МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO/TR 21582— 2024

Изделия медицинские

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Принципы и методы исследований на пирогенность

(ISO/TR 21582:2021, Pyrogenicity — Principles and methods for pyrogen testing of medical devices, IDT)

Издание официальное

**Москва
Российский институт стандартизации
2024**

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Автономной некоммерческой организацией «Институт медико-биологических исследований и технологий» (АНО «ИМБИИТ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии.

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 июня 2024 г. № 174-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узбекское агентство по техническому регулированию

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 сентября 2024 г. № 1188-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO/TR 21582—2024 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 марта 2025 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу ISO/TR 21582:2021 «Пирогенность. Принципы и методы исследования пирогенности медицинских изделий» («Pyrogenicity — Principles and methods for pyrogen testing of medical devices», IDT).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного документа для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5 (подраздел 3.6)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© ISO, 2021
© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2024



В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Сокращения 2
5 Характеристика пирогена 2
6 Оценка пирогенности 5
7 Заключение 10
Библиография 11

Введение

ISO (Международная организация стандартизации) является федерацией национальных органов по стандартизации (органов — членов ISO). Работу по подготовке международных стандартов проводят через технические комитеты ISO. Каждая организация-член, заинтересованная в области деятельности, для которой создан технический комитет, имеет право быть представленной в данном комитете. Международные правительственные и неправительственные организации также принимают участие в работе ISO. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по вопросам стандартизации электротехнической продукции.

Процедуры, примененные при разработке настоящего стандарта, а также процедуры, предназначенные для его дальнейшей поддержки, приведены в Директиве ISO/IEC, часть 1. В частности, нужно отметить необходимость различных критериев утверждения для различных типов документов ISO. Настоящий стандарт составлен в соответствии с редакционными правилами директив ISO/IEC, часть 2 (gost.e-ecolog.ru). Необходимо обратить внимание на возможность того, что некоторые элементы настоящего стандарта могут быть объектом патентных прав.

ISO снимает с себя ответственность за обозначение каких-либо таковых патентных прав. Детали каких-либо патентных прав, обозначенных при разработке документа, будут содержаться во введении и/или в перечне полученных патентных деклараций ISO (см. gost.e-ecolog.ru).

Любая торговая марка, приведенная в настоящем стандарте, является информацией, приведенной для удобства пользователей и не является рекламой.

Для разъяснения добровольного характера стандартов, значений конкретных терминов ISO и выражений, связанных с оценкой соответствия, а также информации о приверженности ISO принципам ВТО по техническим барьерам в торговле (ТВТ) см. следующий URL: gost.e-ecolog.ru

Настоящий стандарт разработан Техническим комитетом ISO/TC 194 «Биологическая и клиническая оценка медицинских изделий».

Все отзывы и вопросы по данному документу должны быть направлены в национальные органы по стандартизации пользователя. Полный перечень данных органов приведен по адресу: gost.e-ecolog.ru members.html.

В настоящее время при оценке безопасности медицинских изделий руководствуются токсикологическими или другими исследованиями, рекомендуемыми в серии стандартов ISO 10993.

Пирогенность, опосредованная материалом, представляет собой системный эффект, включенный в приложение G ISO 10993-11:2017, но данный стандарт полностью направлен на рассмотрение исследования пирогенности медицинских изделий в целом.

Пирогенная реакция — это неблагоприятное воздействие химического агента или другого агента, например микробного компонента, вызывающее фебрильную (лихорадочную) реакцию.

Испытания на пирогенность необходимы для оценки безопасности продуктов, имеющих прямой или опосредованный (косвенный, непрямой) контакт с системой кровообращения и лимфатической системой, спинномозговой жидкостью и системно взаимодействующих с организмом человека.

В настоящее время в качестве приемлемых методов оценки пирогенности медицинских изделий и их материалов существуют методы исследования *in vivo* на кроликах и методы *in vitro* на бактериальные эндотоксины. Основные процедуры, включая приготовление образцов каждого исследуемого объекта, уже установлены, гармонизованы в международном плане и указаны в соответствующих руководствах и фармакопеях.

В последнее время был разработан и применен метод исследования пирогенности *in vitro* с использованием иммунных клеток человека, основанный на методе испытания на пирогенность на клетках человека (HCPT) для исследования пирогенности парентеральных лекарственных средств. Концепция применения исследования пирогенности для медицинских изделий рассматривается в связи с прямым или опосредованным воздействием на клетки крови человека.

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

Изделия медицинские

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Принципы и методы исследований на пирогенность

Medical devices.
Biological evaluation of medical devices.
Principles and methods for pyrogen testing

Дата введения — 2025—03—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает принципы и методы исследования медицинских изделий (МИ) и их материалов на пирогенность.

2 Нормативные ссылки

Нормативные ссылки в настоящем стандарте отсутствуют.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

ISO и IEC поддерживают терминологическую базу данных, используемую в целях стандартизации, по следующим адресам:

- Электропедия IEC: доступна по адресу gost.e-ecolog.ru ;
- платформа онлайн-просмотра ISO: доступна по адресу gost.e-ecolog.ru .

3.1 **медицинское изделие** (medical device): Инструмент, аппарат, устройство, машина, прибор, имплантат, реагент *in vitro* или калибратор, программное обеспечение, материал или другой сходный или сопряженный предмет, *предназначенные* производителем для использования человеком, отдельно или в комбинации, для одной или более конкретных целей:

- диагностика, профилактика, мониторинг, лечение или облегчение течения болезни;
- диагностика, мониторинг, лечение, паллиатив или компенсация травмы;
- обследование, замена, модификация или поддержка органа или физиологического процесса;
- поддержка или сохранение жизни;
- контроль зачатия;
- дезинфекция МИ;
- предоставление информации путем обследования *in vitro* образцов, полученных из организма человека;

и не достигающие своего основного предполагаемого действия фармакологическими, иммунологическими или метаболическими способами в организме человека или на поверхности тела, но которому они могут помочь в функционировании МИ.

Примечание — Продукты, которые могут считаться МИ в отдельных юрисдикциях, но не во всех, включают:

- дезинфицирующие вещества;
- приспособления для лиц с ограниченными возможностями;

Издание официальное

- изделия, включающие ткани животного и/или человеческого происхождения;
- изделия для оплодотворения *in vitro* или технологии вспомогательной репродукции.

[GHTF/SG1/N071:2012, 5.1]

3.2 **пироген** (pyrogen): Вещество, вызывающее лихорадку.

3.3 **пирогенность** (pyrogenicity): Свойство химического вещества или другого агента вызывать фебрильную реакцию.

3.4 **фебрильная реакция** (febrile response): Повышение значения температуры тела выше нормы.

Примечание — Также обозначается как жар или пирексия.

4 Сокращения

COX — фермент циклооксигеназы;
CpG — цитозин (C), следующий за гуанином (G) в секвенции ДНК, при p, обозначающем, что C и G привязаны фосфодиэфирной метильной группой к пятой позиции цитозин-пиримидинового кольца;
ELISA — ферментный иммуносорбентный анализ HCPT, например испытание на активацию моноцитов (MAT);
HCPT — испытание на пирогенность на клетках человека (Human Cells Pyrogenic Test);
IKK — киназа IkB, ферментный комплекс, задействованный в распространении клеточного ответа на воспаление;
IRAK — рецептор IL-1-ассоциированная киназа;
LAL — лизат амебоцитов мечехвоста;
LPS — липополисахарид;
MD-2 — гликопротеин, выделяемый молекулами, связывающий внеклеточный домен TLR4;
MCP — хемотаксический белок макрофагов;
MIP — воспалительный белок макрофагов;
NOD — нуклеотид-связывающий олигомеризационный домен;
PGE_2 — простагландин E_2;
RANTES — регулируемый по активации, нормальный с Т-экспрессией и выделяемый;
RNA — рибонуклеиновая кислота;
SEA — стафилококковый энтеротоксин A;
Spe C — стрептококковый пирогенный экзотоксин C;
Spe F — стрептококковый пирогенный экзотоксин F;
TBK — TANK-связывающая киназа;
TLR — Toll-подобный рецептор;
TNF — фактор некроза опухолей;
TSST — токсин синдрома токсического шока.

5 Характеристика пирогена

5.1 Общие положения

Основываясь на природе пирогена, фебрильную реакцию можно разделить на три группы:

a) пирогенность, опосредованная материалом, вызванная химическими агентами;

b) пирогенность, опосредованная эндотоксином;

c) пирогенность, опосредованная микробными компонентами, кроме эндотоксина.

Пирогенность, не опосредованная эндотоксинами, относится к вышеописанным группам в перечислениях a) и c). Однако принадлежность пирогенности к группе согласно перечислению c) можно четко отличить от пирогенности, опосредованной материалом, по фебрильной реакции, вызванной микробной контаминацией.

TLRs являются белками, которые составляют важную часть иммунной системы, противодействующей микробным инфекциям, тесно связанным с пирогенностью микробных компонентов. На данный

момент были идентифицированы 13 видов TLRs человека, от TLR1 до TLR13, и агонисты к некоторым из них. Большинство пирогенов, которые могут быть оценены в МИ, могут являться биоактивными веществами, полученными от микроорганизмов, присутствующих в качестве контаминантов процесса производства изделия или в самих материалах. Так как компоненты являются агонистами TLR и действуют как пирогены по отношению к человеку, знание о TLR очень важно.

5.2 Бактериальный эндотоксин

Бактериальный эндотоксин, важный компонент внешней мембраны грамотрицательной бактерии, является наиболее мощным пирогеном, распознаваемым TLR4. Эндотоксин является модулятором иммунного ответа организма и проявляет разнообразные биологические действия, например активацию макрофагов, митогенность и адъювантность, и в дополнение к пирогенности вызывает реакцию Шварцмана. С клинической точки зрения эндотоксин является причиной сепсиса, септического шока и полиорганной недостаточности, являющихся системными расстройствами с высоким уровнем смертности.

Эндотоксин в основном состоит из гетерополисахаридной части, подразделенной на О-специфическую цепь, основной олигосахарид и липидный компонент, называемый липид А, являющийся биологически активным центром эндотоксина. На мощность эндотоксина влияют схемы ацилирования и фосфорилирования, а также наличие/отсутствие полярной группы, связанной с фосфатным осадком в молекуле липида А. Дополнительно эндотоксин обладает видоспецифичностью к экспрессии его биоактивности.

В природе грамотрицательные бактерии широко распространены в воде (реки и моря), воздухе, почве, а также в человеческом организме. Таким образом, биоматериалы, сделанные из природных веществ, могут быть заражены бактериями и их компонентами. Автоклавирование, облучение и газовая стерилизация при производственном процессе способны убить бактерии. Тем не менее микробные компоненты, особенно эндотоксин, не могут быть деактивированы такими обычными методами. В случае контаминации в процессе производства удаление эндотоксина достаточно сложно. При производственном процессе количество эндотоксина может быть уменьшено или эндотоксин может быть полностью удален путем депирогенизации (например, при нагревании до 250 °С в течение 30 мин), применения химических веществ для деактивации эндотоксина, таких как, например, полимиксин-В [50], [66], или использования в технологических процессах производства воды, свободной от эндотоксина.

5.3 Микробные компоненты, отличные от эндотоксина

Микроорганизмы производят различные биоактивные вещества, не являющиеся эндотоксинами. Липотейхоевая кислота, важный компонент внешней мембраны грамположительной бактерии, представляет аналог эндотоксина и действует как пироген, распознаваемый TLR2, взаимодействующий и формирующий гетеродимер с TLR1 или TLR6. Липопротеины, липопептиды и липоарабиноманнан, являющиеся клеточными компонентами различных микроорганизмов, также могут действовать как агонисты TLR2. Хотя пептидогликан, строящий клеточную стену грамположительной бактерии и грамотрицательной бактерии, считался агонистом TLR2, недавно было предположено, что белки NOD1 и NOD2, а не TLR2, могут играть роль медиаторов экспрессии его биоактивности. Также вирусная двухцепочечная РНК, жгутики бактерий, бактериальный и вирусный CpG ДНК были идентифицированы как агонисты TLR3, TLR5 и TLR9 соответственно, и все они действуют в качестве пирогена человека. Хотя пирогенность не наблюдали для любой формы препарата (1,3)-β-D-глюкана, можно отметить, что определенные виды (1,3)-β-D-глюкана могут повысить токсичность эндотоксина.

Сообщалось, что эндотоксины и энтеротоксины, такие как TSST-1, SEA, Spe F и Spe C, продуцируемые различными патогенными организмами, вызывают фебрильную реакцию в организме человека токсин-специфическим способом, который может отличаться от сигнальной трансдукции TLR. При диализе наблюдали вспышку воспаления, лихорадки и перитонита у некоторых пациентов из-за контаминации раствора пептидогликаном [52], [76].

5.4 Провоспалительные цитокины

Так как фебрильные реакции, индуцированные агонистами TLR, опосредованы провоспалительными цитокинами, такими как TNFα, IL-1β, IL-6 и INF-γ, производимыми иммунными клетками человека, сам эндогенный медиатор должен, естественно, действовать как пироген. Каждый цитокин далее активирует иммунные клетки цитокиновой сети, так как в дополнение к TLR рецепторы, специфичные к цитокинам, находятся на поверхности моноцитов и макрофагов.

5.5 Химические агенты и другие пирогены

Механизм пирогенности химических или природных веществ не достаточно хорошо исследован. Кроме того, с каждым годом в мире обнаруживают или синтезируют более 1000 новых соединений, не все биологические свойства которых исследованы. Большинство химических веществ, используемых в настоящее время для МИ, безопасны и не пирогенны для человека. Тем не менее некоторые новые биоматериалы и химические вещества могут вызвать фебрильную реакцию.

Такой биологический ответ возможен для аллогенных или ксеногенных клеточных продуктов, которые могут вызвать иммунологическое распознавание и активацию иммунокомпетентных клеток.

В качестве примера ниже перечислены химические вещества, о которых известно, что они способны вызывать фебрильную реакцию организма человека. В основном по механизму возникновения фебрильной реакции эти химические вещества могут быть разделены на три группы:

a) агенты, напрямую стимулирующие терморегуляторные центры мозга и нервной системы,

b) разобщающие агенты окислительного фосфорилирования и

c) пирогены с малоизученными механизмами действия.

Известно, что приведенные ниже химические вещества вызывают у человека фебрильную реакцию:

- простагландины;
- индукторы (например, полиаденилиовая, полиуридиловая, полибионозиновая и полирибоцитидиловая кислоты);
- вещества, нарушающие функцию центров терморегуляции (например, диэтиламид лизергиновой кислоты, кокаин, морфий);
- нейромедиаторы (например, норадреналин, серотонин);
- разобщающие агенты окислительного фосфорилирования (например, 4,6-динитро-о-крезол, динитрофенол, пикриновая кислота);
- N-фенил-β-нафтиламин и альдоль-α-нафтиламин (фебрильный механизм неизвестен);
- металлы, такие как соли никеля, в отдельных случаях.

В дополнение к этим химическим веществам есть вероятность, что микросферы [23] и наночастицы [61], включая продукты деградации имплантатов [7], могут вести себя как пирогены. Микросферы, частицы [23] и наночастицы [61] определенных размеров могут быть фагоцитированы макрофагами и активизировать провоспалительные цитокины, выделяемые макрофагами, такими как TNFα. TNFα является одним из эндогенных пирогенов.

5.6 Принцип фебрильной реакции

TLR являются классом отдельных трансмембранных некаталитических рецепторов, которые распознают структуру сохранившихся микробных молекул, как только они преодолевают физические (физиологические) барьеры, такие как кожа или слизистая кишечника, и активируют иммунные клетки. Считается, что TLR играют ключевую роль во врожденной иммунной системе и могут функционировать как димеры. Большинство TLR действуют как гомодимеры, TLR2 формирует гетеродимеры с TLR1 или TLR6, причем каждый димер имеет разную специфичность лигандов. TLR также могут зависеть от других сорецепторов в плане полной чувствительности лигандов, например в случае распознавания эндотоксинов посредством TLR4, что требует молекулу MD-2. Известно, что связывающие белки CD14 и LPS облегчают распознавание эндотоксина для MD-2. При активации TLRs задействуют молекулы-адаптеры в цитоплазме клеток для распространения сигнала. Известны четыре молекулы-адаптера, задействованные в передаче сигнала. Эти белки известны как MyD88, Tirap (также именуемый Mal), Trif и Tram. Адапторы активируют другие молекулы внутри клетки, включая определенные протеинкиназы (IRAK1, IRAK4, TBK1 и IKKi), усиливающие сигнал и в конечном счете ведущие к индукции или подавлению генов (NF-*κ*B, AP-1 и IRP3), инициирующих воспалительный ответ.

После активации лигандами микробного происхождения возможно несколько реакций. Иммунные клетки могут выработать цитокины, вызывающие воспаление. IL-1β особенно тесно связан с индукцией фебрильной реакции. IL-6 и TNFα были выделены позже и также идентифицированы как пирогенные цитокины, но при более высоких дозах [28], [29]. Понимание механизма лихорадки у млекопитающих состоит в том, что эти провоспалительные цитокины приводят к экспрессии COX-2, которая способствует синтезу PGE_2 [30]. У мышей с недостаточным COX-2 лихорадка не возникает в ответ на LPS, IL-1 или IL-6 [47], а PGE_2 [48] вызывает внутриклеточный сигнальный каскад, меняющий нормальное значение температуры тела. Таким образом, IL-1β, IL-6 и TNFα являются медиаторами, выделяемыми иммун-

ными клетками при контакте с пирогенами, ответственными за вызывание реакции лихорадки в мозге. Известно, что вещество Р индуцирует лихорадку путем выработки TNF-α, IL-6 и PGE_2 [17].

TLRs могут быть задействованы в выработке цитокинов и активации клеток; они участвуют в процессах адгезии и фагоцитоза микроорганизмов, а также других потенциальных пирогенов.

Вне зависимости от сигнального пути TLR и последующей выработки цитокинов температура тела может повышаться веществами, напрямую стимулирующими центры терморегуляции. Также, разобщающие агенты окислительного фосфорилирования могут повысить температуру тела в результате активации цепочки транспорта электронов в митохондрии.

6 Оценка пирогенности

6.1 Общие положения

Существуют три метода для исследования пирогенности, описанные ниже. Исследование пирогенности на кроликах *in vivo* является единственным методом, в отличие от других двух методов измеряющим фебрильную реакцию организма в качестве биологического показателя в соответствии с определением пирогена. Методы *in vitro* обнаруживают пирогены, используя другие биологические показатели, такие как выработка цитокинов и коагуляция белков.

6.2 Испытание на бактериальные эндотоксины (BET)

6.2.1 Общие положения

Метод испытания на бактериальные эндотоксины (BET) гармонизирован с несколькими фармакопеями. Данный метод предназначен для обнаружения или количественного определения бактериального эндотоксина грамотрицательного бактериального происхождения с использованием лизата, являющегося водным экстрактом циркулирующих амебоцитов мечехвоста *(Limulus polyphemus или Tachypleus tridentatus)*. Технически испытание на бактериальные эндотоксины разделяется на два метода: один представляет метод гель-тромба, основанный на формировании геля, индуцированного реакцией лизата с эндотоксинами, а другой является фотометрическим методом, основанным на изменении оптической плотности индуцированных эндотоксинами раствора лизата. Последний далее разделяется на два метода: турбидиметрический, измеряющий концентрации эндотоксинов в растворах образцов, основываясь на изменении прозрачности раствора при гелеобразовании, и хромогенный, оценивающий концентрации эндотоксина измерением оптической плотности цвета хромофора, выделяемого синтетическим хромогенным субстратом, что является моделированием последней стадии ферментной каскадной реакции, описанной ниже.

Испытание на бактериальные эндотоксины может использоваться для контроля контаминации эндотоксинами в процессах производства МИ и готовых изделий с точки зрения обычного контроля качества. До использования реагента лизата, экстрагированного из *Tachypleus tridentatus*, данный метод называли: испытание лизатом амебоцитов лимулуса/отряд мечехвоста (LAL-тест).

Примечание — Существуют другие методы обнаружения бактериальных эндотоксинов, например флуоресцентный метод с использованием рекомбинантного фактора С, см. [6].

6.2.2 Принцип реакции LAL

BET является ферментной каскадной реакцией, имеющей наивысшую чувствительность к обнаружению и количественному определению грамотрицательных бактериальных эндотоксинов. Сначала фактор С, сериновой протеазы, чувствительный к эндотоксинам, находящийся в реагенте лизата, активируется эндотоксином. Активированный фактор С конвертирует фактор В из неактивной формы в активную, что продолжает конвертировать прокоагулирующий фермент в коагулирующий. Наконец, коагулирующий фермент конвертирует коагулоген в коагулин, что ведет к формированию геля. Дополнительно к фактору С изначальный реагент лизата содержит активируемый (1,3)-β-D-глюканами фактор G, который затем конвертирует прокоагулирующий фермент в коагулирующий. Эндотоксин-специфичный реагент LAL был разработан путем удаления фактора G или усиления его функции.

Так как BET основывается на энзиматической реакции, на его результаты влияют температура и pH раствора образца. Реакция стимулируется или ингибируется различными соединениями, такими как протеаза, ингибиторы протеазы, ионы металла, детергенты, хелаты, соли и сахара, если таковые присутствуют в достаточных концентрациях. Таким образом, исследования на предмет мешающих фак-

торов могут проводиться для проверки наличия ингибиторов и инициаторов реакции в исследуемом растворе. Эффекта мешающих факторов можно избежать путем разбавления исследуемого раствора.

6.2.3 Общая процедура BET

Общие методы для обнаружения и количественного определения эндотоксина обсуждались в фармакопеях различных стран и в AAMI ST 72. Детали приводят в данных документах.

Отмечается, что в отсутствие иных указаний для приготовления исследуемого раствора в качестве экстрагирующей жидкости может использоваться апирогенная вода. Эндотоксин, присутствующий в МИ и их материалах, обычно экстрагируют при комнатной температуре.

6.2.4 Особенности (свойства) BET

Метод LAL является простым и быстрым исследованием, способным с высокой точностью обнаружить эндотоксин, обозначая наличие грамотрицательной бактериальной контаминации МИ. Эндотоксин обладает видовой специфичностью в проявлении токсичности в зависимости от химической структуры участка липида А. Так как структурные особенности эндотоксина не в такой степени влияют на активность LAL, как его другие биологические свойства, такие как высвобождение цитокинов из воспалительных клеток, то BET способен идентифицировать более разнообразный спектр эндотоксинов по сравнению с НСРТ [16].

Контаминация МИ эндотоксином может указывать на более широкую микробиологическую контаминацию. Однако корреляция между количеством эндотоксина и других микроорганизмов в изделии отсутствует. BET является очень специфичным для грамотрицательной бактерии или эндотоксина. Исторически преобладающими и наиболее сильными пирогенными контаминантами при производстве МИ, поддающимися контролю, являлись бактериальные эндотоксины. Контаминацию бактериальными эндотоксинами сложно предотвратить, так как они повсеместно распространены, стабильны и достаточно малы, чтобы пройти сквозь обычные стерилизующие фильтры.

BET обладает определенными недостатками. Основным из них является то, что BET не может обнаруживать других пирогенов, кроме эндотоксина. Кроме того, поскольку знания о виде активного для человека эндотоксина ограничены из-за отсутствия требований к структурным свойствам эндотоксина для проявления его токсичности, то BET не всегда отражает пирогенную реакцию человека.

Изготовители изделия экстрагируют эндотоксин из МИ, зная, что нельзя достичь 100 %-ной степени его удаления. В некоторых случаях эндотоксин, абсорбируемый на некоторых полимерах, керамике, металлах или отдельных природных продуктах, невозможно удалить общепринятыми методами водной экстракции. Тем не менее параметры экстракции, рекомендуемые Департаментом по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA), а также согласно обязательным требованиям национальных фармакопей, подтвержденным многолетним применением, были достаточны для обеспечения отсутствия пирогенности МИ при обозначенных пределах предполагаемого его применения [20].

6.3 Исследование пирогенности на кроликах

6.3.1 Общие положения

Исследование пирогенности на кроликах является единственным известным испытанием для обнаружения пирогенов, опосредованных материалом, а также пирогенов, вызванных микроорганизмами.

Наличие пирогенности экстракта, обнаруженного по высокой температуре, указывает на присутствие в изделии пирогенов, не содержащих эндотоксинов. Исследование на кроликах не относится к методам количественного определения эндотоксина в конечных продуктах в качестве рутинного теста для контроля качества.

В соответствии с ISO 10993-11 МИ, содержащие химические вещества, которые ранее вызывали пирогенный ответ и/или новые химические соединения, пирогенный потенциал которых неизвестен, могут быть оценены на предмет пирогенности, опосредованной материалом.

6.3.2 Принцип исследования пирогенности на кроликах

Для оценки фебрильной реакции на пирогены у млекопитающих *in vivo* температура тела измеряется в динамике после внутривенного введения экстракта из МИ или материалов в физиологическом растворе.

6.3.3 Процедура испытания пирогенности на кроликах

Метод испытания представлен в соответствующих руководствах и фармакопеях. Хотя руководства/фармакопеи разных стран различаются в отношении ограничений массы тела кроликов, определения нормальной температуры тела, дозы инъекции исследуемого раствора и повторного использования

кроликов, в основном методы очень схожи. Соотношения образец/экстрагент и условия экстракции, применимые для приготовления экстрактов из МИ и материалов, приведены в ISO 10993-12.

Отмечается, что в качестве экстрагирующего раствора для приготовления проб исследуемого образца можно использовать только апирогенный физиологический солевой раствор. При экстракции может использоваться самая высокая температура среди условий ISO 10993-12, которая не приводит к значительному ухудшению свойств материала.

6.3.4 Характеристика исследования пирогенности на кроликах

В целом исследование на кроликах может обнаружить все виды пирогенов и фактическую величину фебрильной реакции. Данная реакция, индуцированная каждым пирогеном, оценивается *in vivo* как повышение внутренней температуры тела кролика. С этой точки зрения, несмотря на различия в специфичности к пирогенам у человека и кролика, испытание на кроликах *in vivo,* по-видимому, имеет преимущество по сравнению с HCPT. Тем не менее исследование на кроликах имеет недостатки, такие как низкая чувствительность, использование животных, а также необходимость большого количества исследуемого вещества. Исследование пирогенности на кроликах является единственным известным и валидированным методом для обнаружения пирогенов, опосредованных материалом и химическими веществами, вымываемыми из материала и способными вызывать фебрильную реакцию у пациента. Новые контактирующие с кровью или имплантируемые материалы/изделия могут быть проверены на предмет пирогенов, опосредованных материалом.

Однако в большинстве случаев испытание на пирогенность на кроликах не используется вместо BET.

6.4 Испытание на пирогенность на клетках человека (HCPT)

6.4.1 Общие положения

Испытание на пирогенность на клетках человека (HCPT) основывается на иммунологической реакции на клеточном уровне и является методом *in vitro* для обнаружения и количественного определения пирогенов, вызывающих фебрильную реакцию путем активации иммунных клеток человека, таких как моноциты и макрофаги [13]. Метод предназначен для оценки пирогенности, опосредованной эндотоксином, и пирогенности, опосредованной другими микробными компонентами в соответствии с фебрильной реакцией, индуцированной агонистами TLR. В дополнение к агонистам TLR существует возможность, что HCPT может количественно определить степень воспалительного ответа, каскадно инициированного фагоцитозом микросфер и взвешенных частиц.

Первичными мишенями эндотоксина *in vivo* являются моноциты и макрофаги. Был проведен ряд исследований для выяснения взаимосвязи между химической структурой эндотоксина и его биологической активностью с использованием макрофагов. Сам основной метод, применяемый в HCPT, основывается на традиционных методах исследования эндотоксинов. Так как этот метод демонстрирует более широкий спектр выявления пирогенов по сравнению с испытаниями на бактериальные эндотоксины (BET), он может быть полезен в качестве метода для устранения пробела между BET и испытанием пирогенности на кроликах, если он надлежащим образом валидирован.

6.4.2 Принцип метода HCPT

Макрофаги являются тканевыми клетками, происходящими из специфических лейкоцитов — моноцитов. Моноциты и макрофаги относятся к фагоцитарным клеткам, являясь составной частью неспецифической защиты (или врожденного иммунитета), а также способствуя запусканию специфичных механизмов защиты (или клеточно-опосредованного иммунитета) позвоночных животных. Их роль заключается в фагоцитозе продуктов клеточного распада и патогенов как в тканеспецифичных или фагоцитарных клетках, так и в распознавании растворимых патогенов путем TLR, находящихся на поверхности клеток, а также в стимуляции лимфоцитов и других иммунных клеток для ответа на патогены. В качестве секреторных клеток моноциты и макрофаги жизненно важны для регуляции иммунных ответов и развития воспаления. Фагоцитарная активность клеток активируется агонистами TLR (см. 4.2 и 4.3) для выработки активных химических веществ, включая цитокины. Цитокины, такие как TNFα, IL-1β и IL-6, в качестве регуляторных факторов индуцируют фебрильную реакцию в соответствии с механизмом, описанным в 4.6. В HCPT цитокины, выделяемые из таких клеток, обнаруживаются и количественно определяются методом ELISA как средством оценки степени фебрильной реакции.

6.4.3 Выбор иммунных клеток человека

Дополнительно к цельной крови человека линии миеломоноцитарных клеток человека, таких как MM6[1)], и мононуклеарных клеток человека[2)] [72] также доступны в качестве клеток-индикаторов НСРТ. С точки зрения лабораторного применения (простота доставки и безопасность) эти линии клеток более практичны, чем цельная кровь. Тем не менее у цельной крови есть следующие преимущества:

- все компоненты крови присутствуют в физиологических пропорциях, необходимых для взаимодействия пирогена с лейкоцитами;
- в цельной крови возможна инкубация образцов, что невозможно провести с линиями клеток.

С другой стороны, линии клеток имеют следующие недостатки:

- время (обычно недели), затраченное на формирование линии клеток, начиная с аликвоты замороженного материала. Для использования в испытании необходимо достаточное количество клеток необходимой чувствительности (к пирогенам);
- разная чувствительность клеток при разных количествах пассажей;
- необходимость одновременной стимуляции форболовым эфиром или кальцитриолом;
- подтверждение присутствия на клеточной линии различных рецепторных элементов, необходимых для трансдукции ответов пирогенам.

Сообщалось, что чувствительность клеточных линий к эндотоксину отличается друг от друга, только клетки MM6 вырабатывают большое количество TNFα в ответ на относительно небольшое количество эндотоксина после стимуляции кальцитриолом. Клетки цельной крови проявляют более высокую чувствительность к эндотоксину по сравнению с этими клеточными линиями, но клетки MM6-CA8[3)], субклоны клеток MM6 [58], демонстрируют практически идентичную чувствительность к клеткам цельной крови при обнаружении эндотоксина и пептидогликана.

6.4.4 Выбор маркерного цитокина

Хотя количество цитокина и хемокина, полученное стимуляцией агонистов TLR и микросфер из клеток цельной крови человека, различается в зависимости от вида стимуляторов, во всех случаях клетки индуцируют значительное количество MCP-1, IL-1βra, IL-8, MIP-1α и/или MIP-1β в дополнение к IL-1β, IL-6 и TNFα, являющихся традиционными маркерными цитокинами.

Из числа этих цитокинов и хемокинов IL-1β или IL-6 становятся хорошими маркерами из-за более высокой пропорции сигнал/шум (S/N). Дополнительно MIP-1α и MCP-1 проявляют относительно более высокое соотношение S/N, но соотношение MCP-1 для обнаружения агониста TLR3, а также частиц и микросфер относительно мало. См. [35] и [36].

Клетки MM6-CA8 демонстрируют другую схему выработки цитокина и хемокина из клеток цельной крови. Клетки индуцируют значительное количество IL-8, RANTES, IL-1βra, MCP-1, MIP-1α и MIP-1β в дополнение к традиционным маркерным цитокинам. Линия клеток IL-6 проявляет наивысшую пропорцию S/N для обнаружения всех агонистов TLR и микросфер среди этих цитокинов и хемокинов. MIP-1α, MIP-1β и IL-1β также демонстрируют более высокое соотношение S/N, чем TNFα.

С учетом этого можно выбрать подходящий маркерный цитокин или хемокин в соответствии с клетками, используемыми в НСРТ.

6.4.5 Описание метода НСРТ

Свежеотобранную гепаринизированную цельную кровь человека от здорового донора или криоконсервированную цельную кровь человека от нескольких доноров растворяют в физиологической апирогенной солевой или RMPI 1640 среде для клинического применения и объединяют с частью исследуемого МИ прямым методом [63], либо при косвенном методе подходящее количество исследуемого раствора экстрагируют из изделия. После инкубации от 8 до 24 ч при температуре 37 °С в атмосфере, подходящей для выбранной культуральной среды, требуемой методом исследования, количество

[1)] Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ; Cat. No. ACC 124), Брауншвейг, Германия.

[2)] Испытание на активацию моноцитов, CTL-MAT LLC, 20521, бульвар Шагрин, Шейкер-Хайтс, Кливленд, Огайо 44122-5350, США. Приведенная информация является примером коммерчески доступного подходящего продукта. Данная информация приводится для удобства пользователей данного документа и не является рекламой данного продукта со стороны ISO.

[3)] Доктор Юджи Хаишима, Отделение медицинских изделий, Национальный институт здравоохранения, 1-18-1 Камийога, Сетагая-ку, Токио, 158-8501, Япония, gost.e-ecolog.ru . Приведенная информация является примером коммерчески доступного подходящего продукта. Данная информация приведена для удобства пользователей данного документа и не является рекламой данного продукта со стороны ISO.

маркерного цитокина, такого как IL-1β, отражающее количество пирогена в соответствующем образце, измеряется посредством ELISA.

В случае линии миеломоноцитарных клеток человека клетки инкубируются в среде RPMI 1640, содержащей термоинактивированную фетальную бычью сыворотку и соответствующие добавки, такие как 2-меркаптоэтанол, HEPES, глютамин, неосновные аминокислоты, пируват натрия, бычий инсулин и антибиотики. Клетки стимулируются форболмиристатацетатом или кальцитриолом (1a, 25-дигидроксивитамин D3). После инкубации на 72 ч со стимулирующим реагентом клетки помещают в 24-луночный планшет при 1×10^6 клеток/мл/лунок с частью исследуемого изделия при прямом методе или подходящим количеством исследуемого раствора, экстрагированного из изделия, при косвенном методе. После инкубации от 8 до 24 ч при температуре 37 °C в атмосфере, подходящей для выбранной культуральной среды согласно требованиям метода исследования, маркерный цитокин, выделенный из клеток в культуральную среду, определяется методом иммуноферментного анализа (ELISA).

ELISA является стандартным чувствительным и специфичным иммунным методом. Маркерный цитокин, такой как IL-1β в исследуемом образце, располагается между моноклональным покрывающим антителом и помеченным поликлональным детекторным антителом. Несвязанные материалы удаляются в процессе отмывки. Иммобилизованное антитело-детектор прямо или косвенно связывается с ферментом пероксидазы хрена, который, взаимодействуя с субстратом TMB (тетраметилбензидин), вызывает смену цвета от бесцветного к синему. Реакцию останавливают добавлением в раствор кислоты, которая вызывает изменение цвета от синего к желтому, что регистрируется фотометрическим методом при 450 нм с опорной длиной волны в 690 нм.

В каждом анализе получают кривую зависимости доза—эффект для количества продуцируемого маркерного цитокина и эндотоксина из E. coli O111:B4 или другого подходящего стандарта, такого как эндотоксин E. coli UKT-B, откалиброванный по международному эталонному стандарту ВОЗ из E. coli O113:H10 [64]. Данная кривая зависимости доза—эффект должна содержать концентрацию в 0,5 EU/мл, соответствующую 50 пг/мл международного эталонного образца ВОЗ. Показатель считается пороговой концентрацией эндотоксина, вызывающей лихорадку у кролика. Данный порог был подтвержден исследованием, проведенным в 2005 г., включавшим 171 кролика [40].

Методом HCPT маркерный цитокин измеряется как общее количество, высвобождаемое из иммунных клеток, отражающее содержание всех пирогенов, присутствующих в исследуемом образце.

Тем не менее результат, полученный методом HCPT, оценивается конвертированием количества полученного маркерного цитокина в количество эндотоксина, так как эндотоксин является наисильнейшим пирогеном и критическое количество агонистов TLR, индуцирующих фебрильную реакцию, помимо эндотоксина пока не утверждено. Таким образом, подход к обнаружению пирогенности исследуемого образца идентичен испытанию на бактериальные эндотоксины. Метод HCPT имеет способность обнаруживать пирогены по высвобождению конкретных (целевых) цитокинов, что невозможно при исследовании методом на бактериальные эндотоксины.

С помощью метода HCPT обнаруживают пирогены по высвобождению целевых цитокинов, что невозможно сделать методом на бактериальный эндотоксин.

Метод HCPT не может быть использован вместо метода бактериального эндотоксина (LAL) для обычного контроля качества партий крупных готовых изделий/устройств на предмет наличия контаминации бактериальным эндотоксином при отсутствии валидации с использованием экстракта из МИ. Обычно методы HCPT *in vitro* требуют помещения небольшого плоского образца материала в маленькую емкость для прямого испытания с цельной кровью человека. Методами HCPT исследуют только очень небольшую определенную площадь материала, 2 $см^2$, если в 24-луночном планшете [35], или в полипропиленовых пробирках объемом 1,5 мл для испытания на пирогенность [53]. Также существуют методы, основанные на экстракции. Контаминация бактериальным эндотоксином может происходить во многих изделиях, если они содержат ингредиенты/компоненты биологического происхождения, воду (кроме воды для инъекции или ингаляций), используют воду для производства изделия (например, водное выщелачивание или замачивание, экструдирование) или обрабатываются с использованием воды (например, паровое автоклавирование, промывание). Для регулярного контроля качества больших партий готовых стерильных изделий рекомендуется провести исследование экстрактов из них. Необходимо убедиться, что все потенциальные источники бактериального эндотоксина полностью исследованы методом на бактериальные эндотоксины. Само готовое изделие может быть очень большим и занимающим большую площадь поверхности, что может вызвать пирогенность в организме пациента, опосредованную материалом (например, примесями).

Продукты крови человека представляют особую опасность, поэтому весь технический персонал должен пройти соответствующую подготовку по необходимым мерам предосторожности.

6.4.6 Характеристика метода HCPT

Метод HCPT имеет следующие преимущества по сравнению с исследованием пирогенности на кроликах и испытанием на бактериальные эндотоксины:

- не использует животных. Клетки получены из тканей человека, и, таким образом, нет необходимости в межвидовой экстраполяции;
- имеет более широкий спектр выявления пирогена по сравнению с испытанием на бактериальные эндотоксины [75];
- доступен для исследования пирогенных контаминантов в определенных продуктах, не обнаруживаемых испытаниями на кроликах или на бактериальные эндотоксины (например, ингибиторы и стимуляторы реакции LAL-тест, медикаменты, стимуляторы центральных или периферических механизмов регуляции температуры тела, вызывающие иммунные ответы у кроликов);
- позволяет испытывать твердые материалы непосредственно как исследуемый образец без какой-либо экстракции, так как иммунные клетки распознают пирогены, как элюированные из исследуемого образца в культуральную среду, так и связанные с поверхностью [75]. Пирогены эффективно обнаруживаются без какой-либо предварительной обработки материалов, адсорбирующих эндотоксин [75].

Метод HCPT имеет следующие недостатки:

- пирогены, опосредованные материалом, являются химическими веществами, которые обычно при своем действии не взаимодействуют с цитокиновой сетью для индуцирования фебрильной реакции, и маловероятно, что они обнаружатся этим методом;
- лекарства, взаимодействующие с моноцитами или макрофагами (например, антагонисты цитокиновых рецепторов, нефизиологические растворы, цитотоксичные агенты, рекомбинантные белки с цитокиновой активностью), или системы детекции (например, ревматоидные факторы) могут быть не обнаружены методом HCPT;
- может быть не применимым к тканеинженерным продуктам, содержащим живые клетки, выделяющие цитокины и хемокины;
- при использовании метода HCPT реакция на пироген может зависеть от донора образца крови или состояния клеток. В частности, на характеристики цельной крови влияют возраст и пол доноров, их генотип (например, генетические полиморфизмы в кодировании генов для Toll-подобных рецепторов, цитокиновых рецепторов), возможность инфицирования, суточных изменений, влияния диеты и других факторов, которые могут повлиять на чувствительность и специфичность цельной крови в исследованиях *in vitro*;
- трудности с транспортировкой цельной крови;
- применение метода HCPT для исследования твердых образцов на пирогенность может быть проблематичным при рутинном контроле качества партий крупных готовых стерильных изделий;
- метод HCPT на линиях миеломоноцитарных клеток человека имеет недостатки, связанные с его длительностью, стоимостью и техническими сложностями при предварительном культивировании и праймировании (обработка агентом) клеток.

6.4.7 Валидация HCPT

Валидация HCPT позволяет установить, может ли этот метод обнаружить другие пирогены, индуцирующие фебрильную реакцию механизмом, отличающимся от сигнального пути TLR и фагоцитоза, включая пирогены, опосредованные материалом.

7 Заключение

В некоторых случаях метод HCPT может являться хорошей альтернативой традиционным методам исследования пирогенности (на кроликах и LAL-тест). Однако испытания на кроликах необходимы для обнаружения пирогенов, не выявляемых методом HCPT, включая пирогены, опосредованные материалом. Таким образом, важно, чтобы метод оценки пирогенности МИ/материалов был выбран исходя из цели исследования.

Библиография

[1] ISO 10993-11 Biological evaluation of medical devices — Part 11: Tests for systemic toxicity (Оценка биологического действия. Часть 11. Исследования общетоксического действия)

[2] ISO 10993-12 Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials (Оценка биологического действия. Часть 12. Приготовление проб и контрольные образцы)

[3] ANSI/AAMI ST 72 Bacterial endotoxins — Test methods, routine monitoring, and alternatives to batch testing

[4] United States Pharmacopeial Convention, available at: gost.e-ecolog.ru

[5] Japanese Pharmacopoeia, available at: gost.e-ecolog.ru english/ pharmacopoeia/index.html

[6] European Pharmacopeia, available at: gost.e-ecolog.ru

[7] Algan S. M., Purdon M., Horowitz S. M., Role of tumor necrosis factor alpha in particulateinduced 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. Staphlococcal 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-α, 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 H. G., 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 fur 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 PO. 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 Immunitatsforsch 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 Immunitatsforsch 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] Shmunes 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 muropeptides 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., Thiemermann 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: gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru

УДК 615.46:002:006.354 МКС 11.020 IDT

Ключевые слова: медицинские изделия, пироген, пирогенность, фебрильная реакция, окислительное фосфорилирование

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *М.В. Малеевой*

Сдано в набор 11.09.2024. Подписано в печать 13.09.2024. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,10.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru