

# **Инструкция по проведению гель-тромб теста с использованием ЛАЛ-реактива PYROTELL®**

## **Общая информация**

ЛАЛ-тест проводимый в соответствии с требованиями FDA (1) может служить заменой фармакопейного теста проводимого на кроликах (анализа пирогенности) для проверки качества инъекционных лекарственных средств, вводимых человеку, инъекционных лекарственных средств применяемых в ветеринарии, и изделий медицинского назначения. ЛАЛ-тест может быть использован для оценки содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственных субстанциях, используемых при производстве лекарственных средств, включая воду, а также для мониторинга уровня бактериальных эндотоксинов на разных стадиях производства лекарственных средств.

ЛАЛ-реактив предназначен только для проведения анализа *in vitro*, он не предназначен для диагностики эндотоксемии.

## **ИНФОРМАЦИЯ ПО ЛАЛ-РЕАКТИВУ PYROTELL®**

ЛАЛ-реактив Pyrotell, далее ЛАЛ-реактив, поставляется в лиофилизированном виде во флаконах, содержимое которых рассчитано на получение 1, 2 или 5 мл раствора после разведения водой. ЛАЛ-реактив Pyrotell содержит только водный экстракт амебоцитов *L. polyphemus*, 1.5% v/v 25% альбумина (стабилизатор), 3% NaCl, а также другие необходимые ионы. Он не содержит консервантов, буфера и других компонентов. Компанией Associates of Cape Cod, Inc., поставляются серии ЛАЛ-реактива Pyrotell с чувствительностью от 0,03 ЕЭ/мл до 0,5 ЕЭ/мл, которая определена с помощью Национального стандарта эндотоксина (RSE). Чувствительность ЛАЛ-реактива представляет собой минимальную концентрацию бактериальных эндотоксинов, которую можно обнаружить в гель-тромб тесте, проводимом при стандартных условиях. Чувствительность, выраженная в ЕЭ/мл для каждой партии реактива, указана на этикетке флакона и в сопроводительном сертификате. При заказе ЛАЛ-реактива необходимо указывать его чувствительность.

## **Разведение ЛАЛ-реактива**

1. Легким постукиванием соберите порошок на дне флакона. Удалите алюминиевый колпачок и приподнимите пробку, чтобы погасить вакуум. Старайтесь не привнести загрязнений на горлышко флакона. Не протыкайте пробку иглой и не закрывайте пробкой вскрытый флакон. Те небольшие количества порошка, которые остаются на пробке, не оказывают влияния на дальнейшие анализы. Вскрытый флакон закройте Парафильмом.
2. Для разведения ЛАЛ-реактива используйте воду для ЛАЛ-теста (см. «Реактивы для анализа»). Внесите 1,0 , 2,0 или 5,0 мл воды для ЛАЛ-теста в соответствии с указаниями на этикетке флакона. Лيوфилизированный ЛАЛ-реактив переходит в раствор в течение нескольких минут. Перед использованием аккуратно перемешайте содержимое флакона, чтобы добиться большей гомогенности. Слишком интенсивное перемешивание способно привести к пенообразованию, что в свою очередь может оказаться причиной снижения чувствительности.

## **Условия хранения**

Леофилизированный ЛАЛ-реактив сравнительно стабилен и в случае его хранения в холодильнике сохраняет свои свойства до момента истечения срока годности указанного на этикетке. Если не указано иного, храните ЛАЛ-реактив при температуре от -20 до +8°C.

Хранение при температуре ниже  $-20^{\circ}\text{C}$  может привести к деформации пробки, потере вакуума и возможному загрязнению реактива. Температура выше  $+37^{\circ}\text{C}$  приводит к быстрому разрушению лиофилизированного реактива, что проявляется в снижении чувствительности и пожелтении содержимого. Для предохранения от воздействия повышенных температур флаконы с ЛАЛ-реактивом поставляются в изолированных контейнерах вместе с холодагентами.

Свежеразведенный ЛАЛ-реактив, обычно прозрачен, и может слегка опалесцировать. Некоторые серии могут иметь легкую мутность. Присутствие мелких фрагментов или волокон не означает загрязнение и не влияет на чувствительность. Однако, осадок или желтое окрашивание свидетельствуют о разрушении реактива. Разведенный реактив менее стабилен, чем лиофилизированный. Флакон можно держать 24 часа при температуре от 2 до  $8^{\circ}\text{C}$ . Разведенный ЛАЛ-реактив может быть один раз заморожен. Если он заморожен сразу после разведения и хранится при температуре ниже  $-20^{\circ}\text{C}$ , он сохраняет свои свойства в течение трех месяцев. После размораживания качество реактива может быть оценено по тем же критериям, что и качество свежеразведенного препарата.

## **СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

Образцы необходимо собирать в апиrogenные контейнеры в условиях, гарантирующих асептику. Для сбора проб рекомендуется использовать депиrogenизированные стеклянные контейнеры, которые можно использовать многократно, также допускается использование одноразовой пластиковой посуды из полистирола. Эти материалы в наименьшей степени адсорбируют эндотоксин на поверхности. Не все пластиковые контейнеры могут быть свободны от бактериальных эндотоксинов, а экстрагируемые из некоторых видов пластика вещества могут влиять на реакцию. Для того, чтобы убедиться в том, что выбранная партия пластиковой посуды может быть использована в анализе, следует подготовить с помощью воды для ЛАЛ-теста смывы с нескольких контейнеров (выбранных в случайном порядке) и проверить эти смывы тем же способом, что и любой другой испытуемый образец проверяемый с помощью ЛАЛ-теста.

pH реакционной смеси (испытуемый образец и ЛАЛ-реактив) должен быть 6 – 8. Довести pH можно с помощью HCl, NaOH или буфера (не содержащего бактериальных эндотоксинов). Концентрированные HCl, NaOH нужно развести водой для ЛАЛ-теста до концентрации (нормальности), которая не будет приводить к существенному разведению испытуемого раствора. Однако pH физиологического раствора или воды, не имеющих собственной буферной емкости, таким образом доводить нельзя. К группе веществ, которые могут оказывать влияние на ход реакции, относятся вещества, которые могут вызывать денатурацию белков, выводить из раствора катионы (хелатирующие агенты), вещества, способные связывать эндотоксины или изменять их гидрофобные свойства. Обнаружить это присутствие мешающих факторов можно, если в результате реакции с раствором эндотоксина известной концентрации регистрируется значение, меньше или больше ожидаемого (см. «Ограничения метода»). В большинстве случаев разведение испытуемого образца приводит к снижению концентрации и активности мешающих факторов и делает возможным получение достоверных результатов. Возможные способы разведения и правила постановки контролей описаны в разделе «Процедура анализа».

Образцы следует проверять как можно скорее после сбора. Можно рекомендовать замораживать нестерильные пробы, которые не будут проверяться немедленно. Образцы, концентрация бактериальных эндотоксинов в которых может быть ниже 1 ЕЭ/мл, необходимо исследовать и на предмет снижения определяемой концентрации бактериальных эндотоксинов во время хранения.

## **ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

## Реактивы для анализа

1. ЛАЛ-реактив во флаконах на несколько определений (см. описание и способ разведения в разделе выше).
2. Вода для ЛАЛ-теста не входит в комплектацию ЛАЛ-реактива и должна быть заказана отдельно. Лиофилизированный ЛАЛ-реактив должен быть разведен водой, которая не содержит бактериальных эндотоксинов в определяемых в тесте количествах. Можно рекомендовать воду производства Associates of Cape Cod, Inc или воду соответствующую требованиям предъявляемым USP к стерильной воде для инъекций или для ирригации (вода для инъекций без консервантов). Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в воде для инъекций - не более 0,25 ЕЭ/мл, таким образом, такая вода может содержать бактериальные эндотоксины в концентрациях, определяемых ЛАЛ-реактивом с высокой чувствительностью. Для аттестации новой партии воды для инъекций или воды для ЛАЛ-теста следует с помощью этой воды развести ЛАЛ-реактив, приготовить серию разведений стандарта эндотоксина и провести подтверждение чувствительности ЛАЛ-реактива. Если чувствительность будет подтверждена, а в пробирках с отрицательным контролем не будет никаких видимых изменений, проверенная партия воды может использоваться в дальнейших анализах. Воду для ЛАЛ-теста следует использовать для разведения ЛАЛ-реактива, контрольного стандарта эндотоксина и испытуемых образцов.
3. Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ) не входит в комплектацию ЛАЛ-реактива и должен заказываться отдельно. КСЭ используется для подтверждения чувствительности ЛАЛ-реактива, валидации метода для испытуемого препарата и для постановки положительного контроля испытуемого образца. Содержание эндотоксина в флаконе выражено в весовых единицах. Национальный стандарт эндотоксина (RSE) можно заказать в U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. При разведении и хранении КСЭ следует придерживаться инструкции производителя. Одна и та же серия КСЭ может проявлять различную активность (выраженную в ЕЭ/мл) при реакции разными сериями ЛАЛ-реактива, поэтому она должна обязательно сопровождаться сертификатом сравнения серии КСЭ с используемой серией ЛАЛ-реактива.

## Материалы и оборудование (заказываемые отдельно)

1. Пробирки для проведения реакции, 10x75 мм, депирогенизированные, натриевого стекла. Некоторые партии могут оказывать ингибирующее действие на отдельные серии ЛАЛ-реактива. Депирогенизированные пробирки можно заказать у производителя ЛАЛ-реактива, Associates of Cape Cod, Inc.
2. Водяная баня без принудительной циркуляции воды или термоблок, способные поддерживать температуру  $37 \pm 1^\circ \text{C}$ .
3. Штативы для пробирок, используемые при подготовке к анализу и/или для инкубирования.
4. Пипетки, автоматические дозаторы с пластиковыми наконечниками или репетиры. Рекомендуются использовать стерильные и одноразовые наконечники и пипетки.
5. Вихревая мешалка типа «Вортекс».
6. Парафильм. Внутренняя сторона пленки под слоем покровной бумаги, обычно апирогенна.
7. Апирогенные пробирки, объем которых позволяет готовить разведения КСЭ и испытуемого образца (подходящими могут оказаться стеклянные пробирки 18x150 мм с металлическими крышками). В разделе «Сбор и подготовка образца» приведено описание других контейнеров, пригодных для приготовления разведений.
8. Сухо-жаровой шкаф, позволяющий поддерживать температуру  $180^\circ$  или  $250^\circ \text{C}$  для депирогенизации стеклянной посуды. Рекомендуемые циклы депирогенизации – минимум  $180^\circ \text{C}$  в течение 3 часов (10) и  $250^\circ \text{C}$  в течение 30 минут (2,11).

## Контроли

Контроли необходимы для подтверждения достоверности теста. Рекомендуемая процедура приведена в инструкции FDA (1) и в Американской фармакопее (2).

### 1. Положительные контроли.

а.) **Стандартная серия разведений КСЭ.** Ежедневно используйте свежеприготовленные разведения КСЭ из исходного раствора КСЭ. Используемая серия двукратных разведений должна быть подобрана таким образом, чтобы верхняя граница концентрации эндотоксина была выше, а нижняя - ниже заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива ( $\lambda$ ). Рекомендуется использовать ряд концентраций КСЭ соответствующий  $2\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $0,5\lambda$  и  $0,25\lambda$ . Следует делать как можно меньше разведений, учитывая при этом возможность точного отбора проб.

б.) **Положительный контроль** может быть включен в схему анализа при определенных обстоятельствах, в этом случае он заменяет собой стандартную серию разведений КСЭ. См. требования FDA (1), раздел «Анализ лекарственных средств с помощью ЛАЛ-теста». В качестве положительного контроля используется КСЭ в концентрации  $2\lambda$ .

### 2. Отрицательные контроли

Отрицательный контроль представленный водой для ЛАЛ-теста, должен ставится для каждого анализа. При проведении валидации метода для испытуемого препарата (1,2) раствор испытуемого образца, используемый для приготовления серии разведений КСЭ, также может рассматриваться как отрицательный контроль.

## Подготовка образца для проведения анализа

Анализ может быть проведен для одного разведения испытуемого препарата при проведении качественного теста или для серии его разведений при проведении количественного теста (примеры этих анализов приведены в разделе «Результаты и интерпретация»).

Разведения можно делать в пробирках для разведений, после чего необходимый объем реакционной смеси переносится в пробирки для проведения реакции. Можно готовить разведения и в пробирках для реакции, в этом случае в каждой из них должно оставаться по 0,1 мл раствора. Разведение, в котором проводится качественный тест, рассчитывается, исходя из значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов, установленного для испытуемого препарата и значения чувствительности ЛАЛ-реактива. Разъяснение смысла понятия “Максимально допустимое разведение” приведено в разделе «Ограничения метода» и в требованиях FDA (1).

## Проведение теста

Получение удовлетворительных результатов гарантируется стандартизацией правил проведения эксперимента.

1. В пробирки, содержащие по 0,1 мл испытуемого образца и контроли, добавьте по 0,1 мл ЛАЛ-реактива. Используйте пипетки с градуировкой, позволяющей отмерить 0,1 мл или автоматические дозаторы, или репетиры. Сначала добавьте ЛАЛ-реактив к отрицательному контролю, затем от меньшей концентрации КСЭ к большей. Рекомендуется использовать новую пипетку или наконечник каждый раз при отборе ЛАЛ-реактива из флакона. Перемешайте содержимое, покачивая штатив с пробирками в течение 20-30 секунд, для того чтобы добиться полного перемешивания. В том случае, если в анализе используются всего несколько пробирок, перемешать содержимое каждой из них в течение 1-2 секунд можно на вихревой мешалке. Неполное перемешивание является очень распространенной причиной неудовлетворительных результатов.

2. Поместите пробирки в водяную баню или термоблок при температуре  $37 \pm 1^\circ \text{C}$  на  $60 \pm 2$  минут. Реакция начинается сразу после добавления ЛАЛ-реактива, но оптимальные условия для ее протекания наступают, когда реакционные смеси нагреваются до  $37^\circ \text{C}$ . Если в анализе одновременно проверяется большое количество образцов, их следует разделить на

группы, таким образом, чтобы можно было считывать результаты для каждой из них в установленный временной интервал. Не следует трогать пробирки во время инкубирования. Процесс образования геля может быть необратимо нарушен из-за неосторожных толчков, ударов, вибрации. Поэтому не следует использовать водяные бани с принудительной циркуляцией воды. Уровень воды в бане должен быть выше уровня реакционных смесей в пробирках, но не намного, иначе пробирки могут всплывать.

3. Вынимать пробирки из штатива следует по одной. Старайтесь не ударить пробиркой о край штатива. Не следует протирать пробирки от капель воды. Переверните пробирку одним плавным движением. Не останавливайте движение на полпути за исключением случая, когда очевидно, что гель не образовался. За положительный результат принимается твердый гель, который остается на дне пробирки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ.

### Пример анализа серии разведений контрольного стандарта эндотоксина

Для подтверждения заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива, аттестации лаборатории и специалистов, проводящих тест, анализируют серию разведений КСЭ в ряду концентраций, близких к заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (1,2). Как правило, исследуется реакция с растворами КСЭ в концентрации 2 λ, λ, 0,5 λ, 0,25 λ. Так, например, если чувствительность ЛАЛ-реактива равна 0,25 λ, результаты для серии разведений КСЭ могут быть следующими:

| Концентрация эндотоксина                    | Результаты анализа |
|---------------------------------------------|--------------------|
| 0,5 ЕЭ/мл (2 λ)                             | +                  |
| 0,25 ЕЭ/мл (λ)                              | +                  |
| 0,125 ЕЭ/мл (0,5 λ)                         | -                  |
| 0,06 ЕЭ/мл (0,25 λ)                         | -                  |
| Вода для ЛАЛ-теста (отрицательный контроль) | -                  |

Конечным результатом анализа считается наименьшая концентрация эндотоксина, для которой получен положительный результат.

Заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива считается подтвержденной, если конечный результат равен λ плюс-минус один шаг разведения. В этом примере последний положительный результат был получен для концентрации 0,25 ЕЭ/мл или λ, чувствительность ЛАЛ-реактива подтверждена. Тест считается достоверным, если конечные результаты получены для концентраций от 0,125 ЕЭ/мл до 0,5 ЕЭ/мл (допустимая ошибка метода). Разведение, равное 0,06 ЕЭ/мл, включено в тест для того, чтобы можно было регистрировать положительный результат для разведения 0,125 ЕЭ/мл.

Когда анализ проводится в нескольких параллелях, значение чувствительности ЛАЛ-реактива рассчитывается как среднее геометрическое значение полученных результатов.

Среднее геометрическое =  $\text{antilog} ((\Sigma e)/f)$ ,

где  $\Sigma e$  = сумма log значений,  $f$  = количество параллелей

**Отрицательный контроль** (вода для ЛАЛ-теста) должен быть отрицательным. Если в отрицательном контроле получен гель, это означает, что вода для ЛАЛ-теста, посуда, или ЛАЛ-реактив загрязнены. Реакционная смесь должна оставаться прозрачной, не должно происходить помутнения реакционной смеси. Помутнение или появление осадка может свидетельствовать о содержании эндотоксина в концентрациях ниже чувствительности ЛАЛ-реактива.

В том случае, когда в тесте не ставится серия разведений КСЭ (1), в тест включается **положительный контроль**. Для этого используется раствор КСЭ в концентрации, равной 2 λ, в примере, рассмотренном выше, эта концентрация соответствует 0,5 ЕЭ/мл. Если в

положительном контроле получен отрицательный результат, это означает что чувствительность ЛАЛ-реактива как минимум в два раза ниже заявленной и тест не может считаться достоверным. Снижение чувствительности может означать разрушение ЛАЛ-реактива, потерю активности используемого КСЭ (обычно из-за адсорбции эндотоксина на поверхности стекла) и, наконец, о том, что анализ был неправильно проведен.

#### **Пример проведения качественного анализа.**

Для того, чтобы убедиться в том, что содержание бактериальных эндотоксинов в испытуемом образце менее или более установленного для него значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов, достаточно провести анализ этого испытуемого образца в одном единственном разведении. Например, концентрация активного вещества в испытуемом препарате равна 1 мг/мл, а предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 3 ЕЭ/мг (см. раздел «Ограничения метода»). Предельное содержание эндотоксинов, выраженное в виде концентрации, равно:

$$(3 \text{ ЕЭ/мг}) \times (1 \text{ мг/мл}) = 3 \text{ ЕЭ/мл},$$

Эта концентрация выше чувствительности используемого ЛАЛ-реактива, равной 0,25 ЕЭ/мл, следовательно, образец может быть разведен перед проведением анализа.

Рассчитать степень разведения при котором результат будет означать либо разрешение использования препарата < 3 ЕЭ/мл, либо его выбраковку > 3 ЕЭ/мл, можно, разделив значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов на чувствительность ЛАЛ-реактива:

$$3 \text{ ЕЭ/мл} / 0,25 \text{ ЕЭ/мл} = 12.$$

Для получения такого разведения надо смешать 1 часть испытуемого образца с 11 частями воды для ЛАЛ-теста, это даст степень разведения 1:12. Результат анализа будет указывать на то, проходит или нет испытуемый образец тест при предельном содержании бактериальных эндотоксинов, равном 3 ЕЭ/мл. Для этой же степени разведения ставится и положительный контроль испытуемого образца, чтобы исключить возможность получения ложноотрицательных результатов.

#### **Пример проведения количественного анализа**

Количественное определение содержания бактериальных эндотоксинов в испытуемом препарате возможно путем анализа серии его разведений. В приведенном ниже примере испытуемый препарат разводился водой для ЛАЛ-теста и разведения проверяются с помощью ЛАЛ-реактива с чувствительностью 0,25 ЕЭ/мл.

| Разведения испытуемого препарата | Результаты теста |
|----------------------------------|------------------|
| Неразведенный препарат           | +                |
| 1:2                              | +                |
| 1:4                              | +                |
| 1:8                              | -                |
| 1:16                             | -                |
| 1:32                             | -                |
| Отрицательный контроль           | -                |

Для расчета концентрации бактериальных эндотоксинов в испытуемом образце необходимо умножить чувствительность ЛАЛ-реактива  $\lambda$  на значение фактора разведения, являющегося результатом реакции.

$$\text{Концентрация бактериальных эндотоксинов} = \lambda \times 4 = 0,25 \text{ ЕЭ/мл} \times 4 = 1 \text{ ЕЭ/мл}$$

Для результатов, полученных для нескольких параллелей, рассчитывается среднее геометрическое значение.

Анализ включает **положительный контроль испытуемого образца** (испытуемый образец, к которому добавлен КСЭ в концентрации 2 λ) который позволяет исключить ложноотрицательные результаты. Если в положительном контроле испытуемого образца получены отрицательные результаты, а в положительном контроле- результаты положительные это означает, что испытуемый образец ингибирует реакцию. Анализ должен быть повторен для большего разведения испытуемого образца (но не более значения МДР, см. раздел «Ограничения метода»).

## ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Естественным ограничением метода является возможность ингибирования или усиления реакции со стороны испытуемого препарата. Если метод невозможно валидировать (1,2) для концентрации, большей минимально допустимой концентрации, ЛАЛ-тест не может использоваться как замена пирогенного теста на кроликах. Минимально допустимая концентрация МДК рассчитывается следующим образом:

$$\text{МДК} = \frac{\lambda \times (\text{терапевтическая доза испытуемого образца})}{\text{Пороговая пирогенная доза}}$$

Где λ, выражена в ЕЭ/мл, терапевтическая доза испытуемого образца выражена в единицах на килограмм веса, и пороговая пирогенная доза выражена в ЕЭ/кг.

Пороговая пирогенная доза (1) для растворов, вводимых интратекально, составляет 0,2 ЕЭ/кг, для парентеральных растворов она составляет 5 ЕЭ/кг. Предельное содержание бактериальных эндотоксинов для изделий медицинского назначения выражается ЕЭ на мл смыва с поверхности или экстракта, приготовленных в соответствии с требованиями FDA (1). Для медицинских изделий, контактирующих со спинномозговой жидкостью, предельное содержание бактериальных эндотоксинов в смыве должно быть не более 0,06 ЕЭ/мл, во всех других случаях в смывах должно содержаться не более 0,5 ЕЭ/мл. Пороговые пирогенные дозы для медицинских растворов такие же, как и для лекарственных средств.

Трипсин способен вызывать ложноположительные результаты, нагревание перед анализом, приводящее к денатурации, способствует преодолению этого действия.

Кровь, сыворотка и плазма должны быть инактивированы для удаления ингибиторов перед анализом (12).

## ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Количественное определение концентрации бактериальных эндотоксинов возможно, если в испытуемом образце эта концентрация больше или равна чувствительности ЛАЛ-реактива. Материалы биологического происхождения, даже после очистки могут содержать бактериальные эндотоксины в определяемых концентрациях. В воде, полученной путем дистилляции, обратного осмоса или ультрафильтрации, концентрация бактериальных эндотоксинов может быть ниже определяемого уровня, при условии, что установка нормально функционирует и вода не загрязняется после очистки.

## СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТОДА

Для гель-тромб теста допустимая ошибка составляет 50%-200%, от значения полученного в анализе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal

- Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, p. 1696-1697. USP 23 NF 18. 1994. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD.
  3. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
  4. Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.
  5. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
  6. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
  7. Levin, J., and F. B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
  8. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
  9. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.
  10. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.
  11. Sweet, B. H. and J. F. Huxsoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
  12. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.

Associates of Cape Cod, Inc.  
704 Main Street • Falmouth, MA 02540  
Tel: (888) 395-ACC1 or (508) 540-3440