ICS 11.040.40
C 45

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1620—2018

心肺转流系统　连续流血泵红细胞损伤评价方法

Cardiopulmonary bypass systems—Assessment method of red blood cell damage in continuous flow blood pumps

2018-09-28 发布　　2019-10-01 实施

国家药品监督管理局　发布

目　　次

前言 …… Ⅰ
引言 …… Ⅱ
1　范围 …… 1
2　规范性引用文件 …… 1
3　术语和定义 …… 1
4　通则 …… 2
5　试验概述 …… 2
6　试验前准备 …… 3
7　试验步骤 …… 4
8　接受准则 …… 5
附录A（规范性附录）　体外评价血泵红细胞损伤试验所用血液的选择 …… 6
附录B（资料性附录）　血浆游离血红蛋白和总血红蛋白的测定方法 …… 8
参考文献 …… 11

前　言

本标准按照 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。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准由全国医用体外循环设备标准化技术委员会(SAC/TC 158)归口。

本标准起草单位:中国食品药品检定研究院、广东省医疗器械质量监督检验所、威海威高生命科技有限公司。

本标准主要起草人:邵安良、杨立峰、徐丽明、相国民、李梦洁、何晓帆、柯军、洪良通、曹穗兰、郑保婷、向健。

引　言

使用血泵的目的是替代或者辅助人心脏的功能，完成体外循环。目前研发的包括滚柱泵(roller pump)和离心泵(centrifugal pumps)是临床体外循环中普遍使用的连续流血泵。血泵不仅使用在常规心外科手术的心肺转流术(体外循环)中，它还可用于心室辅助，体外膜式氧合等。

溶血是评价血泵所导致红细胞损伤的重要参数之一。血泵引起的溶血，主要取决于血泵的设计、结构和所使用的材料。国际标准化组织外科植入物技委会心血管分技术委员会(ISO/TC 150/SC 2)已发布 ISO 18242:2016 Cardiovascular implants and extracorporeal systems—Centrifugal blood pumps，其中在要求和方法的条款中专门有一条对红细胞损伤的评价要求，并给出了试验用血液的基本条件(血流速率、血糖、血红蛋白含量)；在试验步骤条款中，给出了试验工装的基本组成、试验时间、取样点和检测项目(其中包括游离血红蛋白的检测指标)。然而，在我国相关的血泵标准中并未把溶血性能评价列入评价血泵潜在风险的指标中，无疑给使用留下了安全隐患。而在 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》中没有涉及关于血泵这类仪器在连续循环时流体力学因素、结构等对红细胞的潜在破坏作用。因此，非常有必要建立规范化的评价连续流血泵的体外溶血试验方法。ISO 18242 标准中虽然给出了试验用血液的基本条件，但未给出详细的试验用血液选用标准。事实上，用于试验的血液质量不同会严重影响试验的结果；该标准中也未给出详细的试验工装设计及连续流循环 6 h 的测试方法。ASTM F1830—1997(R 2013) Standard Practice for Assessment of Hemolysis in Continuous Flow Blood Pumps 和 ASTM F1841—1997(R 2013) Standard Practice for Selection of Blood for in vitro Evaluation of Blood Pumps 则给出了详细的试验用血液选用条件和具体的试验工装设计及连续循环 6 h 的测试方法。本标准优化了试验工装的设计，补充了游离血红蛋白的检测方法，完善了试验规程。

心肺转流系统　连续流血泵红细胞损伤评价方法

1　范围

本标准给出了连续流血泵红细胞损伤评价的具体方法。

本标准适用于心肺转流系统中连续流血泵(标称为 5 L/min 以上)红细胞损伤的评价。

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 16886.4　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 16886.4—2003,ISO 10993-4:2002,IDT)

3　术语和定义

GB/T 16886.4 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

连续流血泵　continuous flow blood pump

由驱动力驱动产生连续血流的装置。

3.2

血浆游离血红蛋白　free plasma hemoglobin

红细胞破坏释放到血浆中的血红蛋白(珠蛋白或者含血红素蛋白)。

3.3

溶血　hemolysis

红细胞损伤破坏,导致血红蛋白进入血浆的现象。

3.4

标准溶血指数　normalized index of hemolysis;N.I.H.

每泵送 100 L 血液所增加的血浆游离血红蛋白质量数(克),采用红细胞压积对血浆量进行校正,并用流量及循环时间进行修正。

3.5

标准毫克溶血指数　normalized milligram index of hemolysis;mg.N.I.H.

以血浆游离血红蛋白毫克数表示的标准毫克溶血指数。

3.6

修正溶血指数　modified index of hemolysis;M.I.H.

释放到血浆中的血红蛋白量与经血泵输送的血红蛋白总量归一化后的比值。

4 通则

4.1 溶血指数表示形式

4.1.1 标准溶血指数(N.I.H.)

$$N.I.H. = \Delta \text{free Hb} \times V \times \frac{100 - Hct}{100} \times \frac{100}{Q \times T} \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

N.I.H. ——标准溶血指数，单位为克每 100 升(g/100 L)；

Δfree Hb——在采样时间间隔内，血浆游离血红蛋白浓度的增加量，单位为克每升(g/L)；

V ——回路容量，单位为升(L)；

Q ——流量，单位为升每分(L/min)；

Hct ——红细胞压积，%；

T ——采样时间间隔，单位为分(min)。

4.1.2 标准毫克溶血指数(mg.N.I.H.)

$$mg.N.I.H. = N.I.H. \times 1\,000 \quad \cdots\cdots(2)$$

式中：

mg.N.I.H.——标准毫克溶血指数，单位为毫克每 100 升(mg/100 L)。

4.1.3 修正溶血指数(M.I.H.)

$$M.I.H. = \Delta \text{free Hb} \times V \times \frac{100 - Hct}{100} \times \frac{10^6}{Q \times T \times Hb} \quad \cdots\cdots(3)$$

式中：

M.I.H. ——修正溶血指数；

Hb ——在时间点 0 时总血红蛋白浓度，单位为克每升(g/L)；

10^6 ——修正常数因子，其目的是为了得到一个没有小数的数据；

Δfree Hb——在采样时间间隔内，血浆游离血红蛋白浓度的增加量，单位为克每升(g/L)。

注：在这些参数中，M.I.H.被建议作为在循环系统中由血泵引起溶血程度的一个参数，N.I.H.需要考虑基于红细胞压积的血浆量。最近所研发的溶血性更小的血泵采用 mg.N.I.H.表示，比 N.I.H.更为方便。然而，N.I.H.与 mg.N.I.H.都会随着血液红细胞压积的变化而变化。M.I.H.方程式直接校正了血液血红蛋白浓度及红细胞压积的差异。

4.2 试验用血液

血液来源不同时，由创伤所引起的溶血水平也有所不同，因此需要确定血液的来源，及其各个溶血指数。采用人血、牛血或者猪血作为主要的试验用血液来源。有关连续流血泵红细胞损伤试验所用血液的选择标准见附录 A(体外评价血泵红细胞损伤试验所用血液的选择标准)。

注：不得使用在屠宰场采集的血液(除非血液是通过静脉穿刺获得的)。

5 试验概述

5.1 血液采集

血液应使用(14 G 或者更大的)针头通过血管穿刺采集，并收集到 500 mL～2 000 mL 含有枸缘酸

盐-磷酸盐-葡萄糖-腺嘌呤(CPDA-1)抗凝剂或者硫酸肝素的标准血袋中。

5.2 测试回路

测试回路是由总长为 2 m,内径为 9.5 mm 的聚氯乙烯管及一个血袋(一般为 13 cm×13 cm)组成。血袋上带有一个取样口(或者采用带有三通式出口的三通管,装在聚氯乙烯管回路上)。为了监测压力,在测试回路的入口及出口管路中可结合使用压力监测表(见图 1)。待泵送的血液量为(450±45)mL。测试回路中血液的温度可通过把部分回路浸入恒温浴槽中进行控制。

注 1:测试回路的聚氯乙烯管和血袋是经过常规的溶血试验证明合格的产品。

注 2:可根据待评价血泵类型的不同设计相匹配的测试回路。

5.3 泵的条件

泵的流量应设定为(5±0.25)L/min,循环血液温度为(37±1)℃。压力设定为(500±15)mmHg。然而,根据泵预期应用的临床实际情况,也可以选择 0 ℃～42 ℃范围内的其他温度(如心肺转流术在手术期间会有冷却与加热)。

5.4 评价指标

血浆游离血红蛋白作为评价指标,可采用临床认可的测定方法进行测定,通过计算 M.I.H.进行校正。

注:血浆游离血红蛋白和总血红蛋白的测定方法参见附录 B。红细胞压积(Hct)可采用临床上常用的血细胞分析法。

6 试验前准备

6.1 血液

血液选择见附录 A。

6.2 测试回路

封闭测试回路包括一根总长为 2 m,内径为 9.5 mm 的聚氯乙烯管,一个血袋,一个压力表和一台待测试血泵。回路中应充满 PBS,在回路中循环大约 10 min～20 min,以清洗并湿润所有与血液接触的表面。在加血液之前,应彻底排空回路中的 PBS。在用 PBS 清洗之后,回路中可以开始准备将(450±45)mL 的新鲜血液打入血袋中。应去除血袋中聚集的空气,使没有空气界面留在血袋里。用以产生前压力条件的螺丝钳应放在泵的出口侧。在测试回路的入口及出口处连接压力表。(见图 1)

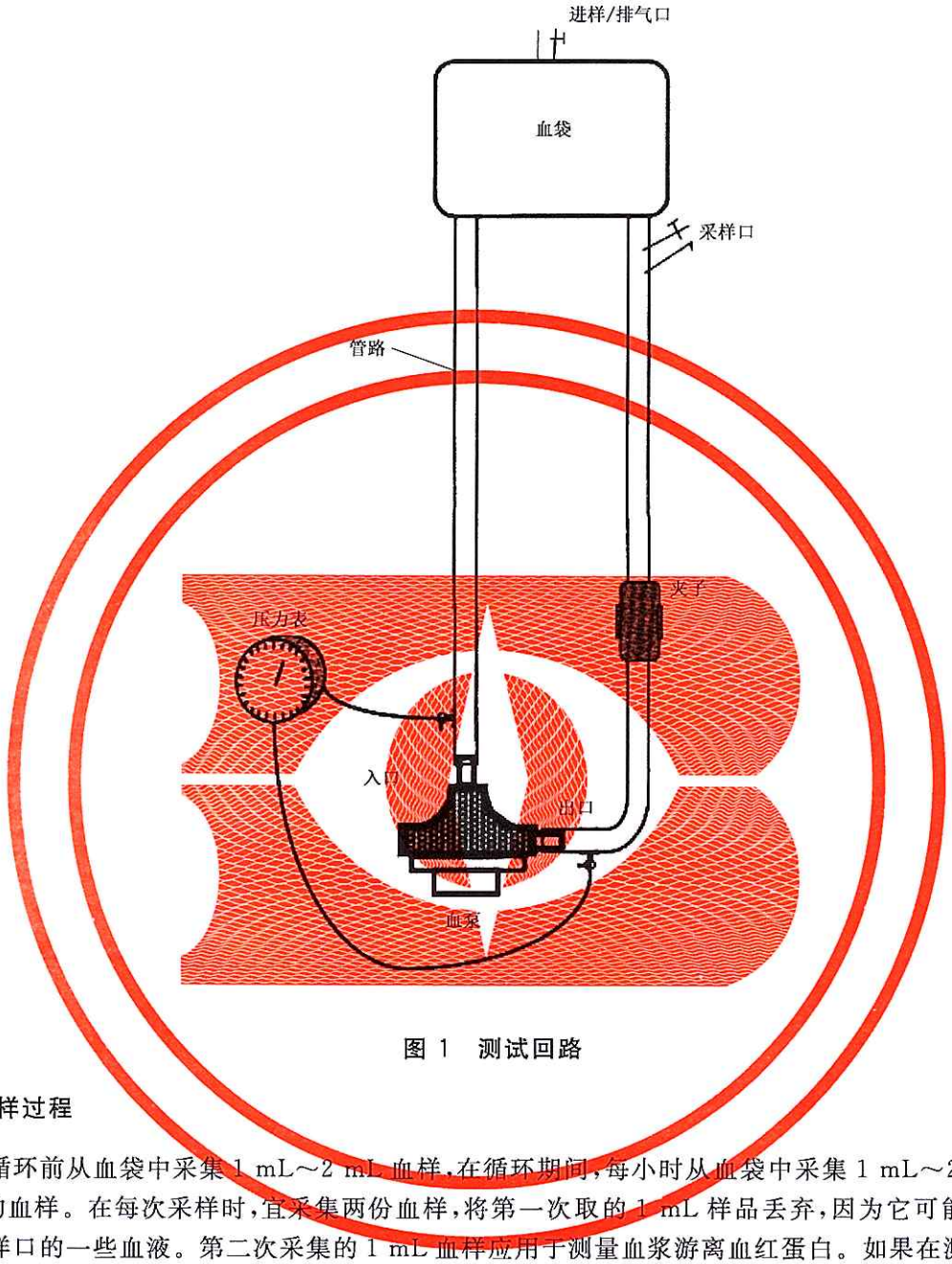

图 1　测试回路

6.3　采样过程

在循环前从血袋中采集 1 mL～2 mL 血样，在循环期间，每小时从血袋中采集 1 mL～2 mL(推荐 1 mL)的血样。在每次采样时，宜采集两份血样，将第一次取的 1 mL 样品丢弃，因为它可能会含有滞留在采样口的一些血液。第二次采集的 1 mL 血样应用于测量血浆游离血红蛋白。如果在测试之前盐水被彻底排净，那么初始的总血液血红蛋白浓度，血浆血红蛋白浓度及红细胞压积都可以用循环前的血液测出。最好时间点为 0 的测量值从在回路中大约循环了 5 min 的血液中测得，以确保其完全混合与稀释。

7　试验步骤

7.1　图 1 中描述了溶血测试的标准闭合回路，该回路由一台被测试的泵、带有采样口的血袋、在管子的每一段有压力监测点的出口管与入口管、压力传感器或者压力表及一个螺丝钳组成。

7.2　血液被加热到 37 ℃(或者其他温度)，通过重力作用经过血袋的进样口或者其他适宜方式灌输到测试回路中。

7.3　在测试回路运行大约 5 min，并且回路中的气泡已排出之后，通过采样口采集第一个血样，作为

0 时间点的血样。

7.4 开启血泵，将其调整到待测试的试验条件。

7.5 测试周期建议为 6 h，在血泵循环 5 min 后采集第一个血样，之后 6 个血样每隔一小时采集一次。所推荐的这种取样方法可以为统计学评价提供足够数量的测试血样。血浆游离血红蛋白的测定方法参见附录 B。为了确保采样的准确性，宜在采集血样之前，对血袋进行轻轻地挤压，并舍弃采样口附近的 1 mL 血样。

7.6 通常情况下，在整个测试周期中循环血液温度宜保持在(37±1)℃，若需在其他合适的使用温度下进行测试时例外。

8 接受准则

结果宜作为时间依存性的溶血数据进行报告，其血浆游离血红蛋白回归曲线的回归系数宜大于 0.95。报告宜以溶血指数的形式给出，即：每循环 100 L 血液所增加的血浆游离血红蛋白克数(N.I.H.)与 M.I.H.值。试验样品的标准溶血指数＞0.1 g/100 L 时，表明连续流血泵在该试验条件和持续使用的时间内会引起红细胞的破坏。

附 录 A
（规范性附录）
体外评价血泵红细胞损伤试验所用血液的选择

A.1 总则

A.1.1 血泵引起的溶血主要取决于血泵的设计、结构和所使用的材料。用于体外评价血液破坏的血源在很大程度上将会影响血泵性能评价的结果。体外溶血试验的试验结果很大程度上会受到供血者物种和年龄、血液采集方法、存储时间、血液的生化状态、血红蛋白及红细胞压积等因素的影响。因此，用于体外评价血泵溶血性能的血液进行标准化是非常重要的，而且这将会使试验结果具有普遍的可比性。

A.1.2 体外溶血试验时，新鲜的牛血或猪血在 48 h 内使用（包括运输时间）；人源供血宜在采集后 24 h 内使用。采集的血液建议在 2 ℃～8 ℃冷藏保存。

A.1.3 针对血泵的设计和材料进行的实验性评价，一般推荐采用新鲜的牛血或者猪血进行体外溶血试验。供血动物的体温宜正常，无明显的疾病特征，如腹泻、流鼻涕等，并且血液学指标在正常范围。从屠宰场获得的血液不宜使用，因为它可能被其他液体污染。不过，通过可控的静脉穿刺获得的血液可以使用。

A.1.4 从健康牛身上采集几个单位的血液是不会影响到他们的健康，因此牛血被强烈建议用于红细胞损伤的实验性评价。在溶血试验中应避免使用两个供血者的混合血。因为混合血液可能会导致溶血增加或者改变红细胞的抗破坏能力。

A.2 血液的采集和准备

A.2.1 用大孔针（14 G 或者更大的）通过血管穿刺采集血液，并采集到含有枸缘酸盐-磷酸盐-葡萄糖-腺嘌呤（CPDA-1）抗凝剂或者硫酸肝素的血袋中。血液采自正常体温下的人（志愿者），牛，或者猪，无明显的疾病特征，如腹泻、流鼻涕等，具有可接受范围内的血液学指标。在采血过程中负压不宜超过 100 mmHg。血液收集至血袋装满，血液与抗凝剂的量在（450±45）mL 范围内。也可以使用更大的血袋。

A.2.2 血液宜冷藏保存在 2 ℃～8 ℃下，即使在运输过程中温度也宜保持在 2 ℃～8 ℃。

A.2.3 血液在使用时宜在（37±1）℃水浴下加温至生理温度。其他适宜方法也可使用。

A.2.4 在温浴过程中要特别注意小气泡的产生，这些小气泡宜在进行体外实验前通过取样口进行消除。

A.2.5 为了去除血液中的微粒、微血栓和聚集的血小板，在血液进入循环时宜用一个口径为 80 μm 或更小的滤器对血液进行过滤。作为质量控制措施，血浆游离血红蛋白浓度应小于 1 mg/mL。建议把总血红蛋白和红细胞压积数据作为血源的筛查指标。试验前和试验中都宜保持合适的生理学血液参数（如 pH 值，碱剩余，葡萄糖浓度）。

A.3 试剂

A.3.1 枸缘酸盐-磷酸盐-葡萄糖-腺嘌呤（CPDA-1）溶液。采集 450 mL 血液时需要添加 63 mL 的 CPDA-1 溶液。

A.3.2　每 63 mL 的 CPDA-1 中含有 2 g 葡萄糖，1.66 g 柠檬酸钠，188 mg 柠檬酸，140 mg 磷酸二氢钠，及 17.3 mg 的腺嘌呤。溶液的 pH 值可用氢氧化钠滴定。

A.3.3　500 mL 血液中含有 2 000 单位～3 000 单位肝素抗凝剂。

附 录 B
（资料性附录）
血浆游离血红蛋白和总血红蛋白的测定方法

B.1 原理

本方法的原理是除硫化血红蛋白外，血红蛋白及其衍生物在碱性条件下可被高铁氰化钾氧化成高铁血红蛋白，高铁血红蛋白与氰化钾反应生成氰化高铁血红蛋白，采用微孔板分光光度计（酶标仪）在540 nm 波长处读数测定氰化高铁血红蛋白吸光度值。

B.2 试剂、耗材及设备

B.2.1 试剂

CMH 试剂、氰化高铁血红蛋白标准品。

B.2.2 耗材

96 孔板、试管、枪头。

B.2.3 设备

微孔板分光光度计（酶标仪）、离心机、加样器。

B.3 校准标准品、质控品及血液样品的制备

B.3.1 校准标准品的制备

以氰化高铁血红蛋白标准品作为贮备液，然后采用血红蛋白氧化剂（CMH 试剂）作为介质，进行1∶2 倍稀释得到系列校准标准品，标准曲线的吸光度值应包括样品的吸光度值（见表 B.1）。

表 B.1 校准标准品的制备

标准品	浓度 mg/mL	制备方法
校准 1	0.8	2 mL 贮备液
校准 2	0.4	1 mL 校准 1＋1 mL CMH 试剂
校准 3	0.2	1 mL 校准 2＋1 mL CMH 试剂
校准 4	0.1	1 mL 校准 3＋1 mL CMH 试剂
校准 5	0.05	1 mL 校准 4＋1 mL CMH 试剂
校准 6	0.025	1 mL 校准 5＋1 mL CMH 试剂

B.3.2 质控品的配制

参见校准标准品，包括高、中、低 3 个浓度，这三个浓度应在校准标准品范围内，且与校准标准品的

系列浓度不重复(见表 B.2)。

表 B.2 质控品的制备

质控品	浓度 mg/mL	制备方法
质控 1	0.625	1.5 mL 贮备原液+0.42 mL CMH 试剂
质控 2	0.125	200 μL 质控 1+800 μL CMH 试剂
质控 3	0.062 5	100 μL 质控 1+900 μL CMH 试剂

B.3.3 血液样品的制备

取循环前血液 2 mL 于试管中备用,取各个时间点的血液 1 mL 于试管中,800 *g* 离心 15 min,收集上清液(血浆),放置备用。

B.4 血液样本合格判定—血液样本中血浆游离血红蛋白(PFH)和总血红蛋白(TBH)的测定

B.4.1 向 96 孔板每孔加入 200 μL 空白 CMH 试剂、校准标准品、质控品。

B.4.2 TBH 样本加样:将 20 μL 对照全血与 5 mL CMH 试剂混合 15 min,向 96 孔板中每孔加入 200 μL,共 6 孔。

B.4.3 PFH 样本加样:向每孔加入 B.3.3 中制备的 100 μL 血浆,共 6 孔,再加入 100 μL CMH 试剂。

B.4.4 将 96 孔板密封后,置于平板振荡器上轻轻振荡 1 min～2 min(中速,可设定为 2 档～3 档,如 250 次/min)。

B.4.5 于 540 nm 波长处读取各孔吸光度值,然后根据标准曲线回归方程[见式(B.1)]计算得到 PFH 和 TBH 的浓度。PFH 样本的最终浓度要乘以稀释因子 2;TBH 样本的最终浓度要乘以稀释因子 251。若 PFH 浓度低于 1 mg/mL,血液样本合格,可继续下一步试验;若高于 1 mg/mL,则当前血液样本不适合本试验,需重新采血。

B.5 试验血液样本血浆游离血红蛋白(PFH)的测定

B.5.1 标准品和质控品加样:向 96 孔板每孔加入 200 μL 空白 CMH 试剂、新鲜制备系列校准标准品和质控品。

B.5.2 PFH 样本加样:向每孔加入 B.3.3 中制备的 100 μL 试验样本血浆,共 6 孔,再加入 100 μL CMH 试剂。设 3 个平行孔。

B.5.3 将 96 孔板密封后,置于平板振荡器上轻轻振荡 1 min～2 min(中速,可设定为 2 档～3 档,如 250 次/min)。

B.5.4 在 540 nm 波长处读取各孔吸光度值,然后根据标准曲线方程[见式(B.1)]计算得到所有样品的血浆游离血红蛋白浓度。

B.6 结果计算

B.6.1 利用吸光度值为纵坐标(Y),校准标准品浓度(mg/mL)为横坐标(X),绘制标准曲线,获得回归方程:

$$Y = aX + b \qquad \cdots\cdots (B.1)$$

式中：

X ——校准标准品浓度，单位为毫克每毫升(mg/mL)；

Y ——吸光度值；

a ——常数；

b ——常数。

B.6.2 根据公式(B.1)，由校准标准品和质控品的吸光度值(Y)，得到校准标准品和质控品的实际浓度(mg/mL)，然后根据式(B.2)计算理论偏差。

$$PDFT = \frac{A - B}{B} \times 100\% \qquad \cdots\cdots (B.2)$$

式中：

$PDFT$ ——理论偏差；

A ——实际浓度，单位为毫克每毫升(mg/mL)；

B ——理论浓度，单位为毫克每毫升(mg/mL)。

每一校准标准品的 $PDFT$ 应在20%之内(最低浓度的校准标准品的 $PDFT$ 在30%之内可接受)。质控品的CV应在20%之内。若3个质控品中有2个或每一个质控品的至少一个平行孔的 $PDFT$ 在20%之内，则试验体系可接受，否则需重新试验。

参 考 文 献

[1] ASTM F1841—1997(R 2013) Standard Practice for Assessment of Hemolysis in Continuous Flow Blood Pumps.

[2] ASTM F1830—1997(R 2013) Standard Practice for Selection of Blood for in vitro Evaluation of Blood Pumps.

[3] ISO 18242:2016 Cardiovascular implants and extracorporeal systems —Centrifugal blood pumps.

[4] Malinauskas R.A.,"Plasma Hemoglobin Measurement Techniques for the In Vitro Evaluation of Blood Damage Caused by Medical Devices" Artif Organs,1997,21(12):1255-1594.

[5] 王芳群,封志刚,茹伟民,袁海宇,曾培,钱坤喜.无源磁浮叶轮血泵的溶血实验及其指标的测定.江苏大学学报(自然科学版),2002,23(2):63-65.

中华人民共和国医药
行业标准
心肺转流系统 连续流血泵红细胞损伤
评价方法
YY/T 1620—2018
*
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.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销
*
开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 26 千字
2018年10月第一版 2018年10月第一次印刷
*
书号:155066·2-33450 定价 24.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

YY/T 1620-2018