

ЛИЗАТ АМЕБОЦИТОВ LIMULUS

ENDOSAFE® КТА

ФЛАКОН ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ (ПИРОГЕНОВ)

НАЗНАЧЕНИЕ

Лизат амебоцитов Limulus (ЛАЛ-реактив) представляет собой водный экстракт, полученный из амебоцитов мечехвоста *Limulus*, и предназначен для количественного определения содержания эндотоксинов с помощью гель-тромб теста или кинетического турбидиметрического метода

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Настоящий реактив предназначен для обнаружения содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах, ветеринарных препаратах, биологических препаратах и изделиях медицинского назначения. Реактив не предназначен для клинической диагностики.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

ЛАЛ-тест является наиболее чувствительным и высокоспецифичным способом оценки содержания бактериальных эндотоксинов - фрагментов клеточной стенки грамотрицательных бактерий, которые являются наиболее известными пирогенами. Основой метода является легко распознаваемое помутнение и гелирование ЛАЛ-реактива, происходящее под действием эндотоксинов (1,5). Простота и экономичность ЛАЛ-теста позволяют использовать его в качестве средства внутрипроизводственного контроля, контроля качества сырья и готовых лекарственных средств, изделий медицинского назначения (6). В статье «Бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США описаны способы валидации ЛАЛ-теста, позволяющие использовать его вместо анализа на кроликах (9).

Гель-тромб тест - простой и воспроизводимый полуколичественный анализ, который проводится путем смешивания равных частей ЛАЛ-реактива Endosafe® КТА и испытуемого образца, получившиеся реакционные смеси инкубируют в течение 60 минут при температуре 37°C. Положительный результат (образование геля) означает, что содержание эндотоксинов в образце равно или больше чувствительности ЛАЛ-реактива, которая обозначается буквой λ (лямбда). С помощью ридера для микропланшет или ридера для пробирок может быть проведен кинетический турбидиметрический анализ. В этом анализе проводится точное измерение начальной степени помутнения реакционной смеси, которая предшествует образованию геля. Время, необходимое для достижения заданной оптической плотности, обратно пропорционально количеству эндотоксина в образце, концентрацию эндотоксина в неизвестном образце можно определить по калибровочной кривой. В кинетических анализах значение λ соответствует наименьшей из концентраций, по которым построена калибровочная кривая.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ

Фредерик Банг (Frederick Bang) обнаружил, что бактерии вызывают внутрисосудистое свертывание у мечехвостов *Limulus polyphemus* (1). В совместной работе Левина (Levin J.) и Банга (Bang F.V.) (5) было продемонстрировано, что факторы свертывания содержатся в клетках крови мечехвоста - амебоцитах, а реакция свертывания инициируется пирогенами (бактериальными эндотоксинами), которые запускают ферментативную реакцию, приводящую к увеличению мутности и гелированию реакционной смеси.

РЕАКТИВЫ

ЛАЛ-реактив: лиофилизированный ЛАЛ-реактив Endosafe® КТА содержит лизат амебоцитов *Limulus*, одно- и двухвалентные катионы и буфер. Чувствительность ЛАЛ-реактива, λ , определяют по Национальному стандарту эндотоксина США (RSE) и выражают в ЕЭ/мл, она представляет собой наименьшую концентрацию Национального стандарта эндотоксина, которая вызывает гелирование ЛАЛ-реактива в стандартных условиях проведения реакции.

Разведение: собирают содержимое флакона на дне, аккуратно постукивая флаконом по твердой поверхности. ЛАЛ-реактив разводят непосредственно перед использованием. Аккуратно, стараясь не привнести загрязнений, приподнимают пробку для того, чтобы погасить вакуум. Небольшие количества порошка, остающиеся на пробке, не оказывают влияния на дальнейшие

анализы. Для разведения ЛАЛ-реактива с помощью пипетки добавляют во флакон с ЛАЛ-реактивом 5,2 мл воды для ЛАЛ-теста или буфера для разведения Endosafe®. Пробку отбрасывают. В том случае, если флакон с реактивом не будет немедленно использован, его закрывают пленкой Парафильм®, внутренняя поверхность которой может считаться апиrogenной. Аккуратно перемешивают содержимое флакона до полного растворения реактива. Раствор реактива бесцветный. Не следует использовать флаконы в случае нарушения укупорки или в том случае, если после разведения наблюдается окрашивание или опалесценция раствора.

Хранение: Лиофилизированный ЛАЛ-реактив относительно стабилен, его следует хранить при температуре 2-25°C, следует избегать воздействия температур выше 25°C. Разведенный ЛАЛ-реактив в процессе работы хранят на холодной поверхности или в холодильнике при температуре 2-8°C до 24 часов. В остальных случаях ЛАЛ-реактив хранят при температуре ниже -20°C в течение 28 суток после его разведения и замораживания. ЛАЛ-реактив можно замораживать и размораживать только один раз.

Контрольный стандарт эндотоксина *E. coli* (КСЭ) поставляется компанией Charles River Endosafe и используется для подтверждения чувствительности ЛАЛ-реактива, валидации метода и для постановки контролей (положительного контроля и положительного контроля испытуемого образца). Активность стандарта, правила его разведения и хранения указаны в Сертификате Анализа. Контрольный стандарт эндотоксина заказывается отдельно.

Вода для ЛАЛ-теста (не содержащая эндотоксинов) используется для разведения ЛАЛ-реактива, подготовки испытуемых растворов, контролей и для разведения стандарта эндотоксина (9). Вода для ЛАЛ-теста заказывается отдельно.

ОБЩИЕ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ЛАЛ-реактив Endosafe® КТА предназначен только для диагностики *in vitro*. При работе с ЛАЛ-реактивом необходимо соблюдать осторожность, поскольку его токсичность не исследовалась.

Для правильного выполнения процедуры анализа следует строго придерживаться всех пунктов инструкции. Для проверки возможности ингибирования в анализ следует включать положительные контроли. Все материалы, контактирующие с испытуемыми образцами, должны быть апиrogenны. Стеклопосуда должна быть депирогенизирована в соответствии с валидированной процедурой, например, не менее трех часов при температуре 200°C. Материалы, которые невозможно подвергнуть тепловой депирогенизации или которые не имеют маркировки «не содержат эндотоксинов», должны быть проверены перед использованием в анализе.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Все материалы и растворители, контактирующие с испытуемым образцом, не должны содержать эндотоксинов. Следует использовать технику асептической работы. Реакция ЛАЛ-реактива с эндотоксином зависит от значения pH, и это значение для реакционной смеси должно быть в диапазоне от 6,5 до 8,0. Если необходимо, значение pH доводят с помощью не содержащего эндотоксинов Трис буфера (поставляется Endosafe). Не следует доводить pH растворов, имеющих низкую буферную емкость, поскольку ЛАЛ-реактив Endosafe® КТА содержит буфер.

ФАКТОРЫ, МЕШАЮЩИЕ РЕАКЦИИ

Анализ может быть валидирован для любого образца, если будет показано, что он не содержит факторов, мешающих реакции. Ингибирование обычно зависит от концентрации, и его легко преодолеть, делая разведения испытуемого образца на воде для ЛАЛ-теста. Обычно причиной ингибирования бывают: 1) факторы, мешающие протеканию ферментативной реакции гелеобразования, и 2) факторы, изменяющие свойства контрольного стандарта эндотоксина (8).

Максимально Допустимое Разведение: В фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины» установлена пороговая пирогенная доза, равная 5 ЕЭ/кг для внутривенных препаратов и 0,2 ЕЭ/кг для интратекальных препаратов (9). В Фармакопее США указаны специфические значения предельного содержания для конкретных лекарственных препаратов. (9) Эти значения могут быть использованы для расчета степени разведения испытуемого препарата, которое может быть сделано для преодоления ингибирования, и при этом не будет означать превышения значения предельного содержания эндотоксинов (7). Максимально Допустимое Разведение (МДР) может быть рассчитано по формуле, приведенной в фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины» (9).

Для лекарственных препаратов с установленным значением предельного содержания бактериальных эндотоксинов значение МДР рассчитывается по формуле:

$$\text{МДР} = \frac{\text{Предельное содержание бактериальных эндотоксинов} \times \text{Концентрация испытуемого раствора}}{\text{Предельное содержание бактериальных эндотоксинов}}$$

λ. Чувствительность ЛАЛ-реактива

Следует помнить, что для гель-тромб теста λ означает заявленную чувствительность ЛАЛ-реактива. Для кинетических тестов λ соответствует наименьшей из измеряемых концентраций эндотоксина по калибровочной кривой.

Например, значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для циклофосамида, установленное в Фармакопее, составляет 0,17 ЕЭ/мг, а концентрация активного вещества в растворе равна 20 мг/мл. Если в анализе используется калибровочная кривая с наименьшей точкой, равной 0,05 ЕЭ/мл, значение МДР будет равно 1:68. В этом случае циклофосамид может быть разведен в 1:68 раз (одна часть препарата в 68 частях его раствора в воде для ЛАЛ-теста).

Проверка на наличие мешающих факторов (ингибирование/усиление реакции) в кинетических методах проводится путем добавления эндотоксина в известной концентрации к испытываемому образцу или к его разведению, такая проверка проводится в двух повторностях. Для проведения проверки необходима калибровочная кривая, построенная с помощью стандарта эндотоксина RSE или КСЭ (в соответствии с Сертификатом Анализа КСЭ). Калибровочная кривая должна быть построена как минимум по трем разным концентрациям RSE или КСЭ. Дополнительная точка должна быть добавлена в каждом случае, когда стандартный диапазон концентраций калибровочной кривой увеличивается на порядок (в десять раз).

Для проверки ингибирования используется концентрация эндотоксина, близкая к середине диапазона концентраций, измеряемых по калибровочной кривой. Например, для калибровочной кривой с диапазоном измерения от 5 до 0,05 ЕЭ/мл концентрация эндотоксина в положительном контроле испытываемого образца должна быть равна 0,5 ЕЭ/мл (См. РУТИННЫЕ АНАЛИЗЫ).

Можно считать, что испытываемый образец не ингибирует и не усиливает реакцию в том случае, если определенная в опыте по калибровочной кривой концентрация эндотоксина находится в пределах 50-200% от добавленной концентрации. Невозможность определить добавленную концентрацию эндотоксина с точностью 50-200% свидетельствует о наличии мешающих факторов. Следует продолжать разведение образца водой для ЛАЛ-теста, не превышая значения МДР, до тех пор, пока определяемая концентрация эндотоксина не будет соответствовать требованиям (9).

β-ГЛЮКАНЫ

ЛАЛ-реактив Endosafe®KTA может реагировать не только с эндотоксинами, но и с β-глюканами. Активность ЛАЛ-реактива Endosafe®KTA к β-глюканам должна быть блокирована до проведения анализа испытываемого образца, содержащего β-глюканы. Для этого следует использовать эндотоксин-специфичный (ES) буфер.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Микропланшеты

Стеклянные пробирки для разведений

Репетир со стерильными шприцами (Репетир Eppendorf® со шприцами на 0,5 и 5,0 мл Combitips® или аналогичное оборудование)

Стеклянные пипетки (рекомендуется) и калиброванные механические дозаторы со стерильными апиrogenными наконечниками

Вихревая мешалка

Ридер для микропланшет с модулем инкубирования или ридер для пробирок.

Внимание: апиrogenные материалы должны быть валидированы или сертифицированы, содержание эндотоксинов в них должно быть ниже минимальной концентрации, определяемой в анализе.

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ КИНЕТИЧЕСКОГО ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Кинетический турбидиметрический анализ может быть проведен с помощью ридера для микропланшет или пробирок, позволяющего проводить измерение оптической плотности в течение всего периода инкубирования. Для регистрации результатов анализов необходим компьютер и программное обеспечение. Примером комплексной измерительной системы, предназначенной для сбора, обработки и хранения данных по определению эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста, может быть ридер для микропланшет BioTek ELx808IU с программным обеспечением Endosafe-V (10). ЛАЛ-реактив Endosafe®KTA в соответствии с валидированной процедурой может быть использован и с автоматическими системами, предназначенными для проведения кинетического турбидиметрического анализа в пробирках.

Каждый опыт должен включать испытуемый препарат или его разведения, положительный контроль испытуемого препарата, положительный контроль или серию разведений контрольного стандарта, соответствующую диапазону концентраций, измеряемых с помощью калибровочной кривой, и отрицательный контроль. Анализ проводится как минимум в двукратной повторности. Следует придерживаться инструкций по использованию выбранной для проведения анализа автоматической системы измерений (8).

Метод: асептически переносят по 0,1 мл каждого образца на дно каждой лунки микропланшета или пробирки в соответствии с картой планшета. Если используют ридеры для микропланшет, не оборудованные модулем инкубирования, возможно потребуется преинкубирование планшета для достижения однородности температуры. При установке рабочих параметров используемого оборудования следуют указаниям производителя ЛАЛ-реактива. В каждую лунку с помощью репетира быстро добавляют по 0,1 мл ЛАЛ-реактива (при комнатной температуре). ЛАЛ-реактив добавляют, начиная с отрицательного контроля и заканчивая наиболее высокой концентрацией эндотоксина. Если ридер для микропланшет не перемешивает растворы автоматически, постукивают по краю планшета несколько раз и начинают отсчет времени измерения. По завершении желаемого периода измерения проводят программную обработку результатов анализа.

РУТИННЫЕ АНАЛИЗЫ

Рутинные анализы лучше всего проводить с использованием калибровочной кривой, у которой наибольшая концентрация в 100 раз больше наименьшей концентрации эндотоксина, каждый анализ должен включать стандартную кривую, состоящую как минимум из трех точек, проверенных в двукратной повторности. Например, 5, 0,5 и 0,05 ЕЭ/мл. Для внутрипроизводственного контроля и контроля сырья может потребоваться калибровочная кривая с более широким диапазоном измерений, при котором максимальная измеряемая концентрация в 1000 раз больше минимальной концентрации, например, от 50 ЕЭ/мл до 0,05 ЕЭ/мл.

Концентрация эндотоксина в положительном контроле испытуемого образца должна быть эквивалентна или близка средней концентрации, измеряемой по построенной калибровочной кривой. Например, при использовании калибровочной кривой с диапазоном измерений 10-0,01 ЕЭ/мл концентрация эндотоксина в положительном контроле испытуемого образца должна быть меньше или равна 1 ЕЭ/мл и больше или равна 0,1 ЕЭ/мл. При использовании калибровочной кривой 50-0,005 ЕЭ/мл содержание эндотоксина в положительном контроле испытуемого образца должно быть меньше или равно 5 ЕЭ/мл и больше или равно 0,05 ЕЭ/мл. Определенное среднее значение концентрации эндотоксина в положительном контроле испытуемого образца должно составлять 50-200% от соответствующей концентрации. В случае, когда необходимо подтверждение зарегистрированной в анализе контаминации испытуемого образца, в качестве контроля должна использоваться стандартная серия разведений эндотоксина. Можно рекомендовать способ подготовки положительного контроля, при котором эндотоксин добавляется непосредственно в соответствующую лунку микропланшета. С помощью этого способа можно подготовить положительный контроль испытуемого образца перед добавлением ЛАЛ-реактива Endosafe®KTA. Для этого в лунку, в которой содержится 100 мкл испытуемого образца, добавляют 10 мкл раствора RSE или КСЭ с концентрацией 5,0 ЕЭ/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ ЭНДОТОКСИНА

При проведении анализа ридер для микропланшет или пробирок контролирует изменение поглощения. Прибор измеряет время, необходимое для того, чтобы значение поглощения изменилось в значительной степени по сравнению с исходным, обычно в диапазоне от 0,050 до 0,200 единиц оптической плотности (OD). Это время называется ПОРОГОВЫМ ВРЕМЕНЕМ (ONSET TIME). Программное обеспечение автоматически устанавливает корреляцию (log/log) Порогового Времени для каждой из проверяемых точек и соответствующей этому времени концентрации эндотоксина. Далее оцениваются параметры калибровочной кривой и достоверность результатов анализа. Ниже приведены примеры результатов, полученных для стандартной серии концентраций эндотоксина ($r=0,999$), и результаты определения концентрации эндотоксина в положительном контроле испытуемого образца (концентрация 0,5 ЕЭ/мл).

ПРИМЕРЫ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Образцы	КСЭ (ЕЭ/мл)	Среднее пороговое время реакции (сек)	Измеряемая концентрация (ЕЭ/мл)
Стандарт 1	5,0	789	
Стандарт 2	0,5	1344	
Стандарт 3	0,05	2163	
Исп. Образец 1	----	<<<<	>>>>
Положительный	0,5	1334	0,508 (102%)

контроль исп образца

Исп. Образец 2	---	<<<<	>>>>
Положительный	0,5	1387	0,426 (85%)
контроль исп. Образца			

В этом примере эндотоксины в испытуемых образцах не обнаружены, а положительные контроли испытуемых образцов дали ожидаемые результаты. Отрицательный контроль должен давать результаты значительно ниже, чем результаты наименьшей из концентраций стандарта эндотоксина.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Линейность: должна быть проверена линейность калибровочной кривой в пределах диапазона концентраций, используемых для определения содержания эндотоксина. Следует проверить не менее 3 разных концентраций, представляющих выбранный диапазон как минимум в трех повторностях (9). Абсолютное значение коэффициента корреляции r должен быть больше или равен значению 0,980 (9).

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА ДЛЯ ГЕЛЬ-ТРОМБ ТЕСТА

Каждый анализ должен включать испытуемый образец или его разведение, отрицательный контроль, положительный контроль испытуемого препарата и положительный контроль, представленный либо стандартом эндотоксина в концентрации 2λ , либо серией последовательных двукратных разведений КСЭ, включающей концентрации меньше и больше заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива. Асептически переносят по 0,1 мл каждого раствора в пробирки для анализа 10x75 мм.

Добавляют по 0,1 мл разведенного ЛАЛ-реактива в каждую пробирку, начиная с отрицательного контроля и заканчивая наибольшей концентрацией эндотоксина. Быстро перемешивают содержимое пробирок и инкубируют пробирки при 37°C в термоблоке или в водяной бане в течение одного часа. По истечении времени инкубирования проверяют каждую пробирку на предмет образования в ней геля.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В гель-тромб тесте результат, полученный для каждой пробирки, может быть либо отрицательным, либо положительным. Положительным результатом считается образование плотного геля, который не разрушается при переворачивании пробирки на 180° . Отрицательный результат характеризуется отсутствием геля или формированием вязких гелевых масс, которые не сохраняют своей целостности при переворачивании пробирки. Результаты теста достоверны только в том случае, если для положительного контроля получены положительные результаты, для положительного контроля испытуемого образца с концентрацией эндотоксина, равной 2λ , получены положительные результаты, а в отрицательном контроле получены отрицательные результаты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭНДОТОКСИНА В НЕИЗВЕСТНОМ ОБРАЗЦЕ С ПОМОЩЬЮ ГЕЛЬ-ТРОМБ ТЕСТА

Для определения концентрации эндотоксина в испытуемом образце делают серию его двукратных разведений для определения конечной точки реакции. Концентрация эндотоксина (E) в испытуемом образце рассчитывается путем умножения значения чувствительности ЛАЛ-реактива на значение фактора разведения, являющегося конечной точкой реакции. Например, при анализе с ЛАЛ-реактивом с чувствительностью $\lambda=0,25$ ЕЭ/мл испытуемый образец проверялся в пяти двукратных разведениях, конечная точка была получена для разведения 1:8. Концентрация эндотоксина в испытуемом образце составляет как минимум 2 ЕЭ/мл, расчет делается по следующей формуле:

$$(E) = (\lambda) \times (8) = (0,25 \text{ ЕЭ/мл}) \times (8) = 2 \text{ ЕЭ/мл}$$

ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ДЛЯ КИНЕТИЧЕСКОГО ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКОГО ТЕСТА И ГЕЛЬ-ТРОМБ ТЕСТА

При проведении контрольных анализов готовой продукции с помощью гель-тромб теста необходимо придерживаться требований, приведенных в фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины», которые включают: 1) проведение первоначальной процедуры контроля качества для лаборатории; и 2) анализ по подтверждению заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (9). Более подробная информация приведена в инструкции для ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста Endosafe.

Компания Charles River Endosafe разработала специальное руководство по валидации оборудования, используемого для проведения кинетических анализов.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

ЛАЛ-реактив Endosafe® стандартизован по Национальному стандарту эндотоксина, и его чувствительность выражена в Единицах Эндотоксина на миллилитр (ЕЭ/мл). Концентрация эндотоксина в испытуемом образце может быть измерена в том случае, если она выше чувствительности ЛАЛ-реактива или находится в диапазоне измерений, заданных калибровочной кривой. Бактериальные эндотоксины могут содержаться в измеряемых количествах в воде или в материалах биологического происхождения в том случае, если способы их очистки были не достаточно эффективны. Содержание эндотоксина, определенное в анализе, следует сравнить с установленным для испытуемого препарата значением предельного содержания бактериальных эндотоксинов.

ОГРАНИЧЕНИЯ

В ЛАЛ-тесте могут быть испытаны образцы, которые не оказывают ингибирующего или усиливающего действия на реакцию, или если эти явления могут быть устранены разведением (см. правила расчета МДР) или специальной подготовкой образца, такой, например, как добавление буфера. Если ЛАЛ тест не может быть валидирован в концентрации, не превышающей максимально допустимого разведения, он не может быть заменой анализа «пирогенность», проводимого на кроликах.

Для гель-тромб теста допустимая ошибка составляет 50%-200% от значения конечной точки анализа.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Bang, F. B. "A Bacterial Disease of Limulus Polyphemus." Bull. Johns. Hopkins. Hosp., 98, p. 325 (1956).
2. Cooper, J.F. and Harbert J.C. "Endotoxin as a Cause of Aseptic Meningitis after Radionuclide Cisternography." J. Nucl. Med., 16, p. 809 (1976).
3. Cooper, J.F., Levin.J. and Wagner, H.N. "Quantitative Comparision of In Vitro and In Vivo Methods for the Detection of Endotoxin." J. Lab. Clin. Med., 78. p. 138 (1971).
4. Hochstein, H.D. "The LAL Test versus the Rabbit Pyrogen Test for Endotoxin Detection: Update '87." Pharm. Technol., 11(6), p. 124 (1987).
5. Levin, J. and Bang, F.B. "Clottable protein in Limulus: Its Localization and Kinetics of Its Coagulation by Endotoxin." Thromb. Diath. Haemorrh., 19, p. 186 (1968).
6. McCullough, K.Z. "Process Control: In-process and Raw Material Testing Using LAL." Pharm. Technol., 12(5) p. 40 (1988).
7. Weary, M.E. "Understanding and setting endotoxin limits" J.Parent. Sci. & Tech., 44:1., p. 16 (1990).
8. Cooper, J.F. "Resolving LAL Test Interferences." J.Parent. Sci. & Tech., 44:1, p.13 (1990).
9. Bacterial endotoxin test <85>. In The U.S. Pharmacopeia, 37rd rev., United Book Press, Inc., Baltimore, MD.
10. Reference Guide for Endoscan-V, Charles River Laboratories, INC., 1023 Wappoo Road, Suite 43B, Charleston, SC, 29407 USA.

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ:

Charles River Endosafe, Division of Charles River Laboratories, Inc
1023, Wappo Road, 43-B, Charleston, SC 29407, USA
Phone: (843) 766-7575; FAX: (843) 766-7676
www.criver.com

ПОСТАВЩИК:

ООО «НПО «ЛАЛ-Центр»

117105, г. Москва, ул. Нагатинская, д.3А
Тел.: +7 (495)517-40-37
e-mail: lalnews@limulustest.ru
www.limulustest.ru