



# Ist die tierexperimentelle Prüfung auf anomale Toxizität für Impfstoffe, Sera und Immunglobuline noch zeitgemäß?

## Eine retrospektive Datenanalyse zur Überprüfung der Aussagekraft der Arzneibuchvorschrift V.2.1.5

Beate Krämer, Margit Nagel, Karin Duchow, Michael Schwanig, Klaus Cußler

Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen

### Zusammenfassung

Das Deutsche Arzneibuch (DAB)\* fordert für Impfstoffe, Immenserum und Immunglobuline eine Prüfung auf anomale Toxizität (ATT) an Mäusen und Meerschweinchen als Verträglichkeitskriterium. Mittels einer retrospektiven Datenanalyse wurde an fast 6000 ATTs die Relevanz dieser Prüfung im Zeitalter einer GMP- und GLP-gerechten Produktion untersucht.

Die Prüfung auf anomale Toxizität wurde in den Prüflabors der verschiedenen Impfstoffhersteller erheblich variiert; die unterschiedlichen Vorgehensweisen betrafen sowohl Auswahl der Tierart, Anzahl der Versuchstiere, Beobachtungszeitraum als auch Impfstoffdosierung und -verabreichung. Durch die Datenanalyse konnten Zusammenhänge zwischen Unverträglichkeitsreaktionen der Versuchstiere und einzelnen Präparatgruppen, Impfstoffkomponenten und Zusatzstoffen aufgedeckt werden. Es wurden außerdem hochsignifikante Unterschiede zwischen Herstellern und Paul-Ehrlich-Institut (PEI) bezüglich der Häufigkeit auffälliger Testergebnisse bei der Testung gleicher Produktchargen gefunden. Auffällige Testergebnisse konnten in keinem Fall auf die unzureichende Qualität einer Produktcharge zurückgeführt werden. Umgekehrt wurde keine in der Praxis unverträgliche Impfstoffcharge vorher durch den ATT identifiziert; der Test ist deshalb als Prädiktor für qualitativ minderwertige Chargen ungeeignet.

Der Test auf anomale Toxizität wurde in allen Fällen, zum Teil jedoch erst in der Wiederholungsprüfung, bestanden. Somit gab es im Erfassungszeitraum weder eine Zurückhaltung einer Charge durch einen Impfstoff-

hersteller noch eine Zurückweisung seitens der Behörde. In der bisher praktizierten Form hat der anomale Toxizitätstest aufgrund des gewählten Tiermodells und der fragwürdigen Übertragbarkeit auf die Zielspezies nur geringe Aussagekraft. Unter Tierschutzaspekten ist die Beibehaltung dieses Testes nicht mehr zu verantworten und sollte deshalb aus dem DAB gestrichen werden, zumal Toxizitätsprüfungen anderer Art in verschiedenen Variationen bei der Impfstoffentwicklung und als Inprozesskontrollen bei der Impfstoffherstellung durchgeführt werden.

*Summary: Is the abnormal toxicity test still relevant for the safety of vaccines, sera and immunoglobulins?*

*A retrospective analysis of data on the relevance of the Pharmacopoeia requirement V.2.1.5*

*The German Pharmacopoeia (DAB) requires the abnormal toxicity test (ATT) using mice and guinea pigs as a non-specific safety test for vaccines, sera and immunoglobulins. The purpose of this project was to investigate the relevance of ATT after the introduction of GMP- and GLP-principles in the manufacturing of biological products.*

*A great variability in the test performance became evident for the different test laboratories, involving the animal species, the animal number as well as the vaccine dosage, administration and test duration.*

*The retrospective analysis of ATT results revealed reasons for the incompatibility of particular preparation groups, vaccine components or additives with the animal species used. There were highly significant differences between the manufacturers and the PEI regarding the frequency of deviating test results for identical test batches. Positive ATTs never resulted from the insufficient quality of a batch. On the other hand vaccines causing adverse reactions in the target species were not identified by the ATT. For these reasons the abnormal toxicity test is unsuitable to detect harmful batches. The results of the analysis of data show that finally the ATT has always been passed, i.e. there was no retention by*

\* **Verzeichnis der Abkürzungen:** AMG=Arzneimittelgesetz, ATT=Prüfung auf anomale Toxizität (abnormal toxicity test), DAB=Deutsches Arzneibuch, GLP=Good Laboratory Practice, GMP=Good Manufacturing Practice, DPT=Diphtherie-Pertussis-Tetanus, EP=Europäische Pharmacopöe, HER=Hersteller, PEI=Paul-Ehrlich-Institut, SKIA=Staatliches Kontrollinstitut für immunbiologische Arzneimittel, UAW=Unerwünschte Arzneimittelwirkung, WHO=World Health Organization

*the vaccine manufacturers and no refusal by the controlling authorities due to the ATT-results.*

*Considering the present animal model and the questionable transferability of the test results to the target species only a poor reliability is evident. Taking into account aspects of drug safety and animal welfare it is recommended to the DAB to omit the ATT.*

*Keywords: abnormal toxicity, safety test, quality control, reduction of animal tests, vaccines*

## 1 Einleitung

Impfstoffe, Immunsera und Immunglobuline sind Arzneimittel, deren Qualität aufgrund unvermeidbarer biologischer Schwankungen während des Herstellungsprozesses kontinuierlich überwacht und geprüft werden muß. Grundsätzlich dürfen nur solche Impfstoffchargen in den Verkehr gebracht werden, deren Qualität, Wirksamkeit, und Unbedenklichkeit dem Stand der Wissenschaft entsprechend nachgewiesen worden ist (§32 AMG, 1994). Auf nationaler Ebene sind die Richtlinien für diese Qualitätskontrollen im Deutschen Arzneibuch (DAB 10, 1991) und in der Impfstoffverordnung Tiere (1993) vorgegeben, in der Europäischen Pharmakopöe (EP, 1986) sind die Qualitätsuntersuchungen für den europäischen Geltungsbereich festgeschrieben. Als Unschädlichkeitsprüfung wird der Test auf anomale Toxizität (ATT) in der Vorschrift V.2.1.5 für jede Impfstoffcharge an der Endabfüllung gefordert. Dadurch soll gewährleistet werden, „daß im gesamten Produktionsprozeß – einschließlich der Abfüllung und gegebenenfalls der Gefrierdrying – keine anomal toxischen Substanzen in das Präparat gelangt sind“ (Schneider, 1986). Für die praktische Durchführung dieser Toxizitätsprüfung sind in den Impfstoff-Monographien im allgemeinen folgende Vorgehensweisen vorgeschrieben:

Bei der Prüfung von Sera und Impfstoffen für Menschen erhalten 5 Mäuse jeweils eine Humandosis, aber höchstens 1 ml intraperitoneal (i.p.), 2 Meerschweinchen wird ebenfalls je eine Humandosis, maximal aber 5 ml i.p., verabreicht.

Für die Testung von Veterinärimpfstoffen und Sera werden 5 Mäusen jeweils 0,5 ml subkutan (s.c.) injiziert, 2 Meerschweinchen erhalten je 2 ml i.p. bzw. s.c., wenn in der Impfstoffzubereitung Zusatzstoffe enthalten sind.

Die Injektionsvolumina sind so gewählt, daß die Dosen einerseits groß genug sein sollen, um bei vorhandener Kontamination eine toxische Reaktion auslösen zu können und andererseits so niedrig gehalten sind, daß ein Effekt durch die Substanz selbst ausgeschlossen werden kann (Gommer, 1991).

Zeigen die Tiere innerhalb von sieben Tagen keine pathologischen Reaktionen, gilt die Prüfung als bestanden. Stirbt eines der Tiere oder zeigt Krankheitsanzeichen, wird die Prüfung wiederholt. Sobald zwei oder mehr Tiere sterben, entspricht die getestete Substanz der Prüfung nicht.

Dem Kommentar zum DAB 9 sind als Bewertungskriterien für diesen Test zu entnehmen, daß die Versuchstiere sieben Tage *post vaccinationem* zu überleben und eine Gewichtszunahme als Nachweis für das fehlende Auftreten von „Reaktionen allgemeiner Art“ aufzuweisen haben (Schneider, 1986).

Die Aussage dieser Prüfung auf anomale Toxizität wird somit lediglich durch die Beurteilung von Gesundheitszustand und Überlebensrate der Versuchstiere getroffen. Es stellt sich hierbei die Frage, wie zuverlässig die Testaussage in Anbetracht dieser unspezifischen Bewertungskriterien ist, bzw. ob und in welchen Maße die Reaktionen der Versuchstiere im Test durch das relativ große Injektionsvolumen und die damit verbundene Aufkonzentrierung von Adjuvantien, Zusatz- und Konservierungsstoffen beeinflusst werden.

Schon Anfang dieses Jahrhunderts gab es für das Diphtherieserum zur Kontrolle des zugesetzten Phenolgehalts eine Unschädlichkeitsprüfung an Mäusen (Otto, 1906; Marxer, 1915). Dieser Tierversuch wurde auch für die später entwickelten Diphtherie-Impfstoffe beibehalten (Otto und Hensch, 1935; Prigge, 1935). Kontaminationen mit Tetanustoxin wurden durch Tests an Meerschweinchen ausgeschlossen, wobei auch hier Gesundheitszustand und Überleben der Versuchstiere als Indikatoren für das Vorhandensein bzw. Freisein schädlicher Beimengungen galten (Otto, 1906).

Seit den vierziger Jahren wurden von internationalen Expertengremien (*US National Institute of Health*, WHO) Minimalanforderungen für Impfstoffe und Sera erarbeitet, die neben impfstoffspezifischen Tests auch den unspezifischen „*safety-test*“ an Mäusen und/oder Meerschweinchen beinhaltete.

Zu Beginn der fünfziger Jahre wurde diese Vorschrift auch für die mittlerweile in großtechnischer Produktion hergestellten Antibiotika als Reinheitskontrolle etabliert, um Verunreinigungen bzw. unbekannte Faktoren, die unabhängig von dem eigentlichen Produkt während des Herstellungsprozesses entstanden sein könnten und deren negative Auswirkungen auf den Zielorganismus befürchtet wurden, auszuschließen (Gommer, 1991).

Im Laufe der Entwicklung und Ausdifferenzierung der Qualitätskontrolle von Impfstoffen und Sera ist der ATT aufgrund der relativ einfachen Durchführbarkeit als Endproduktprüfung, zum Teil mit einigen Modifikationen, in fast allen Prüfvorschriften biologischer Arzneimittel integriert worden, ohne daß die Aussagekraft für das jeweilige Produkt begründet oder belegt wurde. Früher mag dieser Tierversuch mangels differenzierter Testmethoden und aufgrund der damaligen Produktionsbedingungen eine wichtige Prüfgröße innerhalb der Qualitätskontrolle gewesen sein. Da jedoch inzwischen eine Impfstoffpro-

duktion unter GLP- (*Good Laboratory Practice*) und GMP- (*Good Manufacturing Practice*) Bedingungen internationaler Standard ist, sind toxische Verunreinigungen während des Herstellungsprozesses extrem unwahrscheinlich geworden (Ronneberger, 1993). Sowohl innerhalb der pharmazeutischen Industrie als auch bei den Kontrollbehörden wurde deshalb in den letzten Jahren immer häufiger die Frage nach der Relevanz dieser Prüfung für die Qualitätskontrolle von Immunpräparaten gestellt.

Die vorliegende retrospektive Datenanalyse sollte eine fundierte Bewertung der Aussagefähigkeit des ATT ermöglichen und eine Basis für die Modifikation bzw. Abschaffung dieser Prüfvorschrift liefern. Von besonderer Bedeutung war hierbei die Frage, ob auffällige Testergebnisse Ursache für die Zurückweisung von Impfstoffchargen durch die Kontrollbehörde waren. Außerdem sollte ermittelt werden, wieviele Chargen bei den firmeninternen Prüfungen den Anforderungen nicht genügten und deshalb erst gar nicht zur Freigabe eingereicht wurden. Dabei interessierten neben der Häufigkeit auch die Gründe für das Nichtbestehen der Tests. Weiterhin sollte der Einfluß von spezifischen Faktoren auf den ATT, wie zum Beispiel das Vorhandensein von Adjuvantien und anderen Zusatzstoffen, analysiert werden. Nicht zuletzt sollten auch Erfahrungen aus der Prüfpraxis des ATT und Einschätzungen der Impfstoffhersteller einbezogen werden.

## 2 Material und Methoden

Grundlage der Erhebung waren die dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) vorliegenden Anträge der Hersteller auf Chargenfreigabe für die in Deutschland zugelassenen Präparate sowie die Protokolle von anomalen Toxizitätstests, die in der Kontrollbehörde selbst durchgeführt worden waren.

Darüber hinaus wurden Informationen zu Versuchsbedingungen, Testdurchführung und Bewertungskriterien im ATT direkt von den

jeweiligen Prüflabors der Impfstoffproduzenten mittels Fragebogen eingeholt.

In der Datenerhebung wurden neben den differenzierten ATT-Ergebnissen auch Angaben über spezifische Inhalts- und Zusatzstoffe der Immunpräparate erhoben.

Über einen Zeitraum von drei Jahren wurden alle durchgeführten Chargenprüfungen kontinuierlich erfaßt. Die Daten des Veterinärbereichs wurden von 1989 bis 1991 erfaßt, da für diesen Zeitraum eine große Anzahl von Testergebnissen vorlag; seit 1992 wurde der ATT in der Veterinärabteilung des PEI nicht mehr als Routineprüfung durchgeführt.

Bei den Präparaten zur Anwendung am Menschen wurden alle zwischen 1991 und 1993 durchgeführten ATTs erfaßt.

Die statistische Datenauswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. B. Schneider aus dem Fachbereich Biometrie der Medizinischen Hochschule in Hannover.

Die Datenbanken wurden in Excel 4.0 erstellt, statistische Analysen mit dem SPSS-Programm Windows 6.0 ausgeführt.

Als Einheit der statistischen Auswertung wurde die getestete Charge gewählt. Die Zielgröße der Auswertung war die Häufigkeit auffälliger Befunde (gesamt oder spezifiziert nach Gewichtsverlust, Krankheitszeichen oder Tod), die – entsprechend der Fragestellung – entweder auf die Zahl der durchgeführten ATTs oder auf die dabei eingesetzten Tierzahlen bezogen wurde.

Zum Vergleich verschiedener Gruppen von Chargen (z. B. verschiedener Impfstoffarten, Testorte u.ä.) wurden die mittleren Häufigkeiten von auffälligen Befunden innerhalb der jeweiligen Gruppen ermittelt und Unterschiede zwischen den Gruppen mit einer Varianzanalyse und dem F-Test überprüft.

Zum Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Auffälligkeiten (ordinal charakterisiert als „keine Auffälligkeiten“, „negative Gewichtsentwicklung“, „Krankheit“ oder „Tod“)

zwischen Testungen oder Impfstoffgruppen wurde der Chi<sup>2</sup>-Test, zum Teil in der Modifikation nach Kruskal-Wallis, angewandt.

Gezielte produktspezifische Einzelrecherchen wurden durchgeführt, wenn Präparate/Präparatengruppen Auffälligkeiten in Zusammenhang mit der Prüfung auf anomale Toxizität oder Besonderheiten in der Impfpraxis aufwiesen.

Im Rahmen dieser Recherchen wurden neben den Untersuchungsprotokollen aus spezifischen Toxizitätstests sowie Endotoxin- oder Pyrogentests auch Meldungen über unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) ausgewertet bzw. wurde systematisch nach Impfwischenfällen in der Praxis geforscht. Dokumente des Staatlichen Kontrollinstitutes der ehemaligen DDR (SKIA) über klinische Beobachtungen von Impfungen sowie Verträglichkeitsprüfungen an Versuchstieren konnten teilweise in die Auswertung einbezogen werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Erhebung und statistische Auswertung der Daten

In die retrospektive Datenerhebung gingen 416 Präparate von 48 Impfstoffherstellern ein, in dem Erfassungszeitraum wurde bei 5896 Chargen von Herstellern und/oder vom PEI die Prüfung auf anomale Toxizität am Endprodukt durchgeführt.

Zusätzlich prüften zehn Hersteller einen Teil ihrer Produkte auch während des Herstellungsprozesses im ATT. Diese 282 Inprozeß-ATTs wurden in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt, da es sich hierbei nicht um die in der Prüfvorschrift definierten Tests am Endprodukt handelte.

Während der Datenerhebung zeigte sich, daß zwischen den verschiedenen Prüflabors eine große Variabilität bezüglich Testdurchführung, Bewertungskriterien sowie der Protokollierung der Testergebnisse vorlag. Bei fast 25 % der Chargenprüfungen wick die Testdurchführung

von der allgemeinen Prüfvorschrift ab: Die Abweichungen betrafen Tierzahl, Tierspezies, Ausgangsgewicht der Versuchstiere, Injektionsvolumina, Applikationsweise oder Beobachtungszeitraum und Testdauer.

In der Beurteilung des ATT wurden ebenfalls erhebliche Unterschiede gefunden. Einige Hersteller maßen den Gesundheitszustand der Versuchstiere an hausintern festgelegten Kriterien, wie zum Beispiel an einer positiven Gewichtsentwicklung oder dem Aussehen und Verhalten der Tiere, andere führten zur vergleichenden Beurteilung in jedem ATT Kontrolltiere mit.

Wiederholungsprüfungen wurden von einigen Prüflabors schon dann durchgeführt, wenn die Gewichtszunahme eines Versuchstieres zu gering ausfiel, für andere dagegen rechtfertigte nur der Tod eines Versuchstieres eine Testwiederholung.

Auch innerhalb der Versuchsdokumentation gab es viele Varianten: Von einer detaillierten Gewichterfassung beider Spezies bis hin zu dem einzigen Wort „pass“ als Testergebnis waren alle Abstufungen in den verschiedenen Protokollen zu finden.

Die hier dargestellten Unterschiede in der Prüfpraxis des ATT konnten zwar im einzelnen nicht in die vergleichende Datenuntersuchung eingehen, sind jedoch für die Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung.

pretation der Ergebnisse von Bedeutung.

Nachfolgend (Tab. 1) sind die erhobenen Veterinär- und Humandaten differenziert nach Impfstoffart dargestellt.

Der ATT wurde dann als auffällig bewertet, wenn während des Testverlaufs Gewichtsverluste, pathologische Reaktionen oder Todesfälle bei den Versuchstieren beobachtet wurden. Die auffälligen Ergebnisse aus den Chargentests hatten jedoch in keinem Fall eine Zurückhaltung dieser Chargen durch den Hersteller bzw. eine Zurückweisung durch die Kontrollbehörde zur Folge, da die Prüfungen in der Wiederholung jeweils bestanden wurden.

Aus den Daten wird ersichtlich, daß große Unterschiede in der Häufigkeit auffälliger Testergebnisse bestehen: Die Gesamtquote auffälliger ATTs ist bei den Herstellern mit ca. 1 % wesentlich geringer als im PEI, wo in 15 bis 21 % der Fälle Auffälligkeiten beobachtet wurden. Mittels eines t-Tests, in den alle gemeinsam getesteten Präparate eingingen, wurden diese Unterschiede sowohl für die Veterinär- als auch für die Humanprodukte als hoch signifikant ( $P < 0,01$ ) eingestuft.

Übereinstimmungen von auffälligen Testergebnissen zwischen Herstellern und PEI wurden lediglich bei 2 Präparaten in 4 Chargenprüfungen gefunden.

Eine differenzierte Untersuchung der Versuchstierreaktionen ergab, daß im Veterinärbereich weitaus häufiger die Meerschweinchen, im Humanbereich dagegen fast in allen Fällen die Mäuse pathologische Reaktionen zeigten.

In Anbetracht der geringen Konkordanz zwischen Hersteller- und PEI-Ergebnissen sowie der Diskrepanz zwischen Erst- und Wiederholungsprüfungen wurde untersucht, welche Faktoren die Testergebnisse beeinflussen. Die Untersuchung der Häufigkeit der auffälligen Testergebnisse in Abhängigkeit von der Impfstoffart sollte präparatspezifische Einflüsse aufdecken. Die Differenzierung der Daten nach den Herstellerfirmen bzw. Prüflabors sollte mögliche Effekte der Prüfpraxis aufzeigen. Durch die Einteilung der Veterinärpräparate in Abhängigkeit von Impfstoffzusätzen sollten Zusatzstoffspezifische Einflüsse aufgedeckt werden.

Die Verteilung der Auffälligkeiten innerhalb und zwischen den gebildeten Gruppen wurde sowohl chargenbezogen als auch hinsichtlich der Versuchstierreaktionen analysiert.

Die Untersuchung in Abhängigkeit von der Art der Impfstoffe erbrachte lediglich für die Gruppe der DPT-Impfstoffe deutliche Hinweise auf einen präparatspezifischen Effekt (Tab. 2): Hier wurden sowohl für die Häufigkeit auffälliger ATTs als auch

**Tabelle 1: Retrospektive Analyse von anomalen Toxizitätstests, auffälligen Testergebnissen und Versuchstierzahlen**

Immunologische Produkte	Veterinärprodukte				Humanprodukte				Versuchstiere*	
	Tests der Hersteller ATTs	aATTs (%)	Tests im PEI ATTs	aATTs (%)	Tests der Hersteller ATTs	aATTs (%)	Tests im PEI ATTs	aATTs (%)	Anzahl Mäuse	Meerschw.
virale Präparate	452	7 (1,5)	431	84 (19,5)	1368	14 (1)	0		9248	4409
bakterielle Präp.	268	0	122	29 (23,8)	1169	20 (1,7)	167	31 (18,3)	8725	3365
Kombinationspräp.	284	2 (0,7)	158	35 (22,2)	0		0		2574	815
mykologische Präp.	13	0	0		0		0		65	26
Diagnostika	0		0		76	2 (2,6)	3	0	318	106
Immuntherapeutika	0		0		77	3 (3,9)	48	1 (2,1)	631	218
Immunsera, -globuline	56	0	8	0	1677	10 (0,6)	0	0	8632	3481
<b>Gesamt:</b>	<b>1073</b>	<b>9 (0,8)</b>	<b>719</b>	<b>148 (20,6)</b>	<b>4367</b>	<b>49 (1,1)</b>	<b>218</b>	<b>32 (14,7)</b>	<b>30193</b>	<b>12420</b>
t-Test:	P<0,01				P<0,01					

ATT = Test auf anomale Toxizität; \* = von Herstellern und im PEI eingesetzte Versuchstiere; aATT (%) = auffällige Tests (Häufigkeit der auffälligen Tests); t-Test: für die Chargen, die sowohl von Herstellern als auch im PEI geprüft wurden

**Tabelle 2: DPT-Impfstoffe**

	Chargentests			Tierreaktionen										
	ATTs	a ATT	aATT %	Mäuse	Gew.	Path.	Tod	Ges. %	Meerschw.	Gew.	Path.	Tod	Ges. %	
HER DPT-Impfst.	345	12	3,5	1725	2	3	7	0,7	690	1	3	0	0,6	
übrige Präp.	4022	37	0,92	17375	1	0	4	0,03	8042	13	1	2	0,2	
<b>ANOVA</b>			n.s.		n.s.	***	***	n.s.		n.s.	***	n.s.	n.s.	
PEI DPT-Impfst.	21	14	66,7	90	53	0	7	66,7	20	0	0	0	0	
übrige Präp.	197	18	9,14	982	33	0	1	3,46	311	0	0	0	0	
<b>ANOVA</b>			***		***		***	***						

ATT = Test auf anomale Toxizität; Path. = pathologische Reaktionen während des Tests; aATT = auffällige Testergebnisse; Ges. % = Gesamtheit der auffälligen Tierreaktionen in Prozent; Mäuse = Gesamtzahl der im ATT eingesetzten Mäuse; ANOVA = Einfache Varianzanalyse; Meerschw. = Gesamtzahl der im ATT eingesetzten Meerschweinchen; \*\*\* = hochsignifikant ( $P < 0,01$ ); Gew. = Gewichtsverluste während des Testverlaufs; n.s. = nicht signifikant

für die Reaktionen der Labortiere signifikante Unterschiede im Vergleich zu den übrigen Humanpräparaten gefunden.

Im PEI wurden bei der Testung von DPT-Impfstoffen signifikant häufiger auffällige Testergebnisse erzielt als bei der Prüfung anderer Präparate. Für die Herstellerdaten zeigte sich eine Tendenz zu erhöhten Auffälligkeitsraten bei DPT-Impfstoffen.

Auf der Ebene der Versuchstierreaktionen gab es sowohl bei Herstellern als auch im PEI signifikante Unterschiede im Vergleich zwischen DPT- und den übrigen Präparaten, hierbei wurden hauptsächlich bei Mäusen auffällige Reaktionen im ATT beobachtet.

Für die übrigen Human- und Veterinärimpfstoffe konnten keine signifikanten präparatspezifischen Effekte nachgewiesen werden.

Lediglich die Gruppe der Immuntherapeutika zeigte gegenüber den restlichen Humanpräparaten eine signifikant höhere Anzahl von Gewichtsverlusten bei den Meerschweinchen während der Prüfung im ATT.

Aufgrund wiederholter Beobachtungen von pathologischen Versuchstierreaktionen bei der Prüfung von Präparaten, die als Adjuvantien Öl, Aluminiumhydroxid oder Saponin bzw. zur Konservierung Phenol oder Thiomersal enthielten, wurden diese Zusatzstoffe als problematisch für Labortiere eingestuft, und das Auftreten auffälliger Testergebnisse

wurde in Abhängigkeit dieser Zusätze statistisch untersucht. Nachfolgend (Tab. 3) wurde die Häufigkeit auffälliger Testergebnisse für die Gruppen ohne, mit einem oder mit Kombinationen aus verschiedenen Zusatzstoffen untersucht.

Bei den Herstellern war die Anzahl der auffälligen Tests insgesamt sehr gering, innerhalb der Präparatgruppen mit Zusatzstoffen traten sie jedoch ausschließlich bei aluminiumhydroxidhaltigen Produkten auf. Signifikante Gruppenunterschiede wurden nicht gefunden.

Die PEI-Daten zeigten insgesamt in allen Gruppen eine wesentlich höhere Auffälligkeitsrate, der Unterschied in Abhängigkeit der Zusatzstoffe war hier hoch signifikant. Die höchste Auffälligkeitsrate wurde auch hier bei den Präparaten, die eine Kombination aus verschiedenen Zusätzen enthielten, gefunden.

In einer weiteren statistischen Untersuchung wurde für jede einzelne Zusatzstoffgruppe bzw. jede Kombination, sofern es aufgrund der Anzahl der durchgeführten Tests möglich war, die Häufigkeit der jeweiligen Auffälligkeiten gegenüber der Gruppe ohne Zusätze mittels Chi<sup>2</sup>-Test geprüft. Innerhalb der PEI-Daten wurde ein signifikanter Effekt der Zusatzkombinationen Aluminiumhydroxid und Thiomersal ( $P < 0,05$ ) gefunden (vgl. Tab. 3).

Die Untersuchung der Häufigkeit auffälliger Testergebnisse in Abhängigkeit der unterschiedlichen Prüflabors erbrachte keine signifikanten

Unterschiede zwischen den einzelnen Herstellern.

### 3.2 Studie des Paul-Ehrlich-Institutes über Reaktionen der Versuchstiere

Im Rahmen einer in der Veterinärabteilung des PEI durchgeführten Studie wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten alle Versuchstiere im ATT zusätzlich einer Sektion unterzogen, um auch organisch-pathologische Befunde in die Testbeurteilung mit einbeziehen zu können. Die makroskopische Beurteilung der Injektionsstelle ergab, daß die Impfschubstanz häufig als komplettes Depot an dem Ort der Injektion verblieb. In vielen Fällen fanden sich auch Ablagerungen und entzündliche Hautveränderungen in der Umgebung der Injektionsstelle, oft entwickelte sich ein deutlicher Abszeß, teilweise mit entzündlicher Infiltration des umliegenden Gewebes. Vereinzelt kam es zu erheblichen Schwellungen der Lymphknoten im Einzugsgebiet. Diese Befunde wurden als lokale Reaktionen zusammengefaßt.

Unter systemischen Reaktionen wurden pathologische Organveränderungen unter Einbeziehung von nicht näher definierten Ablagerungen auf einzelnen Organen sowie extreme Abmagerungen und Verschlechterungen des Allgemeinzustandes (struppiges Fell, schwankender Gang) der Versuchstiere subsumiert.

**Tabelle 3: Problematische Zusatzstoffe und auffällige ATTs**

Produkte	Art der Zusätze		Tests der Hersteller		Tests im PEI	
			ATTs	aATTs (%)	ATTs	aATTs (%)
ohne Zusätze		ges.	230	3 (1,3)	240	46 (19,2)
mit einem Zusatzstoff	Aluminiumhydroxid (Al.)		238	1 (0,4)	80	11 (13,8)
	Thiomersal (Th.)		126	0	80	21 (26,3)
	Saponin (Sa.)		7	0	3	0
	Phenol (Ph.)		67	0	22	3 (13,6)
	Öl		64	0	120	22 (18,3)
	ges.		502	1 (0,2)	305	57 (18,7)
mit Zusatzstoff-Kombinationen	Al. + Th.		212	1 (0,5)	130	38 (29,2)*
	Al. + Sa.		54	4 (7,4)	7	4 (57,1)
	Al. + Ph.		43	0	11	0
	Th. + Sa.		0	0	2	1 (50,0)
	Th. + Öl		17	0	15	1 (6,67)
	Ph. + Öl		0	0	3	0
	Al. + Th. + Sa.		9	0	3	1 (33,3)
	Al. + Th. + Ph.		6	0	3	0
	ges.		341	5 (1,5)	174	45 (25,9)
Chi <sup>2</sup> -Test:				n.s.		***

ges = Gesamtzahl; ATT = Test auf anomale Toxizität; aATT (%) = auffällige Tests (Häufigkeit der auffälligen Tests); Chi<sup>2</sup>-Test: Vergleich der Häufigkeit auffälliger Tests zwischen den Gruppen; \* = signifikant (P<0,05); \*\*\* = hoch signifikant (P<0,01); n.s. = nicht signifikant

Die folgende Tabelle (Tab. 4) stellt die Reaktionen von Mäusen und Meerschweinchen dar, die Häufigkeit der pathologischen Befunde wurde in Abhängigkeit der Impfstoffgruppe (inaktivierte Impfstoffe bzw. inaktivierte Komponenten, Lebendimpfstoffe und Immunsere) für die beiden Versuchstierspezies statistisch untersucht.

Sämtliche Todesfälle und Gewichtsreduktionen sowie der überwiegende Anteil der systemischen und lokalen Reaktionen waren in der Gruppe der inaktivierten Impfstoffe zu finden. Sowohl im Chi<sup>2</sup>-Test als auch in dem auf Rangunterschiede basierenden Kruskal-Wallis-Test war der Unterschied zwischen den Gruppen sowohl für Mäuse als auch für Meerschweinchen hoch signifikant (P<0,01).

Eine weitergehende Differenzierung ergab, daß systemische Reaktionen der Mäuse ausschließlich bei inaktivierten bakteriellen Impfstoffen, Todesfälle nur bei inaktivierten viralen Präparaten vorkamen, und

daß mit einer Ausnahme alle Reaktionen bei der Prüfung von Schweineimpfstoffen auftraten.

Die Meerschweinchen zeigten sowohl bei inaktivierten bakteriellen und viralen Impfstoffen systemische Reaktionen, auch konnte hier keine Häufung der Reaktionen in Abhängigkeit der Zieltierspezies beobachtet werden.

Die Reaktionen der beiden Versuchstierspezies unterschieden sich signifikant (P<0,01).

### 3.3 Einzelfallrecherchen

Für ausgewählte Präparate, die im Verlauf der Testdurchführung des ATTs auffällige Befunde zeigten, wurde die Verträglichkeit an der Zieltierspezies überprüft. Dazu wurden dem PEI vorliegende Meldungen über unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) ausgewertet. Für den Erfassungszeitraum ergaben sich, soweit recherchierbar, keine Zusammenhänge zwischen Unverträglichkeiten bei den Impfungen und auffälligen

Befunden bei den Versuchstieren. Auch solche Chargen, die in beiden Prüflabors, also sowohl bei dem Hersteller als auch im PEI Auffälligkeiten im ATT aufwiesen (DPT, inaktivierter Schweinevirusimpfstoff), wurden in der Praxis gut vertragen.

Für einzelne Chargen von Veterinärpräparaten gab es wiederholt Meldungen über unerwünschte Arzneimittelwirkungen in der Praxis. Es wurde über Abzeßbildungen, allergische Reaktionen, anaphylaktische Schocks, Krankheitsausbrüche und auch von Todesfällen berichtet.

Die bei den Herstellern für diese Chargen durchgeführten Tests auf anomale Toxizität waren bis auf eine Ausnahme alle im ersten Testdurchlauf ohne Auffälligkeiten bestanden worden. Auch die Wiederholungsprüfung, die für eine Charge aufgrund des Todes eines Meerschweinchens notwendig wurde, war negativ. Die Chargenprüfungen in der Kontrollbehörde verliefen alle unauffällig.

**Tabelle 4: PEI-Studie: Statistische Untersuchung der Versuchstierreaktionen in Abhängigkeit der Impfstoffgruppe**

Impfstoffgruppe	Reaktionen: Mäuse					Reaktionen: Meerschweinchen					
	keine (%)	lokal (%)	syst. (%)	Tod (%)	Gesamt	keine (%)	lokal (%)	Gew. (%)	syst. (%)	Tod (%)	Gesamt
i / li	196 (41)	269 (56)	10 (2)	6 (1)	481	22 (14)	117 (73)	3 (2)	17 (10)	1 (1)	160
l	115 (96)	5 (4)	0	0	120	39 (87)	4 (9)	0	2 (4)	0	45
s	5 (100)	0	0	0	5	7 (100)	0	0	0	0	7
Gesamt	316 (52)	274 (45)	10 (2)	6 (1)	606	68 (32)	121 (57)	3 (1)	19 (9)	1 (1)	212
Chi <sup>2</sup> -Test / Kruskal-Wallis-Test:						***					

i/li = Inaktivierte Impfstoffe bzw. inaktivierte Komponenten; syst. = systemische Reaktionen; l = Lebendimpfstoffe; Gew. = negative Gewichtsentwicklung; s = Immenser; (%) = Häufigkeit der jeweiligen Reaktion; Chi<sup>2</sup>-Test: Vergleich der Häufigkeit auffälliger Reaktionen zwischen den Impfstoffgruppen; \*\*\* = hoch signifikant (P<0,01); Kruskal-Wallis-Test: Modifikation des Chi<sup>2</sup>-Tests unter Einbeziehung von Rangunterschieden

Eine Charge eines Viruslebensimpfstoffes, die bei den geimpften Rindern schwere Schocksymptome ausgelöst hatte, wurde in der Kontrollbehörde einer zusätzlichen anomalen Toxizitätsprüfung unterzogen. Das ATT-Ergebnis der fraglichen Charge unterschied sich nicht von den Testergebnissen zweier mitgeführter Kontrollen, alle waren unauffällig. Auch die anatomisch-pathologische Untersuchung der Versuchstiere ergab keinerlei auffällige Befunde.

Diese Beispiele zeigen, daß das Bestehen des anomalen Toxizitätstests kein sicheres Maß für die tatsächliche Verträglichkeit einer Impfstoffcharge bei den Zieltieren ist.

Die Bestimmung der Endotoxinwerte von Chargen, die in der Impfpraxis zu schweren Schockreaktionen bei den Impfungen geführt hatten, zeigte, daß in vielen Fällen ein stark erhöhter Endotoxingehalt vorlag. Für eine Charge eines adsorbieren Rinderimpfstoffes war der Endotoxingehalt mehr als doppelt so hoch als eine mittlerweile in Kraft getretene Monographie als Höchstgrenze zuläßt. Bei der Prüfung dieser Charge im ATT zeigten die Meerschweinchen ausgeprägte pathologische Reaktionen, die Mäuse waren davon nicht betroffen.

Bei einem inaktivierten bakteriellen Impfstoff für Schweine traten infolge erhöhter Endotoxinwerte ebenfalls pathologische Reaktionen bei Meerschweinchen im ATT auf.

Da für Humanprodukte lediglich schwere Nebenwirkungen, und diese

oft ohne Chargenbezug, bei der zuständigen Behörde gemeldet wurden, konnte keine vergleichende Untersuchung von ATT-Ergebnissen und Unverträglichkeiten an einzelnen Chargen angestellt werden. Es wurde jedoch, soweit verfügbar, Datenmaterial aus der Impfstoffkontrollbehörde der ehemaligen DDR (SKIA) ausgewertet, da hier sämtliche Impfstoffchargen nach der Unverträglichkeitsprüfung an Labortieren zusätzlich einer klinischen Prüfung am Menschen unterzogen wurden. Es zeigte sich, daß die Verträglichkeit einer Impfstoffcharge für Labortiere und Menschen nicht in allen Fällen übereinstimmte. Eine Charge eines Tetanusimpfstoffes, die den Tierversuch ohne Auffälligkeiten bestanden hatte, mußte zum Beispiel aufgrund klinischer Unverträglichkeiten zurückgezogen werden. Umgekehrt zeigten bei der Prüfung einer Charge sämtliche Meerschweinchen pathologische Reaktionen, hingegen wurde der Impfstoff von den Probanden sehr gut vertragen.

Auch hier wird deutlich, daß allein durch das Bestehen dieses Testes keine eindeutigen Schlüsse über die Verträglichkeit eines Produktes am Menschen möglich sind.

#### 4 Diskussion

Als wichtigstes Ergebnis dieser Untersuchung ist festzuhalten, daß auch weit über den Erfassungszeitraum hinaus kein einziger Fall einer Zurückhaltung einer Charge durch Her-

steller, bzw. eine Zurückweisung durch die Kontrollbehörde aufgrund einer nicht bestandenen Prüfung auf anomale Toxizität ermittelt werden konnte. Damit wurde der ATT bzw. der „safety“- oder „innocuity-test“ bei einer Größenordnung von schätzungsweise einigen zehntausend Prüfungen in den letzten Jahren immer bestanden. Es wurden zwar verschiedentlich pathologische Reaktionen und Todesfälle bei den Versuchstieren im ATT beobachtet; da diese jedoch in den Wiederholungsprüfungen nie bestätigt werden konnten, wurde somit in jeder Testwiederholung ein der Erstprüfung konträres Ergebnis ermittelt. Die im ATT aufgetretenen auffälligen Testergebnisse wurden von den Prüfern in der Regel als unspezifische Versuchstierreaktionen gewertet oder anderen Einflußfaktoren zugeschrieben.

Zur Klärung der Ursachen dieser Auffälligkeiten wurden das Auftreten und die Häufigkeit auffälliger Testergebnisse für Hersteller und PEI analysiert und nach möglichen Einflußfaktoren gesucht.

Die statistische Auswertung der gesamten Daten erbrachte signifikante Unterschiede in der Häufigkeit auffälliger Tests zwischen Herstellern und dem PEI. Übereinstimmend auffällige Testergebnisse wurden lediglich bei vier getesteten Chargen gefunden.

Aufgrund dieser Resultate muß die Frage nach der Reliabilität und der Validität dieses Testsystems gestellt werden. Ein Test wird als reliabel

bezeichnet, wenn er bei der Wiederholung einer Messung unter gleichen Bedingungen mit denselben Proben zu dem gleichen Ergebnis wie in der Erstprüfung führt. Das ist beim Test auf anomale Toxizität bei keiner Wiederholungsprüfung der Fall gewesen. Auch die sich aus dieser Definition ergebende notwendige Übereinstimmung zwischen Hersteller- und PEI-Ergebnissen bei Testung gleicher Proben ist nicht vorhanden. Die Validität bezeichnet die Gültigkeit eines Testsystems und stellt ein Maß für die Genauigkeit der Messung dar. Im Falle des ATT sollen die Verunreinigung einer Impfstoffcharge aufgedeckt und die Verträglichkeit beurteilt werden. Diese Anforderungen erfüllt der Test nur ungenügend, was allein schon durch die recherchierten falschnegativen Ergebnisse (vgl. 3.3) deutlich wird. Auch eine in der ehemaligen DDR aufgetretene schwere Verunreinigung einer Charge durch Verwendung eines natriumazidhaltigen Puffers, die bei den Impfungen zu klinischen Reaktionen geführt hatte, konnte durch die Unschädlichkeitsprüfung an Versuchstieren nicht aufgedeckt werden.

Ein präparatespezifischer Einfluß auf die Testergebnisse wurde für DPT ermittelt: Bei der Prüfung von DPT-Impfstoffen wurden im PEI signifikant häufiger auffällige Tests als bei den übrigen Humanpräparaten gefunden. Auch stellten einige Hersteller fest, daß insbesondere Produkte mit einer Ganzkeim-Pertussiskomponente häufiger pathologische Reaktionen bei den Versuchstieren im ATT auslösten, was zur Folge hatte, daß in einigen Labors den Mäusen eine geringere Dosis der Prüfsubstanz verabreicht wurde.

Ein Zusammenhang zwischen der Verträglichkeit an Labortieren und der Art der Pertussiskomponente wurde im *National Institute of Health* in den USA festgestellt (Gupta et al., 1988). Die Untersuchungen von Bhandari et al. (1990) zur Verträglichkeit in Abhängigkeit von Impfstoffdosis und Applikationsweise führten zu der Empfehlung, den

Mäusen im „*innocuity test*“ nur eine halbe Humandosis i.p. der DPT-Adsorbat-Impfstoffe zu injizieren. Auch in Deutschland wurde in einem Nachtrag zum DAB verfügt, daß Verhaltensstörungen von Mäusen in den ersten drei Tagen nach der Injektion eines pertussishaltigen Präparates nicht als Indikation für eine anomale Toxizität gewertet werden. Die niederländische Kontrollbehörde akzeptiert aufgrund dieser präparatspezifischen Effekte bei Pertussiskomponenten eine dritte Wiederholungsprüfung im ATT (Hendriksen, 1988).

Ein weiterer Einflußfaktor für das Auftreten von auffälligen Testergebnissen wurde durch die Auswertung der Veterinärdaten ermittelt. Präparate, die Kombinationen aus den Zusatzstoffen Aluminiumhydroxid, Thiomersal und Saponin enthielten, zeigten deutlich höhere Auffälligkeitsraten als die übrigen Veterinärprodukte. Verschiedene Hersteller beobachteten vermehrt pathologische Reaktionen ihrer Versuchstiere bei der Testung von aluminiumhydroxidhaltigen Präparaten. Diese Reaktionen wurden in der Regel toleriert, wenn sie im Beobachtungszeitraum reversibel waren.

Im Zusammenhang mit Saponin berichtet Daalsgard et al. (1990) über Beeinträchtigung der Vitalität von Labortieren. Dies wurde auch von einigen Prüflabors bestätigt und führte im PEI dazu, daß kaum noch saponinhaltige Präparate im ATT geprüft werden. Da das Ausmaß der Versuchstierreaktionen von dem Reinheitsgrad des Saponins abhängig ist, testen inzwischen einige Impfstoffhersteller jede Saponincharge an Mäusen. Die Bewertung der Reaktionen der Versuchstiere im ATT erfolgt dann in Bezug auf die in der Saponinprüfung beobachteten Reaktionen. Die Problematik einer eindeutigen Testbeurteilung liegt hierbei insbesondere in der unterschiedlichen Akzeptanz dessen, was von den jeweiligen Prüfern als unvermeidlich, weil Zusatzstoffspezifisch, hingenommen wird oder was als nicht bestanden gilt.

Weitere Einflußfaktoren, die das Auftreten auffälliger Ergebnisse im ATT begünstigen, konnten durch die Gesamtdatenanalyse nicht gefunden werden.

Die Studie des PEI zeigte jedoch eine signifikante Häufung auffälliger Testergebnisse in der Gruppe der inaktivierten Impfstoffe bzw. der Präparate, die inaktivierte Komponenten enthielten. Da gerade inaktivierte Impfstoffe häufig die als problematisch eingestuften Adjuvantien, Konservierungsmittel oder Rückstände aus Inaktivierungsprozessen enthalten, kann dieses Ergebnis auch in Zusammenhang mit den Zusatzstoffspezifischen Einflußfaktoren gesehen werden. Aufgrund der zu geringen Fallzahl war es jedoch nicht möglich, die Daten aus der Studie in Abhängigkeit von den einzelnen Zusatzstoffen statistisch zu untersuchen.

Außerdem deckte die Studie hoch signifikante Unterschiede in den Reaktionen der beiden Versuchstierspezies auf (vgl. 3.2). Auffällige Reaktionen der Mäuse entsprachen nicht den beobachteten Auffälligkeiten der Meerschweinchen bei den einzelnen Impfstoffgruppen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Reaktivität muß auch die verschiedentlich diskutierte Möglichkeit einer Reduktion der im ATT eingesetzten Spezies auf eine Art (Hendriksen et al., 1994) in Zweifel gezogen werden.

Durch die Einzelrecherchen konnte gezeigt werden, daß die an Impfungen beobachteten pathologischen Reaktionen in keinem Fall mit einem entsprechend auffälligen Ergebnis in der Prüfung auf anomale Toxizität einhergingen. Umgekehrt ließ sich auch kein Zusammenhang von im ATT auffälligen Chargen und besonderen Impfreaktionen herstellen. Auch hier wurde deutlich, daß der ATT keine gesicherten Aussagen über Qualität und Unbedenklichkeit einer Impfstoffcharge zuläßt.

## 5 Schlußfolgerung und Empfehlungen

Zusammenfassend kann man festhalten, daß die Prüfung auf anomale Toxizität weder den Kriterien der Reliabilität noch der Validität in dem Maße genügt, daß zuverlässige Testergebnisse erwartet werden können.

Die sich daraus ergebende Unsicherheit der Aussage dieser Prüfung wird noch dadurch verstärkt, daß Fehlinterpretationen der Testergebnisse aufgrund von präparat- und Zusatzstoffspezifischen Einflüssen möglich sind.

Durch das unspezifische Testsystem können, wenn überhaupt, nur grobe Verunreinigungen aufgedeckt werden; diese sind jedoch unter den heutigen, streng kontrollierten Produktionsbedingungen nach GLP- und GMP-Standards nicht mehr zu erwarten.

Aus Tierschutzaspekten (vgl. Tierzahlen in Tab. 1) und in Anbetracht der unzuverlässigen Testergebnisse sollte der Test auf anomale Toxizität gänzlich aus den Prüfvorschriften gestrichen werden. Die verschiedentlich diskutierte und von der Europäischen Pharmakopöe für einige Präparate bereits festgeschriebene Möglichkeit der Verlagerung des ATT in die Qualitätskontrolle des *final bulk* hätte zwar eine Reduzierung der Versuchstierzahlen zur Folge, dürfte aber genauso wenig wie die Prüfung am Endprodukt zur Identifizierung von Unverträglichkeiten beitragen.

Zur Bewertung der Qualität einer Impfstoffcharge müßten bereits vorhandene Testsysteme verstärkt herangezogen bzw., wenn nötig, neue entwickelt werden. Sterilitäts- und Identitätsprüfungen reichen zur Überprüfung der Reinheit des Endproduktes aus, wobei sich die Identitätsprüfungen nicht allein auf die arzneilich wirksamen Bestandteile beschränken sollten. Qualitätsminderungen von einzelnen Produktchargen, die zum Beispiel auf einen überhöhten Endotoxingehalt zurückzuführen sind, können weitaus zuverlässiger durch den routinemäßi-

gen Einsatz spezifischer Testsysteme (LAL-Test) nachgewiesen werden.

In der neuesten Fassung der EP (im Druck) wird in der allgemeinen Monographie der „Impfstoffe für Tiere“ der Test auf anomale Toxizität nicht mehr vorgeschrieben. Als *safety test* wird eine spezifische Toxizitätsprüfung am Zieltier mit der doppelten Dosis bei inaktivierten Präparaten bzw. zehnfachen Dosis bei Lebendimpfstoffen als ausreichend erachtet. Konsequenterweise sollte daher der ATT im Allgemeinen Teil der EP (V.2.1.5) und in der Monographie „Immunsere für Tiere“ ebenfalls gestrichen werden.

Bei den immunologischen Arzneimitteln zur Anwendung am Menschen ist die Bereitschaft, auf den ATT zu verzichten, wesentlich geringer. Die Relevanz dieses Tests wird jedoch immer wieder kritisch, insbesondere bei Neufassung einzelner Impfstoffmonographien diskutiert. In diesem Zusammenhang sei auf die Anmerkung von Castle (1995) verwiesen, daß die Streichung des ATT in Monographien für Blutprodukte offenbar in den Fällen, bei denen der Pyrogentest für Kaninchen beibehalten wurde, leichter durchsetzbar erschien. Inzwischen wird auch innerhalb der Expertengruppe 15 der EP die Frage nach der generellen Streichung des ATT für Humanpräparate erörtert. Eine Abschaffung der allgemeinen Prüfvorschrift (V.2.1.5), eventuell verbunden mit besonderen Ausnahmeregelungen für spezielle Produkte unter Anpassung der jeweiligen Versuchsbedingungen (zum Beispiel für pertussishaltige Präparate), sollte in Anbetracht dieser Untersuchungsergebnisse in naher Zukunft auch für den Humanbereich möglich sein.

### Literatur

Bhandari, S. K., Gupta, R. K. und Sharma, S. B. (1990). Testing of adsorbed diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) vaccine for freedom from abnormal toxicity. *Vaccine* 8, 105-106.

- Castle, P. (1995). Alternatives to animal testing: achievements and recent developments in the European Pharmacopoeia. *Dev. Biol. Standard.* 86, im Druck.
- Dalsgaard, K., Hilgers, L. und Trouve, G. (1990). Classical and new approaches to adjuvant use in domestic food animals. *Advances in veterinary science and comparative medicine* 35, 121-160.
- Gommer, A. M. (1991). Animal Usage in Quality Control of Pharmaceutical Products. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene Bilthoven, Report no. 319001001.
- Gupta, R. K., Saxena, S. N. und Sharma, S. B. (1988). Studies on the optimal conditions for inactivation of *Bordetella pertussis* organisms with glutaraldehyde for preparation of a safe and potent pertussis vaccine. *Vaccine* 6, 491-496.
- Hendriksen, C. (1988). Laboratory animals in Bacterial Vaccine Control and some Opportunities for Replacement, Reduction and Refinement. *ATLA* 16: 125-136.
- Hendriksen, C. F. M., Garthoff, B., Aggerbeck, H., Bruckner, L., Castle, P., Cußler, K., Dobbelaer, R., van de Donk, H., van der Gun, J., Lefrançois, S., Milstien, J., Minor, P. D., Mougeot, H., Rombaut, B., Ronneberger, H. D., Spieser, J.-M., Stolp, R., Straughan, D. W., Tollis, M. und Zigtermans, C. (1994). Alternatives to Animal Testing in the Quality Control of Immunobiologicals: Current Status and Future Prospects. ECVAM Workshop Report 4. *ATLA* 22, 420-434.
- Marxer, A. (1915). *Technik der Impfstoffe und Heilsera* (106-109). Braunschweig: Vieweg.
- Otto, R. (1906). Die staatliche Prüfung der Heilsera. *Arbeiten aus dem Königlichen Institut für Experimentelle Therapie zu Frankfurt a.M., Heft II*, Jena.
- Otto, R. und Hetsch, H. (1935). Die Prüfung und Wertbemessung der Diphtherieschutzimpfstoffe. *Arbeiten aus dem Staatsinstitut für Experimentelle Therapie und dem Georg-Speyer-Haus zu Frankfurt a. M., Heft 31*, Jena.
- Prigge, R. (1935). Die Wertbemessung der Diphtherie-Impfstoffe. *Arbeiten*

aus dem Staatsinstitut für experimentelle Therapie und dem Georg-Speyer-Haus zu Frankfurt a. M., Heft 32: 1–50.

- Ronneberger, H. (1993). Methoden zur Reduktion des Tierversuchs bei der Entwicklung und Qualitätskontrolle von biologischen Arzneimitteln. In H. Schöffl, H. Spielmann und F.-P. Gruber (Hrsg.), *Alternativen zu Tierversuchen in Ausbildung, Qualitätskontrolle und Herz-Kreislauf-Forschung* (169–173). Wien, New York: Springer-Verlag.
- Schneider, W. (1986). *Deutsches Arzneibuch 9, Kommentar*. Stuttgart: Apothekerverlag.

### Gesetze und Verordnungen

- Arzneimittelgesetz (1994). Bundesgesetzblatt, Teil I 2071.
- Deutsches Arzneibuch 10 (1991). *Gundlagenfassung und 1. Nachtrag*. Stuttgart: Deutscher Apothekerverlag.
- European Pharmacopoeia, 2nd Edition

(1986). *Abnormal toxicity V.2.1.5*. Sainte-Ruffine France: Maisonneuve S.A.

Impfstoffverordnung Tiere (1993). Bundesgesetzblatt, Teil I 1886.

U.S. Department Of Health, Education And Welfare (1945). Minimum Requirements: Cholera Vaccine. Bethesda.

U.S. Department Of Health, Education And Welfare (1946). Minimum Requirements: Diphtheria Antitoxin. Bethesda, 2. Rev.

U.S. Department Of Health, Education And Welfare (1947). Minimum Requirements: Diphtheria Toxoid. Bethesda, 4. Rev.

U.S. Department Of Health, Education And Welfare (1952). Minimum Requirements: Tetanus Toxoid. Bethesda, 4. Rev.

World Health Organisation (1959). Requirements for Poliomyelitis Vaccine (Inactivated), *In Requirements for Biological Substances, WHO Technical Report Series No. 178*, Geneva: 6, 17–27.

World Health Organisation (1966).

Requirements for Poliomyelitis Vaccine (Inactivated). *In Requirements for Biological Substances, Revised 1965, WHO Technical Report Series No. 323*, Geneva: 23–36.

### Danksagung

Das im Paul-Ehrlich-Institut durchgeführte Projekt zur „Untersuchung der Aussagekraft der Arzneibuchvorschrift V.2.1.5 über die Prüfung auf anomale Toxizität von Impfstoffen und Immunsere sowie Immunglobulinen“ wurde vom Bundesministerium für Forschung und Technologie im Rahmen des Förderprogrammes „Ersatzmethoden zum Tierversuch“ gefördert.

### Korrespondenzadresse:

Dr. Beate Krämer  
Paul-Ehrlich-Institut  
Bundesamt für Sera und Impfstoffe  
Postfach 17 40  
D-63207 Langen

