

DOI:10.19803/j.1672-8629.20250672 中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-8629 (2026) 02-0213-06

单核细胞活化检测法应用研究进展

吴昊¹, 贺庆^{2Δ}, 蔡彤², 裴宇盛², 刘涛³, 王冬梅^{1*} (¹沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; ²中国食品药品检定研究院化学药品检定所, 北京 102629; ³中国科学院苏州生物医学工程技术研究所生物医学工程, 江苏 苏州 215163)

摘要: 目的 针对传统热原检测方法存在的动物伦理问题、种属差异及检测范围局限等不足, 开发并应用更灵敏、广谱且符合“3R”(减少、替代、优化)原则的非动物体外检测技术, 以提升药品的热原安全性控制水平。**方法** 通过查阅文献, 综述单核细胞活化检测法(MAT)的特点、研究进展及发展趋势。**结果** MAT技术具有有效检测低浓度热原; 既能识别内毒素, 也能检测非内毒素热原; 完全体外操作, 符合“3R”原则等优势。**结论** MAT作为新兴的非动物热原检测技术, 凭借其高灵敏度、广谱性和伦理优势, 能够为药品安全性及有效性提供有力保障。

关键词: 热原; 内毒素; 非内毒素; 单核细胞活化检测法; 药典

Research Progress in Applications of MAT

WU Hao¹, HE Qing^{2Δ}, CAI Tong², PEI Yusheng², LIU Tao³, WANG Dongmei^{1*} (¹School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang Liaoning 110016, China; ²Institute for Chemical Drug Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; ³Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou Jiangsu 215163, China)

Abstract: Objective To develop a more sensitive, broad-spectrum, three-R (replacement, reduction and refinement) and non-animal *in vitro* platform in order to address ethical concerns, species-specific variations, and limited ranges of detection inherent in conventional methods for detection of pyrogens. **Methods** By reviewing the related literature, the characteristics, research progress and developments concerning the monocyte activation test (MAT) were summarized. **Results** The MAT technology proved capable of sensitive and broad-spectrum detection of endotoxins and non-endotoxin pyrogens (NEPs) In addition, this technology could be used entirely *in vitro* and without using any animal. **Conclusion** This study has validated the MAT as a robust and ethically-feasible technology for ensuring the safety and efficacy of drugs.

Keywords: Pyrogen; Endotoxin; Non-Endotoxin; Monocyte Activation Test; Pharmacopoeia

热原是指能够引起人体发热反应的物质, 主要包括内毒素热原和非内毒素热原^[1]。内毒素来源于革兰阴性菌, 所有的内毒素都具有脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)结构。非内毒素热原源于革兰阳性菌或从真菌中提取^[2]。多黏菌素 B 可通过将 LPS 聚集状态转变为非活性 LPS 胶束, 有效抑制细胞因子对 LPS 的反应, 结合单核细胞活化检测法(MAT)可区分药物的内毒素/非内毒素热原污染物^[3]。热原污染是药品生产和使用过程中需要严格控制的关键质

量问题, 由于热原污染不能通过标准灭菌过程消除, 并且一旦进入血液就会引发人体出现热原反应, 从轻微反应(如发烧)到感染性休克甚至死亡, 对人类健康造成极大的风险^[4]。

1 常见热原检测方法的比较

目前, 国际上被普遍推荐用于评估热原的方法主要有以下 3 种: 家兔热原实验(Rabbit Pyrogen Test, RPT)和细菌内毒素检查法(Bacterial Endotoxins Test, BET)及 MAT^[5]。RPT 是 20 世纪 40 年代引入的第 1 个评估注射产品的检验方法, 并被多国药典收载。该方法是将产品注射到兔子的耳静脉中并监测直肠温度变化^[6], 通过发热反应来识别内毒素和非内毒素热原的存在。因为兔子的反应与人类发烧的模式相同^[6], 所以 RPT 一直是检测注射、输注或植入人体的药品或医疗器械中热原的一个标准方法。

基金项目: 国家重点研发计划(2023YFC2606100)。

作者简介: 吴昊, 男, 在读硕士, 单核细胞活化反应热原检测研究与标准化研究。

^Δ 为并列第一作者。

***通信作者:** 王冬梅, 女, 博士, 副教授, 药物分析与质量控制。
E-mail: wdmlg@163.com

BET 于 1968 年建立, 是 1 种用于微量内毒素的定性或定量的体外分析检测方法^[7]。近些年 BET 发展迅速, 中国、日本、美国、欧洲均将其收载于药典中。BET 已成为全球药典公认的强制性质控手段, 其核心价值在于提升检测精度、降低成本、推动伦理进步。其专用试剂, 即鲎试剂已成为非肠道用药和医疗器械内毒素检测的关键试剂。鲎试剂对内毒素具有高度特异性, 但无法检测非内毒素热原^[8]。根据所选择的检测方法, 鲎试剂对内毒素的特异性检测可以定性或定量进行。虽然 BET 在大多数情况下已经取代 RPT, 但必须指出的是, BET 不是热原试验, 而是内毒素检查, 因此不能替代 RPT。国内和国际药典对热原检查和内毒素检查有明确的区分。许多生物制品如血液制品会干扰 BET, 并且鲎试剂会与 β -葡聚糖或某些草药制剂发生假阳性反应。目前, 鲎的动物福利问题也得到广泛关注^[9], 因此基因重组型鲎试剂被研发出来。

重组型鲎试剂包括重组 C 因子试剂 (Recombinant Factor C, rFC) 和重组鲎试剂 (Recombinant Cascade Reagents, rCR), 其开发都为基于鲎试剂检测内毒素的原理, 但其不会与 β -葡聚糖产生反应, 具有更好的内毒素特异性且为非动物源性试剂^[10]。美国、欧洲和日本药典均已采纳重组试剂用于内毒素检测法^[11]。但是 rFC 和 rCR 试验都不能完全预测人类对热原物质的反应, 并且随着几种非内毒素热原的出现, 进一步强调开展新型体外热原测试的必要性^[12]。

MAT 是 RPT 的替代方法, 最初是在 20 世纪 90 年代作为一种非动物方法学发展起来的, 后来被引入欧洲药典, 并得到全球多个业内的认可^[13]。MAT 是一种基于与人类发热反应相同的生物机制并且经过验证的 RPT 的体外替代方法^[14]。MAT 的核心机制是建立在人源单核细胞对热原物质的免疫识别与级联反应基础上, 其关键过程包括: 热原特异性识别、细胞内信号转导与炎症介质释放, 最后采用酶联免疫吸附试验进行定量分析, 实现对热原污染的客观量化评估。该方法融合体外检测方法的优点, 并能够识别广泛的病原体相关分子模式 (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs)。这些分子源自可引发败血症的微生物, 如内毒素和非内毒素类型。MAT 除能够检测样品中的所有热原污染物之外, 与 RPT 相比, 消除种属差异是其巨大优势。由于可以证明其与 RPT 的等效性, 替代方法验证机构间

协调委员会建议将其应用于热原物质的检测。此后, MAT 在药品质量控制领域受到广泛关注和应用^[15]。

2 MAT 的检测体系

2.1 单核细胞样本来源与储存

根据欧洲药典第 2.6.30 章, 多种来源的细胞可用于 MAT 测定, 即全血 (Whole Blood, WB)、外周血单核细胞 (Peripheral Blood Monocyte Cells, PBMC) 或单核细胞系。单核细胞系的缺点是其只代表 1 种遗传背景, 且来源于肿瘤细胞系, 并且必须确保传代过程中的功能稳定性^[16]。WB 或 PBMC 可以是新鲜分离的, 也可以是从冷冻血液解冻而来的。WB 或 PBMC 可以来自单一献血者或至少 4 个献血者混合后的供血库^[17], 选取使用至少 4 个献血者的混合后供体库会极大降低人类对热原物质反应性的个体差异风险, 从而确保检测结果能反映人群的普遍反应性。早期获取新鲜人血是较为困难的, 一方面是法律与伦理的限制, 一方面也存在着供体健康风险^[18]。SOLATI 等^[16]通过实验表明这些问题可以通过分离大量的人类 PBMC 并冷冻储存来克服。KORYAKINA 等^[19]也开发并验证 1 种从白细胞过滤器中制备 PBMC 并冷冻保存的方法。SOLATI 等^[16]使用冷冻的混合人单核细胞来测定 MAT, 以 IL-6 产量为读数进行, 实验结果表明冷冻后的 PBMC 细胞与新鲜单核细胞具有相当的敏感性, 能够高敏感地检测和定量肠外药物中的热原污染物。这对实现标准化的建立发挥重要作用。

2.2 MAT 检测指标与选择

单核细胞参与先天免疫反应, 并表达结合热原的 toll 样受体 (Toll-Like Receptors, TLRs)^[20]。当热原与单核细胞表面的 toll 样受体结合后, 会激活细胞内信号通路, 诱导单核细胞释放多种炎症因子, 如白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 等。通过定量检测这些炎症因子的浓度, 可以间接反映样品中的热原含量。MAT 热原检测首选的细胞因子通常是 IL-6, 因为与 IL-1 β 和 TNF- α 不同, IL-6 可以完全分泌到 PBMC 上清液中, 因此可以对其进行完整的估计^[21]。并且仅需少量热原即可诱导 IL-6 释放, 检测敏感性显著优于 IL-1 β 和 TNF- α ^[22]。在人体内毒素激发试验中证实, IL-6 的血浆浓度 (135 ± 28) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 较 TNF- α (16 ± 3) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 IL-1 β (10 ± 2) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 高 1 个数量级^[23]。作为炎症级联反应的上游调控因子^[23-24], IL-6 直接

介导发热信号的初始传导,并与人类及实验动物的体温升高呈强相关性^[25]。SOLATI等^[16]用冷冻的混合PBMC以IL-6和其他细胞因子的产生作为读数,也观察到IL-6比IL-1 β 和TNF- α 更敏感。目前,IL-6已参与MAT 80%的国际验证研究^[26],具备成熟的方法学基础。

HE等^[27]研究验证冷冻保存人全血作为MAT检测基质的可行性,重点评估IL-6与IL-1 β 作为热原标志物的敏感性。结果表明冷冻保存的血液样本依旧具有良好的细胞因子响应能力,同时也证实冷冻血在短期(≤ 12 个月)的稳定可靠性。值得注意的是,冷冻血中IL-6对LPS的敏感性仍高于IL-1 β 。该方案通过优化样本储存条件解决新鲜血来源限制问题,为标准化体外热原评估提供技术基础,支持MAT在药品监管体系中的推广前景。所以无论是新鲜血还是冷冻血,IL-6都是一种非常合适且被推荐用作MAT检测响应的细胞因子。

多项研究已证实IL-6作为MAT检测读数的优越性。在脑膜炎球菌结合疫苗研究中,IL-6被确定为冷冻全血法和WB MAT系统的最佳标记物^[28]。DE MATTOS等^[28]在黄热病疫苗及STODDARD等^[29]在脑膜炎球菌外膜囊泡疫苗研究中也支持此结论,指出IL-6比IL-1 β 更易定量。STOPPELKAMP等^[30]进一步证实IL-6在LPS刺激后信号强且线性范围广。DE MATTOS等^[28]发现含有佐剂的疫苗可能导致IL-1 β 读数因自发激活而异常,凸显了IL-6在复杂制剂(如含佐剂疫苗)中作为可靠指标的独特优势。这些研究为IL-6在疫苗热原检测中的应用提供了重要依据。

综上,IL-6凭借其卓越的敏感性、低背景干扰、高信号稳定性以及与发热机制的强相关性,已成为国际MAT验证研究的首选细胞因子指标,为MAT技术的标准化奠定基础。

2.3 MAT中血清来源与比较

WUNDERLICH等^[31]实验表明胎牛血清(FBS)成分稳定、易于标准化且成本低,可支持单核细胞体外存活与功能,但也发现因含异源蛋白(如牛免疫球蛋白G, IgG)可能干扰免疫检测。相比较FBS,人血清(HS)更贴近人体生理环境,能减少物种差异对免疫反应的影响,但需严格筛选供体(如排除病原体或抗体干扰)且受伦理和资源限制^[31-32]。研究也发现FBS与HS相比,FBS对主要评估的非内毒素

热原的反应性和敏感性较低。此外,FBS的使用违背“3R”(替代、减少、改进)概念,并带来物种之间的数据外推问题^[28]。此外,HS避免动物源性争议,符合“3R”伦理原则。因此,HS-Based MAT被确立为首选方案,推动MAT在热原筛查中的标准化和广泛应用。

3 MAT在热原检测中的应用

3.1 MAT在生物制品热原检测中的应用

3.1.1 MAT在热原检测及对协同热原效应检测中的优势
近些年来,采用BET评估生物制品内毒素的风险有所增加,针对部分生物制品存在的低内毒素回收现象^[33],业内担忧其可能影响内毒素检测的准确性。MAT作为一种功能性的内毒素检测方法可弥补BET在应对低内毒素回收方面的不足^[34]。但MAT也存在局限性:其对内毒素的检出限通常高于BET,因此其对“掩蔽状态下内毒素”的灵敏检测能力仍需更多研究数据支持^[34]。

当生物制品中存在内毒素与非内毒素热原时,两者共存会产生协同增强效应,潜在风险大大提高。这种协同效应在血液制品(如5%人血白蛋白)中较为明显。但BET仅能检测内毒素,无法识别非内毒素热原及协同效应。SOLATI等^[35]采用冷冻保存PBMC来源的MAT试剂盒(CTL-MAT kit)检测内毒素(LPS)和非内毒素热原,实验结果发现MAT对混合热原的协同效应具有高敏感性。与BET相比,MAT可同时识别2类热原及协同效应;与RPT相比,MAT更灵敏、更高效^[35]。该结果可有效支持制药企业放行无热原产品,保护患者免受未检出的非内毒素热原及协同效应危害,是RPT的合格替代方案。

生物制品的复杂性、高聚合价值和独特性,决定必须针对每个产品开展专属的热原测试验证,同时也加强对技术与科学数据支持的需求^[36]。

3.1.2 MAT在疫苗热原检测和疫苗生产质控中的应用

疫苗是用于增强机体对特定疾病或病原体免疫力的药物制剂,其成分通常包含类病原微生物物质、抗原、稳定剂、佐剂等^[37]。MAT在重组乙型肝炎疫苗热原评估中表现出显著优势,其对IL-6的检测限低至2.5 EU \cdot mL⁻¹,而RPT检测限为5 EU \cdot mL⁻¹^[38]。MAT还能识别50 000 ng \cdot mL⁻¹的脂磷壁酸,而RPT在该浓度不具有热原性,故MAT适用于这类含佐剂疫苗的非内毒素热原检测^[38]。另外,因许多疫苗本身不会使人体发热,所以可以使用RPT检验污染热

原,但对于脑膜炎球菌 OMV 疫苗,由于其含有相对较高浓度的致病菌物和已知刺激物的佐剂,存在会使家兔发热的问题。同时由于脑膜炎球菌 OMV 疫苗由外膜蛋白、脂质及固有结构成分 LPS 构成,其 LPS 作为疫苗功能成分而非污染物存在,因此 BET 也无法准确评估 OMV 复合结构中内毒素与 Toll 样受体激动剂的协同效应所引发的复杂炎症反应。但 MAT 法可通过量化细胞因子的释放,可更精准反映 OMV 疫苗的临床热原风险,同时符合国际 3R 原则,为新型复合佐剂疫苗的质量控制提供标准化解决方案。

使用内毒素标准物质作为评价体系的 MAT 在评估含固有热原的复合疫苗 Bexsero (B 群脑膜炎球菌疫苗) 时存在显著缺陷: Bexsero 中的脑膜炎球菌外膜囊泡不仅携带结构异质性 LPS (其脂质 A 酰基化模式与大肠杆菌 LPS 差异导致 TLR4 激活效能不同),还包含脂蛋白、细胞周质成分等非内毒素促炎因子,引发多通路协同免疫激活。这种复杂基质的生物效应导致剂量-反应曲线与标准内毒素缺乏平行性,表现为相同内毒素单位 (EU) 下,OMV 诱导人单核细胞 IL-6 分泌量较纯化 LPS 高 1.8~2.5 倍^[5],导致基于标准内毒素的定量参照失效。VALENTINI 等^[39]建立并验证以疫苗自身参考批次为基准的单核细胞活化检测法,建立 BEXSERO 特异性剂量-效应标准曲线,成功量化总热原活性的动态互作效应。相较于 RPT, MAT 可将批次间变异系数从 15% 降至 3%,且规避 BET 对非内毒素热原的漏检风险^[39],同时也减少大量的动物使用,为含固有热原成分的复杂佐剂疫苗提供符合 3R 原则的标准化质控方案。CARSON 等^[40]应用 MAT 来检测基于广义膜抗原模块的志贺氏菌疫苗的热原性。确定参考批次比较测试为最适合的方法,并提出使用原料药作为参考标准,因为其相较于药物产品更为稳定,且能更好地反映该疫苗的热原性特征。这一方法不仅减少动物实验的需求,还提高了测试的准确性和重复性。该研究首次成功将 MAT 应用于多组分疫苗的热原性检测,并证明使用药物成分作为参考标准的可行性,这为未来疫苗的开发和临床试验提供重要参考^[40]。

MAT 还可以用于疫苗生产过程中的热原监控,帮助优化生产工艺,降低热原污染风险。欧洲药典支持在疫苗生产工艺开发中使用 MAT 进行热原监控。MOLENAAR 等^[6]开发和验证基于 HS-Based MAT (Sanquin-Mat Kit) 的试剂盒,其操作简便、快速,适

用于生产环节的高通量批次筛查。MAT 能灵敏检测疫苗中 LPS 等 PAMPs 引发的促炎反应,有效评估疫苗反应原性水平。研究发现,疫苗在 MAT 中的 IL-6 反应与 RPT 的体温变化 (温升、曲线下面积) 高度相关。例如,含高活性 LPS 的疫苗显示强 IL-6 反应和温升,而经修饰或降低剂量后反应性显著减弱,安全性提升。该模型符合“3R”原则,可以更安全、快速、准确地保障疫苗质量。

MAT 凭借其广谱性和高灵敏度,在疫苗热原检测中展现出独特优势。随着 MAT 的推广应用,也为疫苗的安全性评估提供新的技术选择。

3.1.3 MAT 在其他生物制品中热原检测的应用 对于重组蛋白类药物, MAT 还能够识别生产过程中可能引入的其他热原成分,为产品质量控制提供更全面的保障。在细胞治疗产品领域, MAT 的应用也取得显著进展。由于细胞治疗产品的特殊性 (活细胞、个体化、复杂性等),传统热原检测方法往往难以适用。在针对干细胞制剂的研究中, MAT 成功检测出细胞培养过程中引入的热原,为优化生产工艺提供重要参考^[41]。DANIELS 等^[42]在通过适用性测试及独立的药品生产质量管理规范 (Good Manufacturing Practice, GMP) 验证,评估 MAT 检测热原与促炎污染物的能力,重点验证其对热原阴性与阳性产品批次的可靠区分能力。结果显示, MAT 可 100% 准确识别 3 种单克隆抗体批次中添加的 25% 限制及 125% 限制的标准内毒素污染,无假阳性或假阴性。独立 GMP 验证数据进一步证实其稳健性与准确性,为 MAT 替代 RPT 提供更多支持。此外,研究中发现单克隆抗体中的肽聚糖部分与内毒素共同作用时,对单核细胞的激活及促炎反应显著强于两者单独作用的叠加,清晰揭示药品中“内毒素+非内毒素污染物”相互作用的复杂性,这些结果凸显 MAT 在复杂污染物检测中的优势,为推动其成为药典标准热原检测方法提供关键支持。

3.2 MAT 在化学药品热原检测中的应用

在对琥珀酰明胶注射液 (Succinylated Gelatin Injection, SGI) 的热原检验中, ZHENG 等^[43]研究采用 BET 和 MAT 来评估 SGI 中的热原。实验中 MAT 是在 HL-60/IL-6 测定法的基础上开发的。对 MAT 进行验证,结果发现 BET 在干扰试验中失败,而 MAT 被证明适用于 SGI 的热原检测。所有检测的产品在热原检测试验中均显示阴性结果。表明 MAT

可应用于多组分化学药品的质量和安全控制的热原检测。

4 MAT 的技术优势与挑战

MAT 作为一种新兴的热原检测技术在药品和医疗器械质量控制中展现出巨大潜力^[44]。MAT 对未来减少不必要的动物实验、提升人类健康安全也有着重要意义^[35]。2023 年欧洲药品质量管理局、欧洲委员会以及欧洲动物实验替代方法合作组织联合主办一场题为“热原检测的未来：逐步取代家兔热原实验”的国际会议。会议中，国际监管机构强调欧洲以外地区接受 MAT 的重要性^[45]。欧洲药典和美国药典已将其纳入标准化技术指南，要求规范细胞来源、实验条件和验证指标，以确保不同实验室间结果的可比性。欧洲药典委员会自 2025 年 7 月 1 日起已全面删除 RPT。这意味着欧洲药典的任何文本中将不再要求使用 RPT。目前，《中国药典》也已将 MAT 作为热原检查的补充方法收载于 9301 注射剂安全性检查法应用指导原则^[46]。随着“3R”原则的贯彻，全球监管机构正推动非动物源性检测技术的发展，但 MAT 的广泛应用仍需解决干扰因素控制、临床验证不足及国际方法互认等挑战。MAT 需通过足够的临床数据支持其生物学相关性，并在大规模产业化应用中充分验证批次间检测的可靠性。MAT 在我国热原检测领域的技术着力点应聚焦 3 方面突破：① 标准化，优化人源细胞系、建立 IL-6/TNF- α 为核心的多因子检测技术，制定统一质控标准；② 国产化，研发 MAT 试剂盒及自动化工作站，实现关键试剂与设备自主可控；③ 融合创新，拓展至复杂成分疫苗、CAR-T 等高风险产品检测，开发报告基因细胞系及 AI 辅助决策系统，提升灵敏度与广谱性。未来，MAT 有望成为更快速、准确的热原检测主流方法，为医药产品安全性提供更可靠的保障。

参考文献

[1] KELLUM JA, RONCO C. The Role of Endotoxin in Septic Shock[J]. *Critical Care*, 2023, 27(1): 400.

[2] NASO F, CALAFIORE AM, GAUDINO M, et al. Polyphenols Could Be Effective in Exerting a Disinfectant-Like Action on Bioprosthetic Heart Valves, Counteracting Bacterial Adhesiveness[J]. *Cardiology and Cardiovascular Medicine*, 2022, 6(5): 487–492.

[3] JAVED A, SLINGERLAND CJ, WOOD TM, et al. Chimeric Peptidomimetic Antibiotic Efficiently Neutralizes Lipopolysaccharides (LPS) and Bacteria-Induced Activation of RAW Macrophages[J]. *Acs Infectious Diseases*, 2023, 10, 9(3): 518–526.

[4] THURMAN TL, LAHTI CJ, MATEFFY JM, et al. Comparison of

Pyrogen Assays by Testing Products Exhibiting Low Endotoxin Recovery[J]. *Altex-Alternatives to Animal Experimentation*, 2023, 40(1): 117–124.

[5] VIPOND C, SUTHERLAND J, NORDGREN K, et al. Development and Validation of a Monocyte Activation Test for the Control/Safety Testing of an OMV-Based Meningococcal B Vaccine[J]. *Vaccine*, 2019, 37(29): 3747–3753.

[6] MOLENAAR-DE BACKER MWA, DOODEMAN P, REZAI F, et al. *In vitro* Alternative for Reactogenicity Assessment of Outer Membrane Vesicle Based Vaccines[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 12675.

[7] LIU SH, PEI YS, TAN DJ, et al. Research Progress in Detection Methods of Pyrogen and Bacterial Endotoxin[J]. *Chinese Journal of Pharmacovigilance(中国药物警戒)*, 2024, 33(22): 2331–2337.

[8] PEI YS, CAI T, CHEN C, et al. Study on the Application of Supplementary Methods of Bacterial Endotoxin Test in Chinese Pharmacopoeia[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy(中国现代应用药学)*, 2022, 39(6): 822–826.

[9] THOMAS H. Pyrogen Testing Revisited on Occasion of the 25th Anniversary of the Whole Blood Monocyte Activation Test[J]. *Altex-Alternatives to Animal Experimentation*, 2023, 38(1): 3–19.

[10] FAUZIYAH, MUSTOPA AZ, FATIMAH, et al. Carcinoscorpis and Tachypleus Lysates Assay for Detecting Endotoxin in Milk and Groundwater: Toward Reducing Reliance on Limulus Amebocyte Lysate[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2025, 232–234: 107119.

[11] U.S. Pharmacopeia. Expert Committee Approves Endotoxin Testing Using Non-Animal Derived Reagents[EB/OL]. (2024–07–24)[2025–10–30]. <https://www.usp.org/news/expert-committee-approves-endotoxin-testing-using-non-animal-derived-reagents>.

[12] LI L, CHENG X, WANG J, et al. Determination for the Bacterial Endotoxin of 11 Recombinant Type III Humanized Collagen Solution for Injection by the Recombinant C-Factor Method[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志)*, 2025, 45(3): 530–536.

[13] ABDIN SM, MANSEL F, HASHTCHIN AR, et al. Sensor Macrophages Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells to Assess Pyrogenic Contaminations in Parenteral Drugs[J]. *Biofabrication*, 2024, 16(3): 035017.

[14] HAYASHI K, SANO M, KANAYASU-TOYODA T, et al. Evaluation of the Effect of Cell Freshness on Pyrogen Detection Using a Serum-Free Monocyte-activation Test[J]. *Plos One*, 2024, 19(12): e0316203.

[15] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia[M]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2025.

[16] SOLATI S, AARDEN L, ZEERLEDER S, et al. An Improved Monocyte Activation Test Using Cryopreserved Pooled Human Mononuclear Cells[J]. *Innate Immunity*, 2015, 21(7): 677–684.

[17] MOLENAAR-DE BACKER MWA, GITZ E, DIEKER M, et al. Performance of Monocyte activation Test Supplemented with Human Serum Compared to Fetal Bovine Serum[J]. *Alternatives to Animal Experimentation*, 2021, 38(2): 307–315.

[18] SONDHI P, ADENIJI T, LINGDEN D, et al. Advances in Endotoxin Analysis[J]. *Advances in Clinical Chemistry*, 2024, 118: 1–34.

- [19] KORYAKINA A, FREY E, BRUEGGER P. Cryopreservation of Human Monocytes for Pharmacopeial Monocyte Activation Test[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2014, 405: 181–191.
- [20] KAAIJK P, VAN STRAATEN I, VAN DE WATERBEEMD B, et al. Preclinical Safety and Immunogenicity Evaluation of a Nonavalent PorA Native Outer Membrane Vesicle Vaccine against Serogroup B Meningococcal Disease[J]. *Vaccine*, 2013, 31(7): 1065–1071.
- [21] TAKTAK YS, SELKIRK S, BRISTOW AF, et al. Assay of Pyrogens by Interleukin-6 Release from Monocytic Cell Lines[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1991, 43(8): 578–582.
- [22] POOLE S, MISTRY Y, BALL C, et al. A Rapid ‘One-plate’ *in vitro* Test for Pyrogens[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2003, 274(1–2): 209–220.
- [23] PEDERSEN BK, BRUNSGAARD H, KLOKKER M, et al. Exercise-induced Immunomodulation-Possible Roles of Neuroendocrine and Metabolic Factors[J]. *International Journal of Sports Medicine*, 1997, 18(Suppl 1): 2–7.
- [24] CARTMELL T, POOLE S, TURNBULL AV, et al. Circulating Interleukin-6 Mediates the Febrile Response to Localized Inflammation in Rats[J]. *Journal of Physiology-London*, 2000, 526(Pt 3): 653–661.
- [25] DINARELLO CA, GATTI S, BARTFAI T. Fever: Links with an Ancient Receptor[J]. *Current Biology*, 1999, 9(4): R147–R150.
- [26] National Institute of Environmental Health Sciences. ICCVAM Test Method Evaluation Report: Validation Status of Five *in vitro* Test Methods Proposed for Assessing Potential Pyrogenicity of Pharmaceuticals and Other Products[R/OL]. (2008–03–24)[2025–10–23]. <https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvam/docs/pyrogen/tmer/pyrotmer2008.pdf>.
- [27] HE Q, GAO H, XU LM, et al. Analysis of IL-6 and IL-1 β Release in Cryopreserved Pooled Human Whole Blood Stimulated with Endotoxin[J]. *Innate Immunity*, 2018, 24(5): 316–322.
- [28] DE MATTOS KA, NAVEGA ECA, SILVA VF, et al. Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) in the Quality Control of the 17DD Yellow Fever Vaccine[J]. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals*, 2018, 46(1): 23–37.
- [29] STODDARD MB, PINTO V, KEISER PB, et al. Evaluation of a Whole-Blood Cytokine Release Assay for Use in Measuring Endotoxin Activity of Group B Neisseria Meningitidis Vaccines Made from Lipid a Acylation Mutants[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010, 17(1): 98–107.
- [30] STOPPELKAMP S, WÜRCHUM N, STANG K, et al. Speeding up Pyrogenicity Testing: Identification of Suitable Cell Components and Readout Parameters for an Accelerated Monocyte Activation Test (MAT)[J]. *Drug Testing and Analysis*, 2017, 9(2): 260–273.
- [31] WUNDERLICH C, SCHUMACHER S, KIETZMANN M. Pyrogen Detection Methods: Comparison of Bovine Whole Blood Assay (bWBA) and Monocyte Activation Test (MAT)[J]. *Bmc Pharmacology & Toxicology*, 2014, 15: 50.
- [32] ZERVOS C, ZIMMERMAN TP, WILLIS T, et al. Immunoglobulin G from Single Plasma Donor in Immune Globulin Intravenous Causes False Positive Pyrogen Test[J]. *Biologicals*, 2019, 59: 12–19.
- [33] BURGMAIER L, PÖLT S, AVCI-ADALI M, et al. The Impact of LPS Mutants on Endotoxin Masking in Different Detection Systems[J]. *Biologicals*, 2025, 89: 101808.
- [34] PEI YS, XU L, CAI T, et al. Low Endotoxin Recovery and Mitigation Strategies[J]. *Chinese Journal of Pharmacovigilance (中国药物警戒)*, 2025, 22(1): 72–75.
- [35] SOLATI S, ZHANG T, TIMMAN S. The Monocyte Activation Test Detects Potentiated Cytokine Release Resulting from the Synergistic Effect of Endotoxin and Non-endotoxin Pyrogens[J]. *Innate Immunity*, 2022, 28(3–4): 130–137.
- [36] JEON Y, JEON S, LIM JY, et al. Monocyte Activation test (MAT) as an Ethical Alternative to Animal Testing[J]. *Bmb Reports*, 2025, 58(3): 105–115.
- [37] CARLIN G, VIITANEN E. *In vitro* Pyrogenicity of the Diphtheria, Tetanus and Acellular Pertussis Components of a Trivalent Vaccine[J]. *Vaccine*, 2005, 23(28): 3709–3715.
- [38] DOROUD D, EFTEKHARI Z, DANESHI M, et al. Development of a Monocyte Activation Test for Evaluating Recombinant Hepatitis B Vaccine: a Novel Approach for Pyrogen Assessment[J]. *Iranian Biomedical Journal*, 2024, 28(5–6): 273–281.
- [39] VALENTINI S, SANTORO G, BAFFETTA F, et al. Monocyte-Activation Test to Reliably Measure the Pyrogenic Content of a Vaccine: An *in vitro* Pyrogen Test to Overcome *in vivo* Limitations[J]. *Vaccine*, 2019, 37(29): 3754–3760.
- [40] CARSON D, MYHILL S, PALMIERI E, et al. Development of a Monocyte Activation Test as an Alternative to the Rabbit Pyrogen Test for Mono- and Multi-Component Shigella GMMMA-Based Vaccines[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(7): 1375.
- [41] SCHRÖTTMAIER WC, SALZMANN M, BADRNYA S, et al. Platelets Mediate Serological Memory to Neutralize Viruses *in vitro* and *in vivo*[J]. *Blood Advances*, 2020, 4(16): 3971–3976.
- [42] DANIELS R, VAN DER ELST W, SO C, et al. Fit for Purpose Testing and Independent GMP Validation of the Monocyte Activation Test[J]. *Current Research in Toxicology*, 2024, 8: 100206.
- [43] ZHENG LX, WANG MR, SHEN X, et al. Applicability of Monocyte Activation Test for Pyrogen Detection in Succinylated Gelatin Injection[J]. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2021, 17(4): 503–508.
- [44] BORTON L, COLEMAN K. Material-mediated Pyrogens in Medical Devices: Myth or Reality?[J]. *Altex-Alternatives to Animal Experimentation*, 2025.
- [45] CIREFICE G, SCHÜTTE K, SPREITZER I, et al. The Future of Pyrogenicity Testing: Phasing out the Rabbit Pyrogen Test—a Meeting Report[J]. *Biologicals*, 2023, 84: 101702.
- [46] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People’s Republic of China, Volume IV (中华人民共和国药典四部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2025.

(收稿日期: 2025–09–19 编辑: 孔繁瑶)