

Evaluasi biologis alat kesehatan – Bagian 4: Pemilihan uji untuk interaksi dengan darah

(ISO 10993-4:2017, IDT)

Daftar isi

Daftar isi	i
Prakata	iii
Pendahuluan	iv
1 Ruang lingkup	1
2 Acuan normatif	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Istilah yang disingkat	5
5 Tipe alat kesehatan yang kontak dengan darah (seperti dikategorikan dalam ISO 10993-1)	6
5.1 Alat kesehatan yang kontak non-darah	6
5.2 Alat kesehatan penghubung eksternal	6
5.3 Alat kesehatan implan	7
6 Karakterisasi interaksi darah	8
6.1 Persyaratan Umum	8
6.2 Kategori uji dan interaksi darah	15
6.3 Jenis uji	17
Lampiran A (informatif) Evaluasi pra klinis alat kesehatan kardiovaskular dan prostesis	19
Lampiran B (informatif) Uji laboratorium yang direkomendasikan — Prinsip, dasar ilmiah, dan interpretasi	25
Lampiran C (informatif) Trombosis — Metode untuk pengujian in vivo	39
Lampiran D (informatif) Hematologi/hemolisis - Metode untuk pengujian - Evaluasi sifat hemolitik alat kesehatan dan material alat kesehatan	47
Lampiran E (informatif) Komplemen — Metode untuk pengujian	55
Lampiran F (informatif) Uji laboratorium yang kurang umum	59
Lampiran G (informatif) Uji yang tidak direkomendasikan	63
Bibliografi	65
Tabel 1 — Alat kesehatan atau komponen alat kesehatan yang kontak dengan sirkulasi darah dan kategori pengujian yang sesuai untuk dipertimbangkan - Alat kesehatan penghubung eksternal dan alat kesehatan implan	11
Tabel 2 — Uji umum yang digunakan untuk menilai interaksi dengan darah	16
Tabel C.1 — Skema Penilaian NAVI/AVI A	43
Tabel C.2 — Skema penilaian NAVI/AVI B	43
Tabel C.3 — Peringatan Utama dalam Menggunakan Model NAVI dan AVI ^[143]	44
Tabel C.4 — Keuntungan menggunakan model NAVI dan AVI	45
Tabel F.1 — Uji yang kurang umum digunakan untuk menilai interaksi dengan darah	59
Tabel G.1 — Pengujian yang tidak digunakan dalam penilaian praklinis keamanan	

alat kesehatan	63
Gambar 1 — Diagram alir untuk menentukan perlunya uji interaksi dengan darah	10
Gambar B.1 — Rangkaian koagulasi	30
Gambar B.2 — Jalur komplemen alternatif.....	35
Gambar C.1 — Posisi implan utama yang digunakan dalam model NAVI/AVI	42
Gambar C.2 — Posisi Implan NAVI dan AVI yang jarang digunakan	42

Prakata

SNI ISO 10993-4:2017, *Evaluasi biologis alat kesehatan — Bagian 4: Pemilihan uji untuk interaksi dengan darah*, merupakan standar yang disusun dengan jalur adopsi tingkat keselarasan identik dari ISO 10993-4:2017, *Biological evaluation of medical devices - Part 4: Selection of tests for interactions with blood*, dengan metode terjemahan satu Bahasa, yang ditetapkan oleh BSN pada tahun 2024.

Terdapat standar yang dijadikan sebagai acuan normatif dalam Standar ini telah diadopsi menjadi SNI, yaitu:

1. ISO 10993-1, *Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process* telah diadopsi dengan tingkat keselarasan identik menjadi SNI ISO 10993-1:2015, *Evaluasi biologis alat kesehatan - Bagian 1: Evaluasi dan pengujian dalam proses manajemen risiko*
2. ISO 10993-12, *Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials* telah diadopsi dengan tingkat keselarasan identik menjadi SNI ISO 10993-12:2017, *Evaluasi biologis alat kesehatan - Bagian 12: Persiapan sampel dan material acuan*

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 11-04 *In Vitro Diagnostic Test System*. Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 20 Mei 2024 di Jakarta, yang dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholder*) terkait, yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen, dan pakar.

Dalam Standar ini istilah "*This International Standard*" diganti menjadi "*This Standard*" dan diterjemahkan menjadi "Standar ini"

Apabila pengguna menemukan keraguan dalam standar ini, maka disarankan untuk melihat standar aslinya yaitu ISO 10993-4:2017 (E) dan/atau standar terkait lain yang menyertainya.

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari Standar ini dapat berupa hak kekayaan intelektual (HAKI). Namun selama proses perumusan SNI, Badan Standardisasi Nasional telah memperhatikan penyelesaian terhadap kemungkinan adanya HAKI terkait substansi SNI. Apabila setelah penetapan SNI masih terdapat permasalahan terkait HAKI, Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab mengenai bukti, validitas, dan ruang lingkup dari HAKI tersebut.

Pendahuluan

Pemilihan dan desain metode uji untuk interaksi alat kesehatan dengan darah sebaiknya mempertimbangkan desain alat kesehatan, material, manfaat klinis, lingkungan penggunaan, dan manfaat risiko. Tingkat kekhususan ini hanya dapat tercakup dalam standar vertikal.

Sumber awal pengembangan standar ini telah dipublikasikan, *Guidelines for blood/material interactions, Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute*^[14] bab 9 dan 10. Publikasi ini telah direvisi^[15].

Evaluasi biologis alat kesehatan — Bagian 4 : Pemilihan uji untuk interaksi dengan darah

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan persyaratan umum untuk evaluasi interaksi alat kesehatan dengan darah.

Standar ini menjelaskan:

- a) klasifikasi alat kesehatan yang dimaksudkan untuk penggunaan kontak dengan darah, berdasarkan maksud penggunaan dan durasi kontakannya sebagaimana ditetapkan dalam ISO 10993-1,
- b) prinsip dasar yang mengatur evaluasi interaksi alat kesehatan dengan darah,
- c) dasar pemikiran untuk pemilihan uji secara terstruktur sesuai dengan kategori tertentu, bersama dengan prinsip dan dasar ilmiah dari uji ini.

Persyaratan rinci untuk pengujian tidak dapat ditentukan karena keterbatasan pengetahuan dan presisi uji untuk mengevaluasi interaksi alat kesehatan dengan darah. Standar ini menjelaskan evaluasi biologis secara umum dan belum tentu memberikan petunjuk yang cukup untuk metode uji alat kesehatan tertentu.

Perubahan dalam standar ini tidak menunjukkan bahwa pengujian yang dilakukan menurut standar versi sebelumnya tidak valid. Untuk alat kesehatan yang dipasarkan dengan riwayat penggunaan klinis yang aman, pengujian tambahan sesuai dengan revisi ini tidak direkomendasikan.

2 Acuan normatif

Standar acuan berikut ini dirujuk ke dalam teks sedemikian rupa sehingga sebagian atau seluruh isinya merupakan persyaratan dari standar ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang disebutkan yang berlaku. Untuk acuan tidak bertanggal, edisi terakhir dari standar acuan tersebut yang berlaku (termasuk setiap amendemennya).

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

ISO 10993-12, *Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials*

3 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan standar ini, berlaku istilah dan definisi yang tercantum pada ISO 10993-1, ISO 10993-12 dan sebagai berikut.

ISO dan IEC memelihara basis data terminologis untuk digunakan dalam standardisasi pada alamat sebagai berikut:

- IEC *Electropedia*: tersedia pada <https://www.electropedia.org/>
- Platform penjelajahan daring ISO: tersedia pada <https://www.iso.org/obp>

3.1

antikoagulan

agen yang mencegah atau menunda pembekuan darah

CONTOH Heparin, *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), natrium sitrat.

3.2

interaksi darah/alat kesehatan

interaksi antara darah atau komponen darah dan alat kesehatan

3.3

koagulasi

fenomena yang dihasilkan dari aktivasi *kaskade* faktor penggumpalan (koagulasi)

Catatan 1 untuk entri: Faktor dari kaskade koagulasi dan sistem fibrinolitik dapat diukur setelah paparan ke alat kesehatan, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

3.4

sistem komplemen

bagian dari sistem kekebalan tubuh bawaan, yang terdiri lebih dari 30 protein plasma berbeda, termasuk enzim, kofaktor, dan reseptor seluler yang mungkin terlibat dalam peningkatan trombosis

Catatan 1 untuk entri: Molekul efektor yang dihasilkan dari komponen komplemen adalah komponen yang mungkin terlibat dalam fenomena inflamasi, fagositosis, dan lisis sel. Aktivasi komplemen yang terkait dengan imunotoksitas, hipersensitivitas, dan pembentukan anafilatoksin tidak tercakup dalam standar ini. (Lihat ISO/TR 10993-20.)

Catatan 2 untuk entri: Fokus standar ini adalah aktivasi komplemen karena dapat meningkatkan dan mempercepat hemolisis, aktivasi trombosit dan leukosit, serta trombosis pada permukaan material alat kesehatan. (Lihat juga Lampiran E tentang aktivasi komplemen).

3.5

kontak langsung dengan darah

istilah yang digunakan ketika alat kesehatan atau material alat kesehatan kontak secara fisik dengan darah atau konstituen darah

3.6

embolisasi

proses dimana gumpalan darah, atau benda asing, terbawa dalam aliran darah dan dapat membentuk sumbatan dan menyebabkan obstruksi hilir aliran darah

3.7

sistem uji *ex vivo*

istilah yang digunakan untuk sistem uji yang mengalirkan darah secara langsung dari subjek manusia atau hewan uji ke dalam bejana (*chamber*) uji yang terletak di luar tubuh

Catatan 1 untuk entri: Jika menggunakan hewan uji, darah dapat dialirkan langsung kembali ke hewan (resirkulasi) atau dikumpulkan dalam tabung reaksi untuk evaluasi (*single pass*). Dalam kedua kondisi tersebut, bejana uji terletak di luar tubuh.

3.8

hematologi

studi darah, termasuk kuantifikasi komponen seluler dan plasma darah

3.9**hematokrit**

rasio volume eritrosit terhadap *wholeblood* dalam sampel tertentu

3.10**hemolisis**

pembebasan hemoglobin dari eritrosit, baik melalui penghancuran atau membran sel yang rusak sebagian tetapi masih utuh

3.11***haemocompatible***

<alat atau material alat kesehatan> dapat bersentuhan dengan darah tanpa reaksi merugikan yang signifikan secara klinis seperti trombosis, hemolisis (3.10), platelet, leukosit, dan aktivasi komplemen, dan/atau terjadi efek samping lain yang berhubungan dengan darah

3.12**kontak darah tidak langsung**

sifat alat kesehatan yang kontak dengan jalur darah pasien pada satu titik dan berfungsi sebagai saluran untuk masuk ke dalam sistem vaskular

CONTOH

Alat kesehatan penghantar obat dan larutan nutrisi parenteral.

3.13**alat kesehatan komparator yang telah dipasarkan secara legal*****Legally-Marketed Comparator Device / LMCD***

alat kesehatan yang disetujui atau sudah lama disahkan dan diakui sebagai alat kesehatan yang aman dan digunakan sebagai kontrol acuan dalam evaluasi keamanan secara in vitro atau in vivo terhadap alat kesehatan uji dengan desain, material, dan penggunaan klinis yang serupa

Catatan 1 untuk entri: LMCD mungkin perlu dipasarkan secara legal di wilayah yang sama dengan pengajuan peraturan untuk alat kesehatan uji.

3.14**kontak non-darah**

sifat alat kesehatan atau material yang kontak dengan tubuh pasien di mana alat kesehatan atau material yang berpotensi terekstraksi tidak memiliki kontak secara langsung atau tidak langsung dengan darah

3.15**tekanan osmotik koloid**

pengaruh total protein atau bahan bermassa molekul besar lainnya terhadap aktivitas osmotik plasma

3.16**platelet**

badan sel tanpa inti (*anuclear*), yang terdapat dalam darah dan berkontribusi pada proses trombosis dengan cara menempel pada permukaan, melepaskan faktor, dan/atau beragregasi untuk membentuk sumbat hemostatik

3.17**platelet yang melekat (*platelet adherent*)**

<material atau alat kesehatan> yang memiliki kecenderungan untuk memungkinkan atau

mendorong platelet (3.16) untuk menempel pada permukaannya

Catatan 1 untuk entri: Hal ini sering ditandai relatif terhadap kontrol negatif, kontrol positif, dan/atau LMCD pada kontak darah karena sifat permukaannya.

Catatan 2 untuk entri: Platelet yang melekat tidak selalu berarti platelet yang teraktivasi, yaitu platelet pada suatu permukaan dapat teraktivasi atau tidak.

3.18

menghasilkan trombin

<material atau alat kesehatan> karena sifat permukaannya, memiliki kecenderungan untuk meningkatkan atau menunjukkan peningkatan pembentukan trombin

Catatan 1 untuk entri: Hal ini sering ditandai relatif terhadap kontrol negatif, kontrol positif, dan/atau LMCD pada kontak darah.

3.19

trombogenik

<material atau alat kesehatan> karena sifat permukaannya, memiliki kecenderungan untuk membentuk atau mendorong pembentukan trombus

Catatan 1 untuk entri: Hal ini sering ditandai relatif terhadap kontrol negatif, kontrol positif, dan/atau LMCD pada kontak darah.

3.20

thromboembolization

proses pelepasan trombus (3.21) yang terbawa ke hilir aliran darah, dan selanjutnya dapat menyebabkan penyumbatan vaskular atau oklusi

3.21

trombus

campuran sel darah merah, platelet (3.16) teragregasi, fibrin dan elemen seluler lainnya yang terkoagulasi

3.22

trombosis

pembentukan trombus (3.21) pada kondisi simulasi *in vivo*, *ex vivo*, atau *in vitro*, yang disebabkan oleh aktivasi sistem koagulasi dan platelet (3.16) dalam *wholeblood* yang mengalir

Catatan 1 untuk entri: Trombosis juga dapat terjadi pada bagian pembuluh darah atau alat kesehatan yang mengalami stasis.

3.23

wholeblood

darah tak terfraksinasi yang diambil dari donor manusia atau hewan uji

Catatan 1 untuk entri: Darah dapat bersifat non-antikoagulasi atau antikoagulasi, misalnya mengandung natrium sitrat atau heparin sebagai antikoagulan.

4 Istilah yang disingkat

Bb	fragmen aktif secara enzimatis dari Faktor B yang dihasilkan oleh pembelahan (oleh Faktor D) dalam aktivasi jalur alternatif
β -TG	<i>beta-thromboglobulin</i>
C4d	produk degradasi C4 dengan aktivasi komplemen jalur klasik
C3a, C5a	produk pemisahan komplemen dari C3 dan C5
CH-50	jumlah komplemen yang dibutuhkan untuk melisiskan 50% suspensi RBC
D-Dimer	produk degradasi fibrin spesifik (fibrin <i>cross-linked</i> F XIII) yang terdiri dari dimer fragmen-D
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FDP	produk degradasi fibrin/fibrinogen (<i>fibrin/fibrinogen degradation products</i>)
FPA	<i>fibrinopeptide A</i>
F1.2	fragmen non-katalitik yang terpisah dari protrombin dikonversi menjadi trombin (juga disebut sebagai F1+2)
iC3b	bentuk tidak aktif dari C3b, sub-fragmen C3
IFU	<i>instruction for use</i>
IVC	<i>inferior vena cava</i>
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i>
PET	<i>positron emission tomography</i>
PF-4	<i>platelet factor 4</i>
PRP	<i>platelet-rich plasma</i>
PT	<i>prothrombin time</i>
PTT	<i>partial thromboplastin time</i>
SC5b-9	<i>product of terminal pathway complement activation</i>
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
TAT	<i>thrombin-antithrombin complexes</i>

TCC	<i>terminal complement complex</i> ; disebut juga <i>membrane attack complex (MAC)</i> ; diperkirakan dengan mengukur SC5b-9
TT	<i>thrombin time</i>
TxB2	<i>thromboxane B2</i>

5 Tipe alat kesehatan yang kontak dengan darah (seperti dikategorikan dalam ISO 10993-1)

5.1 Alat kesehatan yang kontak non-darah

Alat kesehatan yang kontak non-darah adalah alat kesehatan yang tidak kontak secara langsung atau tidak langsung dengan darah atau konstituen darah yang berada di dalam tubuh atau yang dikembalikan ke tubuh. Alat kesehatan diagnostik in vitro dan tabung penampung darah adalah contoh alat kesehatan kontak non-darah. Beberapa alat kesehatan, seperti sistem pengantar untuk implan, mungkin mengandung komponen yang kontak dengan darah dan non-darah.

5.2 Alat kesehatan penghubung eksternal

5.2.1 Umum

Di bawah ini adalah alat kesehatan yang kontak dengan sirkulasi darah dan berfungsi sebagai saluran ke dalam sistem vaskular. Beberapa alat kesehatan mungkin memiliki komponen atau bagian dengan jenis kontak yang berbeda (langsung dan tidak langsung). Contohnya termasuk tetapi tidak terbatas pada yang berikut ini.

5.2.2 Alat kesehatan penghubung eksternal yang berfungsi sebagai jalur darah tidak langsung

- alat pengumpul darah;
- kanula;
- *cell savers*;
- alat untuk penyimpanan dan penghantaran darah dan produk darah (misalnya tabung dan kantong);
- set ekstensi (*extension sets*);
- kateter intravaskular.

5.2.3 Alat kesehatan penghubung eksternal yang kontak secara langsung dengan sirkulasi darah

- alat kesehatan *atherectomy*;
- alat monitoring darah dengan kontak darah langsung atau tidak langsung;
- sirkuit *bypass* kardiopulmoner;

- alat untuk adsorpsi zat tertentu dari darah;
- peralatan apheresis terapeutik dan donor;
- oksigenator membran ekstrakorporeal;
- alat hemodialisis/*hemofiltrasi*;
- alat intervensi kardiologi dan vaskular;
- kateter intravaskular (*balloon, imaging, laser, ultrasound*);
- filter penghilangan leukosit;
- alat pendukung peredaran darah perkutan;
- kateter perfusi koroner *retrograde*;
- *vascular guide wires*.

5.3 Alat kesehatan implan

Alat kesehatan implan ditempatkan sebagian besar atau seluruhnya dalam sistem vaskular. Contohnya termasuk tetapi tidak terbatas pada:

- *annuloplasty rings*;
- *arteriovenous shunts*;
- monitor darah (*implantable*);
- alat pendukung peredaran darah (*ventricular-assist devices, artificial hearts, pompa balon intra aorta*);
- alat embolisasi;
- cangkok vaskular sintetik endovaskular;
- *implantable defibrillator and cardioverter leads*;
- filter vena cava inferior;
- kateter penghantaran obat internal;
- *oksigenator intravaskular (paru-paru buatan)*;
- *tissue heart valves* atau mekanis;
- *pacemaker leads*;
- cangkok vaskular jaringan atau vaskular sintetik;
- *stent* vaskular.

6 Karakterisasi interaksi darah

6.1 Persyaratan Umum

PENTING — Karena standar ini adalah standar internasional horizontal, alasan yang tepat dapat diberikan untuk menjustifikasi pilihan kategori uji berdasarkan alat kesehatan yang dikarakterisasi. Misalnya, pengujian *in vivo* untuk bukti trombosis merupakan metode yang sering lebih disukai untuk karakterisasi alat kesehatan pada kategori trombosis. Namun, dalam beberapa kasus, alasan tertulis yang mencakup kombinasi uji dari kategori koagulasi, platelet, hematologi, dan komplemen dapat digunakan sebagai pengganti pengujian trombosis.

6.1.1 Gambar 1 menggambarkan diagram alir yang dapat digunakan untuk menentukan perlunya pengujian untuk interaksi dengan darah. Interaksi dengan darah dapat dibagi menjadi beberapa kategori berdasarkan proses atau sistem utama yang diukur. Tabel 1 mencantumkan daftar contoh alat kesehatan yang kontak dengan sirkulasi darah dan kategori pengujian yang sesuai untuk tiap alat kesehatan. Daftar ini tidak mencakup semua alat kesehatan dan penilaian yang tepat harus diterapkan pada alat kesehatan yang tidak tercantum pada tabel.

Alat kesehatan yang memiliki standar internasional khusus (standar vertikal), persyaratan evaluasi biologis dan metode uji yang ditetapkan dalam standar vertikal tersebut harus diutamakan dari persyaratan umum yang disarankan pada standar ini.

6.1.2 Jika memungkinkan, uji harus menggunakan model atau sistem yang tepat yang menyimulasikan geometri dan kondisi kontak alat kesehatan dengan darah selama aplikasi klinis. Simulasi sebaiknya mencakup durasi kontak, suhu, kondisi steril, antikoagulan (dan level; lihat 6.1.12), dan kondisi aliran yang sesuai. Misalnya, untuk alat kesehatan dengan geometri tertentu seperti *stent* vaskular, luas permukaan yang digunakan dalam pengujian, dalam cm^2 , harus dipertimbangkan secara relatif terhadap volume cairan sistem uji *in vitro*. Untuk alat kesehatan dengan geometri yang tidak ditetapkan atau rumit (seperti dispersi partikel PVA yang digunakan sebagai agen embolisasi), massa sebaiknya digunakan sebagai pengganti luas permukaan untuk menentukan jumlah sampel yang digunakan dalam sistem uji.

Hanya bagian yang kontak dengan darah secara langsung atau tidak langsung yang sebaiknya diuji. Metode dan parameter uji yang dipilih sebaiknya sesuai dengan teknologi saat ini.

Jenis dan level antikoagulan yang tepat mungkin spesifik untuk setiap kasus, tergantung indikasi penggunaan alat kesehatan dan jenis uji yang dilakukan. Cantumkan informasi jenis dan level antikoagulan spesifik yang digunakan dan berikan diskusi terkait kemampuan untuk membedakan respons positif dan negatif. Untuk informasi lebih lanjut, lihat 6.1.6 dan C.2 untuk penelitian pada hewan, 6.1.12 untuk uji *in vivo* dan *ex vivo*, 6.3.1 untuk uji *in vitro*, dan A.3 untuk kateter dan *guide wires*.

Karena banyak uji untuk *hemokompatibilitas* yang diakui sangat bergantung pada kontak permukaan, uji semacam itu (misalnya aktivasi komplemen) tidak akan berlaku untuk aplikasi kontak tidak langsung.

6.1.3 Kontrol (positif dan negatif) harus digunakan kecuali pengabaian dapat dijustifikasi. Jika memungkinkan, pengujian sebaiknya mencakup alat kesehatan dengan predikat relevan yang sudah digunakan secara klinis (yaitu LMCD) atau material yang telah dikarakterisasi dengan baik^[6].

Kontrol sebaiknya mencakup material acuan negatif dan positif. Semua material dan LMCD yang diuji harus memenuhi semua spesifikasi kontrol kualitas (*quality control*) dan jaminan kualitas (*quality assurance*) dari produsen dan laboratorium uji. Sumber, produsen, kelas, dan tipe semua material dan alat kesehatan yang diuji harus diidentifikasi.

6.1.4 Pengujian material yang ditentukan untuk komponen alat kesehatan dapat dilakukan untuk tujuan skrining. Namun, uji awal tersebut tidak dapat menggantikan persyaratan alat kesehatan atau komponen alat kesehatan yang telah disterilkan secara lengkap sebaiknya diuji pada kondisi yang menyimulasikan atau memperluas aplikasi klinis.

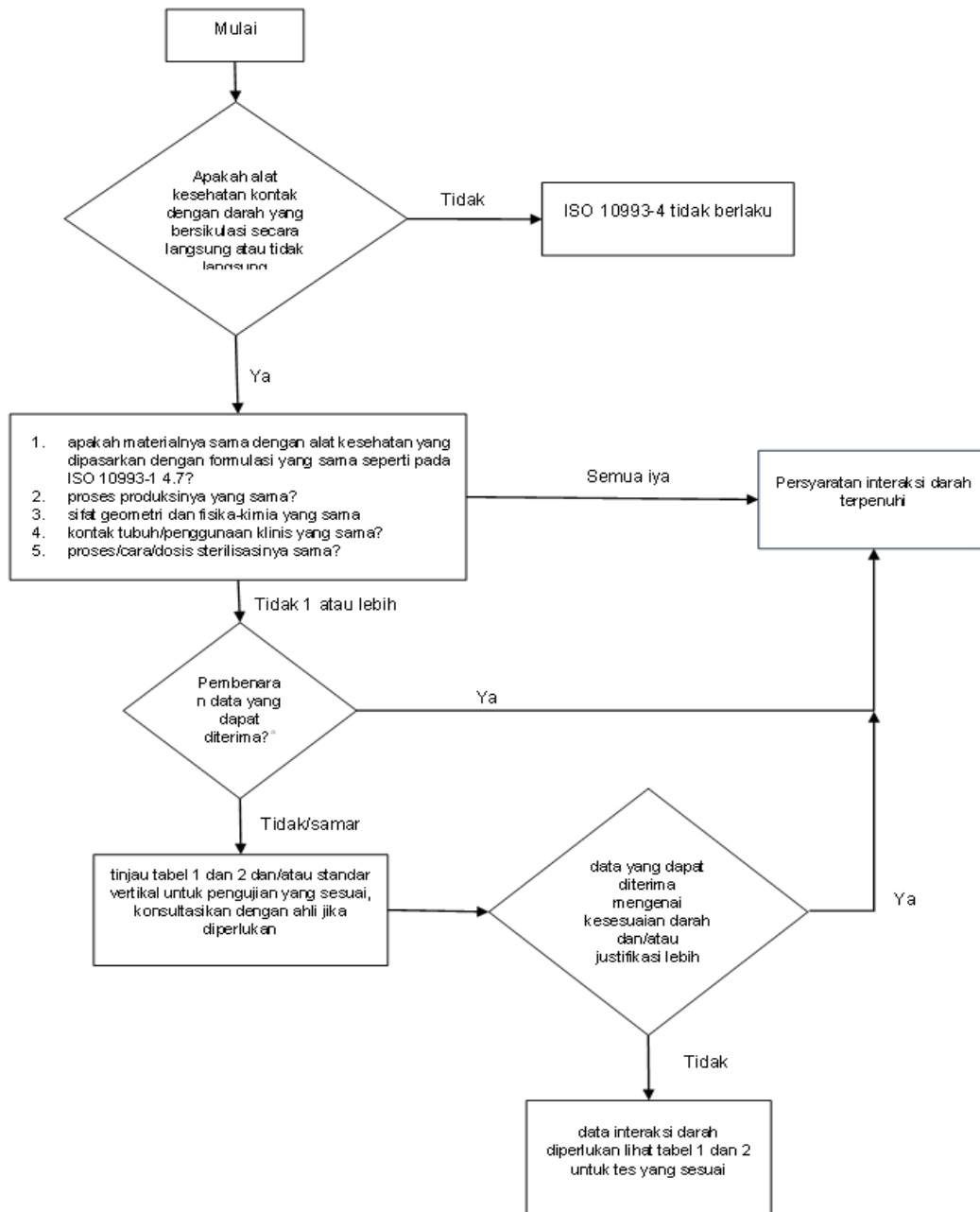
CATATAN 1 Perubahan dalam proses produksi (termasuk penggunaan alat bantu produksi) yang dapat memengaruhi sifat permukaan, atau bahan kimia alat kesehatan yang disterilkan secara lengkap, juga dapat memengaruhi *hemokompatibilitas*.

CATATAN 2 Apabila penuaan dapat memengaruhi sifat alat kesehatan akhir, penggunaan sampel yang sudah lama juga diperlukan. (Misalnya, sifat pelapis yang aktif secara biologis seperti heparin dapat berubah seiring waktu).

6.1.5 Pengujian yang tidak menyimulasikan kondisi alat kesehatan selama digunakan, tidak dapat memprediksi sifat interaksi darah/alat kesehatan yang dapat terjadi selama aplikasi klinis secara akurat. Selain itu, kapasitas uji *in vitro* atau *ex vivo* jangka pendek untuk memprediksi kinerja dalam aplikasi klinis yang sebenarnya dianggap lebih tinggi ketika aplikasi klinis melibatkan paparan terbatas daripada paparan yang lama atau permanen.

CATATAN Pengujian yang disederhanakan terhadap kandidat material alat kesehatan (misalnya modifikasi kimiawi geometris dan fungsional permukaan) dapat berfungsi sebagai langkah penting dalam identifikasi, pengoptimalan, dan pemilihan material alat kesehatan.

6.1.6 Jika penelitian pada hewan akan dilakukan, alat kesehatan yang dimaksudkan untuk digunakan secara *ex vivo* (penghubung eksternal) sebaiknya diuji secara *ex vivo* dan alat kesehatan yang dimaksudkan untuk digunakan secara *in vivo* (implan) sebaiknya diuji secara *in vivo* pada hewan uji dengan simulasi semirip mungkin dengan kondisi penggunaan klinis. Protokol dalam penyelidikan semacam itu sebaiknya menyebutkan secara khusus setiap kategori pengujian (lihat 6.2.1) yang sedang dievaluasi dan menjelaskan metode penilaian yang spesifik.



^a Untuk alat kesehatan yang kontak langsung dan tidak langsung, kebutuhan pengujian *hemokompatibilitas* sebaiknya dipertimbangkan berdasarkan analisis risiko yang sesuai, termasuk pengujian *hemokompatibilitas* sebelumnya, data klinis, data *extractable/leachable*, dan/atau informasi karakteristik permukaan. Misalnya, untuk alat kesehatan dengan kontak langsung, pengujian yang dapat *extractable/leachable* mungkin tidak cukup jika morfologi permukaan diubah, meskipun bahan kimia yang dapat *extractable/leachable* sama (lihat ISO 10993-1).

Gambar 1 — Diagram alir untuk menentukan perlunya uji interaksi dengan darah

Tabel 1 — Alat kesehatan atau komponen alat kesehatan yang kontak dengan sirkulasi darah dan kategori pengujian yang sesuai untuk dipertimbangkan - Alat kesehatan penghubung eksternal dan alat kesehatan implan

Contoh alat kesehatan	Kategori uji						
	Hemolisis		Trombosis				
	Diinduksi oleh material	Diinduksi secara mekanis	in vitro			Hematologi	In vivo/ Ex vivo ^a
Koagulasi			Aktivasi platelet	Komplemen ^d			
Alat kesehatan penghubung eksternal							
Monitor darah (sementara/ex vivo) ^b	X		X	X		X	
Peralatan penyimpanan dan penghantaran darah (misalnya set infus/transfusi), alat pengumpul darah, set ekstensi	X		X	X		X	
Kateter yang dipasang kurang dari 24 jam (misalnya perangkat <i>atherectomy</i> , <i>ultrasound intravascular catheters</i> , <i>antegrade/retrograde coronary perfusion catheters</i> , <i>guide wires</i>); <i>kanula</i>	X		X ^c	X ^c		X ^c	X ^c
Kateter terpasang selama lebih dari 24 jam (misalnya kateter nutrisi parenteral, kateter vena sentral); <i>kanula</i>	X		X ^c	X ^c		X ^c	X ^c
<i>Cell savers</i> ^b	X		X	X			
<i>Alat untuk adsorpsi bahan spesifik dari darah</i> ^b	X	X	X	X	X		
Sistem pemisahan sel dan perlengkapan aphaeresis terapatik dan donor ^b	X	X	X	X	X		
Sistem <i>bypass kardiopulmonal</i> ^b	X	X	X ^c	X ^c	X	X ^c	X ^c

Tabel 1 — (lanjutan)

Contoh alat kesehatan	Kategori uji						
	Hemolisis		Trombosis				
			in vitro				In vivo/ Ex vivo ^a
	Diinduksi oleh material	Diinduksi secara mekanis	Koagulasi	Aktivasi platelet	Komplemen ^d	Hematologi	
Alat hemodialisis/ <i>hemofiltrasi</i> ^b	X	X	X ^c	X ^c	X	X ^c	X ^c
Filter penghilangan leukosit ^b	X		X ^c	X ^c	X	X ^c	X ^c
Alat pendukung sirkulasi percutan ^b	X	X	X ^c	X ^c	X	X ^c	X ^c
Alat kesehatan implan							
<i>Annuloplasty rings, mechanical heart valves</i>	X	X					X
Alat embolisasi	X						X
Cangkok Endovascular	X						X
<i>Implantable defibrillator and cardioverter leads</i>	X						X
Pompa balon intra aorta ^b	X	X					X
<i>Pacemaker leads</i>	X						X
<i>Patch dan cangkok vaskular prostetik (sintetik), termasuk arteriovenous shunts</i>	X						X
<i>Stent (vaskular)</i>	X						X
<i>tissue heart valves, cangkok dan patch jantung, dan AV shunts</i>	X						X

Tabel 1 — (lanjutan)

Contoh alat kesehatan	Kategori uji						
	Hemolisis		Trombosis				
			in vitro				In vivo/ Ex vivo ^a
	Diinduksi oleh material	Diinduksi secara mekanis	Koagulasi	Aktivasi platelet	Komplemen ^d	Hematologi	
<i>Total artificial hearts</i>	X	X					X
<i>Vena cava filter</i>	X						X
<i>Ventricular-assist devices</i> ^b	X	X					X

^a Trombosis adalah fenomena in vivo atau ex vivo, tetapi dapat disimulasikan dengan kondisi in vitro. Pengujian in vivo atau ex vivo mungkin tidak diperlukan jika pengujian trombosis *in vitro* yang relevan secara klinis dilakukan.

^b Hanya komponen yang kontak dengan darah secara langsung atau tidak langsung. Untuk komponen yang hanya kontak dengan darah secara tidak langsung, trombogenesis *in vivo* dan hemolisis mekanis atau aktivasi komplemen mungkin tidak diperlukan.

^c Telah diketahui bahwa respons koagulasi, platelet, dan leukosit terutama terlibat dalam proses trombosis. Oleh karena itu, tergantung pada produsen untuk memutuskan pengujian spesifik pada kategori uji koagulasi, platelet, dan hematologi yang sesuai sebagai alternatif pengujian in vivo.

^d Lihat juga ISO/TS 10993-20 untuk informasi terkait kapan aktivasi komplemen sebaiknya dipertimbangkan untuk titik akhir lain seperti anafilaksis.

6.1.7 Uji *in vitro* dianggap bermanfaat dalam skrining alat kesehatan atau implan penghubung eksternal dan potensi interaksi awal antara alat kesehatan/material dengan darah, tetapi mungkin bukan prediktor yang akurat untuk interaksi darah/alat kesehatan yang terjadi pada paparan dalam waktu lama atau berulang atau kontak permanen (lihat 6.3.1).

CATATAN Untuk alat kesehatan baru atau alat kesehatan yang mengalami perubahan geometri, pengujian pada aliran fisiologis mungkin diperlukan. Untuk kateter jangka panjang atau implan permanen, sistem pengujian *in vitro* mungkin tidak memadai karena masalah stabilitas darah.

6.1.8 Alat kesehatan atau komponen alat kesehatan yang kontak dengan sangat singkat/sementara dengan sirkulasi darah (misalnya lanset, jarum hipodermik, tabung kapiler yang digunakan kurang dari 1 menit) umumnya tidak memerlukan pengujian interaksi darah/alat kesehatan.

CATATAN 1 Untuk produk yang dibuat dengan material seperti pelapis yang dapat terkena darah setelah alat kesehatan dilepas, pengujian interaksi darah/alat kesehatan mungkin dibutuhkan.

CATATAN 2 Jika beberapa komponen alat kesehatan (misalnya, badan alat suntik) yang kontak dengan cairan yang pada akhirnya akan disuntikkan ke pasien, dan waktu penyimpanan tidak ditentukan atau lebih dari 1 menit, pengujian hemolisis komponen yang kontak dengan cairan diperlukan, meskipun alat kesehatan itu sendiri kontak dengan sirkulasi darah kurang dari 1 menit.

6.1.9 Peralatan laboratorium sekali pakai yang digunakan untuk pengambilan darah dan kinerja uji *in vitro* pada darah harus dievaluasi untuk memastikan bahwa tidak ada gangguan yang signifikan terhadap uji yang sedang dilakukan.

6.1.10 Jika pengujian dipilih dengan cara yang dijelaskan dan pengujian dilakukan pada kondisi yang menyimulasikan penerapan klinis, hasil pengujian tersebut memiliki probabilitas terbesar untuk memprediksi kinerja klinis alat kesehatan. Untuk alat kesehatan yang beroperasi dalam berbagai kondisi, kondisi ekstrim dan kondisi rata-rata sebaiknya dipertimbangkan. Namun, perbedaan spesies dan faktor lainnya dapat membatasi prediktabilitas pengujian apa pun.

6.1.11 Karena perbedaan spesies dalam reaktivitas darah, darah manusia sebaiknya digunakan jika memungkinkan (dengan pengecualian metode pengujian yang telah ditetapkan dengan darah hewan, seperti beberapa uji hemolisis). Jika hewan uji diperlukan, misalnya untuk evaluasi alat kesehatan yang digunakan untuk pemaparan dalam waktu lama atau berulang atau kontak permanen, perbedaan spesies dalam reaktivitas darah harus dipertimbangkan.

Nilai darah dan reaktivitas pada manusia dan primata non-manusia sangat mirip^[204]. Penggunaan hewan, seperti kelinci, babi, anak sapi, domba atau anjing, juga dapat diterima untuk jenis uji tertentu. Namun, karena perbedaan spesies mungkin signifikan (misalnya, adhesi platelet^{[148][150]}, trombosis^[44] dan hemolisis^[47] cenderung lebih mudah terjadi pada anjing daripada manusia), semua hasil hewan uji harus diinterpretasikan dengan hati-hati. Spesies yang dipilih dan jumlah hewan yang digunakan harus dapat dipertanggungjawabkan (lihat juga ISO 10993-2).

CATATAN Penggunaan primata non-manusia untuk kompatibilitas darah *in vivo* dan pengujian alat kesehatan dilarang oleh hukum Uni Eropa (86/609/EEC) dan beberapa hukum nasional.

6.1.12 Penggunaan antikoagulan pada pengujian *in vivo* dan *ex vivo* sebaiknya dihindari kecuali jika alat kesehatan dirancang untuk bekerja dengan adanya antikoagulan. Jenis dan konsentrasi antikoagulan yang digunakan untuk memengaruhi interaksi darah/alat kesehatan dan pemilihannya harus dijustifikasi. Alat kesehatan yang digunakan dengan antikoagulan

sebaiknya dinilai dengan menggunakan antikoagulan dalam rentang konsentrasi yang digunakan secara klinis dan/atau dijelaskan dalam IFU (*instruction for use*) produk atau literatur lain yang sesuai. Perbedaan spesies juga sebaiknya dipertimbangkan saat menentukan level antikoagulasi yang sesuai.

6.1.13 Modifikasi pada alat kesehatan yang diterima secara klinis harus dipertimbangkan pengaruhnya terhadap interaksi darah/alat kesehatan dan fungsi klinis. Contoh modifikasi tersebut meliputi perubahan desain, geometri, perubahan permukaan atau komposisi kimiawi dan perubahan tekstur, porositas, atau sifat lainnya. Model alur in vitro dengan kondisi paparan aplikasi yang konsisten dan pengukuran yang relevan dapat digunakan untuk mengevaluasi efek modifikasi pada alat kesehatan yang diterima secara klinis.

6.1.14 Sejumlah replikasi pengujian yang memadai termasuk kontrol yang sesuai sebaiknya dilakukan untuk memungkinkan evaluasi data secara statistik. Variabilitas dalam beberapa metode uji mengharuskan pengujian tersebut diulang dalam jumlah yang cukup untuk menentukan signifikansi. Selain itu, penelitian berulang selama periode kontak darah/alat kesehatan yang lama memberikan informasi tentang ketergantungan waktu interaksi darah-alat kesehatan^{[213]-[216]}. Keseimbangan sebaiknya dipertimbangkan antara evaluasi statistik dan kesejahteraan hewan ketika menerapkan pengujian in vivo; lihat ISO 10993-2.

6.1.15 Rekomendasi dalam 6.1 bersama dengan Gambar 1 dan Tabel 1 berfungsi sebagai panduan untuk pemilihan uji yang tercantum dalam Tabel 2. Panduan lebih lanjut tentang evaluasi pra-klinis tercantum pada Lampiran A sampai dengan Lampiran G. Secara ringkas, prosedur berikut harus dilakukan

- a) tentukan kategori interaksi darah potensial (lihat 6.2) yang sesuai untuk dipertimbangkan guna menetapkan keamanan alat kesehatan tertentu (lihat contoh pada Tabel 1);
- b) mengevaluasi informasi yang ada pada setiap kategori uji untuk alat kesehatan;
- c) Jika ada informasi keamanan yang memadai, siapkan alasan yang tepat untuk mendukung kesimpulan ini dan bahwa pengujian lebih lanjut tidak diperlukan;

CATATAN Perbedaan dalam formulasi, geometri, sifat permukaan, metode fabrikasi, teknik sterilisasi, dan/atau penggunaan klinis dapat membatasi penggunaan informasi keselamatan pada produk serupa.

- d) Jika informasi yang tersedia tidak mencukupi dalam suatu kategori uji, pilih uji yang sesuai, berdasarkan contoh pada Tabel 1 dan 2, untuk memberikan informasi keselamatan tambahan.

6.2 Kategori uji dan interaksi darah

6.2.1 Uji yang direkomendasikan untuk interaksi alat kesehatan dengan darah

Uji yang direkomendasikan disusun berdasarkan tipe alat kesehatan (lihat contoh pada Tabel 1). Uji dibagi ke dalam kategori berikut berdasarkan proses atau sistem utama yang diukur:

- hemolisis
 - diinduksi oleh material
 - diinduksi secara mekanis
- trombosis
 - in vitro
 - koagulasi

- aktivasi platelet
- komplemen
- hematologi
- in vivo/ex vivo

Prinsip dan dasar ilmiah untuk pengujian ini tercantum dalam Lampiran A sampai dengan Lampiran E.

Tabel 2 — Uji umum yang digunakan untuk menilai interaksi dengan darah

Uji berdasarkan kategori	
Hemolisis	Diinduksi oleh material (misalnya ASTM ^[17] , NIH ^[28] , MHLW ^[22])
	Diinduksi secara mekanis
Trombosis (<i>in vivo</i> , <i>ex vivo</i>)	<i>Gross analysis</i> ^a , persentase oklusi, mikroskop cahaya, SEM
Trombosis in vitro	
Koagulasi	Uji trombin (misalnya TAT, F1.2), uji fibrin (misalnya FPA), uji PTT
Aktivasi platelet	Jumlah platelet (% kehilangan) dan beberapa indikator aktivasi (misalnya produk pelepasan atau penanda permukaan platelet seperti β TG, PF4, TxB2) atau SEM (morfologi platelet)
Hematologi	Hitung darah lengkap (CBC/ <i>complete blood count</i>), aktivasi leukosit
Sistem komplemen	SC5b-9 (C3a opsional)
<p>^a Termasuk dalam semua hewan uji (lihat B.2.1 dan ISO 10993-6).</p> <p>Tidak semua uji diperlukan untuk tiap kategori dan pengujian pada tiap kategori mungkin tidak ekuivalen.</p>	

6.2.2 Alat kesehatan yang tidak berkontak

Alat kesehatan ini tidak memerlukan pengujian interaksi darah/alat kesehatan.

6.2.3 Alat kesehatan penghubung eksternal dan implan

Setelah menggunakan Tabel 1 untuk menyelaraskan alat kesehatan baru yang sedang diselidiki dengan alat kesehatan serupa yang sudah ada dan mencatat kategori uji untuk dipertimbangkan, gunakan Tabel 2, Lampiran A dan E untuk memandu pemilihan uji yang sesuai untuk menilai interaksi darah.

6.2.4 Keterbatasan

Parameter desain pengujian dan studi dapat memberikan batasan/pertimbangan praktis tertentu berdasarkan ilmu pengetahuan, teknologi, dan penerapan tertentu. Sebagai contoh:

- a) alat kesehatan/material di lingkungan aliran darah tinggi (arteri) dapat berinteraksi dengan darah secara berbeda di lingkungan aliran darah rendah (vena);
- b) Interaksi darah dapat terjadi dengan semua material, yaitu material uji/alat uji dan material non-uji (misalnya sistem uji). Perhatian harus diberikan untuk tidak mengacaukan interaksi darah yang terkait dengan material uji dengan interaksi yang dikontribusikan oleh faktor lain;
- c) Studi yang hanya mengandalkan satu jenis uji untuk interaksi darah mungkin kurang dapat memprediksi respons yang sebenarnya daripada studi yang mencakup beberapa tes berbeda untuk interaksi darah;
- d) *immunoassay* untuk mendeteksi indikator protein *hemokompatibilitas*, misalnya TAT, C3a, dll., sering kali tersedia untuk pengujian darah manusia, tetapi umumnya tidak tersedia untuk digunakan atau berfungsi dengan darah dari spesies lain.

6.3 Jenis uji

6.3.1 Uji in vitro

Model pengujian in vitro sebaiknya mempertimbangkan desain untuk menyimulasikan kondisi penggunaan klinis terburuk yang diantisipasi dari setiap penggunaan alat kesehatan. Variabel yang harus dipertimbangkan ketika menggunakan metode pengujian in vitro termasuk hematokrit, antikoagulan (jenis dan jumlah), persiapan sampel uji, usia sampel uji, usia darah/komponen darah, penyimpanan sampel uji, aerasi dan pH, suhu, pengacakan yang tepat, luas permukaan sampel uji terhadap rasio volume darah dan untuk studi dinamis, kondisi aliran fluida, terutama laju aliran, laju geser dinding, dan tekanan. Pengujian harus dimulai dengan penundaan minimal, biasanya dalam waktu 4 jam setelah pengambilan darah, karena beberapa sifat darah berubah dengan cepat setelah pengambilan. Alternatif yang terakhir mungkin dapat dilakukan jika divalidasi. Dalam beberapa kasus, sampel yang dihasilkan juga dapat dibekukan dengan menggunakan teknik yang sesuai untuk analisis di masa mendatang jika proses pembekuan/pencairan tidak mempengaruhi analit yang dinilai.

CATATAN Jenis dan jumlah antikoagulan yang relevan secara klinis mungkin atau mungkin tidak sesuai, tergantung pada sistem pengujian dan kemampuan untuk membedakan respons positif dan negatif.

Saat digunakan untuk mengevaluasi *hemokompatibilitas* modifikasi alat kesehatan, pengujian in vitro untuk hemolisis, pembentukan trombus, respons trombosit dan koagulasi dapat dinilai dan dibandingkan antara alat kesehatan yang dimodifikasi dengan alat kesehatan yang diterima secara klinis (lihat A.1.4).

6.3.2 Uji ex vivo

Pengujian *ex vivo* harus dilakukan ketika tujuan penggunaan alat kesehatan adalah *ex vivo*, misalnya alat penghubung eksternal. Pengujian *ex vivo* juga dapat berguna ketika tujuan penggunaan adalah in vivo, misalnya untuk menilai respon akut terhadap implan seperti cangkok vaskular. Namun, penggunaan tersebut sebaiknya tidak menggantikan uji implan.

Sistem uji *ex vivo* tersedia untuk memantau adhesi trombosit, pembentukan emboli, pengendapan fibrinogen, massa trombus, adhesi sel darah putih, konsumsi trombosit, dan aktivasi trombosit^{[44][46][47][50][54][70][78][80]}. Laju aliran darah dapat diukur dengan *Doppler* atau probe aliran elektromagnetik. Perubahan laju aliran dapat mengindikasikan tingkat dan arah pengendapan trombus dan embolisasi. Penumpukan trombus yang sederhana dapat dinilai dengan visualisasi kasar dan atau mikroskopis. Alat lain yang lebih canggih dan menuntut secara teknis juga telah digunakan^{[53][69][73][74][79]}.

6.3.3 Uji in vivo

Pengujian *in vivo* melibatkan penanaman bahan atau alat kesehatan pada hewan. *Vascular patches*, kateter vaskular, cangkok vaskular, *stent* vaskular, *annuloplasty rings*, katup jantung, dan alat bantu peredaran darah adalah contoh alat kesehatan yang diuji secara *in vivo*. Mengingat keragaman aplikasi alat kesehatan yang bersentuhan dengan darah, model uji *in vivo* diharapkan sama beragamnya, agar dapat meniru setiap aplikasi klinis secara tepat.

"*Patensi* saluran atau alat (yaitu aliran darah tanpa hambatan melalui alat)" adalah ukuran umum keberhasilan atau kegagalan untuk beberapa percobaan *in vivo*. Persen oklusi dan massa trombus ditentukan setelah alat dilepas. Kecenderungan trombus yang terbentuk pada alat untuk beremboli ke organ distal sebaiknya dinilai dengan pemeriksaan kasar dan mikroskopis yang cermat pada organ di bagian hilir alat. Selain itu, evaluasi histopatologi jaringan dan organ di sekitarnya juga berguna. Ginjal sangat rentan terhadap trombus yang terjebak yang merupakan emboli dari alat yang diimplankan di bagian proksimal arteri ginjal (misalnya *ventricular-assist devices*, *artificial hearts*, *aortic prosthetic grafts*)^{[184][187][236][237]}.

Metode untuk mengevaluasi interaksi *in vivo* tanpa menghentikan percobaan tersedia. Arteriogram atau pencitraan dari *intravascular ultrasound (IVUS) catheters* digunakan untuk menentukan *patensi* atau pengendapan trombus pada alat kesehatan. *Radioimaging* dapat digunakan untuk memantau pengendapan platelet pada berbagai periode waktu secara *in vivo*; kelangsungan hidup dan konsumsi platelet dapat digunakan sebagai indikator interaksi dan *passivation* darah/alat kesehatan akibat pembentukan *neointima* atau absorpsi protein^{[46][72][79]}.

Pada beberapa sistem uji *in vivo*, sifat material mungkin bukan penentu utama interaksi darah/alat kesehatan. Sebaliknya, parameter aliran, kesesuaian, porositas, dan desain implan mungkin lebih penting daripada kompatibilitas darah dengan material itu sendiri. Sebagai contoh, sistem laju aliran rendah dapat memberikan hasil yang sangat berbeda bila dibandingkan dengan bahan yang sama yang dievaluasi dalam sistem laju aliran tinggi. Dalam kasus seperti itu, kinerja sistem uji *in vivo* sebaiknya lebih penting daripada hasil uji *in vitro*.

Protokol uji *in vivo* sebaiknya berisi bagian yang tepat dan berdiri sendiri yang menyatakan bagaimana setiap kategori uji yang diidentifikasi untuk pengujian, yaitu hemolisis, trombosis, koagulasi, platelet, hematologi, dan sistem komplemen, akan dievaluasi.

Lampiran A
(informatif)
Evaluasi pra klinis alat kesehatan kardiovaskular dan prosthesis

A.1 Pertimbangan umum**A.1.1 Latar Belakang**

Lampiran ini memberikan latar belakang untuk memilih uji guna mengevaluasi interaksi alat kesehatan kardiovaskular dengan darah. Pasal 6 berisi panduan untuk menentukan kapan pengujian diperlukan, kategori interaksi darah yang mungkin sesuai untuk alat kesehatan tertentu, dan daftar pengujian untuk mengevaluasi interaksi darah/alat kesehatan pada alat yang tidak bersentuhan, alat kesehatan penghubung eksternal, dan alat kesehatan implan. Klasifikasi interaksi darah/alat kesehatan dalam A.1.2 disediakan sebagai latar belakang.

A.1.2 Klasifikasi

A.1.2.1 Interaksi yang terutama memengaruhi alat kesehatan dan yang mungkin atau mungkin tidak memiliki efek yang tidak diinginkan pada hewan atau manusia adalah sebagai berikut:

- a) adsorpsi protein plasma, lipid, kalsium, atau zat lain dari darah ke permukaan alat kesehatan; atau penyerapan zat tersebut ke dalam alat kesehatan;
- b) adhesi platelet, leukosit, atau eritrosit ke permukaan perangkat, atau penyerapan komponennya ke dalam alat kesehatan;
- c) pembentukan *pseudointima* atau *neointima* pada permukaan yang bersentuhan dengan darah dan kapsul jaringan pada permukaan alat kesehatan;
- d) perubahan dalam sifat mekanis dan sifat lain dari alat kesehatan.

A.1.2.2 Interaksi yang berpotensi menimbulkan efek yang tidak diinginkan pada hewan atau manusia adalah sebagai berikut:

- a) aktivasi platelet, leukosit atau sel lain, atau aktivasi jalur koagulasi, fibrinolitik, atau komplemen;
- b) pembentukan trombus pada permukaan alat kesehatan;
- c) embolisasi trombotik atau material lain dari permukaan alat kesehatan ke tempat lain di dalam sirkulasi;
- d) cedera pada sel darah yang bersirkulasi yang mengakibatkan anemia, hemolisis, leukopenia, trombositopenia, atau perubahan fungsi sel darah;
- e) cedera pada sel dan jaringan yang berdekatan dengan alat kesehatan;
- f) hiperplasia intima atau akumulasi jaringan lain pada atau yang berdekatan dengan alat kesehatan, yang mengakibatkan berkurangnya aliran atau memengaruhi fungsi lain alat kesehatan;

g) adhesi dan pertumbuhan bakteri atau agen infeksi lainnya pada atau di dekat alat kesehatan.

CATATAN Untuk item b), c) dan d) di atas, beberapa alat kesehatan seperti koil embolisasi memerlukan pembentukan trombus agar dapat berfungsi.

A.1.3 Kelebihan dan kekurangan penggunaan model hewan

Model hewan memungkinkan simulasi penggunaan alat kesehatan klinis yang paling mendekati sebelum pengujian yang sebenarnya pada manusia. Model ini memungkinkan pemantauan alat kesehatan secara terus menerus dan penyelidikan terkontrol yang sistematis terhadap variabel penting. Namun, pilihan model hewan mungkin dibatasi oleh persyaratan ukuran, ketersediaan spesies tertentu, dan biaya. Misalnya, alat kesehatan mungkin tidak dapat dioperasikan pada berbagai kondisi penggunaan klinis dalam model hewan karena keterbatasan anatomi. Sangat penting bagi peneliti untuk memperhatikan perbedaan dan persamaan fisiologis spesies yang dipilih dengan spesies manusia, terutama yang berkaitan dengan koagulasi, fungsi trombosit dan fibrinolisis, serta respons terhadap agen farmakologis seperti anestesi, antikoagulan, agen trombolitik dan antiplatelet, serta antibiotik. Karena perbedaan spesies dalam reaktivitas, perbedaan subjek dalam reaktivitas, dan respons yang bervariasi terhadap alat kesehatan yang berbeda, data yang diperoleh dari satu spesies sebaiknya ditafsirkan dengan hati-hati. Primata non-manusia seperti babun menunjukkan kemiripan yang dekat dengan manusia dalam hal nilai hematologi, mekanisme pembekuan darah, dan sistem kardiovaskular^[50]. Keuntungan tambahan dari primata non-manusia adalah bahwa banyak probe imunologi untuk uji trombosis yang dikembangkan untuk manusia cocok untuk digunakan pada primata. Probe ini termasuk PF-4, β -TG, FPA, TAT dan F1.2. Anjing adalah spesies yang umum digunakan dan telah memberikan informasi yang berguna; namun, trombosis yang terkait dengan alat kesehatan, pada anjing cenderung lebih mudah terjadi dibandingkan pada manusia, perbedaan yang dapat dilihat sebagai keuntungan (sebagai model yang menantang atau dipercepat) ketika mengevaluasi komplikasi ini. Babi dan domba umumnya dianggap sebagai model hewan yang sesuai karena kesamaan hematologi dan kardiovaskularnya dengan manusia^{[71][148][149][150]}. Efek dari prosedur implan bedah terhadap hasil sebaiknya diingat dan kontrol yang tepat harus disertakan. Keputusan akhir tentang penggunaan hewan atau model *in vitro* pada akhirnya melibatkan pertimbangan ketersediaan dan penggunaan hewan secara etis (lihat ISO 10993-2), ketersediaan dan batasan model darah *in vitro*, serta penerapan statistik yang tepat untuk mendapatkan kesimpulan yang tepat^{[213][214][215][216]}.

A.1.4 Keuntungan dan keterbatasan model *in vitro*

Model paparan darah *in vitro* adalah pendekatan yang menarik untuk menguji *hemokompatibilitas* material medis dan alat kesehatan kardiovaskular karena memungkinkan

- a) menghindari model hewan yang mahal,
- b) pengujian replikasi tinggi terhadap objek uji bersama dengan kontrol dan material acuan menggunakan *batch* darah yang sama dan pada waktu yang sama,
- c) penggunaan darah manusia atau hewan dengan aliran, suhu, dan antikoagulasinya telah distandarisasi,
- d) pengujian skenario terburuk, di mana produk aktivasi terakumulasi tanpa pembersihan oleh ginjal atau hati atau organ lain dan fungsi penghambat aktivasi sel endotel tidak ada, dan

- e) isolasi dari faktor perancu yang terkait dengan implantasi perangkat/cedera jaringan yang terkait dengan penggunaan *in vivo*.

Pengujian material dan alat kesehatan tersebut sebaiknya menyimulasikan sebaik mungkin berbagai kondisi klinis paparan darah ke alat kesehatan, karena pengujian pada darah dalam kondisi yang tidak dapat diterapkan secara klinis, misalnya antikoagulan non-klinis (jenis atau tingkat) dan kondisi aliran, dapat menyulitkan interpretasi hasil. Jika memungkinkan, lihat brosur petunjuk penggunaan atau literatur praktik medis umum untuk mengetahui jenis dan jumlah antikoagulan yang berlaku. Jika sesuai, pengujian pada berbagai kondisi penggunaan berlabel untuk alat kesehatan sebaiknya dipertimbangkan. Misalnya, untuk mengevaluasi hemolisis yang diinduksi secara mekanis dan aktivasi trombosit, pengujian sering kali dilakukan pada laju aliran darah tertinggi. Untuk pengujian trombotik, laju aliran darah berlabel minimum mungkin penting untuk mengkaraktirasi keamanan alat kesehatan. Karena telah ditunjukkan bahwa respons dalam darah mungkin berbeda antara berbagai spesies^{[47][148][149][150]}, penggunaan darah manusia lebih relevan untuk interpretasi hasil. Keuntungan lain dalam menggunakan darah manusia adalah bahwa ia menawarkan serangkaian metode pengujian yang lebih rinci, karena sebagian besar metode bioanalitik kontemporer didasarkan pada komponen/epitop darah manusia. Sebaliknya, ada keterbatasan tertentu dalam volume darah yang dapat diperoleh dari satu donor manusia. Dengan demikian, penggunaan darah dari satu hewan besar mungkin lebih praktis dalam kasus-kasus di mana model yang dirancang untuk menyimulasikan kondisi yang relevan secara klinis menyajikan kapasitas volume yang besar.

Untuk menguji *hemokompatibilitas* material/alat kesehatan secara umum, model uji *in vitro* *Chandler loop* klasik^[43] atau modifikasinya^{[193][194][195][199][200][203]} untuk memberikan aliran fisiologis dan/atau kuasi-fisiologis telah digunakan. Sebagai alternatif, pemaparan material-darah (alat kesehatan) menggunakan agitasi lembut juga dapat berguna dalam beberapa kasus untuk mengevaluasi interaksi darah dengan material. Untuk mengukur dampak model terhadap darah, hemolisis dan jumlah sel darah secara umum dapat dipantau untuk memeriksa kenormalan darah. Model-model ini tampak efektif untuk studi skrining, khususnya untuk aplikasi yang melibatkan paparan darah jangka pendek.

A.1.5 Protokol uji untuk pengujian pada hewan

Trombotik, *thromboembolism*, perdarahan dan infeksi merupakan penghalang utama untuk penggunaan dan pengembangan lebih lanjut dari prostesis kardiovaskular tingkat lanjut. Untuk alat kesehatan dengan paparan darah terbatas (<24 jam), pengukuran penting terkait dengan tingkat variasi akut variabel hematologi, hemodinamik, dan kinerja, pembentukan trombus yang besar (*gross thrombus*), dan kemungkinan emboli. Pada paparan yang berkepanjangan atau berulang atau kontak permanen (>24 jam dan >30 hari), penekanan diberikan pada teknik pengukuran serial yang dapat memberikan informasi mengenai perjalanan waktu trombotik dan tromboemboli, konsumsi komponen darah yang bersirkulasi, serta perkembangan hiperplasia intima dan infeksi. Pada kedua kategori paparan dan kontak ini, penilaian hemolisis dan fungsi trombosit merupakan hal yang penting. Pembentukan trombus dapat sangat dipengaruhi oleh teknik pembedahan, fenomena trombotik dan emboli yang bergantung pada waktu, infeksi alat yang ditumpangkan dan kemungkinan perubahan pada permukaan yang terpapar, misalnya hiperplasia intima, enkapsulasifibrosis dan endotelisasi. Yang penting, jenis dan jumlah antikoagulan dapat berdampak besar pada hasil. Sebagai contoh, pada tingkat yang relevan secara klinis, obat antikoagulan dan antiplatelet secara substansial dapat mengurangi atau meniadakan respons trombosit, koagulasi, dan trombotik.

Konsekuensi dari interaksi permukaan artifisial dengan darah dapat berkisar dari trombotik kasar dan *embolization* hingga efek yang tidak kentara seperti percepatan konsumsi elemen yang terlibat dalam hemostasis normal. Efek yang terakhir ini mungkin tidak signifikan secara klinis, misalnya konsumsi trombosit oleh alat kesehatan bisa jadi sangat kecil sehingga tidak

memengaruhi jumlah trombosit total. Sebagai alternatif, alat dengan luas permukaan yang besar dapat menyebabkan penipisan trombosit atau faktor pembekuan plasma sehingga jumlah trombosit total dapat terpengaruh secara signifikan dan hemostasis normal dapat berubah.

Terlepas dari model hewan yang digunakan dan kategori uji tertentu yang sedang dievaluasi, yaitu hemolisis, trombosis, koagulasi, trombosit, hematologi, dan sistem komplemen, protokol studi *in vivo* harus memberikan rincian yang cukup dalam metode dan kriteria yang akan digunakan untuk evaluasi untuk setiap kategori uji yang sedang diselidiki. Laporan retrospektif tentang hasil untuk kategori uji tertentu, tanpa mendukung rencana awal dalam protokol, sering kali dianggap tidak dapat diterima sebagai dokumentasi pengajuan peraturan.

A.2 Kanula yang digunakan untuk akses vaskular langsung dan kanula yang digunakan untuk akses tidak langsung

Istilah "*kanula*" secara umum digunakan dalam dua aplikasi klinis yang agak berbeda. Dalam satu aplikasi, kanula dimasukkan langsung melalui kulit dan masuk ke dalam satu atau beberapa pembuluh darah utama. Hal ini dilakukan untuk memberikan akses volume yang tinggi secara terus menerus dan langsung ke darah. Sebagai contoh, jenis kanula berdiameter besar ini digunakan selama operasi *bypass* jantung-paru sebagai alat kesehatan dengan akses paparan terbatas yang mengalirkan darah ke dan dari tubuh untuk oksigenasi darah. Pengujian *kanula*, dalam contoh ini, harus dilakukan dengan menggunakan paparan kondisi yang sangat mirip dengan penggunaan klinis, karena alat kesehatan tersebut berpotensi menyebabkan beberapa perubahan pada tingkat sel darah yang bersirkulasi serta meningkatkan faktor dalam sistem koagulasi atau komplemen. Respons tertentu sering kali bersifat multifaktorial karena bergantung pada berbagai faktor seperti lokasi implantasi, teknik penyisipan, faktor subjek, dan *regimen* antikoagulasi. Istilah *kanula* juga telah digunakan untuk menggambarkan tabung berdiameter jauh lebih kecil yang dimasukkan hanya secara subkutan, dan dapat digunakan untuk paparan tidak langsung yang terbatas (<24 jam) atau berkepanjangan (<30 hari) terhadap darah. *Kanula* ini, misalnya, digunakan untuk infus insulin dari pompa obat dan penginderaan subkutan untuk kadar glukosa darah. Jenis kanula yang disebutkan belakangan ini, seperti perangkat jalur darah tidak langsung lainnya (lihat 5.2.2), umumnya memerlukan lebih sedikit pengujian dibandingkan alat kesehatan yang bersentuhan langsung dengan darah yang bersirkulasi (lihat 5.2.3 dan 5.3).

A.3 Kateter dan *guide wires*

Sebagian besar uji yang dipertimbangkan pada *kanula* yang kontak dengan darah relevan dengan studi tentang kateter yang kontak dengan darah dan *guide wires*. Lokasi atau penempatan kateter dalam sistem arteri atau vena dapat berpengaruh besar pada interaksi darah/alat kesehatan. Disarankan agar studi kontrol simultan, dengan menggunakan alat kesehatan dengan dimensi dan material yang serupa yang disetujui secara klinis, dilakukan dengan menggunakan arteri atau vena kontralateral. Perhatian sebaiknya diberikan agar tidak terjadi pelepasan trombus pada saat penarikan kateter. Evaluasi alat *in situ* dapat memungkinkan penilaian sejauh mana cedera intima atau *situs masuk* pembuluh darah yang berkontribusi pada proses trombotik. Secara umum, pengukuran aliran darah *Doppler* lebih informatif daripada angiografi. Model implan vena atau arteri dengan antikoagulasi yang sesuai dengan aplikasi klinis dapat menjadi alat yang berguna untuk mengevaluasi respons kontak darah perangkat, terutama saat menilai bahan perangkat baru atau lapisan yang dikembangkan untuk menghadirkan sifat anti-trombogenik.^{[143][161][162][163]} Lihat C.3. Sebagai alternatif, model *in vitro* yang sesuai mungkin lebih sensitif untuk mendeteksi perbedaan permukaan material tersebut.

Dalam kasus di mana antikoagulasi diperlukan, dasar pemikiran untuk jenis dan tingkat antikoagulasi yang digunakan dalam pengujian sebaiknya didasarkan pada aplikasi klinis,

namun dapat memberikan bukti yang cukup bahwa pengujian tersebut dapat membedakan antara respons positif dan negatif. Sebagai contoh, dengan mengikuti kinetika respons dosis sederhana, tromboresistensi lapisan heparin alat kesehatan dapat sepenuhnya tertutupi oleh tingkat normal (klinis) larutan antikoagulan heparin. Namun, di bawah tingkat heparin larutan yang dikurangi/ditantang, efektivitas lapisan heparin untuk mengurangi pembentukan trombus menjadi lebih jelas. Dalam kasus di mana aplikasi mungkin tidak melibatkan penggunaan antikoagulan, pengujian sebaiknya dilakukan tanpa antikoagulan.

Informasi validasi untuk pengujian dengan jenis dan tingkat antikoagulan tertentu sebaiknya menunjukkan kemampuan untuk membedakan antara respons positif dan negatif.

A.4 Oksigenator darah ekstrakorporeal, alat kesehatan hemodialisis/hemofiltrasi, donor dan peralatan apheresis terapeutik, alat kesehatan untuk adsorpsi zat tertentu dari darah.

Respon darah terhadap *bypass* kardiopulmonal dapat menjadi signifikan dan akut. Banyak variabel seperti penggunaan *blood suction*, komposisi cairan priming pompa darah, hipotermia, kontak darah dengan udara dan waktu pemaparan mempengaruhi nilai uji. Emboli pada saluran keluar dapat dideteksi dengan penempatan filter darah secara berkala *ex vivo* atau penggunaan ultrasonografi atau teknik non-invasif lainnya. Akumulasi trombus dapat secara langsung dinilai selama *bypass* dengan memantau faktor kinerja seperti penurunan tekanan pada oksigenator dan laju transfer oksigen. Disfungsi trombosit transien yang didapat terkait dengan pelepasan butiran alfa selektif telah diamati pada pasien yang menjalani *bypass* kardiopulmonal^[158]; uji fungsi platelet dan pelepasan trombosit lainnya sangat berguna.

Aktivasi komplemen disebabkan baik oleh hemodialiser dan peralatan *bypass* kardiopulmonal. Leukostasis paru yang signifikan secara klinis dan cedera paru dengan disfungsi dapat terjadi^{[5][11][16][129]–[147]}. Untuk alasan ini, sangat berguna untuk mengukur aktivasi komplemen atau leukopenia dengan alat kesehatan ini. Lihat juga Lampiran E.

Peralatan apheresis terapeutik dan alat kesehatan untuk absorpsi zat tertentu dari darah, karena rasio permukaan-ke-volume yang tinggi, berpotensi mengaktifkan komplemen, koagulasi, trombosit, dan leukosit. Pemeriksaan interaksi darah/alat kesehatan pada alat kesehatan ini dan alat kesehatan dengan luas permukaan tinggi lainnya sebaiknya mengikuti prinsip yang sama dengan oksigenator ekstrakorporeal dan hemodialisa.

A.5 Ventricular-assist devices dan total artificial hearts

Alat-alat kesehatan ini dapat menyebabkan perubahan yang cukup besar pada berbagai komponen darah. Faktor-faktor yang berkontribusi terhadap efek tersebut termasuk luasnya area permukaan asing yang terpapar darah, *high flow regime*, dan area aliran yang terganggu seperti turbulensi atau aliran yang terpisah. Pengujian alat kesehatan tersebut dapat mencakup pengukuran hemolisis, pembentukan trombus, pembentukan fibrin, *thromboembolization*, pembentukan trombin, kelangsungan hidup platelet dan aktivasi, aktivasi komplemen, dan pemantauan yang cermat terhadap efek hati, ginjal, paru, dan sistem saraf pusat. Pemeriksaan patologis yang mendetail pada saat pengambilan bedah merupakan komponen penting dari evaluasi^{[236][237]}.

A.6 Protesis heart valve

Studi hidrodinamika invasif, non-invasif, dan *in vitro* penting dalam penilaian katup prostetik.

Salah satu cara yang paling efektif untuk skrining disfungsi katup prostetik adalah auskultasi^[186]. *Echocardiography* dua dimensi dan mode M memanfaatkan radiasi ultrasonik untuk membentuk gambar jantung. Pantulan dari bahan dengan impedansi akustik yang

berbeda diterima dan diproses untuk membentuk gambar. Struktur katup prostetik dapat diperiksa. Prostesis mekanis memancarkan sinyal gema yang kuat dan pergerakan penyumbat biasanya dapat dicitrakan dengan jelas. Namun, kualitas gambar mungkin tergantung pada katup tertentu yang diperiksa. *Echocardiography* juga dapat bermanfaat dalam penilaian fungsi prostesis katup yang berasal dari jaringan. Vegetasi, trombus dan bukti penebalan selebaran katup dapat dijelaskan. Dengan menggunakan *echocardiography* Doppler aliran konvensional dan berwarna, regurgitasi dapat diidentifikasi dan semi-kuantifikasi^{[2][185][186][187]}.

Pengukuran kelangsungan hidup dan agregasi platelet, uji darah trombosis dan hemolisis, pengukuran tekanan dan aliran, serta otopsi *valve* dan jaringan yang berdekatan direkomendasikan^{[205][206]}.

A.7 Cangkok vaskular

Material berpori dan tidak berpori yang dapat diimplan pada berbagai lokasi dalam sistem arteri atau vena. Pilihan lokasi implantasi sangat ditentukan oleh pertimbangan anatomi model dan lokasi klinis penggunaan. Patensi cangkok yang diberikan ditingkatkan dengan diameter yang lebih besar dan panjang yang lebih pendek. Patensi dapat didokumentasikan dengan palpasi denyut nadi distal di beberapa lokasi dan dengan angiografi berkala. Ultrasonografi, MRI dan PET juga dapat berguna. Pengukuran serial jumlah trombosit, konstituen pelepasan trombosit, produk degradasi fibrinogen/fibrin, dan protein koagulasi yang diaktifkan juga direkomendasikan. Otopsi cangkok dan segmen vaskular yang berdekatan untuk mengetahui respons jaringan vaskular dapat memberikan informasi yang berharga. Evaluasi sistematis terhadap penampang memanjang dan melintang dari anastomosis proksimal dan distal serta daerah cangkok yang representatif diperlukan untuk evaluasi menyeluruh terhadap alat kesehatan^{[4][205]}. Seperti halnya banyak perangkat vaskular, rejimen antikoagulan klinis yang tepat sangat penting untuk fungsi dan kinerja alat kesehatan.

A.8 Filter IVC, *stent*, dan cangkok *stent*

Alat-alat kesehatan ini dapat dipelajari dengan angiografi dan radiasi ultrasonik. Teknik lain yang berguna untuk evaluasi cangkok vaskular (lihat A.7) juga dapat dilihat di sini^[205].

Lampiran B
(informatif)
Uji laboratorium yang direkomendasikan — Prinsip, dasar ilmiah, dan interpretasi

B.1 Pertimbangan umum**B.1.1 Latar Belakang**

Prinsip-prinsip umum dan dasar ilmiah dari uji yang lebih umum digunakan untuk mengevaluasi kategori hemolisis, trombosis, koagulasi, platelet, hematologi, dan sistem komplemen (lihat 6.2) dijelaskan di B.1 hingga B.3. Lihat Lampiran C, D dan E untuk informasi lebih lanjut mengenai kategori uji trombosis, hemolisis dan komplemen.

Sebagai tambahan, meskipun kurang umum, yang mungkin memiliki nilai lebih lanjut dalam evaluasi interaksi darah/alat kesehatan tertentu dijelaskan dalam Lampiran F. Karena variabilitas biologis dan keterbatasan teknis, keakuratan dan prediktabilitas dari banyak uji ini memerlukan perhatian yang cermat terhadap metodologi dan kehati-hatian dalam interpretasi hasil. Lampiran G mencantumkan uji yang tidak direkomendasikan.

B.4 menyajikan pertimbangan metodologi untuk pengujian faktor plasma yang spesifik untuk koagulasi, aktivasi trombosit dan leukosit serta aktivasi komplemen dengan menggunakan teknik ELISA (atau yang serupa).

Semua referensi dalam daftar pustaka menjelaskan secara lebih rinci dan memberikan contoh berbagai standar, pengujian, dan model untuk dipertimbangkan.

B.1.2 Pengujian *in vitro* versus *ex vivo* versus *in vivo*

B.1.2.1 Sejumlah model *in vitro*, *ex vivo*, dan *in vivo* telah digunakan secara luas untuk memperkirakan interaksi darah-material^{[1]-[30][42]-[147][157]-[237]}. Adalah tepat untuk memilih model yang paling sesuai untuk penggunaan alat kesehatan dan tujuan pengujian serta mengacu pada ISO 10993-12 mengenai persiapan sampel yang tepat dan pertimbangan kelompok kontrol.

Tidak ada satu model *in vitro*, *ex vivo*, atau *in vivo* yang sesuai untuk semua penggunaan. Oleh karena itu, kesesuaian model dengan penggunaan yang sedang dipertimbangkan sebaiknya dijustifikasi.

Pengujian *in vivo* menyajikan simulasi penggunaan akhir yang lebih realistis, namun dipersulit oleh beberapa faktor seperti:

- pilihan model hewan yang sesuai;
- variabilitas antar spesies dan antar subjek dalam respons^{[47][71][148][149][150]};
- kelangkaan alat uji komersial khusus spesies untuk indikator umum trombosis dan koagulasi^{[58][59][60]};
- biaya yang lebih tinggi serta masalah etika dan statistik yang terlibat dalam penggunaan model hewan.

B.1.2.2 Gunakan standar vertikal untuk model yang lebih disukai^{[1]-[41]}. Lihat juga Referensi [186] untuk domba muda sebagai model yang dipercepat untuk mempelajari klasifikasi katup bioprostetik, Referensi [187] untuk babi atau domba dewasa untuk menyelidiki katup yang ditempatkan secara trans vaskular dan katup yang ditanamkan melalui pembedahan,

Referensi [217] untuk [231] untuk model penggantian femur anjing dan domba yang dewasa yang digunakan dalam pengujian model cangkuk pembuluh darah berdiameter kecil dan besar, dan Referensi [232] hingga [235] untuk model koroner babi yang digunakan secara ekstensif untuk menyelidiki desain stent.

B.1.2.3 Seperti yang dijelaskan di bagian lain ISO 10993, uji in vitro yang dilakukan dengan hati-hati menawarkan alat skrining yang valid untuk menilai keamanan biologis alat kesehatan dan materialnya.

Faktor-faktor penting dalam model in vitro yang memerlukan spesifikasi adalah

- volume *wholeblood* dalam sistem uji dasar, misalnya tabung, *loop*, atau model lainnya,
- waktu paparan darah,
- suhu darah,
- kondisi aliran darah,
- jenis dan tingkat antikoagulan,
- rasio paparan, yaitu rasio luas permukaan alat kesehatan/material (cm^2) terhadap volume *wholeblood* dalam sistem (ml), dan
- luas permukaan yang kontak dengan darah dari sistem uji itu sendiri (cm^2).

CATATAN 1 "Fase pemaparan darah" dari investigasi in vitro memerlukan definisi yang tepat tentang kondisi pemaparan material uji/alat kesehatan terhadap darah. Semakin dekat kondisi pengujian meniru aplikasi klinis, semakin besar prediktabilitas model dan respons yang dievaluasi.

CATATAN 2 "Fase pengujian" mengikuti fase pemaparan dimana uji spesifik dilakukan pada darah yang terpapar, plasma darah, atau material/alat kesehatan itu sendiri. Uji dalam fase pengujian biasanya ditargetkan pada satu atau beberapa kategori umum, yaitu hemolisis, trombosis, koagulasi, trombosit, hematologi, dan sistem komplemen.

B.2 dan B.3 memeriksa metode umum yang digunakan untuk menilai kategori utama interaksi material-darah/alat kesehatan (lihat Tabel 2).

B.2 Trombosis

B.2.1 *Gross analysis* — Pengambilan dan pemeriksaan perangkat dan otopsi organ distal

Gross analysis sebaiknya disertakan sebagai bagian dari evaluasi alat kesehatan dasar, karena segmen evaluasi alat kesehatan ini sangat penting dalam mengevaluasi respon biologis in vivo terhadap alat kesehatan implan. Distribusi, ukuran dan sifat yang terlihat dari endapan seluler dan protein, serta emboli apapun, paling baik ditentukan dengan pemeriksaan *gross* yang cermat dan terperinci. Prosedur yang diusulkan telah dipublikasikan^{[7][205][206][207]}.

Alasan di balik nekropsis organ distal adalah untuk memeriksa efek distal (seperti emboli) dari alat yang diimplan. Pentingnya analisis ini bervariasi tergantung pada penggunaan alat kesehatan dan terbatas pada penggunaan di mana risiko tromboemboli atau embolisasi material/alat kesehatan adalah sedang hingga tinggi, misalnya pada katup jantung mekanis dan pompa balon intra-aorta^[206].

Dalam jenis investigasi ini, film berwarna resolusi tinggi dengan perbesaran rendah dan/atau tinggi atau gambar digital pada titik-titik penting yang menarik (pada perangkat, dan jaringan di sekitarnya, dll.) diambil dan diberi label dengan tepat.

B.2.2 Persentase oklusi, luas permukaan yang tertutup trombus dan luas permukaan bebas thrombus

Persentase oklusi dapat dinilai secara kuantitatif selama masa pakai dengan menggunakan teknik pencitraan radiografi kontras dan ultrasonografi. Persentase oklusi juga dapat dinilai secara visual setelah alat kesehatan implan dilepas. Persentase oklusi dapat menjadi ukuran tingkat keparahan proses trombotik dalam saluran. Namun, kurangnya oklusi tidak serta merta menghilangkan adanya proses trombotik, karena trombus mungkin telah beremboli atau terlepas sebelum persentase oklusi diukur. Oklusi dapat disebabkan tidak hanya oleh trombosis, tetapi juga oleh hiperplasia intima, terutama pada lokasi peri-anastomosis pada cangkok vaskular. Oleh karena itu, pemeriksaan mikroskopis pendukung berguna untuk mengidentifikasi sifat dari proses oklusi. Penentuan luas permukaan yang ditutupi oleh trombus dan luas permukaan bebas trombus adalah uji semi-kuantitatif atau kuantitatif yang dapat digunakan sebagai pembandingan dengan alat kesehatan uji dan/atau kontrol.

B.2.3 Mikroskop Cahaya

Dengan teknik ini, informasi dapat diperoleh mengenai kepadatan sel, keberadaan agregat seluler, komposisi jaringan pembungkus, intensitas respons benda asing dan trombus atau fibrin yang melekat pada material. Evaluasi distribusi geografis dari endapan ini pada bahan atau perangkat juga dapat dilakukan. Metode ini bersifat semi-kuantitatif.

Untuk material dan perangkat yang berasal dari polimer atau biologis, metode penyematan lilin parafin dan noda khusus dapat digunakan untuk menilai antarmuka alat kesehatan-biologis.

Untuk material dan alat kesehatan logam dan keramik, teknik penyayatan dan pemotongan plastik keras yang lebih canggih, berguna untuk menangkap antarmuka material/perangkat-biologis yang utuh^{[207]-[211]}.

B.2.4 Scanning electron microscopy (SEM)

Untuk SEM, dasar pemikiran dan interpretasi sama dengan mikroskop cahaya (lihat B.2.3). Metode ini memiliki keunggulan dibandingkan mikroskop cahaya dalam memberikan detail yang lebih besar tentang struktur halus komponen yang sedang diperiksa. Kesimpulan kuantitatif memerlukan penentuan ulangan yang cukup untuk menetapkan tingkat reproduktifitas. Jenis mikroskop ini paling baik mencerminkan apa yang dapat dilihat pada permukaan. Analisis penampang melintang juga dapat digunakan untuk mendukung pengamatan permukaan jika rincian tambahan mengenai interaksi sel dan permukaan trombus informatif^{[70][71][143][205][206]}. Evaluasi morfologi aktivasi trombosit dan leukosit, fibrin dan pembentukan trombus setelah pemaparan dinamis darah atau komponen darah (misalnya plasma kaya trombosit) dengan perbandingan terhadap kontrol acuan sangat berharga^{[143][173]}.

B.3 Hemokompatibilitas in vitro

B.3.1 Hemolisis — Metode untuk pengujian

Hemolisis dianggap sebagai uji skrining yang signifikan karena peningkatan kadar hemoglobin plasma in vivo adalah tidak normal dan dapat mengindikasikan adanya hemopatologi atau masalah pembuluh darah yang mendasarinya. Jika dilakukan dengan benar, kadar hemoglobin plasma yang meningkat mengindikasikan hemolisis, yaitu pelepasan isi sel darah merah (eritrosit), dan dapat mencerminkan kerapuhan membran eritrosit atau kerusakan pada eritrosit. Dalam penilaian interaksi darah-material/alat kesehatan, hemolisis dapat terjadi karena:

- a) kontak darah langsung dengan material/permukaan alat kesehatan (yang disebabkan oleh material);

- b) kontak tidak langsung dari paparan bahan kimia yang dapat diekstraksi dari material alat kesehatan (material yang diinduksi);
- c) paparan turbulensi dan tekanan geser yang meningkat (yaitu non-fisiologis) dari pengoperasian alat kesehatan (yang diinduksi secara mekanis).

Lihat Lampiran D untuk rincian lebih lanjut tentang pengujian hemolisis.

B.3.2 Koagulasi - Metode untuk pengujian

B.3.2.1 Umum

Kaskade koagulasi memiliki dua jalur paralel, yaitu jalur aktivasi kontak (jalur intrinsik) dan jalur faktor jaringan (jalur ekstrinsik) yang bergabung untuk membentuk jalur umum. Yang terakhir ini mencakup protein trombin, yang mengkatalisis pembentukan *fibrin*, komponen utama trombus. Meskipun diketahui bahwa jalur utama untuk inisiasi koagulasi darah adalah jalur faktor jaringan, koagulasi yang terkait dengan alat kesehatan dan material yang kontak dengan darah terjadi melalui jalur aktivasi kontak. Jalur itu sendiri adalah serangkaian reaksi di mana prekursor enzim yang tidak aktif secara berurutan (disebut sebagai zimogen) berinteraksi dengan kofaktor glikoprotein mereka untuk menjadi komponen aktif dalam rangkaian peristiwa aktivasi. Reaksi ini berujung pada pembentukan trombin aktif yang kemudian mengkatalisis pembentukan fibrin. Faktor koagulasi umumnya ditunjukkan dengan angka Romawi, dengan huruf kecil "a" ditambahkan untuk menunjukkan bentuk aktif. Lihat Gambar B.1.

Penilaian aktivitas koagulasi, yaitu tingkat perubahan kadar protein dalam darah yang mengarah pada pembentukan trombin dan fibrin (lihat Gambar B.1), telah lama bergantung pada uji klinis yang mengukur kadar plasma protein utama dalam *kaskade* koagulasi. Tingkat aktivitas koagulasi istirahat normal (homeostasis) telah diketahui dengan baik, seperti halnya beberapa tingkat yang meningkat yang diamati pada berbagai koagulopati klinis. Asumsi untuk pengujian tersebut dengan alat kesehatan adalah bahwa material dan desain alat kesehatan yang tepat sebaiknya tidak boleh dikaitkan dengan aktivitas koagulasi yang berlebihan yang dapat menimbulkan risiko bagi pasien. Tingkat aktivitas koagulasi yang tinggi dapat menjadi indikator kecenderungan yang lebih tinggi untuk bahan atau perangkat yang dapat menyebabkan atau terkait dengan trombosis akut atau tromboemboli. Untuk mengukur aktivitas koagulasi, laboratorium klinis sering kali mengandalkan alat uji yang menggunakan teknik uji immunosorben terkait enzim yang umum. Dalam studi dasar, yang dapat dilakukan secara *in vivo* atau *in vitro* dan akan bergantung pada ketersediaan antibodi yang sesuai terhadap epitop protein koagulasi target spesifik spesies, sampel darah diambil dalam kondisi yang ditentukan dan dipersiapkan serta dianalisis sesuai instruksi pengujian. Kondisi atau faktor yang ditetapkan secara umum yang penting dalam model *in vitro* dijelaskan di B.1.2.3. Perbandingan hasil dengan kontrol yang sesuai seperti kontrol negatif (misalnya tingkat dasar atau tidak ada paparan material/alat kesehatan) dan hasil pada alat kesehatan/material prediktor sangat penting. Aktivitas koagulasi dalam darah yang secara statistik dan biologis lebih tinggi daripada kontrol dapat menjadi indikator desain material/alat kesehatan yang memiliki risiko komplikasi terkait koagulasi yang lebih tinggi. Contoh protein aktivasi koagulasi yang tersedia secara komersial untuk kit ELISA meliputi TAT (kompleks trombin-antitrombin), F.1.2 (fragmen protein yang dilepaskan dari protrombin pada saat pembentukan trombin) dan FPA (fragmen protein yang dilepaskan dari fibrinogen pada saat pembentukan fibrin).

Protein yang mengindikasikan aktivasi koagulasi umumnya menunjukkan fase inisiasi, propagasi, dan terminasi^{[56][57]}. Hal ini mencerminkan reaksi pembentukan awal, periode amplifikasi *kaskade*/umpan balik dan periode perlambatan/deaktivasi di mana prekursor kritis dapat dikonsumsi atau protein yang diukur dinonaktifkan oleh protein umpan balik kontrol negatif. Dengan demikian, perbedaan urutan besarnya dalam tingkat protein aktivasi koagulasi diharapkan dari waktu ke waktu. Oleh karena itu, faktor penting yang perlu dipertimbangkan

adalah kapan fase aktivasi benar-benar terjadi selama waktu kontak material/alat kesehatan-darah. Sebagai contoh, dampak material uji ketika bercampur dengan darah mungkin sangat berbeda pada setiap fase. Selain itu, karena aktivasi protein koagulasi umumnya sebanding dengan luas permukaan yang bersentuhan dengan darah, maka luas permukaan alat kesehatan atau material alat kesehatan dapat sangat berpengaruh pada hasil. Untuk alasan ini, penting untuk menentukan rasio luas permukaan terhadap volume darah (rasio paparan) dalam setiap penelitian. Jika memungkinkan, rasio paparan dapat diperlakukan sebagai variabel untuk membantu memahami kekhususan efek material. Rasio paparan 3,0 cm² hingga 6,0 cm²/ml darah (berdasarkan ketebalan perangkat) konsisten dengan ISO 10993-12. Rasio paparan lain seperti 1,5 dan 2,0 kali rasio ini mungkin perlu dipertimbangkan karena area permukaan yang lebih tinggi secara teoritis akan meningkatkan sensitivitas respons koagulasi terhadap bahan uji.

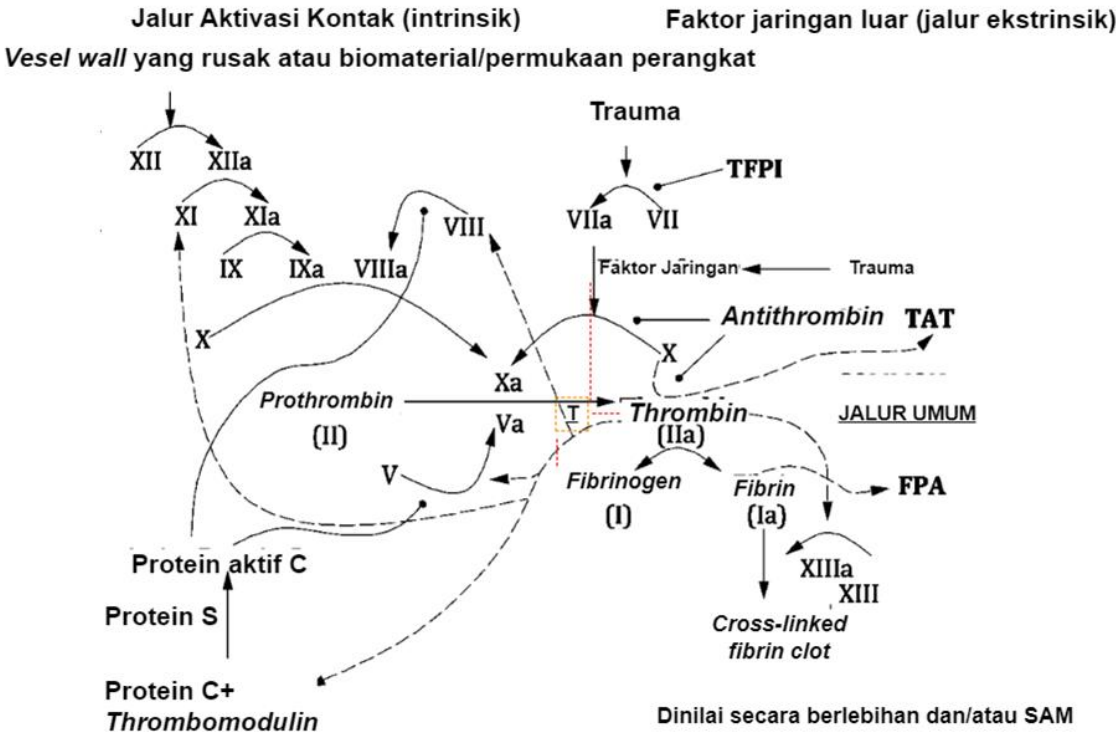
Akan ada batasan fisik pada jumlah material uji yang dapat diuji, karena volume sistem pengujian, misalnya tabung reaksi, dan rasio pencahayaan target. Dalam kasus ini, mungkin tepat untuk menggunakan bagian yang dipotong dari bahan perangkat. Jika perangkat berisi lebih dari satu bahan, proporsi masing-masing bahan dalam perangkat yang lengkap sebaiknya dipertahankan. Perhatian juga sebaiknya diberikan untuk menghindari penggunaan bagian yang terpotong yang mengakibatkan paparan sejumlah besar permukaan yang tidak bersentuhan dengan darah.

Secara alami, ada sejumlah mekanisme yang telah berevolusi untuk menjaga *kaskade* koagulasi tetap terkendali. Salah satu mekanisme tersebut melibatkan protein antitrombin. Antitrombin adalah penghambat protease serin yang dapat mengikat dan menonaktifkan protease serin trombin, FIXa, FXa, FXIa dan FXIIa. Meskipun antitrombin selalu aktif, interaksinya dengan heparin mengubah konformasinya, yang sangat mempercepat laju penghambatan protease.

CATATAN Pengujian ELISA untuk faktor pembekuan darah merupakan "tahap pengujian" yang dibahas dalam B.1.2, yaitu untuk pengujian pada sampel darah yang diperoleh setelah paparan darah secara *in vitro* atau *in vivo* terhadap alat kesehatan atau material medis.

Banyak uji koagulasi standar yang dirancang untuk mendeteksi gangguan koagulasi klinis yang mengakibatkan keterlambatan pembekuan atau perdarahan yang berlebihan, bukan kondisi yang meningkatkan pembekuan/trombosis. Protokol untuk mengevaluasi interaksi darah/alat kesehatan harus dimodifikasi secara tepat untuk mengevaluasi percepatan koagulasi yang disebabkan oleh biomaterial.

Interaksi antara sistem koagulasi dan komplemen diakui^{[143]–[147]}.



Gambar B.1 — Rangkaian koagulasi

B.3.2.2 Uji ELISA trombin-antitrombin (TAT), F1.2 dan fibrin (FPA)

Uji ELISA yang secara langsung mencerminkan pembentukan trombin (TAT, F1.2) dan fibrin (FPA) tersedia secara komersial. Luaran yang diperoleh adalah perkiraan kuantitatif dari jumlah trombin yang ada dan jumlah fibrin yang terbentuk, yang keduanya mencerminkan tingkat aktivitas koagulasi yang terjadi dan mungkin mencerminkan trombosis yang terjadi. Lihat B.4 untuk perincian tentang metodologi ELISA secara umum.

B.3.2.3 Waktu tromboplastin parsial (PTT/*partial thromboplastin time*)

Waktu tromboplastin parsial adalah waktu pembekuan plasma sitrat *recalcified* dengan penambahan tromboplastin parsial yang tidak mengandung aktivator. Tromboplastin parsial adalah suspensi fosfolipid yang biasanya diekstraksi dari tromboplastin jaringan, yaitu homogenat dari otak atau paru-paru mamalia. Pemendekan PTT setelah kontak dengan material dalam kondisi standar menunjukkan aktivasi jalur pembekuan intrinsik pembekuan darah. Heparin dan antikoagulan lainnya menyebabkan PTT yang berkepanjangan. Lihat Referensi [23].

Reagen untuk uji berdasarkan waktu tromboplastin parsial teraktivasi (*activated partial thromboplastin time/APTT*) mencakup aktivator, seperti kaolin, celite, atau asam ellagic. Reagen dengan aktivator tersebut sebaiknya dihindari ketika menilai efek dari alat kesehatan yang kontak dengan darah atau material alat kesehatan karena reagen tersebut menutupi koagulasi yang disebabkan oleh bahan atau perangkat.

Dalam pengujian koagulasi material dan alat kesehatan, material atau alat kesehatan itu sendiri yang berfungsi sebagai aktivator koagulasi. Bahan kontrol positif dan negatif yang tepat sebaiknya digunakan bila tersedia. Kontrol negatif, yaitu plasma darah itu sendiri tanpa bahan/perangkat, sebaiknya disertakan.

B.3.3 Platelet — Metode untuk pengujian

B.3.3.1 Umum

Penilaian platelet dan keadaan aktivasi mereka telah dijelaskan di seluruh literatur, misalnya, lihat Referensi [69] hingga [94] sebagai daftar parsial. Namun, untuk peralatan dan material medis yang bersentuhan dengan darah, metode yang paling sering digunakan adalah penghitungan platelet secara sederhana dan pengukuran protein degranulasi platelet setelah paparan terkendali peralatan atau material medis terhadap darah. Kadar normal platelet dan protein degranulasi dalam keadaan istirahat (homeostasis) telah diketahui dengan baik (lihat literatur produk kit ELISA komersial), demikian pula beberapa kadar abnormal yang diamati pada berbagai trombotopati klinis. Asumsi untuk pengujian tersebut dengan alat kesehatan adalah bahwa material dan desain alat kesehatan yang tepat sebaiknya tidak boleh dikaitkan dengan konsumsi dan/atau aktivasi platelet yang berlebihan yang dapat menimbulkan risiko bagi pasien. Tingginya tingkat kehilangan platelet dan/atau degranulasi dapat menjadi indikator kecenderungan bahan/perangkat untuk menginduksi atau meningkatkan kondisi ini yang dapat menimbulkan komplikasi perdarahan atau trombosis. Untuk mengukur jumlah platelet dan degranulasi platelet penghitungan dilakukan dengan menggunakan penghitung sel diferensial rutin dan degranulasi dinilai dengan menggunakan uji imunosorben terkait enzim standar (ELISA) untuk protein alfa-granul platelet yang telah dikenal dengan baik. Laboratorium klinis sering kali mengandalkan alat uji yang menggunakan teknik uji imunosorben terkait enzim yang umum untuk mengukur protein alfa-granul. Dalam studi dasar, yang dapat dilakukan secara *in vivo* atau *in vitro* dan akan bergantung pada ketersediaan antibodi yang sesuai untuk epitop protein granul trombotopati target spesifik spesies, sampel darah diambil dalam kondisi yang ditentukan dan disiapkan serta dianalisis sesuai instruksi pengujian. Kondisi atau faktor yang ditentukan secara umum yang penting dalam model *in*

vitro dijelaskan di B.1.2.3. Perbandingan hasil dengan kontrol yang sesuai seperti kontrol negatif (misalnya tingkat awal atau sistem pengujian tanpa paparan material/alat kesehatan) dan hasil pada alat kesehatan/material prediktor sangat penting. Jumlah platelet menurun dan protein degranulasi darah meningkat yang secara statistik berbeda secara signifikan dan secara biologis berbeda secara signifikan dari kontrol dapat menjadi indikator desain alat kesehatan/material yang menghadirkan risiko lebih tinggi untuk konsumsi dan aktivasi platelet. Contoh protein alfa-granul yang tersedia secara komersial untuk kit ELISA meliputi

- PF4 (faktor platelet 4, protein 70-asam amino yang berikatan dengan afinitas tinggi terhadap heparin; peran fisiologis utama PF4 tampaknya adalah menetralkan molekul mirip heparin pada permukaan endotel pembuluh darah, sehingga menghambat aktivitas antitrombin III lokal dan meningkatkan koagulasi), dan
- β TG (beta-tromboglobulin, suatu kemokin untuk fibroblas dan neutrofil).

CATATAN Trombin dari *kaskade* koagulasi adalah agonis trombosit yang kuat yang dapat dengan mudah menyebabkan degranulasi trombosit. Dengan demikian, kadar trombin yang tinggi akan berkorelasi dengan kadar degranulasi trombosit yang tinggi.

Seperti pada koagulasi, konsumsi (kehilangan) platelet umumnya terlihat dipengaruhi oleh luas permukaan yang bersentuhan dengan darah. Dengan demikian, luas permukaan (SA/surface area) alat kesehatan atau material medis dapat memengaruhi data jumlah platelet. Untuk alasan ini, penting untuk menentukan rasio SA terhadap volume darah (rasio paparan) dalam setiap penelitian. Jika memungkinkan, rasio paparan dapat diperlakukan sebagai variabel untuk membantu memahami kekhususan efek material. Rasio paparan 3,0 cm² hingga 6,0 cm² /ml darah (berdasarkan ketebalan perangkat) konsisten dengan ISO 10993-12. Rasio paparan lain seperti 1,5 dan 2,0 kali rasio ini mungkin perlu dipertimbangkan karena area permukaan yang lebih tinggi secara teoritis akan meningkatkan sensitivitas respons platelet terhadap material uji.

Aktivasi platelet adalah proses yang terjadi dalam beberapa waktu (menit hingga jam) dan diketahui berpotensi reversibel hingga suatu titik, atau setelah dimulai, proses ini dapat berlanjut secara non-reversibel hingga menimbulkan deformasi bentuk yang signifikan, hilangnya konstituen sitoplasma dan pelepasan mikropartikel serta kehancuran total. Proses ini tergantung pada jenis dan jumlah stimulus. Ada banyak stimulan kuat yang diketahui, yang disebut agonis trombosit, contohnya adalah trombin, ADP, dan kolagen. Permukaan asing itu sendiri, seperti alat kesehatan yang kontak dengan darah, juga dapat bersifat seperti agonis karena dapat menyebabkan pembentukan trombin. Selain itu, platelet dapat melekat pada permukaan ini, tetap melekat atau terlepas dalam keadaan teraktivasi atau tidak teraktivasi dan mengalami perubahan bentuk yang menyebabkan kerusakan platelet. Dengan demikian, menilai keadaan aktivasi trombosit secara keseluruhan pada suatu titik waktu dapat memperoleh manfaat dari penggunaan agen yang membantu "menahan" trombosit dalam keadaan fisik dan biokimiawi pada titik waktu tertentu. Oleh karena itu, jika penilaian platelet tidak dapat dilakukan segera setelah mengeluarkan material uji atau alat kesehatan dari sistem uji, sejumlah agen telah disarankan untuk melawan aktivasi platelet lebih lanjut dan untuk menstabilkan platelet^{[88][89][90][91]}. Contoh agen ini adalah asam sitrat dekstrosa (ACD/*acid citrate dextrose*), sitrat, teofilin, adenosin, dipirydimol (CTAD) dan reagen penstabil platelet lainnya, seperti ThomboFix™1. Sejauh penstabil tersebut dapat meminimalkan aktivasi platelet artefaktual, dan tidak mengaburkan interpretasi respons aktivasi platelet spesifik biomaterial, penggunaan penstabil tersebut layak dipertimbangkan, jika divalidasi untuk mengonfirmasi bahwa titik akhir yang relevan tidak terpengaruh.

B.3.3.2 Jumlah platelet

Penting untuk menentukan jumlah platelet^{45][121]} karena peran penting platelet dalam mencegah perdarahan dan dalam proses trombosis secara umum. Penurunan jumlah platelet

yang signifikan pada darah yang terpapar alat kesehatan dapat disebabkan oleh adhesi platelet, agregasi trombosit, penyerapan platelet (misalnya di limpa) atau pembentukan trombus pada bahan atau alat kesehatan. Penurunan jumlah platelet selama penggunaan alat kesehatan implan juga dapat disebabkan oleh penghancuran atau pembuangan platelet yang dipercepat dari sirkulasi. Berbagai antikoagulan mungkin cocok untuk menghitung trombosit^{[151]-[156]}.

Teknik pengambilan darah sebaiknya dapat direproduksi. Platelet dapat menjadi hiperaktif/aktif dalam berbagai kondisi, termasuk pengambilan darah yang tidak tepat. Uji seperti agregometri platelet dan *flow cytometry* dapat dipertimbangkan untuk memverifikasi reaktivitas dan aktivasi trombosit yang normal.

B.3.3.3 Aktivasi platelet: *Platelet granule-release proteins beta-tromboglobulin (β -TG)* dan *platelet factor 4 (PF4)*, *thromboxane B2 (TxB2)*, dan perubahan morfologi platelet

Penggunaan material atau alat kesehatan tertentu dapat menyebabkan aktivasi platelet, yang dapat mengakibatkan hal-hal berikut:

- a) pelepasan zat granula trombosit, seperti β TG, PF4, TxB2, dan serotonin;
- b) mengubah morfologi trombosit;
- c) generasi mikropartikel trombosit.

Platelet yang teraktivasi bersifat pro-trombogenik. Aktivasi platelet dapat dievaluasi dengan berbagai cara, seperti pemeriksaan mikroskopis (mikroskop cahaya dan elektron) terhadap morfologi platelet yang melekat pada material atau alat kesehatan dan pengukuran β TG, PF4 dan TxB2 yang dilepaskan dari platelet yang diaktifkan.

β TG dan PF4 adalah protein yang disimpan dalam butiran alfa trombosit dan dilepaskan dalam jumlah besar setelah aktivasi platelet^{[85][86][87][106]}. Kedua protein ini dapat dinilai dengan uji ELISA yang tersedia secara komersial. Peningkatan aktivasi platelet dapat terjadi melalui beberapa jalur yang terkait dengan perangkat dan bahan medis. Alat/bahan itu sendiri dapat mengaktifkan platelet, turbulensi dan gaya geser yang berlebihan dapat menyebabkan aktivasi platelet dan aktivasi platelet dapat disebabkan oleh agonis kuat seperti trombin yang dapat terbentuk sebagai akibat trombosis yang terkait dengan material/alat kesehatan atau cedera lokal. Kadar TxB2 yang tinggi, yang juga dapat diukur dengan ELISA, menunjukkan kadar senyawa prekursor tromboksan A2 yang tinggi, agonis trombosit yang kuat yang diduga dihasilkan oleh trombosit yang diaktifkan; TxB2 juga dianggap sebagai penanda independen yang dapat diandalkan untuk aktivasi platelet. Lihat B.3.3.1 dan B.4 untuk perincian tentang metodologi ELISA secara umum. Mungkin juga bermanfaat untuk menilai aktivasi platelet melalui evaluasi perubahan morfologi platelet yang terjadi ketika diaktifkan pada permukaan material/alat kesehatan^{[70][71][173]}.

B.3.4 Hematologi — Metode untuk pengujian

B.3.4.1 Hitung darah lengkap (CBC/*Complete Blood Count*)

Analisis hitung darah lengkap elektronik (sering disebut sebagai CBC) adalah uji vital yang digunakan setiap hari di laboratorium hematologi rumah sakit. Tujuan utamanya adalah untuk menghitung dengan cepat dan akurat konsentrasi berbagai populasi sel pada pasien, di mana hasil yang tidak normal dapat memberikan informasi awal dan penting mengenai berbagai potensi gangguan. CBC digunakan untuk menentukan jumlah atau proporsi sel darah putih dan sel darah merah dalam tubuh. Analisis ini mencakup penghitungan platelet. Dalam analisis interaksi darah-material/alat kesehatan, data CBC memberikan informasi dasar tentang dampak interaksi alat kesehatan/material dengan elemen darah yang terbentuk. Jumlah platelet dan leukosit sebelum dan sesudah paparan darah terhadap material/alat kesehatan

sangat berguna untuk menyimpulkan hilangnya platelet dan leukosit yang teraktivasi yang terserap dalam pembentukan gumpalan darah oleh permukaan trombogenik sehingga dapat memperkirakan potensi trombogenik permukaan tersebut^[24].

B.3.4.2 Aktivasi leukosit

Aktivasi leukosit dapat ditentukan dengan pemeriksaan mikroskopis pada permukaan alat kesehatan untuk leukosit yang teraktivasi. Metode yang lebih sederhana dan kuantitatif melibatkan penggunaan uji ELISA komersial untuk menentukan jumlah elastase *leukosit polimorfonuklear* (PMN) yang dilepaskan ke plasma setelah aktivasi dari interaksi material atau alat kesehatan dengan darah. Pendekatan lain yang didasarkan pada prinsip bahwa trombus yang menempel pada material akan mengandung sejumlah besar trombosit dan leukosit melibatkan penilaian penurunan jumlah platelet dan leukosit dalam darah^[24].

B.3.5 Sistem komplemen — Metode untuk menguji C3a dan SC5b-9

Sistem komplemen berada dalam plasma darah dalam bentuk *kaskade* biokimia yang berfungsi sebagai mekanisme pertahanan yang dirancang untuk pelengkap atau "komplemen" kemampuan antibodi untuk membersihkan patogen dari tubuh. Sistem komplemen adalah bagian dari sistem kekebalan tubuh yang disebut sebagai "sistem kekebalan bawaan". Dalam hal ini, tidak seperti perlindungan antibodi, aktivitas respons tidak diperoleh atau dapat beradaptasi dari waktu ke waktu. Sistem komplemen membentuk garis pertahanan fundamental yang bekerja bersama dan dapat memediasi mekanisme antibodi spesifik. Namun demikian, sistem komplemen juga dapat diaktifkan oleh permukaan material yang asing bagi tubuh, termasuk alat kesehatan yang kontak dengan darah^{[129][138]}.

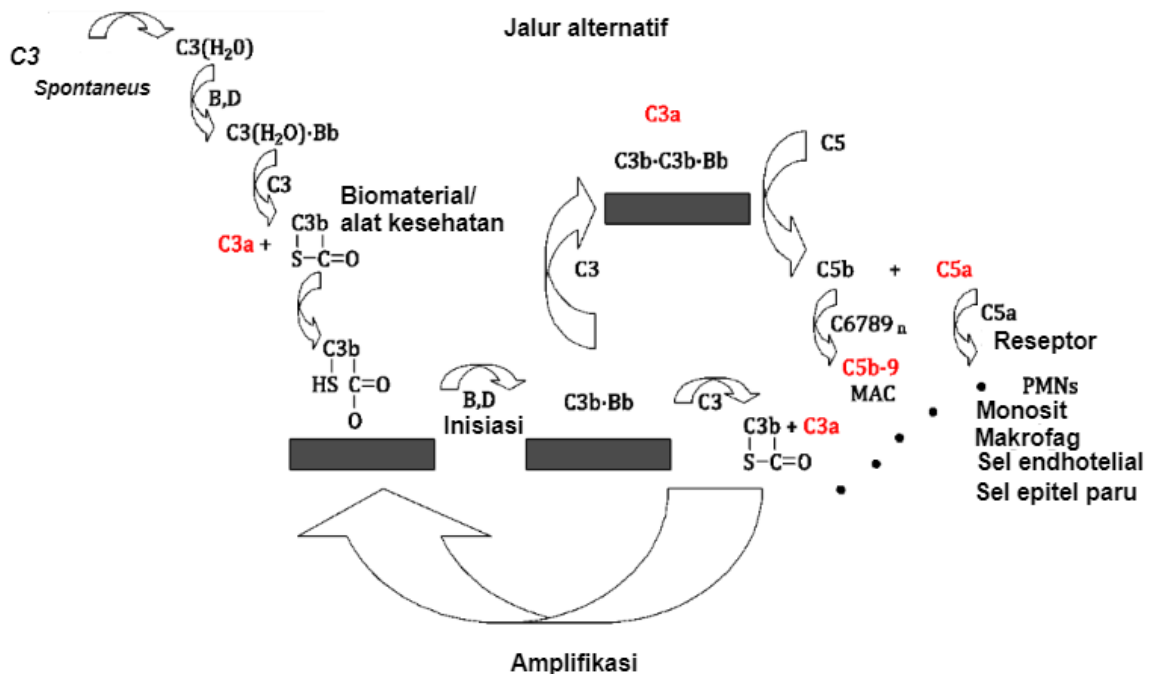
Sistem ini terdiri dari sejumlah protein yang ditemukan dalam darah yang biasanya beredar sebagai prekursor yang tidak aktif. Nomenklatur untuk protein komplemen adalah "C" diikuti dengan angka Arab sederhana untuk protein asli, dan jika dibelah, "a" atau "b" kecil untuk menunjukkan fragmen. Dengan adanya C3b reaktif yang terbentuk secara spontan dalam jumlah yang rendah, kehadiran biomaterial dapat memicu respons amplifikasi yang hasil akhirnya adalah produksi mediator inflamasi, misalnya C5a dan kompleks protein sitotoksik, misalnya *membran attack complex* (MAC), yang dapat merangsang serangkaian respons inflamasi termasuk kemotaksis sel darah putih (WBC/*white blood cell*), produksi spesies oksigen reaktif (ROS/*reactive oxygen species*), dan ekspresi sitokin^{[129][130]}. Lihat Gambar B.2.

Ada banyak protein dan fragmen protein yang membentuk sistem komplemen dan ini dapat dibagi menjadi tiga jalur aktivasi yang berbeda: jalur komplemen klasik, jalur komplemen alternatif dan jalur lektin pengikat manosa. Jalur alternatif lah yang paling dianggap terpengaruh dan reaktif terhadap kehadiran bahan medis.


Sejumlah uji ELISA komersial tersedia untuk menilai jumlah protein komplemen dalam darah. Karena C3a adalah fragmen yang diamplifikasi di mana-mana selama aktivasi, protein komplemen ini dianggap sebagai indikator umum yang baik untuk aktivasi komplemen. Selain itu, bentuk larut dari terminal MAC yang disingkat SC5b-9 juga dapat dinilai dengan uji ELISA. SC5b-9 umumnya dianggap sebagai penanda yang lebih penting yang mewakili tingkat aktivasi komplemen sepenuhnya. Peningkatan kadar salah satu komponen komplemen menunjukkan aktivasi sistem komplemen. Alat kesehatan dengan luas permukaan yang tinggi seperti filter hemodialisis dan perangkat bypass kardiopulmoner telah dikaitkan dengan tingkat komponen komplemen yang tinggi^{[129]–[138][143]} dan fenomena ini telah dikaitkan dengan pengaktifan leukosit dan penyerapan leukosit di paru-paru^{[130][137]}.

Pengukuran fragmen komplemen memiliki beberapa kelemahan. Pertama, kit ELISA hanya menguji komponen komplemen dalam fase cairan (serum atau plasma); kit ELISA tidak mengukur komponen komplemen yang diaktifkan dan melekat pada permukaan alat

kesehatan. Tergantung pada sifat material alat kesehatan, mungkin ada sejumlah besar komplemen yang diaktifkan pada permukaan alat kesehatan / material yang tidak terdeteksi oleh kit ELISA komersial. Kedua, ada spesifisitas spesies untuk banyak kit yang tersedia secara komersial dan tingkat garis dasar (*baseline*) yang tinggi diamati dalam pengujian in vitro yang khas. Dengan demikian, kontrol yang tepat perlu disertakan dan dibandingkan. Metode CH-50 klasik tampaknya berguna dengan serum manusia, sapi, babi, dan kelinci. Namun, sensitivitas CH-50 untuk mendeteksi aktivasi komplemen setelah kontak dengan material / alat kesehatan rendah, mengingat uji CH-50 mengukur aktivitas komplemen residual dan paling sering hanya sebagian kecil dari sistem komplemen yang diaktifkan oleh material / alat kesehatan. Metode fungsional lain untuk pengukuran aktivasi komplemen in vitro adalah generasi komplemen C3- atau C5-konversi yang ditentukan oleh substrat konversi. Referensi [18] dan [19] juga membahas aktivasi komplemen. Lampiran E memberikan informasi lebih lanjut tentang pertimbangan untuk pengujian komplemen material dan alat kesehatan. Lihat B.4 untuk rincian tentang metodologi ELISA umum.



Keterangan

 permukaan biomaterial/alat kesehatan

CATATAN Faktor-faktor yang ditampilkan dalam warna merah dapat diukur dengan kit pengujian yang tersedia secara komersial.

Gambar B.2 — Jalur komplemen alternatif

B.4 Pertimbangan metodologi untuk pengujian faktor plasma yang spesifik untuk koagulasi, aktivasi platelet dan leukosit serta aktivasi komplemen dengan menggunakan teknik ELISA (atau teknik lain yang serupa)

B.4.1 Umum

Penilaian koagulasi, platelet, sel darah dan aktivitas komplemen telah lama bergantung pada uji klinis yang mengukur kadar plasma protein kunci yang terbentuk dalam *kaskade* aktivasi atau dilepaskan dari aktivasi atau kerusakan berbagai jenis sel. Di sini, laboratorium klinis sering kali mengandalkan alat uji yang menggunakan teknik uji immunosorben terkait enzim yang umum. Dalam studi dasar, yang dapat berupa *in vivo* atau *in vitro*, pelaksanaannya akan bergantung pada ketersediaan antibodi/kit uji yang sesuai untuk epitop protein target spesifik spesies. Selain itu, sampel darah akan diambil dalam kondisi yang ditentukan dan disiapkan serta dianalisis sesuai dengan instruksi pengujian. Kondisi yang ditentukan dapat mencakup waktu paparan darah, tingkat antikoagulasi dan antikoagulan, suhu, aliran, hematokrit, dan faktor lainnya. Perbandingan hasil dengan kontrol yang sesuai, seperti kontrol negatif (misalnya tingkat awal atau tidak ada paparan material/alat kesehatan) dan predikat LMCD, sangat penting. Penanda aktivasi dalam darah yang secara statistik signifikan dan secara biologis signifikan lebih tinggi daripada kontrol dapat mengindikasikan desain material/alat kesehatan yang menghadirkan tingkat koagulasi, platelet, atau risiko yang dimediasi oleh komplemen terhadap pasien. Contoh protein koagulasi yang kit ELISA-nya tersedia secara komersial termasuk kompleks trombin-antitrombin (*TAT/thrombin-antithrombin complexes*), F1.2 (fragmen yang dilepaskan dari protrombin pada saat pembentukan trombin) dan FPA (fibrinopeptida A yang dilepaskan dari fibrinogen pada saat pembentukan fibrin). Demikian pula, kit ELISA komersial tersedia untuk menilai aktivasi trombosit (misalnya pelepasan butiran alfa BTG dan PF4) dan aktivasi komplemen (misalnya pembentukan C3a dan SC5b9).

B.4.2 Metode pengujian umum dan dokumentasi

B.4.2.1 Umum

Sertakan hal-hal berikut ini dengan laporan pengujian apa pun.

B.4.2.1.1 Dokumen acuan

Petunjuk penggunaan protokol ELISA pabrik di dalam kit.

B.4.2.2 Penyimpanan dan stabilitas

Jelaskan semua kondisi penyimpanan dan stabilitas reagen kit dan darah/plasma darah yang digunakan.

B.4.2.3 Prosedur

B.4.2.3.1 Persiapan sampel

Berikan instruksi umum.

Hasil pengujian tersebut selalu bergantung pada luas permukaan (SA) alat kesehatan atau material uji alat kesehatan yang sedang diuji. Untuk alasan ini, rasio SA terhadap volume darah (rasio paparan) sebaiknya ditentukan dalam setiap penelitian. Rasio paparan 3,0 cm² hingga 6,0 cm²/ml darah (berdasarkan ketebalan perangkat) sesuai dengan ISO 10993-12. Rasio eksposur lain seperti 1,5 dan 2,0 kali rasio ini mungkin perlu dipertimbangkan karena area permukaan yang lebih tinggi secara teoritis akan meningkatkan sensitivitas respons terhadap permukaan uji.

Penting untuk menentukan cara pendinginan reaksi setelah masa inkubasi, yaitu dengan mencantumkan nama dan konsentrasi agen pendingin.

B.4.2.3.2 Faktor pengenceran (*Dilution Factor/DF*)

Berikan rincian mengenai faktor pengenceran yang digunakan, pengencer yang digunakan, dll.

PERINGATAN - Variabilitas antar dan intra donor-ke-donor yang cukup besar dapat diamati, sehingga membuat satu DF yang ideal sulit untuk diidentifikasi. Oleh karena itu, disarankan untuk menggunakan minimal dua faktor pengenceran sampel uji untuk menangkap semua nilai sampel pada kurva standar. Absorbansi sampel harus berada dalam kisaran yang ditentukan oleh standar terendah dan tertinggi. Jika tidak, sampel sebaiknya diuji ulang dengan DF baru sehingga hasilnya berada dalam kisaran kurva standar.

B.4.2.3.3 Pemilihan data dalam kasus pengujian dengan beberapa DF

Jika semua atau beberapa sampel diuji dalam kondisi tanpa pengenceran, pengenceran rendah, dan pengenceran tinggi, laporkan nilai yang membutuhkan DF terkecil yang ada pada kurva standar. Juga dapat diterima jika sampel "tanpa pengenceran" mengandung beberapa nilai di luar kurva dan semua sampel "pengenceran rendah" berada di dalam kurva dan sampel "pengenceran tinggi" mengandung beberapa nilai di bawah kurva, cukup laporkan pembacaan "pengenceran rendah" di mana semua nilai berada di kurva dengan DF yang sama.

B.4.2.3.4 Persiapan standar

Jelaskan secara rinci, bagaimana kurva standar dan kontrol disiapkan.

B.4.2.3.5 Metode

Jelaskan secara rinci keseluruhan metode sesuai urutan yang diikuti, termasuk menyoroti setiap penyimpangan dari petunjuk kit ELISA.

B.4.2.3.6 Evaluasi

Jelaskan secara rinci perhitungan yang dilakukan untuk menentukan kadar plasma protein yang diukur.

B.4.2.3.7 Analisis statistik

Jelaskan secara rinci metode analisis statistik.

B.4.2.3.8 Keterbatasan dan gangguan

Sebutkan semua keterbatasan atau faktor yang mengganggu seperti teknik pengumpulan darah yang salah, misalnya pencampuran sampel dan larutan sitrat yang tidak memadai (atau antikoagulan lain seperti heparin) dapat menyebabkan nilai protein koagulasi yang meningkat secara salah; antikoagulan yang salah dapat menyebabkan peningkatan semua nilai latar belakang, dll.

B.4.2.3.9 Interval acuan

Buat daftar semua kadar plasma normal dan abnormal yang diketahui dari protein yang sedang diukur dan nilai yang diharapkan dari kontrol.

B.4.3 Lampiran

Sertakan informasi faktor pengenceran yang disarankan, formulir lembar data pengujian ELISA, daftar periksa untuk prosedur ELISA, dll.

Lampiran C (informatif) Trombosis — Metode untuk pengujian in vivo

C.1 Pertimbangan Umum

Berbagai pendekatan telah diterapkan untuk menilai proses dan kejadian trombosis. Namun, untuk alat kesehatan dan material medis yang bersentuhan dengan darah, sifat trombosis in vivo menyebabkan metode yang dijelaskan dalam C.2 dan C.3 lebih umum digunakan untuk menilai trombosis terkait alat kesehatan. Metode-metode ini digunakan dalam evaluasi alat kesehatan yang kontak permanen dan sementara. Seperti yang ditunjukkan dalam standar ini, keragaman aplikasi alat kesehatan yang bersentuhan dengan darah menunjukkan bahwa model uji in vivo harus beragam, agar dapat meniru setiap aplikasi klinis secara tepat.

Metode dalam C.2 dianggap sebagai cara yang paling relevan untuk menilai alat kesehatan untuk trombosis, karena di sini alat kesehatan yang sebenarnya dievaluasi dalam konfigurasi implan klinis yang dimaksudkan dalam model hewan. Elemen utama dalam pekerjaan ini adalah penyesuaian protokol hewan sesuai dengan ISO 10993-2, simulasi yang akurat dari aplikasi klinis manusia dan penyertaan dalam protokol metode terperinci dan analisis yang akan digunakan untuk menilai tingkat trombosis.

Metode dalam C.3 jarang digunakan dan tidak diterima secara luas di seluruh dunia. Namun, metode ini mungkin diperlukan atau diminta oleh otoritas berwenang tertentu. Metode ini disebut sebagai model implan vena non-antikoagulan (*non-anticoagulated venous implant/NAVI*) (bila antikoagulan tidak digunakan) dan model implan vena antikoagulan (*anticoagulated venous implant/AVI*) (bila antikoagulan disertakan). Metode ini melibatkan penyisipan alat kesehatan berbentuk kateter, atau material alat kesehatan yang dibentuk menjadi bentuk kateter, ke dalam pembuluh darah hewan hingga 4 jam, diikuti dengan penilaian kasar jumlah trombus pada permukaan material/kateter. Peringatan mengenai metodologi ini ditunjukkan pada Tabel C.3 bersama dengan keuntungan yang diberikan pada Tabel C.4. Karena peringatan ini, dan untuk menghindari pelabelan yang salah terhadap material dan alat kesehatan sebagai trombogenik, data yang dihasilkan dengan menggunakan model ini membutuhkan kehati-hatian dalam interpretasi[143]. Lihat juga A.3.

Jika alat kesehatan uji adalah alat kesehatan jenis kateter yang digunakan dalam aplikasi vena, metode dalam C.2 dan C.3 setara.

C.2 Studi implan in vivo alat kesehatan akhir dalam studi hewan pra-klinis

Sebagaimana dinyatakan dalam standar ini, pengujian in vivo sebaiknya dilakukan pada alat kesehatan yang ditujukan untuk aplikasi in vivo/implan (lihat 6.1.6, 6.3.2, dan 6.3.3). Protokol sebaiknya mencakup metode terperinci untuk penilaian yang tepat terhadap interaksi darah/alat kesehatan, misalnya analisis pada

- a) alat kesehatan itu sendiri,
- b) sampel darah dari subjek uji, dan
- c) jaringan yang rentan dan organ-organ akhir.

Pengujian praklinis tersebut sebaiknya menggunakan model yang mensimulasikan kondisi aplikasi penggunaan yang sebenarnya, misalnya lokasi implan yang sama, geometri, aliran, durasi kontak, suhu, kemandulan, dll. (lihat 6.1.2), dan menyertakan kontrol yang dapat ditelusuri, misalnya perangkat prediktor (lihat 6.1.3). Yang penting, pengujian sebaiknya

dilakukan pada perangkat atau komponen yang sudah jadi (jadi) (lihat 6.1.4), karena pengujian pada produk yang belum jadi dan pengujian dalam kondisi penggunaan yang disimulasikan dengan buruk tidak akan sangat memprediksi kinerja dalam aplikasi klinis (lihat 6.1.6).

Oleh karena itu, alat kesehatan dengan penggunaan *ex vivo* dan alat kesehatan dengan penggunaan *in vivo* sebaiknya diuji dalam model *ex vivo* dan *in vivo* yang sesuai. Penggunaan antikoagulan pada model *ex vivo/in vivo* sebaiknya konsisten dengan jenis dan jumlah yang digunakan pada aplikasi alat kesehatan klinis rutin dan petunjuk penggunaan produk (lihat 6.1.12). Penggunaan metode replikasi, desain statistik, dan analisis yang tepat sebaiknya dipertimbangkan dalam penelitian pada hewan (lihat 6.1.14 dan Referensi [213], [214], [215], dan [216]).

Pertimbangkan uji yang sesuai dalam kategori berikut: trombosis, koagulasi, trombosit, hematologi, dan aktivasi komplemen, seperti yang dijelaskan pada Tabel 2. Sebagai contoh, satu analisis dapat terdiri dari pemeriksaan kasar dan SEM pada perangkat untuk menilai tingkat trombosis terkait alat kesehatan. Pemeriksaan organ hilir yang rentan, misalnya paru-paru dan ginjal, untuk mencari bukti adanya tromboemboli akan membantu dalam menilai potensi tromboemboli terkait perangkat. Jika antibodi yang sesuai tersedia, koagulasi dapat dinilai dengan mengukur kadar plasma darah dari indikator koagulasi dan pembentukan fibrin, misalnya TAT dan FPA yang diukur melalui teknik ELISA. Demikian juga, penghitungan platelet sederhana dan atau pengukuran penanda aktivasi platelet, misalnya β TG, dapat digunakan untuk menilai dampak alat kesehatan terhadap trombosit. Penghitungan sel darah diferensial rutin dan hemoglobin bebas plasma dapat digunakan untuk penilaian umum faktor hematologi dan penilaian kerusakan fisik sel darah. Terakhir, untuk alat kesehatan dengan area permukaan yang luas, dengan ketersediaan antibodi, kadar plasma dari berbagai faktor komplemen dapat digunakan untuk menilai aktivasi jalur komplemen alternatif.

Secara umum, diinginkan bahwa alat kesehatan yang diuji tidak memiliki dampak yang rendah atau setara pada faktor yang diukur relatif terhadap hasil yang diamati pada alat kesehatan predikat. Hasil yang lebih tinggi dari alat kesehatan predikat dapat dibenarkan berdasarkan analisis risiko/manfaat. Alat kesehatan tanpa predikat sebaiknya menggunakan kontrol yang sesuai, dengan justifikasi yang diberikan untuk pemilihan kontrol tersebut. Evaluasi tersebut lebih disukai daripada penggunaan metode yang dijelaskan pada C.3, karena metode ini paling tepat meniru aplikasi *in vivo*. Seperti biasa, standar vertikal sebaiknya dikonsultasikan di berbagai area perangkat. Untuk yang terakhir ini, banyak contoh dapat ditemukan di antara referensi.

CATATAN 1 Untuk perangkat berbentuk kateter yang dimaksudkan untuk diimplan di lingkungan vena tanpa antikoagulasi, atau antikoagulasi, model implan NAVI dan AVI, masing-masing seperti yang dijelaskan di C.3, menjelaskan pendekatan studi *in vivo* yang sesuai untuk perangkat ini.

CATATAN 2 Untuk alat kesehatan berbentuk kateter yang dimaksudkan untuk diimplan di lingkungan arteri tanpa antikoagulasi, atau dengan antikoagulasi, model implan arteri non-antikoagulan (*non-anticoagulated arterial implant/NAAI*) atau implan arteri antikoagulan (*anticoagulated arterial implant/AAI*), pada posisi implan arteri yang sesuai seperti yang dijelaskan pada C.3, jelaskan pendekatan studi yang sesuai untuk alat kesehatan implan arteri.

Lihat juga 6.3.3 dan Lampiran A dan B.

C.3 Uji trombogenesis NAVI dan AVI secara *in vivo*

Uji NAVI dan AVI melibatkan penyisipan alat kesehatan kateter (atau alat kesehatan lain yang bentuknya sesuai), atau material alat kesehatan yang dibuat dalam bentuk kateter, ke dalam pembuluh darah hewan besar. Uji ini dilakukan dalam situasi, misalnya, untuk mengkaraktirasi kateter baru, mengevaluasi pelapis alat kesehatan baru, mengkaraktirasi material baru, dan dalam situasi pergantian vendor atau langkah pemrosesan material/alat

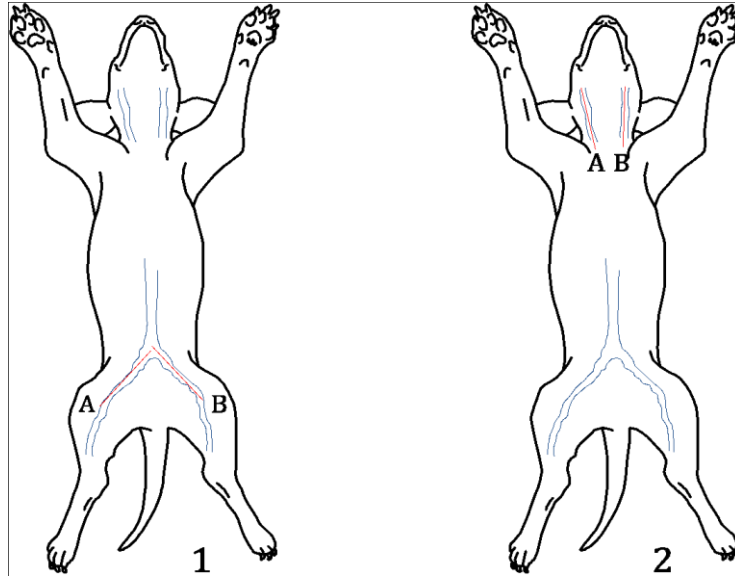
kesehatan. Dalam model itu sendiri, sejumlah posisi vena telah digunakan (lihat Gambar C.1 dan C.2). Jika tidak ada (NAVI) atau ada (AVI) antikoagulan, implan rangkap dua atau rangkap tiga diizinkan untuk diinkubasi in situ untuk jangka waktu hingga 4 jam. Implan kemudian diangkat dan dinilai jumlah trombus yang terlihat di permukaan. Model vena femoralis atau vena jugularis paling sering digunakan, di mana material/alat kesehatan uji diposisikan dalam satu vena dan material kontrol atau alat kesehatan prediktor ditempatkan di lokasi kontralateral. Uji ini membutuhkan dua hingga tiga hewan besar, dengan lokasi implan uji dan kontrol bergantian untuk menghindari bias, dan penilaian trombus pada perangkat menggunakan metode penilaian seperti yang ditunjukkan pada Tabel C.1 dan C.2. Hasil dapat dilengkapi dengan analisis gravimetri dari trombus yang diamati dan pengamatan patensi pembuluh darah. Hasil dari alat kesehatan uji sebaiknya setara dengan, atau lebih rendah trombogeniknya dibandingkan dengan LMCD yang sesuai, jika tersedia atau kecuali jika dibenarkan. Penting untuk memastikan bahwa semua komponen alat kesehatan yang bersentuhan dengan darah secara klinis telah dievaluasi. Berbagai otoritas pengawas di seluruh dunia telah menyarankan agar pengujian dan kontrol ditanamkan hingga 15 cm untuk memastikan paparan yang memadai selama pengujian. Tergantung pada konfigurasi perangkat, hal ini mungkin mengharuskan alat kesehatan khusus dibuat untuk mengurangi panjang komponen, dengan tetap mempertahankan rasio material yang sama dengan alat kesehatan lengkap. Sebagai alternatif, alat kesehatan dapat dibagi lagi menjadi beberapa sampel uji jika perlu.

Untuk alat kesehatan dan material yang ditujukan untuk implantasi arteri, metode dapat disesuaikan dengan posisi implan arteri.

PERHATIAN - Variasi hasil telah diamati antara

- a) fasilitas pengujian,**
- b) evaluator pengujian,**
- c) replikasi pada materi yang sama, dan**
- d) skor yang diperoleh pada kontrol [143].**

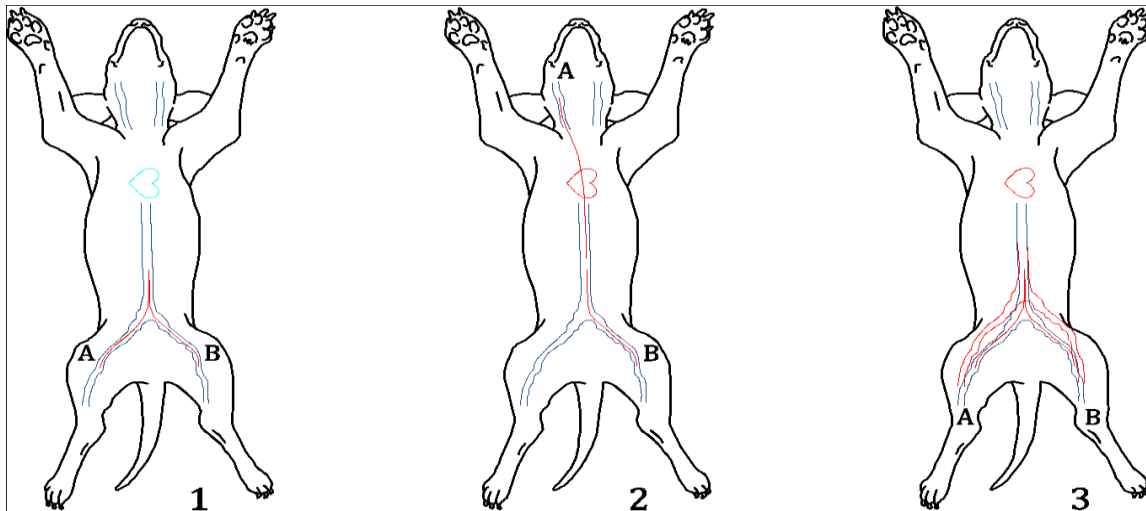
Tabel C.3 memberikan ringkasan kontroversi utama dari model NAVI dan AVI. Tabel C.4 memberikan beberapa keuntungan dari model NAVI dan AVI. Kegunaan terbesar dari model ini mungkin dalam penilaian bahan uji yang sengaja dimodifikasi untuk mengurangi pembentukan trombus akut, misalnya dalam mengevaluasi lapisan heparin.



Keterangan

- 1 femoral
- 2 jugular

Gambar C.1 — Posisi implan utama yang digunakan dalam model NAVI/AVI



Keterangan

- 1 IVC-IVC
- 2 SVC-IVC
- 3 IVC-AA
- AA abdominal aorta
- IVC inferior vena cava
- SVC superior vena cava

PERHATIAN - Penggunaan posisi implan ini memerlukan pertimbangan yang cermat terhadap artefak akibat interaksi alat kesehatan-alat kesehatan dan/atau bias terhadap perbedaan posisi dalam pembentukan trombus.

Gambar C.2 — Posisi Implan NAVI dan AVI yang jarang digunakan

Tabel C.1 — Skema Penilaian NAVI/AVI A

Deskripsi skor pembentukan trombus	Skor
Tidak ada trombosis yang signifikan (gumpalan yang sangat kecil dapat diterima pada saat penyisipan)	0
Trombosis minimal, satu lokasi	1
Trombosis minimal, beberapa lokasi	2
Trombosis yang signifikan, $> 1/4$ hingga $\leq 1/2$ permukaan implan, <i>vessel patent</i>	3
Trombosis signifikan, $> 1/2$ permukaan implan, <i>vessel patent</i>	4
Pembuluh benar-benar tersumbat	5

Tabel C.2 — Skema penilaian NAVI/AVI B

Deskripsi skor pembentukan trombus	Skor
Trombus tidak ada atau minimal dan, jika ada, tampaknya terkait dengan lokasi venotomi implan.	0
Trombus minimal, teramati menutupi 1% hingga 25% permukaan material.	1
Trombus sedang, terlihat menutupi 26% hingga 50% permukaan material.	2
Trombus parah, terlihat menutupi 51% hingga 75% permukaan material.	3
Trombus luas, mencakup 76% hingga 100% permukaan material.	4

Tabel C.3 — Peringatan Utama dalam Menggunakan Model NAVI dan AVI^[143]

Faktor	Deskripsi	Hal yang perlu diperhatikan
1	Posisi implan	Lingkungan dengan aliran yang tinggi menyebabkan rendahnya tingkat trombus yang berhubungan dengan permukaan dan sebaliknya. Oleh karena itu, sedikit perbedaan dalam faktor anatomi seperti diameter pembuluh darah target dan/atau posisi katup vena dapat berdampak potensial pada jumlah trombus yang diamati. Selain itu, jika implan ditempatkan pada sudut atau posisi yang mengubah aliran darah untuk menciptakan arus pusar yang menyebabkan stasis, pembentukan trombus pembentukan trombus dapat terjadi yang tidak terkait dengan sifat material perangkat uji.
2	Teknik implan	Setiap pengujian dan kontrol sebaiknya dimasukkan secara identik dan tepat ke dalam pembuluh darah target dengan masing-masing terletak pada posisi yang identik (sebaiknya terletak di tengah tanpa kontak dengan dinding pembuluh darah).
3	Luasnya kontak alat kesehatan-dinding pembuluh	Faktor ini berkaitan dengan cedera dinding pembuluh / denudasi endotel selama masa implantasi dan inkubasi. Implan itu sendiri dapat menyebabkan trombosis akibat kontak mekanis dengan dinding pembuluh darah, yang menginduksi cedera dan aktivasi faktor jaringan. Di sini, faktor material mungkin memainkan peran kecil dalam tingkat trombus yang diamati dan geometri perangkat dapat memainkan peran utama.
4	Waktu / masa inkubasi	Respons utama yang diukur dari luasnya trombus yang terkait dengan permukaan cenderung intens dalam 1/2 jam pertama hingga 2 jam. Beberapa saat setelah periode ini, sistem trombolitik (fibrinolitik) dapat memulai dan secara biokimiawi menghilangkan beberapa trombus yang terkait.
5	Teknik eksplan	Bergantung pada susunan dan luasnya trombus yang terkait dengan permukaan pada sampel, bahan trombus yang diukur / dinilai bisa rapuh dan mudah terkelupas selama pengambilan/pemaparan perangkat. Tanpa tindakan pencegahan khusus, bahan ini, yang sering disebut sebagai "trombus selongsong", dapat "terlepas" jika sampel ditarik dari atau terganggu di lokasi implannya. Beberapa peneliti menggunakan fiksasi perfusi in situ untuk membersihkan darah yang tidak melekat (<i>non-adherent blood element</i>) dan secara bersamaan mengikat perangkat / trombus / pembuluh menjadi lebih keras (dan lebih fisiologis).
6	Material / Permukaan material	Model ini telah digunakan untuk menilai potensi trombogenik material baru, mengevaluasi perubahan proses pada material yang sudah disetujui dan untuk memenuhi syarat vendor. Seringkali LMCD atau material digunakan sebagai kontrol, yang memberikan hasil yang sama bervariasi.
7	Material <i>non-thrombo adherent</i> diberi label <i>non-thrombogenic</i>	Penelitian ekstensif oleh para ahli di bidang ini ^{[177][178][179]} telah menunjukkan bahwa permukaan hidrofilik dapat bersifat trombogenik (dan tromboemboli) namun tidak <i>tromboadherent</i> (<i>non-thromboadherent</i>). Uji ini akan memberikan skor kelulusan untuk alat kesehatan dan material yang bersifat trombogenik dan tidak <i>tromboadherent</i> (<i>non-thromboadherent</i> .)

Tabel C.3 — (lanjutan)

8	Penerima/ subjek trombotik potensial	Makalah tentang topik ini ^{[56][57][180]} menunjukkan bahwa subjek uji dapat memiliki "potensi trombotik" yang berbeda secara signifikan, yaitu kapasitas yang berbeda untuk membentuk trombus setelah terpapar implan medis dan rangsangan lainnya. Hal ini dapat mengakibatkan perbedaan signifikan skor antara subjek uji.
9	Kekuatan statistik	Dalam mematuhi ISO 10993-2, dikombinasikan dengan variabilitas respons yang terlihat antara perangkat dan bahan predikat, serta antara subjek uji, memperoleh kesimpulan yang bermakna secara statistik sering kali tidak memungkinkan.
10	Keahlian evaluator	Pelatihan dan keahlian evaluator yang memberikan skor trombus sangat penting. Beberapa orang mungkin mengalami kesulitan membedakan antara trombus in vivo yang benar dan trombus palsu [pembentukan gumpalan pasca/ante-mortem (agonal)].
11	Dampak antikoagulasi	Hampir semua alat kesehatan dan material yang diuji dalam model AVI mendapatkan nilai nol dan lulus uji. Hal ini mempertanyakan tujuan dan alasan penggunaan model AVI. Dalam model NAVI, sebagian besar bahan hidrofobik menunjukkan berbagai tingkat trombus sementara bahan hidrofilik menunjukkan tingkat trombus yang kecil.
12	Ukuran implan terhadap diameter pembuluh darah	Ukuran implan terhadap diameter pembuluh darah selain berpotensi menyebabkan kerusakan dinding pembuluh darah, jika ukuran implan relatif terhadap diameter pembuluh darah terlalu besar, aliran darah dapat terpengaruh (stagnasi), menjadi predisposisi terjadinya trombosis. Secara umum, luas penampang implan sebaiknya tidak boleh menempati lebih dari 50% lumen pembuluh darah.

Tabel C.4 — Keuntungan menggunakan model NAVI dan AVI

Faktor	Deskripsi	Hal yang perlu diperhatikan
1	Mempelajari pembentukan trombus	Model NAVI telah diketahui secara konsisten menunjukkan pembentukan trombus in vivo yang substansial pada polimer hidrofobik, terutama setelah 1 jam atau kurang paparan darah. Dengan demikian, model NAVI merupakan model yang baik untuk mempelajari pembentukan trombus. Sebagai contoh, ini mungkin merupakan alat yang berguna untuk mempelajari dampak trombus pada perangkat, seperti sensor intravaskular ^[143] .
2	Mengevaluasi pelapis (<i>coating</i>) yang dimaksudkan untuk mengurangi trombogenesis	Pelapis yang diaplikasikan pada permukaan alat kesehatan untuk mengurangi trombogenesis sebaiknya menunjukkan respons yang berbeda dan konsisten secara terukur, misalnya lebih rendah daripada kontrol yang tidak dimodifikasi, saat diuji dalam model NAVI. Perhatian: Pengujian sebaiknya mencakup langkah-langkah untuk menilai potensi tromboemboli, karena permukaan yang tidak melekat pada trombo mungkin masih bersifat trombogenik.

Tabel C.4 — (lanjutan)

3	Mengevaluasi pelapis yang dimaksudkan untuk meningkatkan trombogenesis	Pelapis yang diaplikasikan pada permukaan alat kesehatan untuk meningkatkan trombogenesis sebaiknya menunjukkan respons yang berbeda dan konsisten secara terukur, misalnya lebih tinggi daripada kontrol yang tidak dimodifikasi, saat diuji dalam model NAVI atau AVI. Perhatian: Pengujian sebaiknya mencakup langkah-langkah untuk menilai potensi tromboemboli, karena permukaan trombogenik dapat melepaskan emboli.
4	Penyaringan material untuk aplikasi kardiovaskular	Model NAVI dan AVI paling tepat untuk menguji alat kesehatan jenis kateter yang dimaksudkan untuk dimasukkan ke dalam pembuluh darah dalam waktu singkat. Berbagai material dan desain perangkat dapat diuji dalam model ini dengan pembuluh kontralateral yang digunakan untuk menilai kontrol atau tidak dimodifikasi versi perangkat uji.

Lampiran D (informatif)

Hematologi/hemolisis - Metode untuk pengujian - Evaluasi sifat hemolitik alat kesehatan dan material alat kesehatan

D.1 Pertimbangan umum

Literatur yang luas tersedia yang menjelaskan interaksi darah/material. Sayangnya, hanya sedikit metode yang dapat diandalkan, dapat diproduksi, dan memprediksi kinerja klinis. Lampiran ini akan mengulas metode uji hemolisis yang telah diketahui dan membahas faktor-faktor yang berkaitan dengan kemampuannya untuk mengkarakterisasi material medis dan alat kesehatan seperti energi permukaan, morfologi permukaan, dan kimia permukaan. Hemolisis juga merupakan fungsi dari kekuatan mekanis lokal dan faktor biokimia.

D.2 Penyebab Hemolisis

D.2.1 Tekanan osmotik (hemolisis yang diinduksi tekanan osmotik)

Membran eritrosit adalah membran semipermeabel. Perbedaan tekanan akan terjadi ketika dua larutan dengan konsentrasi yang berbeda dipisahkan oleh membran tersebut. Tekanan osmotik terjadi ketika membran kedap terhadap gerakan zat terlarut pasif, namun memungkinkan lewatnya pelarut murni, seperti air. Perbedaan tekanan tersebut dapat menyebabkan pembengkakan eritrosit dan pecahnya membran sel dengan pelepasan hemoglobin bebas^[175]. Perlu juga dicatat bahwa kerapuhan osmotik antara sel darah merah mamalia dapat bervariasi^{[95]-[98]}.

D.2.2 Kekuatan mekanis (hemolisis yang diinduksi secara mekanis)

Faktor-faktor dinamis cairan seperti laju aliran darah, turbulensi, dan gaya geser non-fisiologis dapat merusak membran eritrosit dan berpotensi menyebabkan pecahnya membran. Hal yang terakhir ini berpotensi diperburuk oleh alat dengan operasi mekanis dan/atau jalur aliran yang rumit. Contoh alat kesehatan tersebut adalah

- apheresis dan sistem pemisahan sel,
- penyaring darah arteri^{[11][36]},
- pompa darah^{[29][30][124][157]},
- sistem *bypass kardiopulmonal*^{[5][10][11][13][37][41]},
- sistem reservoir vena/kardiotomi^{10[11]},
- alat kesehatan pendukung peredaran darah^[9],
- sistem hemodialisis^{[16][28][41]},
- *heart valves* mekanis^[2], dan
- *ventricular-assist devices*^{[236][237]}.

D.2.3 Faktor biokimia (hemolisis yang diinduksi oleh material)

Perubahan struktur membran pada tingkat molekuler dapat memodifikasi kekuatan dan sifat elastis membran eritrosit. Kekurangan faktor nutrisi atau energi metabolik (ATP) dapat

menyebabkan hilangnya bentuk diskoid dan mikrovasikulasi hemoglobin. Bahan kimia lain, misalnya bahan kimia yang dapat diekstraksi dari alat kesehatan, racun bakteri, pH dan perubahan metabolisme yang disebabkan oleh suhu, dapat mengganggu membran eritrosit^[95]. Perubahan ini dapat menyebabkan pecahnya membran pada tekanan osmotik yang lebih rendah dari yang diharapkan. Uji untuk menentukan tekanan di mana membran eritrosit pecah (kerapuhan osmotik) dapat dilakukan.

D.3 Signifikansi klinis dari hemolisis

D.3.1 Efek Toksik

Peningkatan kadar hemoglobin bebas plasma dapat menimbulkan efek toksik atau memulai proses yang dapat menyebabkan stres pada ginjal atau organ lain^[175]. Konsentrasi hemoglobin bebas plasma adalah ukuran yang mudah untuk mengukur cedera pada eritrosit, tetapi juga merupakan indikator tidak langsung dari kerusakan pada elemen darah lainnya.

D.3.2 Trombosis dan anemia

Hemolisis intravaskular dapat meningkatkan trombosis melalui serangkaian *kaskade* yang melibatkan RBC ADP dan fosfolipid yang dibebaskan^[106] yang menyebabkan aktivasi trombosit dan degranulasi agen protrombotik. Ketika hemolisis menyebabkan penurunan jumlah eritrosit yang signifikan secara klinis, anemia dan kapasitas pengangkutan oksigen yang terganggu dengan efek selanjutnya pada otak dan organ atau jaringan lain dapat terjadi.

D.4 Menentukan penilaian lulus/gagal untuk hemolisis

Hemolisis merupakan fungsi dari waktu pemaparan dan sifat-sifat material seperti energi permukaan, morfologi permukaan, dan kimia permukaan. Hemolisis juga merupakan fungsi dari tegangan geser, interaksi sel-dinding, karakter lapisan protein yang teradsorpsi, stabilitas aliran, masuknya udara, dan variasi sumber darah, usia, dan bahan kimia^{[108][112][113]}. Variabel-variabel ini perlu dikontrol secara memadai untuk perbandingan potensi hemolitik di antara material dan alat kesehatan. Spektrum metode untuk mengevaluasi hemolisis bervariasi dari model yang disederhanakan hingga model yang sangat rumit. Model *in vitro* dan *in vivo* spesifik dengan darah yang mengalir telah dipublikasikan. Studi potensi hemolitik merupakan perbandingan relatif terhadap material atau alat kesehatan yang diuji dalam model yang sama oleh laboratorium tertentu, bukan ukuran absolut. Metode uji *in vitro* mampu mengukur kadar hemoglobin plasma dalam jumlah kecil yang mungkin tidak dapat diukur dalam kondisi *in vivo* (misalnya, karena pengikatan hemoglobin plasma dengan haptoglobin dan pembuangan yang cepat dari tubuh). Pengukuran laktat dehidrogenase dan haptoglobin, sebagai indikator hemolisis dalam pengaturan tes *in vivo*, mungkin dapat diterapkan.

Tidaklah mungkin untuk menentukan tingkat universal untuk jumlah hemolisis yang dapat diterima dan tidak dapat diterima untuk semua alat kesehatan dan penggunaannya. Efek alat kesehatan terhadap hemolisis dapat tertutupi dalam jangka pendek oleh trauma prosedur pembedahan. Alat kesehatan dapat menyebabkan hemolisis dalam jumlah besar, tetapi menjadi satu-satunya penanganan yang tersedia dalam situasi yang mengancam jiwa. Secara intuitif, material yang kompatibel dengan darah adalah non-haemolitik. Pada praktiknya, banyak alat kesehatan yang menyebabkan hemolisis, tetapi manfaat klinisnya lebih besar daripada risiko yang terkait dengan hemolisis. Oleh karena itu, ketika alat kesehatan menyebabkan hemolisis, penting untuk memastikan bahwa alat kesehatan tersebut memberikan manfaat klinis dan bahwa hemolisis berada dalam batas yang dapat diterima secara klinis. Kriteria penerimaan dapat dibenarkan berdasarkan beberapa bentuk penilaian risiko dan manfaat. Pertanyaan-pertanyaan berikut ini merupakan saran untuk mengembangkan penilaian tersebut:

- Berapa lama durasi paparan alat kesehatan kepada pasien?
- Berapa banyak hemolisis yang disebabkan oleh material atau alat kesehatan? Apakah hemolisis terus berlanjut selama alat kesehatan terpapar ke pasien? Apakah hemolisis berlanjut setelah alat kesehatan dilepaskan?
- Apa risiko dan manfaat relatif dari metode lain yang tersedia untuk menangani kondisi ini?
- Apa saja sifat hemolitik dari perawatan yang diketahui ini? Bagaimana perangkat alat kesehatan yang dimaksud dibandingkan dengan perawatan lain ini?
- Seberapa efektifkah alat kesehatan uji dibandingkan dengan bentuk penanganan lain? Alat kesehatan yang lebih efektif dapat menyebabkan lebih banyak hemolisis selama penggunaan, tetapi efektivitas tambahan dapat meningkatkan manfaat bagi pasien.

D.5 Pengujian hemolisis — Pertimbangan umum

D.5.1 Metode

D.5.1.1 Umum

Hemolisis sel darah merah (eritrosit) dinilai dengan menggunakan uji in vitro. Metode langsung menentukan hemolisis karena interaksi fisik dan kimiawi dengan eritrosit. Metode tidak langsung menentukan hemolisis karena ekstraksi dari benda uji. Referensi [17] adalah salah satu standar yang khusus untuk menguji sifat hemolitik material (terutama karena faktor kimia) dan, tergantung pada ukuran dan kompleksitas alat kesehatan, mungkin tidak cukup untuk menguji seluruh alat kesehatan yang utuh. Referensi [17], [22] dan [28] adalah contoh metodologi yang secara khusus dikembangkan untuk pengujian hemolisis alat kesehatan dan bahan komponennya. Referensi [20] dikembangkan untuk menilai hemolisis yang disebabkan oleh nanopartikel medis. Dalam bentuk yang paling sederhana, untuk suspensi eritrosit yang sangat encer yang bersentuhan dengan material uji, hemolisis sering kali dilaporkan sebagai persentase hemoglobin yang telah dibebaskan ke dalam supernatan yang dinormalisasi dengan total hemoglobin yang tersedia pada awal pengujian, yaitu (konsentrasi hemoglobin bebas/konsentrasi hemoglobin total) $\times 100\%$. Jika semua eritrosit yang ada di awal percobaan dihancurkan, maka terjadi hemolisis 100%.

Selain pengujian material alat kesehatan, pengujian dinamis seluruh alat kesehatan dalam kondisi penggunaan klinis untuk mengevaluasi efek struktur perangkat, interaksi mekano-fisik darah dengan material, rentang kondisi penggunaan yang relevan secara klinis (misalnya laju aliran darah, rpm, tekanan, waktu paparan), tujuan penggunaan, dan faktor hemodinamik pada hemolisis sebaiknya dipertimbangkan. Pada banyak alat kesehatan, hemolisis yang disebabkan oleh gaya hidrodinamika dan interaksi dinamis dengan permukaan melebihi yang disebabkan oleh efek kimiawi bahan. Untuk mensimulasikan kondisi penggunaan klinis secara tepat, hematokrit darah dan faktor lain sebaiknya diperhitungkan selama pengujian hemolisis dinamis^{[30][37][41][124]}. Untuk memastikan jumlah hemolisis terburuk yang mungkin terjadi, pengujian in vitro sering kali dilakukan pada laju aliran darah tertinggi yang diharapkan dapat digunakan oleh perangkat. Referensi yang menyediakan protokol untuk pengujian hemolisis mekanis pada perangkat termasuk Referensi [5], [37], [41] dan [124].

Konsentrasi hemoglobin dalam plasma secara signifikan lebih kecil daripada konsentrasi hemoglobin darah total. Konsentrasi hemoglobin bebas plasma biasanya 0 mg/dl hingga 10 mg/dl secara in vivo, sedangkan kisaran normal konsentrasi hemoglobin darah total adalah 11.000 mg/dl hingga 18.000 mg/dl. Untuk alasan ini, berbagai metode telah digunakan untuk mengukur berbagai macam konsentrasi hemoglobin yang ditemukan selama pengujian hemolisis. Catatan untuk diperhatikan:

PERHATIAN — Beberapa uji hemolisis umum menyarankan tingkat batas untuk hemolisis yang diinduksi bahan di bawah ini di mana tidak ada/ rendah risiko yang perlu dikhawatirkan berdasarkan nilai yang secara historis diterima tetapi tidak divalidasi^[14] ^[17] ^[28]. Namun, tingkat hemolisis yang diinduksi oleh material yang lebih tinggi dapat dibenarkan berdasarkan analisis risiko/manfaat yang sesuai.

Peneliti sebaiknya menyadari bahwa uji hemolisis dapat dipengaruhi oleh bahan kimia dalam material atau larutan medis yang dapat mengubah kerapuhan eritrosit (misalnya buffer dan fiksatif tertentu, seperti formaldehid atau glutaraldehid), menyebabkan hemoglobin mengendap (misalnya oleh ion tembaga atau seng) atau mengubah spektrum absorpsi hemoglobin (misalnya oleh polietilena glikol atau etanol) [115] [170].

D.5.1.2 Pengukuran konsentrasi hemoglobin darah total

Secara umum, metode analisis yang diuraikan dalam D.5.1.2.1 dan D.5.1.2.2 telah digunakan untuk menentukan konsentrasi hemoglobin darah total (Hb)[106]. Konsentrasi hemoglobin darah total juga dapat diukur dengan menggunakan alat penghitung sel darah lengkap dan hemoglobinometer yang telah dikalibrasi.

D.5.1.2.1 Metode *cyanmethaemoglobin*

Metode klasik pertama, deteksi *cyanmethaemoglobin* dikeluarkan oleh Komite Internasional untuk Standardisasi Hematologi/*International Committee for Standardization in Haematology*^[121]. Analisis *cyanmethaemoglobin* (*hemiglobincyanide*; HiCN) memiliki keuntungan dalam hal kenyamanan, kemudahan otomatisasi, dan ketersediaan standar referensi utama (HiCN). Metode ini didasarkan pada oksidasi Hb dan pembentukan *hemiglobincyanide* selanjutnya yang memiliki serapan maksimum yang luas pada 540 nm. Agen pelisis seperti deterjen digunakan yang, selain melepaskan Hb dari eritrosit, juga mengurangi kekeruhan (sumber gangguan berupa absorbansi palsu pada 540 nm) dari pengendapan protein. Untuk konsentrasi hemoglobin total, interferensi spektral akibat plasma minimal dan absorbansi sampel dapat dibandingkan dengan larutan standar HiCN secara langsung.

Pita serapan HiCN yang luas di area ini memungkinkan penggunaan fotometer tipe filter sederhana serta spektrofotometer pita sempit baik untuk deteksi manual maupun otomatis. Penggunaan standar referensi HiCN memberikan komparabilitas di antara semua laboratorium yang menggunakan metode ini. Kerugian utama adalah potensi risiko kesehatan dalam menggunakan larutan sianida. Reagen sianida sendiri bersifat toksik melalui berbagai rute paparan, dan sebagai tambahan, melepaskan HCN pada saat pengasaman. Pembuangan reagen dan produk juga menjadi perhatian dan biaya yang cukup besar.

D.5.1.2.2 Metode besi

Metode klasik kedua untuk menentukan konsentrasi hemoglobin total didasarkan pada penentuan konsentrasi besi hemoglobin dalam larutan. Besi pertama-tama dipisahkan dari Hb, biasanya dengan asam atau pengabuan. Kemudian dititrasi dengan $TiCl_3$ atau dikomplekskan dengan reagen untuk menghasilkan warna yang dapat diukur secara fotometrik. Metode ini terlalu rumit untuk pekerjaan rutin dan jarang digunakan.

D.5.1.3 Pengukuran konsentrasi hemoglobin dalam plasma atau supernatan

Dua metode berikut ini telah digunakan untuk mengukur konsentrasi hemoglobin plasma atau supernatan.

D.5.1.3.1 Teknik optik langsung dan kimia tambahan

Karena banyak faktor yang berbeda (misalnya tradisi, kemudahan penggunaan, pembuangan limbah bahan kimia, ketersediaan larutan standar), ada sejumlah uji yang berbeda yang digunakan untuk mengukur hemoglobin plasma sebagai indikator hemolisis, tanpa ada satu metode pun yang diterima secara luas. Pengujian dapat diklasifikasikan ke dalam dua kategori besar: pengujian yang merupakan teknik optik langsung (yaitu berdasarkan kuantifikasi puncak absorbansi oksihemoglobin pada 415 nm, 541 nm atau 577 nm, secara langsung atau melalui penggunaan spektrofotometri turunan) dan pengujian yang menggunakan teknik kimia (yaitu kuantifikasi hemoglobin berdasarkan reaksi kimia dengan pereaksi seperti kromogen seperti benmidin dan hidrogen peroksida atau pembentukan sianmethemoglobin)^[109]. Semua pengujian dapat dilakukan secara manual atau otomatis.

Metode yang populer untuk menentukan konsentrasi hemoglobin didasarkan pada efek katalitiknya pada oksidasi turunan benmidin, seperti *tetramethylbenmidine*, oleh hidrogen peroksida. Laju pembentukan produk berwarna (terdeteksi secara fotometrik pada 600 nm) berbanding lurus dengan konsentrasi hemoglobin. Keuntungan dari metode ini adalah kemudahan otomatisasi (peralatan komersial), penghapusan reagen sian yang berpotensi beracun dan tidak aman bagi lingkungan serta ketersediaan set standar Hb yang dikalibrasi dengan standar referensi primer HiCN. Batas deteksi pengujian (serendah 5,0 mg/dl) sebanding dengan metode hemoglobin sianida^[106]. Kerugian utama adalah bahwa masih ada potensi risiko kesehatan dalam menggunakan pewarna benmidin dan biaya yang terkait dengan pembuangan reagen dan produk. Selain itu, rentang dinamis yang dilaporkan dari metode ini rendah (5 mg/dl hingga 50 mg/dl)^[116] dan kemungkinan penghambatan reaksi (sebanyak 40%)^[117] dapat terjadi dari antikoagulan yang membantu kalsium (misalnya sitrat, oksalat, EDTA)^[116], albumin^[104] atau komponen plasma non-spesifik lainnya^[106] yang dapat mengganggu oksidasi H₂O₂.

Untuk alasan ini, metode optik langsung, seperti yang dilakukan oleh Referensi [102], [105] atau [118] dengan sensitivitas dan produktivitas yang sebanding dapat diganti. Namun, seperti disebutkan di atas, perubahan yang diinduksi secara kimiawi pada hemoglobin dan spektrumnya dapat terjadi yang dapat membatalkan beberapa uji hemoglobin. Selain itu, kompensasi perlu dilakukan untuk gangguan latar belakang plasma endogen, karena hal ini juga dapat mengubah spektrum hemoglobin^[109]. Analisis sebaiknya menyadari keterbatasan ini dalam uji hemoglobin plasma dan memastikan apakah analisis menggunakan teknik yang tepat^{[104][109][115][170]}. Ini termasuk mengevaluasi supernatan uji untuk mengetahui adanya endapan dan membandingkan spektrum optiknya (misalnya 400 nm hingga 700 nm) dengan oksihemoglobin yang diisolasi.

D.5.1.3.2 Metode *immunonephelometric*

Metode *immunonephelometric* didasarkan pada penentuan hemoglobin plasma dengan cara *nephelometry* menggunakan antibodi yang tersedia secara komersial. Metode ini untuk pekerjaan rutin. Terdapat korelasi yang baik dan dapat dibandingkan dengan teknik optik^[107].

D.5.2 Pengawetan darah dan komponen darah

Subpasal ini menyajikan praktik terbaik yang ditunjukkan untuk pengawetan komponen darah manusia oleh *American Association of Blood Banks* [99] dan *Council of Europe*^[101]. Secara umum, material dan alat kesehatan sebaiknya diuji menggunakan darah yang kondisi kimianya meniru kondisi yang akan dialami alat kesehatan secara klinis, misalnya pilihan antikoagulan yang tepat, penggunaan pengawet darah yang minimal, dan pH darah yang sesuai^{[151]-[156]}.

Larutan antikoagulan telah dikembangkan untuk digunakan dalam pengambilan darah yang mencegah koagulasi dan memungkinkan penyimpanan eritrosit untuk jangka waktu tertentu.

Larutan ini semuanya mengandung natrium sitrat, asam sitrat, dan glukosa; selain itu, beberapa di antaranya mengandung adenin, guanosin, manitol, sukrosa, sorbitol dan/atau fosfat^{[151]-[156]}. Meskipun heparin tidak digunakan untuk pengawetan darah, heparin sering digunakan untuk antikoagulasi secara klinis dengan pasien yang terpapar alat kesehatan.

Pembekuan darah dicegah dengan pengikatan kalsium sitrat. Eritrosit memetabolisme glukosa selama penyimpanan. Dua molekul adenosin trifosfat (ATP) dihasilkan oleh fosforilasi adenosin difosfat (ADP) untuk setiap molekul glukosa yang dimetabolisme melalui siklus glikolisis anaerobik Embden-Myerhoff-Parnas. Molekul ATP mendukung kebutuhan energi eritrosit dalam mempertahankan fleksibilitas membran dan fungsi transpor membran tertentu. Konversi ATP ke ADP melepaskan energi yang diperlukan untuk mendukung fungsi-fungsi ini. Untuk memperpanjang waktu penyimpanan, alkalinitas sebaiknya dikurangi dengan penambahan asam sitrat ke dalam larutan antikoagulan. Hal ini memberikan konsentrasi ion hidrogen yang cukup tinggi pada awal penyimpanan eritrosit pada suhu 4°C. Peningkatan keasaman selama penyimpanan mengurangi laju glikolisis. Nukleotida adenosin (ATP, ADP, AMP) habis selama penyimpanan dan penambahan adenosin ke dalam larutan antikoagulan memungkinkan sintesis AMP, ADP dan ATP pengganti.

Sebagian besar glukosa dan adenin dibuang bersama plasma ketika konsentrat eritrosit dibuat. Kelangsungan hidup eritrosit yang cukup hanya dapat dipertahankan setelah pembuangan plasma jika sel tidak terlalu pekat. Konsentrat eritrosit sitrat fosfat dekstrosa (CPD) - adenin yang normal sebaiknya tidak boleh memiliki fraksi volume eritrosit yang lebih besar dari 0,80. Bahkan jika lebih dari 90% plasma dibuang, viabilitas eritrosit dapat dipertahankan dengan penambahan aditif atau media suspensi. Natrium klorida, adenin, dan glukosa diperlukan untuk kelangsungan hidup, sementara manitol atau sukrosa dapat digunakan untuk menstabilkan membran sel lebih lanjut dan mencegah hemolisis^[99].

Kesesuaian wadah untuk penyimpanan produk darah dievaluasi dengan berbagai metode yang mengukur kualitas produk darah^{[103][106]}. Wadah dengan produk darah yang mengandung antikoagulan yang sesuai disimpan dalam posisi tegak pada suhu 1°C hingga 6°C dalam kondisi statis. Pada interval yang telah ditentukan, jumlah hemoglobin plasma bebas sel diukur untuk menilai kelangsungan hidup dan kualitas produk yang disimpan. Kualitas produk yang disimpan dapat ditingkatkan dengan pencampuran yang lembut seminggu sekali. Evaluasi penyimpanan dalam wadah secara tidak langsung mengevaluasi permeabilitas wadah untuk membuang karbon dioksida dari metabolisme eritrosit tanpa adanya faktor perancu lainnya.

D.5.3 Perlindungan petugas yang menangani darah

Prosedur tertulis diperlukan untuk melindungi petugas yang menerima, menangani, dan bekerja dengan darah manusia yang berpotensi terkontaminasi. Bahan yang berpotensi terkontaminasi termasuk darah dan cairan tubuh lainnya serta produk, peralatan yang telah atau mungkin telah bersentuhan dengan darah atau cairan tubuh lainnya, dan bahan yang digunakan dalam pembiakan organisme yang menyebabkan infeksi yang ditularkan melalui darah^[114].

D.5.4 Pengambilan darah (*phlebotomy*)

Meskipun tidak mungkin untuk menjamin 100% sterilitas permukaan kulit untuk proses *phlebotomy*, namun prosedur yang ketat dan terstandarisasi untuk persiapan area *phlebotomy* sebaiknya ada. Sangat penting untuk membiarkan larutan antiseptik mengering di permukaan kulit sebelum pungsi vena dan tidak ada kontak lebih lanjut dengan permukaan kulit sebelum jarum *phlebotomy* dimasukkan^[99].

Sistem wadah tertutup (yaitu yang tidak mengandung udara ruangan) lebih disukai untuk pengumpulan darah demi mencegah kontaminasi mikroba. Tusukan jarum pada segel karet

botol spesimen sebaiknya benar-benar tertutup setelah penarikan jarum, jika tidak, vakum parsial yang tercipta setelah pendinginan dapat menarik udara yang terkontaminasi^[99].

CATATAN Penggunaan tabung vakum berpotensi menyebabkan sedikit hemolisis ^{[125] [126] [127]}.

Darah yang dikumpulkan dalam sistem terbuka dapat terkontaminasi oleh paparan udara ruangan dan tidak dianggap steril. Kontaminasi mikroba adalah penyebab hemolisis yang diketahui.

D.5.5 Pemilihan spesies

Idealnya, pengujian hemolisis sebaiknya dilakukan dengan eritrosit manusia. Namun, beberapa faktor dapat membuat pilihan seperti itu sulit atau tidak mungkin. Di beberapa negara, persediaan darah manusia terbatas dan sebaiknya dicadangkan untuk transfusi manusia. Kriteria kesehatan untuk donor manusia dan hewan juga sebaiknya dipertimbangkan. Semua darah memiliki "masa simpan" yang terbatas dan mungkin lebih sulit untuk mendapatkan sel darah manusia secara tepat waktu. Jika eritrosit hewan digunakan, perhatian sebaiknya diberikan untuk memastikan hemolisis 100% untuk mendapatkan kadar hemoglobin total karena perbedaan stabilitas membran di antara spesies hewan. Kontrol negatif sebaiknya menyebabkan hemolisis minimal sehingga aktivitas bahan uji tidak tertutupi. Eritrosit kelinci dan manusia dilaporkan memiliki sifat hemolitik yang serupa sedangkan eritrosit monyet lebih sensitif dan eritrosit marmot kurang sensitif ^{[95] [96] [97] [98] [123]}.

D.5.6 Evaluasi hemolisis - Paparan *in vitro*, *ex vivo*, dan *in vivo* terhadap darah atau komponen darah

Hemolisis dapat dievaluasi dengan paparan material atau alat kesehatan dalam kondisi *in vitro*, *in vivo*, dan *ex vivo*. Kondisi *in vitro* digunakan untuk mengevaluasi material serta alat kesehatan. Kondisi *ex vivo* dan *in vivo* digunakan untuk mengevaluasi alat kesehatan yang mungkin mengandung lebih dari satu bahan.

Penilaian *in vivo* dan *ex vivo* pada model hewan atau selama uji klinis dapat dilakukan. Pembeneran dapat dilakukan untuk salah satu dari desain studi berikut ini. Dalam kasus pertama, alat kesehatan uji dibandingkan dengan alat kesehatan yang dipasarkan di pasaran sebagai kontrol referensi dengan tingkat hemolisis yang dapat diterima. Dalam kasus kedua, subjek uji dievaluasi untuk mengetahui konsekuensi hemolisis yang signifikan secara klinis.

Tujuan dari uji *in vivo* atau *ex vivo* adalah untuk mengkarakterisasi potensi hemolitik alat kesehatan. Studi pendahuluan dapat dilakukan secara *in vitro* dan dapat menggunakan darah manusia yang masih baru atau yang sudah usang atau darah dari spesies non-manusia. Untuk alat kesehatan yang diindikasikan untuk penggunaan *ex vivo*, praktik umum yang dilakukan adalah mensirkulasi ulang darah melalui alat kesehatan dengan menggunakan kondisi yang mensimulasikan penggunaan klinis yang paling relevan secara klinis dan yang paling buruk (mis. Laju aliran darah tertinggi). Penyelidikan ini diikuti dengan simulasi *ex vivo* dalam model hewan untuk beberapa alat kesehatan atau dengan studi terbatas dan terkontrol pada manusia. Ukuran alat kesehatan dan fungsi yang dimaksudkan mempengaruhi desain penelitian ini.

D.5.7 Metode kontak langsung versus tidak langsung

Kondisi ekstraksi yang akan digunakan diuraikan dalam ISO 10993-12. Beberapa metode pengujian mengharuskan kontak langsung antara alat kesehatan dengan eritrosit, sementara metode lain menjelaskan persiapan ekstrak yang kemudian dipaparkan ke eritrosit. Pemilihan pengujian sebaiknya didasarkan pada alat kesehatan itu sendiri dan kondisi di mana alat

kesehatan tersebut akan digunakan. Kondisi ekstraksi yang harus dipertimbangkan saat suhu tinggi digunakan diuraikan dalam ISO 10993-12.

Lampiran E (informatif) Komplemen — Metode untuk pengujian

E.1 Informasi latar belakang

Aktivasi komplemen telah terlibat dalam reaksi merugikan tertentu selama terapi ekstrakorporeal klinis, khususnya pada hemodialisis^{[129][130][131][132]} dan aplikasi *bypass* jantung-paru^{[133][134][135][136]}. Terapi ini terutama melibatkan alat kesehatan dengan area permukaan kontak darah yang tinggi dan durasi kontak yang relatif singkat. Aktivasi komplemen biasanya terjadi pada tahap awal tak lama setelah darah menyentuh permukaan material alat kesehatan; aktivasi komplemen belum terlihat berlanjut untuk waktu yang lebih lama. Di sini, aktivasi diketahui dimulai dengan kontak darah dengan material alat kesehatan dan pengendapan sejumlah protein plasma, termasuk protein komplemen kritis C3 dan C3b. Kontak protein spesifik ini mengarah pada pembentukan jalur alternatif enzim C3 dan C5 convertase yang penting (C3b-Bb, C3b-C3b-Bb, masing-masing; lihat Gambar B.2). Protein C5 convertase mengkatalisis pembelahan C5 yang menghasilkan generasi C5a dan C5b. Protein C5a adalah efektor yang dikenali dari aktivasi neutrofil dan monosit yang dimediasi oleh reseptor dan fragmen C5b adalah komponen komplemen awal yang dikenali yang mengarah pada pembentukan kompleks penempelan membran komplemen (*membrane attach complex/MAC*) yang mengikat dan mengaktifkan dan/atau menghancurkan sel pengamat dengan menyebabkan lisis. WBC dapat mendeteksi fragmen C3 dan C4 yang terikat pada permukaan material, yang menghasilkan adhesi dan aktivasi permukaan selanjutnya. Aktivasi neutrofil dan monosit, pembentukan dan aktivitas MAC, serta adhesi dan aktivasi WBC pada material menjelaskan patofisiologi dasar yang terlihat secara klinis pada aplikasi perangkat dengan luas permukaan yang tinggi [136]. Yang penting, Referensi [138] telah menunjukkan peran penting dari fragmen C5a dalam memediasi banyak reaksi yang merugikan ini. Di sini, respons yang bergantung pada dosis yang identik dengan yang terlihat pada dialisis yang sebenarnya diamati dalam simulasi hemodialisis dan infus C5a yang dimurnikan. Penelitian lanjutan dalam bidang ini telah menunjukkan bahwa material yang permukaannya sangat nukleofilik (mengandung hidroksil dan amina) menunjukkan potensi pengaktifan komplemen tertinggi dan bahwa berbagai modifikasi permukaan yang mengurangi jenis kimia permukaan ini sangat meniadakan gejala sisa klinis klasik. Penelitian ini didukung oleh peneliti lain yang mempelajari hubungan aktivasi komplemen oleh bahan alat kesehatan dan respons biologis^{[136][137]}.

Untungnya, penemuan material kontak darah yang mengandung hidroksil dan amina sebagai sumber aktivasi komplemen mengarah pada pengembangan material baru yang menghilangkan atau menutupi kelompok-kelompok ini. Modifikasi material ini sangat mengurangi aktivasi komplemen pada area permukaan yang lebih luas/aplikasi kontak akut. Namun, perhatian terhadap aktivasi komplemen pada area alat kesehatan yang luas ini telah mendorong pengujian tersebut menjadi lebih umum pada semua alat kesehatan tanpa memandang luas permukaan kontak darah dan durasi implan. Hingga saat ini, tidak ada makalah ilmiah atau laporan klinis tentang efek samping terkait komplemen yang diidentifikasi oleh Kelompok Kerja ini pada aplikasi perangkat lain, yaitu semua perangkat dengan area permukaan sedang hingga kecil. Dengan demikian, referensi yang tepat yang menghubungkan aktivasi komplemen terkait perangkat dengan efek samping pada manusia, bersama dengan ambang batas area permukaan perangkat yang menjadi perhatian tidak tersedia. Perlu dicatat bahwa reaksi anafilaksis klasik telah terjadi terkait dengan penggunaan alat kesehatan. Namun, di sini, reaksi ini secara umum dikaitkan dengan agen yang diberikan, bukan pada alat kesehatan atau material alat kesehatan^{[139]-[142]}. Beberapa asosiasi yang salah tentang aktivasi komplemen pada perangkat yang terlibat mungkin muncul dari laporan tersebut^[143].

Seperti dalam menilai koagulasi, trombosis, dan aktivasi trombosit, sejumlah alat biologi molekuler (misalnya tes ELISA) tersedia untuk memantau tingkat aktivasi jalur komplemen dalam darah. Contoh protein komplemen yang tersedia secara komersial untuk kit ELISA termasuk tetapi tidak terbatas pada C3a, C5a dan SC5b9. Terlepas dari hubungan yang kuat antara patofisiologi yang dimediasi oleh komplemen dengan fragmen C5a, pengujian komplemen klasik berfokus pada penilaian kompleks C3a dan SC5b9. Sehubungan dengan alat ini, ada metode untuk menilai respons terkait seperti adhesi WBC (menggunakan SEM) dan aktivasi WBC, misalnya, menggunakan bioassay untuk pelepasan elastase PMN.

E.2 Uji aktivasi dan dokumentasi komplemen (disarankan untuk dipertimbangkan dalam melaporkan hasil uji komplemen untuk tujuan ilmiah atau peraturan)

Metode umum dan dokumentasi yang digunakan dalam pengujian komplemen menggunakan uji ELISA dijelaskan di B.4. Seperti reaksi biologis lainnya, seperti pembentukan protein koagulasi, pembentukan komplemen umumnya menunjukkan fase inisiasi, perbanyakan, dan penghentian^{[56][57][137]}. Hal ini mencerminkan reaksi pembentukan C3 dan C5 konvertase awal, amplifikasi *kaskade*/umpan balik dan periode perlambatan/deaktivasi di mana prekursor kritis dapat dikonsumsi atau protein aktif kehilangan aktivitas karena waktu paruh yang pendek atau menonaktifkan oleh protein umpan balik kontrol negatif. Dengan demikian, perbedaan urutan besarnya dalam tingkat protein komplemen diharapkan dari waktu ke waktu. Oleh karena itu, fase *kaskade* komplemen dalam darah pada saat kontak material/alat kesehatan-darah benar-benar terjadi merupakan faktor penting. Artinya, dampak material uji ketika bercampur dengan darah mungkin sangat berbeda pada setiap fase. Selain itu, karena aktivasi komplemen umumnya sebanding dengan luas permukaan yang bersentuhan dengan darah, maka luas permukaan (SA) alat kesehatan atau material alat kesehatan dapat sangat berpengaruh pada hasil. Untuk alasan ini, rasio volume SA terhadap darah (keseluruhan, plasma atau serum) (rasio paparan) sebaiknya ditentukan dalam setiap penelitian. Jika memungkinkan, rasio paparan dapat diperlakukan sebagai variabel untuk membantu memahami kekhususan efek material. Rasio paparan 3,0 cm² hingga 6,0 cm²/ml darah (berdasarkan ketebalan perangkat) konsisten dengan ISO 10993-12. Rasio eksposur lain seperti 1,5 dan 2,0 kali rasio ini mungkin perlu dipertimbangkan karena area permukaan yang lebih tinggi secara teoritis akan meningkatkan sensitivitas respons terhadap material uji.

CATATAN Akan ada batasan fisik pada jumlah material uji yang dapat diuji karena volume sistem pengujian, misalnya tabung reaksi, dan rasio eksposur target.

E.3 Pertimbangan metode uji aktivasi komplemen

Sebuah tinjauan terhadap beberapa metodologi pengujian komplemen laboratorium telah menunjukkan bahwa penggunaan alat uji yang tersedia secara komersial adalah hal yang umum. Namun, sejumlah ketidakkonsistenan di antara metode laboratorium diamati. Hal-hal tersebut adalah sebagai berikut.

- a) **Persiapan darah dan penggunaan antikoagulan:** darah yang digunakan untuk paparan material uji sangat bervariasi di antara laboratorium. Sebagai contoh, serum manusia khusus yang tersedia secara komersial, plasma manusia segar dan beku yang dikitrasi, serum manusia segar, dan darah manusia utuh yang diheparinisasi secara langsung digunakan. Dampak dari berbagai sediaan ini pada hasil komplemen belum dievaluasi, kecuali penggunaan EDTA sebagai antikoagulan. Untuk yang terakhir ini, secara umum diketahui bahwa aktivasi komplemen melalui jalur klasik bergantung pada kalsium dan melalui jalur alternatif bergantung pada magnesium. Dengan demikian, penggunaan pengkelat kalsium/magnesium yang kuat seperti EDTA akan mengikat kalsium dan magnesium yang tersedia dan mematikan aktivasi komplemen, sehingga

sebagian besar pengukuran yang menggunakan antikoagulan ini menghasilkan kadar protein komplemen yang mendekati kadar latar belakang.

Dengan penjelasan di atas, saat ini tidak ada darah standar atau sediaan darah yang diidentifikasi untuk digunakan dalam pengujian komplemen. Namun, ketika serum digunakan, serum sebaiknya utuh secara fungsional dan mempertahankan kapasitas untuk menunjukkan aktivasi komplemen. Jika *wholeblood* atau plasma digunakan, jenis antikoagulan sebaiknya dipilih dengan hati-hati untuk memastikan bahwa itu tidak menghambat atau mempotensiasi aktivasi komplemen yang disebabkan oleh alat kesehatan uji itu sendiri.

- b) Rasio luas permukaan benda uji terhadap volume darah (*wholeblood*, plasma atau serum):** beberapa laboratorium menetapkan rasio ISO 10993-12 berikut ini di mana volume darah (utuh, plasma atau serum) digunakan sebagai pengganti cairan ekstrak. Beberapa laboratorium tidak menentukan rasio dan/atau rasio variabel yang digunakan. Karena aktivasi komplemen dipengaruhi oleh luas permukaan (SA), SA yang terstandardisasi dan dilaporkan penting untuk interpretasi hasil antar dan intralaboratorium.
- c) Penggunaan kontrol:** penggunaan kontrol biomaterial negatif, seperti polipropilena, dan kontrol biomaterial positif, seperti lateks atau selulosa asetat, cukup konsisten; penggunaan kontrol negatif cair, seperti saline, dan kontrol cair positif, seperti faktor bisa ular kobra, tidak konsisten; penggunaan kontrol negatif dan positif yang disediakan dalam kit yang tersedia secara komersial cukup konsisten.
- d) Aktivasi komplemen pada alat kesehatan yang bersentuhan dengan darah diakui sebagai fenomena permukaan.** Dengan demikian, pengujian dengan ekstrak perangkat tidak tepat. Sebaliknya, pengujian komplemen pada alat kesehatan atau material sebaiknya selalu dilakukan dengan menggunakan metode kontak langsung [darah atau konstituen darah]. Bahan kontrol negatif seperti polietilen (PE) sebaiknya disertakan dalam pengujian bersama dengan bahan kontrol positif seperti selulosa yang tidak dimodifikasi, misalnya Cuprophan (jika tersedia). Sejalan dengan itu, penggunaan kontrol negatif cair seperti saline bukan merupakan kontrol negatif yang tepat untuk pengujian aktivasi komplemen alat kesehatan. Di sisi lain, aktivator komplemen cair yang kuat seperti faktor bisa ular kobra dapat digunakan untuk menunjukkan bahwa sistem pengujian bekerja pada kondisi tertentu.
- e) Persiapan/pengenceran kurva standar:** laboratorium menggunakan pengenceran standar yang berbeda untuk menghasilkan kurva standar yang menangkap sebagian besar tingkat sampel uji dan kontrol. Sebagai contoh, pengenceran 1:100, 1:200, 1:1.000 dan 1:10.000 pada standar tertinggi dilaporkan. Faktor yang paling penting di sini adalah bahwa semua sampel pada akhirnya berada di antara nilai rendah dan tinggi pada kurva standar.
- f) Periode inkubasi untuk benda uji dan kontrol:** periode inkubasi bervariasi antara laboratorium, dengan laboratorium melaporkan penggunaan periode inkubasi 60 menit, 90 menit atau 30 menit dan 60 menit dan 90 menit.
- g) Waktu inkubasi setelah penambahan substrat kromogenik:** Periode inkubasi 15 menit hingga 30 menit dilaporkan.
- h) Evaluasi sampel uji:** metode penilaian apakah material uji memberikan hasil positif atau negatif tidak konsisten di antara laboratorium. Sebagian besar laboratorium membuat perbandingan statistik hasil sampel uji dengan biomaterial dan/atau kontrol cairan positif dan negatif. Beberapa laboratorium menyertakan perbandingan dengan nilai historis, hasil

pada alat kesehatan prediktor dan/atau rumus matematika khusus yang melibatkan kontrol negatif dan positif sebagai bagian dari penilaian akhir.

Tidak ada kriteria lulus/gagal yang ditetapkan untuk tingkat aktivasi komplemen yang dapat diterima secara klinis. Penyertaan LMCD dalam pengujian aktivasi komplemen akan sangat membantu untuk interpretasi data. Data alat kesehatan pembanding dapat digunakan untuk mengevaluasi relevansi klinis dari data perangkat uji.

Jika alat kesehatan pembanding tidak dipasarkan secara legal di wilayah regulasi tempat alat kesehatan akan diajukan untuk dipasarkan, otoritas berwenang dapat meminta pengujian pembanding untuk perangkat yang sudah dipasarkan secara legal di wilayah tersebut.

Lampiran F (informatif) Uji laboratorium yang kurang umum

F.1 Umum

Lampiran ini dan Tabel F.1 menjelaskan pengujian yang telah digunakan terutama dalam penelitian untuk menilai interaksi alat kesehatan/material dengan darah. Namun, pengujian ini belum digunakan secara luas dalam pengajuan alat kesehatan sesuai peraturan. Pengujian yang disebutkan di sini adalah untuk tujuan informasi dengan peringatan bahwa pengujian tersebut mungkin tidak terstandarisasi atau berkorelasi dengan relevansi klinis. Karena strategi evaluasi biologis praklinis alat kesehatan sebaiknya berfokus pada uji yang paling bermakna dan diterima secara luas (lihat Lampiran B), maka disarankan untuk berhati-hati dalam menyertakan metode Lampiran F dalam pengajuan perangkat. Uji laboratorium yang jelas tidak direkomendasikan dapat ditemukan di Lampiran G.

Tabel F.1 — Uji yang kurang umum digunakan untuk menilai interaksi dengan darah

Uji berdasarkan kategori ^a	
Trombosis	Pengurangan aliran, analisis gravimetri, penurunan tekanan di seluruh perangkat, analisis protein teradsorpsi, teknik pencitraan
Trombosis in vitro	
Koagulasi	uji generasi trombin menggunakan kromogenik substrat, fibrinogen dan produk degradasi fibrin, D-dimer
Trombosit	penilaian adhesi trombosit, analisis <i>flow cytometry</i> aktivasi trombosit, mikropartikel trombosit pembentukan mikropartikel trombosit, pencitraan gamma trombosit radiolabel, agregometri trombosit
Hematologi	Aktivasi leukosit dengan <i>flow cytometry</i> , penilaian adhesi sel darah, kompleks platelet-lekosit
Sistem Komplemen	Bb, C3bBb, C5a
^a Karena variabilitas biologis dan keterbatasan teknis, keakuratan dan prediktif dari banyak uji ini, yang paling umum digunakan untuk tujuan penelitian, memerlukan perhatian yang cermat terhadap metodologi dan kehati-hatian dalam interpretasi hasil.	

F.2 Trombosis

F.2.1 Pengurangan aliran

Aliran (laju atau volume) diukur setelah periode penggunaan. Pengukuran dapat dilakukan selama penggunaan atau sebelum dan sesudah penggunaan. Dasar pemikiran dan interpretasi sama dengan B.2.1.

F.2.2 Analisis gravimetri (massa trombus)

Ini dilakukan setelah melepaskan perangkat dari posisi penggunaan. Dasar pemikiran dan interpretasi seperti yang dijelaskan pada B.2.1. Di sini, perbedaan berat antara berat alat kesehatan sebelum pemasangan dan berat setelah pemasangan dapat mencerminkan jumlah trombus yang ada. Peringatan penting adalah bahwa semua jaringan yang ada mungkin bukan trombus.

F.2.3 Penurunan tekanan di seluruh perangkat

Ini diukur sebelum dan sesudah periode penggunaan.

F.2.4 Analisis protein yang teradsorpsi (melalui pengikatan antibodi)

Adsorpsi protein pada material uji atau alat kesehatan yang terjadi setelah kontak dengan darah, misalnya lapisan pertama atau lapisan permukaan setelah mencapai kesetimbangan, dianggap berpotensi memengaruhi kinerja alat kesehatan dan/atau hasil klinis. Selain penilaian mikroskopis kualitatif terhadap deposisi fibrin dan trombosit pada material, estimasi kuantitatif protein permukaan dapat dilakukan dengan mengukur jumlah antibodi berlabel yang spesifik untuk protein seperti fibrinogen atau reseptor membran trombosit. Untuk tujuan ini, material dicuci terlebih dahulu setelah terpapar darah untuk menghilangkan protein dan komponen darah yang tidak melekat. Permukaan atau ekstrak permukaan kemudian digabungkan dengan pengikatan antibodi berlabel untuk analisis kualitatif atau kuantitatif. Selain itu, dimungkinkan untuk mengukur jumlah total protein yang teradsorpsi secara langsung tanpa menggunakan antibodi ^{[164][181][182][183]}.

F.2.5 Teknik pencitraan — Angiografi, ultrasonografi intravaskular, ultrasonografi Doppler, CT dan MRI

Pilihan dapat dibuat di antara metode-metode ini untuk menentukan patensi atau tingkat penyempitan cangkok atau saluran lain dan untuk mendeteksi pengendapan trombus pada alat selama kinerja *in vivo*.

F.3 Koagulasi

F.3.1 Uji pembentukan trombin menggunakan substrat kromogenik

Material yang terpapar pada sistem koagulasi utuh dengan adanya fosfolipid akan menghasilkan trombin yang dapat diukur dengan konversi substrat kromogenik [61] [62] [63].

F.3.2 Fibrinogen dan produk degradasi fibrin (*fibrin degradation products/FDP*)

Fibrinolisis fisiologis normal menghasilkan FDP X, Y, C, D dan E dalam konsentrasi di bawah 2 mg/ml plasma. Tingkat FDP yang biasanya rendah dipertahankan oleh rendahnya laju reaksi degradasi dan tingginya laju pembersihan FDP dari sirkulasi. Degradasi patologis fibrin dan fibrinogen, sebagai akibat dari peningkatan aktivasi plasminogen, menghasilkan FDP 2 mg/ml hingga 40 mg/ml atau lebih [64]. Uji ini terutama berguna untuk mengevaluasi alat kesehatan implan. Penggunaan metode yang tersedia secara komersial seperti ELISA direkomendasikan.

Dysfibrinogenemia, afibrinogenemia dan *hypofibrinogenemia* menyebabkan hasil PT, PTT dan TT yang berkepanjangan^[45].

F.3.3 D-dimer

Peningkatan kadar D-dimer menunjukkan aktivasi mekanisme koagulasi. D-dimer adalah produk degradasi yang dicerna plasmin dari fibrin ikatan silang FXIII (koagulasi dan fibrinolisis). Penggunaan uji ELISA dan/atau RIA direkomendasikan untuk mengukur protein tersebut^{[65][66]}.

F.4 Platelet

F.4.1 Penilaian adhesi platelet

Adhesi sel darah^[167] adalah ukuran kompatibilitas darah dari suatu material ketika dipertimbangkan bersama dengan embolisasi distal atau bukti aktivasi satu atau lebih faktor hematologi.

Berbagai metode telah dirancang untuk mengukur adhesi sel pada permukaan, misalnya Kunicki K-score^[75]. Sebagian besar metode ini didasarkan pada pengamatan bahwa sebagian trombosit dikeluarkan dari darah lengkap yang normal sebagai hasil dari perjalanan melalui kolom manik-manik kaca di bawah kondisi aliran atau tekanan yang terkendali.

Metode alternatif adalah penghitungan langsung platelet yang melekat pada permukaan uji. Setelah terpapar darah atau plasma yang kaya trombosit dalam kondisi standar, permukaan uji dibilas untuk menghilangkan sel yang tidak melekat, difiksasi dan disiapkan untuk mikroskop elektron cahaya atau pemindaian. Jumlah platelet yang melekat per satuan luas dihitung secara langsung dan morfologinya (misalnya jumlah penyebaran, tingkat pembentukan agregat) dicatat. Sebagai alternatif, platelet yang telah diberi label dengan ⁵¹Cr atau ¹¹¹In dapat digunakan^{[70] [71] [73]}. Metode non-isotop alternatif, metode LDH dan asam fosfatase, yang menilai aktivitas enzim dalam jumlah besar setelah lisis platelet yang menempel, juga telah dilaporkan sebagai alat yang berguna untuk menilai platelet pada permukaan^{[83] [84]}.

F.4.2 Analisis *flow cytometry* untuk aktivasi platelet

Penggunaan material atau alat kesehatan tertentu dapat menyebabkan aktivasi platelet dan ekspresi penanda aktivasi pada permukaan platelet atau pembentukan partikel mikro platelet^[173]. Penanda aktivasi permukaan platelet telah dievaluasi dengan *flow cytometry* untuk ekspresi P-selectin (GMP-140) atau ekspresi glikoprotein Ib dan IIB/IIIa teraktivasi menggunakan antibodi monoklonal. Epitop yang berbeda dari trombosit teraktivasi dikenali dengan *flow cytometry* menggunakan dua antibodi: satu spesifik untuk platelet (yaitu GP Ib atau GP IIb / IIIa) dan satu spesifik untuk aktivasi trombosit (P-Selectin) [69].

F.4.3 Pencitraan gamma dari platelet yang diberi label radioaktif

Emisi gamma yang tinggi dari ¹¹¹In memungkinkannya untuk digunakan untuk tujuan ini^{[46] [47] [50] [72]}. Metode ini memungkinkan lokalisasi dan kuantifikasi platelet yang disimpan pada alat kesehatan. Teknik ini berguna untuk penghubung eksternal serta alat kesehatan implan.

F.4.4 Agregometri platelet

Agregasi platelet^[74] diinduksi dengan menambahkan agen pengumpul (misalnya ADP, epinefrin, kolagen, dan trombin) ke dalam *platelet-rich plasma* (PRP) yang diaduk secara terus-menerus. Saat platelet berkumpul, plasma menjadi semakin jernih. Sistem optik

(agregometer platelet) digunakan untuk mendeteksi perubahan transmisi cahaya dan perekam secara grafis menampilkan variasi transmisi cahaya dari pengaturan awal. Agregasi platelet yang tertunda atau berkurang dapat disebabkan oleh aktivasi platelet dan pelepasan isi granula, peningkatan FDP atau obat-obatan tertentu (misalnya aspirin, obat anti inflamasi nonsteroid). Penting untuk diingat bahwa agregasi platelet dengan menggunakan beberapa agen bervariasi atau mungkin tidak ada pada beberapa spesies hewan. Agregasi platelet spontan, yang terjadi tanpa adanya agonis tambahan, merupakan kondisi abnormal yang mengindikasikan aktivasi platelet. Agregat platelet juga dapat diskruining dengan metode WU/HOAK^[79].

F.5 Hematologi

F.5.1 Kondisi dan morfologi leukosit

Perubahan status aktivasi leukosit dapat ditentukan dengan *flow cytometry* untuk mengevaluasi peningkatan penanda leukosit, seperti L-selectin dan CD 11b, dan dengan gangguan kuantitatif pada subpopulasi limfosit. Aktivasi leukosit juga dapat dinilai melalui evaluasi perubahan morfologi yang dialami leukosit ketika diaktifkan pada permukaan alat kesehatan. Hal ini biasanya dilakukan melalui SEM^[173].

F.5.2 Penilaian adhesi sel darah

Adhesi sel darah^[167] adalah ukuran kompatibilitas darah dari suatu bahan ketika dipertimbangkan bersama dengan embolisasi distal atau bukti aktivasi satu atau lebih faktor hematologi. Dengan metode tersebut, telah dilaporkan^[167] bahwa adhesi limfosit perifer spesies anjing dan PMN pada *beads coated* dengan poli (hidroksietil metakrilat) (PHEMA) lebih rendah daripada *beads coated* dengan polistiren dan polimer tertentu lainnya. Limfosit dan PMN terisolasi digunakan dalam penelitian ini.

F.5.3 Platelet leucocyte complexes (PLCs)

PLC dapat diukur dengan *flow cytometry* dan dapat menjadi indikator aktivasi sel darah putih dan trombosit setelah terpapar dengan perangkat dan bahan medis^[85].

F.6 Sistem Komplemen

F.6.1 Penilaian aktivasi komplemen Bb, C3bBb, dan C5a

Dari ketiga protein komplemen ini, fragmen C5a dianggap sebagai salah satu faktor komplemen yang paling penting dalam aktivasi komplemen yang terkait dengan perangkat yang bersentuhan dengan darah^[145]. Namun, pengujian rutin untuk C5a tidak diperlukan mengingat sensitivitas yang rendah dari kit ELISA yang tersedia secara komersial untuk penilaian protein ini secara *in vitro*.

Lampiran G (informatif) Uji yang tidak direkomendasikan

G.1 Umum

Pengujian yang dijelaskan pada Tabel G.1 dan di bawah ini adalah pengujian yang umumnya tidak digunakan atau diterima oleh pihak berwenang sebagai bagian dari penilaian praklinis evaluasi keamanan alat kesehatan yang bersentuhan dengan darah. Pengujian ini dianggap sudah ketinggalan zaman atau tidak memiliki manfaat ilmiah yang memadai/tidak dapat diterapkan untuk evaluasi tersebut.

Tabel G.1 — Pengujian yang tidak digunakan dalam penilaian praklinis keamanan alat kesehatan

Pengujian berdasarkan kategori	
<i>hemokompatibilitas in vitro</i>	
Koagulasi	APTT, PT and TT
Platelet	<i>template</i> waktu perdarahan, umur platelet (kelangsungan hidup)
Hematologi	jumlah retikulosit
Sistem komplemen	CH-50, C3 convertase, C5 convertase

G.2 Koagulasi

G.2.1 Waktu tromboplastin parsial teraktivasi (*activated partial thromboplastin time/APTT*), waktu protrombin (*prothrombin time/PT*) dan waktu trombin (*thrombin time/TT*)

Uji ini umumnya mengukur gangguan koagulasi yang biasanya terkait dengan tingkat abnormal faktor pembekuan pasien.

Reagen tromboplastin parsial yang menggunakan berbagai zat pengaktif, seperti kaolin atau celite, tersedia secara komersial. Dengan menggunakan reagen ini, uji ini disebut waktu tromboplastin parsial teraktivasi (APTT). APTT jarang berguna dalam evaluasi in vitro sifat trombogenik alat kesehatan/material yang bersentuhan dengan darah karena zat pengaktif menutupi aktivasi apa pun yang disebabkan oleh alat kesehatan atau material komponennya

Secara umum, uji ini tidak digunakan dalam penilaian alat kesehatan dan/atau material yang bersentuhan dengan darah.

G.3 Platelet

G.3.1 Template Waktu pendarahan

Ketersediaan alat kesehatan sekali pakai yang steril untuk menghasilkan sayatan kulit dengan kedalaman dan panjang standar dalam kondisi standar secara signifikan telah meningkatkan reproduktifitas dan nilai uji ini [67]. Hasil yang berkepanjangan menunjukkan berkurangnya fungsi platelet atau berkurangnya jumlah platelet; yang terakhir ini dapat ditentukan secara terpisah. Waktu perdarahan yang lama dikombinasikan dengan jumlah platelet yang normal telah diamati dalam hubungannya dengan beberapa perangkat penghubung eksternal dengan paparan terbatas (misalnya *bypass kardiopulmonal*) [158]. Tes ini cocok untuk digunakan dengan beberapa hewan percobaan. Pengukuran waktu perdarahan in vitro juga cocok. Uji ini tidak digunakan dalam penilaian alat kesehatan dan/atau material yang bersentuhan dengan darah.

G.3.2 Umur Trombosit

Platelet dengan emisi gamma tinggi ^{111}In diperoleh dari darah pasien dan dilabeli dengan ^{51}Cr atau ^{111}In [46] [15] [72] [148]. Kedua agen ini melabeli platelet dari segala usia yang ada dalam sampel, tidak mengelusi platelet secara berlebihan dan tidak diambil oleh sel lain atau digunakan kembali selama trombogenesis. ^{111}In memiliki keunggulan sebagai pemancar gamma yang tinggi, sehingga membutuhkan pelabelan platelet yang lebih sedikit dan memungkinkan penghitungan permukaan tubuh untuk menilai deposisi platelet lokal yang akan dikombinasikan dengan studi umur. Umur platelet yang berkurang mengindikasikan percepatan pembuangan dari sirkulasi oleh proses imun, trombotik atau proses lainnya. Uji ini tidak direkomendasikan dalam penilaian non-klinis alat kesehatan dan/atau material yang bersentuhan dengan darah.

G.4 Hematologi

G.4.1 Jumlah retikulosit

Jumlah retikulosit yang meningkat mengindikasikan peningkatan produksi eritrosit dalam sumsum tulang. Hal ini mungkin merupakan respons terhadap berkurangnya massa eritrosit yang disebabkan oleh kehilangan darah kronis (perdarahan), hemolisis, atau mekanisme lainnya^{[55][77][111]}. Uji ini tidak digunakan dalam penilaian alat kesehatan dan/atau material yang bersentuhan dengan darah.

G.5 Sistem komplemen

G.5.1 Penilaian aktivasi komplemen CH-50, C3 convertase, C5 convertase

Penurunan CH-50 merupakan indikator konsumsi komplemen total. Peningkatan kadar salah satu komponen komplemen ini menunjukkan aktivasi sistem komplemen. Beberapa material mengaktifkan komplemen dan komponen komplemen yang teraktivasi pada gilirannya mengaktifkan leukosit, menyebabkannya berkumpul dan diasingkan di paru-paru^{[129][130][132][137]}.

Pengukuran produk pemisahan komplemen memiliki kelemahan dalam hal spesifisitas spesies dan tingkat awal yang tinggi ketika dilakukan setelah pengujian in vitro. Metode CH-50 klasik tampaknya berguna dengan serum manusia, sapi, babi, dan kelinci.

Metode fungsional lain untuk pengukuran aktivasi komplemen in vitro adalah generasi komplemen C3- atau C5-konversi, yang ditentukan oleh konversi substrat. Kit ELISA yang tersedia secara komersial untuk komponen komplemen utama juga tersedia.

Uji ini pada umumnya tidak digunakan dalam penilaian aktivasi komplemen pada alat kesehatan dan/atau material medis yang bersentuhan dengan darah.

Bibliografi

International Standards

- (1) ISO 3826-3, *Plastics collapsible containers for human blood and blood components — Part 3: Blood bag systems with integrated features*
- (2) ISO 5840 (all parts), *Cardiovascular implants — Cardiac valve prostheses*
- (3) ISO 5841-3, *Implants for surgery — Cardiac pacemakers — Part 3: Low-profile connectors (IS-1) for implantable pacemakers*
- (4) ISO 7198, *Cardiovascular implants and extracorporeal systems — Vascular prostheses — Tubular vascular grafts and vascular patches*
- (5) ISO 7199, *Cardiovascular implants and artificial organs — Blood-gas exchangers (oxygenators)*
- (6) ISO 10993 (all parts), *Biological evaluation of medical devices*
- (7) ISO 12891-1, *Retrieval and analysis of surgical implants — Part 1: Retrieval and handling*
- (8) ISO 14708-2, *Implants for surgery — Active implantable medical devices — Part 2: Cardiac pacemakers*
- (9) ISO 14708-5, *Implants for surgery — Active implantable medical devices — Part 5: Circulatory support devices*
- (10) ISO 15674, *Cardiovascular implants and artificial organs — Hard-shell cardiotomy/venous reservoir systems (with/without filter) and soft venous reservoir bags*
- (11) ISO 15675, *Cardiovascular implants and artificial organs — Cardiopulmonary bypass systems — Arterial blood line filters*
- (12) ISO/IEC 17025, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*
- (13) ISO 8637, *Cardiovascular implants and extracorporeal systems — Haemodialysers, haemodiafilters, haemofilters and haemoconcentrators*

National standards

- (14) 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
- (15) 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.
- (16) 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
- (17) ASTM F756-13, *Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials*
- (18) ASTM F1984-99, *Standard practice for testing whole blood complement activation in serum by solid materials*
- (19) ASTM F2065-00E1, *Standard practice for testing for alternative pathway complement activation in serum by solid materials*
- (20) ASTM E2524-08(2013), *Standard test method for analysis of hemolytic properties of nanoparticles*
- (21) GB/T 16175, *Biological evaluation test methods for medical organic silicon materials*

- (22) 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
- (23) ASTM 2382, *Standard test method for assessment of intravascular medical device materials on partial thromboplastin time (PTT)*
- (24) ASTM F2888-13, *Standard test method for platelet leukocyte count — An in-vitro measure for haemocompatibility assessment of cardiovascular materials*
- (25) 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
- (26) 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)
- (27) USDA. 9 CFR: Code of Federal Regulations: Chapter 1; Subchapter A - Animal Welfare. In: Animal Welfare Information Center U, editor. Government Printing Office; 2004
- (28) NIH. Evaluation of hemodialyzers and dialysis membranes. Report of a Study Group for the Artificial Kidney-Chronic Uremia Program NIAMDD-1977. Chapter two. In vitro characterization of hemodialyzers. *Artif. Organs.* 1977, **1** (2) pp. 59–77
- (29) ASTM F1830-97, *Standard practice for selection of blood for in vitro evaluation of blood pumps*
- (30) ASTM F1841-97, *Standard practice for assessment of haemolysis in continuous flow blood pumps*

US FDA guidance documents

- (31) 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
- (32) 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
- (33) 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
- (34) 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
- (35) 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
- (36) 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
- (37) 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

- (38) 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
- (39) 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
- (40) 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
- (41) 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>

Thrombosis

- (42) 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
- (43) CHANDLER A.B. *In vitro* thrombotic coagulation of the blood; a method for producing a thrombus. *Lab. Invest.* 1958, **7** (2) pp. 110–114
- (44) COOPER S.L., FABRIZIUS D.J., GRASEL T.G. Methods of assessment of thrombosis *ex vivo*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1987, **516** pp. 572–585
- (45) CORRIVEAU D.M., FRITSMA G.A. Hemostasis and thrombosis in the clinical laboratory. Lippincott, Philadelphia, 1988, 443 p.
- (46) 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.
- (47) DEWANJEE M.K., KAPADVANJWALA M., SANCHEZ A., ELSON R., SERAFINI A.N., ZILLERUELO G.E. et al. Quantitation of comparative thrombogenicity of dog, pig, and human platelets in a hemodialyzer. *ASAIO J.* 1992, **38** (2) pp. 88–90
- (48) DIDISHEIM P., OLSEN D.B., FARRAR D.J., PORTNER P.M., GRIFFITH B.P., PENNINGTON D.G. et al. Infections and thromboembolism with implantable cardiovascular devices. *ASAIO Trans.* 1989, **35** (1) pp. 54–70
- (49) GROTEMEYER K.H., VIAND R., BEYKIRCH K. [Thrombocyte function in vasomotor and migraine headaches]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1983, **108** (20) pp. 775–778
- (50) Harker L.A., Kelly A.B., Hanson S.R. Experimental arterial thrombosis in nonhuman primates. *Circulation.* 1991, **83** (6, Suppl) pp. IV41–IV55
- (51) 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
- (52) KAY L. *Essentials of Haemostasis and Thrombosis*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1988, 290 p.
- (53) LEWIS J., SWEENEY J., BALDINI L., FRIEDLAND G.H., SALZMAN E.W. Assessment of thromboresistance of intravenous cannulae by 125I-fibrinogen scanning. *J. Biomed. Mater. Res.* 1985, **19** (2) pp. 99–113
- (54) 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

Coagulation

- (55) 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.
- (56) BRUMMEL-ZIEDENS K.E., ORFEO T., ROSENDAAL F.R., UNDAS A., RIVARD G.E., BUTENAS S. et al. Empirical and theoretical phenotype discrimination. *J. Thromb. Haemost.* 2009, **7** (1) pp. 181–186
- (57) 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
- (58) 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
- (59) PELZER H., SCHWARZ A., HEIMBURGER N. Determination of human thrombin-antithrombin III complex in plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Thromb. Haemost.* 1988, **59** (1) pp. 101–106
- (60) 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
- (61) 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
- (62) HEMKER H.C., GIESEN P., AL DIERI R., REGNAULT V., DE SMEDT E., WAGENVOORD R. et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2003, **33** pp. 4–15
- (63) HEMKER H.C., GIESEN P., ALDIERI R., REGNAULT V., DE SMED E., WAGENVOORD R. et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2002, **32** pp. 249–253
- (64) 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
- (65) 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
- (66) 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
- (67) 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
- (68) KOTTKE-MARCHANT K. Performance and interpretation of routine coagulation assays. In: *Laboratory Haematology Practice*. Wiley. Blackwell, Oxford, England, May 15, 2012, pp. 420–34

Platelets

- (69) 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
- (70) 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

- (71) 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; 1986. p. xxi, 1204
- (72) 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
- (73) 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
- (74) KUNDU S.K., HEILMANN E.J., SIO R., GARCIA C., OSTGAARD R.A. Characterization of an In vitro Platelet Function Analyzer, PFA-100TM. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 1996, **2** (4) pp. 241–249
- (75) 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
- (76) 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
- (77) NCCLS. Methods for reticulocyte counting (Flow cytometry and supervital dyes); Approved Guideline (H44-A, Vol. 17 No. 15). Volume H44-A, Vol. 17. Clinical and Laboratory Standards Institute; 1997
- (78) 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
- (79) 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
- (80) 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
- (81) BEST COLLABORATIVE. Platelet radiolabelling procedure: The Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. *Transfusion.* 2006, **46** (Suppl) pp. 59–66
- (82) 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
- (83) 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
- (84) TAMADA, Y., KULIK, E., IKADA, Y. Simple method for platelet counting, , in *Biomaterials*, Vol **16**, Issue 3, 1995, pp. 259-261
- (85) 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
- (86) Kottke-Marchant K. Clinical perspectives on platelet function testing. *Medical Laboratory Observer*, May, 44(5): 8-14 (2012)
- (87) ANDERSON J.M., KOTTKE-MARCHANT K. Platelet interactions with biomaterials and artificial devices. *CRC Critical Reviews in Biocompatibility.* 1985, **1** pp. 111–204
- (88) SCHMIDT V., HILBERG T. ThromboFix platelet stabilizer: advances in clinical platelet analyses by flow cytometry? *Platelets.* 2006 Jun, **17** (4) pp. 266–273
- (89) 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

- (90) MURIITHI E.W., BELCHER P.R., MENYS V.C., CHAUDHRY M.A., RACO L., DAY S.P. et al. Quantitative detection of platelet aggregates in whole blood without fixation. *Platelets*. 2000 Feb, **11** (1) pp. 33–37
- (91) MACEY M., AZAM U., MCCARTHY D., WEBB L., CHAPMAN E.S., OKRONGLY D. et al. 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
- (92) DIMITRIEVSKA S., MAIRE M., DIAZ-QUIJADA G.A., ROBITAILLE L., AJJI A., YAHIA L. et al. Low thrombogenicity coating of nonwoven PET fiber structures for vascular grafts. *Macromol. Biosci.* 2011 Apr 8, **11** (4) pp. 493–502
- (93) DE SOMER F., VAN BELLEGHEM Y., FOUBERT L., FRANÇOIS K., DUBRULLE F., DE WOLF D. et al. *In vivo* evaluation of a phosphorylcholine coated cardiopulmonary bypass circuit. *J. Extra Corpor. Technol.* 1999 Jun, **31** (2) pp. 62–66
- (94) CENNI E., GRANCHI D., VERRI E., CAVEDAGNA D., GAMBERINI S., FALSONE G. et al. 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

Haematology (including haemolysis)

- (95) 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
- (96) 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
- (97) MATSUZAWA T., IKARASHI Y. Haemolysis of various mammalian erythrocytes in sodium chloride, glucose and phosphate-buffer solutions. *Lab. Anim.* 1979, **13** pp. 329–331
- (98) 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
- (99) AABB. Standards for blood banks and transfusion services. In: AABB Committee on Standards, editor. Washington, DC: American Association of Blood Banks 1994. p. v
- (100) BEDNAR R., BAYER P.M. Correction: measurements of plasma hemoglobin. *Clin. Chem.* 1993, **39** (9) pp. 2027–2028
- (101) 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. Strasbourg: Council of Europe Pub.; 2007. p. 271
- (102) CRIPPS C.M. Rapid method for the estimation of plasma haemoglobin levels. *J. Clin. Pathol.* 1968, **21** (1) pp. 110–112
- (103) 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
- (104) 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
- (105) 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
- (106) 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.
- (107) LAMMERS M., GRESSNER A.M. Immunonephelometric quantification of free haemoglobin. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1987, **25** (6) pp. 363–367
- (108) LAMPERT R.H., WILLIAMS M.C. Effect of surface materials on shear-induced haemolysis. *J. Biomed. Mater. Res.* 1972, **6** (6) pp. 499–532

- (109)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
- (110)MIALE J.B. *Laboratory medicine, haematology*. St. Louis: Mosby; 1982. [64] p. of plates; xi, 1084 pp
- (111)MOSBY YEAR BOOK. *A Color Atlas of Comparative, Diagnostic and Experimental Haematology*. Mosby-Year Book Europe Ltd, London, England, 1994
- (112)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
- (113)OFFEMAN R.D., WILLIAMS M.C. Material effects in shear-induced haemolysis. *Biomater. Med. Devices Artif. Organs*. 1979, **7** (3) pp. 359–391
- (114)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
- (115)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
- (116)SIGMA DIAGNOSTICS. *Plasma Hemoglobin: Quantitative, colorimetric determination in plasma at 600 nm (Procedure No. 527, April 1991)*. Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, 1991
- (117)STANDEFER J.C., VANDERJAGT D. Use of tetramethylbenzidine in plasma hemoglobin assay. *Clin. Chem.* 1977, **23** (4) pp. 749–751
- (118)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
- (119)KOTTKE-MARCHANT K., ed. *Laboratory Haematology Practice*. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, England, 2012
- (120)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
- (121)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
- (122)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)
- (123)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
- (124)MUELLER M.R., SCHIMA H. et al. *In vitro* hematological testing of rotary blood pumps: Remarks on standardization and data interpretation. *Artif. Organs*. 1993, **17** (2) pp. 103–110
- (125)LIPPI G., BLANCKAERT N., BONINI P., GREEN S., KITCHEN S., PALICKA V. et al. 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>
- (126)SHARP M.K., MOHAMMAD S.F. Scaling of haemolysis in needles and catheters. *Ann Biochem Engineer.* 1998, **26** pp. 788–797
- (127)SAVORY J., BILL J.G. Haemolysis of specimens drawn in the ER [Q&A]. *Lab. Med.* 1996, **27** p. 802
- (128)KENNEDY C., ANGEMULLER S., KING R. et al. A comparison of haemolysis rates using intravenous catheters versus venipuncture tubes for obtaining blood samples. *J. Emerg. Nurs.* 1996, **22** pp. 566–569

Complement

- (129) CHENOWETH D.E. Complement activation produced by biomaterials. *ASAIO Trans.* 1986, **32** (1) pp. 226–232
- (130) 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
- (131) CHENOWETH D.E. Complement activation during hemodialysis: clinical observations, proposed mechanisms and theoretical implications. *Artif. Organs.* 1984, **8** pp. 231–287
- (132) 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
- (133) 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
- (134) VELTHUIS H., JANSEN P.G., HACK C.E., EIJSMAN L., WILDEVUUR C.R. Specific complement inhibition with heparin-coated extracorporeal circuits. *Ann. Thorac. Surg.* 1996, **61** pp. 1153–1157
- (135) FITCH J.C., ROLLINS S., MATIS L., ALFORD B. et al. 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
- (136) HSU L.C. Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits: current status. *Perfusion.* 2001, **16** pp. 417–428
- (137) 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
- (138) 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
- (139) 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
- (140) LAROCHE D., AIMONE-GASTIN I., DUBOIS F. et al. Mechanisms of severe, immediate reactions to iodinated contrast material. *Radiology.* 1998, **209** (1) pp. 183–190
- (141) 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
- (142) 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
- (143) 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
- (144) BLAJCHMAN M.A., OZGE-ANWAR A.H. The role of the complement system in hemostasis. *Prog. Hematol.* 1986, **XIV** pp. 149–182
- (145) JOHNSON R.J. Complement activation during extracorporeal therapy: biochemistry, cell biology and clinical relevance. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1994, **9** pp. 36–45
- (146) FIANE A.E., VIDEM V., LINGAAS P.S., HEGGELUND L., NIELSEN E.W., GEIRAN O.R. et al. 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
- (147) SPEIDL W.S., KATSAROS K.M., KASTL S.P., ZORN G., HUBER K., MAURER G. et al. 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

Animal models

- (148) 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
- (149) 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
- (150) 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. Organs*. 1979, **2** pp. 124–132

Anticoagulation

- (151) 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
- (152) Anticoagulant Citrate Dextrose Solution 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
- (153) 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. p 165; PF 31(3), p. 730
- (154) 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
- (155) 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
- (156) 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

Blood pumps

- (157) MUELLER M.R., SCHIMA H., ENGELHARDT H., SALAT A., OLSEN D.B., LOSERT U., WOLNER E. In vitro hematological testing of rotary blood pumps: remarks on standardization and data interpretation. *Artif. Organs*. 1993, **17** (2) pp. 103–110

Cardiopulmonary bypass

- (158) 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
- (159) 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

- (160) 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

Catheters

- (161) LEACH K.R., KURISU 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
- (162) 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
- (163) 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

General

- (164) 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
- (165) DAWIDS S.G. Test procedures for the blood compatibility of biomaterials. Dordrecht; Boston: Kluwer Academic Publishers; 1993. xii, 684 p
- (166) 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
- (167) 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
- (168) 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.
- (169) NHLBI. Guidelines for blood/material interactions. Bethesda, MD: National Heart Lung and Blood Institute; 1985 September 1985. Report nr NIH: 85-2185
- (170) NORTHUP S.J. Hemocompatibility: Not all devices are created equal. *MDDI.* 1997 January, **1997** pp. 145–150
- (171) 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
- (172) 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
- (173) 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
- (174) 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
- (175) 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
- (176) 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
- (177) RATNER B.D. Blood compatibility – a perspective. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2000, **11** pp. 1107–1119
- (178) 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
- (179) 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
- (180) KAPLAN S., MARCOE K.F., SAUVAGE L.R., WU H.D., MATHESSEN 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
- (181) 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
- (182) 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
- (183) 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

Heart valves

- (184) 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
- (185) 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.
- (186) 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
- (187) 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

Hemodialysis

- (188) 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
- (189) 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) pp. 448–452
- (190) 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
- (191) 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

In vitro models

- (192) Chandler A.B. In vitro thrombotic coagulation of the blood; a method for producing a thrombus. *Lab. Invest.* 1958, **7** (2) pp. 110–114
- (193) MUNCH K., WOLF M.F., GRUFFAZ P., OTTENWALTER 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
- (194) 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
- (195) 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
- (196) TAYAMA E., OHTSUBO S., NAKAZAWA T., TAKAMI Y., NIIMI Y., MAKINOCHI 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
- (197) AMRANI D.L., LEE C., EARLE K., DIORIO J., MURPHY M., YANG J. et al. LiVecchi A. An In vitro Bovine percardial Haemocompatibility Testing System. *J. Heart Valve Dis.* 1998, **7** pp. 268–272
- (198) BOSWALD M., LUGAUER S., BECHERT T., GREIL J., REGENFUS A., GUGGENBICHLER J.P. Thrombogenicity testing of central venous catheters in vitro. *Infection.* 1999, **27** (Suppl 1) pp. S30–S33
- (199) VAN OEVEREN W., TIELLIU 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
- (200) 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
- (201) 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
- (202) 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
- (203) STANG K., KRAJEWSKI S., NEUMANN B., KURZ J., POST M., STOPPELKAMP S. et al. Haemocompatibility testing according to ISO 10993-4: Discrimination between pyrogen- and device-induced hemostatic activation. *Mater. Sci. Eng. C.* 2014, **42** pp. 422–428

***In vitro* versus *in vivo* models**

- (204) DIDISHEIM P., DEWANJEE M.K., KAYE M.P., FRISK C.S., FASS D.N., WAHNER 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

Pathology

- (205) 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.
- (206) 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.
- (207) GREWE P.H., THOMAS D., MACHRAOUI A., BARMEYER J., MULLER K.M. Coronary morphologic findings after stent implantation. *Am. J. Cardiol.* 2000, **85** (5) pp. 554–558

- (208) PRADO C.M., VIARO F., BALDO C.F., AUGUSTO V.D.S., RODRIGUES A.J., EVORA P.R. Glycol methacrylate-embedding medium to study morphological alterations of saphenous vein under brief and crescent pressurizations. *Acta Cir. Bras.* 2008, **23** (Suppl 1) pp. 77–82, discussion 82
- (209) 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
- (210) 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
- (211) 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*
- (212) MITREČIĆ D., CUNKO V.F., GAJOVIĆ S. 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

Statistics

- (213) FESTING M.F. The design and statistical analysis of animal experiments. *ILAR J.* 2002, **43** (4)
- (214) FESTING M.F., ALTMAN D.G. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J.* 2002, **43** (4)
- (215) FESTING M.F. Design and statistical methods in studies using animal models of development. *ILAR J.* 2006, **47** (1)
- (216) DESIGN AND ANALYSIS OF ANIMAL STUDIES IN PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT. Shein-Chung Chow and Jen-pei Liu, Editors, Chapman & Hall CRC Biostatistics Series, 1998

Vascular grafts

- (217) 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
- (218) 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
- (219) 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.
- (220) 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
- (221) TOES G.J., VAN MUISWINKEL K.W., VAN OEVEREN W., SUURMEIJER 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
- (222) 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

- (223) 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
- (224) 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
- (225) ZILLA P., GREISLER H.P. Tissue engineering of vascular prosthetic grafts (Tissue Engineering Intelligence Unit). Landes Bioscience, 1999, 621 p.
- (226) DUDASH L.A., KLINGMAN F., SARETT 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
- (227) 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
- (228) 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
- (229) 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
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
- (230) 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

Vascular stents

- (231) GREWE PH., THOMAS D., MACHRAOUI A., BARMAYER J., MULLER K.M. Coronary morphologic findings after stent implantation. *Am. J. Cardiol.* 2000, **85** (5) pp. 554–558
- (232) RIPPSTEIN P., BLACK MK., BOVIN 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
- (233) 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
- (234) 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

Ventricular-assist devices

- (235) 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
- (236) 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

Informasi perumus SNI

[1] Komite Teknis Perumus SNI

Komite Teknis 11-04 *In Vitro Diagnostic Test System*

[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis perumus SNI

Ketua	:	Eka Purnamasari
Sekretaris	:	Melly Juwitasari
Anggota	:	1. Rini Sugiyati
		2. Lucia Herminawati
		3. Irni Anggraeni
		4. Seriyati Naibaho
		5. Rina Sitanggang
		6. Yudhistira
		7. Louisa Markus Kusmawan
		8. Yeva Rosana
		9. Miswar Fattah

[3] Konseptor Rancangan SNI

Rini Sugiyati, Venni Vernissa, Chintya Mortisalma R

[4] Sekretariat pengelola Komite Teknis perumus SNI

Direktorat Pengawasan Alat Kesehatan, Kementerian Kesehatan