



DER LIMULUSTEST : EIN IN-VITRO-PYROGENNACHWEIS

Claudio Pericin

CIBA-GEIGY A.G.
Pharma Toxikologie
CH-4058 Basel

ZUSAMMENFASSUNG

In den 60er Jahren dieses Jahrhunderts gelang die Entwicklung eines in-vitro-Nachweistests auf bakterielle Endotoxine, der auf deren Reaktion mit den Amöbocyten im Blut des *Limulus polyphemus* beruht.

Da die Endotoxine auch als pyrogene Substanzen bekannt sind, wurde unter anderem angestrebt, den bisher gebräuchlichen Pyrogentest am Kaninchen durch den Limulustest zu ersetzen. Standardisierungs- und Validierungsvorschriften der FDA (Food and Drug Administration) und die Aufnahme des Limulustests als "Bacterial Endotoxins Test" in die USP XX (United States Pharmacopeia) haben den Erfolg dieser Bestrebungen bestätigt. In der Schweiz steht diese offizielle Anerkennung des Limulustests als Alternative bisher noch aus. Einige Untersuchungsergebnisse sollen neben der überzeugenden Nachweisfunktion einen ebenso aktuellen wie begrüßenswerten Aspekt stützen: Den Ersatz von Standarduntersuchungen in vivo durch gleichermassen aussagekräftige in-vitro-Methoden.

PYROGENE

Mit der Einführung der Injektionsspritze im Jahre 1855 eröffnete sich die Möglichkeit, körperfremdes Material und damit auch Medikamente parenteral zu verabreichen. Jedoch traten besonders nach intravenösen Injektionen Fieber und andere toxische Symptome bis zu Schockwirkungen und Tod auf (1).

Im Jahre 1876 gelang Sir John Burdon Sanderson die Extraktion einer fiebererzeugenden Substanz aus faulendem Fleisch, die er nach der griechischen Bezeichnung für feuer- bzw. fiebererzeugenden Stoff "Pyrogen" nannte (2).



Wesentlich für die ersten Erkenntnisse über das durch Injektionen hervorgerufene Fieber waren die Untersuchungen von Hort und Penfold. Die Forscher prüften die Fähigkeit von Bakterien, Fieber zu erzeugen, und fanden eine Methode, Pyrogene am Kaninchen nachzuweisen.

Es gelang ihnen, Mikroorganismen, vorwiegend die gram - negativen, als fiebererzeugend zu differenzieren. Sie sahen auch, dass abgetötete Bakterien ebenso fähig sind, Fieber zu erzeugen, wie lebende Kulturen. Weiterhin bemerkten sie, dass die Toxizität von destilliertem Wasser in einem direkten Verhältnis zur Anzahl der darin vorhandenen Bakterien steht, und folgerten daraus, dass eine dialysierbare, hitzestabile Substanz, möglicherweise bakteriellen Ursprungs, für das Fieber nach den Injektionen verantwortlich ist.

Als Pyrogene stehen Endotoxine von gram-negativen Bakterien im Vordergrund, aber auch in gram-positiven Cyanobakterien wurde Endotoxin gefunden.

Neue Untersuchungen haben ergeben, dass Endo- wie auch Exotoxine als Folge autolytischer Desintegration der Bakterienzellen an die Umgebung abgegeben werden.

Chemisch sind Endotoxine Lipopolysaccharide, die aus einem Polysaccharid- und einem Lipidteil, dem sogenannten Lipid A, zusammengesetzt sind. Das Lipid A stellt den biologisch aktiven Teil des Endotoxinmoleküls dar. Diese Stoffe sind an die Zellwand gebunden. Sie werden nur frei bei Autolyse der Bakterien, Zerstörung der Bakterien oder Lyse nach Injektion lebender Keime in ein lebendes Gewebe. Derartige Bakterienendotoxine stellen die häufigste Kontaminationsquelle pharmazeutischer Produkte dar. Aber auch Pyrogene die nicht zu den Endotoxinen zählen, dürfen nicht vergessen werden. Dazu gehören z.B. Antigen-Antikörperkomplexe, Alkaloide, Steroide, Redoxfarbstoffe, kolloidale Metalle, Weichmacher, die sich aus Kunststoffbehältern herauslösen, sowie endogene Pyrogene, die von Zellen freigesetzt werden. Alle diese genannten Pyrogene lassen sich nur mit dem Kaninchentest nachweisen.



PRÜFUNG VON PYROGENEN

Die Anforderungen an derartige Prüfungen zur Sicherstellung der Pyrogenfreiheit, um damit gesundheitliche Schäden von Patienten fernzuhalten, sind in den Pharmakopöen zum Teil in allgemeinen Kapiteln, zum Teil in Monographien festgehalten. Als offizielle Prüfmethode gilt, mit Ausnahme in den USA, zur Zeit noch der Pyrogentest am Kaninchen.

Auf Pyrogene werden geprüft:

- Injektionspräparate und Pulver für Injektionszwecke, wenn das Etikett die Bezeichnung "pyrogenfrei" trägt bzw. die Einzeldosis 15 ml und mehr beträgt,
- Infusionspräparate,
- Radiopharmazeutika, die auf Grund ihrer Zusammensetzung und Herstellungsweise das Auftreten von Pyrogenen in besonderer Masse befürchten lassen,
- "Medical Devices" (z.B. Hämodialysatoren), Hämodialyse Lösungen und Wasser zum Verdünnen derselben, wenn sie als "pyrogenfrei" gekennzeichnet sind.

Dabei wird die Erhöhung der Körpertemperatur am Kaninchen gemessen, die durch einen Pyrogengehalt im Testpräparat entsteht. Hauptargument für die Beibehaltung des Kaninchen-Tests ist die Möglichkeit, alle Pyrogene zu erfassen .

DER LIMULUSTEST

a) Vorgeschichte und Prinzip

In den letzten Jahren wurden die Diskussionen um die Bedeutung des Kaninchentests vor allem durch den Limulustest (Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test, kurz LAL-Test genannt) belebt. 1956 beobachtete Bang, dass bei Krabben der Art *Limulus polyphemus* eine Infektion mit gramnegativen Bakterien bzw. deren Endotoxinen eine tödlich verlaufende, intravaskuläre Gerinnung verursacht (3). Es handelt sich beim *Limulus poly-*

phemus um eine Seekrabbenart, die zum Unterstamm Chelicerata der Arthropoda gehört, welche in den Küstengewässern von Maine an der kanadischen Grenze bis zur mittelamerikanischen Halbinsel Yucatan vorkommen.

Diese Krabse lebten schon in den Meeren des Mesozoikum. Fossilien dieser Tiere sind in Deutschland gefunden worden (Abb.1).

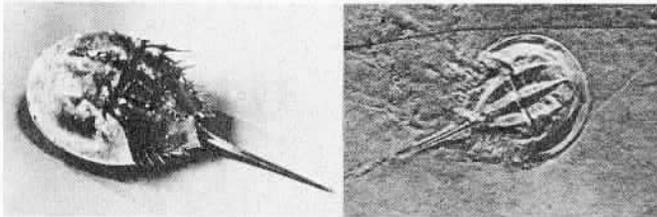


Abb.1 Rechts Fossil eines Pfeilschwanzkrebsees (vergrössert), ca. 145 Millionen Jahre alt (Solnhofer Aktien-Verein-Museum) Links, der *Limulus polyphemus* (Länge bis 60 cm)

So ist anzunehmen, dass die Krabse vom Meer, das damals Europa bedeckte, nach Asien und Amerika gewandert sind. Heute leben nur 4 Species von Limuliden neben dem *Limulus polyphemus* in Amerika: der *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas* und der *Carcinoscorpius rotundicauda* in Asien. Wegen ihrer eigenartigen Form werden sie auf Deutsch Pfeilschwanzkrebse, auf Englisch Horseshoe Crabs genannt. Levin und Bang gingen den Gründen der beobachteten intravaskulären Gerinnung nach. Dabei fanden sie, dass die Amoebozyten (die einzigen zirkulierenden Blutzellen) des *Limulus polyphemus* ein Protein enthalten, das beim Kontakt mit bakteriellen Endotoxinen eine Verklumpung zeigt. Levin und Bang stellten daraufhin ein Zellysat von gewaschenen Amoebozyten her. Dieses Zellysat gelierte in Gegenwart von geringen Mengen bakterieller Endotoxine.

Das aktive Material im Zellysatz setzt sich zusammen aus dem Pro-Clotting - Enzym, welches bei Anwesenheit von Endotoxinen und zweifach positiv geladenen Ionen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Mn^{2+} aktiviert wird und sich in ein Clotting - Enzym umwandelt.

Das Clotting - Enzym wirkt auf Coagulen (gellierbares Protein), das ebenfalls im Lysat vorhanden ist und das dadurch in ein Proteingel verwandelt wird. Die Blutentnahme beim *Limulus polyphemus* erfolgt zwischen dem Thorakal - und Abdominalsegment durch Einstechen einer Kanüle in die Leibeshöhle. Es können pro Tier bis zu 100 - 200 ml Blut entnommen werden. Die Tiere werden nach der Punktion mit einer Farbmarmarkierung versehen und wieder in Freiheit gesetzt. Die Gerinnung des gewonnenen Blutes muss durch geeignete Zusätze verhindert werden. Die Amoebozyten werden abzentrifugiert, gewaschen und lysiert.

Das Lysat wird anschliessend auf optimale Empfindlichkeit eingestellt und gefriergetrocknet.

Kaninchen und Mensch reagieren gleich auf Endotoxin-Schwellendosen: nur ruft beim Menschen eine über dem Schwellenwert liegende Endotoxinmenge eine bedeutend stärkere Reaktion hervor als beim Kaninchen.

Die Fieber-Schwellendosen sind aber von der Bakterienart abhängig. Zum Beispiel liegt die Fieber-Schwellendosis beim Menschen nach intravenöser Injektion von *S. typhosa*-Endotoxin im Bereich von 0,1 - 1 ng/kg, von *E. Coli*-Endotoxin bei 1 ng/kg, und bei *Pseudomonas*-Endotoxin über 50 ng/kg.

Für den Limulustest spricht, dass es sich um einen in-vitro-Test handelt, der hochempfindlich bakterielle Endotoxine nachweist, allerdings keine anderen Pyrogene erfasst.

Mit dem Limulustest können Endotoxine bis in den Picogrammbereich erfasst werden, die der Kaninchentest nicht mehr anzeigt.

Der Limulustest gibt weiter wertvolle Hilfe in verschiedenen Bereichen der medizinischen Diagnostik für den Nachweis von Endotoxinen in Blut, Cerebrospinalflüssigkeit, Synovia und Urin und bei der Lebensmittelüberwachung von Fleisch, Milch und Milchprodukten.

Seine kommerziell erhältlichen Auswertungsmethoden teilen sich hauptsächlich in Gelbindungstest (Makro- und Mikro-Methode) mit qualitativem Charakter und die quantitative Trübungsmessung und Chromogenmethode.

b) Beschreibung der Methoden

Für die Durchführung des Gelbildungstests braucht man ein Wasserbad von 37°C, pyrogenfreie Geräte, pH-Meter und Schüttelmischer zur Homogenisierung der Proben, sowie das mitgelieferte Kontrollstandardendotoxin, mit dem man die deklarierte Lysatempfindlichkeit überprüfen kann. Anschliessend wird die Probe eine Stunde lang erschütterungsfrei bei 37°C ins Wasserbad gesetzt (Abb.2).

Nach 60 Minuten Inkubationszeit wird jeder Reaktionsansatz durch vorsichtiges Neigen der Röhrchen auf Koagulation geprüft. Ist ein festes Gel entstanden, gilt die Reaktion als positiv (Abb.3).

Das rekonstituierte Lysat darf längstens 1 Tag im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt werden. Für eine längere Lagerung muss die Lösung eingefroren werden.

Frauch (4) fand heraus, dass die Endpunktbestimmung im Limulus-Lysat-Test verbessert werden kann, wenn statt der Röhrchenmethode der Test auf einer Glasplatte mit schwarzgefärbter Rückseite durchgeführt wird. Diese Methode hat zudem den Vorteil, dass die Prüfung mit geringeren Materialmengen (10 µl) durchgeführt werden kann. Die Ablesung kann auf den bei 37°C inkubierten Platten bereits nach 30 Minuten erfolgen.

Nguyen und Greppin (5) haben diese Mikromethode von Frauch modifiziert, um die Ablesbarkeit zu verbessern. Die Durchführung erfolgt auf Deckgläschen, die in einer feuchten Kammer bei 37°C 30-60 Minuten bebrütet werden.

Gardi und Arpagus (6) gehen so weit, dass Sie 1 µl des Lysates pro Testansatz für ausreichend halten.

In verschiedenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Makro- und Mikromethode zum selben Ergebnis führen.

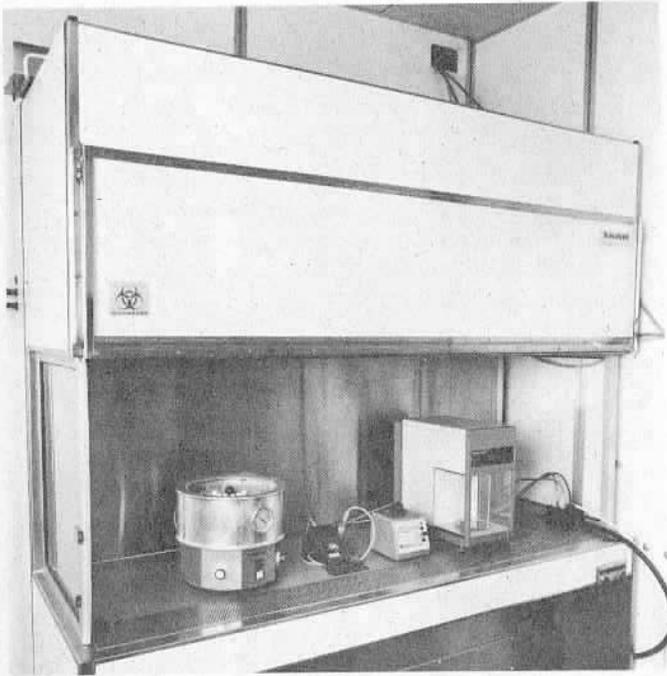


Abb.2 Laminar-Flow-Reinluftzone, in der der Limulustest durchgeführt wird (Wasserbad mit Testeinsätzen, pH-Meter, Schüttelmischer, Mettler-Waage)

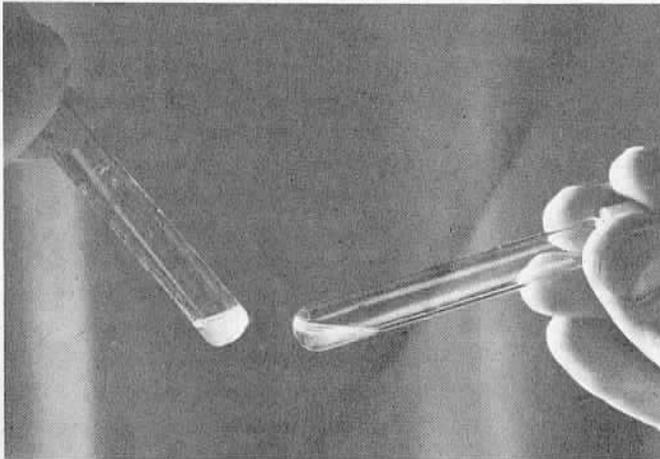


Abb.3 Ablesung der Probe: Links positive Reaktion, rechts negative Kontrolle



Mit der Trübungsmessungsmethode wird erreicht, dass bei genügender Verdünnung des Lysates mit Wasser die sich bildenden Proteinaggregate kein stabiles Gel mehr bilden können. Die so entstandene Trübung ist von der Endotoxinmenge abhängig und wird nephelometrisch oder turbidimetrisch gemessen.

Die Chromogenmethode beruht auf der Messung der Zeit bis zu einem bestimmten Grad der Gelierung in Abhängigkeit von der Endotoxin-Konzentration und wird photometrisch durchgeführt.

Die Automatisierung der Tests wird weiterentwickelt, und es gibt schon heute Geräte, die eine grosse Anzahl von Messungen in kurzer Zeit bewältigen können (7).

c) Interferenzen

Vor der Entscheidung, den Limulustest einzusetzen, muss man bei Arzneimitteln auf Abwesenheit von Störfaktoren prüfen, indem man die Lysatempfindlichkeit in An- und Abwesenheit des zu prüfenden Präparates vergleicht und sich für ein geeignetes Verfahren zur Ausschaltung dieser Störung entscheidet. Die möglichen Verfahren sind Verdünnen, Erhitzen, Zusatz von Dispersionsmitteln, Dialyse und Ultrafiltration (Eintauchfilter).

Die Gelbildung im Limulustest wird verhindert durch:

- Elektrolyte (Ca^{2+} , Phosphat etc.) und einfache Zucker in hohen Konzentrationen
- Antikoagulantien zur Gewinnung von Humanplasma, z.B. Citrat, Heparin, EDTA
- Antibiotika, z.B. Penicillin, Cloxacillin, Tetracyclin, Polymyxin, Chloramphenicol, Streptomycin
- Enzyminhibitoren (SH-Gruppen)
- Rauwolfia-Alkaloide
- tricyclische Antidepressiva
- einige Saponine, Glycoside und Corticoide
- einige Radiopharmazeutika
- Plasmaproteine, z.B. Albumine, Gammaglobuline, Gerinnungsfaktoren
- Ethanol (mehr als 2%, z.B. nach Alkohol-Fraktionierung von Plasmaproteinen)

STANDARDISIERUNG DES TESTS

In Europa, wo es noch keine Regelung gibt, muss der Hersteller



eines Limulus-Testsatzes das Testverfahren überprüfen lassen. Standardisiert werden Lysat und Testverfahren gegen eine Endotoxinpräparation, die stellvertretend für die natürlichen Kontaminanten sowohl Fieberreaktion am Kaninchen als auch Gelbfärbung im Limuluslysate auslösen kann. Dieses Endotoxin heisst U.S. Reference Standard Endotoxin (RSE), gegen das der jeweilige Arbeitsstandard einer Testpackung abgeglichen sein muss. Dies fordert die Etablierung eines Standardpräparates sowie die Festlegung tolerabler Endotoxin-Grenzwerte.

1976 wurde in den USA eine Endotoxin-Einheit aus E.Coli geschaffen, die von der FDA als EC-2 bezeichnet wurde. 0,2 ng des Standards EC-2 entsprechen definitionsgemäss 1 EU (Endotoxin-Unit). Später wurde die Einheit EC-5 geschaffen, wobei 0,1 ng EC-5 1 EU entspricht, d.h. doppelt so aktiv ist. 1977 erstellte die FDA einen Richtlinienentwurf zur Validierung des Limulustests als Endkontrolle und Alternative zum derzeitigen Pyrogentest und passte diese Richtlinien laufend der neuesten Entwicklung an (8).

1980 hat die amerikanische Pharmakopöekommission den Limulustest als "Bacterial Endotoxine Test" in die USP XX aufgenommen.

Der wesentliche Schritt für die Anwendung des Limulustests als möglicher Ersatz für den Kaninentest ist die Feststellung, wieviele dieser definierten Endotoxin-Einheiten beim Menschen eine pyrogene Reaktion auslösen. Vergleichsuntersuchungen beim Kaninchen und beim Menschen haben gezeigt, dass 5 EU/kg Körpergewicht bei beiden Spezies die untere pyrogene Schwellendosis darstellen. Die in einem Arzneimittel zulässigen Endotoxin-Einheiten sollten der maximalen Arzneimitteldosis entsprechen, die innerhalb einer Stunde pro kg Körpergewicht gegeben werden darf. Der Endotoxin-Grenzwert eines Produktes wird deshalb mit dem Quotienten K/M ausgedrückt. Dabei ist K festgelegt mit 5 EU/kg KG Kaninchen oder Mensch. Für die Arzneimitteldosis M gibt es zwei Möglichkeiten. M ist entweder die Arzneimittel-Testdosis pro kg Kaninchen, die bisher gemäss dem Arzneibuch geprüft wurde, oder M ist die höchste Arzneimitteldosis, die klinisch pro kg dem Menschen einmal während maximal einer Stunde verabreicht wird. Der jeweils höhere Wert für M ist in den Quotienten einzusetzen. Für Wasser zu Injektionszwecken hat die FDA das Limit auf 0,25 EU/ml festgesetzt.



Hier einige Endotoxinmengen - ausgedrückt in Gewichtsmenge und EU (bezogen auf EC-5) in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit des Tests.

| Gewichtsmenge Endotoxin in Nanogramm | EU/EC-5 | Empfindlichkeit |
|--------------------------------------|----------|---|
| 0,01 - 1 | 0,1 - 10 | Gelbildung im LAL-Test |
| 1 - 10 | 10 - 100 | positiver Pyrogen-Test im Kaninchen |
| 20 | 200 | Beginn toxischer Reaktionen beim Menschen |

ANWENDUNGSGEBIETE DES LIMULUSTEST IM RAHMEN DER ARZNEIMITTELENTWICKLUNG

In der Schweiz können für den Limulustest die derzeitigen Anwendungsgebiete bei der Herstellung ("in-process") so zusammengefasst werden:

- Ueberprüfung von Rohstoffen, insbes. Wasser als Ansatz, für Parenteralia und für die letzte Spülung von flüssigkeitsführenden Teilen und Endbehältern
- Ueberprüfung von Filterelementen hinsichtlich Pyrogeneluirung und Pyrogenabscheidung
- Validierung von Entpyrogenisierungsmaßnahmen (z.B. trockenes Erhitzen), Inaktivierungskinetiken
- Ursachenermittlung bei Pyrogeneinbrüchen
- Ueberprüfung von Arzneimittelansätzen vor der Entpyrogenisierung

Für die 5 obengenannten Prüfungen existiert somit in der Schweiz im Limulustest ein vollwertiger Ersatz für den in-vivo Kaninchentest.



In den USA können darüberhinaus bestimmte Endprodukte (z.B. Radiopharmazeutika, medical devices, Lösung für Hämodialyse, Wasser, Injectabilia) mittels Limulustest geprüft werden(9, 2).

DERZEITIGE SITUATION IN DER SCHWEIZ

In der Schweiz wie im übrigen Europa (ausgenommen Italien, das die Aufnahme des Tests in seine Pharmakopöe angekündigt hat) gibt es keine gesetzliche Regelung betreffend den Limulustest. Die Entwicklung auf diesem Gebiet wird aufmerksam beobachtet, und die EP-Kommission (European Pharmacopoeia Commission) beschäftigt sich seit längerer Zeit mit dem LAL-Test beziehungsweise mit der Auswahl eines entsprechenden Endotoxin-Standards für den LAL-Test (10, 11, 12, 13).

In den Richtlinien eines Analytiker-Arbeitskreises der Basler Chemischen Industrie, Fachgruppe Mikrobiologie, betreffend den Einsatz des LAL-Tests für Kontrollen am Endprodukt, wird empfohlen, den Test dort einzusetzen, wo eventuell eine EP-Monographie diesen Test vorschreibt, wo der Kaninchen-Test nicht möglich ist, oder als Alternative zum Kaninchen-Test, falls mit grosser Wahrscheinlichkeit keine anderen Pyrogene als Endotoxine von gramnegativen Keimen im Produkt vorkommen können.

Die letztgenannte Alternative sollte nur in Ausnahmefällen - wenn man sich eindeutig auf USP (evtl. British Pharmacopoeia) beziehen kann - in Betracht gezogen werden.

AUS UNSEREN LABORATORIEN

In unserer Firma wird grosser Wert auf fortlaufende Parallelvergleiche zwischen den beiden Methoden Limulustest und Kaninchen-test und die Sammlung experimenteller Daten gelegt, um dadurch Aufschluss über die Möglichkeiten des Ersatzes des Kaninchen-tests durch den Limulustest zu erhalten (14). Bei der Qualitätsüberwachung von destilliertem Wasser mit den Kaninchen-Pyrogen-



test (qualitative Makromethode) fanden die positiven Resultate mit einer unklaren Ausnahme ihre Bestätigung im Limulustest:

NACHWEIS VON PYROGENEN IN AUQA DEST.

| Jahr | n | K | L |
|------|-----|---|---|
| 1976 | 125 | - | - |
| | 1 | - | + |
| | 1 | + | - |
| 1977 | 88 | - | - |
| | 2 | - | + |
| 1978 | 81 | - | - |
| 1979 | 75 | - | - |
| 1980 | 56 | - | - |
| 1981 | 34 | - | - |
| | 4 | + | + |
| 1982 | 73 | - | - |
| 1983 | 41 | - | - |
| 1984 | 33 | - | - |
| | 1 | + | + |
| 1985 | 30 | - | - |

n : Zahl der geprüften Muster

K : Pyrogentest am Kaninchen

L : Limulustest

- : negative Reaktion

+ : positive Reaktion

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, nahm die Zahl der erforderlichen Tests wie auch der prozentuale Anteil positiver Resultate im Laufe der Jahre ab.



Dank Einsatz des Limulustests bei der in-process-Kontrolle konnte die Anzahl der Tierversuche reduziert werden, da bereits in-vitro mögliche Kontaminationen frühzeitig erkannt und sofort Massnahmen ergriffen werden konnten.

Die Frage bleibt noch offen, wann in der Schweiz bzw. in Europa der Limulustest alternativ zum Kaninchentest eingesetzt werden darf. Standardisierungs- und Validierungsvorschriften der FDA und die Aufnahme in die USP räumen dem Limulustest besonders in der Qualitätskontrolle, bei medizinisch-technischen Geräten und wissenschaftlichen Fragestellungen als Methode der Wahl einen Platz ein, von dem er nicht mehr wegzudenken ist.

Bis heute konnte durch den Limulustest die Zahl der Kaninchen für Pyrogentests bedeutend herabgesetzt werden, vor allem bei der in-process-Kontrolle während des Herstellungsverfahrens. Es ist zu hoffen, dass auch in Europa möglichst bald eine entsprechende Aenderung der Vorschriften erfolgt. Das wäre ein grosser Schritt, um Tierexperimente zu ergänzen und sogar zum Teil zu ersetzen.



Literatur

1. C.H. Palmer: Pharmaceutical aspect of pyrogens in hospital and industry. Pyrogens and Fever, Ciba Foundation Symposium, Edinburgh and London, 193-205, 1971.
2. F.C. Pearson: Pyrogens, M. Dekker, New York and Basel, 1985.
3. E. Cohen: Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (Limulida), Alan R. Liss, Inc., New York, 1979.
4. P. Frauch: Der Limulus-Test zum in vitro Nachweis von Endotoxin. J. Pharm. Sc., 63, 808-809, 1974.
5. B.T. Nguyen, R. Greppin: Vérification de l'absence de pyrogènes. Schw. Apoth. Ztg., 112, 474-478, 1974.
6. A. Gardi, G. Arpagus: The Limulus amebocyte lysate test: a useful tool for the control of plasma fractions, Dev. Biol. Stand., 34, 21-26, 1977.
7. H. Oishi, Y. Hatayama, H. Shiraishi, K. Yanagisawa, Y. Sakata: The Automated Measurement of Endotoxin by Parallel Turbidimetric Time Assay, Yakugaku Zasshi, 105, 300-303, 1985.
8. M.J. Akers: Parenteral Quality Control, M. Dekker, New York and Basel, 1985.
9. St.W. Watson, J. Levin, Th. J. Novitsky: Endotoxins and their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test, Alan R. Liss, Inc., New York, 1982.
10. Colloque "Limulus Test", Journal de Pharmacie de Belgique, 34, 121-184, 1979.
11. Referate des Symposions "Pyrogene" der Concept Heidelberg, Memoscript 2/81.
12. Pharma Technologie Journal, Pyrogene II, Symposion der Concept Heidelberg, Memoscript 3/83.
13. R. Scheer: Pyrogene und Limulus Test. Pharmazie in unserer Zeit, 13, 137-146, 1984.
14. C. Pericin: In vitro determinations of pyrogenicity by means of the limulus test. Journal de Pharmacie de Belgique, 34, 166-167, 1979.

