)的血小板颗粒物质含量的平均值。

10.4 阳性对照和试验样品中血小板颗粒物质的含量与阴性对照或对照样品(如选择)的含量进行统计学分析, $p < 0.05$ 为具有统计学意义。

10.5 试验样品、阴性对照和阳性对照的平均值除以空白对照的平均值或已上市对照样品(如选择)的平均值。按式(1)计算与空白对照或对照样品(如选择)的百分比。

$$C = \frac{A}{B} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C——试验样品、阴性对照、阳性对照与空白对照/对照样品(如选择)相比的百分比,%;

A——试验样品、阴性对照、阳性对照血小板颗粒物质含量平均值;

B——空白对照/对照样品(如选择)的颗粒蛋白含量平均值。

11 试验有效性

11.1 相关指标应符合试剂盒的要求。

11.2 阳性对照的含量应高于阴性对照,且差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

11.3 阴性对照与空白对照相比的百分数应在 80%~120%范围内。

12 结果评价

12.1 如采用统计学分析进行结果评价,试验样品应与空白对照或阴性对照进行比较,如差异有统计学意义,则与已上市器械进行比较有助于判断试验样品的结果是否可接受。

12.2 如采用百分比进行结果评价,试验样品与空白对照相比的百分比应在 80%~120%范围内,如试验样品与空白对照相比的百分比小于 80%或大于 120%,则与已上市器械进行比较有助于判断试验样品的结果是否可接受。

12.3 所有生物材料都有可能对所接触的血液中血小板产生影响。与生物材料接触的血液中 β -TG、PF4 及 TxB2 其中有一种或几种颗粒物质显著性升高可能预示着血小板的激活。

13 试验报告

试验报告应至少包含以下信息:

a) 试验样品的描述;

- b) 阴性对照、阳性对照、对照样品(如选择)的描述;
- c) 试剂盒信息;
- d) 试验步骤;
- e) 结果记录;
- f) 试验结果;
- g) 结果评价。

参 考 文 献

- [1] ASTM F2888-13: Standard Test Method for Platelet Leukocyte Count—An In-Vitro Measure for Hemocompatibility Assessment of Cardiovascular Materials
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
医疗器械与血小板相互作用试验
第 2 部分:体外血小板激活产物
(β -TG、PF4 和 TxB₂)的测定

YY/T 1649.2—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.org.cn

服务热线:400-168-0010

2019 年 12 月第一版

*

书号: 155066 · 2-34422

版权专有 侵权必究



YY/T 1649.2—2019