

ЛИЗАТ АМЕБОЦИТОВ LIMULUS

ENDOSAFE ®

ФЛАКОН НА ОДНО ОПРЕДЕЛЕНИЕ 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 гель-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 и в Руководстве FDA по проведению ЛАЛ-теста описаны способы валидации ЛАЛ-теста, позволяющие использовать его вместо анализа на кроликах (10, 11).

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*. 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. Содержащиеся в лизате амeboцитов ферменты являются сериновыми протеазами, кофакторами для которых являются двухвалентные катионы. Эндотоксины активируют эту ферментную систему, запуская каскад ферментативных реакций, которые перерабатывают находящийся в лизате белок-субстрат коагулоген до образования плотного геля (7).

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, 9).

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 (8).

РУКОВОДСТВО FDA ПО ВАЛИДАЦИИ МЕТОДА

В 1987 году Администрация по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, США (ФДА) 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 (10). 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 (10).

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.

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. Стеклянная посуда должна быть депирогенизирована в соответствии с валидированной процедурой, например, не менее трех часов при температуре 200°C. Изделия из пластика, которые имеют маркировку «Стерильно» и предназначены для однократного использования, могут считаться апиrogenными.

РЕАКТИВЫ, ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

Лиофилизированный **ЛАЛ-реактив** Endosafe® поставляется в стеклянных флаконах на одно определение. Реактив содержит лизат амебоцитов Limulus, одно и двухвалентные катионы и буфер. Флаконы закрыты под давлением приблизительно ½ атмосферы сухого азота. Флаконы следует растворять непосредственно перед использованием.

Лиофилизированный ЛАЛ-реактив относительно стабилен, его следует хранить при температуре 2-25°C, следует избегать воздействия температур выше 25°C. Пробирки, в которых появилось желтое окрашивание лиофилизата, не должны использоваться.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

Вода для ЛАЛ-теста (не содержащая эндотоксинов) используется для разведения ЛАЛ-реактива и подготовки растворов КСЭ. Каталожный номер W110.

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. Компания Endosafe предоставляет препараты контрольного стандарта эндотоксина с разными концентрациями.

Водяная баня или термоблок необходимы для проведения инкубирования реакционных смесей при температуре 37° С ±1° С. Для проведения анализа также необходимы: 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. Для размещения пробирок для разведения и анализа следует использовать лабораторные штативы. Для измерения времени инкубирования и времени перемешивания растворов КСЭ используются лабораторные таймеры.

ПОДГОТОВКА ЛАЛ-РЕАКТИВА

Внимание: флаконы на одно определение следует инкубировать сразу же после разведения испытуемым образцом или контролем. Флакон с ЛАЛ-реактивом следует разводить, добавляя непосредственно во флакон 0,2 мл раствора контроля или испытуемого образца.

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, которое стандартизовано 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. Разводят КСЭ 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. В случае если в положительном контроле испытуемого препарата получены отрицательные результаты, и есть подозрение, что данная проблема связана со значением рН, следует измерить значение рН смеси испытуемого образца и ЛАЛ-реактива для того, чтобы убедиться, что значение рН находится в диапазоне значений 6,0 – 8,0. Довести значение рН можно с использованием апиrogenных растворов HCl или NaOH (обычно в концентрации, равной или меньшей 0,1N), или с помощью Трис буфера (Charles River Endosafe). Без необходимости не следует доводить рН растворов с низкой буферной емкостью. **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

Флаконы на одно определение, содержащие ЛАЛ-реактив, используются в качестве пробирок для анализа. Перед использованием собирают содержимое пробирок, аккуратно постукивая дном пробирки по твердой поверхности. При удалении резиновой пробки используют технику асептической работы. Последовательность анализа следующая:

Асептически добавляют по 0,2 мл раствора каждого испытуемого образца в пробирки для анализа. Аккуратно перемешивают содержимое пробирок до полного растворения. Немедленно 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.

СЕРИЯ РАЗВЕДЕНИЙ СТАНДАРТА ЭНДОТОКСИНА (Положительный контроль)

Серию разведений КСЭ не обязательно ставить с каждым анализом, 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 изменений условий проведения анализа или в случае использования другой серии ЛАЛ-реактива.

Из исходного раствора КСЭ готовят свежую серию разведений. 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 ЛАЛ-реактива Endosafe[®] (λ). Добавляют по 0,2 мл раствора каждой концентрации КСЭ в пробирки для анализа. Пробирки перемешивают и инкубируют, как указано выше.

КОНТРОЛИ

Для постановки отрицательного контроля добавляют по 0,2 мл воды для ЛАЛ-теста в две пробирки для анализа. В том случае, если в анализе не ставится серия разведений КСЭ, добавляют в две пробирки для анализа по 0,2 мл раствора КСЭ с концентрацией 2λ. Для постановки положительного контроля испытуемого препарата в пробирки для анализа добавляют по 0,2 мл раствора испытуемого образца, содержащего эндотоксин в концентрации 2λ. Образец может быть разведен или обработан в соответствии с валидированной процедурой. Это контроль ингибирования, который подтверждает

отсутствие ингибирования реакции со стороны испытуемого образца в данном опыте. Следует смотреть раздел **ИНГИБИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ**.

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 – это проверка ЛАЛ-реактива по стандартизованному контрольному эндотоксину. 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. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ЗАЯВЛЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛАЛ-РЕАКТИВА

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

$$\text{Среднее значение} = -1,0625$$

$$\text{Antilog}_{10} \text{ Среднего значения} = 0,0865$$

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. Каждый аналитик должен провести анализ по подтверждению заявленной чувствительности, используя одну серию ЛАЛ-реактива и одну серию КСЭ. Допускается ошибка в интервале от ½ (0,5λ) до 2 (2λ) 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 в четырех повторностях (см. Табл. 1). 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 (Е) 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 λ=0,25 ЕЭ/мл испытуемый образец проверялся в серии последовательных двукратных разведений на воде для ЛАЛ-теста, конечная точка была получена для разведения 1:8. Концентрация эндотоксина в испытуемом образце составляет как минимум 2 ЕЭ/мл, расчет делается по следующей формуле:

$$(E) = (\lambda) \times (8/1) = (0,25 \text{ ЕЭ/мл}) \times (8) = 2 \text{ ЕЭ/мл}$$

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. 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 2λ (8,10). 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	--	--	--	--

Исходное сырье и полупродукты могут иметь кислую или щелочную реакцию, в этом случае требуется доведение значения рН до нейтрального значения также как и растворение испытуемого образца для преодоления ингибирования. ЛАЛ-реактив Endosafe в частности устойчив к действию мешающих факторов, так как он обладает высокой буферной емкостью и сбалансирован одновалентными и двухвалентными катионами.

Максимально Допустимое Разведение: Администрация по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, США (ФДА) установила пороговую пирогенную дозу, равную 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 (11). 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.

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 циклофосамида, 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 циклофосамид 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. Tai, J.Y. and Liu, T.Y. Studies on Limulus lysate. Isolation of pro-clotting enzyme. J. Biol. Chem., 252, p.2178 (1977).
8. Cooper, J.F. "Resolving LAL Test Interferences." J. Parent. Sci. & Tech., 44:1, p.13 (1990).
9. Weary, M.E. Pyrogen testing with the Limulus amebocyte lysate test. Pharmacy Int., 7:99.
10. Guideline on the Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test As an Endproduct Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Dept. of Health & Human Services, FDA, December 1987.

11. Bacterial endotoxin test <85>. In The U.S. Pharmacopeia, 23rd revision, p.1696-1697. Mack Publishing Co., Easton, PA 1995.

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. Progresss in Clinical and Biological Research, Vol. 189, Alan R. Liss. Inc., NY, 1985.

Pearson, F.C. Pyrogens: Endotoxins, LAL Testing, and Depyrogenation. Marcel Dekker, New York and Basal, 1985.

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

Manufactured By: CHARLES RIVER ENDOSAFE – U.S. License No. 1197

Div. of Charles River Laboratories, Inc.

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

Product Codes: R13003 R13006 R13012 R13025

PIR13002