

Pyrogenní látky obsažené ve sterilním injekčním roztoku vyvolávají u králíka po nitrožilním podání vzestup jeho rektální teploty.

Výběr zvířat: Ke zkoušce se použijí zdraví dospělí králíci o hmotnosti nejméně 1,5 kg. Zvířata jsou chována v klidném prostředí v individuálních klecích, krmena standardní vyváženou dietou bez obsahu antibiotik a jejich hmotnost nevykazuje během týdne před zkouškou žádný úbytek. Teplota chovné místnosti je stálá a neliší se o více než 3 °C od teploty zkušební místnosti. Po zkoušce s nepyrogenním výsledkem se může králík vzít do nové zkoušky nejdříve za 3 dny, po zkoušce s pyrogenním přípravkem se tento interval prodlužuje na 3 týdny.

Přístrojové vybavení: Pohyblivost králíka při zkoušce se omezuje vhodným zařízením, které fixuje netraumatizujícím způsobem pouze šiji zvířete a dovolí mu zaujmout normální uvolněnou pozici v sedě. K měření tělesné teploty se použijí rektální teploměry nebo elektrické termometry, které udávají teplotu s přesností 0,1 °C. Všechny prostředky použité v kontaktu s králíkem musí být apyrogenní. Nejprve se provádí předběžné testování králíků. Následuje vlastní provedení zkoušky.

Zkouška se provádí v oddělené nerušené místnosti se stálou teplotou kolem 20 °C. Ke zkoušce se použijí tři králíci, kterým je večer předtím odebrána potrava. Po upoutání do fixačního zařízení a zavedení rektálních termometrů se u každého zvířete 90 min sleduje tělesná teplota v 30min intervalech. Zkoušený roztok, zahřátý na teplotu asi 38,5 °C, se pomalu vstříkne do marginální ušní žíly králíka s dobou podání nejvýše 4 min, není-li v příslušném článku uvedeno jinak. Množství látky se pro provedení zkoušky liší podle zkoušeného přípravku a je předepsáno v příslušném článku. Objem vstříkovaného roztoku má být nejméně 0,5 ml/kg a nejvýše 10 ml/kg tělesné hmotnosti. Reakce králíka je vyjádřena rozdílem mezi jeho výchozí a maximální naměřenou teplotou. Jestliže je tento rozdíl negativní, je výsledek počítán jako nulová odpověď. Výsledek zkoušky se posoudí na základě naměřených vzestupů rektální teploty u použité skupiny králíků (6).

Výhody: tradiční metoda (poprvé uvedena v ČSL 2 v roce 1954) (7) založená na podobné reakci zvířecího organismu na přítomnost pyrogenu/ů v organismu jako u člověka.

Tato metoda měla svůj zásadní význam zejména u následujících typů přípravků:

- Intravenózní roztoky: Roztoky určené pro intravenózní podání, jako jsou elektrolytové roztoky, roztoky pro parenterální výživu, a injekční roztoky.
- Dialyzační roztoky: Roztoky používané při hemodialýze, kde je kritická absence pyrogenů vzhledem k přímému kontaktu s krevním oběhem.
- Implantáty a lékařské přístroje: Implantabilní materiály, jako jsou katetry nebo stenty, které přicházejí do kontaktu s tkáněmi nebo krevním řečištěm.
- Biologické přípravky: Například vakcíny a další biologické produkty, kde je testování na pyrogeny nezbytné pro zajištění bezpečnosti pacienta.
- Roztoky pro oplachování dutin těla: Např. roztoky pro oplachování peritoneální dutiny během chirurgických zákroků.

Nevýhody: biologický a kvalitativní test využívající laboratorní zvíře (3R – Replacement, Reduction, Refinement), časově i ekonomicky náročné, nutnost zaškolení personálu, nutnost trénování používání laboratorních zvířat. Test nelze použít v případě toxicity aktivní látky, případně pokud aktivní látka sama teplotu ovlivňuje.

Úplné odstranění RPT z evropského lékopisu (Ph. Eur.) se dle doporučení jednotlivých lékopisných komisí jeví jako nezbytné z důvodu vyloučení použití laboratorních zvířat. Pro kontrolu pyrogenity (endotoxiny a nonendotoxiny) je cílem přejít k výhradnímu použití testů in vitro (tj. BET nebo MAT) (8).

b. Test aktivace monocytů (Monocyte activation test – MAT) (lékopisný článek 2. 6. 30)

Obecná monografie 2. 6. 30. Test aktivace monocytů (MAT) byla zavedena do Ph. Eur. v roce 2009 a poskytuje in vitro alternativu k RPT. Test aktivace monocytů napodobuje lidskou imunitní reakci inkubací monocytů s testovaným vzorkem. Tento test je schopen detekovat jak endotoxinové, tak neendotoxinové pyrogeny. V přítomnosti pyrogenů dochází k aktivaci monocytů, které následně produkují zánětlivé molekuly, cytokiny, jež jsou odpovědné za horečnatou reakci. Tyto cytokiny jsou poté detekovány pomocí imunologického testu (ELISA), který využívá specifické protilátky a enzymatickou barevnou reakci.

PyroCell Monocyte Activation Test Systems je příkladem detekční soupravy pro stanovení pyrogenů metodou MAT. Tyto soupravy jsou optimalizované a validované pro citlivou detekci pyrogenů ve farmaceutických přípravcích. Systém PyroCell MAT, IL-6® zahrnuje mononukleární buňky získané z kryokonzervované periferní krve (PBMC), které jsou sdružené od čtyř lidských dárců (pMAT buňky), spolu s optimalizovaným kultivačním médiem.

Test se provádí v několika krocích. Prvním krokem je rozmrazení kryokonzervovaných pMAT buněk, které se poté inkubují se zkoušenou látkou jako buněčné kultury po dobu 18–24 hodin. Následující den se sbírají supernatanty buněčných kultur, a cytokin IL-6, uvolňovaný aktivovanými lidskými monocyty, se detekuje pomocí lidského ELISA testu IL-6. Měření absorbance se provádí na čtečce absorbance. Naměřené hodnoty jsou následně přepočítány na ekvivalentní jednotky endotoxinu (EEU/ml) pomocí referenčních ředění endotoxinů. Test je ověřen s použitím soupravy Pelikine compact human IL-6 ELISA, která zajišťuje robustní a spolehlivé výsledky (9).

Výhody MAT:

- Široké spektrum detekce pyrogenů: MAT dokáže detekovat nejen endotoxiny (pyrogeny pocházející z gramnegativních bakterií), ale také neendotoxinové pyrogeny, jako jsou pyrogeny z gram-pozitivních bakterií, hub nebo virů.
- Humánní přístup: MAT je in vitro test, což znamená, že nevyžaduje použití živých zvířat. To snižuje etické a právní problémy spojené s testováním na zvířatech a je v souladu s principy 3R.
- Lepší reprodukovatelnost: Test poskytuje vyšší konzistenci a spolehlivost výsledků než některé in vivo testy, díky standardizovaným podmínkám a použití specifických lidských monocytů.
- Lepší predikce lidské odpovědi: Protože MAT používá lidské buňky, může lépe napodobovat imunitní odpověď člověka na pyrogeny