



中华人民共和国国家标准

GB/T 16886.4—2022/ISO 10993-4:2017

代替 GB/T 16886.4—2003

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: 2017, IDT)

2022-04-15 发布

2023-05-01 实施



国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

目 次

前言	Ⅲ
引言	V
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	4
5 与血液接触器械的类型(按 ISO 10993-1 分类)	4
5.1 非血液接触器械	4
5.2 外部接入器械	5
5.2.1 总则	5
5.2.2 作为间接血路的外部接入器械	5
5.2.3 与循环血液直接接触的外部接入器械	5
5.3 植入器械	5
6 血液相互作用特性	6
6.1 总体要求	6
6.2 试验类别与血液相互作用	10
6.2.1 推荐的器械与血液相互作用试验	10
6.2.2 非接触器械	11
6.2.3 外部接入器械和植入器械	11
6.2.4 局限性	11
6.3 试验类型	11
6.3.1 体外试验	11
6.3.2 半体内试验	11
6.3.3 体内试验	12
附录 A (资料性) 心血管器械和假体的临床前评价	13
附录 B (资料性) 推荐的实验室试验:原则、科学依据和说明	17
附录 C (资料性) 血栓——体内试验方法	26
附录 D (资料性) 血液学/溶血——试验方法——医疗器械和医疗器械材料的溶血性能评价	31
附录 E (资料性) 补体——试验方法	36
附录 F (资料性) 较不常见的实验室试验	39
附录 G (资料性) 不推荐的试验	42
参考文献	44

前言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是 GB/T 16886《医疗器械生物学评价》的第4部分。GB/T 16886 已经发布了以下部分：

- 第1部分：风险管理过程中的评价与试验；
- 第2部分：动物福利要求；
- 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9部分：潜在降解产物的定性和定量框架；
- 第10部分：刺激与皮肤致敏试验；
- 第11部分：全身毒性试验；
- 第12部分：样品制备与参照材料；
- 第13部分：聚合物医疗器械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：降解产物与可沥滤物毒代动力学研究设计；
- 第17部分：可沥滤物允许限量的建立；
- 第18部分：材料化学表征；
- 第19部分：材料物理化学、形态学和表面特性表征；
- 第20部分：医疗器械免疫毒理学试验原则和方法。

本文件代替 GB/T 16886.4—2003《医疗器械生物学评价 第4部分：与血液相互作用试验选择》，与 GB/T 16886.4—2003 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了部分术语，增加了新的术语和定义（见第3章，2003年版的第3章）；
- b) 将2003年版的表1和表2整合为新的表1，重新组织试验类型和表头，以强调并包括材料和机械介导的溶血试验以及用于评估血栓形成风险的体外和体内试验（见表1，2003年版的表1和表2）；
- c) 将2003年版的表3和表4合并成一个新的表2，简要列出了建议的和最常用的试验（见表2，2003年版的表3和表4）；
- d) 更改了进行与血液相互作用试验的流程图（见图1，2003年版的图1）；
- e) 增加了进行与血液相互作用试验的程序（见6.1.15）。

本文件等同采用 ISO 10993-4:2017《医疗器械生物学评价 第4部分：与血液相互作用试验选择》。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专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件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。

本文件起草单位：山东省医疗器械和药品包装检验研究院、四川大学(四川医疗器械生物材料和制

品检验中心)、广东省医疗器械质量监督检验所。

本文件主要起草人:侯丽、乔春霞、袁墩、杨立峰、赵增琳、郑利萍、莫晓彦。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为:

——2003 年首次发布为 GB/T 16886.4—2003;

——本次为第一次修订。

引言

医疗器械与血液相互作用试验方法的选择和设计宜考虑器械设计、材料、临床用途、使用环境和风险受益情况,这些特定要求的水平只能在产品标准中给出。

本文件的原始出处是《美国国家心肺及血液研究所报告 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。

《医疗器械生物学评价》拟由二十一个部分构成:

- 第1部分:风险管理过程中的评价与试验。目的是保护人类由于使用医疗器械所产生的潜在生物学风险,在风险管理过程中描述医疗器械生物学评价,并将其作为医疗器械总体评价和开发过程的一个组成部分。
- 第2部分:动物福利要求。目的在于最大限度利用科学合理的非动物试验,确保用于评价医疗器械所用材料的生物学性能动物试验符合认可的伦理和科学原则。
- 第3部分:遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验。目的是为已确定具有潜在的遗传毒性、致癌性或生殖毒性的医疗器械提供评价指南和方法。
- 第4部分:与血液相互作用试验选择。目的是为医疗器械与血液相互作用评价提供通用要求。
- 第5部分:体外细胞毒性试验。目的是为评估医疗器械体外细胞毒性提供试验方法。
- 第6部分:植入后局部反应试验。目的是为评估医疗器械所用生物材料植入后局部反应提供试验方法。
- 第7部分:环氧乙烷灭菌残留量。目的是为经环氧乙烷(EO)灭菌的单件医疗器械上EO及2-氯乙醇(ECH)残留物的允许限量、EO及ECH提供检测步骤以及确定器械是否可以出厂提供检测方法。
- 第9部分:潜在降解产物的定性和定量框架。目的是为系统评价医疗器械潜在的和已观察到的生物降解以及生物降解研究的设计与实施提供基本原则。
- 第10部分:刺激与皮肤致敏试验。目的是为医疗器械及其组成材料潜在刺激和皮肤致敏提供评价步骤。
- 第11部分:全身毒性试验。目的是为评价医疗器械材料导致潜在不良全身反应时提供试验步骤指南。
- 第12部分:样品制备与参照材料。目的是为医疗器械生物学评价中样品制备方法和参照材料提供选择指南。
- 第13部分:聚合物医疗器械降解产物的定性与定量。目的是为用于临床的成品聚合物医疗器械模拟环境的降解产物定性与定量试验设计提供通用要求。
- 第14部分:陶瓷降解产物的定性与定量。目的是为从陶瓷材料获取降解产物定量用的溶液提供方法。
- 第15部分:金属与合金降解产物的定性与定量。目的是为金属医疗器械或可供临床使用的相应材料样品的降解产物提供定性与定量试验设计的通用要求。
- 第16部分:降解产物与可沥滤物毒代动力学研究设计。目的是为提供与医疗器械相关的设计和实施毒代动力学研究的原则。
- 第17部分:可沥滤物允许限量的建立。目的是为医疗器械可沥滤物允许限量的建立提供

方法。

- 第 18 部分:材料化学表征。目的是为医疗器械成分的定性和定量(必要时)以识别生物危险以及估计和控制材料成分中的生物学风险提供框架。
- 第 19 部分:材料物理化学、形态学和表面特性表征。目的是为识别与评价最终医疗器械材料的物理特性,如物理化学、形态学和表面特性(PMT)的各种参数和试验方法。
- 第 20 部分:医疗器械免疫毒理学试验原则和方法。目的是为医疗器械潜在免疫毒性方面提供免疫毒理学综述以及为检验不同类型医疗器械的免疫毒性提供方法指南。
- 第 22 部分:纳米材料指南。目的是为包含、产生或由纳米材料组成的医疗器械生物学评价提供指南。
- 第 23 部分:刺激试验。目的是为医疗器械及其组成材料潜在刺激提供评价步骤。

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

本文件规定了医疗器械与血液相互作用评价的通用要求。

本文件给出了：

- a) 按照 ISO 10993-1 规定的预期用途和接触时间对接触血液的医疗器械进行分类；
- 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组合相应试验的原则。

由于受器械与血液相互作用方面的认识以及试验的精密度所限，不能规定详细的试验要求，因而本文件只是对生物学评价进行概括性的描述，未必能为具体器械提供足够的试验方法指南。

本文件的变化并不表明根据之前的版本进行试验是无效的。对具有安全临床使用史的上市器械，不推荐按照本次修订进行附加的试验。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

ISO 10993-1 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(Biological evaluation of medical devices—Part 1: Evaluation and testing within a risk management process)

注：GB/T 16886.1—2022 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(ISO 10993-1:2018, IDT)

ISO 10993-12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照材料(Biological evaluation of medical devices—Part 12: Sample preparation and reference materials)

注：GB/T 16886.12—2017 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照材料(ISO 10993-12:2012, IDT)

3 术语和定义

ISO 10993-1 和 ISO 10993-12 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

ISO 和 IEC 维护的用于标准化的术语数据库，地址如下：

——IEC 电子百科：<http://www.electropedia.org/>；

——ISO 在线浏览平台：<http://www.iso.org/obp>。

3.1

抗凝剂 anticoagulant

防止或延缓血液凝固的制剂。

示例：肝素、乙二胺四乙酸(EDTA)、枸橼酸钠。

3.2

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。

3.3

凝血 coagulation

凝固(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，通过测定凝血级联因子和纤维蛋白溶解系统进行。

3.4

补体系统 complement system

先天免疫系统的一部分，由 30 多种特定的血浆蛋白质组成，包括可能与促进血栓形成相关的酶、辅助因子和细胞受体。

注 1：补体成分产生的效应分子，可能与炎症、吞噬作用和细胞溶解现象有关。本文件不包括与免疫毒性、超敏反应和过敏毒素产生相关的补体激活。（见 ISO/TS 10993-20）

注 2：本文件关注的是能促进和加速器械材料表面的溶血、血小板和白细胞活化及血栓形成的补体激活。（另见附录 E 补体激活）。

3.5

直接血液接触 direct blood contact

器械或器械材料与血液或血液成分的物理接触。

3.6

栓塞 embolization

血流中携带的血栓或异物可能淤塞并导致下游血液流动阻塞的过程。

3.7

半体内试验系统 ex vivo test system

将人体或实验动物的血液直接分流至体外的试验容器的试验系统。

注：如果使用动物模型，血液可能直接返回动物体内（循环），或收集至试管内进行评价（单向通过）。这两种情况下试验容器位于体外。

3.8

血液学 haematology

对血液方面的研究，包括细胞组分和血浆成分定量测定。

3.9

红细胞比容 haematocrit

给定血样中红细胞占全血容积的比率。

3.10

溶血 haemolysis

血红蛋白通过破裂的红细胞或细胞膜部分受损但仍完整的红细胞中释放出来的过程。

3.11

血液相容性 haemocompatible

与血液接触的器械或器械材料不会引起任何明显临床意义的不良反应如血栓、溶血(3.10)、血小板、白细胞以及补体激活和/或其他血液相关的不良事件。

3.12

间接血液接触 indirect blood contact

器械与患者血路的某一点接触，并充当进入血管系统的通道。

示例：药物或胃肠外营养液输送装置。

3.13

合法上市的对照器械 **legally-marketed comparator device**

已被批准的或经长期确认的、安全性已被认可的医疗器械,在设计、材料和临床使用都类似的试验器械的体外或体内安全评价中作为参照对照。

注:合法上市的对照器械可能有必要与试验器械的注册监管地区相同。

3.14

非血液接触 **non-blood-contact**

器械或材料与病人人体接触时,器械或潜在浸提出的物质不和血液发生直接或间接接触。

3.15

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。

3.16

血小板 **platelet**

存在于血液中的无核细胞体,通过表面黏附、释放因子,和/或聚集成止血栓子而有助于血栓形成过程。

3.17

血小板黏附 **platelet adherent**

〈材料或器械〉具有允许或促进血小板(3.16)附着到其表面的趋势。

注1:由于其表面性质,血液接触时常常表征为相对于阴性对照、阳性对照和/或 LMCD。

注2:血小板黏附不一定意味着血小板活化,即表面上的血小板可能被激活或不被激活。

3.18

凝血酶生成 **thrombin generating**

〈材料或器械〉由于其表面性质,具有促进或表现出凝血酶形成增加的趋势。

注:在血液接触时常常表征为相对于阴性对照、阳性对照和/或 LMCD。

3.19

血栓形成作用 **thrombogenic**

〈材料或器械〉由于其表面性质,具有形成或促进血栓形成的趋势。

注:在血液接触时常常表征为相对于阴性对照、阳性对照和/或 LMCD。

3.20

血栓栓塞 **thromboembolization**

脱落的血栓(3.21)移到下游,可能导致后续的血管阻塞或闭塞的过程。

3.21

血栓 **thrombus**

由红细胞、聚集的血小板(3.16)、纤维蛋白和其他细胞成分组成的凝固混合物。

3.22

血栓形成 **thrombosis**

在流动全血中由凝血系统和血小板(3.16)激活引起,在体内、半体内或体外模拟条件下形成血栓(3.21)。

注:血栓形成也可能发生在血液静止的血管或器械的区域。

3.23

全血 **whole blood**

从人类志愿者或实验动物采集的未分离血液。

注:血液可能是非抗凝或抗凝的,例如含有枸橼酸钠或肝素作为抗凝剂。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Bb:在旁路途径的激活中通过裂解(通过因子 D)产生的因子 B 的酶促活性片段[enzymatically active fragment of Factor B produced by cleavage (by Factor D) in the activation of the alternative pathway]

β -TG: β -血栓球蛋白(beta-thromboglobulin)

C4d:经典途径补体激活的 C4 降解产物(degradation product of C4 by classical pathway complement activation)

C3a, C5a:C3 和 C5 的补体裂解产物(complement split products from C3 and C5)

CH-50:溶解 50%RBC 悬浮液所需的补体量(amount of complement required to lyse 50% of a RBC suspension)

D-Dimer:由 D-片段二聚体组成的特异纤维蛋白降解产物(因子 XIII 交联纤维蛋白)[specific fibrin degradation products (F XIII cross-linked fibrin) consisting of D-fragment dimer]

ELISA:酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay)

FDP:纤维蛋白/纤维蛋白原降解产物(fibrin/fibrinogen degradation products)

FPA:纤维蛋白肽 A(fibrinopeptide A)

F1.2:从凝血酶原转化为凝血酶分裂出的非催化片段(也称为 F1+2)[the non-catalytic fragment split off from prothrombin in its conversion to thrombin (also referred to as F1+2)]

iC3b:C3b 灭活形式,C3 子片段(inactive form of C3b, a sub-fragment of C3)

IFU:使用说明书(instruction for use)

IVC:下腔静脉(inferior vena cava)

LMCD:合法上市的对照器械(legally-marketed comparator device)

MRI:磁共振成像(magnetic resonance imaging)

PET:正电子发射断层扫描(positron emission tomography)

PF4:血小板因子 4(platelet factor 4)

PRP:富血小板血浆(platelet-rich plasma)

PT:凝血酶原时间(prothrombin time)

PTT:部分凝血活酶时间(partial thromboplastin time)

SC5b-9:末端途径补体激活产物(product of terminal pathway complement activation)

SEM:扫描电子显微镜(scanning electron microscopy)

TAT:凝血酶-抗凝血酶复合物(thrombin-antithrombin complexes)

TCC:末端补体复合物,又称膜攻击复合物(MAC);通过测量 SC5b-9 估计[terminal complement complex; also called membrane attack complex (MAC); estimated by measuring SC5b-9]

TFPI:组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor)

TT:凝血酶时间(thrombin time)

TxB2:血栓素 B2(thromboxane B2)

5 与血液接触器械的类型(按 ISO 10993-1 分类)

5.1 非血液接触器械

非血液接触器械是不与人体内或返回人体的血液或血液成分直接或间接接触的器械。体外诊断器

械和采血管是非血液接触器械的实例。一些器械,例如用于植入物的导引系统,可能同时包含血液接触和非接触血液的组件。

5.2 外部接入器械

5.2.1 总则

这类器械与循环血液接触,作为通向血管系统的通路。一些器械可能具有不同接触类型(直接和间接)的部件或部分。实例包括但不限于下列内容。

5.2.2 作为间接血路的外部接入器械

实例包括但不限于下列内容:

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

5.2.3 与循环血液直接接触的外部接入器械

实例包括但不限于下列内容:

- 动脉粥样硬化切除术器械;
- 直接或间接与血液接触的血液监测器械;
- 心肺旁路回路;
- 血液特异性物质吸附器械;
- 供体和治疗性血浆置换器械;
- 体外膜式氧合器;
- 血液透析器/血液过滤器;
- 心血管介入器械;
- 血管内导管(球囊、成像、激光、超声);
- 白细胞滤除器;
- 经皮循环辅助器械;
- 冠状逆行灌注导管;
- 血管内导丝。

5.3 植入器械

植入器械大部分或全部植入血管系统。实例包括但不限于下列内容:

- 瓣膜成形环;
- 动静脉分流器;
- 血液监测仪(可植入的);
- 循环辅助器械(心室辅助器械、人工心脏、主动脉内球囊泵);
- 栓塞器械;
- 血管内合成血管移植物;
- 植入式除颤器和复律器电极导线;

- 下腔静脉滤器；
- 血管内药物释放导管；
- 血管内氧合器(人工肺)；
- 机械或生物心脏瓣膜；
- 起搏器导线；
- 外科合成或生物血管移植物；
- 血管支架。

6 血液相互作用特性

6.1 总体要求

重要提示——由于本文件是基础标准,因此可以提供合理的理由,以根据具体被表征的器械来说明试验类型选择的合理性。例如,在血栓形成试验类型中,体内血栓试验通常为判定器械性能的优选方法。然而,在某些情况下,包括了凝血、血小板、血液学和补体一系列试验结果的合理书面说明,可替代血栓形成试验。

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。根据测定的主要过程或系统可将血液相互作用分为几类。表 1 列出了与循环血液接触器械示例和每种器械适宜的试验类别。该列表并非全面,应对未列入表中的器械作出合理的判断。

医疗器械如已有产品标准,产品标准中的生物学评价要求和试验方法优先于本文件的通用要求。

6.1.2 如有可能,试验应使用适宜的模型或系统模拟器械临床使用时的几何形状和与血液接触的条件。模拟参数宜包括适宜的接触时间、温度、灭菌条件、抗凝剂(以及水平;见 6.1.12)和血流条件。例如,对有一定几何形状的器械如血管内支架,试验中用到的表面积(cm^2)应考虑到其相对于体外试验系统中液体的体积。对于不确定或几何构造复杂[如作为栓塞剂的聚乙烯醇树脂(PVA)颗粒分散体]的器械,宜用重量代表表面积确定试验系统中使用的样品量。

宜只对直接或间接接触血液的部件进行试验。宜根据当前技术水平选择试验方法和参数。

适宜类型和水平的抗凝剂可以因器械使用说明和所进行的试验类型而有所不同。提供包括所用抗凝剂的具体类型和水平的信息以及辨别阳性和阴性反应能力的讨论。动物研究的 6.1.6 和 C.2,体内和半体内试验的 6.1.12,体外试验的 6.3.1 以及导管和导丝的 A.3 中有相关详细信息。

由于许多血液相容性试验被认为是严格依赖表面接触的,这样的试验(如补体激活)将不适用于间接接触的应用。

6.1.3 试验应设立相应的对照(阳性和阴性),除非能证明这些对照可以省略。如有可能,试验宜包括临床已应用过的同品种器械(即 LMCD)或经充分表征过的材料。

所用对照宜包括阴性和阳性参照材料。所有供试材料和 LMCDs 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 出于筛选目的,可对用作器械部件的材料进行试验。但该类试验不能替代完全灭菌的供试器械或器械部件在模拟或严于临床应用条件下进行的试验。

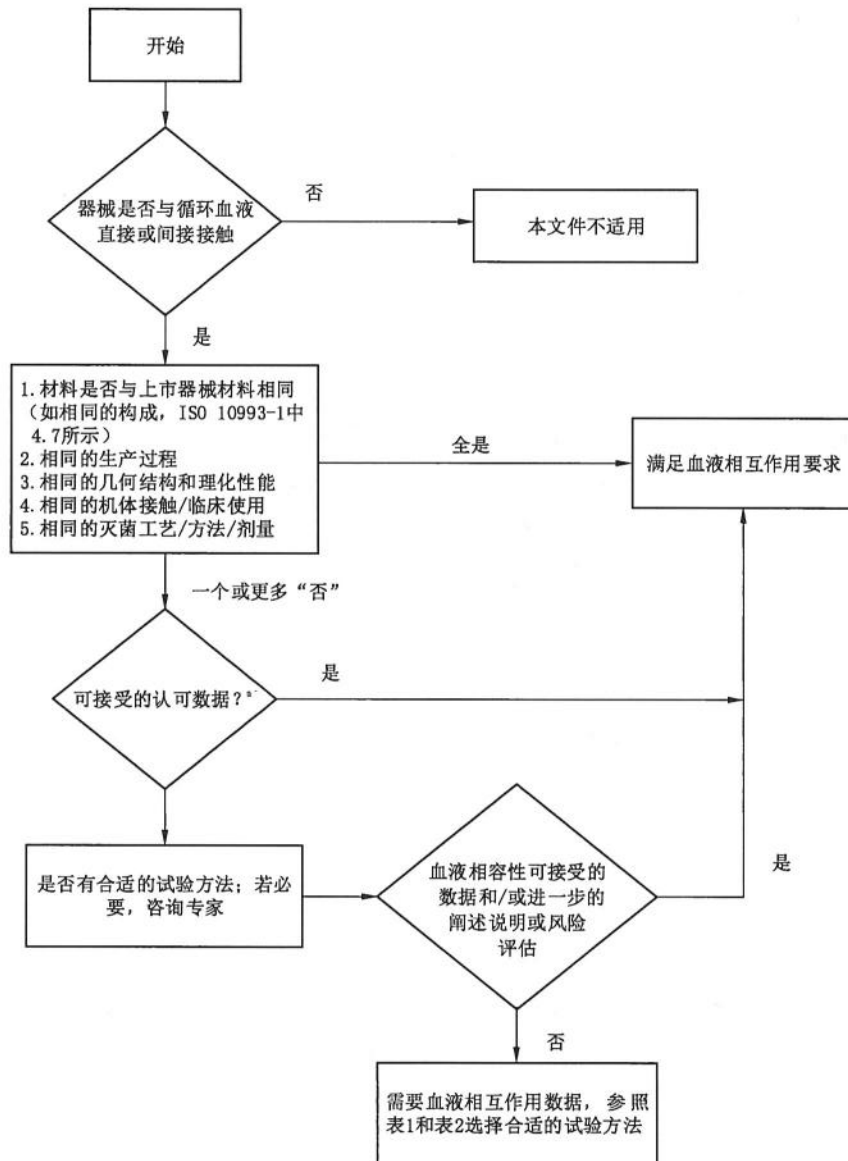
注 1: 在生产过程中的变化(包括使用生产助剂)可能会影响表面性质,或者完全灭菌的器械的化学特性,也可能影响血液相容性。

注 2: 当老化可能会影响最终的器械性能,也有必要使用老化样品。(例如,生物活性涂层如肝素的性质可能随着时间的推移而改变)

6.1.5 未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发生的血液/器械相互作用的性质。此外,短期体外或半体内试验预测实际临床应用性能的能力更适宜于短期临床应用接触而不是长期或永久接触。

注：候选器械材料（例如，不同的表面几何和功能性化学修饰）的简化试验可能是器械材料识别、优化和选择的关键步骤。

6.1.6 如果进行动物研究，预期用于半体内（外部接入器械）的器械宜在半体内条件下进行试验，而用于体内（植入物）的器械则宜在尽可能模拟临床使用的体内动物模型条件下进行。在研究方案中宜特别指出每个被评估的试验类别（见 6.2.1），并描述具体的评价方法。



* 对于直接和间接接触器械，宜根据适宜的风险分析考虑血液相容性试验的必要性，包括以前的血液相容性试验、临床数据、可浸提/可沥滤数据和/或表面特征信息。例如，对于直接接触的器械，如果表面形态发生变化，即使可浸提/可沥滤化学成分相同（见 ISO 10993-1），可浸提/可沥滤试验可能也是不够的。

图1 帮助确定是否需要进行与血液的相互作用试验的流程图

6.1.7 体外试验也适用筛选外部接入器械、植入物以及器械/材料与血液早期相互作用的潜能，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）。

注：对于新器械或几何构造变化的器械，需要在生理血流条件下试验。长期接触的导管或永久接触的植入物，由于血液的稳定性问题，体外试验系统可能不足以说明。

6.1.8 短暂的/瞬态接触循环血液的器械或器械部件(如使用时间小于1 min的采血针、注射针、毛细管)一般不需要进行血液/器械相互作用试验。

注1:对于使用诸如在器械移除后可能留下与血液接触的材料如涂层制成的产品,可能需要进行血液/器械相互作用试验。

注2:如果某些器械部件(如注射器针筒)与最终将被注入患者的液体接触,以及存储液体的时间是不确定的或大于1 min,则有必要对接触液体的部件进行溶血试验,即使器械本身将与循环血液接触的时间小于1 min。

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 如果是按本文件所述的方法选择试验并在模拟临床应用条件下进行试验,这种试验结果最有可能预示器械的临床性能。对于在一定条件下工作的器械,宜考虑极端条件和平均条件。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,试验宜尽可能使用人血(除了已建立的动物血试验方法,如某些溶血试验)。在有必要使用动物模型时,如用于评价器械的长期、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。

人与非人类灵长类动物的血液值和反应性是非常相近的,特定类型的试验使用家兔、猪、牛、绵羊或犬等动物也是被接受的。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黏附、血栓形成和溶血),因此对所有动物研究结果均应予以谨慎地解释。动物种属和动物数量应予以证明是合理的(另见ISO 10993-2)。

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

6.1.12 在体内和半体内试验中应避免使用抗凝剂,除非器械设计成在含抗凝剂条件下应用。由于抗凝剂的类型和浓度会影响血液/器械相互作用,因此应对所用抗凝剂的类型和浓度予以判定。在评估与抗凝剂一起应用的器械时宜采用临床使用的、和/或在产品使用说明书或其他适宜的文献中描述的抗凝剂浓度范围。在确定适宜的抗凝水平时也宜考虑物种差异。

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。与应用一致的接触条件和相关测量的体外流动模型可用于评价对已经临床认可器械的更改的影响。

6.1.14 包括适宜的对照在内,试验宜重复足够的次数,以确保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/器械接触的长时间重复研究还可提供关于血液/器械相互作用的时间依赖性的信息。进行体内试验时,宜考虑统计评价和动物福利之间的平衡,见ISO 10993-2。

6.1.15 6.1中的建议连同图1和表1,作为表2所列试验的选择指南。在附录A~附录G中给出了对临床前评价的进一步指导。总之,应进行以下程序:

- a) 确定潜在的血液相互作用类别(见6.2)是适宜的,从而建立特定器械的安全性(见表1中的示例);
- b) 评价器械在每个试验类别中的现有信息;
- c) 如果存在足够的安全信息,需要准备适宜的理由来支持这一结论,不需要进行进一步的试验;

注:在配方、几何形状、表面特性、制造方法、灭菌技术和/或临床使用方面的任何差异都可能限制类似产品的安全信息的使用。

- d) 如果试验类型的信息不足,根据表1和表2中的示例选择适宜的试验以提供额外的安全信息。

表 1 与循环血液接触器械或器械部件和适用试验分类——外部接入器械和植入器械

器械示例	试验分类						
	溶血		血栓				
	材料诱导	机械力诱导	体外				体内/ 半体内 ^a
凝血			血小板 激活	补体 ^d	血液学		
外部接入器械							
血液监测器(临时/半体内) ^b	X		X	X		X	
血液贮存和输注设备(如输液器/输血器)、血液采集器械、延长器	X		X	X		X	
置入时间小于 24 h 的导管(如动脉粥样硬化切除术器械、血管内超声导管、冠状顺行/逆行灌注导管、导丝);插管	X		X ^c	X ^c		X ^c	X ^c
置入时间大于 24 h 的导管(如肠外营养导管、中心静脉导管);插管	X		X ^c	X ^c		X ^c	X ^c
细胞贮存器 ^b	X	X	X	X			
血液特异性物质吸附器械	X	X	X	X	X		
献血和机采治疗器械以及细胞分离系统 ^b	X	X	X	X	X		
心肺转流系统	X	X	X ^c	X ^c	X	X ^c	X ^c
血液透析/过滤器 ^b	X	X	X ^c	X ^c	X	X ^c	X ^c
白细胞分离器	X		X ^c	X ^c	X	X ^c	X ^c
经皮循环支持设备	X	X	X ^c	X ^c	X	X ^c	X ^c
植入器械							
瓣膜成形环、机械心脏瓣膜	X	X					X
栓塞器械	X						X
血管内移植物	X						X
植入式除颤器和复律器导线	X						X
主动脉内球囊泵 ^b	X	X					X
起搏器导线	X						X
人工(合成)血管移植物和补片,包括动静脉分流器	X						X
支架(血管的)	X						X
生物心脏瓣膜、血管移植物、补片、动静脉分流器	X						X

表 1 与循环血液接触器械或器械部件和适用试验分类——外部接入器械和植入器械（续）

器械示例	试验分类						
	溶血		血栓				
	材料诱导	机械力诱导	体外				体内/ 半体内 ^a
			凝血	血小板 激活	补体 ^d	血液学	
人工心脏	X	X					X
腔静脉滤器	X						X
心室辅助器械 ^b	X	X					X
^a 血栓是一种体内或半体内现象,但可以在体外的条件下模拟。如果做了临床相关的体外血栓试验,或许没有必要做体内或半体内试验。 ^b 只做直接或间接血液接触组件。对于只有间接接触血液的部件,可能不需要做体内血栓形成和机械溶血或者补体激活试验。 ^c 血栓形成过程主要包括凝血、血小板和白细胞反应。因此,制造商应确定将体内试验替换为凝血、血小板和血液学试验是否适宜。 ^d 另见 ISO/TS 10993-20 以获取有关在评价其他毒理学终点(如过敏反应)宜考虑补体激活的情况。							

表 2 用于评估与血液相互作用的常用试验

试验项目	
溶血	材料介导(如 ASTM ^[19] , NIH ^[29] , MHLW ^[23] 法)
	机械力介导
血栓(体内, 半体内)	大体分析 ^a , 闭塞百分率, 光学显微镜, SEM
体外血栓	
凝血	凝血酶(如 TAT, F1.2), 纤维蛋白(如 FPA)试验, PTT 试验
血小板激活	血小板计数(%损失)和血小板活化标记物(如释放产物或血小板表面标记物, 如 β -TG, PF4, TxB2)或 SEM(血小板形态)
血液学	全血计数(CBC), 白细胞激活
补体系统	SC5b-9(C3a 可选)
^a 包括在所有动物研究中(见 B.2.1 和 ISO 10993-6)。 并不是每个类别都需要所有试验, 并且每个类别中的试验可能不是相等的。	

6.2 试验类别与血液相互作用

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(见表 1 示例)。根据检测的主要过程或系统可将血液相互作用分为下列类别:

- 溶血;
- 材料介导;

- 机械介导；
- 血栓；
- 体外：
 - 凝血；
 - 血小板激活；
 - 补体；
 - 血液学；
- 体内/半体内。

这些试验的原理和科学依据在附录 A 至附录 E 中给出。

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。

6.2.3 外部接入器械和植入器械

对照表 1 将正在研究的新器械与类似的现有器械比较并注意要考虑的试验类型之后,使用表 2、附录 A 和附录 E 以指导用来评估血液相互作用的适宜试验的选择。

6.2.4 局限性

试验和研究设计参数可根据科学、技术和特定的应用提出一些实际的局限性/考虑。例如：

- a) 高流速(动脉)环境中的材料/器械可能与在低流速(静脉)环境中与血液发生的相互作用不同；
- b) 与血液相互作用可能发生于所有材料,即试验材料/试验器械和非试验材料(例如,试验系统),应注意不要将与试验材料相关的血液相互作用与其他因素有关的血液相互作用混淆；
- c) 研究表明,仅仅依靠一种血液相互作用试验的研究对真实反应的预测性可能比包括了几种不同血液相互作用试验的研究要低；
- d) 用于检测血液相容性蛋白质指标的免疫分析方法,如 TAT、C3a 等通常可用于人体血液试验,但常常无法用于其他物种的血液试验。

6.3 试验类型

6.3.1 体外试验

体外试验(模型)的设计宜考虑模拟各器械应用中预期的最坏情况下的临床使用情况。体外试验方法应考虑的因素包括血细胞比容、抗凝剂(类型和剂量)、样品制备、样品货架期、血液/血液成分年龄、样本贮存、供氧、pH 值、温度、适当的随机化、试验样品表面积与血液体积之比和血流动力条件特别是流速、壁剪切率和压力。试验应尽快进行,一般在抽血后 4 h 内,因为采血后血液的某些性能会迅速发生改变。如果经过验证,替代方案可能是可行的。在某些情况下,如果冷冻/解冻过程不影响被分析物的分析,那么所得到的样品也可以用适宜的技术进行冷冻保存,以便将来的分析。

注：与临床相关的抗凝剂的类型和剂量可能适宜或不适宜,这取决于试验系统和其识别阳性和阴性反应的能力。

当用于评价改进的器械的血液相容性时,可用溶血、血栓形成、血小板和凝血反应等体外试验评价并将改进的器械和临床已接受器械比较(见 A.1.4)。

6.3.2 半体内试验

当器械预期用途为半体内时(例如外部接入器械),应进行半体内试验。当器械预期用于体内时,半体内试验也是有用的,例如评价植入物(如血管移植植物)的急性反应。然而,半体内试验不能替代植入

试验。

半体内试验系统适用于监测血小板黏附、栓子形成、纤维蛋白原沉积、血栓重量、白细胞黏附、血小板消耗和血小板激活。用多普勒或电磁流量探测头可测量血流速度,血流速度的变化可指示血栓沉积和栓塞形成的程度和过程。可通过肉眼观察和显微观察来评估简单血栓的形成。其他更先进和技术要求更高的工具也已被应用。

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实例有血管补片、血管内导管、血管移植物、血管支架、瓣膜环、心脏瓣膜和辅助循环器械。鉴于血液接触医疗器械应用的多样化,预期体内试验模型将同样多样化,以适宜地模拟每个临床应用。

对于一些体内试验,测定“血液管道或器械(即血液通过器械畅通无阻)是否通畅”是衡量试验成败的常用方法。器械取出后测定闭塞百分率和血栓重量,宜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栓塞末端器官的程度。此外,周围组织和器官的组织病理学评价也是有价值的。肾脏特别容易滞留血栓,这些血栓是植入肾动脉上游的器械(如心室辅助器械、人工心脏、主动脉人工移植物)形成的。

目前已有无需试验结束即可评价体内相互作用的方法,如用心动图或血管内超声成像(IVUS)导管测定器械通畅性或血栓沉积,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,在高与低的流速系统中会产生截然不同的结果。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。

体内试验方案宜包含明确的和独立的章节,以说明如何评价每个确定的试验类别,例如溶血、血栓形成、凝血、血小板、血液学和补体系统。

附录 A

(资料性)

心血管器械和假体的临床前评价

A.1 总则

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。第 6 章包含确定何时需要试验, 哪些血液相互作用类别可能适宜于特定的器械, 以及用于评价非接触器械、外部接入器械和植入器械的血液/器械相互作用的试验列表的指南。A.1.2 中血液/器械相互作用的分类作为背景提供。

A.1.2 分类

A.1.2.1 影响器械, 但不一定对动物或人有不良作用的血液/器械相互作用如下:

- a) 血液中血浆蛋白、脂质、钙或其他物质吸附到器械的表面或吸附到器械内;
- b) 血小板、白细胞或红细胞黏附到器械表面或其成分吸附到器械内;
- c) 与血液接触表面形成假膜、新生内膜或器械表面形成组织囊;
- d) 器械的机械和其他性能的变化。

A.1.2.2 对动物或人有潜在不良作用的血液/器械相互作用如下:

- a) 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;
- b) 器械表面形成血栓;
- c) 血栓形成产生的栓塞或其他材料在循环中从器械表面向其他部位移动形成栓塞;
- d) 对循环血细胞的损伤引起贫血、溶血、白细胞减少、血小板减少或血细胞功能的改变;
- e) 对器械邻近细胞和组织的损伤;
- f) 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;
- g) 器械上或其邻近处黏附并生长细菌或其他感染源。

注: 对于以上 b)、c)、d) 项, 一些器械如栓塞线圈需要形成血栓才能发挥作用。

A.1.3 动物模型的优点与局限性

动物模型可在人类进行实际试验之前对临床器械进行最接近最终用途的模拟。动物模型可对器械进行持续监测并对重要变量进行系统地控制研究。但是动物模型的选择可能受动物大小要求、特定物种的可得性和成本的限制。例如, 由于解剖学限制, 在动物模型上可能不能在全部临床使用条件的范围内完成器械操作。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、溶栓剂、抗血小板剂和抗生素类药物的反应。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宜予以谨慎说明。非人灵长类动物, 如狒狒在血液学指标、血液凝固机理和心血管系统方面表现出与人类的相似性。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 PF4、 β -TG、FPA、TAT 和 F1.2。犬是一种常用物种并已提供了有用的信息, 然而器械在犬身上比在人体上更易于形成血栓, 这种差异性可被认为有益(作为一种挑战性的或加速的模型)。猪和羊通常被认为是适宜的动物模型, 因为它们的血液学和心血管与人相似。材料植入过程对结果的影响也宜予以考虑, 并包括适宜的对照试验。使用动物模型还是体外模型的最终决定涉及动物的可用性和动物伦理(见 ISO 10993-2)、体外血液模型的可用性和局限性以及获得

合理结论所使用的统计方法的适用性。

A.1.4 体外模型的优点与局限性

体外血液接触模型是测定医用材料和心血管器械的血液相容性有吸引力的方法,因为该模型可以:

- a) 避免使用昂贵的动物模型,
- b) 用同一批血液同时对试验对象和对照、参考材料进行高重复性试验,
- c) 在流速、温度和抗凝标准化的情况下使用人或动物的血液,
- d) 激活产物不经肾脏或肝脏或其他器官的清除而积累,并且不存在内皮细胞的激活抑制功能的最坏情况,和,
- e) 与体内使用相关的器械植入/组织损伤相关的混杂因素中分离。

医用材料和器械的这种试验宜尽可能地模拟血液暴露于器械的临床条件的范围,因为在临床不适用条件下对血液进行试验,例如非临床抗凝(类型或水平)和流量条件会使结果难以解释。尽可能参考产品使用说明手册或常见医学实践文献以便了解适用的抗凝剂类型和剂量。适宜时,宜考虑对器械的全部标示使用条件进行试验。例如,为了评价机械诱导的溶血和血小板活化,通常以最高血流速率进行试验。对于血栓形成试验,标示的最小血流速度可能对于表征器械的安全性至关重要。由于已经表明不同物种之间血液中的反应可能有显著差异,使用人血对结果的解释更有意义。使用人体血液的另一个优点是它提供了更详细的试验方法,因为大多数当代生物分析方法都是基于人体血液成分/表位。相反,从单个人供体获得的血液量存在一定的限制。因此,在设计用于模拟临床相关条件的模型呈现大体容量的情况下,来自单个大型动物的血液的使用可能更实用。

为了试验一般材料/器械血液相容性,已使用赋予生理和/或准生理流量的经典的体外试验模型 Chandler 环或其改进版。或者,在某些情况下使用温和搅动的血液-材料(器械)接触也可用于评价血液与材料的相互作用。为了评价模型对血液的影响,可监测溶血和一般血细胞计数以检查血液正常状态。这些模型显示对那些特别是涉及短期接触血液应用的筛选研究有效。

A.1.5 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急剧程度、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(分别>24 h 或>30 d)的器械,重点则放在一系列可以获得关于血栓和血栓栓塞的时间进程、循环血液成分的消耗、内膜增生的进展和感染的信息的测定技术上。对于上述这两类接触类别的器械,溶血和血小板功能评估是很重要的。血栓形成可能在很大程度上受外科技术、可变的时间依赖性的溶栓和栓塞现象、器械引起的感染及接触表面可能发生的变化(如内膜增生、纤维囊腔和内皮化)的影响。重要的是,抗凝剂类型和量可能对结果产生深远的影响。例如,临床相关水平的抗凝和抗血小板药物可显著减少或消除血小板、凝血和血栓反应。

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正常止血过程中的止血成分这样的影响。后者可无临床意义,如器械消耗血小板数量很少时不会影响血小板总量,或者器械表面积较大导致血小板或血浆凝血因子的消耗以至于显著影响血小板总量并将改变正常的止血过程。

无论使用何种动物模型和评价中的特定试验类别,即溶血、血栓形成、凝血、血小板、血液学和补体系统,体内研究方案宜在每个研究的试验类别的评价方法和标准中提供足够的细节。特定试验类别的结果的回顾性报告如果不支持方案中初始计划,通常认为不被监管部门所接受。

A.2 直接用于血管通路的插管和间接用于血管通路的插管

“插管”这一术语通常用于两个完全不同的临床应用。在一个应用中,插管直接穿过皮肤并插入一

支或数支大血管,这是为了提供连续和直接的高容量血液通路。例如,作为短期接触的器械,这种类型的大直径插管在心肺旁路手术期间将血液从人体分流以进行血氧化。在这个例子中,插管试验宜使用尽可能重复临床用途的接触条件进行,因为这样的器械可能潜在地诱导循环血细胞水平的一些改变以及增加凝血或补体系统反应的因素。特定的反应通常是多因素的,因为它取决于多种因素,如植入部位、插入技术、受试对象因素和抗凝方案。术语“插管”也用于描述仅皮下插入的更小直径的管,并且可用于短期(<24 h)或长期(<30 d)间接接触血液。例如,这些插管用于从药物泵输注胰岛素和皮下监测血糖水平。与其他间接接触血液的器械(见 5.2.2)一样,后一种类型的插管通常比与循环血液直接接触的器械(见 5.2.3 和 5.3)要求较少的试验。

A.3 导管与导丝

血液接触的插管需考虑的试验多数都适用于血液接触的导管和导丝的研究。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,因此宜同时使用对侧动脉或静脉进行相似尺寸和材料的临床已批准器械的对照研究。抽出导管时宜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。具有与临床应用有关的抗凝静脉或动脉植入模型可能是评价器械血液接触反应的有用工具,特别是在评估新的器械材料或开发以提供抗血栓形成性质的涂层时。见 C.3。或者,适宜的体外模型可能对检测这种材料表面差异更为敏感。

在需要抗凝的情况下,试验中使用的抗凝类型和水平的理由宜基于临床应用,但能够提供足够的证据表明试验能够区分阳性和阴性反应。例如,按照简单的剂量反应动力学,医疗器械肝素涂层的抗血栓性可被正常(临床)水平的肝素抗凝剂完全掩蔽。然而,在降低/具有挑战性的肝素溶液水平下,肝素涂层降低血栓形成的有效性变得更加明显。在可能不涉及使用抗凝药物的应用情况下,试验宜不采用抗凝剂。

试验用的特定类型和水平的抗凝剂的验证信息宜显示辨别阳性与阴性反应的能力。

A.4 体外血液氧合器、血液透析器/血液过滤器、供体和血液成分采输器和吸附血液中特异性物质的器械

血液对体外循环设备可能产生明显的急性反应。很多因素会影响试验值,如血液吸管的使用、血泵预充液的组成、体温过低、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、超声或其他非侵入性技术进行检测。通过监测像氧合器压降、氧气交换率等特性参数,可以直接评估血栓聚集。在装有心肺旁路的患者中观察到,获得性血小板短暂功能障碍与选择性 α 颗粒的释放有关,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伴有功能障碍的肺损伤。因此,这些器械的补体激活或白细胞减少的定量测定是比较实用的。另见附录 E。

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,宜按照检验体外氧合器和血液透析器的同一原理测定这种和其他表面积较大器械的血液/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、血栓形成、纤维蛋白形成,血栓栓塞、凝血酶生成、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密切监测。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。

A.6 人工心脏瓣膜

在人工瓣膜的评估中,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。2D型和M型超声心动描记器利用超声形成心脏图像,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,但成像质量取决于具体的被检瓣膜。超声心动描记法对于评估组织衍生瓣膜功能也是很实用的,可用于对赘生物、血栓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。

宜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。

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模型的解剖学考虑和临床使用位点。增大给定移植物的直径并且缩小其长度可提高其通畅性,移植物的通畅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、MRI和PET。同时还宜对血小板数、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蛋白进行连续测定。对移植物和邻近的血管进行剖检,可以在血管组织反应方面提供有价值的信息。要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。与许多血管器械一样,适宜的临床抗凝治疗对器械功能和性能至关重要。

A.8 下腔静脉滤器、支架和支架移植物

这类器械可采用血管造影术和超声来进行研究,也可采用其他实用的血管移植物评价技术(见A.7)。

附录 B

(资料性)

推荐的实验室试验:原则、科学依据和说明

B.1 总则

B.1.1 背景

B.1~B.3 中描述了更常用的评价溶血、血栓形成、凝血、血小板、血液学和补体系统试验类别(见 6.2)的一般原则和科学依据。有关血栓形成、溶血和补体的试验类别的更多信息,见附录 C、附录 D 和附录 E。

另外,虽然一些方法较不常见,但在特定血液/器械相互作用的评价中可能具有进一步价值,附录 F 中描述了这些方法。由于生物变异性和技术上的局限性,许多这些试验的准确性和预测性要求仔细注意其方法学并谨慎解释结果。附录 G 列出了不推荐的试验。

B.4 介绍了使用 ELISA(或其他类似)技术试验凝血、血小板和白细胞活化以及补体激活特异性血浆因子的方法学的考虑因素。

所有参考文献更详细地描述了各种标准、试验和模型的示例。

B.1.2 体外、半体内、体内试验

B.1.2.1 大量的体外、半体内和体内模型被广泛用于估计血液-材料的相互作用。选择最适合器械应用和试验目的模型并参考 ISO 10993-12 中有关的恰当的样品制备和对照组的考虑是适宜的。

没有单一的体外、半体内和体内模型适宜于所有应用。因此,宜论证模型对所考虑应用的适宜性。

体内试验提出了一个更实际的最终用途模拟,但由于以下因素而变得复杂:

- 选择适当的动物模型;
- 种间和个体间的反应变异性;
- 血栓和凝血常见指标缺乏物种特异性的市售试剂盒;
- 使用动物模型涉及成本增加、伦理和统计学问题。

B.1.2.2 首选参考产品标准中的模型。另见参考文献[187]为幼羊作为研究生物瓣膜钙化的加速模型,参考文献[188]为用成年猪或绵羊研究经血管置放的瓣膜和手术植入的瓣膜,参考文献[218]~参考文献[232]用于小和大直径血管移植模型研究的成年犬和羊股骨置换模型,以及参考文献[233]~参考文献[236]中猪冠状动脉模型广泛用于研究支架设计。

B.1.2.3 如 ISO 10993 系列标准的其他部分所述,仔细进行的体外试验为评估医疗器械和材料的生物安全性提供了有效的筛选工具。

体外模型中需要规范的重要因素有:

- 基础试验系统中全血的体积,例如管、环或其他模型,
- 血液接触时间,
- 血液温度,
- 血流状况,
- 抗凝剂类型和水平,
- 接触比例,即材料/器械表面积(cm^2)与系统中全血体积(mL)的比值,和
- 试验系统本身接触血液的表面积(cm^2)。

注 1: 体外研究的“血液接触阶段”需要对试验材料/器械与血液的接触条件进行精确的定义。试验条件越接近临

床应用,模型的预测性越高,被评价的反应越高。

注2:接触阶段之后的“试验阶段”是对接触的血液、血浆或材料/器械本身进行特定试验。在试验阶段的试验通常针对一个或多个类别,即溶血、血栓形成、凝血、血小板、血液学和补体系统。

B.2 和 B.3 分析了用于评估血液-材料/器械相互作用的主要类别的常用方法(见表2)。

B.2 血栓形成

B.2.1 大体分析——器械的取出和检查及远端器官的尸检

大体分析宜始终作为基本器械评价的一部分,因为器械评价的这一部分对于评价植入器械的体内生物学反应非常重要。通过认真细致的大体检查,可对细胞和蛋白质沉积物以及任何栓子的分布、可见的大小和属性进行最完善的测定。目前已有发表的推荐方法。

远端器官剖检的原理是检查植入器械远侧的影响(如栓子)。该分析的重要性因器械应用而异,并限于中等至高的应用风险的血栓栓塞或材料/器械栓塞(例如机械心脏瓣膜和主动脉内球囊泵)。

在这种类型的试验中,拍摄关键点(器械和周围组织等)的低倍和/或高倍的高分辨率彩色胶片或数字图像被应用并进行适宜地标记。

B.2.2 闭塞百分率、血栓覆盖面积和无血栓的面积

闭塞百分率可在全生命研究周期内使用造影和超声成像技术进行定量评估,也可以是器械经过使用并取出后以目力评估。闭塞百分率可测定管道中血栓形成过程的严重程度。但是,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。因此,使用显微镜检查有助于鉴别闭塞过程的性质。在试验和/或对照器械比较的基础上,可进行血栓覆盖面积和无血栓面积的半定量或定量测定。

B.2.3 光学显微镜

采用该技术可以获得有关细胞密度、细胞聚集体的存在、囊腔组织的组成、异物反应强度和黏附到材料上的血栓或纤维蛋白等方面的信息,也可以评价这些沉积物在材料或器械上的几何分布。光学显微镜法为半定量方法。

对于聚合物或生物衍生的材料和器械,可以使用石蜡包埋方法和特殊染色法来评估器械-生物界面。

对于金属和陶瓷材料和器械,更复杂的硬塑料包埋和切片技术可用于获取完整的材料/器械-生物界面。

B.2.4 扫描电子显微镜(SEM)

SEM的原理及说明同光学显微镜(见B.2.3)。该方法与光学显微镜相比其优点在于能呈现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。这种类型的显微镜充分反映了在表面可以看到的。如果能提供关于细胞和血栓表面相互作用更多细节的信息,横截面分析也可以用于支持表面观察。与参考对照相比,血液或血液成分(如富血小板血浆)动态接触后血小板和白细胞活化、纤维蛋白和血栓形成的形态学评价是有价值的。

B.3 体外血液相容性

B.3.1 溶血——试验方法

溶血被认为是一种重要的筛查试验,因为体内血浆血红蛋白水平升高是异常的,可能是潜在的血液

病理学或血管问题的指示。通常情况下,血浆血红蛋白水平升高表明溶血,即释放红细胞(RBCs)内容物,并且可能反映红细胞膜的脆性或 RBCs 的损伤。在评估血液-材料/器械相互作用中,溶血可能是由于:

- a) 材料/器械表面直接接触血液(材料介导);
- b) 器械材料(可浸提物)间接接触血液(材料介导);
- c) 接触器械操作产生的湍流和升高(即非生理性的)的剪切应力(机械力介导)。

有关溶血试验的更多详细信息,见附录 D。

B.3.2 凝血——试验方法

B.3.2.1 总则

凝血级联具有两个平行的途径,即融合形成共同途径的接触激活途径(内源性途径)和组织因子途径(外源性途径)。后者包括蛋白凝血酶,其催化血栓主要成分——纤维蛋白的形成。虽然已知用于引发凝血的主要途径是组织因子途径,但与血液接触器械和材料相关的凝血通过接触激活途径发生。两种途径本身是一系列反应,其中连续的无活性酶前体(称为酶原)与其糖蛋白协同因子相互作用成为激活级联事件中的活性因子。反应最终形成活化的凝血酶并催化纤维蛋白的形成。凝血因子通常用罗马数字表示,附有小写“a”表示活化形式。见图 B.1。

凝血活性的评估,比如导致凝血酶和纤维蛋白形成的蛋白质的血液水平变化程度(见图 B.1)长期依赖于测量凝血级联中关键蛋白质的血浆水平的临床测定。凝血活性的正常静息(稳态)水平值,以及在各种临床凝血病中观察到的一些升高的水平值都已经被充分建立。对医疗器械进行这种试验的假设是,适宜的材料和器械设计不宜与可能给患者带来风险的过度凝血活动相关联。高水平的凝血活性可能是材料或器械诱导或与急性血栓形成或血栓栓塞相关的较高趋势的提示。为了测量凝血活性,临床实验室通常依赖于使用常见的酶联免疫吸附测定技术的检验试剂盒。体内或体外的基础研究将取决于是否有适宜的抗体针对物种特异性的目标凝血蛋白表位,血液样本是在规定的条件下回收并根据测定说明书进行制备和分析。B.1.2.3 中描述了在体外模型中典型定义的条件或重要的因素。将结果与适宜的对照譬如阴性对照(例如基线水平或无材料/器械接触)以及同品种器械/材料的结果进行比较至关重要。血液中的凝血活性在统计学上显著和生物学上显著高于对照,可能是材料/器械的设计具有较高凝血相关并发症风险的提示。可获得的市售凝血活化蛋白 ELISA 试剂盒包括 TAT(凝血酶-抗凝血酶复合物),F1.2(凝血酶原形成凝血酶时释放的蛋白质片段)和 FPA(形成纤维蛋白时从纤维蛋白原释放的蛋白质片段)。

表明凝血活化的蛋白质通常具有起始、传播和终止阶段,这反映了初始形成反应、级联/反馈扩增期以及减缓/失活期,其中关键前体可能会被消耗,或者被检测蛋白受负反馈蛋白作用而失活。因此,随着时间的推移,预期凝血活化蛋白水平出现数量级差异。因此,材料/器械-血液接触时间内实际发生时的活化阶段是考虑的重要因素。例如,当与血液混合时,试验材料的影响在每个阶段可能是完全不同的。此外,由于凝血蛋白活化通常与血液接触表面积成比例,器械或器械材料的表面积(SA)对结果影响很大。因此,在每个研究中确认试验 SA-血液体积比(接触比)是很重要的。如果可能,接触比可以被视为变量,以帮助理解材料效应的特异性。 $3.0\text{ cm}^2/\text{mL} \sim 6.0\text{ cm}^2/\text{mL}$ 血液的接触比(基于器械厚度)与 ISO 10993-12 一致。其他接触比例如这个比值的 1.5 倍和 2.0 倍可值得考虑,因为较高的表面积理论上会增加凝血反应对试验材料的敏感性。

由于试验系统(如试管、目标接触比率)的体积,试验材料的量将受到物理限制。在这种情况下,使用器械材料的切割部分可能是适宜的。如果器械包含多种材料,则宜保持整个器械中每个材料的比例。还宜注意避免引入导致大量非血液接触表面接触的切割部分。

一些由自然进化形成的机制控制着凝血级联反应。其中一种机制涉及抗凝血酶。抗凝血酶是一种

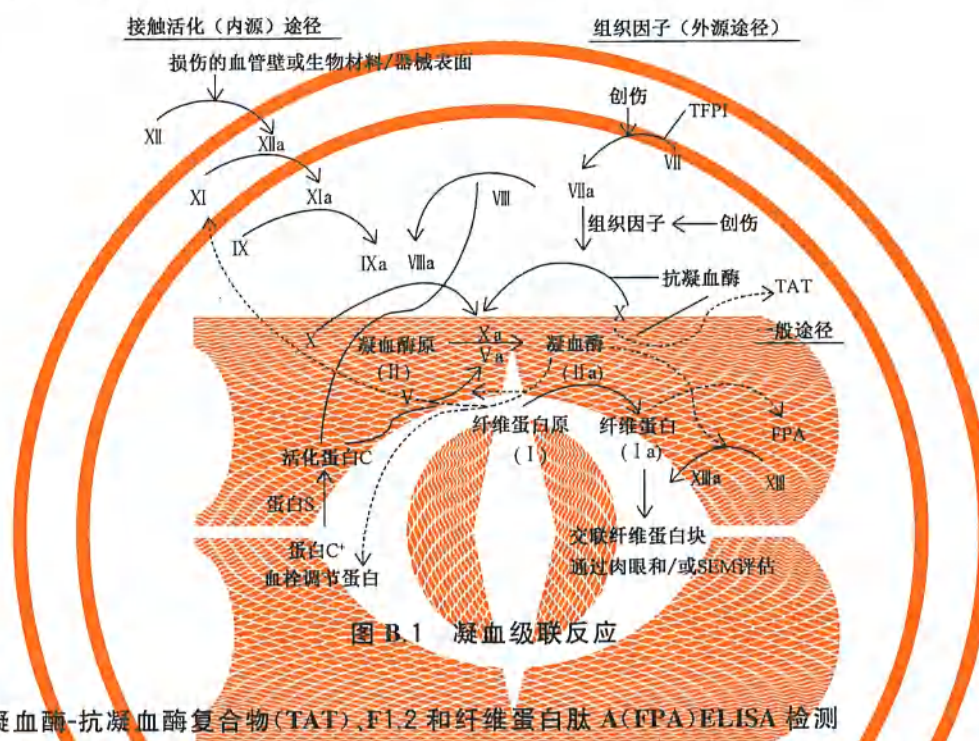
丝氨酸蛋白酶抑制剂,可以结合和失活丝氨酸蛋白酶凝血酶、FⅨa、FⅪa和FⅫa。虽然抗凝血酶保持活跃,但其与肝素的相互作用改变了其构象,大大加快了其对蛋白酶的抑制率。

注: 凝血因子的 ELISA 检测代表了 B.1.2 中讨论的“试验阶段”,即用于在体外或体内血液接触医疗器械或材料后获得的血液样品的试验。

许多标准的凝血测定法是设计用来检测导致凝血时间过长或过度出血的临床凝血障碍,而不是凝血增强/血栓形成的病症。

用于评价血液/器械相互作用的方案应当适当修改,以评价生物材料诱导的加速凝血。

凝血和补体之间的相互作用是被认可的。



B.3.2.2 凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT)、F1.2和纤维蛋白肽A(FPA)ELISA 检测

直接反映凝血酶(TAT、F1.2)和纤维蛋白(FPA)形成的这些 ELISA 测定试剂盒是可商购的。结果是定量估计凝血酶存在量和形成的纤维蛋白量,这两者都反映出发生的凝血激活水平,并可能反映发生的血栓形成。有关一般 ELISA 方法的详细信息,见 B.4。

B.3.2.3 部分凝血活酶时间(PTT)

部分凝血活酶时间是指再钙化的枸橼酸盐抗凝的血浆加上不包含活化剂的部分凝血活酶后的复钙凝固时间。部分凝血活酶为磷脂类悬浮液,一般从组织凝血酶原蛋白(哺乳动物脑或肺的组织匀浆)中提取获得。在标准条件下与材料接触后 PTT 缩短表明血液凝固内源性凝血途径的激活。肝素和其他抗凝剂引起 PTT 延长。见参考文献[24]。

基于活化部分凝血活酶时间(APTT)试验的试剂包括活化剂,如高岭土、硅藻土或鞣花酸。当评估接触血液的器械或器械材料的作用时,应避免使用具有这些活化剂的试剂,因为它们掩盖了由材料或器械引起的凝血。

在医用材料和器械的凝血试验中,器械或材料本身作为凝血活化剂。只要可以得到,宜使用适宜的阳性和阴性对照材料,宜包括不含材料/器械的血浆本身的阴性对照。

B.3.3 血小板——试验方法

B.3.3.1 概述

在整个文献中已经描述了血小板的评估及其活化状态,如参考文献[70]~参考文献[95]。然而,对于血液接触的医疗器械和材料,最常用的已经过论证的方法是对与医疗器械或材料特定接触血液后的血小板的简单计数和血小板脱颗粒蛋白的测量。已经充分建立血小板和脱颗粒蛋白质的正常静息(稳态)水平值(见市售 ELISA 试剂盒产品文献),以及在各种临床血小板病变中观察到的一些异常水平值。对医疗器械进行这种试验的假设是,适宜的材料和器械的设计不宜与可能给患者带来风险的血小板过多消耗和/或激活相关联。高水平的血小板丢失和/或脱颗粒可能是材料/器械诱导或促进这些可能引起出血或血栓形成并发症的这些状况的趋势的提示。为了测量血小板计数和血小板脱颗粒,使用常规细胞分类计数仪进行血小板计数,并使用标准的 ELISA 测定公认的血小板 α -颗粒蛋白以评估血小板脱颗粒。临床实验室通常依赖于使用常见的酶联免疫吸附测定技术的检验试剂盒来测量 α -颗粒蛋白。体内或体外的基础研究将取决于物种特异性靶血小板颗粒蛋白表位的适宜抗体的可用性,血液样本是在规定的条件下回收并根据测定说明书进行制备和分析。B.1.2.3 中描述了在体外模型中典型定义的条件或重要的因素。将结果与适宜的对照譬如阴性对照(例如基线水平或无材料/器械接触的试验体系)以及同品种器械/材料的结果进行比较至关重要。与对照相比,在统计学上显著和生物学上显著的血小板计数减少和血液脱颗粒蛋白增加,可能是材料/器械的设计具有较高血小板消耗和激活风险的提示。可获得的市售 α -颗粒蛋白 ELISA 试剂盒的实例包括:

- PF4(血小板因子 4,与肝素具有高亲和力结合的 70 个氨基酸的蛋白质;PF4 的主要生理作用似乎是中和血管内皮表面上的肝素样分子,从而抑制局部抗凝血酶 III 活性和促进凝血),和
- β -TG(β -血栓球蛋白,一种成纤维细胞和嗜中性粒细胞的趋化因子)。

注:来自凝血级联的凝血酶是一种有效的血小板激活剂,可以容易地引起血小板脱颗粒。因此,高水平的凝血酶将与高水平的血小板脱颗粒相关。

如凝血一样,血小板消耗(损失)通常被视为受血液接触表面积的影响。因此,SA 可以影响血小板计数的数据。因此,在每个研究中确认试验 SA-血液体积比(接触比)是很重要的。如果可能,接触比可以被视为变量,以帮助理解材料效应的特异性。 $3.0\text{ cm}^2/\text{mL}$ ~ $6.0\text{ cm}^2/\text{mL}$ 血液(基于器械厚度)的接触比与 ISO 10993-12 一致。其他接触比例如这个比例的 1.5 倍和 2.0 倍值得考虑,因为较高的表面积理论上会增加血小板对试验材料的敏感性。

血小板活化是一个在一段时间内(数分钟到数小时)发生的过程,并被认为是至某一时间点前是潜在可逆的,或一旦启动,它能不可逆地进展到呈现显著的形状变形、细胞质成分丢失、微粒脱落并完全破坏的地步。该过程取决于刺激类型和量。有许多已知的有效的刺激剂,称为血小板刺激剂,如凝血酶、ADP 和胶原蛋白。异物表面本身,如血液接触的医疗器械,也可以表现为刺激剂,因为它们会引起凝血酶生成。此外,血小板可以黏附到异物表面,在活化或非活化状态下保持黏附或分离,并经历导致血小板破坏的形状变化。因此,在任何时间点评估血小板活化的总体状态,可能受益于使用有助于在特定时间点“阻滞”血小板处于其物理和生化状态的试剂。因此,如果在从试验系统中取出试验材料或器械后不能立即评估血小板,则宜使用一些试剂抵抗进一步的血小板活化并稳定血小板。这些试剂的实例是枸橼酸葡萄糖(ACD)、枸橼酸盐-茶碱-腺苷-双嘧啶醇(CTAD)和其他血小板稳定剂,例如 ThomboFixTM¹⁾。如果这些稳定剂能减少人为的血小板活化的程度,不掩盖生物材料特异性的血小板激活反应,且已被证实不会对相关终点的测定产生不良影响,那么使用稳定剂是值得考虑的。

1) ThomboFixTM 是适合的市售产品的一个实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者,并不表示对这一产品的认可。

B.3.3.2 血小板数

由于血小板对防止出血和血栓形成的一般过程中起关键作用,所以血小板数的测定非常重要。接触器械后血液中血小板数明显下降是由于血小板吸附、血小板聚集、血小板阻留(如在脾中)或材料和器械上的血栓形成引起的。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。各种抗凝剂可能适用于血小板计数。

血液采集技术应具有重现性。在各种条件下,包括不适宜的血液采集方法,会使血小板功能亢进/激活。可以考虑诸如血小板聚集测定法和流式细胞术之类的试验来验证正常的血小板反应和活化。

B.3.3.3 血小板激活: β -TG、PF4、TxB2 和血小板形态变化

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 β -TG、PF4、TxB2 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,如对黏附在材料或器械上的血小板的形态进行显微镜检查(光学和电子显微镜法);测量血小板激活后释放的 β -TG、PF4 和 TxB2。

β -TG 和 PF4 是存储在血小板 α 颗粒中并在血小板激活后大量释放的蛋白质。这两种蛋白质都可通过市售的 ELISA 测定来评估。血小板激活的增加可以通过与医疗器械和材料相关的多种途径发生。器械/材料本身以及湍流和过度的剪切力可激活血小板,并且血小板激活可由有效的激活剂,如与材料/器械或局部损伤相关的血栓而形成的凝血酶引起。高水平的 TxB2 也可以通过 ELISA 测定,表明其前体化合物血栓素 A2 的水平很高,这是一种被认为是由活化的血小板产生的有效的血小板激活剂;TxB2 也被认为是可靠的与物种无关的血小板激活标志物。有关一般 ELISA 方法的详细信息,见 B.3.3.1 和 B.4。通过评价在材料/器械表面的血小板形态变化来评估血小板活化也可能是有价值的。

B.3.4 血液学——试验方法

B.3.4.1 全血计数(CBC)

电子全血细胞计数分析(通常称为 CBC)是医院血液学实验室每天进行的重要测试。其主要目的是快速准确地列举患者的各种细胞群的浓度,其中异常读数可提供有关潜在病症的早期和重要信息。CBC 用于确定人体中白细胞和红细胞的数量或比例。分析包括血小板计数。在血液-材料/器械相互作用的分析中,CBC 数据提供了器械/材料与有形的血液成分相互作用的影响的基本信息。在与材料/器械接触之前和之后的血小板和白细胞计数是有价值的,以推断在血栓形成表面参与凝块形成的激活的血小板和白细胞的损失,因此提供了表面血栓形成潜能的估计。

B.3.4.2 白细胞激活

可以通过对器械表面激活的白细胞进行显微检查来测定白细胞激活。一种更简单的定量的方法涉及使用市售 ELISA 试剂盒,以确定在材料或器械与血液的相互作用激活后释放到血浆中的中性粒细胞(PMN)弹性蛋白酶的量。另一种方法包括评估血液中血小板和白细胞数量的减少,其原理是黏附于材料的血栓会含有大量血小板和白细胞。

B.3.5 补体系统——C3a 和 SC5b-9 的测定方法

补体系统以生物化学级联的形式存在于血浆中,起到防御机制的作用,该机制旨在支持或“补充”抗

体从体内清除病原体的能力。它是免疫系统的一部分,被称为“先天免疫系统”,这部分免疫系统与抗体保护机制有所不同,补体的反应活性既不能获得也不随时间而改变。补体系统共同形成一个基本的防御线,并且可以介导具体的抗体机制。然而,补体系统也可以通过作为人体异物的材料表面(包括与血液接触的医疗器械)起作用。

补体系统由血液中发现的许多蛋白质组成,通常以无活性前体在体内循环。补体蛋白的命名是“C”,后面用简单的阿拉伯数字表示天然蛋白质,如果被剪切,则用小写的“a”或“b”表示片段。在存在自发形成的低水平的反应性 C3b 的情况下,生物材料的存在可以引发其扩增反应,最终结果是产生炎症介质,例如 C5a 和细胞毒性蛋白复合物如膜攻击复合物(MAC),这些炎症介质可以刺激一系列炎症反应包括白细胞(WBC)趋化性,活性氧簇(ROS)产生和细胞因子表达。见图 B.2。

许多蛋白质和蛋白质片段构成补体系统,这些蛋白质和蛋白质片段可以分为三种不同的活化途径:经典补体途径、替代补体途径和甘露糖结合凝集素途径。替代途径被认为最易受到医用材料的影响和反应。

许多市售 ELISA 试剂盒可用于评估血液中补体蛋白的量。由于 C3a 是在激活期间普遍存在的扩增片段,因此该补体蛋白被认为是补体激活的良好总体指标。此外,还可以通过 ELISA 试剂盒评估缩写为 SC5b-9 的可溶形式的末端 MAC。SC5b-9 通常被认为是代表补体激活的全部程度的更重要的标记。任何补体成分的升高水平表示补体系统的激活。血液透析过滤器和体外循环器械等高表面积器械与高水平的活化补体成分相关,这种现象与肺中活化的白细胞和白细胞的阻留有关。

补体片段的测定有几个缺点。首先,ELISA 试剂盒仅测定液相(血清或血浆)中的补体成分;它们不测量被激活并附着到器械表面的补体成分。根据器械材料的性质,在器械/材料表面上可能会有大量的活化补体,而这些活性补体未能被市售 ELISA 试剂盒检出。其次,许多市售试剂盒存在物种特异性,并且在典型的体外试验中观察到较高的基准水平。因此,试验需要包括适当的对照,并进行比较。经典 CH-50 法适用于人、牛、猪、兔血清。然而,鉴于 CH-50 试验测定残留补体活性,并且通常仅有一小部分补体系统被材料/器械激活,故 CH-50 对于检测与材料/器械接触后补体激活的灵敏度较低。测量体外补体激活的另一种功能性方法是通过底物转化测定补体 C3-转化酶或 C5-转化酶的形成。参考文献[20]和参考文献[21]也涉及了补体激活。附录 E 提供了关于医用材料和器械的补体检测需考虑的进一步信息。有关一般 ELISA 方法的详细信息见 B.4。

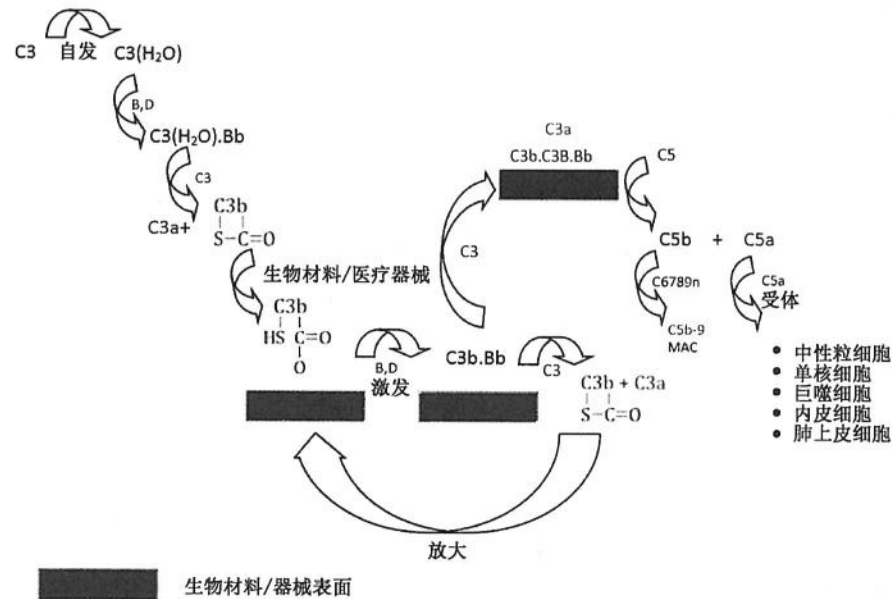


图 B.2 替代补体途径

B.4 ELISA (或其他类似技术) 测试凝血、血小板和白细胞活化和补体激活特异性血浆因子的方法的考虑

B.4.1 总则

凝血、血小板、血细胞和补体活性的评估长期依赖于对激活级联中形成的,或从各种细胞类型活化或损伤释放的关键蛋白质的血浆水平的临床测定。在这里,临床实验室通常依赖于使用常见的酶联免疫吸附测定技术的检测试剂盒。在体内或体外的基础研究将取决于物种特异性靶蛋白表位的适宜抗体的可用性。此外,血液样本是在规定的条件下回收并根据测定说明书进行制备和分析。定义的条件可包括血液接触时间、抗凝血及抗凝剂水平、温度、流量、血细胞比容和其他因素。将结果与适宜的对照譬如阴性对照(例如基线水平或无材料/器械接触的试验体系)以及已上市器械/材料的结果进行比较至关重要。如果血液中的活化标志物在统计学上和生物学上显著高于对照组,则表明该材料/器械设计可能会带给病人更高的凝血、血小板或补体介导的风险。可获得的市售凝血蛋白 ELISA 试剂盒实例包括 TAT(凝血酶-抗凝血酶复合物)、F1.2(凝血酶原形成凝血酶时释放的片段)和 FPA(纤维蛋白原形成纤维蛋白时释放的纤维蛋白肽 A)。类似地,市售 ELISA 试剂盒可用于评估血小板激活(例如, β -TG 和 PF4 释放的 α 颗粒)和补体激活(例如 C3a 和 SC5b-9 形成)。

B.4.2 一般分析方法和文件

B.4.2.1 总则

包括以下任何试验报告。

B.4.2.1.1 参考文件

制造商的 ELISA 试剂盒使用说明书。

B.4.2.2 储存和稳定性

描述试剂盒试剂和所用血液/血浆的所有储存和稳定性条件。

B.4.2.3 步骤

B.4.2.3.1 样品制备

提供一般说明。

这种试验的结果总是取决于被测试的 SA。因此,每次研究中宜规定 SA 血液体积比(接触比)。3.0 cm²/mL~6.0 cm²/mL 血液(基于器械厚度)的接触比与 ISO 10993-12 一致。其他接触比例如这个比例的 1.5 倍和 2.0 倍值得考虑,因为较高的表面积理论上会增加对试验表面的反应灵敏度。

确定孵育期后淬灭反应的方法,即淬灭剂的清单和浓度是重要的。

B.4.2.3.2 稀释因子(DF)

提供使用稀释因子、稀释剂等细节。

警告——鉴于观察到供体内和供体间的变异性较大,使得单个理想的 DF 难以确定。因此,试验样品宜至少进行两个不同的稀释因子,以捕获标准曲线上的所有样品值。样品吸光度应在最低和最高标准范围内。如果不是,则宜使用新的 DF 重新试验样品,以使结果落在标准曲线的范围内。

B.4.2.3.3 使用多个 DFs 进行试验时的数据选择

如果在未稀释、低稀释度和高稀释度条件下测试全部或部分样品,报告标准曲线上需要的最小 DF

值。如果“未稀释”样品含有一些非曲线值,并且所有“低稀释度”样品都在曲线上,而“高稀释度”样品含有一些低于曲线值的值,那么也可以接受的,只需报告“低稀释度”读数,其所有的数值都在相同 DF 曲线上。

B.4.2.3.4 标准的准备

详细描述标准曲线和对照是如何准备的。

B.4.2.3.5 方法

详细描述所遵循的按顺序进行的整体方法,包括突出显示与 ELISA 试剂盒说明书的任何偏差。

B.4.2.3.6 评价

详细描述确定待测蛋白质血浆水平的计算过程。

B.4.2.3.7 统计分析

详细描述统计分析方法。

B.4.2.3.8 限制和干扰

列出生所有限制或干扰因素,例如不正确的血液采集技术,如样品和枸橼酸盐溶液(或其他抗凝剂如肝素)的混合不充分可能导致凝血蛋白值错误升高,错误的抗凝剂可能产生所有背景值升高等。

B.4.2.3.9 参考区间

列出正在测量的蛋白质的正常和异常的血浆水平值以及对照的预期值。

B.4.3 附件

包括建议的稀释因子信息、ELISA 测定数据表格、ELISA 程序的清单等。

附录 C

(资料性)

血栓——体内试验方法

C.1 总则

许多方法已被应用于评估血栓形成的过程和事件。然而,对于与血液接触的医疗器械和材料,由于血栓形成的体内性质,C.2 和 C.3 中描述的方法更常用于评估器械相关的血栓形成。这些方法用于评价永久和临时接触的器械。如本文件所指出的,血液接触医疗器械应用的多样性决定了体内试验模型必然是多样的,以便适当地模拟每个临床应用。

C.2 中的方法被认为是用于评估器械血栓形成的最相关方式,因为实际的器械在动物模型中以其预期的临床植入构型进行评价。其主要内容是根据 ISO 10993-2 的动物福利要求、人类临床应用的准确模拟以及方案中包含的详细方法和用于评估血栓形成程度的分析进行的。

C.3 中的方法使用较少,在全世界范围内不被广泛接受。但是,某些监管部门可能需要或要求用到该方法。该方法被称为非抗凝静脉植入物(NAVI)模型(当不使用抗凝剂时)和抗凝静脉植入物(AVI)模型(当包括抗凝剂时)。该方法本身涉及将导管状的器械或制成导管形状的器械材料插入动物静脉中长达 4 h,随后对材料/导管表面上的血栓量进行大体评估。该方法的注意事项见表 C.3,并注意表 C.4 所提供的优点。由于这些注意事项,为了避免材料和器械被打上本质上可诱导血栓形成的错误标签,需要非常小心解释使用该模型生成的数据。另见 A.3。

当试验器械是应用在静脉中使用的导管型器械时,C.2 和 C.3 中的方法是等效的。

C.2 动物研究中最终器械的体内植入研究

如本文件所述,体内试验宜在预期用于体内/植入应用的器械上进行(见 6.1.6、6.3.2 和 6.3.3)。方案宜包括用于适宜地评估血液/器械相互作用的详细方法,例如分析:

- a) 器械本身,
- b) 来自试验对象的血液样品,和
- c) 易感组织和末端器官。

这样的临床前试验宜使用模拟实际使用情形的模型,例如相同的植入部位、几何形状、流速、接触周期、温度、无菌等(见 6.1.2),并包括适宜的可溯源对照,例如同品种器械(见 6.1.3)。重要的是,宜只对实际已完成(成品)器械或部件进行试验(见 6.1.4),因为对非成品的试验和较差模拟使用条件下的试验不能很好地预测临床应用中的性能(见 6.1.6)。

因此,半体内和体内应用的器械宜分别在适宜的半体内和体内模型中进行试验。半体内/体内模型中的抗凝剂使用宜与常规临床器械应用和产品 IFU 中使用的类型和剂量一致(见 6.1.12)。在动物研究中宜考虑使用适宜的重复性、统计学设计和分析方法。

适宜时考虑这些试验类别:血栓形成、凝血、血小板、血液学和补体激活,如表 2 所示。举例说明,一个分析可能包括器械上的大体检查和 SEM 以评估器械相关的血栓形成程度。检查易感的下游器官如肺和肾,血栓栓塞的证据将有助于评估与器械相关的血栓栓塞的潜在可能。如果可得到适宜的抗体,则可以通过测量凝血和纤维蛋白形成的血浆指标的水平来评估凝血,如通过 ELISA 技术测定 TAT 和 FPA。同样,简单的血小板计数和/或血小板活化标记物如 β -TG 的测量,可用于评估该器械对血小板的影响。常规血细胞分类计数和血浆游离血红蛋白可用于血液学因素的一般评估和血细胞物理损伤的

评估。最后,对于大表面积器械,提供抗体的可用性,可用各种补体因子的血浆水平来评估替代补体途径的活化。

一般来说,试验器械和同品种器械相比,在试验结果上被期望有更低或者相同的影响,或者没有影响。高于同品种器械的结果可基于风险/收益分析论证。没有同品种器械的宜使用适宜的对照,并为选择该对照提供理由。这种评价优于使用 C.3 中描述的方法,因为该方法最适宜地模拟了体内应用。通常,不同的器械领域宜参考产品标准。对于后者,能在参考文献中找到许多实例。

注 1: 对于要在无抗凝或抗凝条件下静脉环境内植入的导管状器械,C.3 中描述的 NAVI 和 AVI 植入模型分别描述了这些器械的适宜的体内研究方法。

注 2: 对于要在无抗凝或抗凝条件下动脉环境内植入的导管状器械,采用与 C.3 中所述类似的适宜的动脉植入位置的非抗凝动脉植入(NAAD)或抗凝动脉植入(AAD)模型,这是动脉植入器械的理想研究方法。

另见 6.3.3、附录 A 和附录 B。

C.3 体内 NAVI 和 AVI 血栓形成试验

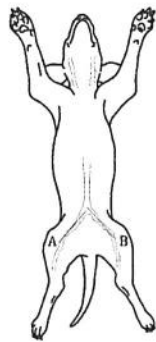
NAVI 和 AVI 试验包括将导管(或其他适宜形状的)器械或制成导管形状的器械材料插入大动物的静脉中。此试验在一些情况下被要求,例如表征新导管、评价新的器械涂层、表征新材料以及改变供应商或材料/器械处理步骤。在此模型中,多个静脉位置(见图 C.1 和图 C.2)已经被使用。在无(NAVI)或有(AVI)抗凝剂的情况下,允许重复两或三个植入物原位放置长达 4 h(特殊情况下,更少或更多的时间可能也是合理的)。然后移除植入物并评价表面上的明显血栓的量。犬股或颈静脉模型是最常用的,其中试验材料/器械位于一侧静脉中,而对照材料或同品种器械放置在对侧静脉中。试验需要 2 只~3 只大型动物,交替试验和对照的植入位置以避免偏差,并使用表 C.1 和表 C.2 所示的评分方法评价器械上的血栓。可通过对观察到的血栓的重量分析和血管通畅性的观察来补充结果。如果 LMCD 可用,试验器械的结果宜等于或小于适宜的 LMCD 的血栓形成;否则需说明。重要的是要确保能全面评价所有临床上接触血液的器械部件。世界各地的监管机构均建议植入长达 15 cm 的试验品和对照品,以确保在试验期间的充分接触。根据器械的特性,可能需要创建定制的器械以缩短部件长度,同时保持与完整器械相同的材料比例。作为替代,如果需要可将器械细分为多个试验样本。

对于用于动脉植入的器械和材料,可以按照动脉植入位置相应地调整方法。

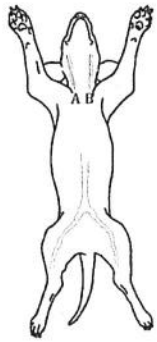
注意事项——在以下方面已观察到结果差异:

- a) 试验设施,
- b) 试验评价者,
- c) 同一材料的重复性,
- d) 对照组的评分。

表 C.3 总结了 NAVI 和 AVI 模型的主要争议。表 C.4 提供了 NAVI 和 AVI 模型的一些显著优点。模型的最大效用可能在于评估有意修改的以减少急性血栓形成的试验材料,例如评价肝素涂层。

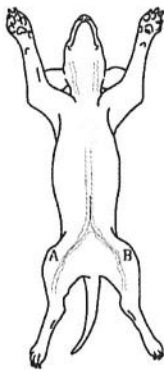


a) 股静脉

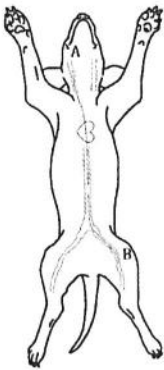


b) 颈静脉

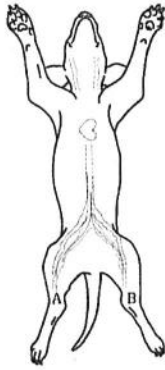
图 C.1 NAVI/AVI 模型的主要植入部位



a) 下腔静脉-下腔静脉



b) 上腔静脉-下腔静脉



c) 下腔静脉-腹主动脉

注意——使用这些植入位置需要仔细考虑器械与器械相互作用和/或血栓形成的位置差异的偏差造成的假象。

图 C.2 NAVI/AVI 模型的其他次常用植入部位

表 C.1 NAVI/AVI 评分方案 A

血栓形成评分描述	评分
无明显血栓形成 (插入部位有非常小的凝块是可接受的)	0
极小血栓形成, 一处	1
极小血栓形成, 多处	2
明显的血栓形成, $>1/4$ 而 $\leq 1/2$ 植入物表面, 血管通畅	3
明显的血栓形成, $>1/2$ 植入物表面, 血管通畅	4
血管完全闭塞	5

表 C.2 NAVI/AVI 评分方案 B

血栓形成评分描述	评分
血栓不存在或极小,如果存在,似乎是与植入物静脉切开部位相关	0
血栓极小,观察到材料表面覆盖 1%~25%	1
血栓中等,观察到材料表面覆盖 26%~50%	2
血栓严重,观察到材料表面覆盖 51%~75%	3
血栓广泛,观察到材料表面覆盖 76%~100%	4

表 C.3 使用 NAVI 或 AVI 模型主要注意事项

因素	描述	相关考虑
1	植入部位	高流量环境导致低水平的与接触表面相关的血栓,反之亦然。因此,解剖学因素如靶血管直径和/或静脉瓣位置的微小差异可能对观察到的血栓的量具有潜在的影响。另外,如果将植入物放置在改变血液流动以产生导致瘀血的涡流的角度或位置,则血栓形成可能与试验器械的材料性质无关。
2	植入技术	每个试验和对照宜同样精确地插入到每个位于相同位置的靶静脉中(最佳位置为位于血管中心,且不与血管壁接触)。
3	器械-血管壁接触程度	该因素涉及植入和接触期间的血管壁损伤/内皮剥脱。植入物本身可能由于与血管壁的机械接触而导致损伤和组织因子激活而产生血栓形成。此时材料因素可能在观察到的血栓程度上发挥较小作用,而器械形状能起主要作用。
4	时间/接触期	测量到的与接触表面相关血栓程度的主要反应在开始的 1/2 h~2 h 内趋于强烈。在此期间之后,血栓溶解(纤维蛋白溶解)系统可启动并由生化反应去除一些相关血栓。
5	取出技术	取决于与接触样品表面相关血栓的组成和程度,被测量/评分的血栓材料在器械取出/接触期间可能是脆弱的并容易脱落。没有特别的预防措施,如果样品在其植入部位取出或受到干扰,这种通常称为“套管血栓”的血栓可被“刮掉”。一些研究者使用原位灌注固定来冲洗非黏附的血液成分,并将器械/血栓/血管伴随交联成更坚韧(更符合生理性的)的形状。
6	材料/材料表面	该模型已被用于评估新材料的血栓形成潜力,评价现有已批准材料的制备工艺变化以及新供应商的资格。通常,产生同样变量结果的合法上市的对照器械(LMCD)或材料被用于对照。
7	非血栓黏附材料被标记为非血栓形成材料	本领域专家的广泛工作已经证明,亲水表面可以促进血栓形成(和血栓栓塞)但并不使血栓黏附。对那些促进血栓形成但非血栓黏附的器械和材料,本试验会给出合格的评分。
8	受体/受试者血栓形成潜力	关于这个主题的论文表明试验对象可以具有显著不同的“血栓形成潜力”,即接触器械植入物和其他刺激物时血栓形成的不同能力。这可能导致试验对象之间的评分有显著差异。
9	统计能力	在符合 ISO 10993-2 的情况下,结合同品种器械和材料之间以及试验对象之间的反应变化,获得统计学上有意义的结论通常是不可能的。

表 C.3 使用 NAVI 或 AVI 模型主要注意事项 (续)

因素	描述	相关考虑
10	评价人员的专业知识	进行血栓评分的评价人员的训练和技能非常重要。有些人可能难以区分真正的体内血栓和假血栓[处死后/前(濒死)形成的凝块]
11	抗凝剂影响	在 AVI 模型中,几乎所有的试验器械和材料都能获得零分,并通过测试。这对使用 AVI 模型的目的和基本原理产生疑问。在 NAVI 模型中,大多数疏水性材料显示不同程度的血栓,而亲水性材料显示出微小的血栓水平
12	植入物的大小与血管直径	除了可能导致血管壁损伤外,如果植入物相对于血管直径的尺寸太大,血流量可能会受到影响(停滞),易发生血栓形成。通常,植入物的横截面积不宜占据血管腔的 50%以上

表 C.4 使用 NAVI 或 AVI 模型的优势

因素	描述	相关考虑
1	血栓形成的研究	已知 NAVI 模型始终显示出在疏水聚合物上形成大量体内血栓,特别是在接触血液后 1 h 或更短的时间内。因此,NAVI 模型是研究血栓形成的良好模型。 例如,它可能是研究血栓对血管内传感器等器械影响的有用工具
2	评价旨在降低血栓形成的涂层	在 NAVI 模型中进行试验时,应用于器械表面以降低血栓形成作用的涂层宜表现出明显不同且一致的反应,即低于未修饰的对照。 注意:试验宜包括评估血栓栓塞潜力的步骤,因为非血栓黏附的表面仍可能形成血栓
3	评价旨在提高血栓形成的涂层	在 NAVI 或 AVI 模型中进行试验时,应用于器械表面以增强血栓形成作用的涂层宜表现出明显不同且一致的反应,即高于未修饰的对照。 注意:试验宜包括评估血栓栓塞潜力的步骤,因为血栓形成的表面可能会脱落栓子
4	心血管应用材料的筛选	NAVI 和 AVI 模型最适宜用于试验短时间内导入血管系统的导管型器械。可以在该模型中试验多种材料和器械设计,对侧血管用于评估试验器械的对照或未修饰版

附录 D

(资料性)

血液学/溶血——试验方法——医疗器械和医疗器械材料的溶血性能评价

D.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材料和器械定性的作用因素。溶血与血液-材料接触时间和材料性质如表面能、表面形态和表面化学有关。溶血也与局部机械力和生物化学因素有关。

D.2 溶血原因

D.2.1 渗透压(渗透压介导的溶血)

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。溶质被动运动时不透过该膜,但允许纯溶剂(如水)通过时就会产生渗透压。这种压差会导致红细胞膨胀和细胞膜破裂,游离血红蛋白释放。还宜注意,哺乳动物红细胞之间的渗透脆性不同。

D.2.2 机械力(机械介导的溶血)

流体动力学因素如血流速度、湍流和非生理剪切力能使红细胞膜变形,并导致膜破裂。后者可能由具有机械操作和/或复杂流动路径的器械而加剧。这种器械的示例是:

- 单采和细胞分离系统,
- 动脉血液过滤器,
- 血泵,
- 心肺旁路系统,
- 心脏切开术/静脉贮血器系统,
- 循环支持器,
- 血液透析系统,
- 机械心脏瓣膜,和
- 心室辅助器械。

D.2.3 生化因素(材料介导的溶血)

分子水平上的膜结构变化可改变红细胞膜的强度和弹性。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化。其他化学物如医疗器械的可浸提物,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,在低渗压情况下这些改变能造成细胞膜破裂。可以进行一种测定红细胞膜破裂(渗透脆性)压力的试验。

D.3 溶血的临床意义

D.3.1 毒性反应

血浆游离血红蛋白量增高可引起毒性反应或引起肾脏和其他器官的应激反应。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。

D.3.2 血栓形成和贫血

血管内溶血可以通过参与释放的 RBC ADP 和磷脂的级联事件来促进血栓形成,引起血小板活化和促血栓形成物质的脱粒。当溶血造成临床上红细胞数量明显降低时,可能导致贫血和携氧能力受损以及随后对脑和其他器官或组织的影响。

D.4 溶血通过/不通过评价的确定

溶血与接触时间、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、夹杂气体以及血源、年龄和化学的变化有关。为了对材料与医疗器械之间的潜在溶血性进行比较,需要对这些因素充分地控制。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外法和体内法模型。溶血潜能的研究是在某个特定实验室用同种模型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而快速从体内去除)。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是可适用的。

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,重要的是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。合格判定可根据风险与受益评估的一些形式来确定。为进行这类评估,宜考虑下列问题:

- 器械与患者的接触期有多长?
- 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患者接触的全部过程内?器械取出后溶血是否还会继续?
- 其他治疗方法的相对风险与受益如何?
- 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?
- 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。

D.5 溶血试验——一般性考虑

D.5.1 方法

D.5.1.1 总则

使用体外试验评估红细胞的溶血。直接法可测定由于物理和化学因素与红细胞相互作用引起的溶血,间接法测定试验样品浸提物导致的溶血。参考文献[19]是专项检验材料溶血性能(主要由于化学因素所致)的标准,根据器械大小和复杂性,本方法可能不足以检验完整的医疗器械。参考文献[19]、参考文献[23]和参考文献[29]是专门开发用于医疗器械及其部件的材料溶血试验方法学的实例。参考文献[22]被开发用于评估由医用纳米粒子引起的溶血作用。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,溶血常被报告为释放入上清液的血红蛋白被试验开始时测出的总血红蛋白标准化后的百分比[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。

此外,如进行了器械的材料试验,还宜考虑进行临床使用条件下的整体医疗器械的动力学试验以评价器械的结构作用、血液与材料的机械-物理相互作用、临床相关使用条件范围(如血流速率、旋转速度、压力、接触时间)、预期使用与血液动力学因素。对于许多器械,由流体动力学和与表面的动态相互作用

引起溶血超过了由材料的化学作用引起的溶血。为了适宜模拟临床使用条件,动态溶血试验宜考虑血液细胞比容等因素。为了确定可能出现的最坏情况的溶血,体外试验通常以预期使用该器械的最高血流速率进行。参考文献[6]、参考文献[38]、参考文献[42]和参考文献[125]提供了器械的机械溶血试验方案。

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,而总血红蛋白浓度的正常范围为 11 000 mg/dL~18 000 mg/dL。基于这个原因,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。注意事项为:

注意——一些常见的溶血测定表明,材料介导的溶血的界限值低于根据历史上接受但未验证的无/低风险的值。然而,基于合适的风险/受益分析,更高的可接受水平的材料介导的溶血被认为是合理的。

研究者宜注意,医用材料或溶液中的化学物可能会给溶血试验带来不良作用,可能会改变红细胞脆性(例如特定缓冲液和固定剂如甲醛或戊二醛)、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)。

D.5.1.2 血红蛋白总量测定

通常,D.5.1.2.1 和 D.5.1.2.2 中概述的分析方法已被用于确定总血红蛋白(Hb)浓度。总血红蛋白浓度也可以使用校准的全血细胞计数仪和血红蛋白计来测量。

D.5.1.2.1 氰化高铁血红蛋白法

第一种经典的方法是由国际血液学会标准化委员会推荐的氰化高铁血红蛋白测定。氰化高铁血红蛋白(氰化高铁血红蛋白;HiCN)分析具有简便、易于自动化、可得到基准参照标准品(HiCN)等优点。该方法基于 Hb 的氧化作用及随后形成氧化高铁血红蛋白,在波长 540 nm 处有一个最大吸收峰。像去垢剂这样的溶解剂,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,可以用筒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 参照标准品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。

D.5.1.2.2 测铁法

第二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 TiCl_4 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。

D.5.1.3 血浆或上清液血红蛋白浓度测定

以下两种方法已被用于测定血浆或上清血红蛋白浓度。

D.5.1.3.1 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),现今有许多不同的方法用于测量血浆血红蛋白以指示溶血,但没有一种方法得到广泛的认可。这些方法可分为两大类:第一类是直接光学技术评价(即基于直接或通过使用衍生分光光度法对 415 nm、541 nm 或 577 nm 处的氧合血红蛋白吸收峰进行定量);第二类是化学技术评价(即以与试剂如联苯胺类发色团和过氧化氢发生化学反应,或形成氧化高铁血红蛋白为基础对血红蛋白进行定量测定)。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)受血红蛋白的催化作用被过氧化氢氧化。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害的氰化试剂,可以用 HiCN 基准参照标准品来校准 Hb 标准溶液系列。该方法的检测限度(低至 5.0 mg/dL),与氰化高铁血红蛋白法相当。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),可能因钙螯合物抗凝剂(如枸橼酸盐、草酸盐、EDTA)、白蛋白或其他可能干扰 H_2O_2 氧化的非特异性血浆成分而发生反应抑制(多达 40%)。

由于这些原因,可以替代直接光学方法,例如参考文献[103]、参考文献[106]或参考文献[119]中具有相当灵敏度和可重复性的方法。但是,如上所述,可能发生因化学反应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,所以需要血浆内在背景干扰进行补偿。分析者宜注意血浆血红蛋白测定中的这些局限性,并确定是否使用了适宜的技术,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)。

D.5.1.3.2 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,与光学技术有密切关联并具可比性。

D.5.2 血液与血液成分保存

本条提供了经美国血库协会和欧洲理事会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,其化学条件宜模拟器械的临床条件(例如抗凝剂的适当选择、尽量少的使用血液保存剂以及适宜的血液 pH 值)。

目前已经开发出用于血液采集时防止凝血并能在一段时间内保存红细胞的抗凝剂,这些抗凝剂都含有枸橼酸钠、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/或磷酸盐或其他。虽然肝素不用于血液保存,但它常用于临床上对接触医疗器械的患者进行抗凝治疗。

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,每个葡萄糖分子通过糖酵解途径,可将二磷酸腺苷(ADP)磷酸化作用生成两个三磷酸腺苷(ATP)分子。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,宜向抗凝剂溶液中加入枸橼酸以降低碱性。这会为贮存于 4 °C 的初期的红细胞提供较高的氢离子浓度。贮存期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合成替代的 AMP、ADP 和 ATP。

当制备红细胞浓缩液时,除血浆的同时也除去了相当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宜大于 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,即应加入氯化钠、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。

血制品贮存容器的适用性可通过各种测定血制品质量的方法来进行评价。含有一种适宜抗凝剂的血制品容器,在 1 °C~6 °C 的静态条件下竖直贮存。在预定的时间周期,测定细胞游离血浆血红蛋白量,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。

D.5.3 血液处理人员的保护

有必要为接触、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。

D.5.4 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,宜有严格标准化的静脉切开放血部位准备程序。尤其重要的是,在静脉穿刺前,允许消毒液在皮肤表面干燥,并且在插入静脉穿刺针之前,不要与皮肤表面进一步接触。

为防止微生物污染,采用封闭式容器系统(即不含室内空气)进行血液采集。用针穿刺样本瓶的橡胶密封区,拔出穿刺针后宜完全密闭,否则在冷藏后局部会产生真空而吸入污染空气。

注:使用真空管有可能导致轻微溶血。

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。

D.5.5 物种选择

最理想的溶血试验宜使用人血红细胞,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,宜保留供人体输血用,同时也宜考虑供血人和动物的健康要求。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,在获取总血红蛋白含量时宜确保 100% 的溶血。阴性对照的溶血宜控制在最低限度,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。

D.5.6 溶血评价——体外、半体内和体内与血液或血液成分接触

材料或器械可以在体外、体内或半体内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验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,评价试验对象溶血作用的临床后果。

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临床最相关和预期的最坏临床使用条件(如最高血液流速)下,血液流经器械进行再循环。在进行这些研究之后,将对某些医疗器械进行动物模型的半体内模拟研究,或者对人体进行有限的对照研究。医疗器械的尺寸和预期功能会影响这些研究的设计。

D.5.7 直接接触与间接接触法

所用浸提条件见 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。宜根据器械本身和其将来使用的条件选择试验。ISO 10993-12 概述了提高温度时考虑的条件。

附录 E
(资料性)
补体——试验方法

E.1 背景信息

在临床体外治疗特别是在血液透析和心肺旁路应用中,补体激活与某些不良反应有关。这些治疗主要涉及具有血液接触表面积大和接触时间相对较短的器械。补体激活通常在血液接触器械材料表面后不久的早期阶段发生;尚未看到它将持续更长时间。在此,激活被认为开始于血液与器械材料接触以及包括关键补体蛋白质 C3 和 C3b 在内的许多血浆蛋白质的沉积。这些特异性蛋白质的接触导致重要的 C3 和 C5 转化酶(分别为 $C3b \cdot Bb$ 、 $C3b \cdot C3b \cdot Bb$, 见图 B.2)形成替代途径。C5 转化酶蛋白催化剪切 C5 并产生 C5a 和 C5b。C5a 蛋白是公认的受体介导的嗜中性粒细胞和单核细胞活化的效应分子, C5b 片段是公认的导致补体膜攻击复合物(MAC)形成的初始补体成分, MAC 可以结合并激活周围细胞,和/或裂解破坏周围细胞。WBCs 可以检测材料表面结合的 C3 和 C4 片段,这导致其后续的表面黏附和活化。中性粒细胞和单核细胞活化, MAC 形成和激活以及 WBC 黏附和激活于材料导致了在高表面积器械应用中临床观察到的典型病理生理学。重要的是,参考文献[139]已经显示了 C5a 片段在介导许多这样的不良反应中起着关键作用。在此,在模拟血液透析和纯化的 C5a 的输注中观察到与实际透析期间观察到的那些相同的剂量依赖性反应。该领域的继续工作表明,表面高度亲核(含羟基和胺)的材料具有最高的补体激活潜能,各种表面修饰减少了这类表面化学材料的应用大大降低了经典的临床后遗症。这项工作得到研究医疗器械材料补体激活与生物反应关系的其他研究人员的支持。

幸运的是,发现含羟基和胺的血液接触材料作为补体激活的来源,加快了可以消除或掩盖这些反应的新材料的开发。这种材料修饰大大减少了较大表面积/急性接触应用中的补体激活。然而,不管与血液接触表面积和植入持续时间如何,对这些大面积器械激活补体的关注使得这种试验在所有器械上变得更常见。迄今为止,该工作组在其他器械应用,即所有中小表面积的器械中尚未确定有关补体相关不良事件的科学论文或临床报告。因此,尚未得到器械相关的补体激活与人类不良事件相关联的适宜参考文献以及关注的器械表面积阈值。值得注意的是,经典的过敏反应与医疗器械使用有关。然而,这里的反应通常归因于因子的传递,而不是器械或器械材料。一些补体激活与器械应用的错误联系可能源于这些报告。

在评估凝血、血栓形成和血小板活化时,许多分子生物学工具(例如 ELISA 测定)用于监测血液中补体通路激活的水平。例如可用的市售补体蛋白 ELISA 试剂盒,包括但不限于 C3a、C5a 和 SC5b-9。尽管补体介导的病理生理学与 C5a 片段有很强的联系,但经典的补体检测集中在评估 C3a 和 SC5b-9 复合物。结合这些工具,现在有一些评估相关反应例如 WBC 黏附(使用 SEM)和 WBC 活化的方法(如使用生物测定法评价 PMN 弹性蛋白酶释放)。

E.2 补体激活试验和文献(科学或监管的目的报告补体试验结果时宜考虑)

B.4 中描述了使用 ELISA 测定法进行补体检测的通用方法和文献。

像其他生物反应如凝血蛋白形成一样,补体形成通常表现为启动、传播和终止阶段。这反映了初始的 C3 和 C5 转化酶形成反应,级联/反馈扩增和减缓/失活期,其中关键前体可能被消耗或活性蛋白质由于半衰期短或由阴性对照反馈蛋白失活而失去活性。因此,随着时间的推移,补体蛋白水平预期出现数量级差异。由此,材料/器械-血液接触实际发生时血液中的补体级联的阶段是重要因素。也就是说,试

验材料与血液混合时的影响在每个阶段可能会有很大的不同。另外,由于补体激活通常与血液接触表面积成比例,SA 对结果影响很大。因此,每项研究宜规定 SA 与血液(全血、血浆或血清)的体积比(接触比)。如果可能,接触比可以被视为变量,以帮助理解材料效应的特异性。 $3.0\text{ cm}^2/\text{mL}\sim 6.0\text{ cm}^2/\text{mL}$ 血液(基于器械厚度)的接触比与 ISO 10993-12 一致。其他接触比例如这个比例的 1.5 倍和 2.0 倍可能值得考虑,因为较高的表面积理论上会增加对试验材料的反应灵敏度。

注:由于试验系统的体积,可以试验的试验材料的量有物理限制,例如试管、目标接触率。

E.3 补体激活试验方法考虑

多个试验实验室补体试验方法的综述显示,使用市售的试验试剂盒是常见的。然而,观察到实验室方法存在一些不一致。内容如下:

- a) 血液制备和抗凝剂:用于接触试验材料的血液在实验室之间差异很大。例如,使用特殊的市售人血清,新鲜和冷冻枸橼酸盐抗凝的人血浆,新鲜人血清和直接接触的新鲜肝素化全血。这些不同的血液制剂对补体结果的影响尚未得到评价,使用 EDTA 作为抗凝剂的除外。对于后者,通常众所周知,通过经典途径的补体激活是钙依赖性的,而通过替代途径的补体激活是镁依赖性的。因此,使用有效的钙/镁螯合剂如 EDTA 会结合可用的钙和镁并阻止补体激活,使得使用这些抗凝剂的大多数试验结果接近补体蛋白的背景水平。

如上所述,目前没有被鉴定用于补体试验的标准血液或血液制剂。然而,当使用血清时,血清宜在功能上完整并保持显示补体激活的能力。如果使用全血或血浆,宜仔细选择抗凝剂的类型,以确保其不会抑制或加强由试验器械本身引起的补体活化。

- b) 试验样品表面积与血液(全血、血浆或血清)体积的比例:一些实验室指定使用 ISO 10993-12 的比例,血液(全血、血浆或血清)的体积代替浸提液的体积。一些实验室没有指定比例和/或使用可变比例。由于补体激活受 SA 影响,标准化和报告的 SA 对实验室内和实验室间的结果解释很重要。
- c) 使用对照:有些一致的是使用阴性生物材料对照如聚丙烯,阳性生物材料对照如乳胶或乙酸纤维素;不一致的是使用液体阴性对照如盐水以及阳性液体对照如眼镜蛇毒因子;使用市售试剂盒中提供的阴性和阳性对照是相当一致的。
- d) 血液接触医疗器械的补体激活被认为是发生在表面的现象。因此,使用器械浸提液进行试验是不适宜的。相反,器械或材料的补体试验宜始终使用[血液或血液成分]直接接触法进行。测定中宜包括阴性对照物质如聚乙烯(PE)以及阳性对照物质如非改性纤维素(如铜仿²⁾,如果有的话)。相应地,使用液体阴性对照如盐水不是医疗器械补体激活试验的适宜的阴性对照。另一方面,可以使用有效的液体补体活化剂如眼镜蛇毒因子来证明试验系统在特定条件下工作。
- e) 标准曲线制备/稀释:实验室使用不同稀释度的标准品,以产生捕获大多数水平的试验和对照样品的标准曲线。例如,已有报告 1:100、1:200、1:1 000 和最高为 1:10 000 的稀释度。这里最重要的因素是所有样品最终都位于标准曲线上的低和高值之间。
- f) 试验样品和对照的孵育期:实验室之间的孵育期不同,不同实验室报告为 60 min、90 min 或 30 min、60 min 和 90 min 的孵育期。
- g) 添加显色底物后孵育时间:15 min~30 min 孵育期。
- h) 试验样本评价:实验室之间评估试验材料是否产生阳性或阴性结果的方法不一致。大多数实

2) 铜仿是适合的市售产品的一个实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者,并不表示对这一产品的认可。

实验室将试验样品结果与阳性和阴性生物材料和/或液体对照进行统计学比较。一些实验室采用与历史数值以及与同品种器械的结果比较,和/或涉及阴性和阳性对照的特殊数学公式作为最终评估的一部分。

对于临床可接受的补体激活水平没有确定的通过/失败标准。在补体激活试验中包含合法上市的可比较的器械将有助于数据解释。可比较的器械数据可用于评价试验器械数据的临床相关性。

如果可比较的器械在器械将被注册上市的监管区域没有合法销售,那么地区监管机构可能会要求与在该地区已经合法销售的器械进行比较试验。

附录 F
(资料性)
较不常见的实验室试验

F.1 总则

本附录描述了主要用于评估器械/材料与血液相互作用的研究的试验。然而,这些试验在监管器械提交的文件中没有被广泛使用。这里提到的试验方法仅供参考(见表 F.1),需要注意的是,这些方法可能尚未标准化,也可能无临床相关性。作为医疗器械,临床前生物学评价策略宜着重于最有意义和广泛接受的试验(见附录 B),宜在器械提交的文件中谨慎包括任何附录 F 方法。明确的不推荐的实验室试验见附录 G。

表 F.1 评价与血液相互作用的较不常见的试验

试验类别 ^a	
血栓	血流减少,重量分析,通过器械后的压降,吸附蛋白质分析,成像技术
体外血栓	
凝血	使用显色底物的凝血酶生成,纤维蛋白/纤维蛋白原降解产物(FDP),D-二聚体
血小板	血小板黏附评估,血小板活化的流式细胞术分析,血小板微粒形成,放射性标记血小板的 γ 成像,血小板聚集测定
血液学	流式细胞术测定白细胞激活,血细胞黏附评估,血小板白细胞复合物(PLCs)
补体系统	Bb, C3bBb, C5a
^a 由于生物变异性和技术限制,最常用于研究目的试验的准确性和预测性,需要仔细注意方法,谨慎解释结果。	

F.2 血栓**F.2.1 血流减少**

器械使用一段时间后测定血流(速度或体积),可在使用期间或使用前后进行,原理及说明同 B.2.1。

F.2.2 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。这里,植入前与植入后即刻器械重量之间的差异可以反映存在的血栓量。需要特别注意的不是所有存在的组织都是血栓。

F.2.3 通过器械的压降

可在器械使用前后一个时期进行测量。

F.2.4 吸附的蛋白质分析(通过抗体结合)

与血液接触后的试验材料或器械发生的蛋白质吸附,例如第一层或表层在达到平衡时被认为可能影响器械性能和/或临床结果。除了定性显微镜判断纤维蛋白和沉积在材料上的血小板之外,通过测量蛋白质如纤维蛋白原或血小板膜受体特异的标记抗体的量,可以定量估计表面蛋白质。为此,首先洗涤

接触血液后的材料以去除非黏附的蛋白质和血液成分,然后将表面或表面的提取物与标记的抗体结合进行定性或定量分析。另外,可以不使用抗体直接测量吸附的蛋白质的总量。

F.2.5 成像技术——血管造影术、血管内超声、多普勒超声、计算机 X 线断层扫描(CT)和磁共振成像(MRI)

可从中选择方法来测定移植物或其他通道的开放性或闭合程度,还可测定体内应用器械上的血栓沉积。

F.3 凝血

F.3.1 使用显色底物的凝血酶生成

材料在有磷脂存在的情况下与未启动的凝血系统接触将会生成凝血酶,可通过显色底物的换算进行测量。

F.3.2 纤维蛋白/纤维蛋白原降解产物(FDP)

正常的生理性纤维蛋白降解生成 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,而降解产物从循环中清除速度快的情况下会维持该降解产物的正常低水平。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 或更高浓度的 FDP。该试验主要用于评价植入器械。推荐使用市面上使用的方法如 ELISA 法。

异常纤维蛋白原血症,无纤维蛋白原血症和低纤维蛋白原血症导致 PT、PTT 和 TT 结果延长。

F.3.3 D-二聚体

D-二聚体水平升高表明凝血机制激活。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/或放射免疫分析(RIA)法定量测定此类蛋白。

F.4 血小板

F.4.1 血细胞黏附评价

血细胞黏附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黏附的方法,例如 Kuniki K-score 法。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。

另一种可供选择的方法是对黏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黏附细胞,随后固定试验表面,准备进行光学或扫描电子显微镜检查。对每一单位面积黏附血小板直接计数并记录其形态(如铺展量和聚集形成程度)。还可采用⁵¹Cr 或¹¹¹In 标记血小板技术。另外一种非同位素方法即乳酸脱氢酶(LDH)和酸性磷酸酶方法,用于评估黏附血小板溶解后体内的酶活性,也是一种用于评估表面血小板的有用工具。

F.4.2 血小板活化的流式细胞术分析

使用某些材料或器械可能导致血小板活化、在血小板表面活化标志物的表达或血小板微粒的产生。血小板表面活化标记物通过使用单克隆抗体的流式细胞术检测 P-选择蛋白(GMP-140)表达或活化糖蛋白 I b 和 II B/III a 表达。使用两种抗体通过流式细胞术识别活化血小板的不同表位,即血小板特异性(即 GP I b 或 GP II b/III a)和血小板激活特异性(P-Selectin)的抗体。

F.4.3 放射性同位素标记血小板伽马成像

^{111}In 能发射较强的伽马射线,使其适用于这一用途,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。

F.4.4 血小板聚集

血小板聚集是因向连续搅拌的富血小板血浆 (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 (如阿司匹林、非甾体抗炎药) 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 法能筛查血小板聚集。

F.5 血液学

F.5.1 白细胞状态和形态

活化白细胞状态的变化可以通过流式细胞术来评价增加的白细胞标志物,如 L-选择蛋白和 CD11b 以及淋巴细胞亚群中的数量紊乱。还可以通过评价在医疗器械表面上激活时白细胞经历的形态学变化来评估白细胞活化。这通常通过 SEM 进行。

F.5.2 血细胞黏附评估

血细胞黏附是当考虑与远端栓塞或一种或多种血液学因素的激活证据相结合时材料的血液相容性的测量。通过这种方法,已经报道犬外周淋巴细胞和多形核白细胞 (PMNs) 对涂覆有聚 (甲基丙烯酸羟乙酯) (HEMA) 的珠粒的黏附比涂覆有聚苯乙烯和某些其他聚合物的珠粒低。在本研究中使用分离的淋巴细胞和 PMNs。

F.5.3 血小板白细胞复合物 (PLCs)

PLCs 可以通过流式细胞术测量,并且可能是接触医疗器械和材料后白细胞和血小板活化的指标。

F.6 补体系统

F.6.1 Bb、C3bBb 和 C5a 的补体激活评价

在这三种补体蛋白中,C5a 片段被认为是与血液接触器械相关的补体激活中关键的补体因子之一。然而,考虑到市售 ELISA 试剂盒对该蛋白质的体外评价的灵敏度很低,不需要常规测试 C5a。

附录 G

(资料性)

不推荐的试验

G.1 总则

作为血液接触医疗器械安全评价的临床前评估的一部分,表 G.1 和下文所述的试验通常不被监管机构使用或接受。这些试验被认为是过时的,或者没有足够/不适合进行此类评价的科学价值。

表 G.1 医疗器械安全性临床前评估中未使用的试验

试验类别	
体外血液相容性	
凝血	APTT、PT 和 TT
血小板	模板出血时间、血小板寿命(生存)
血液学	网织红细胞计数
补体系统	CH-50、C3 转化酶、C5 转化酶

G.2 凝血

G.2.1 活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)和凝血酶时间(TT)

这些试验通常测定与患者凝血因子水平异常相关的凝血障碍。

使用各种活化物质如高岭土或硅藻土的部分凝血激酶试剂可商购。使用这些试剂进行的试验称为活化部分凝血活酶时间(APTT)。因为活化物质掩盖了由器械或其材料组分引起的任何活化,因此 APTT 在体外评价血液接触器械/材料的血栓形成性质中很少有用。

这些指标通常不用于评估接触血液的医疗器械和/或材料。

G.3 血小板

G.3.1 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。现已观察到一些短期接触的外部接入器械(如心肺旁路)出血时间延长,而血小板数正常。该试验适用于使用某些实验动物,也适用于体外出血时间测定。该试验不用于评估接触血液的医疗器械和/或材料。

G.3.2 血小板寿命

将从患者血液中采集的高伽马射线¹¹¹In 发射的血小板用⁵¹Cr 或¹¹¹In 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。¹¹¹In 具有较强的伽马射线发射能力,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。对于接触血液的医疗器械和/或材料的非临床评估,不宜进行此项试验。

G.4 血液学

G.4.1 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。这可能是长期失血(出血)、溶血或其他原因引起的红细胞质量下降的反应。此项试验不用于对接触血液的医疗器械和/或材料的评估。

G.5 补体系统

G.5.1 CH-50、C3 转化酶和 C5 转化酶的补体活化评估

CH-50 的减少是补体消耗总量的指标。任何补体成分的升高水平表示补体系统的活化。一些材料激活补体和活化的补体成分反过来激活白细胞,导致它们聚集并被隔离在肺中。

补体分裂产物的测量具有种属特异性以及在执行体外试验后基线水平高的缺点。人、牛、猪和兔血清似乎都可以用于经典的 CH-50 方法。

体外补体激活测定的另一功能方法是通过底物转化测定补体 C3-或 C5-转化酶的产生。已有测定关键补体成分的市售 ELISA 试剂盒。

这些试验一般不用于与血液接触的医疗器械和/或材料的补体激活的评价。

参 考 文 献

- [1] GB/T 16175 医用有机硅材料生物学评价试验方法
- [2] ISO 3826-3 Plastics collapsible containers for human blood and blood components—Part 3: Blood bag systems with integrated features
- [3] ISO 5840 (all parts) Cardiovascular implants—Cardiac valve prostheses
- [4] ISO 5841-3 Implants for surgery—Cardiac pacemakers—Part 3: Low-profile connectors (IS-1) for implantable pacemakers
- [5] ISO 7198 Cardiovascular implants and extracorporeal systems—Vascular prostheses—Tubular vascular grafts and vascular patches
- [6] ISO 7199 Cardiovascular implants and artificial organs—Blood-gas exchangers (oxygenators)
- [7] ISO 8637-1 Extracorporeal systems for blood purification—Part 1: Haemodialysers, haemodiafilters, haemofilters and haemoconcentrators
- [8] ISO 10993 (all parts) Biological evaluation of medical devices
- [9] ISO/TS 10993-20:2006 Biological evaluation of medical devices—Part 20: Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices
- [10] ISO 12891-1 Retrieval and analysis of surgical implants—Part 1: Retrieval and handling
- [11] ISO 14708-2 Implants for surgery—Active implantable medical devices—Part 2: Cardiac pacemakers
- [12] ISO 14708-5 Implants for surgery—Active implantable medical devices—Part 5: Circulatory support devices
- [13] ISO 15674 Cardiovascular implants and artificial organs—Hard shell cardiomy/venous reservoir systems (with/without filter) and soft venous reservoir bags
- [14] ISO 15675 Cardiovascular implants and artificial organs—Cardiopulmonary bypass systems—Arterial blood line filters
- [15] ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [16] 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
- [17] Harker L.A., Ratner B.D., Didisheim P. eds. Cardiovascular Biomaterials and Biocompatibility. Supplement to Cardiovasc. Pathol. 2 (3). Suppl, Jul-Sept 1993, pp. 1S-224S.
- [18] ANSI/AAMI RD16. Hemodialyzers, hemodiafilters, and hemoconcentrators. In: International Organization for Standardization and Association for the Advancement of Medical Instrumentation, editor. Cardiovascular implants and artificial organs. American National Standards Institute; 2007. p. 30.
- [19] ASTM F756-13 Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials
- [20] ASTM F1984-99 Standard practice for testing whole blood complement activation in serum by solid materials

- [21] ASTM F2065-00E1 Standard practice for testing for alternative pathway complement activation in serum by solid materials
- [22] ASTM E2524-08 (2013) Standard test method for analysis of hemolytic properties of nanoparticles
- [23] MHLW Notification by Director, OMDE, Yakushokuki-hatsu 0301 No. 20, March 1, 2012, Basic Principles of Biological Safety Evaluation Required for Application for Approval to Market Medical Devices
- [24] ASTM 2382 Standard test method for assessment of intravascular medical device materials on partial thromboplastin time (PTT)
- [25] ASTM F2888-13 Standard test method for platelet leukocyte count—An in-vitro measure for haemocompatibility assessment of cardiovascular materials
- [26] Anticoagulant Sodium Citrate Solution U.S.P. In: Larry Callahan, editor. USP 28: (USP Citric Acid RS); Assay. U.S. Pharmacopeia; 2006d. p 168; PF 31(5). p. 731.
- [27] NIH. Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals; Health Research Extension Act of 1985; Public Law 89-544. In: Office of Extramural Research; OLAW, editor. Office of Laboratory Animal Welfare; 2002. (a/k/a OLAW, 2002)
- [28] USDA. 9 CFR, Code of Federal Regulations; Chapter 1; Subchapter A - Animal Welfare. In: Animal Welfare Information Center U. editor. Government Printing Office; 2004
- [29] NIH. Evaluation of hemodialyzers and dialysis membranes. Report of a Study Group for the Artificial Kidney-Chronic Uremia Program NIAMD-1977. Chapter two. In vitro characterization of hemodialyzers. Artif. Organs. 1977, 1 (2) pp. 59-77.
- [30] ASTM F1830-97 Standard practice for selection of blood for in vitro evaluation of blood pumps
- [31] ASTM F1841-97 Standard practice for assessment of haemolysis in continuous flow blood pumps
- [32] CDRH. Class II special controls guidance document for certain percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) catheters—Document No. 1605. In: Office of Device Evaluation (ODE); Division of Cardiovascular Devices; Interventional Cardiology Devices Branch, editor. DRAFT guidance for industry and FDA staff; FDA; 2008. p. 34.
- [33] CDRH. Class II special controls guidance document: indwelling blood gas analyzers—Document No. 1126. In: Office of Device Evaluation (ODE); Division of Cardiovascular and Respiratory Devices; Anesthesiology and Respiratory Devices Branch, editor. Final guidance for industry and FDA staff; FDA; 2001. p. 16.
- [34] CDRH. Coronary drug-eluting stents; nonclinical and clinical studies. In: Center for Devices and Radiological Health (CDRH); Center for Drug Evaluation and Research (CDER); and Office of Combination Products (OCP), editor. DRAFT guidance for industry; FDA; 2008. p. 89.
- [35] CDRH. Coronary drug-eluting stents; nonclinical and clinical studies—Companion Document No. 6255. In: Center for Devices and Radiological Health (CDRH); Center for Drug Evaluation and Research (CDER); and Office of Combination Products (OCP), editor. DRAFT guidance for industry; FDA; 2008. p. 32.
- [36] CDRH. Guidance for annuloplasty rings 510(k) submissions—Document No. 1358. In: Office of Device Evaluation (ODE); Division of Cardiovascular and Respiratory Devices; Circulatory Support and Prosthetic Devices Branch, editor. Final guidance for industry and FDA staff; FDA;

2001, p. 17.

[37] CDRH. Guidance for cardiopulmonary bypass arterial line blood filter 510(k) submissions—Document No. 1622. In: Office of Device Evaluation (ODE); Division of Cardiovascular Respiratory and Neurology Devices; Circulatory Support and Prosthetic Devices Branch, editor. Final guidance for industry and FDA staff; FDA; 2000. p. 8.

[38] CDRH. Guidance for cardiopulmonary bypass oxygenators 510(k) submissions—Document No. 1361. In: Office of Device Evaluation (ODE); Division of Cardiovascular and Respiratory Devices; Circulatory Support and Prosthetic Devices Branch, editor. Final guidance for industry and FDA staff; FDA; 2000. p. 23.

[39] G95-1. 1997 Blue Book Memorandum: Use of International Standard ISO-10993, “Biological Evaluation of Medical Devices Part 1: Evaluation and Testing” (Replaces # G87-1 # 8294). FDA < <http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm080735.htm> >. Accessed 04/15/ 2010

[40] Tripartite Subcommittee for Medical Devices. Tripartite Biocompatibility Guidance for Medical Devices. In: Office of Device Evaluation (ODE) in FDA’s Center for Devices and Radiological Health (CDRH), editor. General Program Memorandum # G87-1. FDA; 1986

[41] FDA. 21 CFR 58(b)(3): Good Laboratory Practices (GLP) for Non-Clinical Laboratory Studies, In: Department of Health and Human Services, editor. Volume 1, Code of Federal Regulations. FDA; 2004

[42] Implanted Blood Access Devices for Hemodialysis-Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. January 21, 2016, available at <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-meddev-gen/documents/document/ucm308598.pdf>

[43] Bosch T., Schmidt B., Blumenstein M., Gurland H.J. Thrombogenicity markers in clinical and ex vivo assessment of membrane biocompatibility. *Contrib. Nephrol.* 1987, 59 pp. 90-98.

[44] CHANDLER A.B.. In vitro thrombotic coagulation of the blood; a method for producing a thrombus. *Lab. Invest.* 1958, 7 (2) pp. 110-114.

[45] Cooper S.L., Fabrizio D.J., Grasel T.G. Methods of assessment of thrombosis ex vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1987, 516 pp. 572-585.

[46] Corriveau D.M., & Fritsma G.A. Hemostasis and thrombosis in the clinical laboratory. Lippincott, Philadelphia, 1988, p.

[47] Dewanjee M.K. Methods of assessment of Thrombosis in vivo. In: Blood in contact with natural and artificial surfaces; *Annals of the New York Academy of Sciences*, (Leonard E.F., Turitto V.T., Vroman L. eds.). New York Academy of Sciences, New York, N.Y., 1987, pp. 541-71.

[48] Dewanjee M.K., Kapadvanjwala M., Sanchez A., Elson R., Serafini A.N., Zilleruelo G.E. Quantitation of comparative thrombogenicity of dog, pig, and human platelets in a hemodialyzer. *ASAIO J.* 1992, 38 (2) pp. 88-90.

[49] Didisheim P., Olsen D.B., Farrar D.J., Portner P.M., Griffith B.P., Pennington D.G. Infections and thromboembolism with implantable cardiovascular devices. *ASAIO Trans.* 1989, 35 (1) pp. 54-70.

[50] Grottemeyer K.H., Viand R., Beykirch K. [Thrombocyte function in vasomotor and migraine headaches]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1983, 108 (20) pp. 775-778.

[51] Harker L.A., Kelly A.B., Hanson S.R. Experimental arterial thrombosis in nonhuman primates. *Circulation.* 1991, 83 (6) pp. IV41-IV55.

- [52] Hoch J.R., & Silver D. Hemostasis and Thrombosis. In: Moore WS, editor. Vascular Surgery: A Comprehensive Review. 3rd ed. Philadelphia; W. B. Saunders; 1991. pp. 63-79.
- [53] Kay L. Essentials of Haemostasis and Thrombosis. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1988, p.
- [54] Lewis J., Sweeney J., Baldini L., Friedland G.H., Salzman E.W. Assessment of thrombo-resistance of intravenous cannulae by 125I-fibrinogen scanning. J. Biomed. Mater. Res. 1985, 19 (2) pp. 99-113.
- [55] Zingg W., Ip W.F., Sefton M.V., Mancer K. A chronic arteriovenous shunt for the testing of biomaterials and devices in dogs. Life Support Syst. 1986, 4 (3) pp. 221-229.
- [56] Henry J.B. Haematology and Coagulation. In: Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods. (Henry J.B. ed.). W. B. Saunders, Philadelphia, Eighteenth Edition, 1991, pp. 556-603.
- [57] Brummel-Ziedens K.E., Orfeo T., Rosendaal F.R., Undas A., Rivard G.E., Butenas S. Empirical and theoretical phenotype discrimination. J. Thromb. Haemost. 2009, 7 (1) pp. 181-186.
- [58] Brummel-Ziedens K.E., Vossen C.Y., Rosendaal F.R., Umezaki K., Mann K.G. The plasma hemostatic proteome: thrombin generation in healthy individuals. J. Thromb. Haemost. 2005, 3 pp. 1472-1481.
- [59] Boisclair M.D., Lane D.A., Wilde J.T., Ireland H., Preston F.E., Ofosu F.A. A comparative evaluation of assays for markers of activated coagulation and/or fibrinolysis: thrombin-antithrombin complex, D-dimer and fibrinogen/fibrin fragment E antigen. Br. J. Haematol. 1990, 74 (4) pp. 471-479.
- [60] Pelzer H., Schwarz A., Heimbürger N. Determination of human thrombin-antithrombin III complex in plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay. Thromb. Haemost. 1988, 59 (1) pp. 101-106.
- [61] Sommeijer D.W., Van Oerle R., Reitsma P.H., Timmerman J.J., Meijers J.C., Spronk H.M., Ten Cate H. Analysis of blood coagulation in mice: pre-analytical conditions and evaluation of a home-made assay for thrombin-antithrombin complexes. Thromb. J. 2005, 3 p. 12.
- [62] Gatt A., van Veen J.J., Woolley A.M., Kitchen S., Cooper P., Makris M. Thrombin generation assays are superior to traditional tests in assessing anticoagulation reversal in vitro. Thromb. Haemost. 2008, 100 pp. 350-355.
- [63] Hemker H.C., Giesen P., Al Dieri R., Regnault V., de Smedt E., Wagenvoort R. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. Pathophysiol. Haemost. Thromb. 2003, 33 pp. 4-15.
- [64] Hemker H.C., Giesen P., AlDieri R., Regnault V., de Smed E., Wagenvoort R. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. Pathophysiol. Haemost. Thromb. 2002, 32 pp. 249-253.
- [65] Gaffney P.J., Edgell T., Creighton-Kempsford L.J., Wheeler S., Tarelli E. Fibrin degradation product (FnDP) assays: analysis of standardization issues and target antigens in plasma. Br. J. Haematol. 1995 May, 90 (1) pp. 187-194.
- [66] Nieuwenhuizen W. A reference material for harmonisation of D-dimer assays. Fibrinogen subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Hemostasis. Thromb. Haemost. 1997, 77 pp. 1031-1033.
- [67] Spannagl M., Haverkate F., Reinauer H., Meijer P. The performance of quantitative D-

dimer assays in laboratory routine. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2005, 16 pp. 439-443.

[68] Lethagen S., & Kling S. New bleeding time devices with retractable blades evaluated in children, healthy volunteers and patients with prolonged bleeding time. *Thromb. Haemost.* 1993 Oct 18, 70 (4) pp. 595-597.

[69] Kottke-Marchant K. Performance and interpretation of routine coagulation assays. In: *Laboratory Haematology Practice*. Wiley. Blackwell, Oxford, England, May 15, 2012, pp. 420-34.

[70] 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. *Thromb. Haemost.* 1994, 72 (5) pp. 745-749.

[71] 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. *Scan. Electron Microsc.* 1984, (Pt 1) pp. 279-290.

[72] Goodman S.L., Cooper S.L., Albrecht R.M. Activation of platelets from humans, canines, and macaques on polymer surfaces. In: Nosé Y, Kjellstrand C.M., Ivanovich P., International Society for Artificial Organs. World Congress, editors. *Progress in artificial organs*, 1985. Cleveland: ISAO Press; 1985. p. xxi, 1204

[73] ICSH. Recommended method for indium-111 platelet survival studies. International Committee for Standardization in Haematology. Panel on Diagnostic Applications of Radionuclides. *J. Nucl. Med.* 1988, 29 (4) pp. 564-566.

[74] Karwath R., Schurer M., Wolf H. Measurement of platelet adhesiveness onto artificial surfaces using Cr-51 and In-111 labeled platelets. *Studia Biophysica*. 1989, 131 pp. 117-123.

[75] Kundu S.K., Heidmann E.J., So R., Garcia C., Ostgaard R.A. Characterization of an In vitro Platelet Function Analyzer, PFA-100™. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 1996, 2 (4) pp. 241-249.

[76] Kunicki T.J., Tuccelli M., Becker G.A., Aster R.H. A study of variables affecting the quality of platelets stored at "room temperature". *Transfusion*. 1975, 15 (5) pp. 414-421.

[77] Lewis S.M., Rowan R.M., Kubota F. Evaluation of a prototype for a reference platelet counter. *J. Clin. Pathol.* 1990, 43 (11) pp. 932-936.

[78] NCCIS. Methods for reticulocyte counting (Flow cytometry and supravital dyes); Approved Guideline (H44-A, Vol. 17 No. 15). Volume H44-A, Vol. 17. Clinical and Laboratory Standards Institute; 1997

[79] Palatianos G.M., Dewanjee M.K., Robinson R.P., Novak S., Dewanjee P.K., Kapadvanjwala M., Hsu L.C., Sfakianakis G.N., Kaiser G.A. Quantitation of platelet loss with indium-111 labeled platelets in a hollow-fiber membrane oxygenator and arterial filter during extracorporeal circulation in a pig model. *ASAIO Trans.* 1989, 35 (3) pp. 667-670.

[80] Wu K.K., & Hoak J.C. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet*. 1974, 2 (7886) pp. 924-926.

[81] Zingg W., Ip W.F., Sefton M.V., Mancor K. A chronic arteriovenous shunt for the testing of biomaterials and devices in dogs. *Life Support Syst.* 1986, 4 (3) pp. 221-229.

[82] Best Collaborative. Platelet radiolabelling procedure: The Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. *Transfusion*. 2006, 46 (Supplement s3) pp. 59-66.

[83] Holme S., Heaton A., Roodt J. Concurrent label method with ¹¹¹In and ⁵¹Cr allows accurate evaluation of platelet viability of stored concentrates. *Br. J. Haematol.* 1993, 84 pp. 717-723.

[84] Fushimi F., Nakayama M., Nishimura K., Hiyoshi T. Platelet adhesion, contact phase

coagulation activation, and C5a generation of polyethylene glycol acid-grafted high flux cellulosic membrane with varieties of grafting amounts. *Artif. Organs*. 1998 Oct, 22 (10) pp. 821-826.

[85] Simple method for platelet counting, Yasushi Tamada, Eduard A. Kulik, Yoshito Ikada, in *Biomaterials*, Vol 16, Issue 3, 1995, pp. 259-261.

[86] Gorbet M.B., & Sefton M.V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes, Maud B. Gorbet, Michael V. Sefton, in *Biomaterials* 25 (2004), pp. 5681-5703.

[87] Kottke-Marchant K. Clinical perspectives on platelet function testing. *Medical Laboratory Observer*, May, 44(5): 8-14 (2012).

[88] Anderson J. M., & Kottke-Marchant K. Platelet interactions with biomaterials and artificial devices. *CRC Critical Reviews in Biocompatibility*. 1985, 1 pp. 111-204.

[89] Schmidt V., & Hilberg T. ThromboFix platelet stabilizer: advances in clinical platelet analyses by flow cytometry? *Platelets*. 2006 Jun, 17 (4) pp. 266-273.

[90] Hu H., Daleskog M., Li N. Influences of fixatives on flow cytometric measurements of platelet P-selectin expression and fibrinogen binding. *Thromb. Res*. 2000 Nov 1, 100 (3) pp. 161-166.

[91] Murnithi E.W., Belcher P.R., Menys V.C., Chaudhry M.A., Raco L., Day S.P. Quantitative detection of platelet aggregates in whole blood without fixation. *Platelets*. 2000 Feb, 11 (1) pp. 33-37.

[92] Macey M., Azam U., McCarthy D., Webb L., Chapman E.S., Okrongly D. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 haematology system. *Clin. Chem*. 2002 Jun, 48 (6 Pt 1) pp. 891-899.

[93] Dimitrievska S., Maire M., Diaz-Quijada G.A., Robitaille L., Ajji A., Yahia L. Low thrombogenicity coating of nonwoven PET fiber structures for vascular grafts. *Macromol. Biosci*. 2011 Apr 8, 11 (4) pp. 493-502.

[94] De Somer F., Van Belleghem Y., Foubert L., Francis K., Dubrulle F., De Wolf D. *In vivo* evaluation of a phosphorylcholine coated cardiopulmonary bypass circuit. *J. Extra Corpor. Technol*. 1999 Jun, 31 (2) pp. 62-66.

[95] Cenni E., Granchi D., Verri E., Cavedagna D., Gamberini S., Falsone G. CD62, thromboxane B2, and beta-thromboglobulin: a comparison between different markers of platelet activation after contact with biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res*. 1997 Sep 5, 36 (3) pp. 289-294.

[96] Coldman M.F., Gent M., Good W. The identical effect of electrolyte and non-electrolyte on the osmotic fragility of mammalian erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1970, Pergamon Press, printed in Great Britain, Vol. 33, pp. 157-165.

[97] Coldman M.F., Gent M., Good W. Relationships between osmotic fragility and other species-specific variables of mammalian erythrocytes, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1970, Pergamon Press, printed in Great Britain, Vol. 34, pp. 759-772.

[98] Matsuzawa T., Ikarashi Y. Haemolysis of various mammalian erythrocytes in sodium chloride, glucose and phosphate-buffer solutions. *Lab. Anim*. 1979, 13 pp. 329-331.

[99] Coldman M.F., Gent M., Good W. The osmotic fragility of mammalian erythrocytes in hypotonic solutions of sodium chloride. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1969, Pergamon Press, printed in Great Britain, Vol. 31, pp. 605-609.

[100] AABB. Standards for blood banks and transfusion services. In: AABB Committee on

Standards, editor. Washington, DC: American Association of Blood Banks 1994. p. v

[101] Bednar R., Bayer P.M. Correction; measurements of plasma hemoglobin. Clin. Chem. 1993, 39 (9) pp. 2027-2028.

[102] COUNCIL OF EUROPE. Recommendation No. R (95) 15; Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. In: Committee of Ministers to Member States, editor. 13th ed. 13th ed. Strasbourg: Council of Europe Pub.; 2007. p. 271.

[103] Cripps C.M. Rapid method for the estimation of plasma haemoglobin levels. J. Clin. Pathol. 1968, 21 (1) pp. 110-112.

[104] EDQM. Sterile plastic containers for human blood and blood components (3.2.3). European Pharmacopoeia 5.0; European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare; 1997b. pp. 175-179.

[105] Fairbanks V.F., Ziesmer S.C., O'Brien P.C. Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. Clin. Chem. 1992, 38 (1) pp. 132-140.

[106] Harboe M. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1959, 11 (1) pp. 66-70.

[107] Henry J.B. Haematology and Coagulation. In: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. (Henry J.B. ed.). W. B. Saunders, Philadelphia, Eighteenth Edition, 1991, pp. 556-603.

[108] Lammers M., Gressner A.M. Immunonephelometric quantification of free haemoglobin. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1987, 25 (6) pp. 363-367.

[109] Lampert R.H., Williams M.C. Effect of surface materials on shear-induced haemolysis. J. Biomed. Mater. Res. 1972, 6 (6) pp. 499-532.

[110] Malinauskas R.A. Plasma hemoglobin measurement techniques for the *in vitro* evaluation of blood damage caused by medical devices. Artif. Organs. 1997, 21 (12) pp. 1255-1267.

[111] Miale J.B. Laboratory medicine, haematology. St. Louis: Mosby; 1982. [64]p. of plates; xi, 1084 pp.

[112] Mosby Year Book. A Color Atlas of Comparative, Diagnostic and Experimental Haematology. Mosby-Year Book Europe Ltd, London, England, 1994

[113] Obeng E.K., Cadwallader D.E. *In vitro* dynamic method for evaluating the hemolytic potential of intravenous solutions. J. Parenter. Sci. Technol. 1989, 43 (4) pp. 167-173.

[114] Offeman R.D., Williams M.C. Material effects in shear-induced haemolysis. Biomater. Med. Devices Artif. Organs. 1979, 7 (3) pp. 359-391.

[115] OSHA. 29 CFR Regulation Part 1910; Occupational Safety and Health Standards—1910. 1030; Bloodborne pathogens. In: National Archives and Records Administration, editor. Washington, DC: US Department of Labor; 2008

[116] Reed K.W., Yalkowsky S.H. Lysis of human red blood cells in the presence of various cosolvents. J. Parenter. Sci. Technol. 1985, 39 (2) pp. 64-69.

[117] SIGMA DIAGNOSTICS. Plasma Hemoglobin; Quantitative, colorimetric determination in plasma at 600 nm (Procedure No. 527, April 1991). Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, 1991

[118] Standefer J.C., Vanderjagt D. Use of tetramethylbenzidine in plasma hemoglobin assay. Clin. Chem. 1977, 23 (4) pp. 749-751.

[119] Taulier A., Levillain P., Lemonnier A. Value of derivative spectrophotometry for the determination of plasma and urinary hemoglobin. Comparison with the method using Allen's

correction]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 1986, 44 (3) pp. 242-248.

[120] Kottke-Marchant K. ed. *Laboratory Haematology Practice*. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, England, 2012

[121] Dudash L.A., Klingman F.L., Bastijanic J.M., Kottke-Marchant K., Marchant R.E. Cross-reactivity of cell-selective CRETAWAC peptide with human and porcine endothelial cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2014 Aug, 102 (8) pp. 2857-2863.

[122] WHO. Recommended methods for the visual determination of white cells and platelet counts. In: *Expert panel of Cytometry of the International Committee for Standardization in Haematology*, editor. WHO/LAB/88.3; World Health Organization; 1988. p. 8.

[123] Zwart A., Van Assendelft O.W., Bull B.S., England J.M., Lewis S.M., Zijlstra W.G. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition). *J Clin Pathol* 1996; 49 (4): 271-4. (PREVIOUSLY CITED AS International Committee for Standardization in Haematology)

[124] Wennberg A., Hensten-Pettersen A. Sensitivity of erythrocytes from various species to in vitro hemolysis. *J. Biomed. Mater. Res.* 1981, 15 (3) pp. 433-435.

[125] Mueller M.R., & Schima H. In vitro hematological testing of rotary blood pumps: Remarks on standardization and data interpretation. *Artif. Organs*. 1993, 17 (2) pp. 103-110.

[126] Lippi G., Blankaert N., Bonini P., Green S., Kitchen S., Palicka V. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008, 46 pp. 764-772. Available at: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2008.170>.

[127] Sharp M.K., & Mohammad S.F. Scaling of haemolysis in needles and catheters. *Ann Biochem Engineer.* 1998, 26 pp. 788-797.

[128] Savory J., & Bill J.G. Haemolysis of specimens drawn in the ER [Q&A]. *Lab. Med.* 1996, 27 p. 802.

[129] Kennedy C., Angemuller S., King R. A comparison of haemolysis rates using intravenous catheters versus venipuncture tubes for obtaining blood samples. *J. Emerg. Nurs.* 1996, 22 pp. 566-569.

[130] Chenoweth D.E. Complement activation produced by biomaterials. *ASAIO Trans.* 1986, 32 (1) pp. 226-232.

[131] Craddock P.R., Fehr J., Brigham K.L., Kronenberg R.S., Jacob H.S. Complement and leukocyte-mediated pulmonary dysfunction in hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 1977, 296 pp. 769-774.

[132] Chenoweth D.E. Complement activation during hemodialysis; clinical observations, proposed mechanisms and theoretical implications. *Artif. Organs*. 1984, 8 pp. 231-287.

[133] Hakim R.M., Breillatt J., Lazarus J.M., Port F.K. Complement activation and hypersensitivity reactions to dialysis membranes. *N. Engl. J. Med.* 1984, 311 pp. 878-882.

[134] Chenoweth D.E., Cooper S.W., Hugli T.E., Stewart R.W., Blackstone E.H., Kirlin J. W. Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N. Engl. J. Med.* 1981, 304 (9) pp. 497-503.

[135] Velthuis H., Jansen P.G., Hack C.E., Eijssman L., Wildevuur C.R. Specific complement inhibition with heparin-coated extracorporeal circuits. *Ann. Thorac. Surg.* 1996, 61 pp. 1153-1157.

[136] Fitch J.C., Rollins S., Matis L., Alford B. Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing

coronary artery bypass surgery with cardiopulmonary bypass. *Circulation*. 1999, 100 pp. 2499-2506.

[137] Hsu L.C. Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits; current status. *Perfusion*. 2001, 16 pp. 417-428.

[138] Johnson R.J. 2013 'The complement system', in Ratner B, Hoffman A, Schoen F, and Lemons J (eds), *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 3rd Ed., Oxford, UK, Elsevier Academic Press, 533-545.

[139] Johnson R.J., Burhop K.E., Van Epps D.E. Infusion of ovine C5a into sheep mimics the inflammatory response of hemodialysis. *J. Lab. Clin. Med.* 1996, 127 pp. 456-469.

[140] Neidhart P.P., Meier B., Polla B.S., Schifferli J.A., Morel D.R. Fatal anaphylactoid response to protamine after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Eur. Heart J.* 1992, 13 (6) pp. 856-858.

[141] Laroche D., Aimone-Gastin L., Dubois F. Mechanisms of severe, immediate reactions to iodinated contrast material. *Radiology*. 1998, 209 (1) pp. 183-190.

[142] Bergamaschini L., Mannucci P.M., Federici A.B., Coppola R., Guzzoni S., Agostini A. Posttransfusion anaphylactic reactions in a patient with severe von Willebrand disease: role of complement and alloantibodies to von Willebrand factor. *J. Lab. Clin. Med.* 1995, 125 (3) pp. 348-355.

[143] Bergamaschini L., Santangelo T., Faricciotti A., Ciavarella N., Mannucci P.M., Agostini A. Study of complement mediated anaphylaxis in humans. The role of IgG subclasses (IgG1 and/or IgG4) in the complement activating capacity of immune complexes. *J. Immunol.* 1996, 156 (3) pp. 1256-1261.

[144] Wolf M.F., & Anderson J.M. Practical approach to blood compatibility assessments: general considerations and standards. In: *Biocompatibility and performance of medical devices*, (Boutrand J. P. ed.). Woodhead Publishing Ltd, 2012

[145] Blajchman M.A., & Ozge Anwar A.H. The role of the complement system in hemostasis. *Prog. Hematol.* 1986, XIV pp. 149-182.

[146] Johnson R.J. Complement activation during extracorporeal therapy: biochemistry, cell biology and clinical relevance, *Nephrol. Dial. Transplant.* 1994, 9 pp. 36-45.

[147] Fiane A.E., Videm V., Lingaas P.S., Heggelund L., Nielsen E.W., Geiran O.R. Mechanism of complement activation and its role in the inflammatory response after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Circulation*. 2003 Aug 19, 108 (7) pp. 849-856.

[148] Speidl W.S., Katsaros K.M., Kastl S.P., Zorn G., Huber K., Maurer G. Coronary late lumen loss of drug eluting stents is associated with increased serum levels of the complement components C3a and C5a. *Atherosclerosis*. 2010 Jan, 208 (1) pp. 285-289.

[149] Dewanjee M.K., Kapadvanjwala M., Sanchez A., Elson R., Serafini A.N., Zilleruelo G. E., Sfakianakis G.N. Quantitation of comparative thrombogenicity of dog, pig, and human platelets in a hemodialyzer. *ASAIO J.* 1992, 38 (2) pp. 88-90.

[150] Didisheim P., Dewanjee M.K., Frisk C.S., Kaye M.P., Fass D.N. Animal Models for predicting clinical performance of biomaterials for cardiovascular use. In: Boretos J.W, Eden M., National Institutes of Health (U.S.), editors. *Contemporary biomaterials: material and host response, clinical applications, new technology, and legal aspects*. Park Ridge, N.J., U.S.A.: Noyes Publications; 1984a. pp. 132-179.

[151] Didisheim P., Stropp J.Q., Borowick J.H., Grabowski E.F. Species differences in platelet adhesion to biomaterials: Investigation by a two-stage technique. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Or-*

gans. 1979, 2 pp. 124-132.

[152] EDQM. Anticoagulant and Preservative solutions for human blood; Anticoagulant acid-citrate-glucose solutions (ACD) and Anticoagulant citrate-phosphate-glucose solution (CPD). European Pharmacopoeia 5.0; European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare; 1997a. pp. 400-403.

[153] Anticoagulant Citrate Dextrose Solution U.S.P. In: U.S.P. Ian DeVeau, editor. USP 28; (USP Citric Acid RS); Assay for total citrate. U.S. Pharmacopeia; 2006a. p 165; PF 31(3), p. 727.

[154] Anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose U.S.P. In: Larry Callahan, editor. USP 28; (USP Citric Acid RS); Assay for total citrate and total phosphate. U.S. Pharmacopeia; 2006b. p165; PF 31(3), p. 730.

[155] Anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose Adenine Solution U.S.P. In: Larry Callahan, editor. USP 28; (USP Citric Acid RS); Assay for total citrate and total phosphate. U.S. Pharmacopeia; 2006c. p 166; PF 31(3), p. 728.

[156] Anticoagulant Heparin Solution U.S.P. In: Biologics and Biotechnology-Blood and Blood Products Committee, editor. USP 11; (USP Endotoxin RS) Assay for heparin sodium; Assay for sodium chloride (RB 1-Oct—2009). U.S. Pharmacopeia; 2009

[157] Anticoagulant Sodium Citrate Solution U.S.P. In: Larry Callahan, editor. USP 28; (USP Citric Acid RS); Assay. U.S. Pharmacopeia; 2006d. p 168; PF 31(3), p. 731.

[158] Mueller M.R., Schima H., Engelhardt H., Safar A., Olson D.B., Losert U., Wolner E. In vitro hematological testing of rotary blood pumps; remarks on standardization and data interpretation. Artif. Organs. 1993, 17 (2) pp. 103-110.

[159] Harker L.A., Malpass T.W., Branson H.E., Hessel E.A 2ND, Slichter S.J. Mechanism of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonary bypass: acquired transient platelet dysfunction associated with selective alpha granule release. Blood. 1980, 56 (5) pp. 824-834.

[160] Moen O., Fosse E., Dregelid E., Brockmeier V., Andersson C., Hogasen K., Venge P., Mollnes T.E., Kierulf P. Centrifugal pump and heparin coating improves cardiopulmonary bypass biocompatibility. Ann. Thorac. Surg. 1996, 62 (4) pp. 1134-1140.

[161] Palatianos G.M., Dewanjee M.K., Robinson R.P., Novak S., Dewanjee P.K., Kapadvanjwala M., Hsu D.C., Sfakianakis G.N., Kaiser G.A. Quantitation of platelet loss with indium-111 labeled platelets in a hollow-fiber membrane oxygenator and arterial filter during extracorporeal circulation in a pig model. ASAIO Trans. 1989, 35 (3) pp. 667-670.

[162] Leach K.R., Kurian Y., Carlson J.E., Repa I., Epstein D.H., Rness M., Sahatjian R., Hunter D.W., Casteneda-Zuniga W.R., Amplatz K. Thrombogenicity of hydrophilically coated guide wires and catheters. Radiology. 1990, 175 (3) pp. 675-677.

[163] Lee K.H., Han J.K., Byun Y., Moon H.T., Yoon C.J., Kim S.J., Choi B.I. Heparin-coated angiographic catheters; an *in vivo* comparison of three coating methods with different heparin release profiles. Cardiovasc. Intervent. Radiol. 2004, 27 (5) pp. 507-511.

[164] Roberts G.M., Roberts E.E., Davies R.L., Lawrie B.W. Thrombogenicity of arterial catheters and guidewires. Br. J. Radiol. 1977, 50 (594) pp. 415-418.

[165] Cao L., Chang M., Lee C.Y., Castner D.G., Sukavaneshvar S., Ratner B.D., Horbett T. A. Plasma-deposited tetraglyme surfaces greatly reduce total blood protein adsorption, contact activation, platelet adhesion, platelet procoagulant activity, and in vitro thrombus deposition. J. Biomed. Mater. Res. A. 2007, 81 (4) pp. 827-837.

[166] Dawids S.G. Test procedures for the blood compatibility of biomaterials. Dordrecht; Boston: Kluwer Academic Publishers; 1993. xii, 684 p.

[167] EMEA. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology-Q 2 (R1), (CPMP/ICH/381/95); and Note for guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology-Q 2 B (CPMP/ICH/281/95). In: ICH Harmonised Tripartite Guideline, (Unit H.M.E. ed.). European Medicines Agency, 1995

[168] Kataoka K, Maeda M, Nishimura T, Nitadori Y, Tsuruta T, Akaike T, Sakurai Y. Estimation of cell adhesion on polymer surfaces with the use of "column-method". J. Biomed. Mater. Res. 1980, 14 (6) pp. 817-823.

[169] Levy R. J. Cardiovascular Biomaterials and Biocompatibility. In: Cardiovascular Pathology, No. 3. (Ratner B.D., & Didisheim P. eds.). Suppl, Harker, LA, Vol. 2, 1993, pp. 1S-224S.

[170] NHLBI. Guidelines for blood/material interactions. Bethesda, MD: National Heart Lung and Blood Institute; 1985 September 1985. Report nr NIH: 85-2185.

[171] Northrup S.J Hemocompatibility; Not all devices are created equal. MDDI. 1997 January, 1997 pp. 145-150.

[172] Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. Biomaterials Science, Third Edition; An Introduction to Materials in Medicine. Elsevier Academic Press; 2012. 864 p.

[173] Sefton M.V., Gemmell C.H., Gorbet M.B. What really is blood compatibility? J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2000, 11 (11) pp. 1165-1182.

[174] Sefton M.V., Sawyer A., Gorbet M., Black J.P., Cheng E., Gemmell C., Pottinger-Cooper E. Does surface chemistry affect thrombogenicity of surface modified polymers? J. Biomed. Mater. Res. 2001, 55 (4) pp. 447-459.

[175] Seyfert U.T., Biehl V., Schenk J. In vitro haemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. Biomol. Eng. 2002, 19 (2-6) pp. 91-96.

[176] Taber C.W., & Thomas C.L. Taber's Cyclopedic Medical Dictionary. In: Thomas CL, M.D., editor. Taber's Cyclopedic Medical Dictionary. 17th ed. Philadelphia; F.A. Davis Co.; 1993. p. 2600.

[177] TRIPARTITE SUBCOMMITTEE FOR MEDICAL DEVICES. Tripartite Biocompatibility Guidance for Medical Devices. In: Office of Device Evaluation (ODE) in FDA's Center for Devices and Radiological Health (CDRH), editor. General Program Memorandum #G87-1. FDA; 1986

[178] Ratner B.D. Blood compatibility-a perspective. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2000, 11 pp. 1107-1119.

[179] Hoffman A.S., Horbett T.A., Ratner B.D., Hanson S.R., Harker L.A. 1982) 'Thrombotic events on grafted polyacrylamide-silastic surfaces as studied in a baboon', in Cooper S L, Peppas N A and Hoffman A S (eds), Biomaterials: interfacial Phenomena and Applications, 6, 59-80, American Chemical Society

[180] Llanos G.R., & Sefton M.V. Immobilization of poly(ethylene glycol) onto poly(vinyl alcohol) hydrogel; evaluation of thrombogenicity. J. Biomed. Mater. Res. 1993, 27 (11) pp. 1383-1391.

[181] Kaplan S., Marcoe K.F., Sauvage L.R., Wu H.D., Mathesen S.R., Walker M.W. The effect of predetermined thrombotic potential of the recipient on small-caliber graft performance. J. Vasc. Surg. 1986, 3 (2) pp. 311-321.

[182] Akizawa T., Kino K., Kinugasa E., Koshikawa S., Ikada Y., Kishida A., Hatanaka Y., Imamura K. Clinical effects of a polyethylene glycol grafted cellulose membrane on thrombogenicity

and biocompatibility during hemodialysis. ASAIO Trans. 1990 Jul-Sep, 36 (3) pp. M640-M642.

[183] Ishihara K., Ziats N.P., Tierney B.P., Nakabayashi N., Anderson J.M. Protein adsorption from human plasma is reduced on phospholipid polymers. J. Biomed. Mater. Res. 1991, 25 pp. 1397-1407.

[184] Mulvihill J.N., Faradji A., Oberling F., Cazenave J.P. Surface passivation by human albumin of plasmapheresis circuits reduces platelet accumulation and thrombus formation. Experimental and clinical studies. J. Biomed. Mater. Res. 1990, 24 pp. 155-163.

[185] Burns G.L., Pantalos G.M., Olsen D.B. The calf as a model for thromboembolic events with the total artificial heart. ASAIO Trans. 1987, 33 (3) pp. 398-403.

[186] Rosengart T.K., Lang S.J. Valvular Heart Disease. In: Surgical Intensive Care (Barrie P. S., & Shires G.T. eds.). Little, Brown and Company, Boston, 1993, pp. 577-612..

[187] Schoen F.J., Hirsch D., Bianco R.W., Levy R.J. Onset and progression of calcification in porcine aortic bio prosthetic valves implanted as orthotopic mitral valve replacements in juvenile sheep. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1994 Nov, 108 (5) pp. 880-887.

[188] Gallegos R.P., Nockel P.J., Rivard A.L., Bianco R.W. The current state of in-vivo pre-clinical heart valve evaluation. J of Heart Valve Disease, May;14(3) 2005.

[189] Kishida A., Akatsuka Y., Yanagi M., Aikou T., Maruyama I., Akashi M. *In vivo* and *ex vivo* evaluation of the antithrombogenicity of human thrombomodulin immobilized biomaterials. ASAIO J. 1995, 41 (3) pp. M369-M374.

[190] Mahiout A., Meinhold H., Jorres A., Krieg R., Kessel M., Tretzel J., Baurmeister U. Ex vivo model for pre-clinical evaluation of dialyzers containing new membranes. Life Support Syst. 1985, 3 Suppl 1(3 Suppl 1) pp. 448-452.

[191] Spencer P.C., Schmidt B., Samtleben W., Bosch T., Gurland H.J. Ex vivo model of hemodialysis membrane biocompatibility. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs. 1985, 31 pp. 495-498.

[192] Ward R.A., Schmidt B., Blumenstein M., Gurland H.J. Evaluation of phagocytic cell function in an ex vivo model of hemodialysis. Kidney Int. 1990, 37 (2) pp. 776-782.

[193] Chandler A.B. In vitro thrombotic coagulation of the blood; a method for producing a thrombus. Lab. Invest. 1958, 7 (2) pp. 110-114.

[194] Munch K., Wolf M.F., Gruffaz P., Ottenwaelter C., Bergan M., Schroeder P., Fogt E.J. Use of simple and complex in vitro models for multiparameter characterization of human blood-material/device interactions. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2000, 11 (11) pp. 1147-1163.

[195] Yoshizaki T., Tabuchi N., Van Oeveren W., Shibamiya A., Koyama T., Sunamori M. PMEA polymer-coated PVC tubing maintains anti-thrombogenic properties during in vitro whole blood circulation. Int. J. Artif. Organs. 2005, 28 (8) pp. 834-840.

[196] Zimmermann A.K., Weber N., Aebert H., Ziemer G., Wendel H. P. Effect of biopassive and bioactive surface-coatings on the haemocompatibility of membrane oxygenators. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 2007, 80 (2) pp. 433-439.

[197] Tayama E., Ohtsubo S., Nakazawa T., Takami Y., Niimi Y., Makinouchi K., Glueck J.A., Nose Y. The simple in vitro thrombogenic test; modified methods for same priming pumps. Artif. Organs. 1997, 21 (12) pp. 1305-1308.

[198] Amrani D.L., Lee C., Earle K., DiOrio J., Murphy M., Yang J. LiVecchi A. An In vitro Bovine percardial Haemocompatibility Testing System. J. Heart Valve Dis. 1998, 7 pp. 268-272.

[199] Boswald M., Lugauer S., Bechert T., Greil J., Regenfus A., Guggenbichler J.P. Throm-

bogenicity testing of central venous catheters in vitro. *Infection*. 1999, 27 (S1) pp. S30-S33.

[200] Van Oeveren W., Tiellu I.F., De Hart J. Comparison of modified chandler, roller pump, and ball valve circulation models for in vitro testing in high flow conditions; application in thrombogenicity testing of different materials for vascular applications. *Int. J of Biomaterials* 2012; 673163, 7 pages

[201] Kolandaivelu K., Edelman E.R., Background L. Pulsatile, In Vitro Flow Circuit for Modeling Coronary Implant Thrombosis, in *Transactions of the ASME*, Vol. 124, Dec. 2002

[202] Kolandaivelu K., & Edelman E.R. Environmental influences on endovascular stent platelet reactivity: An in vitro comparison of stainless steel and gold surfaces, 2004 Wiley Periodicals, Inc. *J. Biomed. Mater. Res.* 2004, 70A pp. 186-193.

[203] Kolandaivelu K., Leiden, Benjamin B., Edelman, Elazer R. Predicting response to endovascular therapies; Dissecting the roles of local lesion complexity, systemic comorbidity, and clinical uncertainty. *J. Biomech.* 2014, 47 pp. 908-921.

[204] Stang K., Krajewski S., Neumann B., Kurz J., Post M., Stoppelkamp S. Haemocompatibility testing according to ISO 10993-4: Discrimination between pyrogen- and device-induced hemostatic activation. *Mater. Sci. Eng. C.* 2014, 42 pp. 422-428.

[205] Didisheim P., Dewanjee M.K., Kaye M.P., Frisk C.S., Fass D.N., Walner H.W., Tirrell M.V., Zollman P.E. Nonpredictability of long-term in vivo response from short-term in vitro or ex vivo blood-material interactions. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*. 1984b, 30 pp. 370-376.

[206] Anderson J.M., *Cardiovascular Device Retrieval and Evaluation*. In: *Cardiovascular Biomaterials and Biocompatibility, Cardiovascular Pathology*, No. 3, (Ratner B.D., & Didisheim P. eds.). Suppl. Harker, LA, Vol. 2, 1993, pp. 199S-208S.

[207] Schoen F.J., Appendix: Pathology analysis of the cardiovascular system and prosthetic devices. *Interventional and surgical cardiovascular pathology: clinical correlations and basic principles*. Saunders, Philadelphia, 1989, pp. 369-96.

[208] Grewe P.H., Thomas D., Muchraoui A., Barmeyer J., Muller K.M. Coronary morphologic findings after stent implantation. *Am. J. Cardiol.* 2000, 85 (5) pp. 554-558.

[209] Prado C.M., Viaro F., Baldo C.F., Augusto Vdos S., Rodrigues A.J., Eyora P.R. Glycol methacrylate-embedding medium to study morphological alterations of saphenous vein under brief and crescent pressurizations. *Acta Cir. Bras.* 2008, 23, pp. 77-82, discussion 82

[210] Rippstein P., Black M.K., Boivin M., Veinot J.P., Ma X., Chen Y.X., Human P., Zilla P., O'Brien E.R. Comparison of processing and sectioning methodologies for arteries containing metallic stents. *J. Histochem. Cytochem.* 2006, 54 (6) pp. 673-681.

[211] Singhrao S.K., Muller C.T., Gilbert S.J., Duance V.C., Archer C.W. An immunofluorescence method for postembedded tissue in the acrylic resin Technovit 9100 New using fluorescein isothiocyanate secondary detection. *Microsc. Res. Tech.* 2009, 72 (7) pp. 501-506.

[212] Zhang Q., Wang J., Wu H., Zhang L., Zhou J., Ye Q., Shao X., Guan C., Xu J., Yang Y, et al. Low temperature glycol methacrylate resin embedding method: A protocol suitable for bone marrow immunohistochemistry, PCR, and FISH analysis. *Microsc Res Tech*

[213] Mitreci cD, Cunko VF, Gajovi cS. Semi-thin sections of epoxy resin-embedded mouse embryos in morphological analysis of whole mount in situ RNA hybridization. *J. Microsc.* 2008, 232 (3) pp. 504-507.

[214] Festing MF. The design and statistical analysis of animal experiments. *ILAR J.* 2002, 43

(4).

[215] Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J.* 2002, 43 (4).

[216] Festing MF. Design and statistical methods in studies using animal models of development. *ILAR J.* 2006, 47 (1).

[217] Design and Analysis of Animal Studies in Pharmaceutical Development. Shein-Chung Chow and Jen-pei Liu, Editors, Chapman & Hall CRC Biostatistics Series, 1998

[218] Guidoin R., Douville Y., Basle M.F., King M., Marinov G.R., Traore A., Zhang Z., Guillemot F., Dionne G., Sumanasinghe R. Biocompatibility studies of the Anaconda stent-graft and observations of nitinol corrosion resistance. *J. Endovasc. Ther.* 2004, 11 (4) pp. 385-403.

[219] Guidoin R., Gosselin C., Martin L., Marois M., Laroche F., King M., Gunasekera K., Domurado D., Sigot-Luizard M.F., Blais P. Polyester prostheses as substitutes in the thoracic aorta of dogs. I. Evaluation of commercial prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.* 1983, 17 (6) pp. 1049-1077.

[220] Hoch JR, Silver D. Hemostasis and Thrombosis. In: *Vascular Surgery: A Comprehensive Review*, (Moore W.S. ed.), W. B. Saunders, Philadelphia, Third Edition, 1991, pp. 63-79.

[221] Koskas F., Brocheriou I., Cluzel P., Singland J.D., Regnier B., Bonnot M., Kieffer E. Custom made stent-grafts for aortic aneurysm repair using gianturco Z stents and woven polyester: healing in an animal model. *Vasc. Endovascular Surg.* 2005, 39 (1) pp. 55-65.

[222] Toes G.J., Van Muiswinkel K.W., Van Oeveren W., Smeijer A.J., Timens W., Stokroos I., Van Den Dungen J.J. Superhydrophobic modification fails to improve the performance of small diameter expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Biomaterials.* 2002, 23 (1) pp. 255-262.

[223] White R.A. Diagnosis and therapy of emergent vascular diseases. In: *Textbook of critical care*, (Shoemaker W.C., Society of Critical Care Medicine, ed.), Saunders, Philadelphia, Second Edition, 1989, pp. 447-452.

[224] Wilson G.J., Macgregor D.C., Bridgeman J., Weber B.A., Binnington A.G., Pinchuk L. A Corethane/polyester composite vascular prosthesis for vascular access. Comparison with expanded polytetrafluoroethylene grafts in a canine model. *ASAIO J.* 1995, 41 (3) pp. M728-M734.

[225] Yoneyama T., Ishihara K., Nakabayashi N., Ito M., Mishima Y. Short-term in vivo evaluation of small-diameter vascular prosthesis composed of segmented poly(etherurethane)/2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer blend. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 43 (1) pp. 15-20.

[226] Zilla P., Greisler H.P. Tissue engineering of vascular prosthetic grafts (Tissue Engineering Intelligence Unit). Landes Bioscience, 1999, p.

[227] Dudash L.A., Klingman F., Saret S.M., Kottke-Marchant K., Marchant R.E. Endothelial cell attachment and shear response on biomimetic polymer-coated vascular grafts. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2012 Aug, 100 (8) pp. 2204-2210.

[228] Tang C., Klingman F., Larsen C.C., Kottke-Marchant K., Marchant R.E. Platelet and endothelial adhesion on fluorosurfactant polymers designed for vascular graft modification. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2009, 88 (2) pp. 348-358.

[229] Kottke-Marchant K., Anderson J.M., Rabinovitch A., Huskey R.A., Herzig R. The effect of heparin vs. citrate on the interaction of platelets with vascular graft materials. *Thromb. Haemost.* 1985, 54 pp. 842-848.

[230] Kottke-Marchant K., Anderson J.M., Rabinovitch A. The platelet reactivity of vascular graft prostheses: An in vitro model to test the effect of preclotting. *Biomaterials.* 1986, 7 pp. 441-448.

- [231] Kottke-Marchant K., Anderson J. M., Miller K. M., Marchant R. E., Lazarus H. Vascular graft associated complement activation and leukocyte adhesion in an artificial circulation. *J. Biomed. Mater. Res.* 1987, 21 pp. 379-397.
- [232] Kottke-Marchant K., Anderson J.M., Umemura Y., Marchant R.E. The effect of albumin coating on the in vitro blood compatibility of Dacron arterial prostheses. *Biomaterials.* 1989, 10 pp. 147-155.
- [233] Grewe PH. Thomas D., Machraoui A., Barmeyer J., Muller K.M. Coronary morphologic findings after stent implantation. *Am. J. Cardiol.* 2000, 85 (5) pp. 554-558.
- [234] Rippstein P., Black MK. Boivin M., Veinot J.P., Ma X., Chen Y.X., Human P., Zilla P., O'Brien E.R. Comparison of processing and sectioning methodologies for arteries containing metallic stents. *J. Histochem. Cytochem.* 2006, 54 (6) pp. 673-681.
- [235] Schwartz R.S. Edelman E.R., Carter A., Chronos N.A., Rogers C., Robinson K.A., Waksman R., Machan L., Weinberger J., Wilensky R.L. Preclinical evaluation of drug-eluting stents for peripheral applications: recommendations from an expert consensus group. *Circulation.* 2004, 110 (16) pp. 2498-2505.
- [236] Kolandaivelu K., Leiden, Benjamin B., Edelman, Elazer R. Predicting response to endovascular therapies: Dissecting the roles of local lesion complexity, systemic comorbidity, and clinical uncertainty. *J. Biomech.* 2014, 47 pp. 908-921.
- [237] Schoen F.J. Anderson J.M., Didisheim P., Dobbins J.J., Gristina A.G., Harasaki H., Simmons R.L. Ventricular assist device (VAD) pathology analyses: guidelines for clinical studies. *J. Appl. Biomater.* 1990, 1 pp. 49-56.
- [238] Wagner W.R. Schaub R.D., Sorensen E.N., Snyder T.A., Wilhelm C.R., Winowich S., Borovetz H. S., Kormos R. L. Blood biocompatibility analysis in the setting of ventricular assist devices. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2000, 11 pp. 1239-1259.
-

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准

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—2022/ISO 10993-4:2017

*

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 4.25 字数 123 千字
2022年4月第一版 2022年4月第一次印刷

*

书号:155066·1-69153 定价 75.00 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



GB/T 16886.4-2022



码上扫一扫 正版服务到