

ARTIKEL *REVIEW* : PERBANDINGAN METODE PENGUJIAN ENDOTOKSIN UNTUK SEDIAAN FARMASI

Nur Diana Hadad, Ade Zuhrotun

Program Studi Profesi Apoteker, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

nur16027@mail.unpad.ac.id

diserahkan 29/07/2021, diterima 24/11/2021

ABSTRAK

Endotoksin adalah molekul hidrofobik kecil yang merupakan bagian dari kompleks lipopolisakarida (LPS) yang membentuk sebagian besar membran luar bakteri gram negatif. Ketika molekul LPS bersirkulasi dalam tubuh manusia, berbagai sitokin inflamasi yang diekspresikan secara berlebihan oleh aktivasi sistem imun bawaan dan menyebabkan inflamasi sistemik. Artikel ini mengulas mengenai perbandingan metode pengujian endotoksin yang banyak digunakan untuk sediaan farmasi. Metode yang digunakan pada artikel *review* ini adalah melalui pencarian data ilmiah yang dilakukan secara *online* pada database *PubMed*, *Science Direct*, *Research Gate* dan *Google Scholar* dengan kata kunci yakni “*Bacterial Endotoxin Test*”, “*Endotoxin*”, “*Gel-clot*”, “*Turbidimetric*” dan “*Chromogenic*”. Berdasarkan hasil penelusuran dan pengumpulan data tersebut diketahui bahwa metode pengujian endotoksin yang banyak digunakan yaitu *gel-clot*, *Turbidimetri*, dan *kromogenik*, setiap metode tersebut memiliki kekurangan dan kelebihan masing-masing.

Kata Kunci : Endotoksin, *gel-clot*, kromogenik, pengujian endotoksin, *turbidimetri*

ABSTRACT

Endotoxins are small hydrophobic molecules that are part of the lipopolysaccharide (LPS) complex that makes up most of the outer membrane of Gram-negative bacteria. When LPS molecules circulate in the human body, various inflammatory cytokines are overexpressed by the activation of the innate immune system and cause systemic inflammation. This review article compares endotoxin assay that are widely used for pharmaceutical preparations. The method used in this review article is through an online search for scientific data in the PubMed, Science Direct, ResearchGate and Google Scholar databases with the keywords "Bacterial Endotoxin Test", "Endotoxin", "Gel-clot", "Turbidimetric" and "Chromogenic". From the results of the search and data collection, it is known that the most widely used endotoxin testing methods are gel-clot, turbidimetric, and chromogenic, each method has its own advantages and disadvantages.

Keywords : Endotoxin, gel-clot, chromogenic, endotoxin assay, turbidimetry

PENDAHULUAN

Endotoksin adalah molekul hidrofobik kecil yang merupakan bagian dari kompleks lipopolisakarida yang membentuk sebagian besar membran luar bakteri gram negatif, molekul ini akan dilepaskan ketika bakteri mati dan membran luarnya hancur. (Ørving *et al.*, 2020) (Dullah & Ongkudon, 2017).

Secara struktural, endotoksin dapat dibagi menjadi tiga bagian: lipid A, wilayah inti, dan rantai-O. Lipid A adalah glikofosfolipid yang menyimpan daerah hidrofobik karena residu asam lemak, tetapi juga daerah ionik melalui gugus fosfat dalam residu gula (Ørving *et al.*, 2020). Wilayah inti terdiri dari berbagai residu gula dan bermuatan sangat negatif karena berbagai gugus karboksil dan fosfat, yang selanjutnya meningkatkan ikatan antara molekul endotoksin melalui jembatan garam. Rantai-O terdiri dari unit oligosakarida berulang yang berbeda dan merupakan wilayah endotoksin yang paling luar (Ørving *et al.*, 2020).

Endotoksin dapat membentuk interaksi yang stabil dengan biomolekul lain sehingga sulit dikeluarkan terutama selama produksi obat biofarmasi (Dullah & Ongkudon, 2017). Beberapa biomolekul yang dilaporkan telah terbukti berinteraksi dengan endotoksin adalah: *lipopolysaccharide binding protein* (LBP), *bactericidal/permeability-increasing protein* (BPI), komponen P amiloid, protein kationik, lisozim dan laktoferin (Dullah & Ongkudon, 2017) (Balakrishnan *et al.*, 2013).

Selain itu, endotoksin tidak dihilangkan saat organisme dimatikan melalui proses sterilisasi. Sebaliknya, pelepasan LPS terjadi setelah sel-sel mati. Meskipun produk mungkin telah disterilkan, endotoksin organisme masih tetap ada jika organisme gram negatif telah ada sebelum sterilisasi (Ongkudon *et al.*, 2012).

Pengujian LPS ini pada produk jadi merupakan bagian penting untuk memastikan keamanan produk yang disterilkan terutama di bidang produk biologi, alat kesehatan, obat parenteral, ketahanan pangan dan air, dan sebagainya (Dullah & Ongkudon, 2017) (Ding *et al.*, 2015).

Ketika molekul LPS bersirkulasi dalam tubuh manusia melalui hati, berbagai sitokin inflamasi, seperti *tumor necrosis factor*, interleukin-6, *platelet activating factor*, dan sebagainya, diekspresikan secara berlebihan oleh aktivasi sistem imun bawaan dan menyebabkan inflamasi sistemik (Ding *et al.*, 2015) (Dinakaran, 2017), respon sindrom, yang telah dilaporkan sebagai penyebab kematian terkait dengan sindrom pernafasan akut yang parah, kanker, luka bakar di area luas, dan peritonitis akut (Mastrangelo *et al.*, 2013) (Stewart *et al.*, 2014). Tingkat kematian yang tinggi terkait dengan syok yang diinduksi endotoksin tetap menjadi masalah klinis utama, terutama pada pasien dengan imunosupresi (Ding *et al.*, 2015).

Tujuan dari penulisan artikel *review* ini adalah untuk membandingkan metode pengujian endotoksin yang banyak digunakan yaitu *gel-clot*, turbidimetri, dan kromogenik sebagai bahan kajian yang dapat digunakan untuk pertimbangan penggunaan metode uji endotoksin yang lebih efektif dan efisien.

METODE

Strategi Pencarian Data

Metode yang digunakan pada artikel *review* ini adalah melalui pencarian data ilmiah yang dilakukan secara *online* pada database *PubMed*, *Science Direct*, *Research Gate* dan *Google Scholar* dengan kata kunci yakni "*Bacterial Endotoxin Test*", "*Endotoxin*", "*Gel-clot*", "*Turbidimetric*" dan "*Chromogenic*" serta dilakukan pencarian data dari kompendial yaitu Farmakope Indonesia

Edisi VI (FI VI). Referensi data yang diperoleh kemudian ditetapkan dengan kriteria eksklusi dan inklusi.

Kriteria Eksklusi dan Inklusi

Penetapan kriteria inklusi yaitu data berupa jurnal internasional dan kompendial yang secara spesifik membahas metode pengujian endotoksin pada bakteri dari tahun 2011 hingga tahun 2021. Sedangkan kriteria eksklusinya yaitu data yang diperoleh dari *website* tidak valid atau tanpa nama penulis serta sumber yang dipublikasikan sebelum tahun 2011.

Studi yang digunakan

Melalui pencarian data ini didapatkan total 87 referensi termasuk kriteria eksklusi dan 11 referensi diantaranya secara spesifik membahas metode pengujian endotoksin yang termasuk dalam kriteria inklusi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan Farmakope Indonesia Edisi VI dijelaskan bahwa metode uji endotoksin yang digunakan di Industri Farmasi Indonesia untuk obat-obatan yang memerlukan proses sterilisasi saat ini adalah metode LAL dengan dua tipe teknik uji, yaitu teknik pembentukan jendal gel (*gel-clot*) dan teknik fotometrik. Teknik fotometrik ini mencakup metode turbidimetri, yang berdasarkan adanya kekeruhan setelah pengujian dan metode

kromogenik yang berdasarkan munculnya warna. Di antara dua teknik tersebut, dapat dipilih salah satu untuk pengujian endotoksin. Apabila hasil yang didapat kurang sesuai, dapat menggunakan teknik *gel-clot* untuk menentukan hasil akhir. Berdasarkan **Tabel 1.** dapat diketahui hasil perbandingan metode pengujian secara prinsip, kekurangan dan kelebihan dari masing-masing metode tersebut.

Pengujian endotoksin dilakukan untuk menghindari resiko reaksi demam pada pasien setelah pemberian sediaan injeksi. Beberapa produk farmasi seperti infus dan obat suntik yang diberikan secara langsung ke sistem sirkulasi pembuluh darah pasien dalam jumlah besar harus steril serta terbebas dari kontaminasi endotoksin dalam batasan tertentu (WHO, 2012).

Berdasarkan Farmakope Indonesia Edisi VI tahun 2020 terdapat beberapa jenis obat yang diatur kandungan batas maksimum endotoksin bakteri dalam obat terutama obat untuk injeksi, beberapa contoh obat atau injeksi tersebut adalah air steril untuk injeksi (*Sterile Water for Injections*) dengan batas endotoksin bakteri $\leq 0,25$ UE.mL⁻¹ F1, amoksisilin (batas kandungan endotoksin $\leq 0,25$ UE.mg⁻¹ amoksisilin), injeksi ampisilin (batas kandungan endotoksin $\leq 0,15$ UE.mg⁻¹ ampisilin), injeksi dekstrosa (batas kandungan endotoksin $\leq 0,5$ UE.mL⁻¹).

Uji *gel-clot* adalah tes kualitatif yang paling sederhana dan paling banyak digunakan.

Tabel 1. Perbandingan metode pengujian endotoksin

Metode	Prinsip	Kelebihan	Kekurangan	Referensi
Gel-clot	Pembentukan gel	Sederhana dan hasil yang akurat	Proses preparasi lebih lama	(Hashmi & Thakur, 2019) (Chen, 2014)
Turbidimetri	Perubahan Kekeruhan	Sistem otomatis dan mudah dilakukan	Sensitif terhadap kekeruhan sehingga bisa menghasilkan hasil yang positif palsu	(Mercier <i>et al.</i> , 2020) (WHO, 2012)
Kromogenik	Perubahan warna	Sistem otomatis dan mudah dilakukan	Banyak senyawa dapat berinteraksi dengan metode ini	(WHO, 2012) (Franco <i>et al.</i> , 2018) (Elsayeh & Kandil, 2015)

Ini menghasilkan hasil biner, baik dalam bentuk positif maupun negatif. Setelah inkubasi yang tepat pada suhu 37°C, jika gel tahan terhadap inversi 180°, itu dinilai positif jika tidak dinilai negatif untuk endotoksin (Maloney *et al.*, 2018) (Tinker-Kulberg *et al.*, 2020). Pada metode turbidimetri, konsentrasi koagulin tak larut meningkat yang mengakibatkan peningkatan kekeruhan. Laju peningkatan kekeruhan berhubungan dengan peningkatan konsentrasi endotoksin (Das *et al.*, 2014) (Wong *et al.*, 2016). Pada metode kromogenik substrat kromogenik digunakan untuk menghasilkan warna dan intensitas warna ini diambil sebagai parameter terhadap konsentrasi endotoksin dalam sampel uji (WHO, 2012). Substrat kromogenik sintetik ini diliofilisasi bersama dengan reagen *Limulus amoebocyte lysate* (LAL). Substrat ini memiliki urutan asam amino yang homolog dengan salah satu titik pembelahan substrat alami yaitu koagulogen. Substrat utuh tidak berwarna, sedangkan pNA bebas berwarna kuning dengan puncak serapan pada 405 nm (Das, Kumar and Swain, 2014) (Wong *et al.*, 2016).

Metode gel-clot

Meskipun seluruh reaksi belum dapat ditentukan, dapat dipahami bahwa reaksi yang mengarah ke pembentukan gel melibatkan serangkaian langkah aktivasi enzim (Hashmi and Thakur, 2019). Larutan reaksi dicampur secara menyeluruh dan segera ditempatkan dalam inkubator atau penangas air non-sirkulasi pada 37°C ± 1°C selama 60 ± 2 menit (WHO, 2012) (Maloney, Phelan and Simmons, 2018). Pada akhir masa inkubasi, tabung dikeluarkan dari inkubator dan dibalik. Jika gel telah terbentuk dan tetap utuh di dasar tabung reaksi setelah pembalikan 180 derajat, tesnya positif. Tes positif menunjukkan bahwa konsentrasi endotoksin dalam tabung lebih

besar dari atau sama dengan sensitivitas Pyrotell (reagen lisat) (Dobrovolskaia, 2011). Keadaan lain dari campuran reaksi merupakan tes negatif, yang menunjukkan konsentrasi endotoksin kurang dari sensitivitas Pyrotell. Tes dianggap negatif jika gel telah terbentuk tetapi pecah atau runtuh saat dibalik. (Tinker-Kulberg *et al.*, 2020) (Dobrovolskaia, 2011).

Gel tersebut terbentuk akibat adanya inisiasi kaskade protease oleh kombinasi LPS dan *zymogen* Faktor C. Faktor C yang diaktifkan menstimulasi Faktor B, yang mengubah enzim *proclotting* menjadi enzim *clotting*. Akhirnya, dua ikatan peptida dalam koagulogen dibelah secara katalitik untuk membentuk gel (Ding *et al.*, 2015).

Metode *gel-clot* sering dianggap sebagai prosedur yang paling akurat dan sensitif untuk menguji kandungan endotoksin dalam produk injeksi farmasi karena lebih sedikit hasil positif palsu dan negatif palsu yang diamati saat metode tersebut digunakan (Maloney, Phelan and Simmons, 2018). Meskipun metode *gel-clot* sejauh ini merupakan tes yang paling akurat, namun juga paling memakan waktu untuk melakukannya, tidak ada sistem otomatis yang menggunakan metode *gel-clot* (Hashmi and Thakur, 2019). Faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil dari metode *gel-clot* termasuk penghambat kimiawi (misalnya, ethylenediaminetetra acetic acid [EDTA]) yang menyebabkan khelat dari kation divalen yang diperlukan untuk reaksi LAL (Elnaggar and Habib, 2017) denaturasi protein dari agen seperti fluorescein, gangguan pH (nilai pH tidak dalam kisaran 6.0 hingga 7.5), dan penghambat fisik yang dapat menyerap endotoksin atau menghasilkan viskositas (WHO, 2012) (Elnaggar and Habib, 2017).

Metode Turbidimetri

Pada langkah terakhir metode Turbidimetri melibatkan pembelahan protein pembekuan oleh enzim pembekuan yang diaktifkan. Produk pembelahan menyatu sebagai akibat interaksi ionik yang terjadi setelah pembelahan dan menyebabkan campuran reaksi menjadi keruh, kekeruhan diukur menggunakan 96-well plate reader pada panjang gelombang 340 nm (Obeng *et al.*, 2017).

Metode turbidimetri dapat digunakan untuk menentukan kandungan endotoksin sampel dengan dua cara. Keduanya membutuhkan penggunaan kurva standar tetapi berbeda pada titik akhir untuk pengukuran. Konsentrasi endotoksin dapat ditentukan dengan menggunakan pengukuran densitas optik untuk membandingkan sampel dengan standar otentik untuk mengukur laju peningkatan kekeruhan (Wong *et al.*, 2016), durasi waktu hingga tingkat kekeruhan yang diinginkan tercapai, atau tingkat kekeruhan setelah periode inkubasi yang ditentukan (Das, Kumar and Swain, 2014). Seperti metode kromogenik, metode turbidimetri dapat diubah dengan menguji darah, serum, albumin, plasma, dan bahan serupa. Metode turbidimetri sensitif terhadap bahan tersuspensi atau keruh dan dapat menghasilkan positif palsu jika sampel tidak disiapkan dengan benar. Tripsin adalah contoh lain dari sampel yang, ketika diuji, dapat menyebabkan hasil positif palsu kecuali sampel didenaturasi dengan benar (WHO, 2012) (Sharma *et al.*, 2011).

Metode Kromogenik

Dengan adanya endotoksin, komponen LAL diaktifkan dalam kaskade proteolitik yang menghasilkan pembelahan substrat peptida buatan tak berwarna yang ada di *Pyrochrome* LAL (Zhijian. *et al.*, 2017). Pembelahan proteolitik dari substrat membebaskan p-nitroanilin (pNA), yang

berwarna kuning dan memiliki absorbansi 405 nm (Zhijian. *et al.*, 2017) (Ferreira *et al.*, 2019). Pengujian dilakukan dengan menambahkan volume *Pyrochrome* ke volume spesimen dan menginkubasi campuran reaksi tersebut pada suhu 37°C (WHO, 2012). Ketika metode kromogenik digunakan, tersedia dua metode untuk mengukur konsentrasi endotoksin dalam sampel. Metode kinetik bergantung pada jumlah waktu yang dibutuhkan sampel untuk mencapai absorbansi tertentu (405 nm) (Z. *et al.*, 2017). Waktu onset ditentukan oleh konsentrasi endotoksin dalam sampel. Misalnya, interval reaksi yang lebih pendek menunjukkan konsentrasi endotoksin yang lebih tinggi dalam sampel. Dalam metode kromogenik titik akhir, pengukuran pNA setelah periode inkubasi yang ditetapkan digunakan untuk menentukan konsentrasi endotoksin (Martinho *et al.*, 2011). Baik metode kinetik dan metode kromogenik titik akhir memerlukan kurva standar untuk menentukan jumlah endotoksin yang ada dalam sampel (WHO, 2012) (Martinho *et al.*, 2011).

Ada banyak keuntungan menggunakan metode kromogenik. Sistem yang digunakan dapat mengurangi jumlah waktu yang diperlukan untuk melakukan pengujian (dan karenanya meningkatkan jumlah pengujian yang dapat dilakukan) sehingga lebih efektif (Elsayeh and Kandil, 2015). Ketika banyak tes endotoksin yang harus dilakukan, metode kromogenik dapat menjadi solusi terbaik. Metode ini mudah dilakukan dan hasilnya bisa dihitung dengan mudah (WHO, 2012). Namun perlu diperhatikan ketika zat yang mengubah sifat protein, ion khelat, mengikat endotoksin, atau mengubah keadaan hidrofobik endotoksin diuji, zat tersebut dapat mengganggu pengujian. Beberapa protease serin (misalnya tripsin, faktor darah yang diaktivasi) menyebabkan hasil yang positif palsu kecuali

mereka telah diubah sifatnya oleh panas sebelum pengujian. Serum hewan, albumin, plasma, dan zat lain dapat mengganggu uji kromogenik berbasis pNA karena warnanya yang kuning. Kekeruhan yang berlebihan dalam sampel juga dapat mengganggu pengujian, kecuali jika kekeruhan dapat dikurangi (Ongkudon *et al.*, 2012).

SIMPULAN

Terdapat tiga metode pengujian endotoksin bakteri yang umum dan banyak digunakan yaitu metode *gel-clot*, Turbidimetri, dan kromogenik. Meskipun setiap metode memiliki kelebihan dan kekurangan, semuanya dapat digunakan untuk menentukan keberadaan endotoksin secara akurat dan efektif dalam berbagai produk. Banyak ilmuwan percaya bahwa metode penggumpalan gel adalah metode paling akurat untuk menentukan kandungan endotoksin. Ketika metode *gel-clot* digunakan, interaksi yang dapat menghambat reaksi lebih sedikit, tetapi proses preparasi yang lama dapat menunda hasil. Metode turbidimetri dapat dilakukan dengan sistem otomatis. Cara ini juga mudah dilakukan, tetapi banyak orang merasa bahwa hasil positif palsu sering kali muncul saat metode tersebut digunakan. Metode kromogenik sangat mudah digunakan dan dapat dilakukan dengan sistem otomatis, tetapi banyak senyawa yang dapat berinteraksi ketika metode tersebut digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

Balakrishnan, A., Marathe, S. A., Joglekar, M., & Chakravorty, D. (2013). Bactericidal/permeability increasing protein: A multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization. *Innate Immunity*, 19(4), 339–347. <https://doi.org/10.1177/1753425912465098>

Chen, D. (2014). A new method for the analysis of bacterial endotoxins in ultrapure

paraffin oil. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/575246>

Das, A. P., Kumar, P. S., & Swain, S. (2014). Recent advances in biosensor based endotoxin detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 51, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.07.020>

Dinakaran, V. (2017). Microbial Translocation in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases: A Microbiome Perspective. *Journal of Cardiology & Current Research*, 8(6). <https://doi.org/10.15406/jccr.2017.08.00305>

Ding, X., Su, W., & Ding, X. (2015). Methods of Endotoxin Detection. *Journal of Laboratory Automation*, 20(4), 354–364. <https://doi.org/10.1177/2211068215572136>

Dullah, E. C., & Ongkudon, C. M. (2017). Current trends in endotoxin detection and analysis of endotoxin–protein interactions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 251–261. <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1141393>

Elsayeh, M., & Kandil, A. H. (2015). Ultra wide band based quantitative and qualitative method for bacterial endotoxin detection. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 49(1), 11–20. <https://doi.org/10.1080/08327823.2015.11689892>

Kementrian Kesehatan RI. 2020. Farmakope Indonesia Edisi VI. Jakarta : Kemenkes RI.

Franco, E., Garcia-Recio, V., Jiménez, P., Garrosa, M., Gírbés, T., Cordoba-Diaz, M., & Cordoba-Diaz, D. (2018). Endotoxins from a pharmacopoeial point of view. *Toxins*, 10(8), 1–9. <https://doi.org/10.3390/toxins10080331>

Hashmi, F., & Thakur, A. (2019). Bacterial

- Endotoxin Test by Gel-Clot Method. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, Volume-3(Issue-3), 564–567. <https://doi.org/10.31142/ijtsrd22945>
- Maloney, T., Phelan, R., & Simmons, N. (2018). Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection. *PLoS Biology*, 16(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006607>
- Mastrangelo, G., Fadda, E., & Cegolon, L. (2013). Endotoxin and cancer chemo-prevention. *Cancer Epidemiology*, 37(5), 528–533. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2013.04.008>
- Mercier, T., Guldentops, E., Lagrou, K., & Maertens, J. (2020). Prospective Evaluation of the Turbidimetric β -D-Glucan Assay and 2 Lateral Flow Assays on Serum in Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 1–21. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa295>
- Ongkudon, C. M., Chew, J. H., Liu, B., & Danquah, M. K. (2012). Chromatographic Removal of Endotoxins: A Bioprocess Engineer's Perspective. *ISRN Chromatography*, 2012(April 2014), 1–9. <https://doi.org/10.5402/2012/649746>
- Ørving, R. B., Carpenter, B., Roth, S., Reich, J., Kallipolitis, B. H., & Hansen, J. S. (2020). Bacterial endotoxin testing—fast endotoxin masking kinetics in the presence of lauryldimethylamine oxide. *Microorganisms*, 8(11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111728>
- Sharma, S., Mittal, B. R., Vatsa, R., and Singh, B. 2011. Gel Clot Bacterial Endotoxin Test of FDG : Indian Scenario. *Indian J Nucl Med*, 26(3), 149-152. <https://doi.org/10.4103/0872-3919.103998>.
- Stewart, R. K., Dangi, A., Huang, C., Murase, N., Kimura, S., Stolz, D. B., Wilson, G. C., Lentsch, A. B., & Gandhi, C. R. (2014). A novel mouse model of depletion of stellate cells clarifies their role in ischemia/reperfusion- and endotoxin-induced acute liver injury. *Journal of Hepatology*, 60(2), 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.09.013>
- Tinker-Kulberg, R., Dellinger, K., Brady, T. E., Robertson, L., Levy, J. H., Abood, S. K., LaDuca, F. M., Kepley, C. L., & Dellinger, A. L. (2020). Horseshoe Crab Aquaculture as a Sustainable Endotoxin Testing Source. *Frontiers in Marine Science*, 7(April). <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00153>
- Wong, J., Davies, N., Jeraj, H., Vilar, E., Viljoen, A., & Farrington, K. (2016). A comparative study of blood endotoxin detection in haemodialysis patients. *Journal of Inflammation (United Kingdom)*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12950-016-0132-5>
- World Health Organization. (2012). Test for sterility (Final text for revision of The International Pharmacopoeia). World Health Organization, March, 1–2.