

NOTA APPLICATIVA

LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE (LAL) - MULTI TEST VIAL
Per la determinazione quantitative delle endotossine
da batteri Gram-negativi

LAL

N. 1009
NOVEMBRE 2005

NOTA APPLICATIVA

□ Introduzione

- Il Limulus Amebocyte Lysate Test (LAL), se impiegato seguendo le linee guida della Food and Drug Administration USA, può sostituire il Test del coniglio per pirogeni riportato nella Pharmacopea USA (1) sui prodotti finiti (iniettabili nell' uomo e presidi medico-chirurgici).
- Il LAL Test è raccomandato per la determinazione quantitativa di endotossine in materie prime impiegate nella produzione, acqua inclusa, e per il monitoraggio "in-process" dei livelli di endotossina.
- Il USP Bacterial Endotoxin Test (2) è il test ufficiale riportato nelle specifiche monografie della USP.

□ Sommario del test

- Il Limulus Amebocyte Lysate è l'estratto acquoso di cellule del sangue (amebociti) del *Limulus polyphemus*.
- Il LAL Test si esegue aggiungendo 0,1 ml del campione in esame a 0,1 ml di lisato di Pyroquant ricostituito. Quando il Pyroquant si è sciolto completamente (occorre circa 1 minuto), si agita delicatamente e si trasferisce la provetta immediatamente in un termostato a secco od in un bagnomaria senza circolazione dell' acqua a 37°C (± 1°C) per 60 minuti (± 2 minuti).
- Al termine del periodo di incubazione, si rimuove la provetta dal bagnomaria e la si capovolge con un movimento lento. Se si è formato un gel che rimane intatto sul fondo della provetta dopo il capovolgimento di 180°, il test si considera positivo; la concentrazione di endotossina nella provetta è superiore od uguale alle sensibilità del Pyroquant. Ogni altra condizione fisica del lisato costituisce un test negativo che indica una concentrazione in endotossina inferiore alla sensibilità del Pyroquant.
- Nel caso di formazione di un gel che si rompe dopo il capovolgimento della provetta, il test è da considerarsi negativo.
- Il LAL Test è rapido, specifico, di facile esecuzione, di alta sensibilità.
- Il Pyroquant è in grado di evidenziare sino a 0,03 Unità di Endotossina/ml con il metodo di gelificazione (gel-Clot).

□ Storia e principio biologico

- Howell descrisse la coagulazione del sangue del Limulus nel 1885. Negli anni '50 Bang presso il Marine Biological Laboratory di Wood Hole nel MA scoprì (3) che i batteri Gram-negativi causavano la coagulazione del sangue del Limulus (4). Levin e Bang scoprirono successivamente che la reazione era enzimatica e che l' enzima si trovava nei granuli degli amebociti (5).
- Dimostrarono che la coagulazione ha inizio da un componente della parete cellulare dei batteri chiamata endotossina o lipopolisaccaride (6).
- Dalle conoscenze odierne si sa che la reazione che porta alla formazione del gel è una reazione enzimatica a cascata. Mentre la reazione completa non è ancora chiara, è stata ben descritta l' ultima fase. La proteina coagulabile (coagulogeno) è scissa mediante un enzima coagulante attivato; i prodotti insolubili della scissione interagiscono per interazione ionica formando il gel.
- Informazioni più dettagliate sulla reazione del LAL e relative applicazioni si trovano in letteratura (7, 8, 9).

□ Reagenti

- Il Limulus Amebocyte Lysate Pyroquant (LAL) è confezionato in forma liofilizzata in vial da 1, 2, 5 ml.
- Pyroquant contiene unicamente un estratto acquoso di amebociti di *Limulus polyphemus*, 1,5 % v/v di siero albumina umana come stabilizzante, 3% di Na Cl ed altri appropriati ioni.
- Non sono aggiunti conservanti, tamponi od altri ingredienti.
- Il Pyroquant è disponibile in lotti con differenti sensibilità a partire da 0,03 UE/ ml sino a 0,25 UE/ml in riferimento agli Standard di Endotossina della USP. La sensibilità (I) è la minima concentrazione di RSE che produce un solido gel in condizioni standard.
- La sensibilità del lotto, espressa in UE/ml, è riportata stampata su ogni vial e confezione.
- Specificare la sensibilità richiesta al momento dell' ordine.
- Il Pyroquant deve essere impiegato solo a scopi diagnostici in vitro. Non utilizzarlo per la determinazione dell' endotossemia.
- La tossicità di questo reagente non è stata determinata e pertanto deve essere utilizzato con precauzione.

❑ Ricostruzione del Pyroquant

Picchiettare leggermente la vial in modo che il PYROQUANT si trovi sul fondo della vial.

Rimuovere il sigillo di chiusura ed eliminare il vuoto sollevando il tappo di colore grigio.

Fare attenzione a non contaminare l'imboccatura della vial.

Togliere ed eliminare il tappo. Non iniettare attraverso il tappo e non riutilizzarlo.

Un piccolo quantitativo di LAL eventualmente rimasto adeso al tappo non influirà sul test.

Coprire la vial con Parafilm "M" (American Can. CO.) quando non è usata.

Ricostruire il PYROQUANT con 1.0, 2.0, 5.0 ml di acqua apirogena "Acila" seguendo le indicazioni riportate in etichetta.

I pellet di LAL liofilizzato solubilizzano in pochi minuti.

Prima dell'uso agitare delicatamente il contenuto della vial per assicurarne l'omogeneità.

Una agitazione troppo vigorosa potrebbe causare la formazione di una eccessiva quantità di schiuma che potrebbe portare ad una diminuzione di sensibilità del lisato.

❑ Condizioni di conservazione

Il Pyroquant liofilizzato è relativamente stabile al calore e, se conservato refrigerato, mantiene la sua completa attività sino allo scadere della data riportata in etichetta.

Al momento del ricevimento, conservare il prodotto a $-20/+8^{\circ}\text{C}$. Temperature inferiori a -20°C danneggiano il tappo provocando una perdita di vuoto ed una possibile contaminazione del Pyroquant.

Temperature superiori a 37°C possono causare un rapido deterioramento del Pyroquant liofilizzato che si manifesta con perdita di sensibilità ed ingiallimento del prodotto.

Pyroquant, viene spedito in contenitori coibentati per proteggerlo dalle alte temperature.

Pyroquant reidratato con acqua per LAL apirogena "Acila" (vedi Capitolo Reagenti) è in genere trasparente con una leggera opalescenza. Occasionalmente un lotto può presentare una leggera, uniforme torbidità. La presenza di piccole fibre non indica contaminazione e non influisce sulla attività, mentre una precipitazione a flocculi od un preciso colore giallastro è indice di deterioramento.

Il Pyroquant ricostituito è meno stabile del prodotto liofilizzato; le vial possono essere conservate per 24 ore a $2/8^{\circ}\text{C}$.

Il Pyroquant ricostituito può essere congelato una volta. Il prodotto conserva la sua attività per 3 mesi se viene immediatamente congelato dopo la ricostituzione e mantenuto a -20°C . Dopo scongelamento, si applicano gli stessi criteri visivi per l'accertamento della qualità come nel caso della ricostituzione iniziale.

❑ Prelievo del campione e preparazione

I campioni devono essere prelevati asepticamente e trasferiti in contenitori apirogenici. Si raccomanda l'impiego di vetreria riutilizzabile depirogenata o plastica in polistirolo monouso, sterile per ridurre l'adsorbimento dell'endotossina alle superfici del contenitore.

Non tutti i contenitori in plastica sono esenti da endotossina rilevabile ed alcune sostanze estraibili possono interferire con il LAL test.

Per determinare se il lotto di contenitori è idoneo, si devono prelevare a caso alcuni contenitori dal lotto, risciacquarli con un piccolo volume di acqua sterile apirogena "Acila", lasciare riposare a temperatura ambiente per una ora ed eseguire il test del LAL sulla soluzione come se si trattasse di un campione.

Il pH della soluzione lisato/campione (campione addizionato al Pyroquant) deve essere compreso tra 6 e 8. Correggere il PH, se necessario, con HCl, NaOH o tampone (esenti da endotossina). Diluire HCl o NaOH concentrati con acqua apirogena "Acila" portando ad una normalità che non modifichi significativamente la diluizione del campione in esame dopo correzione.

Non correggere il pH di soluzioni saline non tamponate, od acqua.

Sostanze che denaturano le proteine, chelano i cationi, legano le endotossine, alterano lo stato idrofobico delle endotossine, possono dare interferenza nel test. L'interferenza si può evidenziare mediante il recupero di endotossina più o meno significativo di quello che ci si attende, da un quantitativo noto di endotossina standard aggiunta al campione (vedi Capitolo "Limitazioni del metodo").

In molti casi, la diluizione del campione riduce la concentrazione e l'attività delle sostanze interferenti consentendo di ottenere risultati validi. Idonei controlli e schemi di diluizione si trovano al Capitolo "Metodo di esecuzione".

I campioni devono essere esaminati al più presto possibile dopo il loro prelievo. Può essere utile congelare un campione non sterile che sarà conservato o spedito prima del test.

Campioni con presunte basse concentrazioni di endotossina (inferiori a 1 UE/ml) devono essere testati per valutare la eventuale perdita di endotossina durante la conservazione.

❑ Metodo di esecuzione del test

- REAGENTI

1. Vial di differenti volumi (Vedi Capitolo Descrizione e metodo di ricostituzione).

Acqua per LAL sterile apirogena "Acila" da ordinare specificatamente. Poichè il limite di endotossina per l'acqua per iniettabili è di 0,25 UE/ml, l'acqua e gli iniettabili finiti possono avere reazione positiva con alcuni lotti di Pyroquant. Per certificare un nuovo lotto di acqua come acqua per LAL con un dato lotto di Pyroquant, allestire diluizioni di endotossina standard con il nuovo lotto di acqua per confermare la sensibilità del Pyroquant. Se la sensibilità del lotto è confermata ed il controllo negativo non dimostra aumento di viscosità di precipitazione flocculi, l'acqua è idonea per essere impiegata nel test. Usare acqua sterile apirogena "Acila" per la ricostituzione degli standard di endotossina, per la diluizione degli standard di endotossina e per i campioni in esame.

2. Endotossina standard. Deve essere ordinata separatamente. La Endotossina Standard di Controllo (CSE) si impiega per confermare la sensibilità del Pyroquant, validare il prodotto, approntare i controlli di inibizione. Ogni vial contiene un peso noto di endotossina.

Nella preparazione dell'Endotossina Standard di Riferimento USP (EC-6) si devono seguire alla lettera le istruzioni per la ricostituzione e la conservazione riportate nella apposita Nota Applicativa.

Differenti lotti di CSE possono avere differenti attività (UE/ng) se analizzati con differenti lotti di Pyroquant. Richiedere il Certificato di Analisi per l'attività della CSE con uno specifico lotto di Pyroquant.

- MATERIALI E STRUMENTAZIONE NECESSARI MA NON FORNITI

1. Bagnomaria ad acqua non circolante o bagnomaria a secco in grado di mantenere una temperatura di $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2. Supporti per provette.

3. Pipette, pipettatori automatici con puntali a perdere sterili, monouso, apirogeni.

4. Agitatore tipo Vortex.

5. Provette apirogene di volume sufficiente per approntare le diluizioni di endotossina standard o dei campioni in esame (provette in vetro 16x160 mm riutilizzabili, con tappo metallico). Vedi Capitolo "Prelievo e preparazione del campione" per altri contenitori adatti alle diluizioni.
6. Stufa ad aria calda a 180°C o 250°C per la deprogenazione della vetreria.
Si raccomanda un ciclo di deprogenazione di almeno 180°C per 3 ore (10) o 250°C per 30 minuti (2, 11).
7. Provette in vetro diametro 10x75 mm, deprogenate. Alcune marche di vetreria hanno proprietà inibenti per la reazione del LAL.
8. Parafilm (M) per ricoprire le vial quando non in uso.

- CONTROLLI

I controlli si rendono necessari per assicurare la validità del test.
Le metodiche da seguire sono dettagliate nei documenti della FDA (1) e USP (2).

1. Controlli di endotossina

- A. Serie di standard di endotossina.
Approntare una serie di diluizioni preparate al momento partendo dalla soluzione di endotossina base ogni giorno.
Le diluizioni dovranno portare ad una serie finale di diluizioni al raddoppio per includere la sensibilità (I) del Pyroquant.
Si raccomandano concentrazioni di 2λ, 1λ, 0,5λ e 0,25 λ per confermare la sensibilità del Pyroquant.
Utilizzare meno diluizioni possibili con gli appropriati volumi per massimizzare l'accuratezza.
- B. In talune circostanze si possono usare controlli positivi invece di una serie di concentrazioni standard. Fare riferimento alle Linee Guida della FDA (1) al Capitolo "Routine Testing of Drugs by the LAL Test". La concentrazione del controllo positivo dovrebbe essere di 2 λ.
- C. I controlli positivi del prodotto sono controlli di inibizione e consistono nel campione o diluizione del campione ai quali si aggiunge l' endotossina standard. La concentrazione finale dell' endotossina aggiunta al campione in esame dovrebbe essere di 2 λ.

2. Controlli negativi

Un controllo negativo di acqua apirogena sterile "Acila" dovrebbe essere incluso in ogni serie di campioni esaminati.
Durante la validazione del prodotto od il test di inibizione/attivazione (1,2), il campione utilizzato per diluire l' endotossina standard deve essere trattato come un controllo negativo.

- PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

In alternativa diluire i campioni alla richiesta concentrazione per eseguire un test con valore soglia ("pass/fail") oppure eseguire un test testando una serie di concentrazioni differenti (esempi dei due tipi di test sono riportati nel Capitolo "Risultati ed Interpretazione").
Le diluizioni devono essere eseguite in provetta deprogenata ed il volume trasferito nella provetta apirogena.
La diluizione analizzata per il test "pass/fail" è determinata dalla sensibilità del Pyroquant ed il limite di endotossina per il campione.
Fare riferimento a "Limitation of Procedure" od alle Linee Guida della FDA (1) per comprendere e calcolare la Minima Valida Concentrazione (MVC) e la Massima Valida Diluizione (MVD).

- ESECUZIONE DEL TEST

- Per ottenere risultati soddisfacenti è indispensabile applicare una metodologia accurata e ripetitiva.
1. Aggiungere 0,1 ml di Pyroquant ricostituito ad ogni provetta contenente 0,1 ml di campione o controllo mediante pipetta graduata con suddivisione da 0,1 ml o mediante micropipetta automatica. Approntare per primi i controlli negativi. Aggiungere le concentrazioni standard di endotossina ad ogni vial partendo dalla diluizione più bassa per arrivare a quella più alta in ogni serie. Agitare con vigore il supporto con le provette per 20-30 secondi per assicurare una buona omogeneità. In caso di poche provette, ogni provetta può esser agitata su Vortex per 1-2 secondi. Una agitazione inadeguata è la prima causa di risultati insoddisfacenti.
 2. Trasferire i tubi di reazione in bagnomaria a 37°C ± 1°C per 60 ± 2 minuti. La reazione inizia quando il campione è aggiunto al LAL ma non raggiunge le condizioni ideali sino a quando si raggiungono i 37°C. Se si esaminano in parallelo più campioni, il test deve essere eseguito per "batch" ed iniziato ad intervalli tali che permettano la lettura entro il tempo limite. Non disturbare le provette durante il periodo di incubazione. La reazione di formazione del gel è delicata e può irreversibilmente essere compromessa se provette sono toccate, agitate o fatte vibrare. Non utilizzare un bagnomaria con agitazione od altro sistema che sia una possibile fonte di vibrazione. Immergere le provette, ma non così in profondità che ci sia il rischio che galleggino o si muovano nel supporto.
 3. Prelevare le provette una alla volta dal supporto ed eseguire la interpretazione del risultato di ciascuna. Non asciugarle od urtarle contro la parete del supporto. Capovolgerle con un movimento delicato; non fermarsi in questo movimento a mezza via, a meno che si sia constatata la chiara mancanza di formazione del gel. Un test positivo è indicato dalla formazione di un gel che non collassa quando la provetta è capovolta.

□ Risultati ed interpretazione

Serie di Standard di Endotossina - Esempio

Confermare la sensibilità del Pyroquant e qualificare il laboratorio od il tecnico eseguendo il test del LAL su una serie standard a concentrazioni note di endotossina che includa la sensibilità riportata in etichetta (ad esempio 2/ 1/ 0,5/ 0,25 λ).
Nell' esempio qui di seguito riportato la sensibilità è 0,25 UE/ml:

CONCENTRAZIONE ENDOTOSSINA	RISULTATO DEL TEST
0,5 UE/ml (2 λ)	+
0,25 UE/ml (1 λ)	+
0,125 UE/ ml (0,5 λ)	-
0,06 UE/ml (0,25 λ)	-
Acqua "Acila" (Controllo Positivo)	-

L' "endpoint" di questo test è definito come l'ultimo valore di diluizione che ha dato un risultato positivo. La sensibilità riportata in etichetta del Pyroquant è confermata se l'"endpoint" è più o meno una diluizione al raddoppio.

Nell' esempio riportato, la concentrazione di endotossina nella provetta positiva della serie eseguita è 0,25 UE/ml e pertanto la sensibilità è confermata.

Il test sarebbe stato valido (sensibilità confermata) anche nel caso in cui l' "endpoint" fosse stato 0,125 UE/ml oppure 0,5 UE/ml (errore del metodo).

Per dimostrare un "endpoint" di 0,125 UE/ml, il livello 0,06 UE/ml deve essere presente in una serie ed essere negativo.

Quando il test per la determinazione delle endotossine viene ripetuto più volte sullo stesso campione , la sensibilità è espressa come media geometrica (GM) delle sensibilità individuali:

$$GM = \text{antilogaritmo} \frac{(\sum \epsilon)}{f}$$

dove:

$\sum \epsilon$ = somma dei logaritmi "endpoint"

f = numero di "endpoint" ripetuti.

L' acqua per LAL come controllo negativo deve dare un risultato negativo.

Se il controllo negativo gelifica, l'acqua o la vetreria od il Pyroquant sono contaminati.

Il prodotto gelificato dovrebbe essere trasparente, senza aumento di viscosità.

La formazione di "fiocchi tipo neve" od una precipitazione a flocculi indica una concentrazione di endotossina inferiore alla sensibilità del Pyroquant.

In assenza della serie di diluizioni di endotossina, si può includere nei test un controllo positivo. Il controllo positivo, nell' esempio riportato, a 2λ e' 0,5 UE/ml.

Se il controllo positivo è negativo, la sensibilità del Pyroquant è inferiore di una diluizione al raddoppio alla sensibilità riportata in etichetta ed il test non è valido.

Perdita di sensibilità può significare deterioramento del Pyroquant, caduta di attività della endotossina (a seguito di adsorbimento alle pareti del contenitore), oppure l' esecuzione del test è avvenuta in modo non corretto.

Esempio di test a valore soglia ("pass/fail")

E' possibile analizzare la concentrazione di Endotossina presenti in un campione con una determinata sensibilità di Pyroquant ed ottenere un risultato che indichi se il campione ha un contenuto di endotossina inferiore o superiore al limite prefissato.

Nell'esempio qui riportato, la concentrazione del campione è di 1 mg/ml ed il limite desiderato o predeterminato di endotossina è di 3 UE/mg (vedi "Limitazioni del metodo").

Il limite espresso in UE/ml,

$$(3EU/mg) (1mg/ml) = 3EU/ml$$

è maggiore della sensibilità del Pyroquant, (0,25 UE/ml), e pertanto il campione deve essere diluito per poter eseguire un test "pass/fail".

Per determinare la diluizione del campione in esame che indichi un "pass" , < 3 UE/ml, od un "fail", >= 3 UE/ ml si deve dividere il limite di endotossina espresso in UE/ml per la sensibilità del LAL:

$$\frac{3 \text{ UE/ml}}{0,25 \text{ UE/ml}} = 12$$

Approntare la diluizione 1:12 aggiungendo 11 parti di acqua "Acila" ad una parte di campione ed eseguire il test.

Il risultato indicherà se il campione passa la prova ad un limite di 3 UE/ml.

I controlli positivi del prodotto si includono nel test agli stessi valori di diluizione per accertare la presenza di falsi risultati negativi.

Esempio di test quantitativo

L' endotossina si quantifica ricercando l' "endpoint" in una serie di diluizioni del campione. Nell' esempio sotto riportato, il campione è diluito con acqua apirogena "Acila" e le diluizioni sono testate; λ e' 0,25 UE/ml. I risultati sono classificati come positivi o negativi.

DILUIZIONE DEL CAMPIONE	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, moltiplicare la sensibilità (λ) del Pyroquant per il reciproco della diluizione all' "endpoint":

$$\text{Conc} = \lambda \left(\frac{4}{1} \right) = 0,25 \text{ UE/ml (4)} = 1 \text{ UE/ml}$$

La concentrazione di test ripetuti è espressa come media geometrica.

Un controllo positivo del prodotto (campione addizionato di 2 λ di endotossina standard) deve essere presente e dare positività per evidenziare eventuali risultati falsi negativi. Se il controllo di prodotto positivo è negativo ed il controllo positivo è positivo, il campione interferisce: inibisce la reazione del LAL. Il campione deve essere riesaminato ad un valore di diluizione più elevato (senza superare il MVD, vedi Capitolo "Limiti del test").

□ Limiti del test

Il metodo può avere limitazioni a seguito della capacità del campione di inibire od attivare il LAL test. Se il procedimento non può essere validato (1,2) ad una concentrazione del campione che è superiore alla Minima Valida Concentrazione (MVC) il test del LAL non può sostituire il test dei pirogeni in conformità alla USP.

La MVC si calcola nel modo seguente:

(λ) dose campione

limite di tolleranza endotossinica

dove:

λ è espressa in UE/ml

la dose del campione è espressa in unità/peso in kg del corpo

il limite di tolleranza dell' endotossina e' espresso in UE/kg

La Massima Diluizione Valida (MVD) è la diluizione del campione in esame contenente il MVC.

E' la concentrazione iniziale del campione divisa per la MVC.

Il limite di tolleranza endotossinica è 0,2 UE/kg per i medicinali a somministrazione per via intratecale e 5 UE/kg per tutti gli altri prodotti parenterali.

Il limite per i presidi medico-chirurgici è espresso per ml su estrazione o volume di risciacquo ottenuti come descritto nelle linee guida della FDA (1).

Per sistemi che vengono a contatto con fluidi cerebrospinali, il limite è 0,06 UE/ml; per quelli che non lo sono è di 0,5 UE/ml.

Il limite per i presidi liquidi è lo stesso di quello dei medicinali.

La tripsina causa risultati falsi positivi a meno che non sia denaturata con trattamento al calore prima del test.

Prodotti quali sangue, siero, plasma devono essere trattati prima della esecuzione del test per inattivare gli inibitori (12).

□ Previsione di risultati

La endotossina può essere quantificata se la concentrazione è superiore od uguale alla sensibilità del Pyroquant.

Materiali derivati da fonti biologiche, anche dopo purificazione biochimica, possono contenere livelli misurabili di endotossina.

L' acqua ottenuta per distillazione, osmosi inversa, ultrafiltrazione può contenere livelli di endotossina inferiori al rilevabile se il processo produttivo di purificazione è eseguito correttamente e se l' acqua non è contaminata dopo la produzione.

□ Caratteristiche specifiche

L' errore del metodo LAL di gelificazione è più o meno una diluizione al raddoppio rispetto all' "endpoint" del test.

□ Bibliografia

- 1.Guideline on 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. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, p. 1696 (85) United States Pharmacopeia, 23rd Revision 1995. U.S. Pharmacopeial Convention, INC- Rockville, MD.
- 3.Howell, W.H. 1885. Observation upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cueumaria* sp. Johns Hopkins University Circular 43: 4-5.
- 4.Bang, F.B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol.Bull. (Woods Hole,M.A.) 105:361-362
- 5.Levin,J. and F.B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. JohnsHopkins Hosp. 115:337-345.
- 6.Levin, J. and F.B. Ban. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115: 265-274.
- 7.Levin, J. and F.B.Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186197.
8. Novitsky, T.J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
- 9.Progress in Clinical and Biological Research Vol.231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte LysateTest. 1987. Watson, S.W., J.Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R.Liss, Inc., N.Y.
- 10.Tsuji, K. and S.J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.
11. Sweet, B.H. and J.F. Huxsoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101 - 108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia. P.A.
12. 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, NW.