

# Klinische Endpunkte bei der Tollwutimpfstoffprüfung

Joachim Hartinger, Tamara Folz und Klaus Cussler  
Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen

## Zusammenfassung

Alle warmblütigen Tiere, einschließlich des Menschen, sind anfällig für Tollwut. Die Infektion mit dem Virus führt unvermeidlich zum Tod. Impfstoffe und Antiseren sind derzeit die einzige erfolgreich nutzbare Möglichkeit, um Tollwutinfektionen zu verhindern. Um die Herstellung von sicher wirksamen und unschädlichen Impfstoffen sicherzustellen, muß derzeit jede Charge auch mittels Tierversuchen getestet werden. Alleine für Wirksamkeitstests von Tollwutimpfstoffen werden bei jeder Charge weit über hundert Mäuse eingesetzt. Dafür werden in Belastungsexperimenten die Sterblichkeitsraten von immunisierten Tieren mit ungeimpften Kontrolltieren verglichen. Derzeit gibt es für diesen Test mehrere Ersatzmethoden. Allerdings sind die Akzeptanz und die Anforderungen an diese Methoden in gesetzlichen Bestimmungen sehr unterschiedlich. Lediglich in der europäischen Arzneibuchmonographie für inaktivierte Veterinärimpfstoffe wurden vor kurzem Ersatzmethoden für die Wirksamkeitsprüfung aufgenommen. Die international z.B. in den Richtlinien der WHO (World Health Organization) oder des O.I.E. (Office International d'Epizooties) notwendigen Änderungen werden vorhersehbar noch mehrere Jahre beanspruchen, weshalb dieser Versuch weltweit vorerst weiterhin in großem Maßstab durchgeführt wird.

Um die Leiden der Versuchstiere zu vermindern, haben wir deshalb nach Kriterien gesucht, die verwendet werden können, um die Letalität als Endpunkt zu ersetzen. Hierfür wurden Protokollblätter entwickelt, auf denen die zu erwartenden klinischen Zeichen sowie Temperatur und Gewicht aufgezeichnet wurden. Die mit transplantierten Transpondern messbare Abnahme der Körpertemperatur trat erst zu einem sehr späten Zeitpunkt auf und konnte nicht sinnvoll genutzt werden. Eine deutliche Abnahme des Körpergewichtes ist bei der Labormaus das früheste Anzeichen der Erkrankung. Verlangsamte und kreisförmige Bewegungen, gefolgt von Krämpfen und Lähmungen, sind die ersten neurologischen Symptome der Tollwut. Die Kombination dieser beiden Parameter kann verlässlich als „Humaner Endpunkt“ dienen. Im Durchschnitt erspart das den Mäusen zwischen vier und fünf Tage der belastendsten Phase des Experiments und ist ein deutliches „refinement“ der Durchführung im

Sinne der 3R. Ein Video, in dem der Tierversuch und die klinischen Zeichen vorgestellt werden, ist mittlerweile erhältlich.

**Summary:** Clinical endpoints during rabies vaccine control tests.

All warm-blooded animals, including humans, are susceptible to rabies. The infection with the virus leads inevitably to the death of the recipient. Vaccines and anti-serums are at present the only possibility to prevent rabies infections in the human and veterinary medicine. In order to be able to guarantee the production of a reliably safe and effective vaccine, each batch has to be tested. These tests contain animal experiments. Alone for efficacy tests of rabies vaccines done for each batch far over one hundred mice are used. In a defined time period in challenge experiments the number of deaths rates of immunised animals are compared with non vaccinated control animals. At present several replacement methods for this test are in development. However, so far none of them has been validated in an international multicenter study. The modifications necessary for example in the WHO (World Health Organization) or O.I.E. (Office International d'Epizooties) guidelines will need several more years. Therefore, this test method will be internationally used in the foreseeable future. In order to avoid unnecessary suffering of the animals, we looked for signs, which can be used to replace lethality as criterion. For this purpose score-sheets were developed, on which the observed clinical signs were recorded. The decrease of body-temperature, which was measured with transplanted transponders, occurred too late to be usable. A clear reduction of the body weight is the earliest sign of an illness. Slow and circular movements, followed by cramps and paralyses, are the first neurological symptoms of rabies. The combination of these parameters can serve as a reliable indicator for humane endpoints. This saves the mice on average between four and five days of the most stressful phase of the experiment and is a clear "refinement" of the test conditions in the sense of the 3R. A video which shows the clinical signs is available.

**Keywords:** 3R, refinement, efficacy tests, humane endpoints, rabies, vaccine

## 1 Einführung

Tollwut ist eine sehr alte Krankheit und in der ganzen Welt verbreitet. In Europa und Asien hat sich die Tollwut beim Menschen verringert oder ist beständig, aber in eini-

gen Ländern Afrikas oder Amerikas steigt sie an. Seit 1990 ist in den europäischen Ländern die Zahl der Tollwutfälle bei Wildtieren durch Immunisierungskampagnen um 80% verringert worden, 1999 konnte die Schweiz sogar „tollwutfrei“ er-

klärt werden (WHO, 1997; Zanoni et al., 2000).

Alle Säuger und auch der Mensch können mit Tollwut infiziert werden. Das Virus tritt durch virushaltigen Speichel, der meist nach dem Biß eines kranken Tieres

in eine Wunde gelangt, in den Körper ein. Dort wird das Virus innerhalb der Nervenzellen zum Rückenmark transportiert, von wo es das Gehirn erreicht. Dort vermehrt und verbreitet es sich und zerstört unterschiedliche Bereiche. Das führt zu den klassischen Zeichen von Tollwut wie Wasserscheue und Krämpfe. Im akuten Stadium herrschen Zeichen von Hyperaktivität (Tollwut) oder Paralyse (stille Wut) vor, bis die Lähmung zunimmt und das Koma erreicht ist.

Auch heute ist die Schutzimpfung die einzige Möglichkeit, diese Krankheit zu bekämpfen. Die Impfstoff-Forschung begann bereits 1882, als der französische Wissenschaftler Louis Pasteur entdeckte, daß Tollwut durch Agenzien übertragen wird, die so klein waren, daß sie unter einem Mikroskop nicht mehr gesehen werden konnten. Er entwickelte Techniken, um das Virus in Tieren kultivieren zu können und abzuschwächen, und entwickelte schließlich einen Impfstoff, mit dem er erfolgreich Menschen behandelte, die durch rasende Hunde gebissen wurden.

Inaktivierte Impfstoffe werden aus infektiösem Material hergestellt. Ihre Produktion ist ein biologischer Prozeß und kann dementsprechend Veränderungen unterworfen sein. Um die Herstellung von sicheren und verlässlich wirksamen Impfstoffen konsistenter Qualität zu gewährleisten, muß jeder Herstellungsschritt genau kontrolliert werden. Da die Produkte in der Regel weltweit verkauft werden, sind die Prüfmethoden auf Unschädlichkeit und Wirksamkeit unter anderem in der Europäischen Pharmakopöe (*Ph. Eur.*), dem *Code of Federal Regulations* (CFR), den WHO- und O.I.E.-Richtlinien gesetzlich festgelegt. Sie enthalten auch zahlreiche Tierversuche. Die Protokolle dafür sind detailliert ausgeführt und standardisiert. In der Praxis werden alleine für Wirksamkeitstests mindestens 120 Mäuse für jede Impfstoff-Charge eingesetzt, was sich z.-B. in Deutschland pro Jahr auf 10 bis 20.000 Tiere addiert (Weißer und Hechler, 1997). Die dafür eingesetzten Mäuse werden vor allem durch die Infektion und den dadurch bedingten Krankheitsverlauf stark belastet.

Das Leiden der Tiere im Versuch muss dabei auf das notwendige Minimum reduziert werden. Die Belastung, die dieser *Challenge-Test* hervorruft und die große Zahl von Mäusen, die verbraucht werden,

machen die Notwendigkeit eines „*refinement*“ sehr deutlich.

Während bereits seit längerem Bemühungen existieren, diesen Belastungstest durch *in vitro* Methoden zu ersetzen, ist er noch immer Bestandteil aller behördlicher Anforderungen. Hier wird deshalb ein alternatives Prüfkonzept vorgestellt, das klinische Endpunkte zur Begrenzung der Leiden im Versuch heranzieht (Morton, 1995; Svendsen et al., 1997). Wir zeigen, daß spezifisches Verhalten, Abnahme des Körpergewichts und (in geringerem Ausmaß) abnehmende Körpertemperatur verlässlich als Humane Endpunkte verwendet werden können, und schlagen vor, diese klinischen Zeichen anstelle vom Tod als Endpunkte zu definieren.

## 2 Tiere, Material und Methoden

### 2.1 Tiere

Je zehn weibliche NMRI-Mäuse mit einem Anfangsgewicht von 11 bis 15 Gramm (Charles River, D-Sulzfeld) wurden bei 23°C, Futter und Wasser *ad libitum* und einem 12stündigen Hell-Dunkelrhythmus in Makrolon Typ III Käfigen, angereichert mit Hobelspänen, Zellulosestreifen und Papphäuschen, gehalten. Die Käfige wurden einmal wöchentlich gereinigt. Vor Versuchsbeginn wurde den Tieren eine Eingewöhnungszeit von einer Woche gegeben.

Die hier vorgestellte Studie wurde im Rahmen von Routineprüfungen gemäß Monograph 216 „Tollwut-Impfstoff für Menschen aus Zellkulturen“ oder Monograph 451 „Tollwut-Impfstoff für Tiere“ des Europäischen Arzneibuchs durchgeführt, um den Einsatz zusätzlicher Tiere zu vermeiden.

### 2.2 Ergebnisse

Die Tiere wurden mit verschiedenen Impfstoffverdünnungen geimpft. Zwei Wochen später wurden die Mäuse unter Narkose durch eine intrazerebrale Injektion mit Tollwutviren infiziert. Die Anzahl der Tiere, die bei den jeweiligen Verdünnungen vor der Infektion geschützt werden, gibt ein Maß für die Wirksamkeit des Impfstoffes. Die Tiere, die das Injektionsprozedere überlebten, wurden über die nächsten 14 Tage sorgfältig beobachtet. Auf Protokollblättern (s. Abb. 1) wurden zweimal täglich klinische Zeichen, das Körpergewicht, die Körpertemperatur und das Ver-

halten der Tiere aufgezeichnet. In diese Untersuchung wurden über 200 Mäuse einbezogen.

### 2.2.1 Klinische Zeichen

Die ersten Zeichen von Tollwut treten nicht vor dem 4. Tag nach der Belastung auf. Vor dieser Zeit auftretende Anzeichen von Erkrankung sind höchstwahrscheinlich auf die intrazerebrale Injektion oder andere Umstände, die nicht mit der Infektion zusammenhängen, zurückzuführen. Deshalb werden diese Tiere aus dem Experiment genommen. Die klinischen Zeichen von Tollwut nehmen progressiv zu, und es kann zwischen 2 bis 6 Tagen dauern, bis die Tiere verenden.

Die folgenden 5 Stadien wurden bei mit Tollwut infizierten Mäusen beobachtet:

► Stadium 1: Gesträubtes Fell, aufgekrümmter Rücken

Ein rauhes, gesträubtes Fell oder ein bukeliger Rücken sind erste, unspezifische Zeichen der Erkrankung, die auch bei vielen anderen Krankheiten beobachtet werden.

Die klinischen Zeichen in Stadium 1 zeigen bereits, daß sich das Tier nicht wohlfühlt und kränktelt.

► Stadium 2: Verlangsamte Bewegungen, Kreisbewegungen

In der 2. Phase reagieren die Tiere verzögert und bewegen sich langsamer als üblich. Häufig zeigen sie Kreisbewegungen in eine Richtung.

Das sind die ersten klinischen Anzeichen einer neurologischen Störung.

► Stadium 3: Unsichere Bewegungen, Zittern, Krämpfe

In Phase 3 werden die neurologischen Zeichen deutlicher. Die Tiere zittern und bewegen sich unsicher, Krämpfe können auftreten und von außen durch Berührung hervorgerufen werden. Zu diesem Zeitpunkt ist ein Gewichtsverlust bereits deutlich messbar.

In diesem Stadium beobachten wir definitiv Zeichen einer Infektion mit Tollwutviren.

► Stadium 4: Lähmungszeichen

Erste Anzeichen von Lähmungen und Paresen, üblicherweise beginnend bei den Hinterbeinen, sind klare Indikatoren einer progressiv verlaufenden Tollwutinfektion. Diese gehen schnell in eine komplette Lähmung über. Die Tiere sind deutlich ausgetrocknet.

Tier-Nr.		Tage nach der Infektion													
		-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	Körpergewicht [g]*	22,2	22,3	21,6	21,9	22,1	22,3	21,8	21,2	18,5	16,9	15,4	14,2	13,9	
	Temperatur [°C]	38,1	38,4	37,5	37,8	37,9	37,8	37,9	37,7	37,1	36,5	35,7	34,0	33,7	
	Klinische Zeichen	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	4	5	
	- Rauhes Fell								X	X	X	X	X	X	
	- Gekrümmter Rücken								X	X	X	X	X	X	
	- Verlangsamte Bewegungen								X						
	- Kreisbewegungen								X	X					
	- Zittern									X	X				
	- Unsichere Bewegungen										X				
	- Krämpfe										X	X	X		
	- Paresen											X	X		
	- Lähmungen, Paralyse												X		
	- Kraftloses Liegen													X	
	- Agonie, Koma													X	

Abb. 1: Protokollblatt für Tollwut-Impfstoffwirksamkeitstests Bemerkungen: Die Maus wurde am 12. Tag tot aufgefunden.

► Stadium 5: Moribunde Tiere, Koma  
In Phase 5 werden die Tiere zunehmend moribund. Sie wirken erschöpft und liegen gelegentlich auf der Seite. Offensichtlich können sie nicht mehr trinken und fressen. Dennoch überleben in der Endphase viele Tiere noch ein oder zwei Tage in komatösem Zustand.

Die Infektion von Mäusen mit Tollwut-Viren ist durch einen langsam fortschreitenden Krankheitsverlauf gekennzeichnet und beginnt normalerweise etwa 4 bis 6 Tage nach der Infektion. Im Gegensatz zu vielen andern Säugern zeigen Mäuse keine Anzeichen von Aggression.

Keine Maus, die Stadium 3 erreichte, erholte sich wieder, alle starben einige Tage später. Auch alle Tiere, die in Stadium 3 beschriebene Zeichen aufwiesen und deren Körpergewicht schon über 15% abgenommen hatte, starben im Verlauf der Infektion. Das regelmäßige Auftreten dieser klinischen Zeichen eröffnet demnach die Möglichkeit, das Experiment zu beenden und dadurch den Tieren einen langsam fortschreitenden Tod zu ersparen, ohne wissenschaftliche Daten zu verlieren.

### 2.2.2 Körpergewicht

Das Körpergewicht der Tiere wurde mit einer elektronischen Waage gemessen und auf Protokollblättern festgehalten. Die Anästhesie und die intrazerebrale Infektion mit Tollwut-Viren hatte kurzfristig einen negativen Effekt auf das Körpergewicht. Deshalb wurde das Gewicht der Tiere vom 2. Tag nach der Belastung als Basis für die Bestimmung des Gewichtsverlusts festgelegt. Abbildung 2 ist zu entnehmen, daß die Gewichtsabnahme ein sehr früher Indikator einer Infektion ist und messbar wird, bevor klinische Zeichen auftreten. Das Gewicht nahm kontinuierlich ab, und seine Reduktion konnte kurz vor dem Tod zwischen 30 und 50% betragen. Die alleinige Gewichtsabnahme von 20% ergab bereits einen brauchbaren Parameter als Endpunkt.

### 2.2.3 Körpertemperatur

Um die Körpertemperatur berührungslos messen zu können, wurden temperatursensitive Transponder (Plexx, NL-Elst), die mit einem Identifikationscode ausgestattet waren, dorsal unter die Haut der Mäuse implantiert. Die Transponderwerte wur-

den zweimal täglich mit einem Lesegerät abgefragt. Interessanterweise trat bei den Mäusen keine Fieberreaktion auf. Im späteren Verlauf der Infektion wurde jedoch eine Hypothermie immer deutlicher. Allerdings trat sie zu spät auf, um sinnvoll als Endpunkt verwendet werden zu können.

## 3 Diskussion

Das Auftreten typischer klinischer Zeichen und die Abnahme des Körpergewichts können als geeignete Endpunkte bei der Tollwutinfektion der Labormaus herangezogen werden. Wenn ein Gewichtsverlust von mindestens 15% zusammen mit klinischen Anzeichen neurologischer Funktionsstörungen auftritt, haben die Tiere einen „point of no return“ erreicht. Der tödliche Verlauf der Infektion ist unausweichlich. Die Berücksichtigung beider Parameter gemeinsam erlaubt die Beendigung des Experiments sogar zu einem früheren Zeitpunkt, als jeder einzeln für sich betrachtet, und kann das Leiden der Tiere um durchschnittlich drei bis fünf Tage verringern (Cussler et al., 1998).

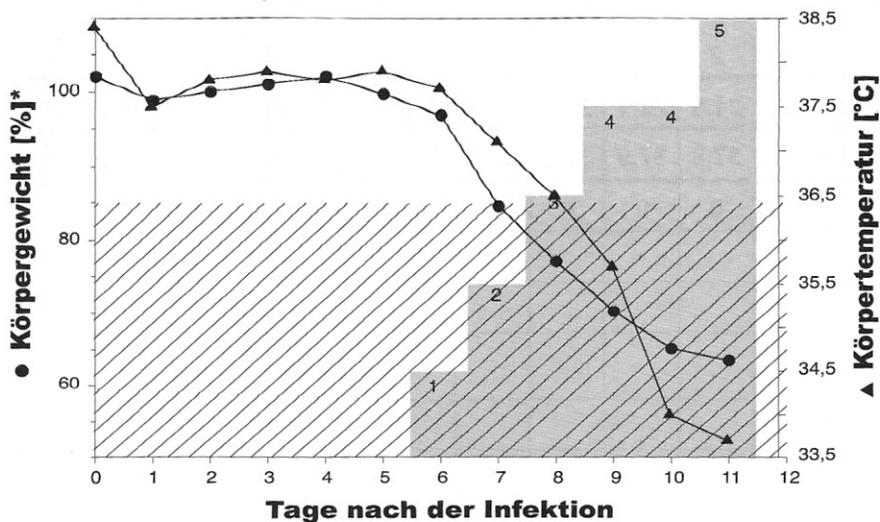


Abb. 2: Entwicklung klinischer Zeichen, Körpergewicht und -temperatur während der Tollwutinfektion (schattierter Bereich: Gewichtsverlust > 15%)  
\* normalisiert am Tag 2 nach der Infektion

Ein zweckmäßiges Protokollblatt ist die einzige Ausrüstung, die zur Einführung früherer Humaner Endpunkte benötigt wird. Die klinischen Zeichen sind nicht schwer zu beurteilen und das Tierpflegepersonal kann entsprechend trainiert werden, die verschiedenen Krankheitsstadien zu erkennen. Für die Gewichtsmessung ist noch eine geeignete Wägeeinrichtung und vor allem ein zusätzlicher Zeitaufwand notwendig. Berücksichtigt man dabei noch das erhöhte Infektionsrisiko des Personals und den zusätzlichen Stress für die Versuchstiere, ist die dadurch erhaltene Verbesserung möglicherweise nicht mehr verhältnismäßig.

Wir halten es aufgrund der hier vorgestellten Daten für geboten, im Interesse des Tierschutzes humane Endpunkte bei Wirksamkeitsprüfungen von Tollwutimpfstoffen vorzuschreiben.

Wir möchten darüber hinaus anregen, ähnliche Untersuchungen in anderen Testsituationen durchzuführen, weil dadurch möglicherweise unnötige Schmerzen oder Belastungen von Tieren auch in anderen Bereichen vermieden werden können.

#### Danksagung

Für die finanzielle Unterstützung des Projektes und der Videoproduktion danken wir der Doerenkamp-Zbinden Stiftung, CH-Chur.

Für die Konzeption und Herstellung des Videofilmes „Humane Endpoints Replace Lethal Parameters in Batch Potency Tests of Rabies Vaccines“ danken wir The HELP Group Humane Endpoints in Animal Experiments Biomedical Research, NL-Bilthoven.

#### Literatur

- Brown, F., Cussler, K. and Hendriksen, C. F. M. (eds.) (1996). Replacement, Reduction and Refinement of Animal Experiments in the Development and Control of Biological Products. *Dev. Biol. Stand.* 86. Basel: Karger.
- Cussler, K., Morton, D., B. and Hendriksen, C. F. M. (1998). Humane Endpoints as a Replacement for the Estimation of Lethality Rates in the Potency Testing of Rabies Vaccines. *ALTEX 15 (Suppl.)*, 40-42.
- Morton, D. B. (1995). Advances in refinement in animal experimentation over the past 25 years. *ATLA 23 (Suppl.)*, 812-822.
- O.I.E. (1996). Manual of standards for diagnostic tests & vaccines, List B Diseases, Chapter 3.1.5. Rabies.
- Ph. Eur. (1999). Monograph 216 *Vaccinum rabiei ex cellulis ad usum humanum*, und Ph. Eur. monograph 451 *Vaccinum rabiei inactivatum ad usum veterinarium*.
- Robinson, P. A. (1984). Rabies Virus. In R. B. Belshe (ed.), *Textbook of Human*

- Virology* (1. Edition: 490). Littleton, MA: PSG Publishing Company, Inc.
- Svendsen, O., Sandoe, P. and Thorn, N. A. (1979). Laboratory animal science, welfare and ethics in Pharmacology and Toxicology. *Pharmacology & Toxicology 80 (Suppl.)*, 3-5.
- Weisser, K. and Hechler, U. (1997). *Animal Welfare aspects in the quality control of immunobiologicals. A critical evaluation of the animal tests in pharmacopoeial monographs*. FRAME, ECVAM and PEI (eds.), Nottingham, UK: Russel & Burch House.
- WHO World Survey of Rabies N° 33 for the year 1997.
- Zanoni, R. G., Kappeler, A., Müller, U. M. et al. (2000). Tollwutfreiheit der Schweiz nach 30 Jahren Fuchstollwut - Rabies free status of Switzerland after 30 years of fox rabies. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde 142 (8)*, 423-429.

#### Korrespondenzadresse

Dr. Joachim Hartinger  
Paul-Ehrlich-Institut  
Postfach  
D-63207 Langen  
Tel. +49-6103-77 80 04  
Fax +49-6103-77 12 34  
E-mail: harjo@pei.de