

Lisato degli amebociti del

Limulus

PYROTELL® STV

Prodotto da:  ASSOCIATES OF
CAPE COD
INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA

Telefono:	(508) 540-3444
Numero verde:	(888) 395-2221
Fax:	(508) 540-8680
Assistenza tecnica:	(800) 848-3248
Assistenza clienti:	(800) 525-8378

PN000857- IT rev7 2 maggio 2023

Fiala monostest Pyrotell®

per il rilevamento e la determinazione quantitativa delle endotossine batteriche gram-negative (lipopolisaccaridi)

Il test del lisato degli amebociti del *Limulus* (LAL) può sostituire il test dei pirogeni (test della febbre dei conigli), riconosciuto dalla Farmacopea statunitense (USP), per i test a prodotto finito di "farmaci iniettabili per uso umano (inclusi i prodotti biologici), farmaci iniettabili per uso veterinario e dispositivi medici". Il test LAL è consigliato per la determinazione quantitativa delle endotossine nelle materie prime utilizzate per la produzione, compresa l'acqua, e per il monitoraggio di processo dei livelli di endotossina. Il Bacterial Endotoxins Test (1) della Farmacopea statunitense (USP) è il test ufficiale a cui si fa riferimento in specifiche monografie USP.

Breve descrizione del test

Il lisato degli amebociti del *Limulus* è un estratto acquoso di cellule ematiche (amebociti) del granchio a ferro di cavallo, *Limulus polyphemus*. Il test LAL viene eseguito aggiungendo 0,2 ml di campione di analisi a una fiala monostest (STV) di Pyrotell®. Dopo che il Pyrotell® si è dissolto (dopo circa un minuto), la soluzione viene accuratamente miscelata e la STV viene collocata immediatamente in una incubatrice a secco o in bagnomaria senza circolazione di acqua a 37 ± 1 °C per 60 ± 2 min. Dopo il periodo di incubazione, la STV viene rimossa e capovolta con un unico movimento uniforme. Il test è positivo se sul fondo della provetta si è formato un gel che rimane intatto dopo l'inversione di 180°; la concentrazione di endotossina presente nella provetta è maggiore o uguale alla sensibilità del Pyrotell®. Qualsiasi altro stato della miscela costituisce un test negativo e indica una concentrazione di endotossina minore della sensibilità del Pyrotell®. Il test è negativo anche se il gel si è formato ma si rompe o collassa durante l'inversione. Il test LAL è rapido, specifico, semplice da eseguire e altamente sensibile. Utilizzando la tecnica di gelificazione (gel-clot), il Pyrotell® è in grado di rilevare fino a 0,03 unità endotossiniche (EU) per ml.

Antecedenti e principio biologico

Howell descrisse la coagulazione del sangue del *Limulus* nel 1885 (2). Intorno al 1950, presso il Marine Biological Laboratory di Woods Hole, nello stato del Massachusetts, Bang scoprì che i batteri gram-negativi provocavano la coagulazione del sangue del *Limulus* (3). Levin e Bang determinarono successivamente che la reazione era enzimatica e che gli enzimi si trovavano nei granuli degli amebociti (4). Dimostrarono che la coagulazione ha inizio da un unico componente strutturale della parete cellulare dei batteri chiamato endotossina o lipopolisaccaride (5). In base alle conoscenze attuali si ritiene che la reazione che porta alla formazione di coaguli sia una cascata di passaggi di attivazione enzimatica. Sebbene la reazione completa non sia chiara, l'ultimo passaggio è ben descritto. La proteina coagulabile (coagulogeno) viene scissa mediante l'enzima coagulante attivato e i prodotti insolubili della scissione si uniscono tramite interazione ionica e formano la matrice di gel. Maggiori informazioni sulla reazione chimica LAL e sulle relative applicazioni sono reperibili in letteratura (6,7,8).

Reagent

Le fiale monostest di Pyrotell® contengono 0,2 ml di LAL liofilizzato.

Associates of Cape Cod, Inc. offre lotti individuali di Pyrotell® con sensibilità comprese fra 0,03 e 0,25 EU/ml, in conformità alla USP Endotoxin Reference Standard (endotossina standard di riferimento della Farmacopea statunitense, nota anche come Reference Standard Endotoxin o RSE). La sensibilità (λ) è la concentrazione minima di RSE che, in presenza di condizioni standard, produce una coagulazione compatta di gel. La sensibilità del lotto, misurata in EU/ml, è indicata sulle etichette della confezione. Specificare la sensibilità desiderata al momento dell'ordinazione.

Utilizzare Pyrotell® esclusivamente per fini diagnostici in vitro. Non utilizzare questo prodotto per rilevare l'endotossemia. Dato che la tossicità di questo reagente non è stata determinata, si dovrà esercitare cautela quando si maneggia Pyrotell®.

Ricostituzione di una fiala monostest (STV)

- La STV viene reidratata con 0,2 ml di campione di analisi durante la procedura di analisi (consultare la sezione "Esecuzione del test" in Procedura di analisi).
- Picchiare leggermente la STV in modo da far cadere sul fondo della fiala il Pyrotell® sciolto. Togliere la guarnizione aggraffata ed eliminare il vuoto sollevando il tappo grigio. Non contaminare l'imboccatura della fiala. Togliere il tappo e gettarlo; non iniettare attraverso il tappo e non riutilizzarlo. Una piccola quantità di LAL rimasta sul tappo non influirà sull'esito del test.
- Il pellet LAL liofilizzato entrerà in soluzione entro un minuto dall'aggiunta del campione di analisi. Dopo la reidratazione, miscelare bene il contenuto della fiala per garantire omogeneità.

Condizioni di conservazione

Il Pyrotell® liofilizzato è relativamente resistente al calore e, se conservato refrigerato, manterrà la completa attività fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala. Al ricevimento del prodotto, conservarlo a una temperatura compresa fra -20 °C e +8 °C. Le temperature inferiori a -20 °C provocano la contrazione del tappo, e portano a una perdita del vuoto e all'eventuale contaminazione del Pyrotell®. Le temperature superiori a 37 °C possono causare il rapido deterioramento del Pyrotell® liofilizzato, evidenziato da una perdita di sensibilità e un'evidente colorazione giallastra del prodotto. Pyrotell® è spedito in contenitori isolati insieme a buste contenenti ghiaccio che lo proteggono dalle temperature elevate.

Il Pyrotell® reidratato con reagente acqua per LAL (consultare la sezione "Reagenti del test") è in genere trasparente e leggermente opalescente. Di tanto in tanto un lotto può presentare una leggera e uniforme torbidità. La presenza di piccole fibre o filamenti non indica contaminazione né compromette l'attività del prodotto; tuttavia, un precipitato a fiocchi o un colore marcatamente giallo indicano deterioramento.

Prelievo e preparazione dei campioni di analisi

I campioni di analisi devono essere raccolti asetticamente in contenitori aprotici. Si consiglia l'utilizzo di vetreria deprogenata o di contenitori in plastica, sterili e monouso, in plastica qualificata (in base all'USP [9]) per ridurre al minimo l'adsorbimento dell'endotossina alle superfici dei contenitori. Non tutti i contenitori in plastica sono esenti da endotossina rilevabile; le sostanze estraibili da alcune materie plastiche possono interferire con il test LAL. Per determinare se il lotto è accettabile è possibile risciacquare i contenitori (selezionati a caso da un lotto) con un piccolo volume di reagente acqua per LAL (a temperatura ambiente per un'ora) e analizzare la soluzione di risciacquo come se fosse un campione di analisi.

Il pH della miscela di reazione (campione diluito aggiunto al Pyrotell®) deve essere compreso tra 6 e 8. Correggere il pH del campione di analisi con HCl, NaOH (privo di endotossina rilevabile) o tampone compatibile (ad es., Pyrosol®). Diluire il componente HCl o NaOH concentrato con LRW fino a raggiungere un livello accettabile che non comporti una significativa diluizione del campione di analisi una volta corretto. Non correggere il pH di soluzioni fisiologiche non tamponate o acqua.

Le sostanze che denaturano le proteine, chelano i cationi, legano le endotossine o alterano il loro stato idrofobico possono causare interferenza nel test. L'interferenza può essere rilevata mediante il recupero di endotossina, notevolmente maggiore o minore del previsto, da una quantità nota di endotossina standard aggiunta al campione di analisi (vedere "Limiti della procedura"). Nella maggioranza dei casi, la diluizione del campione di analisi riduce la concentrazione e l'attività delle sostanze interferenti, consentendo comunque di ottenere risultati validi. I controlli e gli schemi di diluizione adeguati sono trattati nella sezione "Procedura di analisi".

I campioni di analisi vanno analizzati appena possibile dopo il prelievo. Può essere utile congelare un campione di analisi non sterile da conservare o spedire prima del test. I campioni di analisi con presunte basse concentrazioni di endotossina (meno di 1 EU/ml) devono essere testati per valutare l'eventuale perdita di endotossina durante la conservazione.

Procedura di analisi

Reagenti del test

- Pyrotell® STV* (vedere la descrizione e il metodo di ricostituzione nella sezione qui sopra).
- Reagente acqua per LAL* (LRW), non fornito con Pyrotell®; ordinare separatamente. Utilizzare acqua di diluizione che non contenga endotossine rilevabili con il test LAL. Le fonti d'acqua consigliate includono Associates of Cape Cod, Inc. oppure l'acqua sterile per iniezione o per irrigazione (Sterile Water for Injection or Irrigation o WFI, senza agenti batteriostatici) dell'USP. Il limite endotossinico nella WFI dell'USP è 0,25 EU/ml, pertanto la WFI può presentare endotossina rilevabile con alcuni lotti di Pyrotell®. Per certificare un nuovo lotto di acqua come la LRW con un determinato lotto di Pyrotell®, effettuare diluizioni dell'endotossina standard con il nuovo lotto di acqua per confermare la sensibilità del Pyrotell®. L'acqua è idonea all'uso se viene confermata la sensibilità del lotto e il controllo negativo non indica nessun aumento di viscosità e nessuna precipitazione flocculante. Utilizzare la LRW per ricostituire le endotossine standard e per diluire le endotossine standard e i campioni di analisi.
- Endotossina standard*, non fornita insieme a Pyrotell®; ordinare separatamente. Endotossina standard di controllo (CSE), n. di cat. E0005, reperibile presso Associates of Cape Cod, Inc., usata per confermare la sensibilità del Pyrotell®, convalidare il prodotto e preparare i controlli di inibizione. Ciascuna fiale contiene una quantità di peso misurata di endotossina. L'endotossina standard di riferimento dell'USP può essere richiesta alla U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Seguire le istruzioni dei produttori relative alla ricostituzione e alla conservazione delle endotossine standard. I lotti di CSE possono mostrare concentrazioni differenti (EU/ng) quando testate con diversi lotti di Pyrotell®. Richiedere un certificato di analisi che indichi la concentrazione di una CSE con un lotto specifico di Pyrotell®.

Materiali e apparecchiature (non forniti)

- Bagnomaria ad acqua non circolante* oppure incubatrice a secco, in grado di mantenere una temperatura di 37 ± 1 °C.
- Rastrelliere portaprovette*.
- Pipette*, pipettatori automatici con puntali o pipettatori a ripetizione con cilindri delle siringhe in plastica. Si consiglia l'uso di prodotti sterili monouso.
- Miscelatore di tipo vortex*.

5. *Provette per diluizione apirogene* di capacità adeguata per eseguire le diluizioni dello standard di endotossina o del campione di analisi, ad es., n. di cat. TB013, TB240 o TB016C. Per informazioni sugli altri contenitori idonei per le diluizioni, vedere “Prelievo e preparazione dei campioni di analisi”.

6. *Stufa ad aria calda* in grado di raggiungere una temperatura di 250 °C per la depirogenazione della vetreria. Le impostazioni di durata e temperatura minime adottate comunemente prevedono la permanenza per 30 minuti a una temperatura di 250 °C (1, 10).

Controlli

I controlli sono necessari per garantire la validità del test. Le procedure richieste sono definite in dettaglio dall’USP (1).

1. Controlli di endotossina

a. **Serie di standard di endotossina.** Preparare una serie di diluizioni fresche partendo dalla soluzione di endotossina base. Preparare le diluizioni in modo che una serie finale di diluizioni al raddoppio includa la sensibilità (λ) del Pyrotell®. Per confermare la sensibilità del Pyrotell® si consiglia di utilizzare le concentrazioni 2λ , λ , $0,5\lambda$ e $0,25\lambda$. Utilizzare quante meno diluizioni possibile con volumi pipette appropriati per massimizzare l’accuratezza.

b. In conformità con le indicazioni dell’USP (1), per eseguire il test dei limiti è possibile utilizzare i **controlli positivi** al posto di una serie di concentrazioni standard. La concentrazione del controllo positivo deve essere 2λ .

c. **I controlli positivi del prodotto** sono controlli di inibizione e sono costituiti da campione di analisi o diluizione del campione di analisi ai quali si aggiunge endotossina standard. La concentrazione finale dell’endotossina aggiunta nel campione di analisi deve essere 2λ .

2. Controlli negativi

I controlli negativi con LRW devono essere inclusi in ciascun lotto di campioni di analisi analizzati. Quando si esegue il test per i fattori interferenti (1), anche il campione di analisi usato per diluire l’endotossina standard viene trattato come controllo negativo.

Preparazione dei campioni di analisi per test dei limiti o dosaggio quantitativo

Diluire il campione di analisi alla concentrazione richiesta per effettuare il test dei limiti (superato/respinto) (1) oppure eseguire il dosaggio quantitativo (1) analizzando una serie di concentrazioni (esempi dei due tipi di test sono inclusi nella sezione “Risultati e interpretazione”). Le diluizioni devono essere effettuate in provette per diluizione e il volume del test di 0,2 ml deve essere trasferito nelle STV. La diluizione analizzata nel test dei limiti viene determinata attraverso la sensibilità del Pyrotell® ed il limite endotossinico del campione di analisi. Consultare “Limiti della procedura”

Esecuzione del test

Per ottenere risultati soddisfacenti, è necessario adottare una **tecnica uniforme**.

1. Aggiungere 0,2 ml di campione di analisi o di controllo direttamente nella STV utilizzando una pipetta graduata (con incrementi da 0,1 ml) oppure un pipettatore automatico. Preparare innanzitutto il controllo o i controlli negativi. Aggiungere le concentrazioni di endotossina standard ad ogni STV, passando dalla concentrazione più bassa a quella più alta in ciascuna serie. Agitare vigorosamente le rastrelliere portaprovette per 20-30 secondi in modo da garantire un’adeguata miscelazione. Se sono presenti solo poche provette, ciascuna di esse può essere miscelata su vortex per 1-2 secondi. Una miscelazione non adeguata è spesso causa di risultati insoddisfacenti dell’analisi.

2. Collocare le provette di reazione in acqua o in bagno a secco a 37 ± 1 °C per 60 ± 2 minuti. La reazione inizia quando il campione di analisi viene aggiunto al LAL, tuttavia non avviene ad una velocità ottimale finché la miscela non raggiunge i 37 °C. Se si esaminano molti campioni in parallelo, i test devono essere raggruppati in lotti ed iniziati ad intervalli tali da permettere la lettura di ciascuno entro il limite di tempo.

Non disturbare le STV durante il periodo di incubazione. La reazione che consente la formazione del gel è delicata e può interrompersi in modo irreversibile se le provette vengono manipolate, agitate o subiscono vibrazioni. Non usare bagnomaria con agitazione dell’acqua o altre sorgenti di vibrazioni. Immergere le provette fino a superare il livello della miscela di reazione, ma non inserirle troppo in profondità per evitare di causarne il galleggiamento o lo spostamento all’interno delle rastrelliere.

3. Rimuovere e leggere le provette di reazione una alla volta, direttamente dall’acqua o dal bagno a secco. Non asciugare le provette mediante strofinamento, e non farle urtare contro il lato della rastrelliera. Invertire la provetta con un movimento uniforme; non fermarsi a metà durante l’inversione, a meno che non sia ovvio che il gel non si sia formato. Il risultato positivo del test è indicato dalla formazione di un gel che non collassa quando la provetta viene invertita.

Risultati e interpretazione

Esempio di serie di endotossina standard

Confermare la sensibilità del Pyrotell® e qualificare il laboratorio oppure il tecnico eseguendo il test LAL su una serie conosciuta di concentrazioni di endotossina standard (1) che includa la sensibilità indicata sull’etichetta (cioè 2λ , λ , $0,5\lambda$ e $0,25\lambda$). In questo esempio la sensibilità (λ) del Pyrotell® è di 0,25 EU/ml:

Concentrazione della endotossina	Risultato del test
0,5 EU/ml (2λ)	+
0,25 EU/ml (λ)	+
0,125 EU/ml ($0,5\lambda$)	-
0,06 EU/ml ($0,25\lambda$)	-
LRW (controllo negativo)	-

L’endpoint di questo dosaggio viene definito dalla concentrazione minima di endotossina necessaria per ottenere un risultato positivo del test. La sensibilità indicata sull’etichetta del Pyrotell® viene confermata se l’endpoint è λ più o meno una diluizione al raddoppio. In questo esempio la concentrazione di endotossina nell’ultima provetta con risultato positivo nella serie è di 0,25 EU/ml o λ , perciò la sensibilità viene confermata. Il test è valido (la sensibilità è confermata) se l’endpoint è da 0,125 a 0,5 EU/ml (l’errore del metodo). Per mostrare un endpoint di 0,125 EU/ml, il livello di 0,06 EU/ml deve essere presente nella serie e risultare negativo.

Quando il dosaggio dell’endotossina viene replicato, la sensibilità viene espressa come media geometrica (GM) delle sensibilità individuali:

$$GM = \text{antilogaritmo} ((\Sigma e)/f)$$

in cui Σe = somma dei logaritmi degli endpoint ed f = numero degli endpoint replicati.

Il **controllo negativo** LRW deve dare un risultato negativo del test. Se il controllo negativo coagula, significa che LRW, gli articoli di vetro o il Pyrotell® sono contaminati. La miscela deve essere trasparente senza presentare aumenti di viscosità. Particelle o precipitazioni flocculanti indicano che la concentrazione dell’endotossina è inferiore alla sensibilità del Pyrotell®.

In assenza delle serie di endotossine (1), è possibile includere con i test un **controllo positivo**. Il controllo positivo a 2λ è il livello 0,5 EU/ml nell’esempio sopra indicato. Se il controllo positivo dà risultato negativo, la sensibilità del Pyrotell® è inferiore al valore doppio della sensibilità indicata sull’etichetta e il test del campione di analisi risulta non valido. La perdita di sensibilità può significare che il Pyrotell® è deteriorato, l’endotossina ha perduto concentrazione (spesso a causa dell’adsorbimento sulla superficie del contenitore) oppure il test non è stato condotto correttamente.

Esempio di un test dei limiti (superato/respinto)

È possibile analizzare la concentrazione di un campione con un Pyrotell® ad una determinata sensibilità e ottenere dei risultati che indicano se il campione di analisi presenta o meno una quantità superiore o inferiore di endotossina rispetto al suo limite. In questo esempio la concentrazione del campione di analisi è di 1 mg/ml e il limite endotossinico desiderato o predeterminato è di 3 EU/mg (vedere la sezione “Limiti della procedura”). Il limite espresso in EU/ml,

$$(3 \text{ EU/mg}) (1 \text{ mg/ml}) = 3 \text{ EU/ml}$$

è maggiore rispetto alla sensibilità del Pyrotell®, 0,25 EU/ml; di conseguenza il campione di analisi deve essere diluito per poter essere sottoposto al test superato/respinto. Stabilire la diluizione del campione di analisi che indicherà il buon esito del test (superato), ossia $< 3 \text{ EU/ml}$, oppure l’esito negativo (respinto), $\geq 3 \text{ EU/ml}$, dividendo il limite endotossinico misurato in EU/ml per la sensibilità del LAL:

$$3 \text{ EU/ml} / 0,25 \text{ EU/ml} = 12.$$

Miscelare una parte di campione di analisi con 11 parti di LRW allo scopo di raggiungere una diluizione 1:12 ed effettuare il test. Il risultato indicherà se il campione di analisi supera il test al limite di 3 EU/ml. I controlli positivi del prodotto sono inclusi durante il processo di diluizione del campione di analisi per escludere i risultati falsi negativi.

Esempio di un dosaggio quantitativo

L’endotossina viene quantificata in un dosaggio trovando l’endpoint in una serie di diluizioni del campione di analisi. Nell’esempio indicato di seguito, il campione di analisi viene diluito con LRW e le diluizioni indicate nella tabella vengono testate; λ è 0,25 EU/ml. I risultati vengono indicati come positivi o negativi.

Diluizione del campione di analisi	Risultato del test
non diluito	+
1:2	+
1:4	+
1:8	-
1:16	-
1:32	-
controllo negativo	-

Per calcolare la concentrazione di endotossina nel campione di analisi, moltiplicare la sensibilità del Pyrotell® (λ) per il reciproco della diluizione all’endpoint:

$$\text{Conc.} = (\lambda) (4/1) = (0,25 \text{ EU/ml}) (4) = 1 \text{ EU/ml}$$

La concentrazione per dosaggi replicati viene espressa con una media geometrica.

Per escludere i risultati falsi negativi deve essere presente un **controllo positivo del prodotto** (campione di analisi con aggiunta di endotossina standard 2λ) che risulti positivo al test. Se il controllo positivo del prodotto risulta negativo e il controllo positivo del test risulta positivo, il campione di analisi inibisce il test LAL. Il campione di analisi deve essere rianalizzato a una diluizione maggiore (non superare la Massima Diluizione Valida (MVD); vedere la sezione “Limiti della procedura”).

Limiti della procedura

La procedura è limitata dalla capacità del campione di analisi di inibire o attivare il test LAL. Se la procedura non può essere convalidata (1) a una diluizione del campione di analisi che non supera la Massima Diluizione Valida (MVD), il test LAL non potrà sostituire test dei pirogeni riconosciuto dall’USP. La MVD è calcolata come segue:

$$\text{MVD} = (\text{limite endotossinico}) (\text{concentrazione della soluzione per campione di analisi}) / (\lambda)$$

dove λ è la sensibilità indicata sull’etichetta espressa in EU/ml.

Secondo l’USP (1), il limite endotossinico per i farmaci con somministrazione parenterale è definito sulla base della dose espressa in K/M, dove K è la soglia della dose pirogenica di endotossina per kg di peso corporeo (0,2 EU/kg per i farmaci somministrati per via intratecale e 5 EU/kg per tutti gli altri farmaci somministrati per via parenterale) e M è la dose massima per l’uomo.

In base all'USP (12), il limite endotossinico per i dispositivi medici finiti non supera 20 EU/dispositivo e 2,15 EU/dispositivo per i dispositivi a contatto con il liquido cerebrospinale. Il limite endotossinico dell'estratto del dispositivo viene calcolato in questo modo: $(K \times N)/V$, dove K è il limite per ogni dispositivo, N è il numero di dispositivi estratti e V è il volume totale dell'estratto.

La tripsina genererà un risultato falso positivo se prima dell'analisi non viene denaturata mediante trattamento termico. Materiali quali sangue, siero e plasma, devono essere trattati al fine di inattivare gli inibitori prima di eseguire il test (11).

Valori attesi

L'endotossina può essere quantificata se la concentrazione è maggiore o uguale alla sensibilità del Pyrotell®. I materiali di origine biologica possono contenere livelli misurabili di endotossina anche dopo essere stati sottoposti a purificazione biochimica. L'acqua ottenuta mediante distillazione, osmosi inversa o ultrafiltrazione può contenere una quantità di endotossina inferiore a quella rilevabile, a condizione che il processo di purificazione funzioni correttamente e che l'acqua non venga contaminata dopo la produzione.

Caratteristiche prestazionali specifiche

L'errore nel metodo di gelificazione è di più o meno una diluizione al raddoppio dell'endpoint del dosaggio.

Bibliografia

1. <85> Bacterial Endotoxins Test, current USP.
2. Howell, W. H. 1885 Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
3. Bang, F. B. 1953 The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol. Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.
4. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
5. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
6. Levin, J., and F. B. Bang. 1968 Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
7. Novitsky, T. J. 1984 Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
8. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.
9. <1085> Guidelines on endotoxins test, current USP.
10. <1228> Depyrogenation, current USP.

11. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984 Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.

12. <161> Medical Devices – Bacterial Endotoxin and Pyrogen Tests, current USP.

Il nostro personale specializzato sarà lieto di spiegare gli aspetti pratici e teorici del test LAL. Non esitate a contattarci per qualsiasi quesito sull'uso di Pyrotell®. I prodotti le cui prestazioni non sono conformi alle specifiche tecniche verranno sostituiti, tuttavia l'azienda deve essere avvisata prima di effettuare la restituzione dei prodotti.