

ЛИЗАТ АМЕБОЦИТОВ LIMULUS

ENDOSAFE ®

ФЛАКОН ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ (ПИРОГЕНОВ)

НАЗНАЧЕНИЕ

Лизат амeboцитов Limulus (ЛАЛ-реактив) представляет собой водный экстракт, полученный из амeboцитов мечехвоста Limulus, и предназначен для качественного обнаружения бактериальных эндотоксинов с помощью гeль-тромб теста.

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 визуально распознаваемое гелирование ЛАЛ-реактива, происходящее под действием эндотоксинов (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 (10).

Гель-тромб тест - простой и воспроизводимый анализ, который проводится путем смешивания равных частей **ЛАЛ-реактива** Endosafe® и испытуемого образца, получившиеся реакционные смеси инкубируют в течение 60 минут при температуре 37°C. Положительный результат означает, что содержание эндотоксинов в образце равно или больше чувствительности ЛАЛ-реактива, которая обозначается буквой λ.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ

Развитие нового метода, альтернативного анализу на пирогенность, который проводится на кроликах, началось с исследований, проведенных в Университете им. Джона Гопкинса (Johns Hopkins Univ.). 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.B.) (5) было продемонстрировано, что факторы свертывания содержатся в клетках крови мечехвоста – амeboцитах, а реакция свертывания, вызываемая пирогенами (бактериальными эндотоксинами), является ферментативной (1,4).

Позже Купер (Cooper J.F.), Левин (Levin J) и Вагнер (Wagner H.N.) предложили использовать эту реакцию для проверки пирогенности радиофармацевтических препаратов. В сравнительном исследовании, проведенном в 1970 г. было показано, что ЛАЛ-тест является более чувствительным, чем анализ на кроликах, и что реакция ЛАЛ-реактива (гелирование или увеличение мутности) коррелирует с концентрацией эндотоксинов (3). Усовершенствование состава ЛАЛ-реактива, стандартизация и автоматизация методов проведения анализа, а также более глубокое понимание природы реакции сделали возможным контроль парентеральных лекарственных препаратов, биологических препаратов и изделий медицинского назначения с помощью ЛАЛ-теста (2, 4, 7).

Реакция должна проводиться при нейтральном значении pH и зависит от времени и концентрации. Анализ обычно проводят для водных растворов или смывов с испытуемого образца. В большинстве случаев действие факторов, мешающих проведению реакции, может быть преодолено с помощью разведений испытуемого раствора.

ТЕСТ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

В 1987 году Администрация по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, США (FDA) информировала производителей лекарственных средств, ветеринарных препаратов и изделий медицинского назначения о процедурах, которые Администрация считает

необходимыми для проведения валидации ЛАЛ-теста, используемого для контроля качества (9). В настоящее время требования к проведению валидации приведены в фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины». Следование правилам валидации соответствует современным требованиям GMP, разработанным для производителей лекарственных препаратов и изделий медицинского назначения. Общая пороговая пирогенная доза для парентеральных препаратов составляет 5 Единиц Эндотоксина (ЕЭ) на кг, для интратекальных препаратов эта доза составляет 0,2 ЕЭ/кг. Содержание эндотоксинов в смывах с изделий медицинского назначения не должно превышать 0,5 ЕЭ/мл. Для изделий, контактирующих со спинномозговой жидкостью, содержание эндотоксинов не должно превышать 0,06 ЕЭ/мл (11).

ОБЩИЕ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

Все материалы, контактирующие с испытуемыми образцами, должны быть апиrogenны. Стеклянная посуда 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.

РЕАКТИВЫ, ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

Лиофилизированный **ЛАЛ-реактив** Endosafe® поставляется во флаконах по 5,2 мл на 50 определений или во флаконах по 1,2 мл на 10 определений. Реактив содержит лизат амебоцитов *Limulus*, одно и двухвалентные катионы и буфер.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

Вода для ЛАЛ-теста (не содержащая эндотоксинов) используется для разведения ЛАЛ-реактива и подготовки растворов КСЭ.

Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ) или Национальный стандарт эндотоксина (RSE) необходимы для постановки положительных контролей. Для подготовки исходных растворов эндотоксина и их последующих разведений используется **вихревая мешалка**.

Водяная баня или **термоблок** необходимы для проведения инкубирования реакционных смесей при температуре 37° С ±1° С. Для проведения анализа также необходимы стерильные и апиrogenные стеклянные пробирки 10x75 мм, пробирки из боросиликатного стекла 16x125 мм или большие, калиброванные механические дозаторы со стерильными одноразовыми пластиковыми наконечниками для точного дозирования объемов менее 1 мл и пипетки для дозирования больших объемов. Следует использовать штативы для размещения пробирок для реакции и для разведения. Для измерения времени инкубирования и времени перемешивания растворов КСЭ используются лабораторные таймеры.

ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ЛАЛ-РЕАКТИВА ENDOSAFE®

Разведение: собирают содержимое флакона на дне, аккуратно постукивая флаконом по твердой поверхности. Непосредственно перед использованием разводят реактив указанным количеством воды для ЛАЛ-теста, для чего удаляют пробку и добавляют воду пипеткой. В том случае, если флакон с реактивом не будет немедленно использован, его закрывают пробкой или парафилмом. Аккуратно перемешивают содержимое до полного растворения. Избегайте касания укупорочных средств во избежание контаминации. 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° С 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.

ПОДГОТОВКА КОНТРОЛЬНОГО СТАНДАРТА ЭНДОТОКСИНА (КСЭ)

Разведение: компанией Charles River Endosafe поставляется эндотоксин *E.coli*, который может быть использован для подтверждения заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива и для постановки положительных контролей. КСЭ содержит определенное количество эндотоксина, указанное в **Сертификате Анализа**, который стандартизован по Национальному стандарту эндотоксина США. Следует помнить, что Сертификат Анализа относится к конкретным сериям ЛАЛ-реактива и КСЭ. Национальный Стандарт Эндотоксина может быть заказан в U.S. Pharmacopoeial

Convention, Inc., Rockville, MD 20852. Лиофилизированный КСЭ следует готовить согласно прилагаемой к флакону инструкции и Сертификату Анализа. КСЭ разводят водой для ЛАЛ-теста и интенсивно перемешивают раствор 5 минут перед началом подготовки разведений. Делают несколько разведений исходного раствора КСЭ для того, чтобы довести концентрацию до 1 ЕЭ/мл, затем готовят серию последовательных двукратных разведений стандарта эндотоксина так, чтобы минимальная концентрация КСЭ была ниже, а максимальная концентрация КСЭ была выше значения заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива.

Хранение: разведенный КСЭ хранят 28 дней при температуре от 2 до 8° С. Рабочие растворы следует готовить ежедневно, за исключением случаев, когда условия и сроки хранения растворов валидированы.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцы, подлежащие анализу с помощью **ЛАЛ-реактива** Endosafe®, отбирают и готовят с использованием депирогенизированных материалов и реактивов, не содержащих эндотоксинов. Следует использовать технику асептической работы. **Если испытуемый образец содержит мешающие факторы, то его разводят или обрабатывают таким образом, чтобы удалить мешающие факторы в соответствии с процедурой, описанной в разделе ИНГИБИРОВАНИЕ.**

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

А. ПОДГОТОВКА РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ И ИНКУБИРОВАНИЕ

1. Добавляют по 0,1 мл каждого разведения испытуемого образца в пробирки для анализа, как минимум в двукратной повторности.
2. Добавляют по 0,1 мл разведенного **ЛАЛ-реактива** Endosafe® в каждую пробирку, начиная с отрицательного контроля и заканчивая пробирками с наиболее высокой концентрацией эндотоксина. Перемешивают реакционные смеси вручную или на вихревой мешалке на малой скорости.
3. Помещают пробирки с реакционными смесями в водяную баню или термоблок, нагретые до температуры 37±1С° на 60 минут (±2 мин). **Очень важно точное соблюдение времени инкубирования ЛАЛ-реактива Endosafe® и эндотоксина. Если испытывается одновременно большое количество образцов, следует начинать реакцию с 2-4 минутными интервалами таким образом, чтобы можно было проводить считывание результатов каждой пробы без увеличения времени ее инкубирования.**

Поскольку реакция ЛАЛ-реактива Endosafe® и эндотоксина зависит от температуры, следует проверять температуру в устройстве для инкубирования. Реакция гелеобразования очень чувствительна к колебаниям и толчкам и может быть необратимо нарушена в случае неаккуратного обращения с пробирками в течение времени инкубирования.

В. СЕРИЯ РАЗВЕДЕНИЙ СТАНДАРТА ЭНДОТОКСИНА (Положительный контроль)

1. Серию разведений КСЭ не обязательно ставить с каждым анализом только в том случае, если результаты предыдущих анализов серии КСЭ укладывались в допустимые рамки. Такую серию следует ставить как минимум один раз в день с первой серией опытов и повторять в случае изменения условий проведения анализа или в случае использования другой серии ЛАЛ-реактива.
2. Готовят серию разведений КСЭ согласно Сертификату Анализа для конкретных серий ЛАЛ-реактива и КСЭ. Серия разведений должна включать четыре последовательных двукратных разведения, соответствующих 2λ, λ, 1/2λ и 1/4λ. Максимальная концентрация эндотоксина в такой серии выше, а минимальная ниже заявленной чувствительности (λ) **ЛАЛ-реактива** Endosafe®. Переносят по 0,1 мл каждого раствора КСЭ в пробирки для реакций, испытывают как минимум в двух повторностях.
3. Добавляют по 0,1 мл ЛАЛ-реактива в каждую пробирку, начиная с отрицательного контроля. Перемешивают реакционные смеси, как указано выше (п. А.2).
4. Инкубируют реакционные смеси 60 минут при 37°С (п. А.3).

С. КОНТРОЛИ

1. **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ.** Добавляют по 0,1 мл воды для ЛАЛ-теста в две пробирки.
2. **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ.** В том случае, если в анализе не ставится серия разведений КСЭ, добавляют в две пробирки для анализа по 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 2λ.

3. **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА.** Добавляют по 0,1 мл раствора испытуемого образца, содержащего эндотоксин в концентрации 2λ. Образец должен быть разведен или обработан в соответствии с валидированной процедурой. Это контроль ингибирования, который подтверждает отсутствие ингибирования реакции со стороны испытуемого образца в данном опыте. Его готовят путем добавления КСЭ к испытуемому раствору таким образом, чтобы концентрация КСЭ в испытуемом образце составляла 2λ. Для подготовки положительного контроля испытуемого образца может использоваться концентрированный раствор КСЭ.

4. В завершении добавляют по 0,1 мл ЛАЛ-реактива к каждой пробирке, перемешивают содержимое и инкубируют, как указано выше (п.п. А.2 и А.3).

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.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

ЛАЛ-реактив Endosafe® стандартизован по Национальному стандарту эндотоксина, и его чувствительность выражена в Единицах Эндотоксина на миллилитр (ЕЭ/мл). Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива проводится с помощью Национального стандарта эндотоксина или с помощью Контрольного стандарта эндотоксина. Полученное в результате анализа значение чувствительности ЛАЛ-реактива не должно отличаться более чем в два раза от заявленного значения чувствительности.

Результаты анализа подтверждения заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива с чувствительностью, равной 0,125 ЕЭ/мл, представлены в Табл. 1. Серия из четырех двукратных разведений КСЭ была подготовлена таким образом, чтобы наибольшая концентрация эндотоксина была больше, а наименьшая меньше заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива.

Табл. I. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА

Повторности	Разведения КСЭ (ЕЭ/мл)				Конечная точка
	0,25	0,125	0,06	0,03	
1	+	+	+	-	0,06
2	+	+	-	-	0,125
3	+	+	-	-	0,125
4	+	+	+	-	0,06

Чувствительность ЛАЛ-реактива рассчитывается по конечным точкам путем определения среднего геометрического значения. Каждая конечная точка для каждой из четырех повторностей переводится в десятичный логарифм. По этим четырем значениям рассчитывается среднее значение логарифма. Чувствительность ЛАЛ-реактива представляет собой антилогарифм среднего значения логарифмов. (см. Табл II)

Табл. II: РАСЧЕТ СРЕДНЕГО ГЕОМЕТРИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ

Конечная точка (ЕЭ/мл)	Log ₁₀ Конечной точки
0,06	-1,222
0,125	-0,903
0,125	-0,903

0,06

-1,222

Среднее значение = -1,0625

Antilog_{10} **Среднего значения** = 0,0865

ПРОЦЕДУРА ПЕРВИЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ ЛАБОРАТОРИИ, ПРОВОДЯЩЕЙ АНАЛИЗЫ

До того, как начнется проведение официальных анализов, необходимо оценить вариабельность результатов, получаемых в лаборатории, и степень подготовки аналитиков, проводящих анализ. Такая оценка проводится в соответствии с процедурой, описанной в фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины» (10). Каждый аналитик должен провести анализ по подтверждению заявленной чувствительности, используя одну серию ЛАЛ-реактива и одну серию КСЭ. Допускается ошибка в интервале от $\frac{1}{2}$ (0,5 λ) до 2 (2 λ) от значения заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (λ).

АНАЛИЗ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ЗАЯВЛЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛАЛ-РЕАКТИВА

Перед началом использования новой серии ЛАЛ-реактива его чувствительность должна быть подтверждена. Одна серия ЛАЛ-реактива используется с одной серией эндотоксина (КСЭ или RSE), анализ проводится как минимум в четырех повторностях. Среднее геометрическое значение должно укладываться в допустимые пределы ошибки, как было указано выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭНДОТОКСИНА В НЕИЗВЕСТНОМ ОБРАЗЦЕ

Для определения концентрации эндотоксина в испытуемом образце делается серия 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 чувствительностью $\lambda=0,25$ ЕЭ/мл испытуемый образец проверялся в четырех 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:

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

ИНГИБИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ

До начала проведения рутинных анализов необходимо исследовать возможность ингибирования со стороны испытуемого образца. 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 (7). О том, что ингибирование имеет место, можно сделать вывод, если результаты для серии двукратных разведений эндотоксина, сделанные в растворе испытуемого препарата (положительный контроль испытуемого препарата), отличаются более чем в два раза от результатов аналогичной серии разведений эндотоксина в воде для ЛАЛ-теста (положительный контроль). Распознать ингибирование можно следующим образом:

Заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива (λ)	=0,125 ЕЭ/мл
Конечная точка для положительного контроля	=0,125 ЕЭ/мл
Конечная точка для положительного контроля испытуемого образца А	=0,20 ЕЭ/мл
Конечная точка для положительного контроля испытуемого образца В	=0,50 ЕЭ/мл

Результаты для образца А находятся в рамках допустимой ошибки опыта, в то время как образец В ингибирует реакцию. Наиболее простой способ определить неингибирующую концентрацию испытуемого образца - это подготовить серию его последовательных разведений с эндотоксином в концентрации 2 λ (7,10). Такая серия проверяется одновременно с аналогичной серией разведений испытуемого образца в воде для ЛАЛ-теста. Следующие результаты означают, что испытуемый образец не ингибирует реакцию и не содержит эндотоксинов в разведении 1:20 и большем.

Разведения образца	1:4	1:10	1:20	1:40
Исп. образец с КСЭ в концентрации 2λ	--	--	++	++
Исп. образец в воде для ЛАЛ-теста	--	--	--	--

ЛАЛ-реактив Endosafe® содержит буфер, который способен нормализовать значения pH, выходящие за рамки, допустимые для реакции. В измерении и доведении pH нет необходимости, если в положительном контроле испытуемого образца получаются положительные результаты при анализе, проводимом по валидированной процедуре. Если в этом контроле получены неудовлетворительные результаты, необходимо измерить значение pH, поскольку для реакции ЛАЛ-реактива и эндотоксина оптимально нейтральное значение pH. Следует измерять значение pH реакционной смеси, состоящей из равных частей ЛАЛ-реактива и испытуемого образца, если есть подозрение, что значение pH реакционной смеси выходит за допустимые рамки. Довести значение pH можно буферным раствором или определенным количеством раствора кислоты или основания.

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 (10). Фармакопея США утвердила специфические значения пороговой дозы, такие как 175 ЕЭ на дозу для радиофармацевтических препаратов (10). Эти значения должны использоваться для расчета степени разведения испытуемого препарата, которое может быть сделано для преодоления ингибирования, и при этом не будет означать превышения значения предельного содержания эндотоксинов. Максимально Допустимое Разведение может быть рассчитано по формуле, приведенной в вышеупомянутых документах (8, 10).

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

$$\text{МДР} = \frac{\text{Предельное содержание бактериальных эндотоксинов} \times \text{Концентрация испытуемого раствора}}{\lambda, \text{ Чувствительность ЛАЛ-реактива}}$$

Например, значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для циклофосфида, установленное в Фармакопее, составляет 0,17 ЕЭ/мг, а концентрация активного вещества в растворе равна 20 мг/мл. Если для анализа этого препарата используется ЛАЛ-реактив с чувствительностью 0,125 ЕЭ/мл, значение МДР составит 1:27:

$$\text{МДР} = \frac{0,17 \text{ ЕЭ/мг} \times 20 \text{ мг/мл}}{0,125 \text{ ЕЭ/мл}} = 27,2$$

В этом случае циклофосфамид может быть разведен в 1:27 раз для преодоления ингибирования, которое может иметь место.

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 (10).

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 Comparison 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 & raw material testing using LAL. *Pharm. Technol.*, 12(5) p. 40 (1988).
7. Cooper, J.F. "Resolving LAL Test Interferences." *J. Parent. Sci. & Tech.*, 44:1, p.13 (1990).
8. Weary, M.E. "Understanding and setting endotoxin limits" *J. Parent. Sci. & Tech.*, 44:1., p. 16 (1990).
9. Guideline on the 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. Dept. of Health & Human Services, FDA, December 1987.
10. Bacterial endotoxin test <85>. In The U.S. Pharmacopeia, 34th rev. United Book Press, Inc., Baltimore, MD.
11. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices <161>. In The U.S. Pharmacopeia, 34th rev. United Book Press, Inc., Baltimore, MD.

SIGNIFICANT TEXTS ON LAL TESTING

Bacterial Endotoxins: Structure, Biomedical Significance, and Detection With the Limulus Amebocyte Lysate Test. Editors: J.W. ten Cate, H.R. Buller, A. Sturk and J. Levin. *Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 189, Alan R. Liss. Inc., NY, 1985.

Endotoxins and their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test. Editors: S. Watson, J. Levin., T. Novitsky. *Progresss in Clinical and Biological Research*, Vol. 93, Alan R. Liss. Inc., NY, 1982.

Manufactured By: CHARLES RIVER ENDOSAFE

Div. of Charles River Laboratories, Inc.

1023 Wappo Road, 43-B, Charleston, SC 29407, USA

Phone: (843) 766-7575; FAX: (843) 766-7676

Order Codes: 50-Test: R11012 R11025

10-Test: R12003 R12006 R12012 R12025

PIR11004 and PIR12004