



中华人民共和国国家标准

GB/T 16886.4—2003/ISO 10993-4:2002

医疗器械生物学评价 第4部分：与血液相互作用试验选择

Biological evaluation of medical devices—
Part 4: Selection of tests for interactions with blood

(ISO 10993-4:2002, IDT)

2003-03-05 发布

2003-08-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

GB/T 16886 的本部分等同采用国际标准 ISO 10993-4:2002《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 的总题目是医疗器械生物学评价，由下列部分组成：

- 第1部分：评价与试验；
- 第2部分：动物保护要求；
- 第3部分：遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验；
- 第4部分：与血液相互作用试验选择；
- 第5部分：体外细胞毒性试验；
- 第6部分：植入后局部反应试验；
- 第7部分：环氧乙烷灭菌残留量；
- 第8部分：生物学试验参照材料的选择与限定；
- 第9部分：潜在降解产物的定性与定量框架；
- 第10部分：刺激与致敏试验；
- 第11部分：全身毒性试验；
- 第12部分：样品制备与参照样品；
- 第13部分：聚合物降解产物的定性与定量；
- 第14部分：陶瓷降解产物的定性与定量；
- 第15部分：金属与合金降解产物的定性与定量；
- 第16部分：降解产物与可溶出物毒代动力学研究设计；
- 第17部分：可溶出物允许限量的确立；
- 第18部分：材料化学定性。

有关其他方面的生物试验将有其他部分的标准。

本部分的附录A、附录B、附录C均为资料性附录。

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归口。

本部分起草单位：国家药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心、天津市医用生物材料监测研究中心。

本部分主要起草人：由少华、史弘道、吴平、刘欣。

引 言

医疗器械与血液相互作用试验方法的选择和设计应考虑器械设计、材料、临床有效性、使用环境和风险受益情况,这些具体要求只能包括在产品标准中。

GB/T 16886 本部分的原始出处是《美国国家心、肺、血液研究工作组报告^[29]第9章和第10章:血液/材料相互作用指南》。该报告目前已进行了修订^[32]。

医疗器械生物学评价

第 4 部分:与血液相互作用试验选择

1 范围

GB/T 16886 的本部分给出了医疗器械与血液相互作用评价的通用要求。GB/T 16886 的本部分规定了:

- a) 按照 GB/T 16886. 1/ISO 10993-1 规定的预期用途和接触时间对接触血液的医疗和牙科器械进行分类;
- b) 器械与血液相互作用基本评价原则;
- c) 根据具体器械分类,结合试验基本原理和科学依据选择给定试验的原则。

由于受器械与血液相互作用方面的认识以及试验的准确度所限,不能规定详细的试验要求,因而 GB/T 16886 的本部分只是对生物学评价进行概括性的描述,不对具体器械提供试验方法指南。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 16886 本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 16886. 1—2001 医疗器械生物学评价 第 1 部分:评价与试验(idt ISO 10993-1:1997)

GB/T 16886. 2—2000 医疗器械生物学评价 第 2 部分:动物保护要求(idt ISO 10993-2:1992)

3 术语和定义

GB/T 16886. 1/ISO 10993-1 中确立的以及下列术语与定义适用于 GB/T 16886 本部分。

3.1

血液/器械相互作用 blood/device interaction

血液或血液成分与器械间的相互作用所导致的对血液、器官、组织或器械的影响。

注:这些影响或许有/或无临床意义或不希望产生的后果。附录 A 给出了血液或血液成分与器械间的相互作用方面的详细信息。

3.2

半体内 ex vivo

试验系统用术语。该系统是从人体或试验动物体直接将血液引入一个置于体外的试验容器中。

注:如果使用动物模型,血液可直接返回动物体内(循环),也可收集至试管内进行评价(单向通过)。

3.3

血栓形成 thrombosis

由血栓引起的血管、器械部分或完全闭塞的体内现象。

注 1:血栓形成的定性包括在动物或临床装置上进行的半体内和体内方法。

注 2:血栓由红细胞、聚集血小板、纤维蛋白和其他细胞成分组成。

3.4

凝血 coagulation

凝血因子级联活化作用所致的现象。

注：体内或体外接触器械之后，可测定凝血级联因子和纤维蛋白溶解系统。

3.5

血小板 platelet

存在于循环中的无核细胞体，粘附于表面并聚集成止血栓子以减少出血。

注：血小板试验包括血小板定量测定以及血小板结构与功能的分析。试验包括分析血小板释放的或粘附于器械表面的血小板因子或血小板表面成分。

3.6

血液学 haematology

对血液方面的研究，包括对血细胞和血浆成分的定量测定。

3.7

补体系统 complement system

先天免疫系统的一部分，由数种血浆蛋白质组成，包括酶和细胞受体。

注：补体成分产生的效应分子，与炎症、吞噬作用和细胞溶解有关。

4 缩略语

下列缩略语适用于本部分。

Bb	替代途径补体激活产物
β-TG	β-血栓球蛋白
C4d	经典途径补体激活产物
C3a, C5a	从 C3 和 C5 裂解出的(活化的)补体产物
CD62L	L-选择素
CH-50	50%溶血的补体
CT	计算机断层摄影技术
D-Dimer	特异纤维蛋白降解产物(因子 X Ⅲ交联纤维蛋白)
ECMO	体外膜氧合器
ELISA	酶联免疫吸附试验
EM	电子显微镜
FDP	纤维蛋白/纤维蛋白原降解产物
FPA	纤维蛋白肽 A
F ₁₊₂	凝血酶原激活片段 1+2
iC3b	中央 C 补体激活产物
IVC	下腔静脉
MRI	磁共振成像
PAC-1	能识别血小板表面糖蛋白 II b/Ⅲ a 激活形态的单克隆抗体
PET	正电子断层 X 线摄像
PF-4	血小板因子 4
PRP	富血小板血浆
PT	凝血酶原时间
PTT	部分凝血激活酶时间
P-selectin	血小板或内皮细胞释放反应期间显露的受体

RIA	放射免疫测定
S-12	血小板释放反应期间识别显露的 α 颗粒膜成分 P-selectin 的单克隆抗体
SC5b-9	末端途径补体激活产物
TAT	凝血酶-抗凝血酶复合物
TCC	末端补体复合物
TT	凝血酶时间
VWF	von Willebrand 因子

5 与血液接触器械的类型(按 GB/T 16886.1/ISO 10993-1 分类)

5.1 非接触器械

例如体外诊断器械。

5.2 外部接入器械

这类器械与循环血液接触,作为通向血管系统的管路。如 GB/T 16886.1/ISO 10993-1 中所包括的器械。

a) 与血路间接接触的外部接入器械包括以下器械(不局限于此):

- 插管;
- 延长器;
- 血液采集器械;
- 血液及血制品贮存和输注器械(如管、针、袋);
- 细胞贮存器;

b) 与循环血液接触的外部接入器械包括以下器械(不局限于此):

- 动脉粥样硬化切除术器械;
- 血液监测器;
- 导管;
- 导丝;
- 血管内窥镜;
- 血管内超声器械;
- 血管内激光系统;
- 冠状逆行灌注导管;
- 心肺旁路回路;
- 体外膜式氧合器;
- 血液透析器/血液过滤器;
- 血液成分采输器;
- 血液特异性物质吸附器;
- 心血管介入器械;
- 经皮循环辅助系统。

5.3 植入器械

植入器械大部分或全部植入血管系统,包括以下器械(不局限于此):

- 瓣膜成形环;
- 机械或组织心脏瓣膜;
- 人工或组织血管移植物;
- 循环辅助器械(心室辅助器械、人工心脏、动脉内球泵);
- 下腔静脉过滤器;

- 栓塞器械；
- 血管内植入物；
- 植入式除颤器和复律器；
- 支架；
- 动静脉分流器；
- 血液监测仪；
- 血管内药物释放导管；
- 起搏器导线；
- 血管内膜式氧合器(人工肺)；
- 去白细胞滤器。

6 血液相互作用特性

6.1 总则

6.1.1 图1列出了一个判定流程图,可用于确定是否需要进行血液相互作用试验。

根据检测的主要过程或系统可将血液相互作用分为五类。

表1和表2列出了与循环血液接触器械举例和器械适用试验类别。

注:本标准是一协调性标准,在器械具体特性的基础上可研究制定出合理的原理来证明不同类型的选择。血栓形成试验为判定器械性能的常用优选方法,在很多情况下,血栓形成试验综合了凝血、血小板、血液学和补体系统试验原理。

医疗器械如已有产品标准,标准中的生物学评价要求和试验方法优先于本部分的总则。

6.1.2 如有可能,试验系统应模拟器械临床使用时的几何形状和与血液接触的条件,包括接触时间、温度、灭菌条件和血流条件。对有一定几何形状的器械,应评价试验参数(浓度每单位体积)与接触表面积(cm^2)之比。

只对血液接触部件进行试验,应根据当前技术水平选择方法和参数。

6.1.3 试验应设立相应的对照,除非能证明这些对照可以省略。如有可能,试验应包括临床已应用过的相关器械或经鉴定过的参照材料^[7]。

所用参照材料应包括阴性对照和阳性对照。所有供试材料和器械应符合制造商和实验室的全面质量控制和质量保证规范,并应能识别出材料和器械的来源、制造商、等级和型号。

6.1.4 对器械部件待选材料可能会进行筛选试验。但该类试验不能替代完整供试器械或器械部件在模拟或加严的临床应用条件下进行的试验。

6.1.5 如不是模拟器械使用条件进行的试验,或许不能准确反映出临床应用中发生的血液/器械相互作用的性质,如一些短期体外或半体内试验难以预示长期的体内血液/器械相互作用^{[25][26]}。

6.1.6 根据以上所述,预期用于半体内(外部接入器械)的器械应在半体内条件下进行试验,而用于体内(植入物)的器械则应在尽可能模拟临床使用的条件下,在动物模型上进行体内试验。

6.1.7 体外试验也适用筛选外部接入器械或植入物,但不能准确预示长期、重复或永久接触的血液/器械相互作用(见6.3.1)。不接触血液的器械不需要评价血液/器械相互作用。与循环血液接触时间很短的器械(如手术刀、皮下注射针、毛细吸管)一般不需要进行血液/器械相互作用试验。

6.1.8 6.1.6和6.1.7与第5章、图1和表2中所述为6.2.1中所列试验的选择指南。

6.1.9 各种用于采集血液和进行血液体外试验的一次性使用实验室器具均应进行评价,以证实对所进行的试验无明显干扰作用。

6.1.10 如果是按标准所述的方法选择试验并在模拟临床应用条件下进行试验,这种试验结果能预示器械的临床性能,但物种差异和其他因素也可能会限制试验的预测性。

6.1.11 由于物种间血液反应的差异性,试验应尽可能使用人血。在必须使用动物模型时,如用于评价

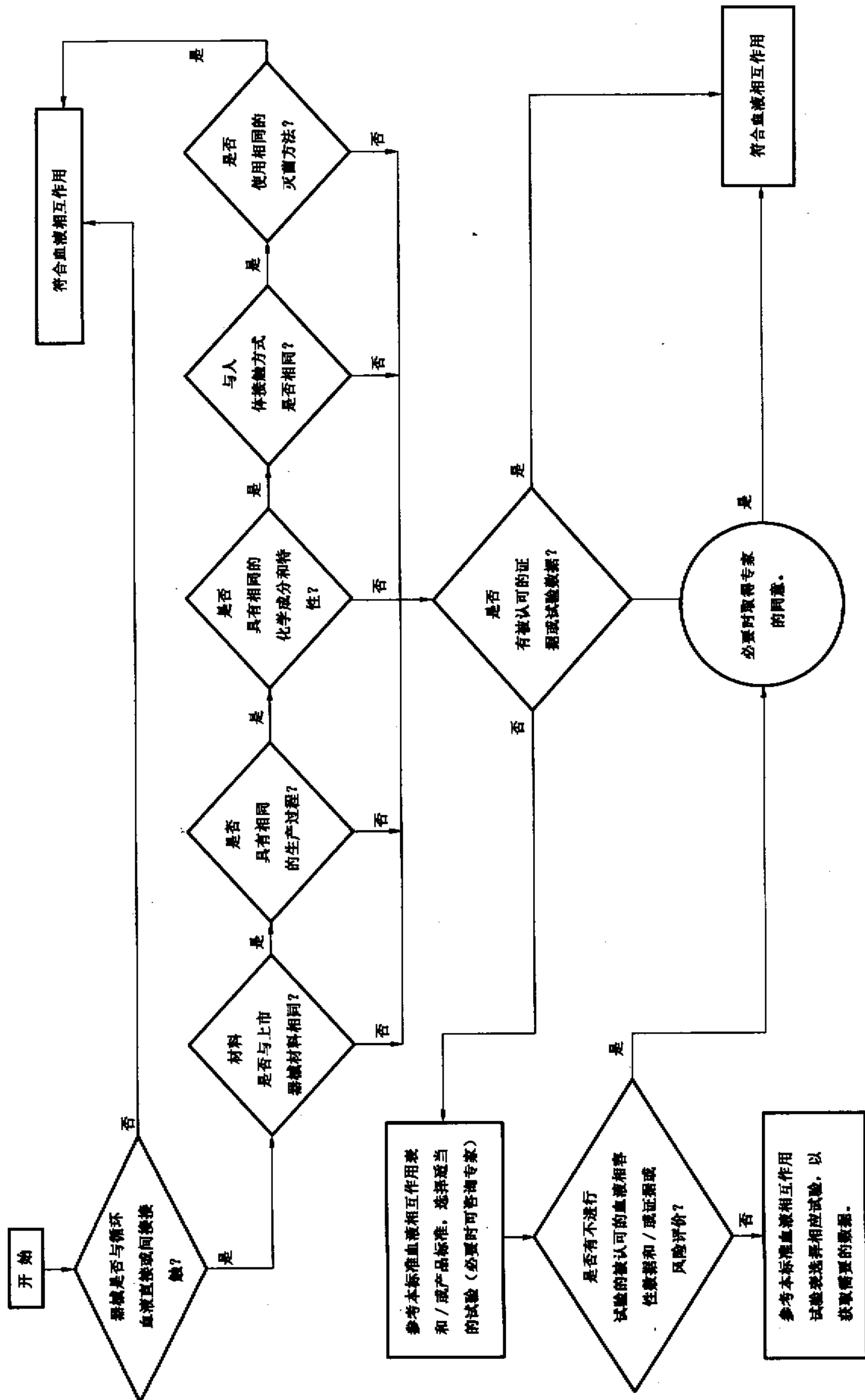


图 1 与血液相互作用试验选择判定流程图

器械的长期、多次或永久接触相互作用时应考虑血液反应中的物种差异性。

人与其他灵长类动物的血液等级和反应性是非常相近的^[26],使用家兔、猪、牛、绵羊或狗等动物进行试验也能获取令人满意的结果。但由于物种间可能存在明显的差异性(如犬科类动物比人更容易发生血小板粘附、血栓形成^[20]和溶血),因此对所有动物研究结果均应予以谨慎的解释。试验所用动物和动物数目应予以证明是合理的(见 GB/T 16886/ISO 10993-2)。

注:欧盟法规(86/906/EEC)和有些国家的法规中禁止使用灵长类动物进行血液相容性试验和医疗器械试验。

6.1.12 除非器械设计成在含抗凝剂条件下应用,一般在体内和半体内试验中应避免使用抗凝剂。由于抗凝剂的种类和浓度会影响血液/器械相互作用,因此应对所用抗凝剂的种类和浓度予以判定。在评价与抗凝剂一起应用的器械时应采用临床使用的抗凝剂浓度范围。

表 1 与循环血液接触器械或器械部件和适用试验分类——外部接入器械

器械举例	试验分类				
	血栓形成	凝血	血小板	血液学	补体系统
动脉粥样硬化切除术器械				×	
血液监测器	×			×	
血液贮存和输注设备、血液采集器械、延长器		×	×	×	
体外膜式氧合器系统、血液透析器/血液过滤器、经皮循环辅助系统	×	×	×	×	×
导管、导丝、血管内窥镜、血管内超声器械、激光系统、冠状逆行灌注导管	×	×		×	
细胞贮存器		×	×	×	
血液特异性物质吸附器械		×	×	×	×
血液成分采输器		×	×	×	×
^a 只作溶血试验。					

表 2 与循环血液接触器械或器械部件和适用试验分类——植入器械

器械举例	试验分类				
	血栓形成	凝血	血小板	血液学	补体系统
瓣膜成形环、机械心脏瓣膜	×			×	
主动脉内球囊泵	×	×	×	×	×
人工心脏、心室辅助器械	×			×	
栓塞器械				×	
血管内植入物	×			×	
植入式除颤器和复律器	×			×	
起搏器导线	×			×	
去白细胞滤器		×	×	×	
人工(合成)血管移植物(片)、动静脉分流器	×			×	
支架	×			×	
组织心脏瓣膜	×			×	
组织血管移植物(片)、动静脉分流器	×			×	
静脉腔滤器	×			×	
^a 只作溶血试验。					

6.1.13 对已经临床认可器械的更改应考虑其对血液/器械相互作用和临床性能的影响。这类变动包括在设计、几何形状方面的改变、表面的变化或材料主要化学成分的改变,以及在材质、多孔性或其他性能方面的改变。

6.1.14 试验应反复进行足够的次数,包括适宜的对照试验,以能够进行数据的统计学评价。某些试验方法因具有波动性,所以要反复试验多次才有意义。对血液/器械接触的延期重复研究还可提供关于血液/器械相互作用的时间因素方面的信息。

6.2 试验与血液相互作用类别

6.2.1 推荐的器械与血液相互作用试验

根据器械的类型,推荐试验分类按表3和表4。

根据检测的主要过程或系统可将血液相互作用分为五类:

- a) 血栓形成(见3.3);
- b) 凝血(见3.4);
- c) 血小板和血小板功能(见3.5);
- d) 血液学(见3.6);
- e) 补体系统(见3.7)。

这些试验的原理和科学依据参见附录B。

6.2.2 非接触器械

这类器械不要求进行血液/器械相互作用试验。一次性使用试验器具应经过确认,以排除材料对试验精确性的影响。

6.2.3 外部接入器械

对照表1和表2确定出具体器械的血液相互作用类别后,表3可作为指南用于选择外部接入器械的适用试验,以合理地评价血液相互作用(见6.1.6)。试验选择标准根据所评价的具体器械而定。

6.2.4 植入器械

对照表1和表2确定出具体器械的血液相互作用类别后,表4可作为指南用于选择植入器械的适用试验,以合理地评价血液相互作用(见6.1.6)。试验选择标准根据所评价的具体器械而定。

6.2.5 说明与限定

目前已有适用于人血试验的免疫测定法,但通常不适用于其他物种。人体试验器具一般不与其他物种血液交叉反应,但有些非人灵长类动物除外。在设计试验系统时,应注意确保实际测得的激活作用是试验材料所引起,而不是试验系统产生的假象。使用人血的体外和半体内模拟试验常需要测试用的血浆,应根据试验条件进行低、中、高度稀释,以确定免疫测定法的有效范围。仅在有效检测范围内测得的结果在出具报告时应谨慎解释,还应注意要确保供试样品的稀释范围是可测得的。

由于材料特性不合格或血液试验前的不正确操作,在评价血液/器械相互作用中可能会出现与实际不相符之处。例如,在研究只依赖于一种试验模式时,或试验中可能带人与试验材料或器械无关的异物。此外处于低流速(静脉)环境中的材料与处于高流速(动脉)环境中的材料与血液的相互作用有较大差异,改变试验方案或改变血流条件会使材料体内血液相容性表现发生改变。

6.3 试验类型

6.3.1 体外试验

体外试验方法应考虑的因素包括血细胞比容、抗凝剂、样本采集、样本年龄、样本贮存、供氧,以及pH值、温度、试验与对照试验的顺序、表面积与体积之比和血流动力条件(特别是壁剪切率)。试验应尽快进行,一般在4h内,因为采血后血液的某些性能会迅速发生改变。

6.3.2 半体内试验

半体内试验适用于半体内器械,例如外部接入器械。半体内试验也适用于像血管移植物这样的体内器械,但这种试验不能替代植入试验。

半体内试验系统适用于监测血小板粘附、栓子形成、纤维蛋白原沉积、血栓重量、白细胞粘附、血小板消耗和血小板激活^{[20][30][48]}。用多普勒或电磁流量探测头可测量血流速度,血流变化可指示血栓沉积和栓塞形成的程度和过程。

许多半体内试验系统应用放射性同位素标记血液成分以监测血液/器械相互作用,血小板和纤维蛋白原是最常用的放射性同位素标记血液成分。通过严格控制试验步骤,可将标记过程引起的血小板反应性变化控制在最低程度^{[23][24][25]}。

半体内试验与体外试验相比,其优点在于使用流动的本体血(提供了生理血流条件),由于能改变试验容器,故能评价多种材料,还可对一些状况进行实时监测。缺点则是各试验之间的血流条件不一致,动物间血液的反应不同,可供评价的时间间隔相对较短。建议在试验中采用同一动物进行阳性与阴性对照试验。

表3 外部接入器械试验方法

试验分类	评价方法	注释
血栓形成	闭塞百分率	
	流速降低	
	重量分析(血栓重量)	
	光学显微镜(粘附的血小板、白细胞、聚集物、红细胞、纤维蛋白等)	
	器械产生的压降	
	血栓成分的标记抗体	
	扫描电镜(血小板粘附和聚集;血小板和白细胞形态;纤维蛋白等)	
凝血	PTT(非活化)	
	凝血酶生成;特异性凝血因子评价;FPA、D-二聚体、F ₁₊₂ 、TAT	
血小板	血小板计数/粘附	
	血小板聚集	
	模板出血时间	
	血小板功能分析	
	PF-4、 β -TG;血栓烷 B ₂	
	血小板活化标记	
	血小板微粒	
	放射性同位素 ¹¹¹ In 标记的残存血小板伽玛成像	¹¹¹ In 标记推荐用于长期或重复应用(>24 h~30 d)和永久接触(>30 d)
血液学	白细胞计数(有或无分类计数)	
	白细胞活化	
	溶血	
	网织红细胞计数;外周血细胞活化特异性释放产物(例如粒细胞)	
补体系统	C3a、C5a、TCC、Bb、iC3b、C4d2、SC5b-9	
	CH50、C3 转化酶、C5 转化酶	

表 4 植入器械试验方法

试验分类	评价方法	注释
血栓形成	扫描电镜(血小板粘附和聚集;血小板和白细胞形态;纤维蛋白等)	
	闭塞百分率	
	流速降低	
	血栓成分的标记抗体	
	器械剖检(肉眼和显微镜下);组织病理学	
	末端器官剖检(肉眼和显微镜下);组织病理学	
凝血	特异性凝血因子测定;FPA、D-二聚体、 F_{1+2} 、PAC-1、S-12、TAT	
	PTT(非活化)、PT、TT;血浆纤维蛋白原;FDP	
血小板	PF-4、 β -TG;血栓烷 B_2	
	血小板活化标记	
	血小板微粒	
	放射性同位素 ^{111}In 标记的残存血小板伽玛成像	
	血小板功能分析	
	血小板计数/粘附	
	血小板聚集	
血液学	白细胞计数(有或无分类计数)	
	白细胞活化	
	溶血	
	网织红细胞计数;外周血细胞活化特异性释放产物(例如粒细胞)	
补体系统	C3a、C5a、TCC、Bb、iC3b、C4d、SC5b-9 CH50、C3 转化酶、C5 转化酶	

6.3.3 体内试验

体内试验系将材料或器械植入动物体内。用于体内试验的器械有血管补片、血管移植物、瓣膜环、心脏瓣膜和辅助循环器械。

对于大多数体内试验,测定血液管道是否开放是衡量试验成败的最常用方法。器械取出后测定闭塞百分率和血栓重量,应通过肉眼及显微镜仔细检查器械下游器官,评价器械上形成的血栓梗塞末端器官的程度。此外,周围组织和器官的组织病理学评价也是有价值的。肾脏特别易于滞留肾动脉上游的植入器械(如心室辅助器械、人工心脏、主动脉人工移植物)形成的血栓^[19]。目前已有无需试验结束即可评价体内相互作用的方法,如用心动图测定移植物开放性或器械上的血栓沉积,放射成像技术则可用于监测体内各个时期血小板的沉积情况。血小板存活与消耗可提示血液/器械相互作用和由新内膜形成或蛋白质吸附引起的钝化反应。

有些体内试验系统中材料特性可能不是血液/器械相互作用的主要决定因素,确切地说就是血流参数、柔顺性、多孔性及植入物设计可能比材料本身的血液相容性更为重要。比如,对同一种材料,流速的高与低会导致截然不同的结果。在这种情况下,体内试验系统性能要比体外试验结果更具重要性。

附录 A

(资料性附录)

心血管器械和假体的临床前评价

A.1 总体考虑

A.1.1 背景

本附录提供了选择评价心血管器械与血液相互作用试验的背景。GB/T 16886 本部分的第 6 章针对何时应进行试验,以及具体器械与血液相互作用分类提供了指南。该章还包括评价非接触器械、外部接入器械和植入器械的试验。

A.1.2 分类

下列血液/器械相互作用分类供作参考。

- a) 主要影响器械,但不一定对应用对象有不良作用的情况如下:
 - 1) 血液中血浆蛋白、类脂质、钙或其他物质吸附到器械的表面或吸附到器械内;
 - 2) 血小板、白细胞或红细胞粘附到器械表面或其成分吸附到器械内;
 - 3) 器械表面形成假膜或组织囊;
 - 4) 器械的机械和其他性能的变化。
- b) 对动物或人有潜在不良作用的情况如下:
 - 1) 血小板、白细胞或其他细胞的激活,或凝血、纤维蛋白溶解、补体通路的激活;
 - 2) 器械表面形成血栓;
 - 3) 血栓形成产生的栓塞或其他材料在循环中从器械腔的表面向其他部位移动形成栓塞;
 - 4) 对循环血细胞的破坏引起贫血、溶血、白细胞减少、血小板减少或血细胞功能的改变;
 - 5) 对器械邻近细胞和组织的损伤;
 - 6) 内膜增生或其他组织在器械或其附近聚集,导致血液流速降低或影响器械的其他功能;
 - 7) 器械上或其邻近处粘附并生长细菌或其他感染原。

A.1.3 动物和体外试验的优点与限制性

动物模型可对器械进行持续监测并对重要变量进行系统控制研究。但是动物模型的选择可能受动物大小要求、物种可得性和成本的限制。其关键在于,研究者要注意所选物种与人的生理差异和相近之处,特别是凝血、血小板功能和纤维蛋白溶解以及对诸如麻醉剂、抗凝剂、溶血栓剂和抗血小板剂这类药物和抗生素的反应。由于在血液反应方面存在物种差异性和应用对象差异性,而且不同器械的反应也各异,因此由一种物种试验中得到的数据应予以谨慎说明。像狒狒这样的灵长类动物与人有着相近的血液等级、血液凝固机理和心血管系统^[30]。非人灵长类动物的另一个优点还在于,许多开发为人用的测定血栓形成的免疫探针也适用于灵长类动物,这些探针包括 PF-4、 β -TG、FPA、TAT 和 F₁₊₂。狗是一种常用物种并已提供了有用的信息,然而器械在狗身上比在人体上更易于形成血栓,一般评价认为这种差异性是有利的。猪也是一种适宜的动物模型,其血液学和心血管与人相似。材料植入过程对结果的影响也应予以考虑,并应包括相应的对照试验。

由于在止血和血液因子及活性方面存在物种差异性,所以在体外试验中应尽可能首选人血。

血栓形成是一个动态过程,因此在体外试验中应尽可能模拟血栓产生的动态条件(例如血液-材料界面的剪切力)。在某些情况下,评价血液与材料相互作用也可使用静态试验。

A.1.4 动物试验方案

血栓形成、血栓栓塞、出血和感染是限制当前心血管假体使用和进一步发展的主要问题。对与血液短期接触的器械(<24 h),主要是测定血液学、血液动力学以及性能变量变化的严重程度、肉眼可见的

血栓形成和潜在的栓塞。而对长期、重复或永久接触(>24 h)的器械,重点则放在一系列可以获得血栓和血栓栓塞的时间过程、循环血液成分的消耗、内膜增生的扩展和感染等信息的测定技术上。对于上述这两类器械,溶血和血小板功能评价是很重要的。血栓形成可能在很大程度上受外科技术、血栓溶解和栓塞现象的各种时间因素、器械的感染及接触表面可能发生的变化(如内膜增生和内皮化)的影响。

移植物表面与血液相互作用的后果,重者形成肉眼可见的血栓和栓塞,轻者则会出现像加速消耗止血成分这样的影响。后者可以被补偿(器械消耗血小板数量很少时不会影响血小板总量),或导致血小板或血浆凝血因子的降低(因器械表面积较大而消耗的血小板数影响其总量)。

A.1.5 体外试验方案

体外试验在不使用动物和成本相对较低的情况下应进行足够次数的试验,以进行统计学评价。体外试验主要是测定血液学、血液动力学以及性能变量变化的严重程度、肉眼可见的血栓形成和补体激活。体外法能通过改变材料或器械与血液的接触期来对各种因子和活化作用的动力学进行研究。

A.2 插管

插管主要用于插入一支和数支大血管中作为血液通路,还可用于心肺旁路和其他过程。插管可进行短期或长期的试验,一般视为动静脉分流器研究。使用插管不会使循环血细胞水平、凝血因子或补体系统因子发生改变。与其他间接血路器械(5.2.1)一样,插管与直接接触循环血液的器械(6.2.1.2)相比而言需做的试验较少。

A.3 导管与导线

插管需做的试验多数都适用于导管和导线的研究。导管在动脉或静脉系统中的部位或放置对血液/器械相互作用有较大的影响,因此建议使用对侧动脉或静脉进行同期对照研究。抽出导管时注意不要使血栓脱离导管,原位评价可对内膜或插入口损伤引起的血栓形成的程度进行评估。一般来说,多普勒血流测定比血管造影能提供更多的信息,而血液成分的放射性同位素标记动力学研究建议仅用于长期使用导管。

A.4 体外氧合器、血液透析器、血液成分采输器和吸附血液中特异性物质的器械

心肺旁路对止血剂有明显的急性反应。还有很多因素会影响试验评价,如使用血液吸管、驱液式血泵的成分、低温麻醉、血液与空气接触以及接触时间等。对体外管路中的栓子可以用定期放置的半体内血液过滤器、超声辐照或其他无损伤性技术进行检测。通过监测像氧合器压降、氧气交换率等特性参数,可以直接评价血栓聚集。在装有心肺旁路^[31]的患者中观察到,获得性血小板短暂功能障碍与选择性 α 颗粒的释放有关,模板出血时间及其他血小板功能和释放试验是相当实用的。

血液透析器和心肺旁路器械会引起补体激活,可导致临床上值得注意的肺部白细胞浸润和肺损伤伴有功能障碍。因此,这些器械的补体激活定量测定是比较实用的。

血液成分采输器和用于从血液中吸附特异性物质的器械,因其表面积与体积之比较高,很可能会激活补体、凝血、血小板和白细胞通路,应按照检验体外氧合器和血液透析器的同一原理测定血液/器械的相互作用。

A.5 心室辅助器械和人工心脏

这类器械能引起各血液成分的显著变化。影响因素有:与血液接触的外表面积较大;快速血流状态和紊流(如湍流或分流)区域。这类器械的试验可包括测定溶血、纤维蛋白原浓度、凝血酶的生成、血小板存活和激活、补体激活和对肝、肾、肺及中枢神经系统功能的封闭监测。对外科取出物进行详细的病理检查也是评价的重要组成部分^{[40][41]}。

A.6 人工心脏瓣膜

在人工瓣膜的评价中,侵入式、非侵入式和体外流体动力学研究是很重要的。

检查人工瓣膜功能障碍最有效的方法之一是听诊法^[42]。2D型和M型超声心动描记器利用超声辐射形成心脏图像,接收来自具有不同声阻抗物质的反射并处理成图像,可以检验人工瓣膜的结构。机械瓣膜反射较强的回声信号,闭合器的运动一般都能清晰成像,成像质量取决于具体被检瓣膜。超声心动描记法对于评价组织衍生瓣膜功能也是很实用的,可用于对赘生物、血凝块和瓣膜叶增厚迹象的检验。使用常规的和彩色多普勒血流超声描记法可以对血液返流进行鉴别和半定量测定^[42]。

建议进行血小板存活和聚集测量、血栓形成和溶血试验、压力与流速测量以及瓣膜及其周围组织的剖检试验^{[41][43]}。

A.7 血管移植物

多孔和非多孔材料能植入动脉和静脉系统的各个部位,植入部位的选择主要取决于移植物的预定用途。给定移植物直径增大并且长度缩小可提高其开放性,一般情况下的有效模式是,内径小于4 mm的移植物,长度至少为内径的10倍(即4 mm内径的移植物长度为40 mm)。移植物的开放性可通过对某些部位末梢脉搏触诊和周期性血管造影来进行判定,也可应用超声辐射、MRI和PET。在狒狒体上进行的连续的放射性同位素标记血小板成像研究结果与非内皮化的移植物表面积有关^[30],放射性同位素标记血小板有助于对血管壁上的血栓形成聚集物进行非侵入式成像。同时还建议对血小板数、血小板释放成分、纤维蛋白原/纤维蛋白降解产物和激活的凝血种类进行连续测定。对移植物和邻近的血管进行剖检,可以在内皮完好性和增生反应的形态学研究方面提供有价值的信息。应对血管移植物近端与远端吻合的纵切面和横截面以及有代表性的移植物中间部位进行系统评价,这对于器械的全面评价是十分必要的。

A.8 下腔静脉过滤器、支架和支架移植物

这类器械可采用血管造影术和超声辐射来进行研究,也可采用血管移植物评价技术(见第A.7章)^[43]。

附录 B

(资料性附录)

实验室试验:原理、科学依据和说明

B.1 总则

B.1.1 背景

本附录阐述了 6.2.1 中所列试验的原理和科学依据。具体方法见于实验室医学和临床病理学标准文本。参考文献[17]~[44]、[46]~[59]中描述了可用于评价血液/器械相互作用的试验。由于生物学变异性和技术上的局限性,使许多试验的准确性受到限制。

B.1.2 体外试验原理

使用静态和动态系统,例如循环回路和离心系统^{[50][54]}。

B.1.3 试验条件

为了进行血液/器械相互作用体外评价试验,取自正常人体或试验动物的抗凝血液或血浆应在标准条件下先与材料或器械接触,标准条件包括时间、温度和流速。接触后短期内对接触过的等份血液或血浆进行试验。接触条件应与器械的预定使用条件一致。

在制备试验样品时,应注意在试验之前避免血液任何成分的激活或释放。应根据供试器械或材料特性和其预定最终用途确定适宜的试验条件。

B.1.4 分类

在其使用部位评价外部接入器械和植入器械时,血液采集到抗凝剂中,在无先前接触阶段情况下按规定方法进行试验。如 6.2.1 中规定,试验按其过程或被测系统分为五类:血栓形成、凝血、血小板和血小板功能、血液学和补体系统。

B.2 血栓形成

B.2.1 闭塞百分率

闭塞百分率是器械经过使用并取出后以目力来定量测定,即是测定管道中血栓形成过程的严重程度。无闭塞不能完全排除血栓形成过程的存在,因为血栓可能在测量闭塞百分率之前已经变成栓子或被清除。闭塞亦可能不仅仅是因血栓形成造成的,还可能由内膜增生引起,尤其是在血管移植物的外周吻合处,需用显微镜检查来鉴别闭塞过程的性质。在能比较的基础上,可进行血栓覆盖表面积和血栓游离表面积半定量试验测定。

B.2.2 流速降低

器械使用一个时期后测量流速,可在使用期间或使用前后进行,原理及说明同 B.2.1。

B.2.3 重量分析(血栓重量)

将器械从使用部位取出后进行,原理及说明同 B.2.1。

B.2.4 光学显微镜

采用该技术可以获得有关细胞密度、细胞聚集和纤维蛋白粘附到材料上等方面的信息,以及材料或器械上这些沉积物的几何分布。光学显微镜法为半定量方法。

B.2.5 器械产生的压降

可在器械使用前后一个时期进行测量,原理及说明同 B.2.1。

B.2.6 扫描电镜(SEM)

原理及说明同 B.2.4。该方法与 B.2.4 相比其优点在于能呈示被检成分更为清晰的细微结构。要作出定量结论需进行反复多次测定以确定其重现性程度。

B.2.7 抗体结合

对材料上的纤维蛋白和血小板沉积进行显微定性判定之后,可通过测量纤维蛋白原或血小板膜受体的特异性标记抗体量进行定量评价。进行这种测量时,材料在接触血液之后应进行清洗,以在标记抗体结合之前除去非附着性血液成分。

B.2.8 器械取出和检查

该方法对于评价植入器械的生物学反应非常重要。通过认真细致的检查,可对细胞和蛋白质沉积物的分布、大小和显微镜下的属性进行最完善的测定。目前已有发表的推荐方法^{[40][41]}。

B.2.9 远侧器官剖检

其原理是检查植入的器械对远侧的影响,这些影响包括血栓栓塞和器械成分引起的栓塞^[42]。

B.2.10 成像技术——血管造影术、血管内超声、多普勒超声、CT 和 MRI

可从中选择方法来测定移植物或其分管道的开放性或闭合程度,还可测定体内器械上的血栓沉积。

B.3 凝血

凝血法主要使用全血(新鲜的、非抗凝的)、抗凝全血(通常是枸橼酸盐)、富血小板血浆或贫血小板血浆。因为大多数标准凝血评价是用于检测导致血液凝固延迟或过量出血的临床凝血失调,所以应修改血液/器械相互作用评价方案,使其适于评价生物材料引起的加速凝血作用。活化部分凝血激活酶时间测定试验所用的试剂包括一种激活剂,比如白陶土、硅藻土或鞣花酸。应避免使用这种有激活剂的试剂,因为激活剂会掩盖材料和器械引起的加速凝血。

血液与试验材料接触可在一静态容器中,如并联的板池,也可应用一个封闭的回路系统,回路导管的内表面为试验材料。在与试验表面预定接触时间之后,即可进行表面和血液的试验^[34]。

B.3.1 部分凝血激活酶时间(PTT)

部分凝血激活酶时间^[38]是指再钙化的枸橼酸盐血浆加上部分凝血激活酶后的凝固时间。部分凝血激活酶为磷脂类悬浮液,一般从组织(哺乳动物脑或肺的组织匀浆)中浸提而成。在标准条件下与材料接触后 PTT 缩短表明血液凝固接触活化阶段;PTT 延长则提示缺乏血浆凝血因子 I(纤维蛋白原)、II(凝血酶原)、V、VIII、IX、X、XI 或 XII,因子 VII 或 XIII 除外。肝素和其他抗凝剂也能导致 PTT 延长。

使用市售含有各种激活剂(如白陶土或硅藻土)的部分凝血激活酶试剂的试验称之为活化部分凝血激活酶时间测定(APTT)。APTT 对体外血液/器械相互作用评价没有意义,这是因为激活剂会掩盖器械或其组成材料所致的激活作用。

B.3.2 凝血酶原时间(PT)

该试验用于测定凝血酶原和附加因子。在有组织凝血激活酶存在时,血液凝固时间取决于凝血酶原、因子 V、因子 VIII 和因子 X 的浓度(在纤维蛋白原、纤维蛋白溶解和抗凝血活性正常情况下)。凝血酶原时间延长一般表明缺乏凝血酶原因子 V、VIII、X 或纤维蛋白原。

B.3.3 凝血酶时间(TT)

凝血酶时间^[38]是加入凝血酶溶液后血浆凝固所需的时间。纤维蛋白原缺乏(低于 100 mg/dL)、纤维蛋白原变质、纤维蛋白降解产物或肝素水平提高都会延长凝血酶时间。该试验仅适用于评价植入器械。

B.3.4 凝血酶生成

材料在有磷脂(见 B.3.1)存在的情况下与未触动的凝血系统接触将会生成凝血酶,可通过发色基质的换算进行测量。该方法的变异性低于常规凝血试验。

B.3.5 纤维蛋白原

异常纤维蛋白原血症、无纤维蛋白原血症和血纤维蛋白原过少会导致 PT、PTT 和 TT 延长^[21]。

B.3.6 纤维蛋白原和纤维蛋白降解产物(FDP)

正常的生理性纤维蛋白溶解生成 FDP 片段 X、Y、C、D 和 E,血浆浓度低于 2 mg/mL。在降解反应

速度慢,而 FDP 从循环中清除速度快的情况下会保持 FDP 低水平。纤维蛋白溶酶原活性增加所致的纤维蛋白和纤维蛋白原病理性降解,会生成 2 mg/mL~40 mg/mL 的 FDP 或更高的浓度。该试验只适用于评价植入器械。推荐使用文献所述方法^{[51][52]}。

B.3.7 特异性凝血因子评价

血液与材料或器械在标准条件下接触后凝血因子明显减少(如少于正常值或对照水平的 50%),提示因吸附、凝血或其他机制使这些因子加速消耗。

B.3.8 FPA、D-二聚体、F₁₊₂、TAT

FPA、D-二聚体或 F₁₊₂ 水平升高表明凝血机制激活。FPA 和 F₁₊₂ 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。D-二聚体是因子 XIII 交联纤维蛋白(凝血和纤维蛋白溶解)的纤维蛋白溶酶消化降解产物。推荐使用 ELISA 法和 RIA 法。

B.4 血小板和血小板功能

在制备血小板悬液时应注意切勿激活血小板。

B.4.1 血小板数

由于血小板对防止出血起关键作用,所以血小板数的测定非常重要^{[21][49][59]}。接触器械后血液中血小板数明显下降是由于血小板吸附、聚集、吸收(如在脾中)或材料和器械上的血液凝固引起的。植入器械使用过程中血小板数减少可能是由于血小板在循环中的加速破坏或清除所致。血小板计数可采用 EDTA 混悬液介质。

血液收集技术应具有重现性。在各种条件下,包括不正确的血液收集,会使血小板功能亢进。试验中通常使用聚集仪来检验血小板的正常反应。采用该方法检测反应性降低的血小板比较容易,但一般检测不出功能亢进的血小板。将血小板聚集试验加以改良(适当降低血小板或聚集剂的浓度)后可用于测定血小板接触材料或器械后是否有功能亢进情况。

B.4.2 血小板聚集

血小板聚集^[38]是因向连续搅拌的 PRP 中加入聚集诱导剂(例如 ADP、肾上腺素、胶原、凝血酶等)引起的。随着血小板的聚集,血浆逐渐变清。可使用一种光学系统(血小板聚集仪)检测光传播中的变化,记录仪以图像显示光传播相对其设定基线的变化。血小板激活与颗粒成分的释放以及 FDP 增加或某些药物(如阿斯匹林、非甾类抗炎药)会导致血小板聚集延迟或减少。要切记有些试剂能改变血小板聚集,而某些动物种属中可能没有血小板聚集现象。自发性血小板聚集(未加入诱导剂所发生的)是一种提示血小板激活的异常现象。使用 WU/HOAK 法^[52]能自动检查血小板聚集。

B.4.3 血细胞粘附

血细胞粘附^[34]是材料血液相容性测定方法,该方法还可一并检验是否有末端栓塞和一个或多个血液因子的激活迹象。

目前已有多种测量细胞向表面粘附的方法,例如 Kuniki Kscore 法^[53]。多数方法的原理都是将正常全血以一定的流速或压力通过一根玻璃球柱,观察从中排除血小板的比例。该原理已应用于其他血细胞向玻璃球聚合物涂层上粘附的定量测定。已有报道^[34]通过用这样一种方法,甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)涂层球上的犬科动物外周淋巴细胞和多形核白细胞的粘附要低于聚苯乙烯和其他聚合物涂层球。在本项研究中采用了分离的淋巴细胞和多形核白细胞。

另一种可供选择的方法是对粘附于试验表面的血小板直接计数。在标准条件下与血液或富血小板血浆接触后,冲洗试验表面以除去非粘附细胞,随后固定试验表面,准备进行光学或扫描电子显微镜检查。对每一单位面积粘附血小板直接计数并记录其形态(如散布数量和聚集形成程度)。还可采用⁵¹Cr 或¹¹¹In 标记血小板技术^{[33][55][56]}。

B.4.4 血小板激活

某些材料或器械的应用会引起血小板激活,可导致以下现象:

- a) 血小板颗粒物质的释放,比如 BTG(β 血栓球蛋白)、血小板因子 4(PF4)和血清素;
- b) 血小板形态学改变;
- c) 血小板微粒生成。

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。这些评价方法有:对粘附在材料或器械上的血小板形态进行显微镜检查(光学和电子显微镜法);测量 BTG、PF4 和血清素;通过流式血细胞计数(微粒生成、P-选择素(GMP-140)显示来评价血小板激活;或使用单克隆抗体表达活化的血小板膜糖蛋白 I b 和 II B/III a。使用流式血细胞计数识别活化血小板不同抗原决定簇的两个抗体是:一个特异性用于血小板(即 GP I b 或 GP II b/III a)另一个则特异性用于血小板激活(P-选择素)^{[60][61]}。

B.4.5 模板出血时间

市售的一种无菌、一次性使用器械能在标准条件下切出标准深度和长度的皮肤切口,大大提高了试验的重现性和有效性。出血时间延长说明血小板功能下降或血小板数减少,后者可以单独测定(见 B.4.1)。现已观察到一些短期接触的外部接入器械(如心肺旁路)^[31]出血时间延长,而血小板数正常。该试验适宜于使用某些试验动物,也适用于体外出血时间测定。

B.4.6 血小板功能分析

经典的模板出血时间已应用自动方法的原理。全血吸出时通过一孔径为 150 μm 的胶原滤器,血小板粘附并聚集,最后将滤器孔堵塞。血压和温度是符合标准的,抗凝反应不会影响该试验。该试验适用于动物血液。

B.4.7 放射性同位素标记血小板伽玛成像

^{111}In 能发射较强的伽玛射线,使其适用于这一用途^{[23][30]},该方法能够确定血小板沉积在器械上的位置与数量,适用于外部接入器械和植入器械。

B.4.8 血小板寿命(生存)

将从患者血液中采集的血小板用 ^{51}Cr 或 ^{111}In ^{[23][24][32][57]} 进行标记。这两种试剂示踪样本中各个时期的血小板,应避免血小板的过度洗提,并且在血栓形成期间不要被其他细胞捕获或再次使用。 ^{111}In 具有较强的伽玛射线发射能力,进行寿命研究时通过标记较少的血小板,即能对表面体计数来评价血小板的定位沉积。血小板寿命缩短,说明由于免疫过程、血栓形成过程或其他过程使血小板加速从循环中排出。

B.5 血液学**B.5.1 白细胞**

可通过对器械表面或活化白细胞进行显微检查来测定白细胞激活,并且可应用流式血细胞计数评价白细胞指示物的增加(如 L-选择素和 CD11b)和淋巴细胞亚群数量的失调。

B.5.2 溶血

该方法是一项非常有意义的筛选试验。在试验操作规范的情况下,血浆血红蛋白量升高指示溶血并反映出在与材料和器械接触中红细胞膜的易破裂性(参见附录 C)。

B.5.3 网织红细胞计数

网织红细胞数升高,表明骨髓中红细胞增生旺盛。长期失血(出血)、溶血或其他原因引起的红细胞质量下降都可能引起网织红细胞数升高^[61]。

B.6 补体系统——CH50 和 C3a、C5a、TCC、Bb、iC3b、C4d、SC5b-9

CH50 降低表明总体补体消耗。这些补体成分任何一项的升高都表明补体系统的激活。有些材料

会激活补体,而激活的补体成分又会激活白细胞,使白细胞在肺部聚集并被清除。

体外试验之后测定补体裂解产物的不利之处在于物种的特异性和较高的基准水平。经典 CH50 法适用于人、牛、猪、兔血清。

另一种测量补体激活的体外功能法是通过酶解物转化测定补体 C3 转化酶或 C5 转化酶的形成。

ASTM F1984-99 和 ASTM F2065-00^{[13][14]}描述了补体激活作用。

附录 C

(资料性附录)

医疗器械及其成分的溶血性能评价

C.1 一般性考虑

虽然描述血液/材料相互作用的文献很多,但是具有可靠性、重现性并能够预示临床性能的试验方法却很少。本附录将回顾已有的溶血试验方法,并探讨这些方法对医用和牙科材料及器械定性的作用因素。

C.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本附录。

C.2.1

抗凝剂 anticoagulant

一种阻止或延缓血液凝固的制剂。见[62],例如肝素和枸橼酸盐。

C.2.2

膨胀压 oncotic pressure

胶体渗透压 colloidal osmotic pressure

蛋白质或其他大分子量物质对血浆渗透活性的总体影响。见[62]。

C.2.3

血细胞比容 hematocrit

给定样品红细胞占全血容积的百分比。

C.2.4

溶血 haemolysis

血红蛋白从红细胞中释出,因红细胞破裂或是通过部分受损但完整的细胞膜释出。

C.2.5

阴性参照材料 negative reference material

高密度聚乙烯,或类似确认过的其他材料。

注:见 GB/T 16886.12/ISO 10993-12。

C.2.6

压积红细胞 packed erythrocytes

一单位人血离心后除去血浆上清层得到的成分。

注:用于输血的人体红细胞性能:红细胞体积占压积红细胞成分的 0.65~0.80。压积红细胞含有原单位血的全部红细胞、大部分的白细胞(约 $2.5 \times 10^9 \sim 3.0 \times 10^9$)和不定数量的血小板,这取决于离心方法。

C.2.7

洗涤红细胞 washed erythrocytes

全血除去血浆后用等渗溶液洗涤而得的红细胞悬液。

注:洗涤红细胞是一种已除去大部分血浆、白细胞和血小板的红细胞悬液,血浆残留量取决于洗涤方法。洗涤后贮存时间应尽量短,在 $1^\circ\text{C} \sim 6^\circ\text{C}$ 下贮存不得超过 24 h。

C.2.8

全血 whole blood

从所选供血者采集的未分离血液,含有枸橼酸盐或肝素抗凝剂。

C.3 溶血原因

C.3.1 机械力——压力

红细胞膜是一种半透膜,当两种不同浓度的溶液被该膜隔开时会产生压差,而该膜不使溶质透过时就会产生渗透压。这些压力差会使红细胞膨胀和细胞膜破裂,游离血红蛋白释出^[62]。

C.3.2 机械力——流变

影响血液流速的因素、剪切力及其他因素可使红细胞膜变形,导致细胞膜破裂。

C.3.3 生物化学因素

分子水平上的膜结构变化可改变红细胞的强度和弹性。营养素或代谢能量(ATP)的缺乏可导致红细胞失去圆盘形状并且血红蛋白微囊泡形成。其他化学药品、细菌毒素、pH值和因温度引起的代谢的改变都能够损伤红细胞膜^[63],在低渗压情况下这些改变可能会造成细胞膜破裂。可以进行一种测定红细胞膜破裂(渗透脆性)压力的试验。

C.4 溶血的临床意义

C.4.1 毒性反应

血浆游离血红蛋白量增高可引起毒性反应或对肾脏和其他器官造成影响^[62]。血浆游离血红蛋白浓度是一种测定红细胞损伤的简易方法,也是其他血液成分损伤情况的间接指征。

C.4.2 血栓形成

血管内溶血释出磷脂能促使血栓形成^[66]。当溶血造成临床上红细胞数量明显降低时,会导致贫血并削弱载氧能力,对脑和其他器官或组织产生继发影响。

C.5 溶血通过/不通过评价的确定

溶血与时间、材料性能(如表面能、表面形态和表面化学)有关,还与剪应力、细胞壁相互作用、吸附蛋白层特性、血流稳定性、夹带气体以及血源、年龄和化学的变化有关^{[67][68][69]}。为了对材料与医疗器械之间的潜在溶血性进行比较,需要对这些因素加以适当控制。评价溶血的方法简繁各异,形式多样,已经出版的方法有采用流动血液进行试验的特异性体内法和体外法。潜在溶血性的研究是在某个特定实验室用同种模式对材料或器械进行比较,而不是绝对测量。体外法能够对体内条件下不能测量的少量血浆血红蛋白进行定量测定(例如因为血浆血红蛋白与结合珠蛋白结合和快速从体内去除)。也应考虑在某项体内试验中将乳酸脱氢酶和结合珠蛋白测定作为溶血的指征。

不可能对所有医疗器械及其应用规定一个统一的合格与不合格的溶血量值。器械对溶血的影响在短期内会被手术过程的创伤所掩盖,器械能导致大量溶血,但在生命垂危的情况下器械又可能是仅有的治疗手段。直观上认为,血液相容性材料不会引起溶血,但实际上很多器械都能引起溶血,但其临床受益远远超出溶血带来的风险。因此,在器械有溶血倾向时,必须确认该器械的临床受益和溶血是否在临床可接受的限度内。合格判定应根据风险与受益评价的一些形式来确定。为进行这类评价,建议考虑下列问题:

- a) 器械与病人的接触期有多长?
- b) 材料或器械引起的溶血程度有多高? 溶血是否贯穿于器械与病人接触的全部过程内? 器械取出后溶血是否还会继续?
- c) 其他治疗方法的相对风险与受益如何?
- d) 已知的治疗方法的溶血性能如何? 供试器械与其他治疗方法的比较结果如何?
- e) 供试器械与其他治疗形式相比,效能如何? 更为有效的器械在使用过程中可能引起更严重的溶血,但同时带给病人的受益也会相应增加。

C.6 溶血试验——一般性考虑

C.6.1 方法

C.6.1.1 总则

体外试验一般用于评价红细胞损伤,直接法可测定由于物理和化学因素对红细胞影响导致的溶血,间接法测定试验样品浸提物导致的溶血。ASTM F 756-00 是专项检验材料溶血性能(主要由于化学因素所致)的标准,不适宜用于检验整体医疗器械。ASTM F 756-00^[11]以及 GB/T 16175-1996^[8]中规定的溶血试验给出了方法范例和研究具体医疗器械溶血试验的可参照方案。此外,如进行了器械的材料试验,还应考虑进行整体医疗器械的动力学试验以评价器械的结构作用与血液动力学因素。

溶血试验最简单的形式是,高度稀释红细胞悬液与试验材料接触,溶血常被称为释入上清液的血红蛋白占试验开始时测出的总血红蛋白的百分比[即(游离血红蛋白浓度/总血红蛋白浓度)×100%]。如果试验开始时红细胞全部破坏,即为100%溶血。对于医疗器械试验,不宜使用高度稀释的红细胞悬液,为使溶血指数标准化^[63]还必须考虑到血细胞比容和其他因素。

作为溶血试验的最低要求,实验室必须能测定总血红蛋白浓度和血浆或上清液的血红蛋白浓度。血浆中的血红蛋白浓度明显低于总血红蛋白的浓度,体内血浆游离血红蛋白浓度在正常情况下为0 mg/dL~10 mg/dL,而总血红蛋白浓度为11 000 mg/dL~18 000 mg/dL。基于这个原因,应采用不同的方法测定溶血试验中出现的较大范围的血红蛋白浓度。

测定血中血红蛋白(Hb)总量有三种经典的分析方法^[70]。

注:研究者应注意,医用材料或溶液中的化学药品可能会给溶血试验带来不良作用,可能会改变红细胞脆性(例如用甲醛或戊二醛作为固定剂)、造成血红蛋白沉淀(例如由铜或锌离子引起的)或改变血红蛋白的吸收光谱(例如聚乙二醇或乙醇引起的)^{[44][65]}。

C.6.1.2 血红蛋白总量测定

C.6.1.2.1 氰化正铁血红蛋白法

第一种经典的方法是由国际血液学会标准化委员会^[71]推荐的氰化正铁血红蛋白测定。氰化正铁血红蛋白(氰化高铁血红蛋白 HiCN)分析具有简便、易于自动化、可得到基本对照标准(HiCN)等优点。该方法是基于Hb的氧化作用及随后形成氰化高铁血红蛋白,在波长540 nm处有一个最大吸收峰。像洗涤剂这样的溶解剂,除了用于使红细胞释出Hb以外,还用于降低蛋白质沉淀物引起的混浊(一种干扰源,为540 nm处的非真实吸光度)。对于总血红蛋白浓度,因血浆造成的光谱干扰最小,样品吸光度可直接与HiCN标准溶液相比。

在该方法中,可以用简滤型光度计以及窄波带分光光度计手动或自动检测HiCN的主吸收带。HiCN基准标准的应用为所有使用该法的实验室提供了可比性。该方法的主要缺点是使用氰化物溶液存在潜在的健康风险。氰化试剂在各种接触方式下都具有毒性,并且遇酸释放HCN,试剂和产品的处置比较麻烦而且费用较高。

C.6.1.2.2 氧合血红蛋白法

氧合血红蛋白法是第二种测量总血红蛋白浓度的经典方法,目前已不常用。氧合血红蛋白法是基于用分光光度法测定氢氧化氨处置期间形成的HbO₂。也有使用稀释的碳酸钠溶液对形成的氧合血红蛋白进行定量测定。该方法没有固定的标准制备过程,但这无关紧要,因为该法要求测量的是在原样本血浆中血红蛋白总量的百分比,可从新鲜血样中制备短期标准物。

C.6.1.2.3 测铁法

测铁法为第三种测定总血红蛋白浓度的经典方法,是测定溶液中血红蛋白铁的浓度。通常通过酸解或灰化,先从Hb中分离出铁,然后用TiCl₃滴定或用一种试剂络合显色,这可以用光度法测定。该方法操作复杂,已很少应用。

C.6.1.3 血浆或上清液血红蛋白浓度测量

C.6.1.3.1 直接光学和化学技术

由于受各种因素的影响(例如在传统、方便使用、化学废弃物的处置、标准溶液供应等方面),现今约有 20 多种不同的方法用于测量血浆血红蛋白(用于指示溶血),但没有一种方法得到广泛的认可。这些方法可分为两大类:第 1 类是直接光学技术评价(即基于直接、或通过使用导出的分光光度法对在 415、541 或 577 nm 处的氧合血红蛋白吸收峰进行定量);第 2 类为化学技术评价(即通过与试剂发生化学反应对血红蛋白进行定量测定,例如联苯胺类发色团和过氧化氢化学反应的基础上,或形成氰化正铁血红蛋白)。这些方法可以是手动或自动操作。

测定血红蛋白浓度的常用方法原理是联苯胺衍生物(如 N-四甲联苯胺)在过氧化氢内受血红蛋白催化发生氧化作用,产生显色反应。显色物(在 600 nm 处光度法测定)的形成速度与血红蛋白的浓度成正比。该方法的优点是易于自动化(市售设备),不使用有潜在毒性和环境危险性的氰化试剂,可以用 HiCN 基准对照标准来校准 Hb 标准溶液系列。该方法的检测限度(低至 5.0 mg/dL)可与氰化血红蛋白法相比^[70]。其主要缺点是使用联苯胺染色剂仍然有潜在健康风险,同时试剂和产品的处置费用较高。而且,该方法的动态范围较低(5 mg/dL~50 mg/dL)^[73],可能因钙螯合物抗凝剂(如枸橼酸盐、草酸盐、EDTA)^[73]、白蛋白^[75]或其他可能干扰 H₂O₂ 氧化的非特异性血浆成分^[74]而发生反应抑制(多达 40%)^[74]。

因此,可以用具有可比灵敏性和重现性的方法,比如 Harboe^[76],Cripps^[77]或 Taulier^[78]法代替直接光学法。但是,如上所述,可能发生因化学物质引起的血红蛋白和其光谱的改变,使得一些血红蛋白测定无效。而且,因其还能改变血红蛋白的光谱^[72],所以需要血浆内在背景干扰进行补偿。研究者应注意血浆血红蛋白测定中的这些限制性,并确定是否使用了适当的技术^{[64][65][72][73]},这包括评价试验上清液是否有沉淀出现和对比上清液与分离的氧合血红蛋白的光谱(例如 400 nm~700 nm)。

C.6.1.3.2 免疫比浊法

免疫比浊法是使用市售的抗体采用浊度法测定血浆血红蛋白。该方法为常规性操作,与光学技术^[79]有密切关联并具可比性。

C.6.2 血液与血液成分保存

本条提供了经美国血库协会^[80]和欧洲理事会^[81]确认过的人体血液成分保存最佳规范。通常,材料和器械试验用的血液,其化学条件应模拟器械的临床条件(例如抗凝剂的适当选择、血液保养液的最低用量和适宜的血液 pH 值)^[83]。

目前已经开发出用于血液采集防止凝血并能在一段时间内保存红细胞的抗凝溶液,这些溶液都含有枸橼酸钠、枸橼酸和葡萄糖,有些还含有腺嘌呤、鸟嘌呤核苷、甘露醇、蔗糖、山梨糖醇和/或磷酸盐^{[82][83][84][85][86][87]}。

枸橼酸与钙离子结合可防止血液凝固。红细胞在贮存期间的能量来源是葡萄糖,一分子葡萄糖通过糖酵解途径,可由二磷酸腺苷(ADP)磷酸化作用生成两分子三磷酸腺苷(ATP)。ATP 分子为维持红细胞膜的可塑性和膜的运输功能提供能量,ATP 至 ADP 的转换释放维持这些功能所需的能量。为延长贮存时间,必须向抗凝剂溶液中加入枸橼酸以降低碱性。在红细胞贮存于 4℃ 下的初期,保养液应保持适当较高的氢离子浓度,酸性增加会降低葡萄糖分解率。核苷酸腺苷(ATP、ADP、AMP)在贮存期间会被消耗,在抗凝溶液中加入腺苷可以使 AMP、ADP 和 ATP 转化合成。

当制备红细胞浓缩液时,除血浆的同时也除去了相当大部分的葡萄糖和腺嘌呤。除血浆后只要细胞不是超浓缩,红细胞就能保持充分活力。一般的枸橼酸磷酸盐葡萄糖(CPD)-腺嘌呤红细胞浓缩液,其红细胞容积分数不应大于 0.80。即使是除去 90% 以上的血浆,靠某种添加剂或悬浮液介质也能维持红细胞活力,即必须加入氯化钠、腺嘌呤和葡萄糖,而加入甘露醇或蔗糖能够进一步稳定细胞膜,可防止溶血^[80]。

血制品贮存容器的适用性可采用各种测定血制品质量的方法来进行评价^{[70][83]}。含有一种适宜抗凝剂的血制品容器,在 1℃~6℃ 的静态条件下应竖直贮存。在预定的时间周期,测定游离细胞和血浆

血红蛋白量,以评价贮存血制品的活力与质量。可以每周对贮存的血制品轻轻混合一次,以提高血制品质量。在无其他干扰因素的情况下,对容器中贮存物的评价同时也能间接评价容器对从红细胞代谢产生的二氧化碳的渗透性。

C.6.3 血液处理人员的保护

必须为接触、处理和工作时使用有潜在污染人血的人员制定书面保护措施。潜在污染材料包括血液和其他体液与制品、已经或可能已经与血液或其他体液接触的设备,以及用于有机物培养的血源性感染材料^[88]。

C.6.4 血液采集(静脉切开放血术)

静脉切开放血术中不能保证皮肤表面 100% 无菌时,应有严格标准化的静脉切开放血部位准备程序。必须做到在进行静脉穿刺之前,应使皮肤表面的抗菌溶液干燥,并在静脉穿刺针刺入之前不得与表皮接触^[80]。

用于采集血液的密闭容器(即不含室内空气)应能防止微生物污染。用针穿刺样本瓶的橡胶密封区,拔出穿刺针后应完全密闭,否则在冷藏后局部会产生真空而吸入污染空气^[80]。

注:使用真空管可导致轻微溶血。

在一个开放系统中采集的血液会被室内空气所污染,不能认为无菌。微生物污染被认为是溶血的原因之一。

C.6.5 物种选择

最理想的溶血试验是使用人血红细胞,但许多因素使这种选择难以实现或不可能。在有些国家中,人血供应是受限制的,必须储备用于人体输血,同时也应考虑供血人和动物的健康要求。而且所有血液都有一限定的“保存期”,这使得及时得到人血细胞更为困难。如果使用动物红细胞,由于动物物种间红细胞膜稳定性的差异,测定总血红蛋白含量必须保证 100% 的溶血。阴性对照物的溶血则应控制在最低限度,这样才不会掩盖试验材料的溶血活性。有报道表明家兔与人的红细胞具有相似的溶血特性,而猴子的红细胞较灵敏,豚鼠红细胞则灵敏性较低^[89]。

C.6.6 溶血评价——体外、半体外和体内与血液或血液成分接触

材料或器械可以在体外、体内或半体外条件下接触来评价其溶血作用。对材料和器械的评价常采用体外条件,半体内或体内条件则用于评价多种材料组成的器械。

在动物模型或临床试用期间可进行体内或半体内评价。可以选择下列两种设计之一:第一种情况,供试器械与已知具有合格溶血性能的上市器械进行比较;第二种情况,评价试验对象临床上明显的溶血症状。

体内或半体内试验目的是对医疗器械潜在溶血性进行定性测定。初步研究可以用体外法,并可使用新鲜的或过期的人血或动物血液。对于半体内用的医疗器械,一般的方法是用模拟预定的临床使用条件使血液流经器械再进入循环。有些医疗器械在进行半体内研究后再在一种动物模型上进行体内模拟试验,或在人体上进行限制性对照研究,研究方案应根据器械的尺寸和预期的功能进行设计。

C.6.7 直接接触与间接接触法

所用浸提条件见 GB/T 16886.12/ISO 10993-12。某些试验方法主张使器械与红细胞直接接触,而有些方法则用制备的浸提液与红细胞接触。应根据器械本身和其将来使用的条件选择试验。当使用高温浸提时应考虑 GB/T 16886.12/ISO 10993-12 中规定的条件。

参 考 文 献

国际标准

- [1] ISO 5840:1996 心血管植入物——人工心脏瓣膜
- [2] ISO 5841-1 心脏起搏器——第1部分:植入式起搏器(已转化为 GB 16174.1—1996, idt ISO 5841-1:1989)
- [3] ISO 5841-3 外科植入物——心脏起搏器——第3部分:植入式起搏器用小头连接器
- [4] ISO 7198 心血管植入物——血管假体
- [5] ISO 7199 心血管植入物和人工器官——血气交换器(人工肺)
- [6] ISO 10993-12 医疗器械生物学评价——第12部分:样品制备和参照材料(已转化为 GB/T 16886.12—2000, idt ISO 10993-12:1996)
- [7] ISO 3826 人体血液及血液成分用塑料折式容器

各国国家标准

- [8] GB/T 16175—1996 医用有机硅材料生物学评价试验方法
- [9] AANSI/AAMI CVP3-1981 人工心脏瓣膜
- [10] ANSI/AAMI VP20-1986 血管移植假体
- [11] ASTM F 756-00 材料溶血性能评价标准规范
- [12] BS 5736-11:1990 医疗器械生物学危害评价——第11部分:溶血试验方法
- [13] ASTM F 1984-99 固体材料血清总补体激活试验标准规范
- [14] ASTM F 2065-00 固体材料血清替代途径补体激活试验标准规范
- [15] DIN 58 361-4:1980 输血、输液、输血容器和附件,塑料血浆袋,尺寸
- [16] NF 90-300:1981 医疗外科材料——氧合器

科学文献

- [17] BOSCH, T., SCHMIDT, B., BLUMENSTEIN, M. and GURLAND, H. J., Thrombogenicity markers in clinical and ex vivo assessment of membrane biocompatibility. *Contr. Nephrol.*, 59, 1987, pp. 90-98
- [18] CHENOWETH, D. E., Complement activation produced by biomaterials. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, 32:226-232, 1986
- [19] BURNS, G. L. PANTALOS, G. M. and OLSEN, D. B., The calf as a model for thromboembolic events with the total artificial heart. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, 33, 1987, pp. 398-403
- [20] COOPER, S. L., FABRIZIUS, D. J. and GRASEL, T. G., Methods of assessment of thrombosis ex vivo. In: Leonard E. F., Turitto V. T., and Vroman L. (Eds): *Blood in contact with natural and artificial surfaces. Ann N. Y. Acad. Sci.*, 516, 1987, pp. 572-585
- [21] CORRIVEAU, D. M. and FRITSMA, G. A. (Eds): *Hemostasis and thrombosis in the clinical laboratory*. J. B. Lippincott, Philadelphia, 1988, p. 443
- [22] DAWIDS, S. (Ed): *Test procedures for the blood compatibility of biomaterials*. Kluwer, Dordrecht, Boston, 1993, p. 684
- [23] DEWANJEE, M. K., Methods of assessment of thrombosis in vivo, In: Leonard E. F., Turitto V. T. and Vroman L. (Eds): *Blood in contact with natural and artificial surfaces. Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 516, 1987, pp. 541-571

- [24] DEWANJEE, M. K. , KAPADVANJWALA, M. and SANCHEZ, A. , Quantitation of comparative thrombogenicity of dog, pig, and human platelets in a hemodialyser. *Amer. Soc. Artif. Int. Organs J.* , 38, 1992, pp. 88-90
- [25] DIDISHEIM, P. , DEWANJEE, M. K. , FRISK, C. S. , KAYE, M. P. and FASS, D. N. , Animal models for predicting clinical performance of biomaterials for cardiovascular use. In: Boretos J. W. and Eden M. (Eds). *Contemporary Biomaterials*, Noyes Publications, Park Ridge, NJ, USA, 1984, pp. 132-179
- [26] DIDISHEIM, P. , DEWANJEE, M. K. , KAYE, M. P. , FRISK, C. S. , FASS, D. N. , TIRRELL, M. V. and ZOLLMAN, P. E. , Nonpredictability of long-term in vivo response from short-term in vitro or ex vivo blood/material interactions. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, 30, 1984, pp. 370-376
- [27] DIDISHEIM, P. , OLSEN, D. B. , FARRAR, D. J. , PORTNER, P. M. , GRIFFITH, B. P. , PENNINGTON, D. G. , JOIST, J. H. , SCHOEN, J. F. , GRISTINA, A. G. and ANDERSON, J. M. , Infections and thromboembolism with implantable cardiovascular devices. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, 35, 1989, pp. 54-70
- [28] DIDISHEIM, P. , STROPP, J. Q. , BOROWICK, J. H. and GRABOWSKI, E. F. , Species differences in platelet adhesion to biomaterials: investigation by a two-stage technique, *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, 2, 1979, pp. 124-132
- [29] Guidelines for blood/material interactions. Report of the National Heart, Lung and Blood Institute Working Group, U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. NIH Publication No. 85-2185, revised September 1985. Available from Biomaterials Program, Bioengineering Research Group, Division of Heart and Vascular Diseases, NHLBI, Two Rockledge Center, 6701 Rockledge Drive, Bethesda, MD 20892, USA
- [30] HARKER, L. A. , KELLY, A. B. and HANSON, S. R. , Experimental arterial thrombosis in non-human primates. *Circulation*, 83, Supplement IV, 1991, pp. 41-55
- [31] HARKER, L. A. , MALPASS, T. W. , BRANSON, H. E. , HESSEL, E. A. II and SLICHTER, S. J. , Mechanism of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonary bypass: Acquired transient platelet dysfunction associated with selective alpha granule release. *Blood*, 56, 1980, pp. 824-834
- [32] HARKER, L. A. , RATNER, B. D. , and DIDISHEIM, P. (Eds) : Cardiovascular Biomaterials and Biocompatibility. Supplement to *Cardiovasc. Pathol.* , 2(3) (Suppl.) , Jul-Sept 1993, pp. 1S-224S
- [33] KARWATH, R. , SCHÜRER, M. and WOLF, H. , Measurement of platelet adhesiveness onto artificial surfaces using Cr-51 and In-111 labelled platelets. *Studia Biophys.* , 131, 1989, pp. 117-123
- [34] KATAOKA, K. , MAEDA, M. , NISHIMURA, T. , NITADORI, TSURUTA, T. , AKAIKE, T. , and SAKURAI, Y. , Estimation of cell adhesion on polymer surfaces with the use of "column method". *J. Biomed. Mater. Res.* , 14, 1980, pp. 817-823
- [35] KAY, L. A. , *Essentials of Haemostasis and Thrombosis*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1988, pp. 290
- [36] LEWIS, J. L. , SWEENEY, J. , BALDINI, L. , FRIEDLAND, G. H. , and SALZMAN, E. W. , Assessment of thromboresistance of intravenous cannulae by 125 I-fibrinogen scanning. *J. Biomed. Mater. Res.* , 19, 1985, p. 99
- [37] MAHIOUT, A. , MEINHOLD, H. , JORRES, A. , KRIEG, R. , KESSEL, M. , TRETZEL, J. and BAURMEISTER, U. , Ex vivo model for preclinical evaluation of dialysers containing new mem-

- branes. *Life Support Systems*, 3, Suppl. 1, 1985, pp. 448-452
- [38] MIALE, J. B. , *Laboratory medicine hematology*. Sixth edition, CV Mosby, St. Louis, 1982
- [39] PALATIANOS, G. M. , DEWANJEE, M. K. , and ROBINSON, R. P. , et al. Quantification of platelet loss with Indium-111 labelled platelets in a hollow-fiber membrane oxygenator and arterial filter during extracorporeal circulation in a pig model. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, 35, 1989, pp. 667-670
- [40] SCHOEN, F. J. , ANDERSON, J. M. , DIDISHEIM, P. , DOBBINS, J. J. , GRISTINA, A. G. , HARASAKI, H. , and SIMMONS, R. L. , Ventricular assist device(VAD) pathology analyses: guidelines for clinical studies. *J. Appl. Mater.* , 1, 1990, pp. 49-56
- [41] SCHOEN, F. J. , *Interventional and surgical cardiovascular pathology*. Appendix: Pathologic analysis of the cardiovascular system and prosthetic devices, W. B. Saunders Co. , Philadelphia, 1989, pp. 369-396
- [42] ROSENGART, T. K. , LANG, S. J. , Valvular Heart Disease. In: Barrie, P. S. , Shires, G. T. , *Surgical Intensive Care*, Little, Brown and Company, Boston, 1993, pp. 577-612
- [43] ANDERSON, J. M. , Cardiovascular Device Retrieval and Evaluation. In: Harker, L. A. , Ratner, B. D. , Didisheim, P. (Eds) ; Cardiovascular Biomaterials and Biocompatibility. Supplement to *Cardiovasc. Pathol.* , 2, (3) (Suppl.) , Jul-Sept 1993, pp. 199S-208S
- [44] SPENCER, P. C. , SCHMIDT, B. , SAMTLEBEN, W. , BOSCH, T. and GURLAND, H. J. , Ex vivo model of hemodialysis membrane biocompatibility. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, 31, 1985, pp. 495-498
- [45] *Tripartite Biocompatibility Guidance for Medical Devices*. Prepared by toxicology sub-group of the Tripartite Subcommittee on medical devices, September 1986
- [46] WARD, R. A. , SCHMIDT, B. , BLUMENSTEIN, M. , and GURLAND, H. J. Evaluation of phagocytic cell function in an ex vivo model of hemodialysis. *Kidney International* , 37, 1990, pp. 776-782
- [47] WHITE, R. A. , Diagnosis and therapy of emergent vascular diseases. In: Shoemaker, W. C. , Ayres, S. , Holbrook, P. R. , and Thompson, W. L. , *Textbook of Critical care* , 2nd edn. W. B. Saunders, Philadelphia, 1989, pp. 447-452
- [48] ZINGG, W. , IP, W. F. , SEFTON, M. V. , and MANCER, K. , A chronic arteriovenous shunt for the testing of biomaterials and devices in dogs. *Life Support Systems* , 4, 1986, pp. 221-229
- [49] World Health Organization, *Recommended methods for the visual determination of white cells and platelet counts*. Document WHO/LAB/88. 3, 1988
- [50] ICH: *Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology* (CPMP/ICH/281/95) and *Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology* (CPMP/ICH/381/95), The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
- [51] GROTEMEYER, K. -H. , VIAND, R. , BEYKIRCH, K. Thrombozytenfunktion bei vasomotorischen. Kopfschmerzen und Migränekopfschmerzen. *Dtsch. Med. Wschr.* , 108, 1983, pp. 775-778
- [52] WU, K. K. , HOAK, J. C. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet*, 1974 II , p. 924
- [53] KUNICKI, T. J. , TUCELLI, M. , BECKER, G. A. , ASTER, R. H. , A study of variables affecting the quality of platelets stored at room temperature. *Transfusion*, 15, 1975, pp. 414-421
- [54] CHANDLER, A. B. , In Vitro thrombotic coagulation of the blood; a method for producing a

thrombus. *Lab. Investigations*, 7, 1958, pp. 110-114

- [55] GOODMAN, S. L. , LELAH, M. D. , LAMBRECHT, L. K. , COOPER, S. L. , ALBRECHT, R. M. , In vitro vs. Ex vivo Platelet Deposition on Polymer Surfaces. *Scanning Electron Microscopy* , 1, 1984, pp. 279-290
- [56] GOODMAN, S. L. , COOPER, S. L. , ALBRECHT, R. M. , Activation of Platelets from Humans, Canines, and Macaques on Polymer Surfaces. *Progress in Artificial Organs* , ISAO Press, 1985
- [57] ICSH Panel on Diagnostic Application of Radionuclides. Recommended method for ¹¹¹ Indium Platelet survival studies. *J. Nuclear Med.* , 29, 1988, pp. 564-566
- [58] NCCLS and ICSH. *Methods for reticulocyte counting (Flow cytometry and supravital dyes)* , approved guideline. NCCLS document H44-A. Vol. 17, No. 15, 1997
- [59] LEWIS, S. M. , ROWAN, R. M. , KUBOTA, F. , Evaluation of a prototype for a reference platelet counter. *J. Clin. Pathol.* , 43, 1990, pp. 932-936
- [60] CHIGNIER, E. , PARISE, M. , MCGREGOR, L. , DELABRE, C. , FAUCOMPRET, S. , MCGREGOR, J. , A P-Selectin/CD62P monoclonal antibody (LYP-20), in Tandem with Flow Cytometry Detects in vivo activated circulating rat platelets in severe vascular trauma. *Thrombosis and Haemostasis* , 72, 1994, pp. 745-749
- [61] KUNDU, S. , HELLERMAN, E. , SIO, R. , GARCIA, C. , OSTGAARD, R. , Characterization of an in vitro Platelet function Analyzer, PFA-100. *Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis* , 2, 1996, pp. 241-249

Scientific papers referenced in Annex C

- [62] *Taber's Cyclopedic Medical Dictionary* , 17th Edition, F. A. Davis Company, Philadelphia, PA, 1993
- [63] MUELLER, M. R. , SCHIMA, H. , ENGELHARDT, H. , SALAT, A. , OLSEN, D. B. , LOSERT, U. , WOLNER, E. , In vitro Hematological Testing of Rotary Blood Pumps; Remarks on Standardization and Data Interpretation, *Artif. Organs* , 17(2), 1993, pp. 102-110
- [64] NORTHUP, S. J. , Hemocompatibility; Not all devices are created equal. *Med. Devic Diagnost. Ind.* , Jan. 1997, pp. 145-150
- [65] REED, K. W. , YALKOWSKY, S. H. , Lysis of human red blood cells in the presence of various cosolvents. *J. Par. Sci. Technol.* , 39(2), 1985, pp. 64-68
- [66] HOCH, J. R. , SILVER, D. , Hemostasis and Thrombosis, in *Vascular Surgery: A Comprehensive Review* , 3rd edition, W. S. Moore, ed. , W. B. Saunders, Philadelphia, 63-79, 1991
- [67] OFFEMAN, R. D. , WILLIAMS, M. C. , Material effects in shear-induced hemolysis, *Biomater. Med. Dev. Art. Org.* , 7, 1979, pp. 359-391
- [68] LAMPERT, R. H. , WILLIAMS, M. C. , Effect of surface materials on shear-induced hemolysis, *J. Biomed. Mater. Res.* , 6, 1972, pp. 499-532
- [69] OBENG, E. K. , CADWALLADER, D. E. , In vitro dynamic method for evaluating the hemolytic potential of intravenous solutions. *J. Parenteral Sci. Technol.* , 43, 1989, pp. 167-173
- [70] HENRY, J. B. , Hematology and Coagulation, In: *Clinical Diagnosis & Management By Laboratory Methods* , 18th edn. , W. B. Saunders Co. , Philadelphia, PA, USA, 556-603, 1991
- [71] International Committee for Standardization in Haematology (ICSH); Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood. (ICSH Standard EP 6/2; 1995) and specifications for international hemoglobin cyanide standard (4th edition) *J. Clin. Pathol.* , 49, 1996, pp. 274-279

- [72] MALINAUSKAS, R. A. Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices, *Artif. Organs*, 21, 1997, pp. 1255-1267
- [73] Sigma Diagnostics; *Plasma Hemoglobin: Quantitative, colorimetric determination in plasma at 600 nm* (Procedure No. 527, April 1991) Sigma Diagnostics, St. Louis, MO
- [74] STANDEFER, J. C. , VANDERJAGT, D. Use of tetramethylbenzidine in plasma hemoglobin assay. *Clin. Chem.* , 23, 1997, pp. 749-751
- [75] FAIRBANKS, V. F. , ZIESMER, S. C. , O'BRIEN, P. C. Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. *Clin. Chem.* 1992; 38:132-140. Erratum - Correction: Measurements of Plasma Hemoglobin, *Clin. Chem.* , 39, 1993, pp. 2027-2028
- [76] HARBOE, M. , A method for determination of haemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry, *Scand. J. Clin. Lab Invest.* , 11, 1959, pp. 66-70
- [77] CRIPPS, C. M. Rapid method for the estimation of plasma haemoglobin levels. *J. Clin. Pathol.* , 21, 1968, pp. 110-112
- [78] TAULIER, A. [Value of derivative spectrophotometry for the determination of plasma and urinary haemoglobin. Comparison with the method using Allen's correction]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 44, 1986, pp. 242-248 French
- [79] LAMMERS, M. , GRESSNER, A. M. , Immunonephelometric quantification of free hemoglobin. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* , 25, 1987, pp. 363-367
- [80] *Standards for Blood Banks and Transfusion Services*, 16th edn. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1994
- [81] *Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components*. Strasbourg: Council of Europe Publishing and Documentation Service, 1992, pp. 37-38
- [82] Anticoagulant Citrate Dextrose Solution. *U. S. Pharmacopeia* 23, 1995, p. 119
- [83] Anticoagulant and preservative solutions for human blood: Anticoagulant acid-citrate-glucose solutions (ACD) and Anticoagulant citrate-phosphate-glucose solution (CPD). *European Pharmacopoeia* 0209, 1997, pp. 400-403
- [84] Anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose Solution. *U. S. Pharmacopeia* 23, 1995, pp. 119-120
- [85] Anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose Adenine Solution. *U. S. Pharmacopeia* 23, 1995, pp. 121-122
- [86] Anticoagulant Heparin Solution. *U. S. Pharmacopeia* 23, 1995, p. 122
- [87] Anticoagulant Sodium Citrate Solution. *U. S. Pharmacopeia* 23, 1995, p. 122
- [88] 29 CFR, Code of Federal Regulations, 1910. 1030, *Bloodborne Pathogens*
- [89] WENNBERG, A. , HENSTEN-PETTERSEN, A. , Sensitivity of erythrocytes from various species to in vitro hemolysis, *J. Biomed. Mater. Res.* , 15, 1981, pp. 433-435
- [90] *A Colour Atlas of Comparative, Diagnostic and Experimental Haematology*, Mosby-Year Book Europe Limited, London, England, 1994
- [91] Sterile plastic containers for human blood and blood components. *European Pharmacopoeia* , 3. 2. 3, 1997, pp. 175-179