

## • 检验仪器与试剂评价 •

## 脐带血库启用新冷冻贮存袋的验证研究\*

陈劲松, 吴洁莹, 陆 琰, 谢闰娥, 许遵鹏, 李 焱

(广州市妇女儿童医疗中心脐血库, 广东广州 510623)

**摘要:**目的 新型号的脐带血冷冻贮存袋启用前,需要进行一系列的测试,以验证贮存袋能否达到脐带血冷冻贮存的使用要求。**方法** 抽取 28 个新型号冷冻贮存袋,按照标准操作程序将脐带血细胞冷冻保存和溶解复温,然后检测贮存袋的物理完整性及袋内脐带血细胞的各项质量指标,项目包括有核细胞活率、细胞回收率、CD34 阳性细胞、干细胞集落培养、无菌测试以及验证贮存袋的最大装载容量。**结果** 28 个测试的贮存袋,均通过了完整性测试,所保存的细胞各项检测指标符合使用要求。**结论** 新型贮存袋性能效果与原来的基本一致,并确认 50 mL 规格贮存袋装载 50 mL 液体、250 mL 贮存袋装载 80 mL 液体是安全的。

**关键词:**冷冻贮存袋; 低温储存; 脐带血; 造血干细胞; 液氮

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.20.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)20-2820-03

## A validation study of starting use of new freezing bags in cord blood bank\*

Chen Jinsong, Wu Jieying, Lu Yan, Xie Gui'e, Xu Zunpeng, Li Yan

(Cord Blood Bank, Guangzhou Women and Children Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China)

**Abstract: Objective** To verify whether the storage bag can reach the use requirement of cord blood freezing storage by conducting a series of tests before starting use of new type cryopreservation bag for cord blood. **Methods** According to the standard operation procedure, 28 new type cryopreservation bags were extracted. The cord blood units were performed the cryostorage and thaw for rewarming according to the standard operating procedures. Then the physical integrity and various quality indicators of cord blood in bag were detected, including the nucleated cell viability, cell recovery rate, CD34-positive cell, colony-forming cultivation of stem cells, sterility test and verification of actual load volume. **Results** All the tested storage bags passed the integrity test, and the various testing indicators of the preserved cells conformed to the use requirements. **Conclusion** The new type storage bag has the same performance and effect to original bag, it is verified that the maximum loading volume of 50 mL (for 50 mL specification of storage bag) and 80 mL (for 250 mL specification of storage bag) is safe.

**Key words:** freezing storage bag; cryopreservation; cord blood; hematopoietic stem cells; liquid nitrogen

脐带血造血干细胞保存于深低温液氮中(-196℃),为了保障干细胞的冷冻保存效果,需要选用材料合适、质量优良的冷冻保存血袋,并制定严格的操作规程。标准操作规程中任何一项改动,都需要评估对产品质量的影响。因此作为关键材料,启用新型号冷冻贮存袋之前,必须进行相应的评估测试,确保现有的质量体系能正常运行。

**1 材料与方**

**1.1 材料来源** 随机抽取规格为 50 mL 和 250 mL 的新型号冷冻贮存袋共 28 个,同时用 10 个旧型号的冷冻贮存袋作为对照。每个贮存袋内装入含 10% (v/v) 二甲基亚砜(DMSO)的脐带血干细胞,有细胞浓度(TNC)范围是  $6.0 \times 10^9/L$  至  $13.7 \times 10^9/L$ 。冷冻贮存袋用高频热合机封口后,放入铝制保护盒中,经程控降温仪降温至-100℃之后,立即放入-196℃的液氮罐中,深低温保存至少 6 周,然后进行测试。

**1.2 仪器与试剂** 新型号的脐带血冷冻贮存袋 CryoMACS 由德国 Miltenyi Biotec 公司生产, CryoMACS 贮存袋批号为 6111114002、6120418008、6110927001。旧型号的冷冻贮存袋由 Cryocyte 美国百特公司生产, Cryocyte 贮存袋批号为 H08J15034、H09L03035。DMSO USP2D1S 由德国 WAK-

Chemie Medical 公司生产,程控降温仪 Kryo550 由英国 Planer 公司生产,液氮贮存罐 MVE 205 由美国查特公司生产,全自动血细胞计数仪器 Coulter diff 2 由美国贝克曼库尔特公司生产,流式细胞仪 BD FACSanto II 由美国 BD 公司生产。

**1.3 方法** 冷冻贮存袋经过至少 6 周的深低温液氮保存,然后将冷冻贮存袋取出,在 37℃ 温水中解冻融化,进行检测。

**1.3.1 贮存袋的物理完整性** 融化后,将每个贮存袋放置于两张吸水纸之间。以吸水纸轻压并揉搓贮存袋和导管封口。核查吸水纸是否沾染血迹,检查贮存袋是否裂缝或接缝、接口或封口的泄漏。

**1.3.2 贮存袋的质量检测** 从贮存袋中抽出脐带血进行以下检测,判断脐带血干细胞产品经 CryoMACS 贮存袋保存后的质量:(1)有核细胞活率检测。用台盼蓝染色法检测细胞的活率,通过对比冷冻贮存前的数据,计算出有核细胞活率的回收率。(2)总有核细胞(TNC)回收率。用全自动血细胞计数仪检测血细胞的浓度,通过对比冷冻贮存前的数据,计算出 TNC 回收率。(3)CD34 阳性细胞回收率。用 BD FACSanto II 流式细胞仪检测脐血 CD34 阳性细胞数,通过对比冷冻贮存前的数据,计算出 CD34 阳性细胞回收率。(4)造血干/祖细胞集落检

\* 基金项目:广东省科技厅项目(2011B031800375);广州市卫生局项目(201102A213061);博士启动项目(201011)。 作者简介:陈劲松,男,主管技师,主要从事医学检验研究。

测。使用 MethoCult H4434 甲基纤维素培养基,检测脐血集落形成细胞(CFU)。无菌技术抽取解冻后的脐带血 1 mL,用等量的 RPMI-1640 和 5%血清蛋白溶液混匀洗涤,离心去除上清液从而将 DMSO 洗脱,然后定量接种  $1 \times 10^5$  个有核细胞于甲基纤维素培养基中,放入二氧化碳培养箱培养 14 d,计算观察总细胞集落生长情况(包括 BFU-E、CFU-GM、CFU-GEMM 集落)。通过对比冷冻贮存前的检测数据,计算出总集落回收率。

(5)细菌、真菌培养检测。无菌技术抽取 4~8 mL 解冻后的脐带血,接种到血培养瓶,用 bioMerieux Bact/ALERT 3D 自动微生物培养监测系统检测。

**1.3.3 贮存袋安全容量验证** CryoMACS 贮存袋是容量为 50 mL 和 250 mL 的冷冻贮存袋,其使用说明书推荐使用容量分别是 10~20 mL 和 30~70 mL,若超出这个范围,则需要用户自行测试确认。根据研究者以往使用 Cryocyte 贮存袋的经验以及实际操作流程,将最大装入量设定为 50 mL(50 mL 规格)和 80 mL(250 mL 规格)并进行测试,接受测试的 28 个贮存袋,有 14 个贮存袋是 50 mL 规格(货号 200-074-400),测试中装载 50 mL 脐带血,另外 14 个贮存袋是 250 mL 规格(货号 200-074-401),测试中装载 80 mL 脐带血。

**1.4 判断是否合格的标准** 作为新型号或规格的冷冻贮存袋,根据脐血库标准操作规程要求,要达到以下标准:(1)贮存袋在使用过程中尤其是解冻融化后无变形爆裂泄漏,结构完整;(2)贮存袋解冻融化后,受测试样品细胞活率大于或等于 70%;(3)贮存袋解冻融化后,受测试样品 TNC 回收率应大于或等于 80%(与冻存前的样品数据比较);(4)贮存袋解冻融化后,受测试样品 CD34 细胞回收率应大于或等于 70%(与冻存前的样品数据比较);(5)贮存袋解冻融化后,受测试样品应有集落形成细胞形成;(6)贮存袋解冻融化后,受测试样品细菌真菌检测结果应为阴性。

**2 结 果**

总共对 3 个批次 28 个 CryoMACS 贮存袋进行了测试,包含 50 mL 和 250 mL 两种容量规格,经过标准操作程序进行冷冻保存和解冻复温验证,确认其装载容量不超过 50 mL 和 80 mL 时,可以安全使用。根据本单位的操作流程,分别将新型号的贮存袋的装载容量上限设定为 50 mL 和 80 mL。所有测试的 28 份样本解冻复温后经细菌培养检查,无细菌和真菌生长。解冻融化后的 CryoMACS 贮存袋,全部通过了物理完整性测试,符合冷冻贮存袋完整性所要求的验收标准。检测冷冻保存和解冻融化后的细胞活率、TNC、CD34、CFU 数量的回收率,结果均符合判断标准(活率大于或等于 70%、TNC $\geq$ 80%、CD34 $\geq$ 70%、CFU 检测有集落形成细胞生长)。新型号贮存袋的性能指标与原来使用的贮存袋基本一致(相差小于 10%,符合脐血库质量规程的要求),见表 1。

**表 1 脐带血细胞活率、TNC、CD34、CFCs 4 项检测指标的回收率(%)**

项目	CryoMACS 贮存袋			Cryocyte 贮存袋		
	$\bar{x}$	s	范围	$\bar{x}$	s	范围
活率回收率	91	1.0	89~95	90	1.4	86~95
TNC 回收率	97	3.2	89~104	95	3.0	89~98

**续表 1 脐带血细胞活率、TNC、CD34、CFCs 4 项检测指标的回收率(%)**

项目	CryoMACS 贮存袋			Cryocyte 贮存袋		
	$\bar{x}$	s	范围	$\bar{x}$	s	范围
CD34 回收率	88	9.7	80~116	90	9.1	75~112
CFU 回收率	84	17.0	60~113	82	19.0	62~114

**3 讨 论**

脐带血干细胞是造血干细胞移植的重要细胞来源,脐带血经过采集、检测、有效成分收集分离等处理程序后,装入冷冻贮存袋,在-196℃的液氮里面深低温长期保存,当临床需要输注脐带血时,再从液氮中取出,于 37℃温水中快速解冻复温。冷冻贮存袋在性能上要求能抵御-196℃的低温以及解冻复温时近 233℃的温差,因此脐血库使用的冷冻贮存袋跟普通的一次性使用塑料采血袋在性能和制造成本上有明显的区别。

美国 Baxter 公司生产的 Cryocyte Freezing Container 贮存袋是近 16 年来全球使用最广泛的冷冻贮存袋之一,受其停产的影响,需要替代产品。在选择新产品的过程中,研究者参考了国内外的血液研究中心以及美国食品药品监督管理局(FDA)的数据资料<sup>[1-4]</sup>,并制定了相应的新产品选用、采购验收和质量评估的标准操作程序。

目前获得中国食品药品监督管理局(CFDA)批准注册的产品有两个,其注册商标名分别是 CryoMACS 和 Cryostore,在国际市场上已经获得 FDA 认可的上市产品主要有:CryoMACS Freezing Bag 贮存袋(德国 Miltenyi Biotec 公司生产);Cryostore Freezing Bags 贮存袋(美国 OriGen BioMedical 公司生产);Cell-Freeze Cryogenic Storage Container 贮存袋(美国 Charter Medical 公司生产);CryoSC Freezing Bag 贮存袋(瑞士 Biosafe SA 公司生产);Pall Freezing Bags 贮存袋(Pall Medical 公司生产)。这些上市产品的原材料大部分选用乙烯-醋酸乙烯共聚物(EVA),小部分选用 PO、聚氯乙烯(PVC)或氟化乙丙烯(FEP)。相比之下,EVA 作为原材料,在使用中具有较好的撞击承受力和较低的破损率<sup>[5]</sup>。

根据 Khuu 等<sup>[6]</sup>报道的 1 204 例冷冻贮存袋解冻融化结果,即使是注册合格的产品,某些批次的贮存袋使用过程中发生破裂的比例也高达 9.6%。美国明尼苏达大学 Thyagarajan 等<sup>[7]</sup>报道的 679 例细胞冷冻保存案例,有 24 例(3.5%)发生冷冻贮存袋破裂,并且大部分是发生在解冻融化过程。可见使用前对每一批次的产品抽检测试的重要性。引起贮存袋破裂的其中一个重要原因是袋内所装液体的量过多。因此使用者要测试贮存袋的最大装载量,确定一个安全上限。CryoMACS 贮存袋的产品说明书推荐使用容量分别是 10~20 mL(针对 50 mL 规格产品)和 30~70 mL(针对 250 mL 产品),若超出这个范围,则需要用户自行测试确认。显然按照这个推荐容量使用,将会十分浪费贮存空间。研究者根据以往使用 Cryocyte 冷冻贮存袋的经验,考虑到血液冷冻形成固体后体积变大,袋内空气在解冻过程中体积会增加等因素,将 50 mL 规格的贮存袋装载容量定为 50 mL,将 250 mL 规格的贮存袋装载容量定为 80 mL,并通过了测试,整个使用过程中无发生破损爆裂情况。

值得注意的是冷冻保存血液时添加的冷冻保护剂 DMSO

会对塑料有一定的降解作用<sup>[8-9]</sup>,可能会令含有 PVC 成分的贮存袋释出有害物质邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP),因而生产厂家要求贮存袋内 DMSO 的浓度不能超过 20%。鉴于 DMSO 会对塑料的降解作用,用户在测试过程中,一定要加入 DMSO 来测试,研究者是按 10% 的 DMSO 使用常规来进行测试。

此次启用新冷冻贮存袋的原因是 Baxter 公司停产 Cryocyte 冷冻贮存袋,需要选用其他品牌的冷冻贮存袋。经过实验室正确度试验,新型号的冷冻袋在材质、工艺、规格、性能效果上与原来的 Baxter 公司的产品基本一致,符合本脐带血库现行的标准操作程序要求。

#### 参考文献

- [1] Pomper GJ, Wilson E, Isom S, et al. A validation study of new cryopreservation bags for implementation in a blood and marrow transplant laboratory[J]. Transfusion, 2011, 51(6):1291-1295.
- [2] Dijkstra-Tiekstra MJ, Setroikromo AC, Wildt-Eggen J. Freezing of stem cells in a bag and tube under various freezing conditions? [J]. Vox Sang, 2012, 102(3):273.
- [3] Abbruzzese L, Michieli M, Rupolo M, et al. A new freezing and storage procedure improves safety and viability of haematopoietic stem cells and neutrophil engraftment: a single institution experi-

ence[J]. Vox Sang, 2010, 98(2):172-180.

- [4] Rabe F, Kadidlo D, Van Orsow L, et al. Establishment of an unrelated umbilical cord blood bank qualification program: ensuring quality while meeting Food and Drug Administration vendor qualification requirements[J]. Transfusion, 2013, 53(10):2243-2247.
- [5] Hmel PJ, Kennedy A, Quiles JG, et al. Physical and thermal properties of blood storage bags: implications for shipping frozen components on dry ice[J]. Transfusion, 2002, 42(7):836-846.
- [6] Khuu HM, Cowley H, David-Ocampo V, et al. Catastrophic failures of freezing bags for cellular therapy products: description, cause, and consequences[J]. Cytotherapy, 2002, 4(6):539-549.
- [7] Thyagarajan B, Berger M, Sumstad D, et al. Loss of integrity of umbilical cord blood unit freezing bags: description and consequences[J]. Transfusion, 2008, 48(6):1138-1142.
- [8] Laura C, Susan B, Bas-Davis S, et al. Development and Implementation of a Computerized System for Collection, Processing, and Administration of Cellular Therapy Products [J]. J Oncol Prac, 2012, 8(5):262-266.
- [9] 贾国荣. 二甲基亚砜临床应用的安全性国内外研究现状[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11):1284-1286.

(收稿日期:2014-05-11)

(上接第 2819 页)

险管理的兴起将人们的观念又向前推进了一步<sup>[10-11]</sup>,其前提是识别和分类风险,统计技术在制定相应的质量控制计划中也将发挥不可或缺的重要作用。

#### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部医政司编. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 20468 临床实验室定量测定室内质量控制指南[M]. 秦皇岛:中国标准出版社,2006.
- [3] Clinical Laboratory Standards Institute. C24-A3 Statistical quality control for quantitative measurement procedures: principles and definitions: approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2006.
- [4] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2003.
- [5] Westgard JO. Statistical quality control procedures[J]. Clin Lab

Med, 2013, 33(1):111-124.

- [6] Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, et al. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry [J]. Clin Chem, 1981, 27(3):493-501.
- [7] 王云峰. 统计学原理:理论与方法[M]. 上海:复旦大学出版社, 2010.
- [8] 王治国, 居漪, 王薇. 临床检验质量规范[J]. 检验医学, 2012, 27(12):984-988.
- [9] 何法霖, 王薇, 钟堃, 等. 临床血液学检验项目质量规范的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(18):2302.
- [10] Westgard S. Prioritizing risk analysis quality control plans based on Sigma-metrics[J]. Clin Lab Med, 2013, 33(1):41-53.
- [11] Westgard JO. Perspectives on quality control, risk management, and analytical quality management [J]. Clin Lab Med, 2013, 33(1):1-14.

(收稿日期:2014-05-14)

## 统计资料类型

统计资料共有三种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。