



# 中华人民共和国国家标准化指导性技术文件

GB/Z XXXXX—ISO/TR 21582:2021

## 致热性 医疗器械热原试验的原理和方法

Pyrogenicity—Principles and methods for pyrogen testing of medical devices

(ISO/TR 21582:2021, IDT)

草案版次选择

(本草案完成时间：2022.2)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

# 目 次

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| 前 言.....                 | II  |
| 引 言.....                 | III |
| 1 范围.....                | 4   |
| 2 规范性引用文件.....           | 4   |
| 3 术语和定义.....             | 4   |
| 4 缩略语.....               | 5   |
| 5 热原表征.....              | 5   |
| 5.1 概述.....              | 5   |
| 5.2 细菌内毒素.....           | 6   |
| 5.3 除内毒素以外的微生物成分.....    | 6   |
| 5.4 促炎细胞因子.....          | 6   |
| 5.5 化学物质和其他热原.....       | 6   |
| 5.6 发热反应的原理.....         | 7   |
| 6 致热性评估.....             | 7   |
| 6.1 概述.....              | 7   |
| 6.2 细菌内毒素试验 (BET) .....  | 7   |
| 6.2.1 概述.....            | 7   |
| 6.2.2 LAL 反应的工作原理.....   | 8   |
| 6.2.3 BET 的一般程序.....     | 8   |
| 6.2.4 BET 的特性.....       | 8   |
| 6.3 家兔热原试验.....          | 8   |
| 6.3.1 概述.....            | 8   |
| 6.3.2 家兔试验的原理.....       | 8   |
| 6.3.3 家兔试验的步骤.....       | 9   |
| 6.3.4 家兔试验的特点.....       | 9   |
| 6.4 人细胞热原试验 (HCPT) ..... | 9   |
| 6.4.1 概述.....            | 9   |
| 6.4.2 HCPT 的原理.....      | 9   |
| 6.4.3 人类细胞的选择.....       | 9   |
| 6.4.4 细胞因子标志物的选择.....    | 10  |
| 6.4.5 HCPT 的步骤.....      | 10  |
| 6.4.6 HCPT 的特点.....      | 11  |
| 6.4.7 确认研究.....          | 11  |
| 7 结论.....                | 11  |
| 参 考 文 献.....             | 13  |

## 前 言

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

本文件等同采用ISO/TR 21582:2021《致热性 医疗器械热原试验的原理和方法》。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会（SAC/TC 248）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件所废止文件的历次版本发布情况为：

本文件为首次制定。

## 引 言

目前，医疗器械的安全性评估以 GB/T 16886 系列标准中推荐的毒理学和其他研究为指导。

材料介导的热致性包含在 GB/T 16886.11-2021 附录 G 中的全身反应中，但本文件对致热性进行了总体描述。

热原反应是指化学物质或其他物质的不良反应，如微生物成分产生发热反应。为了评价直接或间接接触血液循环和淋巴系统、脑脊液（CSF）并系统地与人体相互作用的产品的安全性，需要对热原反应进行试验。

目前，家兔体内致热性试验和体外细菌内毒素试验已作为评价医疗器械及其材料致热性的公认方法。已经建立包括试验样品的样品制备在内的基本程序在国际中协调一致，并在相关指南和药典中提到。

最近，一种利用人免疫细胞进行的体外热原试验，即基于人体细胞的热原试验（HCPT），已经被开发出来并应用于非肠道药物的热原试验。由于直接或间接接触人类血细胞（HCPT），目前正在考虑将其应用于医疗器械热原试验。

# 致热性 医疗器械热原试验的原理和方法

## 1 范围

本文件规定了医疗器械及其材料的热原试验的原理和方法。  
本文件适用于医疗器械及其材料的热原试验。

## 2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

ISO 和 IEC 维护的用于标准化的术语数据库，地址如下：

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

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

### 3.1

#### 医疗器械 medical device

制造商的预期用途是为下列一个或多个特定医疗目的用于人类的，不论单独使用或组合使用的仪器、设备、器具、机器、用具、植入物、体外应用试剂、软件、材料（3.12）或者其他相似或相关物品。这些目的是：

- 疾病的诊断、预防、监护、治疗或者缓解；
- 损伤的诊断、监护、治疗、缓解或者补偿；
- 解剖或生理过程的研究、替代、调节或者支持；
- 支持或维持生命；
- 妊娠控制；
- 医疗器械的消毒；
- 通过对取自人体的样本进行体外检查来提供医疗信息；

其作用于人体体表或体内的主要设计作用不是用药理学、免疫学或代谢的手段获得，但可能有这些手段参与并起一定的辅助作用。医疗器械包括齿科器械。

注：在某些监管机构认为是医疗器械，但在其他监管机构则不被认为是医疗器械的产品是：

- 消毒物质；
- 残疾人员的辅助用品；
- 含有动物和/或人类组织的器械；
- 体外受精或辅助生殖技术的器械。

[来源：GHTE/SG1/N071：2012，5.1，有修改]

### 3.2

#### 热原 pyrogen

引起发热的物质。

### 3.3

#### 致热性 pyrogenicity

化学物质或其他物质产生发热反应的能力。

### 3.4

**发热反应 febrile response**

由于调定点温度的升高，温度高于正常范围。

注：也称为发热或热病。

**3.5****氧化磷酸化 oxidative phosphorylation**

大多数有氧生物的代谢途径，它利用酶氧化营养物质并释放能量。

**4 缩略语**

下列缩略语适用于本文件。

COX: 环氧化酶

CpG: DNA序列中靠近鸟嘌呤（G）和胞嘧啶（C），p表示C和G由磷酸二酯键连接。甲基基团位于胞嘧啶环的5位

ELISA: 酶连接免疫吸附试验HCPT，如单核细胞活化试验（MAT）

IKK: IκB激酶，一种参与细胞对炎症反应的增殖的酶复合体

IRAK: 人白介素受体相关激酶

LAL: 鲎变形细胞溶解产物

LPS: 脂多糖

MD-2: 结合于TLR4的胞外结构域的分子分泌糖蛋白，

MCP: 巨噬细胞趋化蛋白

MIP: 巨噬细胞炎症蛋白

NOD: 核苷酸结合寡聚化结构域蛋白

PGE<sub>2</sub>: 前列腺素E<sub>2</sub>

PANTES: 受激活调节，正常T表达和分泌

RNA: 核糖核酸

SEA: 葡萄球菌肠毒素A

Spe C: 链球菌致热性外毒素C

Spe F: 链球菌致热性外毒素F

TBK: TANK绑定激酶

TLR: Toll样受体

TNF: 肿瘤坏死因子

TSST: 中毒性休克综合征毒素

**5 热原表征****5.1 概述**

根据热原的来源，发热反应分为以下三种类型：

- a) 由化学物质引起的材料介导的致热性；
- b) 内毒素介导的致热性；
- c) 由微生物成分而不是内毒素介导的致热性。

非内毒素介导的致热性是对应于源自上述a)和c)的发热反应的通用说法。然而，后者可以清楚地区别于材料介导的致热性，因为发热反应起源于微生物污染。

TLRs是构成免疫系统抵御微生物感染重要组成部分的蛋白质，与微生物成分引起的致热性密切相关。迄今为止，13种TLR1和TLR13之间的人类TLR以及其中一些受体激动剂已被确定。可以在医疗器械领域评估的大多数热原可能是源自微生物的生物活性物质，这些微生物作为器械制造过程的污染物存在或

存在于材料中。由于这些成分是 TLR 激动剂，对人体起到致热原的作用，因此 TLR 的知识对于理解热原非常重要。

## 5.2 细菌内毒素

细菌内毒素是革兰氏阴性菌外膜的重要成分，是可被TLR4识别的最强的热原。内毒素是宿主免疫反应的调节剂，表现出多种生物活性，如巨噬细胞的活化、有丝分裂性和佐剂性，除致热性外，还引起施瓦茨曼反应（Schwartzman reactions）。从临床角度看，内毒素引起脓毒症、脓毒性休克和多器官衰竭，是死亡率较高的全身性疾病。

内毒素通常由一种可分为O型-特异性链的杂多糖部分、一种核心低聚糖和一种被称为脂质A的脂质成分组成，它是内毒素的生物活性中心。内毒素的效力受酰化和磷酸化模式以及脂质A分子中与磷酸残基结合的极头基的影响。此外，内毒素对其生物活性的表达具有物种特异性。

在自然界中，革兰氏阴性菌广泛分布于水（河流和海洋）、空气、土壤和人体中。因此，由天然物质制成的生物材料很可能被细菌及其成分所污染。制造过程中的高压灭菌、辐照和气体灭菌能够杀死细菌。然而，微生物成分，特别是内毒素不能用这种普通的灭菌方法灭活，一旦被污染，在制造过程中就很难去除内毒素。在制造过程中，内毒素污染可以通过除热原来减少或消除内毒素污染（例如：250℃，30min，使用化学物质如多粘菌素-B<sup>[50][66]</sup>灭活内毒素，或在清洗和制造过程中使用无内毒素水）。

## 5.3 除内毒素以外的微生物成分

微生物能产生除内毒素以外的各种生物活性物质。脂磷壁酸是革兰氏阳性细菌外膜的重要组成部分，是内毒素的对应物，作为被TLR2识别的热原，与TLR1或TLR6相互作用并形成异二聚体。脂蛋白、脂肽和脂阿拉伯甘露聚糖是各种微生物的细胞成分，也被称为TLR2激动剂。虽然构建革兰氏阳性和革兰氏阴性菌细胞壁的肽聚糖被认为是TLR2激动剂，但最近有研究表明，NOD1和NOD2蛋白可以发挥介导其生物活性表达的作用，而不是TLR2。此外，病毒双链RNA、细菌鞭毛、细菌和病毒CpG DNA分别被鉴定为TLR3、TLR5和TLR9的激动剂，它们对人类都是致热原。虽然还没有任何一种（1,3）-β-D-葡聚糖制备的致热性的报道，但可以注意到，某些种类的（1,3）-β-D-葡聚糖能增强内毒素毒性。

据报道，各种致病微生物产生的外毒素和肠毒素，如TSST-1、SEA、SpeF和SpeC，通过与TLR信号转导不同的毒素特异性方式引起人体发热反应。由于透析期间溶液被肽聚糖污染，一些患者出现炎症、发热和腹膜炎<sup>[52][76]</sup>。

## 5.4 促炎细胞因子

由于TLR激动剂诱导的发热反应是由人类免疫细胞产生的促炎细胞因子如TNF α、IL-1 β、IL-6和INF-γ介导的，因此内源性介质本身自然起到热原的作用。每个细胞因子都通过细胞因子网络进一步激活免疫细胞，因为除了TLRs外，细胞因子的特异性受体还位于单核细胞和巨噬细胞的表面。

## 5.5 化学物质和其他热原

除微生物成分外，化学物质或天然物质的致热性尚不清楚。此外，全世界每年都发现或合成了超过1000多种新的化合物，但每种化合物的生物学特性还不太清楚。目前用作医疗器械的生物材料的大多数化学物质都是安全的，而且对人类不具有致热性。然而，一些新的生物材料和化学物质可能会引起人体发热反应。

这种可能性也适用于非自体细胞产物，这些产物可能引起免疫活性细胞的免疫识别和激活。

例如，下面列出了已知的会引起人类发热反应的化学物质。根据诱发发热反应的原理，这些化学物质主要可分为三组：

- 直接刺激大脑和神经系统的体温调节中心的物质，
- 氧化磷酸化解偶联剂，和
- 机制尚不清楚的热原。

下面列出的化学物质已知会引起人体的发热反应：

- 前列腺素；
- 感应器(例如：聚腺苷酸、聚尿苷酸、聚生物腺苷酸和聚核糖苷酸)；
- 破坏温度调节中心功能的物质(例如：麦角酸二乙胺、可卡因、吗啡)；
- 神经递质(例如：去甲肾上腺素、血清素)；
- 氧化磷酸化解偶联剂(例如：4,6-二硝基邻甲酚、二硝基苯酚、苦味酸)；
- N-苯基- $\beta$ -萘胺和 aldo- $\alpha$ -萘胺(其发热机制尚不清楚)；
- 在某些情况下的金属，如镍盐。

除了这些化学物质，还有一种可能是微球<sup>[23]</sup>和纳米颗粒，<sup>[61]</sup>包括植入物衍生的磨损碎片<sup>[7]</sup>可能为热原。由特定尺寸组成的微球、颗粒<sup>[23]</sup>和纳米颗粒<sup>[61]</sup>可被巨噬细胞吞噬，并激活巨噬细胞释放的促炎细胞因子如TNF $\alpha$ 。TNF $\alpha$ 是内源性热原之一。

## 5.6 发热反应的原理

TLRs是一类单跨膜非催化受体，一旦微生物突破皮肤或肠道黏膜等物理屏障并激活免疫细胞，它们就会识别源自微生物的结构保守分子。它们被认为在先天免疫系统中起关键作用，并且已知以二聚体的形式发挥作用。虽然大多数TLRs似乎是同型二聚体，但TLR2与TLR1或TLR6形成异型二聚体，每个二聚体具有不同的配体特异性。TLR还可能依赖其他共受体来获得完全的配体敏感性，例如在TLR4识别内毒素的情况下，这需要MD-2分子。已知CD14和LPS结合蛋白有助于将内毒素呈递给MD-2。当被激活时，TLRs在细胞的细胞质内招募适配器分子以传播信号。已知有四种适配器分子参与了信号传递。这些蛋白质被称为MyD88、Tirap(也称为Mal)、Trif和Tram。这些适配器激活细胞内的其他分子，包括某些蛋白激酶(IRAK1、IRAK4、TBK1和IKKi)，这些蛋白激酶可以放大信号，并最终导致协调炎症反应的基因(NF- $\kappa$ B、AP-1和IRP3)的诱导或抑制。

在被微生物来源的配体激活后，可能会发生几种反应。免疫细胞能产生引发炎症的细胞因子。特别是，IL-1 $\beta$ 与诱导发热反应密切相关。IL-6和TNF $\alpha$ 后来被分离出来，发现在较高剂量时<sup>[28]</sup>，<sup>[29]</sup>也是热原细胞因子。目前对哺乳动物发热机制的理解是，这些促炎细胞因子导致了介导PGE<sub>2</sub>合成的COX-2的表达。<sup>[30]</sup>缺乏COX-2的小鼠在应对LPS、IL-1或IL-6<sup>[47]</sup>时不会出现发热，同时<sup>[48]</sup>PGE<sub>2</sub>触发细胞内信号级联，改变体温的调定点。因此，IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF $\alpha$ 是免疫细胞与致热原接触时释放的介质，负责触发大脑中的发热反应。已知P物质通过产生TNF- $\alpha$ 、IL-6和PGE<sub>2</sub>来诱发发热<sup>[17]</sup>。

TLRs似乎参与了细胞因子的产生和细胞活化，以及微生物和其他潜在热原的黏附和吞噬。

在不依赖于TLR信号通路和随后的细胞因子的产生的情况下，通过直接刺激体温调节中心的物质来提高体温。此外，氧化磷酸化解偶联剂能通过激活线粒体中的电子传递链而提高体温。

## 6 致热性评估

### 6.1 概述

有三种用于致热性试验的方法，如下所述。根据热原的定义，家兔体内热原试验是唯一一种直接测定体内发热反应作为终点的试验，而其他两种方法都没有。相反，体外方法使用不同的终点检测热原，如细胞因子的产生和蛋白质凝固。

### 6.2 细菌内毒素试验(BET)

#### 6.2.1 概述

细菌内毒素试验在几部药典中协调一致。本试验是用鲎(美洲鲎和中华鲎)循环变形细胞水提取物中的溶菌产物试剂来检测或量化革兰氏阴性细菌来源的细菌内毒素。细菌内毒素试验分为两种技术方法；一种是溶菌液与内毒素反应形成凝胶的凝胶技术，另一种是内毒素诱导的溶菌液光学变化的光度测定技术。后者进一步细分为两种方法：一种是根据伴随凝胶形成的浊度变化来测定样品溶液的内毒素浓度，另一种是显色技术，通过测量合成显色底物释放的发色团颜色的光密度来估计内毒素浓度，该底物是下文所述酶促级联反应最后步骤的取代基。每种光度测定技术均可分为终点法和动态法。



细菌内毒素试验可能从常规质量控制的角度监测医疗器械生产过程和最终产品的内毒素污染情况。在开始使用从中华鲎中提取的溶菌液试剂之前，该试验在过去被称为鲎试剂(LAL)检测。

注：也有其他方法可用于检测细菌内毒素，例如，使用重组C因子荧光法的方法，见参考文献[6]。

## 6.2.2 LAL 反应的工作原理

BET是一种酶级联反应，具有检测和定量革兰阴性细菌内毒素的最高敏感性。首先，内毒素激活因子C，即存在于溶菌液试剂中的内毒素敏感丝氨酸蛋白酶原。活化因子C将因子B从非活性形式转化为活性形式，进一步将凝固酶原转化为凝血酶。最后，凝血酶将凝胶原转化为凝血蛋白，形成凝胶。除因子C外，原溶菌液试剂还含有G因子，可被(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖激活，随后将凝固酶原转化为凝血酶。已通过去除G因子或使其功能饱和而开发出内毒素特异性鲎试剂。

因为BET是基于酶反应，会受样品溶液的温度和pH的影响，也会被各种化合物（如适当浓度的蛋白酶、蛋白酶抑制剂、金属离子、表面活性剂、螯合物、盐和糖）增强或抑制。因此，能通过进行干扰因子的检测，以检查样品溶液中反应的抑制剂和增强剂的存在。通过对样品溶液的稀释，能避免干扰因素的影响。

## 6.2.3 BET 的一般程序

内毒素检测和定量的一般方法已经在一些国家的药典和AAMI ST 72 中进行了讨论。这些文件中提到了一些细节内容。

需要注意的是，除非另有说明，无热原的水能作为制备样品溶液的浸提介质。医疗器械及其材料中存在的内毒素通常是在环境温度下提取的。

## 6.2.4 BET 的特性

LAL检测是一种简单快速的检测内毒素的方法，具有高灵敏度，表明医疗器械上存在革兰氏阴性细菌污染。内毒素具有特异性的毒性表达取决于脂质A部分的化学结构。与内毒素的其他生物学特性（如炎症细胞释放细胞因子）相比，内毒素对LAL活性的结构要求并不严格，因此BET比HCPT<sup>[16]</sup>具有更广泛的内毒素检测谱。

医疗器械上的内毒素污染能表明更广泛的微生物污染。然而，器械上的内毒素含量与器械上的其他微生物数量没有相关性。BET只对革兰氏阴性菌或内毒素污染非常具有特异性。从历史上看，在医疗器械制造中可控制的主要和最强的热原污染物是细菌内毒素。细菌内毒素污染很难预防，因为它在自然界中无处不在、稳定，而且足够小，可以通过传统的灭菌过滤器。

然而，可以认为上述BET的特性不仅有优点，也有缺点。最重要的缺点是BET不能检测除内毒素以外的热原。此外，由于毒性表达的高度结构要求，人们对人体活性内毒素种类的认识有限，因此BET并不总是反映人体的热原反应。

器械制造商从医疗器械中提取内毒素，从而得到器械中内毒素的回收提取效率低于100%。但在某些情况下，吸附在某些塑料、陶瓷或金属和某些天然产物上的内毒素不能通过一般的水提取方法有效地回收。然而，根据经过多年使用证明的监管证据，被美国食品和药品监管局以及其他国家药典所推荐的提取参数，已经足以确保医疗器械在器械预期使用的规定限度下的无致热性<sup>[20]</sup>。

## 6.3 家兔热原试验

### 6.3.1 概述

家兔热原试验是唯一已知的检测材料和微生物介导的热原的试验。

本试验中高温浸提物的阳性致热性表明产品中存在非内毒素致热原。家兔试验不包括作为常规质量控制试验的最终产品内毒素定量方法。

如ISO 10993-11所述，含有以前曾引起热原反应反应的新物质的医疗器械，和/或具有热原反应潜力未知的新化学实体，能对材料介导的致热性进行评价。

### 6.3.2 家兔试验的原理

在静脉注射医疗器械或其材料的生理盐水浸提液后，动态测量核心体温，以评价哺乳动物对热原的体内发热反应。

### 6.3.3 家兔试验的步骤

检测方案在相关指南和药典中具有详细阐述。尽管不同国家的指南/药典在对家兔体重的限制、基线温度的测定、样品溶液的注射剂量和家兔的重复使用方面存在差异，但试验方案的大部分非常相似。ISO10993-12中也定义适用于从医疗器械和材料中制备浸提液的样品/浸提介质比和浸提条件。

值得注意的是，只有无热原的生理盐水可以作为制备样品溶液的浸提介质。在ISO10993-12的条件下，不会导致材料显著变化的最高温度可用于提取。

### 6.3.4 家兔试验的特点

基本上，家兔试验可以检测出各种热原，以及发热反应的真实效力。这种由每种热原引起的反应是随着家兔体内核心体温的升高而估计的。为此，尽管人类和家兔对热原的种属特异性是不同的，但家兔体内试验似乎对HCPT有优势。然而，家兔试验存在灵敏度低、使用动物、需要大量试验样品等缺点。

家兔试验是唯一已知和经过确认的方法，用于检测材料介导的热原，即可引起患者发热（发烧）反应的材料中提取的化学浸出物。新的血液接触或植入材料/器械介导的热原能被筛选出来。

然而，在大多数情况下，家兔试验并不能代替BET。

## 6.4 人细胞热原试验 (HCPT)

### 6.4.1 概述

HCPT基于细胞水平的免疫反应，是一种通过激活人免疫细胞如单核细胞和巨噬细胞<sup>[13]</sup>来检测和定量热原诱导发热反应的体外方法。本试验旨在评价内毒素介导的致热性和由TLR激动剂诱导的热反应对应的其他微生物成分介导的致热性。除了TLR激动剂外，HCPT还能量化由微球和磨损颗粒的吞噬作用引发的炎症反应级联反应的效力。

单核细胞和巨噬细胞是体内内毒素的主要靶点，迄今已有大量研究利用巨噬细胞来阐明内毒素的化学结构和生物活性之间的关系。HCPT的基本技术本身是基于内毒素研究的传统方法。由于该试验与内毒素试验相比范围更广，如果经适当的确认，它能作为一种有效的方法来弥补内毒素试验与家兔试验之间差距。

### 6.4.2 HCPT 的原理

巨噬细胞是组织内的细胞，来源于被称为单核细胞的特定白细胞。单核细胞和巨噬细胞具有吞噬作用，在非特异性防御（或先天免疫）中发挥作用，并帮助启动脊椎动物的特定防御机制（或细胞介导免疫）。它们的作用是吞噬固定细胞或移动细胞的细胞碎片和病原体，并通过位于细胞表面的TLR识别可溶性病原体，并刺激淋巴细胞和其他免疫细胞对病原体作出反应。单核细胞和巨噬细胞作为分泌细胞，对免疫反应的调节和炎症的发展至关重要。这些细胞被吞噬作用或TLR激动剂激活（见4.2和4.3），产生包括细胞因子在内的强大化学物质。根据4.6中描述的机制，细胞因子如TNF  $\alpha$ 、IL-1  $\beta$  和IL-6作为调节因子诱导发热反应。在HCPT中，通过ELISA方法检测和定量这些细胞释放的细胞因子，作为评价发热反应效力的一种措施。

型号为ACC 124的MM6是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文本使用者，并不表示对这一产品的认可。CTL-MAT有限责任公司的人单核细胞是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文本使用者，并不表示对这一产品的认可。

### 6.4.3 人类细胞的选择

除了人类全血外，人髓单核细胞细胞系（如MM6）和人单核细胞<sup>[72]</sup>也可作为HCPT的指示细胞。从实验室使用的角度来看（供应系统 and 安全性），这些细胞系似乎比全血细胞更有用。然而，全血也有以下优点：

——所有的血液成分都是按生理比例存在的，这是热原与白细胞相互作用所需要的；

——浸入全血中是可能的，而这对其他细胞系统来说是不可能的。

另一方面，这些细胞系也有以下缺点：

——从冷冻样本开始建立细胞系所花费的时间（通常为数周）。在试验中需要使用足够数量的具有高灵敏度（对热原）的细胞；

——不同传代数之间的细胞敏感性不一致；

——需要与佛波酯或骨化三醇等药物共刺激；

——验证对热原反应的转导所必需的各种受体元件在细胞系上的持续存在。

据报道，不同细胞系对内毒素的敏感性不同，在细胞系中，只有MM6细胞在骨化三醇启动后，对相对少量的内毒素产生大量的TNF $\alpha$ 。与这些细胞系相比，全血细胞对内毒素具有更高的敏感性，但MM6-CA8细胞（MM6细胞的亚克隆）<sup>[58]</sup>对检测内毒素和肽聚糖的敏感性与全血细胞几乎相同。

#### 6.4.4 细胞因子标志物的选择

虽然TLR激动剂和微球刺激人全血细胞产生的细胞因子和趋化因子的数量因刺激剂种类的不同而不同，但在所有情况下，细胞除诱导产生传统的细胞因子标志物（IL-1 $\beta$ ，IL-6和TNF $\alpha$ ），还会产生大量的MCP-1，IL-1 $\beta$  ra，IL-8，MIP-1 $\alpha$ 和/或MIP-1 $\beta$ 。

在这些细胞因子和趋化因子中，IL-1 $\beta$ 或IL-6因信噪比（S/N）最高而成为较好的标志物。此外，MIP-1 $\alpha$ 和MCP-1的S/N比值相对较高，但MCP-1检测TLR3激动剂、颗粒和微球的比值相对较低。见参考文献[35]和[36]。

MM6-CA8细胞表现出与全血细胞不同的细胞因子和趋化因子产生模式。除传统的细胞因子标志物外，还诱导了大量的IL-8、RANTES、IL-1 $\beta$  ra、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 和MIP-1 $\beta$ 。在这些细胞因子和趋化因子中，IL-6检测所有TLR激动剂和微球的S/N比值最高。MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 和IL-1 $\beta$ 的S/N比值也高于TNF $\alpha$ 。

考虑到这些因素，根据HCPT中使用的细胞选择合适的细胞因子标志物或趋化因子。

#### 6.4.5 HCPT 的步骤

从健康献血者抽取的新鲜肝素化人全血或从一批捐赠者中获取的冷冻保存的人全血，用生理、无热原临床级生理盐水或RPMI1640培养基稀释，用直接法取一块器械样品<sup>[63]</sup>或用间接法取适量试验液。根据试验方法的要求，在合适的培养基中，37℃孵育8 h至24 h后，用ELISA法测定相应样品中反应热原量的细胞因子标志物如IL-1 $\beta$ 的量。

对于人类骨髓单核细胞系，细胞保存在RPMI1640培养基中，该培养基中含有10%热灭活胎牛血清和适当的补充剂，如2-巯基乙醇、HEPES、谷氨酰胺、非必需氨基酸、丙酮酸钠、牛胰岛素和抗生素。细胞由肉豆蔻酸二酯或骨化三醇（1 $\alpha$ ，25-二羟基维生素D3）启动。用引物试剂孵育72 h后，将细胞以1 $\times 10^6$ 个细胞/ml/孔接种于24孔板上，并置入一块器械样品（直接法）或取器械浸提出的适量试验液（间接法）。根据试验方法的要求，在适合培养基的中，37℃孵育8 h至24 h后，用ELISA法定量细胞释放到培养基中的细胞因子。

ELISA是一种高灵敏和特异性的标准免疫学检测方法。细胞因子标志物，如供试品样品中的IL-1 $\beta$ ，被夹在单克隆包膜抗体和标记的多克隆检测抗体之间。通过洗涤步骤去除未结合的物质。结合检测抗体直接或间接地与辣根过氧化物酶相连，该酶代谢底物TMB（四甲基苯并胺），诱导颜色从无色变为蓝色。加入酸后反应停止，使颜色从蓝色变成黄色。这是在450 nm的光度测量，参考波长为690 nm。

每次试验都要形成从大肠杆菌0113:B4或其他合适的标准（如根据来自 E. coli 0113:H10 的国际WHO 参考标准校准的 E. coli UKT-B 内毒素）产生的细胞因子标志物和内毒素的剂量反应曲线。<sup>[64]</sup>该剂量-反应曲线需要包含0.5 EU/ml的浓度，相当于WHO参照标准的50pg/mL。该值被认为是引起家兔发热的内毒素浓度的阈值。2005年用171只家兔做的研究证实了这一阈值<sup>[40]</sup>。

在HCPT中，细胞因子标志物是通过刺激试验样本中存在的所有热原来测量免疫细胞释放的总量。然而，HCPT的结果是通过将产生的细胞因子标志物的数量转化为内毒素的数量来评价的，因为内毒素是最强的热原，而除内毒素外的TLR激动剂的诱导发热反应的临界量目前尚未得到批准。因此，检测样品致

热性的概念与细菌内毒素试验相同。HCPT具有检测靶向细胞因子释放热原的能力，这是细菌内毒素试验所不可能做到的。

需要注意的是，除非用医疗器械浸提液进行验证，否则HCPT检测不能代替细菌内毒素试验(LAL)用于大型成批成品/器械存在细菌内毒素污染的常规质量控制检验。一般来说，体外HCPT方法需要将一个小块扁平样本放在一个小容器中，直接与全血进行试验。这些方法只检测非常小面积的材料(如果在24孔板中，则为 $2\text{cm}^2$ <sup>[35]</sup>)，或在1.5 ml聚丙烯管中进行致热性。<sup>[53]</sup>这基于可行的提取方法。如果许多器械含有生物来源的成分/组分、含有非注射或吸入的水、器械的生产用水(例如水浸或浸泡、挤压操作)或用水处理(例如高压蒸汽、清洗)，则可能发生细菌内毒素污染。对于大批量的最终产品、灭菌产品的常规质量控制，建议进行浸提研究，以确保所有潜在的细菌内毒素来源都通过基于内毒素的致热性试验得到充分检验。实际的最终器械可能非常大，包含非常大的表面积，这可能会导致患者产生材料介导的发热反应(例如：添加剂)。

人体血液制品存在特殊危险性，因此所有技术人员都需要接受必要的安全预防措施方面的充分培训。

#### 6.4.6 HCPT 的特点

与家兔试验和细菌内毒素试验相比，HCPT具有以下优点。

- HCPT 不使用动物。这些细胞来源于人体组织，因此避免了需要跨物种推断。
- 与细菌内毒素试验<sup>[75]</sup>相比，HCPT 具有更广泛的热原检测谱。
- HCPT 可用于检测某些产品中的热原污染物，家兔试验或细菌内毒素试验无法进行评价(例如：LAL 反应的抑制剂和增强剂、影响体温调节的中枢或外周机制并引起家兔免疫反应的药物)。
- HCPT 能够将固体材料直接作为试验样品进行试验，而无需任何浸提，因为免疫细胞可以识别从试验样品中洗脱到培养基中并结合到表面的热原<sup>[75]</sup>。无需对吸附内毒素的材料进行任何预处理即可有效检测到热原<sup>[75]</sup>。

HCPT有以下缺点。

- 材料介导的热原是一种化学物质，通常不通过细胞因子通路来诱导发热反应，HCPT 很可能检测不到。
- 与单核细胞或巨噬细胞相互作用的药物(如细胞因子受体拮抗剂、非生理溶液、细胞毒性物质、具有细胞因子活性的重组蛋白)或检测系统(例如风湿病因素)，可能不用 HCPT 检测。
- HCPT 可能不适用于含有释放细胞因子和趋化因子的活细胞的组织工程产品。
- 检测时对热原的反应取决于献血者的血液样本或细胞状况。特别是，由于献血者的年龄、性别、遗传背景(例如，toll 样受体细胞因子受体编码基因的遗传多态性)、受感染献血者的安全问题、昼夜变化、饮食的影响和其他因素的不同，人的血液能有所不同，这可能会影响全血体外试验的敏感性和特异性。
- 整个血液供应系统也是个问题。
- 直接使用固体样品的 HCPT 无法用于检测大批量最终产品、灭菌产品/器械的常规质量控制试验中是否存在热原污染。
- 使用人骨髓单核细胞细胞系进行 HCPT 预培养和启动细胞具有时间、成本和技术复杂性等缺点。

#### 6.4.7 确认研究

进一步的确认研究将能够确定HCPT是否可以检测其他热原，这些热原通过TLR信号通路和吞噬作用以外的不同机制诱导发热反应，包括材料介导的热原。

## 7 结论

在某些情况下，HCPT能作为传统致热性试验方法(家兔法和LAL)的有用替代试验；然而，仍需要家兔试验来检测HCPT未检测到的热原，包括材料介导的热原。因此，根据医疗器械及其材料的热原检测的目的，选择合适的方法是非常重要的。

## 参 考 文 献

- [1] ISO 10993-11, Biological evaluation of medical devices — Part 11: Tests for systemic toxicity
- [2] ISO 10993-12, Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials
- [3] ANSI/AAMI ST 72, Bacterial endotoxins — Test methods, routine monitoring, and alternatives to batch testing
- [4] United States Pharmacopeial Convention, available at: <https://www.usp.org/>
- [5] Japanese Pharmacopoeia, available at: <https://www.pmda.go.jp/english/pharmacopoeia/index.html>
- [6] European Pharmacopeia, available at: <http://www.edqm.eu>
- [7] Algan S. M., Purdon M., Horowitz S. M., Role of tumor necrosis factor alpha in particulate-induced bone resorption, *J Orthop Res*, 14, pp. 30-35, 1996
- [8] Atkins E., Huang W. C., Studies on the pathogenesis of fever with influenzal viruses. I. The appearance of an endogenous pyrogen in the blood following intravenous injection of virus, *J Exp Med*, 107, pp. 383-401, 1958
- [9] Atkins E., Morse S. I., Studies in staphylococcal fever. VI. Responses induced by cell walls and various fractions of staphylococci and their products, *Yale J Biol Med*, 39, pp. 297-311, 1967
- [10] Beeson P. B., Temperature-elevating effect of a substance obtained from polymorphonuclear leucocytes (abstract), *J Clin Invest*, 27, p 524, 1948
- [11] Bellon J. M., N, G. H., Jurado, F., Carranza, A. and Bujan, J., In vitro interaction of bacteria with polypropylene/ePTFE prostheses, *Biomaterials*, 22, pp. 2021-2024, 2001
- [12] Bencsics A., Elenkov I. J., Vizi E. S., alpha 2-, alpha 2A-, alpha 2B/2C-Adrenoceptor subtype antagonists prevent lipopolysaccharide-induced fever response in rabbits, *Brain Res*, 705, pp. 302-306, 1995
- [13] Bernatchez S. F., Parks P. J., Gibbons D. F., Interaction of macrophages with fibrous materials in vitro. *Biomaterials*, 17, pp. 2077-2086, 1996
- [14] Bi Y., Seabold J. M., Kaar S. G., Ragab A. A., Goldberg V. M., Anderson J. M., Greenfield E. M., Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation, *J Bone Miner Res*, 16, pp. 2082-2091, 2001
- [15] Bodel P. T., Atkins E., Studies in staphylococcal fever. V. Staphylococcal filtrate pyrogen, *Yale J Biol Med*, 38, pp. 282-298, 1965
- [16] Brandenburg K, Howe J, Gutsman T, Garidel P., The expression of endotoxic activity in the Limulus test as compared to cytokine production in immune cells, *Curr Med Chem.*, 16(21), pp. 2653-2660, 2009
- [17] Brito H O. et al. , Evidence of substance P autocrine circuitry that involves TNF- $\alpha$ , IL-6, and PGE2 in endogenous pyrogen-induced fever, *Journal of Neuroimmunology*, 293, pp. 1-7, 2016
- [18] Braude A. I., Mc C. J., Douglas H., Fever from pathogenic fungi, *J Clin Invest*, 39, pp. 1266-1276, 1960
- [19] Brunson K. W., Watson D. W., Pyrogenic specificity of streptococcal exotoxins, staphylococcal enterotoxin, and gram-negative endotoxin, *Infect Immun*, 10, pp. 347-351, 1974

- [20] Bryans et al. , Bacterial endotoxin testing, :A report on the methods, background, data, and regulatory history of extraction recovery efficiency, Biomedical Instrumentation and Technology, 37, pp. 73-78, 2004
- [21] Cardona M. A., Simmons R. L., Kaplan S. S., TNF and IL-1 generation by human monocytes in response to biomaterials, J Biomed Mater Res, 26, pp. 851-859, 1992
- [22] Cho D. R., Shanbhag A. S., Hong C. Y., Baran G. R., Goldring S. R., The role of adsorbed endotoxin in particle-induced stimulation of cytokine release, J Orthop Res, 20, pp. 704-713, 2002
- [23] Daniels A. U., Barnes F. H., Charlebois S. J., Smith R. A., Macrophage cytokine response to particles and lipopolysaccharide in vitro, J Biomed Mater Res, 49, pp. 469-478, 2000
- [24] Deininger S., Traub S., Aichele D., Rupp T., Hartung T., von Aulock S., Presentation of lipoteichoic acid potentiates its inflammatory activity, Immunobiology, 213, pp. 519-529, 2008
- [25] Dennison D. K., Huerzeler M. B., Quinones C., Caffesse R. G., Contaminated implant surfaces, :an in vitro comparison of implant surface coating and treatment modalities for decontamination, J Periodontol, 65, pp. 942-948, 1994
- [26] Dinarello C. A., Shparber M., Kent E. F., Wolff S. M., Production of leucocytic pyrogen from phagocytes of neonates, J Infect Dis, 144, pp. 337-343, 1981
- [27] Dinarello C. A., Interleukin-1, Rev Infect Dis, 6, pp. 51-95, 1984
- [28] Dinarello C. A., Cannon J. G., Wolff S. M., Bernheim H. A., Beutler B., Cerami A., Figari I. S., Palladino M. A. Jr, O'Connor J. V., Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1, J Exp Med, 163, pp. 1433-1450, 1986
- [29] Dinarello C. A., Cannon J. G., Mancilla J., Bishai I., Lees J., Coceani F., Interleukin-6 as an endogenous pyrogen, :induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells, Brain Res, 562, pp. 199-206, 1991
- [30] Dinarello C. A., Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens, :some concepts have changed, J Endotoxin Res, 10, pp. 201-222, 2004
- [31] Fennrich S, Fischer M, Hartung T, Lexa P, Montag-Lessing T, Sonntag HG, Weigandt M, Wendel A, Detection of endotoxins and other pyrogens using human whole blood, Dev Biol Stand, 101, pp. 131-139, 1999.
- [32] Freudenberg M. A., Galanos C., Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action, Int Rev Immunol, 6, pp. 207-221, 1990
- [33] Girardin S. E., Philpott D. J., Mini-review, :the role of peptidoglycan recognition in innate immunity, Eur J Immunol, 34, pp. 1777-1782, 2004
- [34] Haishima Y., Murai T., Nakagawa Y., Hirata M., Yagami T., Nakamura A., Chemical and biological evaluation of endotoxin contamination on natural rubber latex products, J Biomed Mater Res, 55, pp. 424-432, 2001
- [35] Hasiwa M., Kullman K., von Aulock S., Klein C. L., Hartung T., An in vitro pyrogen safety test for immune-stimulating components on surfaces, Biomaterials, 28, pp. 1367-75, 2007
- [36] Hasiwa N. et al. , Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test, ALTEX, 30(2), pp.169-208, 2013
- [37] Hasiwa M., Kylián O., Hartung T., Rossi F., Removal of immune-stimulatory components from surfaces by plasma discharges, Innate Immunity, 14, pp. 89-97, 2008

- [38] Heinz B. C., von Mallek D., [Survey of incidents associated with hip and knee replacement devices Auswertung des Medizinprodukte-Beobachtungs- und -Meldesystems für die Jahre 2000 bis 2002]. *Orthopäde*, 34, pp. 47–54, 2005
- [39] Henderson B., Poole S., Wilson M., Microbial/host interactions in health and disease, :who controls the cytokine network? *Immunopharmacology*, 35, pp. 1–21, 1996
- [40] Hoffmann S., Lüderitz-Püchel U., Montag-Lessing T., Hartung T., Optimization of pyrogen testing in parenterals according to different pharmacopoeias by probabilistic modelling, *J Endotoxin Res*, 11, pp. 25–31, 2005
- [41] Hoffmann S., Peterbauer A., Schindler S., Fennrich S., Poole S., Mistry Y., Montag-Lessing M. et al. , International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells, *J Immunol Methods*, 298, pp. 191–173, 2005
- [42] Horowitz S. M., Gonzales J. B., Effects of polyethylene on macrophages, *J Orthop Res*, 15, pp. 50–56, 1997
- [43] Jahnke M, Weigand, Sonntag H-G. Comparative testing for pyrogens in parenteral drugs using the human whole blood pyrogen test, the rabbit in vivo pyrogen test and the LAL test, *European Journal of Parenteral Science*, 5(2), pp. 39–44, 2000
- [44] Kanoh S, Mochida K, Ogawa Y., Studies on heat-inactivation of pyrogen from *Escherichia coli*., *Biken J.*, 13, pp 233–239, 1970
- [45] Kobayashi G. S., Friedman L., Characterization of the Pyrogenicity of *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Cryptococcus neoformans*, *J Bacteriol*, 88, pp. 660–666, 1964
- [46] Kure R., Grendahl H., Paulssen J., Pyrogens from surgeons' sterile latex gloves, *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]*, 90, pp. 85–88, 1982
- [47] Li S., Ballou L. R., Morham S. G., Blatteis C. M., Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1 $\beta$ , *Brain Res*, 910, pp. 163–173, 2001
- [48] Li S., Goorha S., Ballou L. R., Blatteis C. M., Intracerebroventricular interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1  $\beta$  and IL-18, pyrogenic and PGE (2)-mediated? *Brain Res*, 992, pp. 76–84, 2003
- [49] Li S., Wang Y., Matsumura K., Ballou L. R., Morham S. G., Blatteis C. M., The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(–/–), but not in cyclooxygenase-1(–/–) mice, *Brain Res*, 825, pp. 86–94, 1999
- [50] Loverock B., Baines A., Burgenson A., Simon B., A Recombinant Factor C Procedure for the Detection of Gram-negative Bacterial Endotoxin, *Pharmacopeial Forum*, 36 (1), 2010
- [51] Magalhães P.O. et al. , Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review, *J Pharm Pharm Sci.*, 10(3), pp. 388–404, 2007
- [52] Martis L. et al. , Aseptic peritonitis due to peptidoglycan contamination of pharmacopoeia standard dialysis solution, *Lancet*, 365, pp. 588–594, 2005
- [53] Mazzotti F., Beutter J., Zeller R., Fink U., Schindler S., Wendel A., Hartung T., von Aulock S., In vitro Pyrogen Test – a new test method for solid medical devices, *J Biomed Mater Res*, 80, pp. 276–82, 2007
- [54] Miyamoto T., Okano S., Kasai N., Inactivation of *Escherichia coli* endotoxin by soft hydrothermal processing, *Appl Environ Microbiol.*, 75, pp. 5058–5063, 2009
- [55] McClosky W. T., Price C. W., van Winkle W., Welch H., Calvery H. O., Results of the first USP collaborative study of pyrogens, *J Am Pharm Assoc*, 32, pp. 69–73, 1943
- [56] Test Monocyte Activation, *Pharmeuropa*, Vol 20, 3, pp. 505– 511, 2008
- [57] Morath S., Geyer A., Hartung T., Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*, *J Exp Med*, 193, pp. 393–397, 2001



- [58] Nakagawa Y., Maeda H., Murai T., Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: Comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Vol. 9, 3, pp. 588-597, 2002
- [59] Nakagawa Y., Murai T., Hasegawa C., Hirata M., Tsuchiya T., Yagami T., Haishima Y., Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 66, pp. 347-355, 2003
- [60] Niki Y., Matsumoto H., Suda Y., Otani T., Fujikawa K., Toyama Y., Hisamori N., Nozue A., Metal ions induce bone-resorbing cytokine production through the redox pathway in synoviocytes and bone marrow macrophages, *Biomaterials*, 24, pp. 1447-1457, 2003
- [61] Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J., Nanotoxicology, :an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ Health Perspect*, 113, pp. 823-839, 2005
- [62] Ogawa Y., Murai T., Kawasaki H., Endotoxin test for medical devices—The correlation of the LAL test with the pyrogen test, *J. Antibact. Antifung. Agents*, 19, pp. 561-566, 1991
- [63] Petri E., Ploeg A.d., Habermaier B., Fennrich S. Improved detection of pyrogenic substances on polymer surfaces with an ex vivo human whole-blood assay in comparison to the *Limulus amoebocyte lysate* test, 2000, Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. Proceedings of the 3rd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Bologna, IT. 29 Aug. to 2 Sept. 1999.
- [64] Poole S., Dawson P., Gaines Das R. E., Second international standard for endotoxin, calibration in an international collaborative study, *J Endotoxin Research*, 4, pp. 221-231, 1997
- [65] Rietschel E. T., Kirikae T., Schade F. U., Ulmer A. J., Holst O., Brade H., Schmidt G., Mamat U., Grimmecke H. D., Kusumoto S. et al. , The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity, *Immunobiology*, 187, pp. 169-190, 1993
- [66] Ronco C, Endotoxin Removal: History of a Mission. *Blood Purif*, 37(suppl 1), pp. 5-8, 2014
- [67] Rotta J., Endotoxin-like properties of the peptidoglycan, *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol*, 149, pp. 230-244, 1975
- [68] Schachtrupp A., Klinge U., Junge K., Rosch R., Bhardwaj R. S., Schumpelick V., Individual inflammatory response of human blood monocytes to mesh biomaterials, *Br J Surg*, 90, pp. 114-120, 2003
- [69] Schindler S., Asmus S., von Aulock S., Wendel A., Hartung T., Fennrich S., Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity testing, *J Immunol Methods*, 294, pp. 89-100, 2004
- [70] Schleifer K. H., Chemical structure of the peptidoglycan, its modifiability and relation to the biological activity, *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol*, 149, pp. 104-117, 1975
- [71] Siraganian R. P., Baer H., Hochstein H. D., May J. C., Allergenic and biologic activity of commercial preparations of house dust extract, *J Allergy Clin Immunol*, 64, pp. 526-533, 1979
- [72] Solati S., Aarden L., Zeerleder S., Wouters D. An improved monocyte activation test using cryopreserved pooled human mononuclear cells, *Innate immunity*, 21, pp. 677-684, 2015
- [73] Shmunis E., Darby T., Contact dermatitis due to endotoxin in irradiated latex gloves, *Contact Dermatitis*, 10, pp. 240-244, 1984

- [74] Spreitzer I, Fischer M, Hartzsch K, Lüderitz-Püschel U, Montag T, Comparative Study of Rabbit Pyrogen Test and Human whole Blood Assay on Human Serum Albumin, ALTEX, 19(Suppl. 1), pp. 73-75, 2002
- [75] Stang K, Fenrich S, Krajewski S, Stoppelkamp S, Burgener I, Wendel HP, Post M, Highly sensitive pyrogen detection on medical devices by the monocyte activation test, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Volume 25, Issue 4, pp. 1065-1075, 2014
- [76] Toure F. et al. , Icodextrin-induced peritonitis: Study of five cases and comparison with bacterial peritonitis, Kidney international, 65(2), pp. 654-660, 2004
- [77] Traub S., Kubasch N., Morath S., Kresse M., Hartung T., Schmidt R. R., Hermann C., Structural requirements of synthetic mucopeptides to synergize with lipopolysaccharide in cytokine induction, J Biol Chem, 279, pp. 8694-8700, 2004
- [78] U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Biological tests and assays, Bacterial endotoxins test (LAL) <85>, In: United States Pharmacopeia, Rev. 32, 2009, Rockville, Maryland, U. S. A.
- [79] U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Pyrogen Test (USP Rabbit Test) <151>. In: United States Pharmacopeia, Rev. 32, 2009, Rockville, Maryland, U. S. A.
- [80] Wang J. E., Dahle M. K., McDonald M., Foster S. J., Aasen A. O., Thiernemann C., Peptidoglycan and lipoteichoic acid in Gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism, Shock, 20, pp. 402-414, 2003
- [81] Watson D. W., Host-parasite factors in group A staphylococcal infections. Pyrogenic and other effects of immunologic distinct exotoxins related to scarlet fever toxins, J Exp Med, 111, pp. 255-284, 1960
- [82] Welch H., Calvery H. O., McClosky W. T., Price C. W., Method of the preparation and test for bacterial pyrogen, J Am Pharm Assoc, 32, pp. 65-69, 1943
- [83] Williams D., Endotoxins and medical devices: the significance of dead bacteria, Med Device Technol, 14, pp. 8-11, 2003
- [84] Zou W., Bar-Shavit Z., Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide, J Bone Miner Res, 17, pp. 1211-1218, 2002
- [85] GHTF/SG1/N071:2012, available at:  
<http://www.imdrf.org/docs/ghtf/final/sg1/technical-docs/ghtf-sgl-n071-2012-definition-of-terms-120516.pdf>
-