

JANINA ALEKSANDROWICZ, ZYGMUNT KUDELSKI

TEST LAL (*LIMULUS AMOEBOCYTE LYSATE*) W ZASTOSOWANIU DO
OCENY BEZPIECZEŃSTWA BIOPREPARATÓW

THE LAL (*LIMULUS AMOEBOCYTE LYSATE*) TEST AS APPLIED FOR THE
EVALUATION OF SAFETY OF BIOLOGICAL PREPARATIONS

Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: prof. dr hab. D. Rymkiewicz

Praca ujmuje przeglądowo zastosowania testu Limulus Amoebocyte Lysate LAL do oznaczania zawartości endotoksyny w preparatach biologicznych. Omówiono rozwój badań nad endotoksyną, jej chemicznymi i biologicznymi właściwościami, oraz efekty działania. Podano charakterystykę Limulus polyphemus, zasady testu LAL, oraz jego zastosowanie do wykrywania endotoksyny w różnych rodzajach preparatów.

WSTĘP

Użycie testu LAL do wykrywania i kontroli obecności substancji pirogennych w produktach farmaceutycznych i sprzęcie medycznym jest odkryciem ostatnich piętnastu lat. Jednakże związek między reakcją a iniekcją dożylną płynów infuzyjnych jest znany od ponad 100 lat. W 1862 r. *Billroth* [4] po raz pierwszy użył słowa „pyrogen” w odniesieniu do substancji wywołujących gorączkę.

Nazwa „endotoksyna” odnosi się do specyficznego pirogeny związanej ze ścianą Gram(-) bakterii, a określenie „lipopolisacharyd” (LPS) związane jest ze strukturą biochemiczną endotoksyny. Zazwyczaj endotoksyny uwalniają się podczas lizy komórek bakteryjnych [2, 3].

Endotoksyna składa się z kompleksów lipidów i polisacharydów o różnym składzie chemicznym.

Wywiera ona liczne i bardzo różne efekty patofizjologiczne na żywe organizmy i poszczególne narządy. Reakcja organizmu na endotoksynę jest zwykle układowa i objawia się podwyższoną temperaturą, dreszczami, tachykardią, bólami głowy, obniżeniem ciśnienia, biegunką, bólami mięśniowymi, nudnościami, wymiotami i innymi objawami [8]. W najcięższych przypadkach, gdy dochodzi do uwolnienia w organizmie dużych ilości endotoksyny, lub w wyniku podania płynów infuzyjnych czy preparatów zawierających duże dawki endotoksyny może wystąpić tzw. szok endotoksyczny, który z kolei może zakończyć się zejściem śmiertelnym [10, 30]. W związku z powyższym istnieje konieczność kontroli wszelkiego rodzaju płynów i preparatów do iniekcji, a także sprzętu medycznego w kierunku obecności endotoksyny [1, 18].

BUDOWA CHEMICZNA ENDOTOKSYN

Endotoksyny bakterii Gram-ujemnych są lipopolisacharydami (LPS), ich masa cząsteczkowa waha się od 900.000 do 1.000.000, są substancjami odpornymi na ciepło (tzw. ciepłostałymi). Antygenowe właściwości lipopolisacharydów są związane z ich częścią wielocukrową, a większość aktywności biologicznych wiąże się z częścią lipidową.

Można wyróżnić zasadnicze trzy części w budowie przestrzennej LPS [24]:

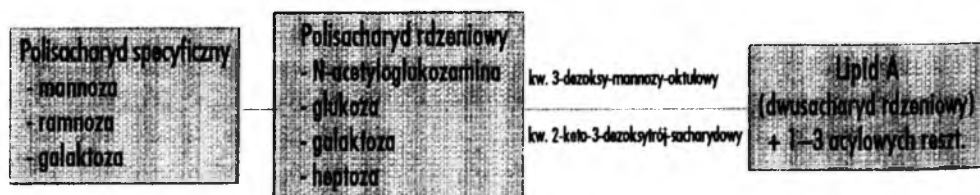
1. *Polisacharyd swoisty* dla antygeny O (np. Antygen somatyczny O *Salmonella*) danego szczepu bakterii złożony z powtarzających się kombinacji oligosacharydów (np. mannoza-ramnoza-galaktoza) tworzących swoistą determinantę haptenuową.

2. *Polisacharyd rdzeniowy* (N-acetyloglukozamina, glukoza, galaktoza, heptoza) jednakowy u wszystkich bakterii Gram-ujemnych.

3. Lipid A jest zbudowany z dwusacharydowego rdzenia, powiązanego z pewną liczbą reszt acylowych, którymi mogą się różnić lipidy A pochodzące z różnych bakterii.

Czasami u niektórych drobnoustrojów (np. *Salmonella minnesota*), lipid A występuje w kilku wersjach jednocześnie. Rdzeń polisacharydowy połączony jest z lipidem A za pomocą kwasu 3-dezoksy-D-mannooktulozowego. Rdzeń polisacharydowy i lipid A mogą być połączone 2-keto-3-dezoksytrój-sacharydem [24, 29].

Struktura chemiczna lipidu A poszczególnych bakterii wykazuje swoistość gatunkową. W przypadku niektórych drobnoustrojów lipid A jest mieszaniną kilku związków o zbliżonej strukturze (Ryc. 1).



Ryc. 1. Chemiczna budowa lipidu A.
The chemical structure of Lipid A.

Lipopolisacharydy bakteryjne są tak rozpozsechnione i mają tak wielostronne działanie np. immunostymulujące z jednej strony, a toksyczne z drugiej strony, że przy stosowaniu preparatów pochodzenia biologicznego (surowice, szczepionki, płyny infuzyjne i inne) należy określić zawartość LPS i wykluczyć zanieczyszczenie nim tychże preparatów.

Biologiczna reaktywność lipopolisacharydów bakteryjnych jest bardzo różnorodna [24]. Endotoksyny działają na układ odpornościowy, wywierają działanie na komórki bezpośrednio i pośrednio. Wiązanie LPS do błony komórkowej jest podstawowym etapem interakcji LPS z komórkami. Interakcja ta wyzwała kaskadę reakcji wewnątrz komórkowych. Wiąże się z receptorami na błonie komórkowej w formie kompleksu LPS-binding protein (LBP), który jest glikoproteiną surowiczą mającą powinowactwo do receptora CD18 („scarenger receptor”). Innymi mechanizmami działania LPS na monocyty i makrofagi są absorpcja, pinocytoza i fagocytoza.

Lipopolisacharydy indukują szerokie spektrum reakcji biologicznych [22, 31].

Efekt działania endotoksyny (LPS) jest zależny od dawki. W zależności od niej różny jest udział poszczególnych reakcji bezpośrednich i pośrednich składających się na całą odpowiedź.

W Polsce od szeregu lat produkowany był preparat lipopolisacharydu z hodowli *E. coli* szczep *Kroegera* 08 otrzymywany zmodyfikowaną metodą *Westphala* i *Leüderitza*, noszący nazwę Pyrogen Standard. Był to preparat służący do: 1) badania wrażliwości zwierząt doświadczalnych (królików) na działanie ciał gorączkotwórczych, a także 2) służący do nieswoistego pobudzenia odporności w stanach nawracających zakażeń układu oddechowego. Wykorzystanie tego preparatu wymagało jednak dalszych badań. W Centrum Szkolenia Kadry Wojskowej Akademii Medycznej były prowadzone badania, na podstawie których stwierdzono, że preparat jest nietoksyczny. Nawet cała ampulka (500 j) Pyrogenu podana myszy nie powodowała jej śmierci. Z kolei Pyrogen podawany człowiekowi podskórnie w ilości 50–450 j był przyczyną zaczerwienienia i obrzęku utrzymującego się w miejscu wstrzyknięcia przez 2 dni oraz manifestował się wzrostem temperatury do 38°C.

W wielu krajach do tej pory prawnie obowiązującym testem na obecność ciał pirogennych jest tzw. test króliczy. W 1985 r. został przez Farmakopeę USA wprowadzony test LAL (*Limulus amoebocyte lysate*) jako oficjalnie stosowany test do określania stężenia endotoksyn bakteryjnych w wodzie [27, 28].

CHARAKTERYSTYKA LIMULUS POLYPHEMUS

Odczynnikiem stosowanym w teście LAL jest lizat amebocytów (komórek krwi) jednego z przedstawicieli stawonogów (*Arthropoda*), należącego do gromady staroraków (*Merostomata*) w podtypie szczękoczułkowców (*Chelicerata*) o nazwie *Limulus polyphemus*. Potocznie zwany jest on „krabem” podkowiastym, choć nie ma nic wspólnego z krabami czy skorupiakami. Właściwą nazwą jest skrzypłocz. Żyje na wybrzeżu atlantyckim Ameryki Płn. Od Maine po Jukatan a także w wodach Pacyfiku od Zatoki Bengalskiej po płd.-zach. Japonię, na Sumatrze, Borneo i Filipinach (Ryc. 2).



Ryc. 2. Fotografia *Limulus polyphemus*.
Photography of *Limulus polyphemus*.

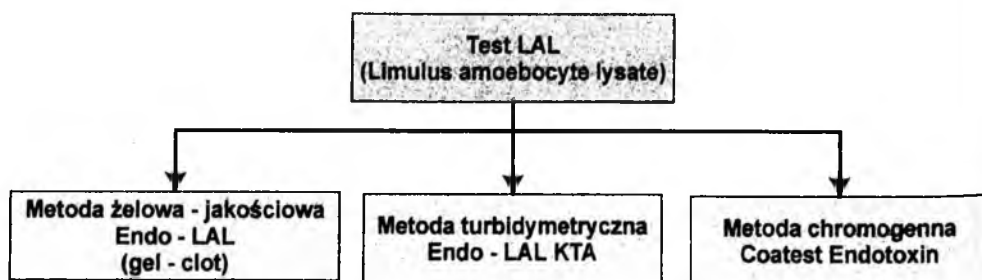
Zetknięcie się krwi skrzypłocza z endotoksyną bakteryjną (LPS) prowadzi do agregacji amebocytów, ich degranulacji i rozerwania, efektem tego jest tworzenie się skrzepu pozakomórkowego. Bakterie Gram (-) zostają w ten sposób unieruchomione w skrzepie. W naturze reakcja ta ma za zadanie chronić *Limulus* przed inwazją bakterii Gram (-).

Właściwości koagulacji endotoksyn bakterii Gram (-) przez amebocyty *Limulus* zostały wykorzystane *in vitro* do testu określającego stężenie endotoksyn w badanych preparatach.

ZASADA TESTU LAL (*LIMULUS AMOEBOCYTE LYSATE*)

Test LAL wykorzystuje zdolność endotoksyny do aktywacji kaskadowej reakcji od proenzymu-koagulogenu do enzymu koagulazy przy użyciu lizatu *Limulus amoebocyte* (LAL). W diagnostyce jest szeroko stosowany do wykrywania endotoksyn przy endotoksemii, w surowicach pacjentów, zanieczyszczeniach endotoksyną preparatów podawanych w iniekcjach, a także w skażeniach nią sprzętu medycznego. Do testu LAL stosuje się odpowiednie zestawy odczynników różnych firm (np. Chromogenix-Sweden).

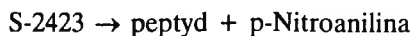
Odróżnia się trzy podstawowe metody postępowania (ryc. 3).

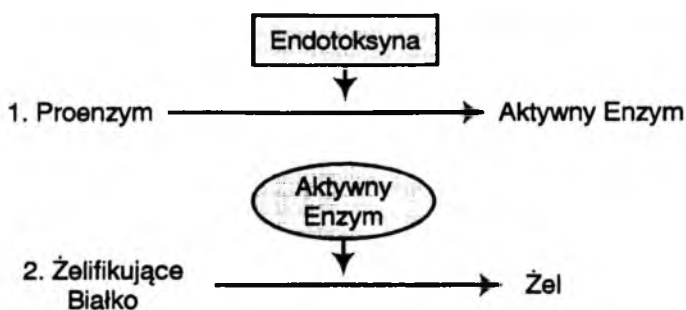


Ryc. 3. Modyfikacje testu LAL.

The modifications of basic LAL test.

- Metoda żelowa (gel-clot) – opiera się na zasadzie reakcji endotoksyny z krwią skrzypłocza powodującej koagulację poprzez uruchomienie łańcucha reakcji enzymatycznych w wyniku których powstaje żel. Reakcja ta jest pół ilościowa. W reakcji tej wyznacza się „punkt końcowy” powstającego żelu wobec krzywej standardowej ustawionej w granicach międzynarodowych jednostek aktywności endotoksyny (EU): od 0,03 EU/ml do 1,2 EU/ml (Ryc. 4).
- Metoda turbidymetryczna polega na podobnym postępowaniu tylko, że oznacza się zmętnienie wobec krzywej standardowej przy dł. fali 405 nm.
- Test LAL z użyciem substratu chromogenicznego S-2423, KABI (tzw. zestaw Endo LAL Coatest Endotoxin). Reakcja polega na uaktywnianiu enzymów obecnych w odczynniku LAL, które działając na substrat S-2423 uwalniają z niego p-nitroanilinę (PNA) wg schematu:





Ryc. 4. Schemat reakcji endotoksyny z *Limulus amoebocyte lysate*.

The scheme of reaction endotoxin with *Limulus amoebocyte lysate*.

Substrat chromogeniczny jest syntetycznym peptydem, związanym kowalennie z chromoforem. Syntetyczny peptyd ma tę samą albo podobną sekwencję aminokwasów jak koagulogen – enzym należący do kaskady enzymów powodujących żelifikację w lizacie amebocytów. Dlatego też enzym wykrzepiający działa na substrat chromogeniczny w ten sam sposób jak koagulogen. Wszystkie substraty chromogeniczne obecnie stosowane do testu LAL zawierają jako chromofor paranitroanilinę (PNA), która po uwolnieniu nadaje badanej reakcji żółte zabarwienie. Uwalnianie p-nitroaniliny jest proporcjonalne do ilości endotoksyny, a więc metoda z wykorzystaniem PNA jest metodą ilościową.

Można przeprowadzać postępowanie: jednoetapowe, w którym próbkę badaną inkubuje się w 37°C z mieszaniną substratu + lizat LAL i odczytuje spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 405$ nm, jak również – postępowanie dwuetapowe, przy którym badaną próbkę inkubuje się z lizatem LAL, a następnie po dodaniu substratu chromogenicznego następuje kolejna inkubacja w 37°C i odczyt przy długości fali $\lambda = 405$ nm. Oznaczenie to można wykonać w probówkach lub na specjalnych płytkach. Pomiar można także przeprowadzić metodą kinetyczną przez mierzenie adsorbancji w sposób ciągły, przy czym krzywa standardowa liczona jest jako log początkowego czasu reakcji („onset time”) w stosunku do log stężenia endotoksyny standardowej. Liczy się tutaj czas potrzebny do uzyskania absorbancji 0,1 w momencie punktu wyjściowego.

Duner w 1993 r. [9] stwierdziła, że test LAL ma znacznie więcej zalet w porównaniu z biologicznym testem na królikach wykrywającym obecność ciał pirogennych. Należą do nich: szybkość, prostota wykonania, ilościowe oznaczenie stężenia endotoksyny i minimalna objętość badanej próbki. Ponadto test LAL jest znacznie czulszy od testu króliczego. Przyjmuje się, że gdy progowa dawka gorączkotwórcza na kilogram wagi królika wynosi 1 ng endotoksyny standardowej EC-2 czyli 10^{-9} , co odpowiada stężeniu 2 ng endotoksyny w ml badanej próbki. Test LAL pozwala na wykrycie endotoksyny nawet w stężeniu 0,1–0,2 pg. ml (czyli 10^{-12}). Test ten jest również bardziej swoisty dla endotoksyny, która jest najbardziej niebezpiecznym pirogenem.

UWAGI OGÓLNE

Pirogenność niektórych preparatów nie może być badana klasycznym testem na królikach ze względu na farmakologiczny wpływ poszczególnych składników na zwie-

rzęta doświadczalne. I tak np. epinefryna, błękit metylowy amfoteryna B, kontrasty są z natury rzeczy gorączkotwórcze [6, 7]. Ponadto stwierdzono, że roztwory fosforanowe wolne od pirogenów mogą wywołać gorączkę u królików, jeżeli są wstrzyknięte w dużych ilościach [27, 28], w przeciwieństwie do niektórych środków uspokajających takich jak pochodne fenotiazyny, kortykosteroidy, preparaty przeciw gorączkowe (paracetamol, APAP i in.), mogące obniżyć temperaturę ciała królika, maskując w ten sposób pirogeny potencjał badanych roztworów [2, 3]. Z tego wynika, że pewne grupy preparatów (chemioterapeutyki, antybiotyki, płyny infuzyjne i dooponowe) są trudne do badań testem na królikach na obecność substancji pirogennych ze względu na ich różne właściwości [6, 7, 11, 16, 17, 19, 32]. Szczególnie w przypadku preparatów dooponowych obecność pirogenów jest wyjątkowo niebezpieczna ze względu na drogę ich podawania i powinna zostać wykluczona.

Jak wspomniano wcześniej w 1985 r. do badania stężenia endotoksyny bakteryjnej w wodzie jako potencjalnego wskaźnika pirogenności Farmakopea USA wprowadziła oficjalnie test LAL [33].

W 1987 r. Farmakopea Europejska [12] zatwierdziła LAL do oznaczania endotoksyny w wodzie. FDA US w tym samym roku podaje dopuszczalną zawartość endotoksyny w lekach, niektórych produktach biologicznych i sprzęcie medycznym [15].

Pfeiffer [26] podaje, że 12 laboratoriów w różnych krajach należących do przemysłu farmaceutycznego już rutynowo stosuje powyższy test zamiast testu na królikach. Dotyczy to zarówno badań w trakcie procesu produkcyjnego jak też oznaczeń pirogenności produktów końcowych np. płynów do wlewek pozajelitowych [23], szczepionek bakteryjnych i wirusowych [20], ekstraktów alergenowych [5], plazmy i frakcji osocza [9, 14, 25, 27, 28] oraz wielu innych preparatów [11, 17, 32].

Jeżeli chodzi o zastosowanie testu LAL do oznaczania endotoksyny w osoczu krwi to niektórzy badacze [10, 25] twierdzą, że aktywacji enzymów i powstawaniu reakcji żelowej w teście LAL przeszkadzają naturalne inhibitory [21].

WHO w 1990 r. zaakceptowała ten test obok tradycyjnego testu na królikach oraz elektroforetycznego testu za pomocą barwienia srebrem [34–36].

W ubiegłym roku niektóre firmy (*SmithKline-Beecham*, *Merck-Sharp-Dohme*) wprowadziły test LAL do kontroli pirogenności szczepionek (np. *Engerix*, *Pedvax*) obok dotychczas stosowanego testu na królikach.

Farmakopea Polska – FP V – [13] wprowadziła test LAL jako obowiązujący do badania pirogenów w antybiotykach i wodzie zamiast wyłącznie do tej pory stosowanego testu biologicznego.

W Zakładzie Badania Surowic i Szczepionek PZH wykonano wstępne badania zawartości endotoksyny w wybranych grupach preparatów biologicznych stosując test LAL [1]. Zbadano zawartość endotoksyny w 44 biopreparatach w tym 20 serii szczepionek wirusowych i bakteryjnych, 10 serii ludzkich immunoglobulin do stosowania dożylnego i 14 serii antybiotyków. Wykazano przydatność testu LAL do wykrywania endotoksyn w preparatach biologicznych. Prowadzone są dalsze badania zmierzające do określenia limitu endotoksyny w preparatach dla których dotychczas nie ma wy-
mogów.

Autorzy dziękują dr *A. Fenton* za pomoc w poszukiwaniu niektórych pozycji piśmiennictwa i dr *B.I. Piotrowicz* za opracowanie charakterystyki *Limulus polyphemus*.

J. Aleksandrowicz, Z Kudelski

THE LAL (*LIMULUS AMOEBOCYTE LYSATE*) TEST AS APPLIED
FOR THE EVALUATION OF BIOLOGICAL PREPARATIONS

Summary

In the paper some problems concerning of pyrogen testing were described. The risk of reactions after administration parenteral preparations contaminated pyrogenic substances give the cause for searching sensitive, repeated methods of their designation.

The paper is review of the adaptation *Limulus Amoebocyte Lysate* (LAL) test for the estimation of endotoxin in biological preparations. The paper overview, chemical structure of endotoxin the characteristic of *Limulus polyphemus*, principle basis of the LAL test and general remarks of application.

The LAL test according to the opinion of many authors is more sensitive in comparing with the pyrogen rabbit test.

PIŚMIENICTWO

1. Aleksandrowicz J., Fiejka M., Kudelski Z., Marciniak-Rusek A., Paś-Dziegielewska L.: Test LAL w zastosowaniu do badania biologicznie czynnych, niepożądaných substancji w biopreparatach. Med. Dośw. Mikrobiol., 1996, 3, 48, 215. – 2. Bennet I.L., Cluff L.E.: Bacterial pyrogens. Pharmacol. Rev. 1957, 9, 427. – 3. Berger A., Elenbogen G.D., Gurgis L.G.: Pyrogens. Advan. Chem., 1956, 16, 168. [Amer. Chem. Soc.]. – 4. Billroth T.: Biobachtungstudien über das wundfieber und accidentelli wund- Krankheiten. Arch. Klin. Chir., 1862, 2, 325–511. In: Berzofsky R.N., McCullough K.L.: Applications of LAL in pharmaceuticals and medical devices: Immunology Insets and other Arthropods 18, 429. – 5. Brede S.: Evaluation of endotoxin in allergenic extracts. Arb. Paul Ehrlich Ins. Georg Speyer-Haus, Ferdinand Blum inst. 1983, 78, 195. – 6. Cooper J.F., Pearson S.M.: Detection of endotoxin in biological products by the *limulus* test. Dev. Biol. Stand., 1977, 34, 7. – 7. Cooper J.F.: Acceptance of the Limulus test as an alternative pyrogen test for radiopharmaceutical and intrathecal drugs In: E. Cohen (ed), Prog. Clin. Biol. Res., vol. 29: Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (*Limulidae*) Alan R. Liss. Inc., New York 1979, 345. – 8. Van Deventer S.J.H., Büller H.R., Ten Cate J.W., Sturk A., Paur W.: Endotoxemia: an early predictor of septicemia in febrile patients. Lancet 1988, 1, 605. – 9. Duner K.I.: A new kinetic single-stage *Limulus amoebocyte lysate* method for the detection of endotoxin in water and plasma. J. Biochem. Biophys. Meth., 1993, 26, 131. – 10. Elin R.J., Robinson R.A., Levine A.S., Wolff S.M.: Lack of clinical usefulness of the *Limulus* test in the diagnosis of endotoxemia. N. Eng. J. Med., 1975, 293, 521.
11. Elin R.J.: Clinical utility of the *Limulus* test with blood, CFS and synovial fluid in: E. Cohen (ed), Prog. Clin. Biol. Res., vol. 29: Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (*Limulidae*) Alan R. Liss. Inc., New York, 1979, 279. – 12. European Pharmacopea Second Edition Part II: Bacterial endotoxins test, 1987, V. 2., 1, 9, 1. – 13. Farmakopea Polska: Oznaczenie zawartości bakteryjnej endotoksyny (test LAL) 1996, ed, V, t. III, 66. – 14. Gardi A., Arpagaus G.: The *Limulus Amoebocyte Lysate* test, a useful tool for the control of plasma fractions. Dev. Biol. Stand., 1977, 34, 21. – 15. Guideline on Validation of the *Limulus Amoebocyte Lysate* test as End-product Endotoxin. Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products and Medical Devices US Dept. of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 1987, App. D., 22–24; App. E, 25. – 16. Guzman R.J., Kuo H.S.: Pyrogen testing of an intravenous fat emulsion in: E. Cohen (ed.), Prog. Clin. Biol. Res., vol. 29: Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (*Limulidae*) Alan R. Liss, Inc., New York 1979, 333. – 17. Harrison S.J., Tsuji K., Enzinger R.M.: Application of LAL for detection of endotoxin in antibiotic preparations in: E. Cohen (ed.), Prog. Clin. Biol. Res., vol. 29: Biomedical

Applications of the Horseshoe Crab (*Limulidae*). Alan R. Liss, Inc., New York 1979, 353. – 18 Jastrzębski Z.: Wykrywanie obecności endotoksyn bakteryjnych w środkach farmaceutycznych. Biuletyn Instytutu Leków, 1995, 3, 31. – 19. Jørgensen J.H., Smith R.F.: Rapid detection of contaminated intravenous fluids using the *Limulus* in vitro endotoxin assay. App. Microbiol. 1973, 26, 521. – 20. Kreeftenberg J.G., Loggen H.G., van Ramshorst J.D., Beuvery E.C.: The *Limulus Amoebocyte Lysate* Test Micromethod and Application in the control of sera and vaccines. RIVM, Bilthoven – International Symposium on pyrogenicity. S. Karger, Basel, 1977, 34, 15.

21. Levin J., Tomasulo P.A., Oser R.S.: Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. J. Lab. Clin. Med. 1970, 75, 903. – 22. Lynn W.A., Golenbock D.T.: Lipopolisaccharide antagonists Immunol. Today 1992, 13, 271. – 23. Mascoli C.C., Weary M.E.: *Limulus Amoebocyte Lysate* (LAL) test for detecting pyrogens in parenteral infectable products and medical devices: Advantages to manufacturers and regulatory officials. Bull. Parenter. Drug Assoc., 1979 b, 33(2), 81. – 24. Nowicki A., Szwech P.: Regresja nowotworów pod wpływem lipopolisacharydów bakteryjnych. Pol. J. Immunol., 1994, 19, 263. – 25. Pearson F.C., Bacich J., Srigley W., Maglalang E., Graff E., Abrosion F., Garcia D.: Applications of the *Limulus Amoebocyte Lysate* Assay to testing of Human Serum Albumin. Dev. Ind. Microbiol. 1981, 29, 371. – 26. Pfeiffer M., Scheer R.: Die Rückgewinnung von Endotoxinen aus wässrigen *Limulus*-Amoebocyten-Lysat-Test mittels Ultrafiltration. Pharm. Ind. 1989, 51, 9, 1034. – 27. Piotrowicz B.I., Edlin S.E., McCartney A.Ch.: A sensitive chromogenic *Limulus Amoebocyte Lysate* micro-assay for detection of endotoxin in human plasma and in water. Zbl. Bakt. Hyg. A. 1985, 260, 108. – 28. Piotrowicz B.I., Watt I., Edlin S., McCartney A.C.: A micromethod for endotoxin assay in human plasma using *Limulus Amoebocyte Lysate* and a chromogenic substrate. Eur. J. Clin. Microbiol., 1985, 4, 1, 52. – 29. Romanowski P., Dzierzbicka K., Myśliwski A., Kołodziejczyk A.M.: Syntetyczne immunomodulatory wzorcowane na naturalnych produktach mikroorganizmów. Postępy Biochemii 1991, 37, 159. – 30. Sturk A., van Deventer S.J.H., Wanter ten Cate J. et al.: Bacterial Endotoxins, Wiley-Liss, 1991, 1 Progress in Clinical and Biological Research 1991, v. 367.

31. Symposium on Bacterial Endotoxin, Some aspects of Biological Activities. Abst. Ed. W. Kaca University of Łódź, Poland, 1996, 4. – 32. Thomas L.L.M., Cate H., Sturk A. et al.: Quantitative chromogenic endotoxin determination in cerebrospinal fluid. Clin. Chim. Acta, 1983, 127, 137. – 33. US Pharmacopea 1985 XXI, ch. 85. – 34. WHO, The collection, fractionation, quality control and uses of blood products, Geneva, 1981, 108. – 35. WHO, Expert Committee on Biological Standardization Tech. Rep. Ser. 800 Geneva, 1990, 136. – 36. WHO, Endotoxin, Tech. Rep. Ser. Nr 858, 1995, 45.

Otrzymano: 1997.01.20