

凝血因子类血液制品活性检验的标准化研究

倪 叩 刘新宇*

湖北省药品监督检验研究院 湖北 武汉 430000

摘要：凝血因子类血液制品是用于治疗血友病、获得性凝血功能障碍以及围手术期出血等相关疾病的必需品，其活性高低直接影响到患者的治疗效果及安全性。而活性检测是产品质量控制的重要手段，检测结果的真实性及有效性又取决于所采用检测方法的标准化程度。但是目前对于凝血因子活性检测存在缺乏有效的参考物质、检测方法多样、实验室之间难以进行有效校准、效价赋值不统一等问题，这给产品的质量评判带来了很大的影响。本文基于标准化理论，总结了凝血因子活性检测的方法及其相关标准，阐述了标准化面临的困难，在此基础上提出了一个包括“标准物质溯源—方法学标准—室间质评—效价赋值统一”的四维度标准化方案并给出了实现我国标准向国际靠拢的具体建议，希望对提高我国凝血因子类产品质量标准以及促进我国药品监管科学的发展起到一定的作用。

关键词：凝血因子；血液制品；活性检验；标准化；效价测定；参考物质

引言

凝血因子类血液制品是从健康人血浆中分离纯化而成的一种生物制品，主要有重组人凝血因子Ⅷ、重组人凝血因子Ⅸ、人凝血酶原复合物以及人纤维蛋白原等产品。这些产品主要用于治疗因遗传或获得原因导致的各种凝血因子缺乏疾病患者，对于血友病的预防和按需治疗、肝病相关的凝血功能异常以及严重外伤引起的大量失血均有重要意义。而凝血因子制品最核心的质量属性就是它的生物学活性，也就是每克蛋白质所能产生的促进血液凝固的能力，这也决定了临床上用药量以及疗效。因此，活性测定是凝血因子制品生产过程中的重要控制手段。活性测定的结果直接影响到是否放行，也会影响到医生给患者开具的个性化处方。但是由于活性测定涉及到大量的生物学因素的影响，例如参考物质赋值、所用的方法学原理、使用的仪器设备以及操作人员的操作水平等都会对最终测定结果造成影响，所以不同的实验室之间甚至是同一个实验室的不同批次之间都会出现很大的差异，这也是困扰行业的难题之一^[1]。标准化是解决这个问题的根本方法。目前国际上有世界卫生组织（WHO）和国际血栓与止血学会（ISTH）在凝血因子的标准品生产和活性测定方面做了大量的工作。接下来我们将从活性测定的标准化的角度出发进行讨论，希望能够为中国制定出一套适合国情的标准提供借鉴意义。

1 凝血因子活性检验的方法学基础与标准化要素

1.1 活性检验的生物学原理与主流方法

凝血因子活性测定依据凝血级联反应原理，在一定条件下测定待测标本能否使缺乏某种凝血因子血浆发生

凝固以及所需时间长短反映凝血因子活性高低。目前主要有两类：一类是一期凝固法（基于凝固终点判断的一期法，通常依据活化部分凝血活酶时间APTT原理进行），另一类是二期末物法（发色底物法）。一期凝固法是以凝固终点作为判断标准，操作简单方便，是目前各国药典收载最多的测定方法，但是该方法易受标本中其他物质（如肝素、狼疮抗凝物等）干扰，且对乏因子血浆的质量要求很高。二期末物法则是在凝血因子被激活以后产生的一种蛋白质水解酶，能够分解预先设计的人工合成底物，通过测定酶活力大小来推算凝血因子活性，该方法准确度高，干扰相对较小，但是需要昂贵仪器以及高质量试剂耗材。值得注意的是，不同凝血因子适用的凝固体系有所区别，如FⅧ、FⅨ检测通常基于APTT系统，而FⅡ、FⅦ、FⅩ检测则需基于凝血酶原时间（PT）系统，在实际方法学标准化中需予以区分。

1.2 标准化的核心要素识别

标准化是为了使某一方面获得最佳秩序而制定共同和重复使用的规则的一种活动。凝血因子活性检测标准化主要包括以下几个方面：一是参考物质，即国际标准品（IS）、工作标准品（WS）以及内部对照品等，它们的赋值准确性和一致性是整个标准化的基础；二是所用的方法，包括样本稀释比例、使用的试剂及其制备过程、孵育条件、终点判断标准等细节；三是实验室的操作，包括工作人员的培训、仪器的校正、环境条件以及数据分析等；四是效价表示，包括效价单位的概念、计算方法（例如平行线法或者斜率比法）以及结果的表述形式等。这四个相互联系，在任何一个环节发生变化都会影响最后的结果。

2 当前活性检验标准化的主要问题与难点

2.1 参考物质溯源体系不完整

WHO国际标准品是全世界用于测定凝血因子活性最高计量标准,其赋值经过多个实验室合作完成。但是国内大部分凝血因子生产厂以及各省市级食品药品检验所使用的工作标准品多为自制,其赋值基于对WHO国际标准品进行校准而来,在校准时因为WHO国际标准品数量有限、价格较高并且有效期较短,部分单位在标准品换代衔接时可能存在校准频率不足或未充分关注代次间效价漂移的风险,这一环节对标准品赋值传递的准确性构成潜在影响^[2]。另外各种不同的凝血因子(如FⅧ、FIX、FⅡ、FⅦ、FX等)其标准品发展程度各异,某些因子的国际标准品未能及时更新,造成溯源链路在最初就存在问题。

2.2 方法学差异导致的结果不可比

一期凝固法和发色底物法之间存在的本质区别导致使用不同的方法对同样的标本进行测定可能会得到在统计学上有显著差异的结果。而且即使是凝固法,不同厂家生产的凝血仪器、不同来源的活化剂(如白陶土、鞣花酸、硅藻土等)、不同批号的乏因子血浆都会影响到凝固终点的判断。而在我国临床检测中,由于部分实验室在具体操作规程上存在差异,稀释液的选择、孵育时间和稀释度设定等细节并不完全统一,这些“隐性因素”叠加后可能造成实验室间检测结果的偏差超出生物学变异允许的合理范围,从而影响产品效价判定的客观性。

2.3 实验室间校准与协同评估机制薄弱

国际血液学标准化委员会(ICSH)、ISTH会不定期举办国际室间质量评价活动(EQAS),发放盲样以评价全世界各参比实验室检测结果的一致性。虽然中国已经开展了一些血液制品相关室间质评工作,但是专门针对凝血因子活性检测的标准化室间质评活动相对较少,参与单位数量不多,频次不高,而且对于出现问题的原因缺少系统的反馈以及改进措施^[3]。因此造成很多实验室有持续性的系统性问题却不能发现,同时同时也在一定程度上制约了区域性或者行业层面特异性校正因子的制定。

2.4 效价赋值方式与临床用量的脱节

目前药典规定效价测定以生物学活性单位(IU)表示,而这个单位是通过统计方法获得(例如随机区组设计、四参数逻辑模型拟合等)。但是这个单位与临床上病人使用时反应之间并没有建立起联系。不同的产品虽然标注相同活性单位,但由于它们所含有的分子成分不同(比如vonWillebrand因子含量不同或者凝血因子被激活的程度不同),所以在人体内的止血作用也有可能不一

样。这种现象提示我们,在现有IU基础上亟需引入更多反映产品分子异质性的质控指标,以更好地桥接“实验室效价”与“临床疗效”,这也是标准化工作向临床端延伸所面临的新挑战。

3 凝血因子活性检验标准化体系的构建路径

3.1 完善三级参考物质体系的建设与溯源管理

建立“国际标准品—国家/行业工作标准品—企业内部参考品”的三级溯源体系。首先是积极参加WHO国际协作标定研究,使国内具备条件的优秀实验室成为国际标准品赋值合作单位,提高中国在凝血因子国际标准化中的影响力;其次是由中国食品药品检定研究院负责研制及标化国家工作标准品,包括FⅧ、FIX、PCC等多种产品,在多个实验室之间进行复核后确定其值并发放到各地方检测机构以及相关企业;最后对于企业自身而言要制定企业内部参考品定期校准方案,每隔半年至一年对企业内部参考品进行校准,保存好标准品稳定性监测结果以保证从最高等级标准到常规检测的所有环节均可追溯。

3.2 制定方法学操作规范与标准作业程序

在《中国药典》通则基础上,对每一种凝血因子品种分别制定详细的操作层面的一致性标准作业程序(SOP)。该SOP要包括如下内容:取样前样品收集、制备、保存方式;稀释液种类、pH值以及离子强度;活化剂种类及其浓度范围;乏因子血浆来源的要求(残留因子活性最大允许量、无抑制物等);凝固终点判定的质量控制标准;标准曲线中的浓度点以及复管要求;平行线或者斜率比的统计方法及其适用性评价标准^[4]。另外还要有方法学变更的记录以及确认工作——如果实验室使用不同的主要试剂批次、不同仪器型号或者不同的检测方法,则需要做桥接实验来保证两种情况下的检测结果具有一致性。

3.3 构建常态化的室间质量评估与偏差校正机制

制定针对全国所有凝血因子制品批签发检验机构以及相关生产企业的质控实验室开展专项室间质量评价方案。每年至少两次,每次发放经过国际标准品准确校正的盲样(包括各种不同的活度、不同因子种类),要求各参加单位在限定时间内用平时的方法检测后将真实值及计算结果上报给主办方。主办方采用稳健统计学方法(如中位数±四分位距)作为目标值以及允许误差界限,对于结果超出合理偏差范围(如基于稳健统计方法设定的警告限和行动限)的实验室发出整改通知书,并要求其在规定的时间内提交原因分析及改进措施。连续多次评价不合格且未有效整改的实验室,需暂停其相关项目

的检测资质。

3.4 推动效价赋值标准化与临床相关性的统一

关于效价赋值与临床效应的关系，建议进行大规模、多中心回顾性研究，获取各种产品实验室活性值与其临床给药剂量及止血效果的相关资料，从而提出“校正效价”或者“临床相关活性”的概念。从标准化角度，在已有的IU基础上，添加产品特性描述（例如FVIII制品中VWF:RCO/FVIII:C比率、FIX制品活化程度指数等），使效价更具象化。另外还要及时参加国际上的相关研讨会（如WHO生物制品标准化专家委员会会议），了解世界范围内效价赋值的发展趋势，使中国的标准与国际上最前沿的标准相一致。

4 标准化推进的制度保障与技术展望

4.1 法规标准层面的顶层设计

推进凝血因子活性检测标准化应先在法律上确定其必要性和严肃性。当前《中国药典》2025年版已正式实施，建议在其现有相关通则框架下，进一步制定或细化“凝血因子活性检测标准化指导原则”，明确对参考物质的要求、方法学评价标准以及实验室能力考核等强制性或指导性规定。同时，国家药监局也可将室间质控达标作为凝血因子类产品生产企业通过GMP认证的前提条件，以此促进标准化达成共识。

4.2 行业协作平台的建设

标准化工作是需要整个行业共同参与的大事。可以考虑在中国输血协会或者中国食品药品企业质量安全促进会的基础上，建立“血液制品质量控制标准化专业委员会”，不定期地召开技术研讨会和技术培训课程，编写标准化操作手册及常见问题解答，建立检验结果共享平台，收集所有实验室的质量控制数据并发布年度汇总报告，以达到行业内自我管理的目的。

4.3 新技术对标准化的赋能

随着分析技术发展，质谱法、高效液相色谱法等理

化方法日益成熟，能够提供凝血因子蛋白质含量的精准信息。虽然这些理化方法无法直接替代基于功能学原理的生物学活性检测，但可作为“比活性”指标的有力补充，与生物学活性测定相互印证，共同为产品质量提供更全面的评价维度。同时，人工智能辅助凝固终点自动判断方法以及微流控芯片检测平台等新技术的应用也将降低人为因素造成的偏差，使标准化更加坚实可靠。

5 结语

凝血因子类血液制品的应用价值毋庸置疑，但是其活性检测的规范化程度与小分子化学药物相比仍有较大差距。本文总结了该领域规范化的关键因素以及存在的问题，提出以建立三级参考物质体系、统一检测方法学要求、开展常规室间质量评价以及对临床相关性进行重新评估作为主要措施来推进凝血因子类血液制品活性检测规范化的工作思路。这需要监管部门、检验实验室、生产厂家和相关行业协会齐心协力，同时也应该学习借鉴WHO以及欧美药典的相关做法，但是也要考虑中国血浆来源、产品种类以及检测资源的情况。伴随着我国药品监管科学发展，凝血因子类血液制品活性检测规范化也将由理想变为现实，成为推动整个行业健康发展的强大动力。

参考文献

- [1]侯继锋,王箫舟,周勇.凝血因子活性测定标准化的现状与挑战[J].中国生物制品学杂志,2024,37(3):321-327.
- [2]张磊,刘斌,陈云.发色底物法与凝固法测定人凝血因子VIII活性的可比性研究[J].中国输血杂志,2023,36(5):412-417.
- [3]王玉梅,赵丹,李刚.我国血液制品质量控制标准化的进展与思考[J].药物分析杂志,2023,43(8):1298-1305.
- [4]周勇,梁争论,王军志.生物制品标准物质溯源体系的构建与国际比较[J].中国药事,2021,35(4):398-405.