

1

Historisches zu Pyrogenen und Endotoxinen

Der Begriff „pyrogen“ leitet sich vom griechischen Wort *pyr* = Feuer ab. Pyrogen bedeutet feuererzeugend. Damit ist Fieber gemeint. Hippokrates von Kos (ca. 460/459 bis ca. 375 v. Chr.) sieht im Fieber ein gutes Zeichen während einer Erkrankung, ebenso Paracelsus (1493–1541), der dem Fieber eine reinigende Wirkung zuschreibt. Thomas Sydenham (1624–1689), der von nachfolgenden Ärztegenerationen den Beinamen „Der englische Hippokrates“ bzw. „Der zweite Hippokrates“ bekommt, studiert und beschreibt ab 1661 sehr genau Fälle von epidemisch auftretendem Fieber. Im Jahre 1676 veröffentlicht er seine Erkenntnisse in dem Buch „Observationes medicae“. Seiner Meinung nach sind Krankheiten durch eine Anhäufung von Zeichen charakterisiert. Fieber wertet er als Zeichen für Abwehrreaktionen des menschlichen Körpers [1].

Ein Zeitgenosse Sydenhams ist Thomas Willis (1621–1675), der in Oxford Medizin studiert und in Kreisen bekannter Naturwissenschaftler verkehrt. Fieber ist für Willis eine Folge von Fehlmischungen („Dyskrasien“) des Blutes, die durch eine gestörte Fermentation der Körpersäfte entstehen sollen [2].

Mitte des 18. Jahrhunderts injiziert Albrecht von Haller (1708–1777) Tieren faulige Flüssigkeiten; dies ruft in den Versuchstieren schwere Fieberreaktionen hervor.

Weitere Experimente erfolgen mit Beginn des 19. Jahrhunderts. Die französischen Forscher Gaspard und Cruvelbier injizieren Hunden ebenfalls faulige Flüssigkeiten und schmutziges Hafenwasser; die Tiere erkranken und bekommen hohes Fieber. Der dänische Mediziner Peter Ludvig Panum (1820–1885) untersucht Patienten mit Sepsis und prägt den Begriff „putrides Gift“ (putrid = faulig), womit aus heutiger Sicht Endotoxine gemeint sind. Seine Forschungsergebnisse veröffentlicht er 1874 in Virchows Archiv unter dem Titel „Das putride Gift, die putride Infektion oder Intoxikation und die Septikamie“. Richard Friedrich Johann Pfeiffer (1858–1945), ein Schüler von Robert Koch, entdeckt 1892 bei dem gramnegativen Bakterium *Vibrio cholerae* ein hitzeunempfindliches Toxin, von dem er annimmt, dass es aus dem Inneren der Zellen stammt; er nennt dies Endotoxin, auch um es von den damals schon bekannten exkretorischen Toxinen, den Exotoxinen, abzugrenzen (siehe auch Abschn. 1.4). Damit ist der bis heute verwendete Begriff „Endotoxin“ geboren.

W.H. Howell (1860–1945) forscht über Blutkoagulation und die Wirkung von Heparin. Er publiziert 1886 in den Mitteilungen der Johns Hopkins University erste wissenschaftliche Beobachtungen, dass die Haemolymphflüssigkeiten der Tiere *Li-*



Abb. 1.1 Jack Levin mit *Limulus polyphemus* am Strand (Pickering Beach, Delaware, USA) Anfang Juni 2019. Foto: Mit freundlicher Genehmigung der Labor LS SE & Co. KG, Bad Bocklet und von Prof. Jack Levin, University of California School of Medicine, San Francisco.

mulus polyphemus (engl. *horseshoe crab*), *Cucumaria* spec. (Seegurke) und *Callinectes hastatus* (engl. *blue crab*) koagulieren können (siehe auch Tab. 2.5). L. Loeb führt die Arbeiten von Howell fort und publiziert seine Ergebnisse in den Jahren zwischen 1903 und 1927. E.C. Hort und W.J. Penfold untersuchen das sogenannte „Injektionsfieber“ an Kaninchen und vertreten die Theorie, dass Pyrogene bakteriellen Ursprungs seien. Sie finden, dass pyrogene Substanzen filtrierbar und hitzestabil sind und einen quantitativen Effekt zeigen. Die intravenöse Injektion von pyrogenfreien Salzlösungen in Kaninchen führt zu keinem Anstieg der Körpertemperatur. Hort und Penfold publizieren ihre Ergebnisse im Jahre 1912 [5, 6]. Ihre Erkenntnisse geraten in Vergessenheit, aber die Arbeiten werden in den 1920er-Jahren von Florence Barbara Seibert wieder aufgenommen und fortgeführt [7].

Nach den frühen Arbeiten von Howell und Loeb über die Haemolymphé dauert es bis Anfang der Fünfzigerjahre des 20. Jahrhunderts, als Frederik B. Bang die Untersuchungen am „blauen Blut“ des *Limulus polyphemus* wieder aufnimmt und in den 1960er-Jahren zusammen mit Jack Levin an dem Thema weiterarbeitet.

1.1 Chronologie ab 19. Jahrhundert

- 1822 Eine der ersten Fossilien der Schwertschwänze wird in Bayern (Solnhofen) gefunden und von Desmarest als *Mesolimulus walchii* beschrieben.
- 1862 Carl F. J. Zincken findet einen fossilen Schwertschwanz (*Tachypleus decheni*).
- 1856 Peter Ludvig Panum verwendet den Begriff „putrides Gift“.

- 1862 Theodor Billroth benutzt die Bezeichnung „pyrogen“.
- 1886 William Henry Howell beschreibt die Koagulation der Haemolymph e u. a. beim *Limulus*.
- 1889 G. Roussy isoliert aus gramnegativen Bakterien eine pyogene Substanz [3].
- 1892 Richard Friedrich Pfeiffer entdeckt in *Vibrio cholerae* ein hitzeunempfindliches Toxin, das er Endotoxin nennt.
- 1894 Eugenio Centanni entdeckt in *Salmonella typhi* ebenfalls ein Toxin, dem er den Namen Piritoxina gibt [4].
- 1912 E.C. Hort und W.J. Penfold berichten über die pyogene Wirkung toter gramnegativer Bakterien [5, 6].
- 1912 Aufnahme des Kaninchen-Pyrogentests in die British Pharmacopeia.
- 1925 Florence B. Seibert entwickelt in den USA den Kaninchen-Pyrogentest [7].
- 1942 Aufnahme des Kaninchen-Pyrogentests in die USP XII.
- 1953 Frederik B. Bang entdeckt die Auslösung der Koagulation der Haemolymphe des *Limulus polyphemus* durch gramnegative Bakterien [8, 11].
- 1963 Zusammenarbeit von Frederik B. Bang und Jack Levin; sie publizieren gemeinsam mehrere Fachartikel, in denen sie den Mechanismus der Koagulation und seine Lokalisation in den Amoebocyten beschreiben und Endotoxine als Auslöser erkennen [9].
- 1967 Nobelpreis für Physik für H.K. Hartline für Studien am optischen System des *Limulus*.
- 1968 Frederik B. Bang und Jack Levin beschreiben eine standardisierte Methode zum Nachweis von Endotoxinen. Dieser ursprüngliche Test beruhte auf der qualitativen Endpunktbestimmung der Gelbildung [10].
- 1969 Beginn der Entwicklung des kommerziellen LAL-Tests durch James F. Cooper und Henry N. Wagner.
- 1971 Vergleichsuntersuchungen von Jack Levin, James F. Cooper und Henry N. Wagner zwischen LAL-Test und Pyrogentest [12].
- 1972 Cooper et al. setzen den LAL-Test zum Endotoxinnachweis in Radiopharmazeutika ein [13].
- 1973 FDA publiziert Guidelines für die Herstellung von Limulus-Amoebocyten-Lysat und schlägt Standards vor.
- 1974 Travenol Laboratories (jetzt Baxter) startet Lysatherstellung für eigene Testzwecke.
- 1974 Kobayashi gewinnt Lysat aus *Tachypleus* (TAL-Reagenz).
- 1977 Associates of Cape Cod (ACC), gegründet von James Sullivan und Stanley Watson, starten ebenfalls die Lysatherstellung.
- 1979 Mahalanabis gewinnt Lysat aus *Carcinoscorpius rotundicauda*.
- 1980 Aufnahme des LAL-Tests in die USP XX, Monografie „Bacterial Endotoxins Test“, als Referenzstandard wurde Endotoxin aus *E. coli* O113:H10:K festgesetzt.
- 1980 Gründung von Pyroquant, jetzt ACC Europe GmbH, in Mörfelden-Walldorf.
- 1981 Iwanaga entdeckt den alternativen Aktivierungsweg durch Glucane [15].
- 1985 Aufnahme des LAL-Tests ins DAB 9.
- 1987 FDA-Guideline, die die verschiedenen Methoden beschreibt, im Juli 2011 zurückgezogen [16].

- 1991 FDA Interim Guidance, ebenfalls 2011 zurückgezogen [17].
- 1993 Bundesanzeiger Nr. 2 v. 6. Januar 1993: Bekanntmachung zur Möglichkeit des Ersatzes der Prüfung auf Pyrogene durch die Prüfung auf Bakterienendotoxine nach DAB 10 [18].
- 1995 Vollblutmodell, Hartung und Wendel, Universität Konstanz.
- 1998 Ph. Eur., USP und JP harmonisieren den RSE aus *E. coli* O113:H10:K (10 000 IE/Vial).
- 2001 Monografie zum Endotoxintest ist zwischen Ph. Eur., USP, JP harmonisiert.
- 2003 Rekombinantes Reagenz (Faktor C) kommt auf dem Markt (Fa. Cambrex, jetzt Lonza).
- 2006 Portable Test System (PTS) als Kartuschenystem wird von Fa. Charles River zur Marktreife entwickelt.
- 2010 MAT wird in die Ph. Eur. unter der Kapitelnummer 2.6.30 aufgenommen.
- 2011 Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für die Entdecker der Toll-like Rezeptoren Jules Hoffmann und Bruce Beutler.
Jules Hoffmann entdeckt, dass Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) mit Mutationen im Toll-Gen wehrlos gegenüber Bakterien- und Pilzinfektionen sind. Das Toll-Gen ist für die Synthese von Rezeptoren zuständig. Diese Rezeptoren binden u. a. LPS und lösen so Abwehrreaktionen des Organismus gegenüber den mikrobiellen Eindringlingen aus. Beutler findet diese Rezeptoren auch in Säugetieren; bei Mäusen beschreibt er den Toll-like receptor 4, TLR 4, an den LPS bindet. Dadurch wird eine molekulare Aktivierungskaskade ausgelöst, die den nukleären Faktor Kappa-B (NF-*kB*) aktiviert. Dieser Faktor wiederum schaltet Gene für Immunaktivatoren wie den Cytokinen an, sodass schlussendlich B- und T-Zellen aktiviert werden und Entzündungsreaktionen und Fieber vorliegen [20].
- 2011 Fa. Hyglos bringt neuartigen ELISA-Test zum Nachweis von Endotoxinen unter Verwendung eines LPS-selektiven Phagenproteins heraus.
- 2012 Verstärkt anhaltende Forschungen zum LER-Effekt (*low endotoxin recovery*) und zur Maskierung.
- 2014 Hyglos bringt den Endotoxin Recovery Kit (Endo-RS) auf den Markt sowie zusammen mit Microcoat Biotechnologie GmbH einen zellbasierten MAT zur Pyrogendetektion.
- 2014 Haemochrom bringt den Haemotox™ rFC Kit auf den Markt.
- 2016 Ph. Eur. publiziert das überarbeitete Kapitel 5.1.10 im Supplement 8.8; in diesem Kapitel wird der rFC als Alternative zum herkömmlichen LAL-Test vorgestellt.
- 2017 Kikuchi et al. publizieren Vergleichsstudien zwischen drei LAL-Tests und drei rFC Tests und können weitgehend Äquivalenz aufzeigen [21].
- 2018 Hyglos/bioMerieux bringen als weiteren rFC Test den ENDOZYME II GO auf den Markt
- 2018 Die FDA genehmigt als erstes Arzneimittel den monoklonalen Antikörper Emgality™ von Eli Lilly, welcher für die Chargenfreigabe mittels rFC auf Endotoxine geprüft wird.

Tab. 1.1 Fieber und Hypothermie beim Menschen.

Hypothermie	Hypothalamus ↓ Sollwert: um 37 °C	Fieber Erhöhung des Sollwerts auf > 38 °C
Wärmeabgabe	—	Wärmeproduktion
Schwitzen, starke Durchblutung der Haut	—	Zittern, “Gänsehaut”, Verengung der peripheren Gefäße

1.2 Fieber

Die normale und auch ideale Körpertemperatur des Menschen, die Basaltemperatur, liegt zwischen 36,0 und 37,2 °C. Der menschliche Körper reagiert auf Infektionen mit Fieber, d. h. mit einer Erhöhung der Körperkerntemperatur. Sie entsteht durch die Sollwertänderung der Temperatur im Wärmeregulationszentrum der Regio praopticæ des Hypothalamus. Der Hypothalamus ist Teil des Zwischenhirns. Zu den Symptomen des Fiebers gehören – neben der Erhöhung der Körpertemperatur – weitere physiologische Reaktionen wie Komplementaktivierung, hypotoner Schock, Verbrauchskoagulopathie und Induktion von Entzündungsfaktoren. Diese Symptome treten bei Endotoxindosen im Nanogrammbereich auf; auf Dosierungen im Mikrogrammbereich folgt der septische Schock. Die Bundesärztekammer definiert Fieber ab einer Temperatur von 38,5 °C. Bei einer Körpertemperatur < 35 °C liegt Hypothermie (Unterkühlung) vor. Der Betroffene beginnt zu zittern, hat eine kalte Haut sowie Schmerzen (siehe Tab. 1.1).

1.3 Pyrogene

In der Tab. 1.2 sind die bekannten fiebererzeugenden Agenzien (endogene und exogene Pyrogene) zusammengefasst.

1.4 Endotoxine, Exotoxine und Enterotoxine

Endotoxine oder LPS sind Bestandteile der äußeren Membran der gramnegativen Bakterienzellen. Ihre Eigenschaften werden in Tab. 1.3 denen der Exotoxine gegenübergestellt.

Enterotoxine sind Exotoxine, die ihre schädigende Wirkung im Verdauungssystem entfalten. Enterotoxine werden z. B. von *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, Shigellaarten, *Pseudomonas aeruginosa*, Clostridiumarten, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, und *Vibrio cholerae* gebildet. Hier finden sich sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien.

Tab. 1.2 Herkunft und Natur der Pyrogene.

Endogene Pyrogene	Hormone	Steroide
		Prostaglandine
	Cytokine	Interferone Interleukine TNF alpha Colony Stimulating Factor (CSF) Wachstumsfaktoren
Exogene Pyrogene	Herkunft	Organismen
	Mikrobiell	Gram(-)-Bakterien Gram(+)-Bakterien Pilze Viren Plasmodien
		Moleküle
		Endotoxin (LPS) Lipid A LTA Peptidoglykane Nucleinsäuren Tuberkulin Flagelline Exotoxine von Streptokokken und Staphylokokken Porine Phosphoinositole Glucane Mannoproteine
	Herkunft	Antigene
Nichtmikrobiell		Serumalbumin, human γ -Globulin, bovin Polynukleotide Steroide Gallensalze Lithocholinsäure Colchicin Bleomycin
Abiotisch		(Nano-)Partikel, z. B. Kunststoff, Gummi, Staub

Exotoxine sind toxische Proteine, die von Bakterien synthetisiert und in die Umgebung ausgeschieden werden. Auch in Abwesenheit der Bakterien können diese Proteine schädigend auf Mensch und Tier einwirken. Die Proteine werden durch Futter oder Lebensmittel aufgenommen, beispielsweise Botulinustoxin von *Clostridium botulinum*. Ein anderer Weg ist die Aufnahme von Bakterien, die dann im Körper (Magen, Darm) ihre Exotoxine freisetzen. Dies ist z. B. bei Cholera der Fall: *Vibrio cholerae* lebt im Wasser und kann über Trinkwasser oder rohe Fische und Meeresfrüchte aufgenommen werden. Die Choleratoxine ctxA und ctxB und der toxisch regulierte Pilus werden im Dünndarm freigesetzt und aktivieren das Enzym Adenylatcyclase an den Membranen der Dünndarmschleimhaut. Dadurch steigt die Konzentration von cAMP an, wodurch eine erhöhte Sekretion von Chloridionen bei gleichzeitiger Inhibition der NaCl-Resorption und verstärkter Wasserabgabe erfolgt. Folgen sind starke wässrige Durchfälle („Reiswasserstuhl“). Damit sind die Exotoxine dieses Bakteriums auch Enterotoxine [22].

Exotoxine werden in drei Gruppen eingeteilt [23] (siehe Tab. 1.4):

- Superantigene aktivieren die Interaktion des MHC-Komplexes mit dem T-Zell-Rezeptor.
- Porenbildner permeabilisieren die Cytoplasmamembranen.
- AB-Toxine wirken als Enzyme im Cytosol von Mensch- und Säugetierzellen.

Zu den Superantigenen gehören das toxische Schocksyndrom – Toxin 1 (*Staphylococcus aureus*), Enterotoxin B (Staphylokokken) und die pyrogenen Exotoxine aus *Streptococcus pyogenes* (hier ist der interessante Fall, dass ein Exotoxin aus einem grampositiven Bakterium fiebererzeugend wirkt).

Die Porenbildner binden an die Säugetierzellen und bilden Transmembranporen. Zu den Porenbildnern gehören z. B. Hämolysin aus *Bacillus cereus*, EHEC-Hämolysin aus enterohämorrhagischen *E. coli*-Zellen, Enterotoxin aus *Clostridium perfringens*, Aerolysin aus *Aeromonas* spp., cytotoxi-assoziiertes Gen A (CagA) aus *Helicobacter pylori*.

Tab. 1.3 Gegenüberstellung der Eigenschaften von Endotoxinen und Exotoxinen.

Charakteristikum	Endotoxin	Exotoxin
Chemische Natur	LPS	Proteine
Teil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien	Ja	Nein
Meist von grampositiven Bakterien	Nein	Ja
Gewöhnlich extrazellulär	Nein	Ja
Phagen- oder plasmidcodiert	Nein	Viele
Antigene Wirkung	Schwach	Ja
Umwandlung zum Toxoid	Nein	Viele
Neutralisation durch Antikörper	Schwach	Ja
Verschiedene pharmakologische Wirkungen	Nein	Ja
Stabil bei hohen Temperaturen	Ja	Nein ^{a)} > 60 °C → Denaturierung

a) Ausnahme: Enterotoxin von *Staphylococcus aureus* widersteht Kochen bei 100 °C [25].

Tab. 1.4 Medizinisch bedeutsame Toxine, nach [23]; sv = Serovar.

Toxin	Bakterium	Toxingruppe
Enterotoxine	<i>Staphylococcus aureus</i>	Superantigen
Pyogene Enterotoxine	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Superantigen
Streptolysin S	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Porinbildner
Hämolysin BL	<i>Bacillus cereus</i>	Porinbildner
Nichthämolytisches Enterotoxin	<i>Bacillus cereus</i>	Porinbildner
Cytotoxin K	<i>Bacillus cereus</i>	Porinbildner
Cereulide	<i>Bacillus cereus</i>	Porinbildner
Enterotoxin	<i>Clostridium perfringens</i>	Porinbildner
Aerolysin	<i>Aeromonas</i> spp.	
EHEC-Hämolysin	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>	Porinbildner
Cytotoxinassoziiertes Gen A (CagA)	<i>Helicobacter pylori</i>	Porinbildner
Vakuolenbildendes Cytotoxin (VacA)	<i>Helicobacter pylori</i>	Porinbildner
Cytotoxin	<i>Plesiomonas</i> spp.	Porinbildner
Hitzestabiles direktes Hämolysin (TDH)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Porinbildner
Cytotoxisch nekrotisierender Faktor 1	<i>E. coli</i>	AB-Toxin: Deamidase
Shiga-like Toxin	<i>E. coli</i>	AB-Toxin: RNase
Cytolethales Distending Toxin	<i>E. coli, Campylobacter</i> spp.	AB-Toxin: DNase
Lethaler Faktor	<i>Bacillus anthracis</i>	AB-Toxin: Protease
Neurotoxin	<i>Clostridium botulinum</i>	AB-Toxin: Protease
Plasmidcodiertes Protein Pet	<i>E. coli</i>	AB-Toxin: Protease
Subtilase Cytotoxin	<i>E. coli</i>	AB-Toxin: Protease
Shigellaenterotoxin 1	<i>E. coli</i>	AB-Toxin: Protease
Enterotoxin C2	<i>Clostridium botulinum</i>	AB: ADP-Ribosyltransferase
C3-Toxin	<i>Clostridium botulinum</i>	AB: ADP-Ribosyltransferase
Iotatoxin	<i>Clostridium perfringens</i>	AB: ADP-Ribosyltransferase
Diphtherietoxin	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	AB: ADP-Ribosyltransferase
Pertussistoxin	<i>Bordetella pertussis</i>	AB: ADP-Ribosyltransferase
Hitzelabiles Toxin	<i>E. coli</i>	AB: ADP-Ribosyltransferase
Enteroaggregatives hitzelabiles Toxin	<i>E. coli</i>	AB: ADP-Ribosyltransferase
Exotoxin A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AB: ADP-Ribosyltransferase
Typhustoxin	<i>Salmonella enterica</i> sv. <i>Typhi</i>	AB: ADP-Ribosyltransferase
Choleratoxin	<i>Vibrio cholerae</i>	AB: ADP-Ribosyltransferase
Ödemfaktor	<i>Bacillus anthracis</i>	AB: Adenylylcyclase
Adenylylcyclase	<i>Bordetella pertussis</i>	AB: Adenylylcyclase
Hitzestabiles Toxin	<i>E. coli</i>	AB: Adenylylcyclase
Alphatoxin	<i>Clostridium perfringens</i>	AB: Phospholipase C
Cytotoxin ExoU	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AB: Phospholipase C
Shigatoxin	<i>Shigella dysenteriae</i>	AB-Toxin

AB-Toxine binden über ihre Bindungsdomäne B an Rezeptoren von Säugetierzellen und gelangen daraufhin in das Zelliinnere, wo ihre Untereinheit A, die enzymatisch aktiv ist, zelleigene Substrate angreift und verändern kann. AB-Toxine lösen eine Vielzahl von schweren Erkrankungen aus: Diphtherie, Cholera, Pertussis (Keuchhusten), Anthrax (Milzbrand), Gasbrand, Tetanus, Botulismus; die drei letzten genannten Krankheiten werden von Clostridiumarten verursacht [24].

Literatur

- 1 Jankrift, K.P. (2007). *Die großen Ärzte im Porträt*. Wiesbaden: Marixverlag.
- 2 Eckart, W.U. (1994). *Geschichte der Medizin*, 2. Aufl., Berlin: Springer.
- 3 Roussy, G. (1889). Recherches experimentales, substances calorigenes et frigorigenes d'origine microbienne, Pyretogenine et Frigogenine. *Gaz. Hop.* 62: 171.
- 4 Centanni, E. (1894). Untersuchungen über das Infektionsfieber, das Fiebergift der Bakterien. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 20: 148.
- 5 Hört, E. und Penfold, W.J. (1912). Microorganisms and their relation to fever. *J. Hyg. Camb.* 12: 361–390.
- 6 Hört, E. und Penfold, W.J. (1912). A critical study of experimental fever. *Proc. R. Soc. B* 85: 174–186.
- 7 Seibert, F.B. (1925). The cause of many febrile reactions following intravenous injection. I. *Am. J. Physiol.* 71: 621–651.
- 8 Bang, F.B. und Frost, J.L. (1953). The toxic effect of a marine bacterium in *Limulus* and the formation of blood clots. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 95: 361.
- 9 Levin, J. und Bang, F.B. (1964). The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 115: 265–274.
- 10 Levin, J. und Bang, F.B. (1968). Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 19: 186–197.
- 11 Bang, F.B. (1956). A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 98: 325–351.
- 12 Cooper, J.F., Levin, J. und Wagner, H.N. (1971). Quantitative comparison of in vitro and in vivo methods for the detection of endotoxin. *J. Lab. Clin. Med.* 78: 138–148.
- 13 Cooper, J.F., Hochstein, H.D. und Seeligmänn, E.B. (1972). The *Limulus* test for endotoxin (pyrogen) in radiopharmaceuticals and biologicals. *Bull. Parenter. Drug Assoc.* 26: 153–162.
- 14 Hartung, T. und Wendel, A. (1996). Detection of pyrogens using human whole blood. *In Vitro Mol. Toxicol.* 9 (4): 353–359.
- 15 Iwanaga, S. et al. (1985). Hemolymph coagulation system in *Limulus*. In *Microbiology – 1985: Meetings of the American Society for Microbiology*, (Hrsg. L. Leive), S. 29–32. Washington: ASM.
- 16 FDA (1987). 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. Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA. 2011 zurückgezogen.
- 17 FDA (1991). Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologicals. Kinetic LAL techniques. 15 July 1991. Rockville, MD, USA. 2011 zurückgezogen.

- 18** Bundesanzeiger Nr. 2 vom 6. Januar 1993, S. 67: Bekanntmachung zur Möglichkeit des Ersatzes der Prüfung auf Pyrogene durch die Prüfung auf Bakterien-Endotoxine nach DAB 10 (Parenteralia; Prüfung auf Reinheit). Abgedruckt in Pharm. Ind. 55, Heft 10/92 und Heft 2/93.
- 19** Reinberger, S. (2011). Wachposten des Immunsystems. *Spektrum Wiss.* 12: 15–18.
- 20** Kikuchi, Y. et al. (2017). Collaborative study on the bacterial endotoxins test using recombinant Factor C-based procedure for detection of lipopolysaccharides. *Pharm. Med. Dev. Regul. Sci.* 48 (4): 252–260.
- 21** Kikuchi, Y. et al. (2018). Collaborative study on the bacterial endotoxins test using recombinant Factor C-based procedure for detection of lipopolysaccharides. Part 2. *Pharm. Med. Dev. Regul. Sci.* 49 (10): 706–718.
- 22** Bauernfeind, A. und Shah, P.M. (1995). *Lexikon der Mikrobiologie und der Infektiologie*, 2. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer.
- 23** Weiß, A., Barth, H. und Schmidt, H. (2018). *Bakterielle Toxine. Molekulare Struktur, Funktionsweise und Nachweisysteme*. Hamburg: Behr's Verlag.
- 24** Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D. und Clark, D. (2012). *Brock Biology of Microorganisms*, 13. Aufl., S. 831. San Francisco: Pearson Education, Inc.
- 25** Ryan, K.J. und Ray, C.G. (2004). *Sherris Medical Microbiology. An Introduction to Infectious Diseases*, 4. Aufl., S. 165. New York: MacGraw-Hill.

Biographische und historische Daten zu Medizinern und Naturwissenschaftlern finden sich in den folgenden Nachschlagewerken:

- Krafft, F. und Meyer-Abich, A. (1970). *Große Naturwissenschaftler. Biographisches Lexikon*. Frankfurt am Main, Hamburg: Fischer Bücherei. Das Buch ist antiquarisch erhältlich. Eine leicht gekürzte Fassung ist im Marxverlag erschienen.
- Hoffmann, D., Laitko, H. und Müller-Wille, S. (Hrsg.) (2007). *Lexikon der bedeutenden Naturwissenschaftler*, 3 Bde. München: Spektrum Akademischer Verlag.
- Störig, H.J. (2004). *Kleine Weltgeschichte der Wissenschaft*, 2 Bde. Köln: Parkland.