

Bestimmung des Tetanus-Antitoxingehaltes in humanen Immunglobulinen zur intravenösen Anwendung und in Tetanus-Immunglobulinen mittels Enzymimmuntest

Zur Einschränkung von Tierversuchen bei der staatlichen Chargenprüfung

Christian Mainka und Manfred Haase

Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, D-Langen

Zusammenfassung

Das Europäische Arzneibuch (Pharmakopöe) schreibt für die Prüfung auf Wirksamkeit von Tetanus-Immunglobulin vom Menschen einen Versuch im Meerschweinchen oder in der Maus vor. In der staatlichen Prüfung dieser Arzneimittel wurde gemäß Arzneibuchvorgabe verfahren (Maus-Test). Mit dem Ziel, den Bedarf an Versuchstieren in der staatlichen Chargenprüfung von Immunglobulinen einzuschränken, wurde von uns ein Bestimmungsverfahren für antitoxische Tetanus-Antikörper, die Enzymimmuntechnik (ELISA), erprobt. Insgesamt 51 Chargen von 19 verschiedenen Immunglobulinpräparaten von 10 Herstellern wurden im ELISA im Rahmen der staatlichen Chargen- und Zulassungsprüfung untersucht. Fast alle Tetanus-Immunglobuline erreichten bzw. überschritten den in Deutschland empfohlenen Gehalt von 250 IE/ml, der in den jeweiligen Zulassungsverfahren mit den pharmazeutischen Unternehmen festgelegt worden ist. Bei den normalen intravenösen Immunglobulinen schwankte der Titer präparateabhängig stark, jedoch überschreiten einige Präparate ohne weiteres den im Arzneibuch geforderten Gehalt von 50 IE/ml. Wegen der sofortigen Bioverfügbarkeit nach Applikation von normalen intravenösen Immunglobulinen wird die Frage des therapeutischen Nutzens des in ihnen enthaltenen Tetanus-Antitoxins diskutiert, falls dieser vom Hersteller deklariert würde. Die Meßergebnisse waren zuverlässig reproduzierbar. Aufgrund der Befunde konnten früher praktizierte Tierversuche zur Wertbemessung von Tetanus-Antitoxin weitgehend eingestellt werden.

Summary: Determination of tetanus antitoxin levels in human immunoglobulins for intravenous use and in tetanus immunoglobulins by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

The present European Pharmacopoeia monograph for human tetanus immunoglobulin specifies that the estimate of potency has to be performed in guinea pigs or mice. In the course of the state control of such products we have so far used the potency test in mice. Aimed at a reduction of the numbers of animals used for testing tetanus potency of immunoglobulins in the course of official batch release we have used the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). 51 batches of 19 different immunoglobulin preparations of 10 manufacturers were included. Almost all tetanus immunoglobulins contained more than 250 I.U. of tetanus antitoxin per millilitre as agreed with manufacturers during marketing authorization negotiations in Germany. Normal human immunoglobulins for intravenous use had – depending on individual products – lower and fluctuating tetanus antitoxin titers. However, some of them fulfil the Ph. Eur. monograph requirement of not less than 50 I.U./ml. The question is raised whether such products could be useful in treatment of persons with view to their immediate bioavailability, whenever the antitoxin titer is stated in particular on the package inserts. Our titration results were reliably reproducible. We have drawn the conclusion that we can largely renounce at animal tests when determining tetanus antitoxin potency in immunoglobulins.

Keywords: tetanus antitoxin determination, human normal immunoglobulin, human tetanus immunoglobulin, ELISA

Einleitung

Der staatlichen Prüfung von Immunglobulinen werden die relevanten Arzneibuch-Monographien zugrundegelegt. Die Anforderung des Europäischen Arzneibuchs (European Pharmacopoeia – Ph.Eur., 1991) an die Herstellung und Prüfung für Tetanus-Immunglobulin vom Menschen entspricht der Monographie „Immunglobulin vom Menschen zur intramuskulären Injektion“, mit Ausnahme der Mindestzahl von Spendern und der spezifischen Vorschriften zur Prüfung auf Wirksamkeit. Die Anforderungen an die Herstellung und Prüfung für „Normales Immunglobulin vom Menschen zur intravenösen Anwendung“ sind im Europäischen Arzneibuch gleichfalls beschrieben.

Zwar schreibt das Europäische Arzneibuch (European Pharmacopoeia, 1991) weiterhin die Prüfung auf Wirksamkeit von Tetanus-Immunglobulinen vom Menschen gegen das Toxin von *Clostridium tetani* am Tier vor, jedoch wird von uns der Tierversuch bei der staatlichen Chargen- und Zulassungsprüfung nur noch stichprobenweise und in Zweifelsfällen durchgeführt; seit 1992 war dies nicht mehr der Fall. Die Gründe dafür legen wir in dieser Veröffentlichung dar.

Die Hersteller sind jedoch weiterhin gehalten, die Wirksamkeit des Tetanus-Immunglobulin-Endproduktes im Tierversuch zu bestimmen. Dabei wird die zum Schutz von Meerschweinchen oder Mäusen gegen die paralyisierende bzw. tödliche Wirkung einer bestimmten Menge Toxins notwendige Minimaldosis mit der erforderlichen Dosis eines Standard-Tetanus-Antitoxins verglichen, das bei den Versuchstieren einen Schutz garantiert (European Pharmacopoeia, 1991). Zur Routineuntersuchung von Spenderseren und für Inprozess-Kontrollen setzen auch die Hersteller von Tetanus-Immunglobulinen in der Regel geeignete *in vitro* Testverfahren ein. Auch an normalen Immunglobulinzubereitungen werden häufig Tetanus-Antito-

xinbestimmungen durchgeführt, weil das Europäische Arzneibuch vorschreibt, daß mindestens ein bakterieller Antikörper, für den ein Internationaler Standard verfügbar ist, in zehnfacher Konzentration wie im Ausgangsmaterial für intramuskuläre Immunglobuline und in dreifacher Konzentration wie im Ausgangsmaterial für intravenöse Immunglobuline vorhanden sein muß. Bei der Auswahl der Antikörperbestimmung kann der Hersteller jedoch einen bakteriellen Antikörper seiner Wahl titrieren, es muß nicht Tetanus-Antitoxin sein.

Im Paul-Ehrlich-Institut ist in den vergangenen Jahren intensiv nach Alternativmethoden zum Ersatz des Tierversuchs zur Prüfung auf Wirksamkeit von Immunglobulinen gegen Tetanus-Toxin geforscht worden. Bei diesen langjährigen Untersuchungen ergab sich seit einiger Zeit eine eindeutige Präferenz für die Enzymimmuntechnik. Die Bestimmung antitoxischer Tetanus-Antikörper mittels Enzymimmuntechnik auf Mikrotiterplatten weist gegenüber der Wirksamkeitsprüfung am Tier mehrere Vorteile auf:

- Versuchstiere werden nicht benötigt,
- die Versuchsdauer ist kürzer,
- eine gute Standardisierbarkeit ist nachgewiesen (Henne et al., 1983; Pietsch und Pietsch, 1989; Schröder und Kuhlmann, 1990; Werner et al., 1983).

Die nachfolgend vorgestellten Tetanus-Antikörperbestimmungen wurden im Rahmen der staatlichen Chargen- und Zulassungsprüfung von normalem intravenösen Immunglobulin und Tetanus-Immunglobulin für die Anwendung am Menschen durchgeführt. Aufgrund der dabei gewonnenen Ergebnisse wird zusätzlich auch die Problematik diskutiert, welchen Stellenwert die Behandlung mit normalen, intravenös zu verabreichenden Immunglobulinen bei der Prophylaxe und Therapie von Tetanusinfektionen beim Menschen haben kann (Buchwald, 1988; Eckhardt et al., 1989). Eine vergleichbare Untersuchungsreihe unseres Hauses in

den 80er Jahren (Haase und Mengel, 1983) wurde noch mittels passivem Mäuseschutzversuch mit der L+/10-Methode gemäß Ph. Eur. durchgeführt.

Material und Methoden

Intravenöse Immunglobuline und Tetanus-Immunglobuline

Die von uns untersuchten, in der Bundesrepublik Deutschland zugelassenen oder zur Zulassung gestellten Immunglobuline sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Bei der späteren tabellarischen Darstellung der Ergebnisse und deren Besprechung sind die Hersteller- und Präparatenamen in verschlüsselter Form durch Buchstaben und Zahlen ersetzt.

Die Antikörperbestimmung im ELISA erfolgte durch wiederholte Titration einzelner Chargen (3–6 malige Wiederholung) eines Präparates; von einem Teil der Präparate wurden mehrere Chargen untersucht. Die Ergebnisse der Tierversuche sind den Herstellerprotokollen entnommen.

Enzymimmunttest zur Messung von Tetanus-Antitoxin

Zur Durchführung des Enzymimmunttests wurden Standard-Mikrotiterplatten des Typs M 29 A der Firma Dynatech (D-Denkendorf) eingesetzt. Für die Antigenbeschichtung wurde Tetanustoxoid (Fluid-Impfstoff ohne Adjuvans zur Spenderimmunisierung) der Behringwerke AG (D-Marburg) in einer Konzentration von 0,1 µg/ml (0,36 Lf/ml) in 0,06M Karbonatpuffer (pH 9,6) verwendet und nach Beschickung von 100 µl je Reaktionsnäpfchen zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Dieser Impfstoff war als einziger ohne Adjuvanzusatz in Deutschland erhältlich; er hat sich in Vorversuchen als besonders geeignet erwiesen und war von der Firma freundlicherweise für diesen Zweck zur Verfügung gestellt worden. Als Wasch-

Tabelle 1: Zusammenstellung der untersuchten intravenösen Immunglobuline (IVIG) und Tetanus-Immunglobuline (TIG) vom Menschen

Hersteller	Präparat	Chargenbezeichnung	Protein (g/l) lt. Hersteller
Armour Pharma GmbH, Eschwege	Purimmun (IVIG)	(1) 125190 (2) 150190 (3) 2290	50
Baxter Deutschland GmbH, München	Gammagard (IVIG)	(1) 90A29AG12 (2) 90E07AG11	50
Behringwerke AG, Marburg	Venimmun (IVIG)	(1) 131011 (2) 134011 (3) 137011 (4) 144021	50
	Gamma-Venin (IVIG)	(1) 728011 (2) 733011 (3) 736011	50
	Tetagam S (TIG)	(1) 044011 (2) 045011	100–170
Biotest Pharma GmbH, Dreieich	Biseko*	(1) 1206050	50
	Intraglobin (IVIG)	(1) 1403030	50
	Intraglobin F (IVIG)	(1) 1412010 (2) 1411060	50
	Pentaglobin (IVIG)	(1) 1467040 (2) 1463080 (3) 1462070	50
Blutspendedienst d. DRK, Hagen	Immunglobulin(7S) human i.v. (IVIG)	(1) 80386 (2) 80391 (3) 80393 (4) 80403	50
Immuno GmbH, Heidelberg	Endobulin (IVIG)	(1) 240259003 (2) 240729007	50
	Tetanobulin (TIG)	(1) 13019001/03 (2) 13118806 (3) 13178912 (4) 13058905/02 (5) 13218810/2 (6) 13108805	100–170
Institut Mérieux GmbH, Leimen	Tetaglobulin (TIG)	(1) 4620-D1153 (2) 4590-D0835 (3) 4690-E0667L (4) 4690-E0667H (5) 4500-C1016	100–170
Sandoz AG, Nürnberg	Sandoglobulin (IVIG)	(1) 01001 (2) 02001	60
Schweiz. Serum- & Impfinstitut, Bern	Globuman Berna (IVIG)	(1) 111330104	50
Troponwerke GmbH & Co. KG, Köln	Polyglobin N (IVIG)	(1) 0330290 (2) 0410490 (3) 0510790 (4) 0420590	50
	Psomaglobin N (IVIG)	(1) 0011289 (2) 0021289 (3) 0070690	50
	Hyper-Tet (TIG)	(1) 0120189	100–170
Wellcopharm GmbH, Burgwedel	WellcoTIG (TIG)	(1) 4620-D1153 (2) 4710-E0944	100–170
* Serumkonserve			

und Verdünnungslösung wurde PBS (pH 7,2) mit 0,05% Tween 20 eingesetzt. Die Inkubationslösung in der Mikrotitrationsplatte wurde ausgeschüttet, danach zweimal gewaschen und auf Zellstoff abgeklopft. 100 µl der Immunglobulin- und Referenz-Standardverdünnungsreihe von 1:20 bis 1:1280 wurden danach in die Reaktionsnäpfchen einpipettiert und eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach diesem Schritt wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Als Referenzstandard wurde eine Mischung mehrerer Chargen des Behring-Präparats Tetagam eingesetzt, das zu einem früheren Zeitpunkt mehrfach im Toxinneutralisa-

tionstest gemäß der oben bezeichneten Europäischen Arzneibuchmonographie-Methode gegen den Internationalen Standard ausgewertet wurde und 250 I.E./ml Tetanus-Antitoxin enthält.

Die an die Festphasen gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit 100 µl einer 1:1000 Verdünnung des Antihuman-Alkalische Phosphatase Konjugats von der Ziege (Best.-Nr. 3150, Sigma Chemie GmbH, D-Deisenhofen) beschickt. Die Reaktionszeit betrug eine Stunde in der feuchten Kammer bei 37°C. Auch nach diesem Reaktionsschritt wurde dreimal gewaschen, dann wurde das Substrat p-Nitrophenyl Phosphat (Best.-Nr. 9389, Sigma

Chemie GmbH, D-Deisenhofen) zur Farbentwicklung beigegeben. Die Reaktion wurde mit 100 µl 1N NaOH gestoppt, wenn für die am stärksten gefärbten Proben eine Absorption von 0,8 bis 1,0 gemessen wurde. Für die Messung der optischen Dichten bei 410 nm wurde ein Photometer für Mikrotiterplatten des Typs Dynatech MR 600 eingesetzt. Die Auswertung erfolgte graphisch mit Hilfe einer Eichkurve.

Ergebnisse

Antikörper gegen Tetanustoxin waren in allen kommerziellen Immunglobulinen zur intravenösen Anwen-

Tabelle 2: Spezifische Antikörper gegen das Toxin von *Cl. tetani* in handelsüblichen intravenösen Immunglobulinpräparaten vom Menschen

Produktsymbol	Titration Nr. Tetanus-Antitoxingehalt in I.E:					Mittelwert	Variations- koeffizient
	1	2	3	4	5		
AaIVIG (1)	40.80	58.90	95.50			65.07	0,428
AaIVIG (2)	50.80	66.10	73.20			63.37	0,181
AaIVIG (3)	50.03	82.85	80.64	47.56		65.27	0,291
BaIVIG (1)	79.20	85.20	89.20			84.53	0,059
BaIVIG (2)	46.25	60.05	31.97	52.04		47.58	0,249
CaIVIG (1)	15.17	23.52	19.26			19.32	0,216
CaIVIG (2)	21.10	27.90	26.30			25.10	0,142
CaIVIG (3)	24.60	37.90	21.50			28.00	0,311
CaIVIG (4)	16.46	21.71	38.31	15.41	21.89	22.75	0,404
CbIVIG (1)	6.42	6.98	8.80			7.40	0,168
CbIVIG (2)	11.61	7.28	6.91	8.34	14.26	9.68	0,326
CbIVIG (3)	8.44	6.71	7.19	3.71		6.51	0,308
DaIVIG (1)	10.82	5.65	6.71	4.84	4.07	6.42	0,413
DbIVIG (1)	14.90	22.00	6.10			14.33	0,556
DcIVIG (1)	17.59	10.22	12.98			13.59	0,274
DcIVIG (2)	18.54	19.73	14.93	12.01		16.30	0,216
DdIVIG (1)	5.70	6.30	4.80			5.60	0,135
DdIVIG (2)	5.88	3.72	3.07	4.96		4.41	0,285
DdIVIG (3)	2.34	8.47	5.06	4.55		5.10	0,496
EaIVIG (1)	15.71	21.52	12.53			16.53	0,275
EaIVIG (2)	19.91	24.12	16.65			20.22	0,185
EaIVIG (3)	16.30	34.50	26.80			25.87	0,353
EaIVIG (4)	14.74	20.83	17.80	14.37		16.81	0,174
FaIVIG (1)	30.85	25.38	25.00			27.22	0,121
FaIVIG (2)	28.85	42.61	35.63	25.55		33.16	0,228
HaIVIG (1)	38.75	52.46	19.02	22.80		33.25	0,463
HaIVIG (2)	24.60	42.50	53.40			40.17	0,362
IaIVIG (1)	15.97	28.33	35.92	22.60		25.70	0,330
JaIVIG (1)	55.83	49.51	56.11			53.82	0,069
JaIVIG (2)	57.60	65.70	54.80			59.37	0,095
JaIVIG (3)	37.13	63.71	60.73	59.98	54.90	55.29	0,192
JaIVIG (4)	60.09	70.02	43.02	37.72		52.71	0,284
JbIVIG (1)	53.74	61.59	65.77			60.36	0,101
JbIVIG (2)	55.55	42.72	42.85			47.04	0,157
JbIVIG (3)	68.09	67.81	48.96	36.85		55.42	0,276

Tabelle 3: Spezifische Antikörper gegen das Toxin von *Cl. tetani* in handelsüblichen intramuskulären Tetanus-Immunglobulinpräparaten vom Menschen

Produktsymbol	Titration Nr. Tetanus-Antitoxingehalt in I.E./ml:			Mittelwert	Variations- koeffizient	Tierversuch IE/ml
	1 4	2 5	3 6			
CcTIG (1)	233.18	291.92	298.31	279.71	0,111	270
	295.46					
CcTIG (2)	306.84	287.93	278.40	307.80	0,068	270
	332.86	321.69	319.12			
FbTIG (1)	348.10	401.40	370.60	373.70	0,072	310
FbTIG (2)	195.49	319.16	241.26	273.47	0,244	280
	337.95					
FbTIG (3)	252.00	333.10	304.80	296.63	0,139	290
FbTIG (4)	227.43	377.44	283.67	285.40	0,229	250
	253.05					
FbTIG (5)	431.97	395.41	294.04	367.22	0,146	300
	337.73	411.87	332.32			
FbTIG (6)	347.57	280.45	276.65	311.94	0,114	280
	363.22	306.55	297.21			
GaTIG (1)	322.88	412.92	206.99	314.26	0,328	300
GaTIG (2)	391.30	559.30	497.50	482.70	0,176	296
GaTIG (3)	265.34	247.40	470.30	299.07	0,349	282
	314.34	198.00				
GaTIG (4)	194.09	296.66	231.75	280.56	0,234	282
	342.52	337.84				
GaTIG (5)	355.22	289.00	325.05	310.64	0,130	304
	338.95	242.26	313.36			
JcTIG (1)	197.51	268.64	190.33	228.09	0,236	300
	239.71	307.67	164.70			
KaTIG (1)	178.83	195.66	148.18	181.07	0,104	300
	191.00	198.94	173.82			
KaTIG (2)	207.45	185.31	189.53	186.67	0,123	303
	215.87	164.94	156.97			

dung in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisbar.

In Tabelle 2 sind die Antikörpertiter in I.E. für die einzelnen Arzneimittelchargen aus drei bis fünf Auswertungen aufgezeichnet und daraus die Mittelwerte mit Variationskoeffizient berechnet. Die Großbuchstaben A,B,C,D,E,F,H,I und J stehen für den Hersteller, die Kleinbuchstaben a–d für das Produkt, IVIG bedeutet intravenöses Immunglobulin, die Zahl 1–4 in Klammern steht für die fortlaufende Numerierung der untersuchten Chargen des jeweiligen Präparates.

Die Meßwerte für Antikörper gegen Tetanustoxin in I.E. in kommerziellen Tetanus-Immunglobulinen sind in der Tabelle 3 aufgelistet. Die Großbuchstaben C,F,G,J und K ste-

hen für den Hersteller, die Kleinbuchstaben a–b für das Präparat, TIG für Tetanus-Immunglobulin, die Zahlen 1–4 in Klammern für die fortlaufende Numerierung der untersuchten Chargen des jeweiligen Präparates. Die letzte Spalte der Tabelle enthält zum Vergleich die Meßwerte des Maus-Neutralisationstests, entnommen aus den Chargenbegleitscheinen der Hersteller. Ein exakter statistischer Vergleich war an dieser Stelle nicht möglich, weil die von den Herstellern präsentierten Tierversuchsergebnisse lediglich als Einzelergebnisse ohne Angabe der 95%igen Vertrauensbereiche vorlagen. Jedoch ergab eine Schätzung der 95%igen Vertrauensbereiche des Mittelwertes des Tetanus-Antitoxingehaltes der einzelnen Immunglobu-

line im ELISA eine Übereinstimmung dieser Vertrauensbereiche mit den Werten der Tierversuche, außer bei den drei letzten in der Tabelle 3 genannten Chargen.

Diskussion

Die Prüfung auf Wirksamkeit von Tetanus-Immunglobulin vom Menschen durch den Hersteller muß immer noch aufgrund der Arzneibuchvorschrift (European Pharmacopoeia, 1991) im Versuchstier erfolgen. Hierzu wurde bereits ernsthaft über Ersatzmethoden nachgedacht. Ein entsprechender Abänderungsvorschlag wurde kürzlich veröffentlicht (Europäisches Pharmacopoeia Forum, Juni 1994), ohne daß eine

spezifische Empfehlung eines Testsystems aufgenommen wurde; jedoch erfolgte der Vorschlag eines Immunoassays „hinreichender Sensitivität und Spezifität“. Solche Immunoassays sind im Kapitel V.2.1.10 „Immunochemische Methoden“ des Arzneibuchs angegeben.

Kürzlich wurde vom Council of Europe und der Weltgesundheitsorganisation ein internationaler Ringversuch zur Einstellung eines Internationalen und Europäischen Standards „Human Tetanus Immunoglobulin BRP“ durchgeführt (Sesardic et al., 1993). Dieser Ringversuch diente nicht ausschließlich der Wertbestimmung und Einstellung des vorgesehenen Standards, sondern auch der Beurteilung von *in vitro* Verfahren als Alternativmethoden zum *in vivo* Bioassay. Die Autoren kamen zu der Schlußfolgerung, daß die Gehaltsbestimmung im ELISA vergleichbare Ergebnisse zum Tierversuch liefert.

Besonders im Hinblick auf die Bestimmung des Tetanus-Antikörpergehaltes von spezifischen Tetanus-Immunglobulinen, die einen hohen Gehalt an Antitoxin aufweisen, liefert der ELISA nach unseren Erkenntnissen zuverlässige Vergleichsdaten. In unseren ELISA Untersuchungen lagen die spezifischen Tetanus-Immunglobuline im Meßbereich von ca. 180–480 I.E./ml. Nur 2 Präparate mit 3 Chargen (JcTIG1, KaTIG1+2) erreichten in unserem ELISA System nicht 250 I.E./ml, wie im Zulassungsverfahren in Deutschland festgelegt ist. In diesen Fällen erfolgte die ELISA Wertbestimmung am Laufzeitende, sodaß der aufgezeigte Titerabfall dafür ursächlich sein dürfte. Die Freigabe dieser Chargen erfolgte aufgrund der mit dem Chargenbegleitschein vorgelegten Ergebnisse im Tierversuch (über 250 I.E./ml), wie dies auch bei allen anderen Tetanus-Immunglobulinen der Fall ist, solange die Monographie für diese Arzneimittel nicht geändert ist. 13 andere untersuchte Chargen von 3 Präparaten lagen über der vorher erwähnten Schwelle von 250 I.E./ml; viele übertrafen diesen Wert wesentlich (s. Tabelle 3). Zum Ver-

gleich sei erwähnt, daß das Europäische Arzneibuch (European Pharmacopoeia, 1991) derzeit mindestens 50 I.E./ml vorsieht; nach dem oben genannten Revisionsentwurf soll der Gehalt zukünftig 100 I.E. Tetanus-Antitoxin je Milliliter betragen. Die von der Arzneibuchforderung abweichenden 250 I.E./ml erlauben eine wesentliche Reduktion des Injektionsvolumens eines bei der Applikation schmerzhaften Arzneimittels. Sie sind nach Auskunft der Zulassungsinhaber ohne weiteres erfüllbar.

Ein Vergleich der durchgeführten ELISA-Tests mit den Tierversuchen der Hersteller aus den Chargenfreigabeanträgen bzw. Zulassungsunterlagen zeigt eine ausreichende Übereinstimmung der Ergebnisse (Tabelle 3). In der vorliegenden Untersuchungsreihe konnte somit die aus der Praxis bekannte zufriedenstellende Reproduzierbarkeit des ELISA-Tests aufgezeigt werden.

Die Tetanus-Antikörperbestimmung in Serumproben und bei Inprozess-Kontrollen während der Herstellung von Immunglobulinen wird in immer größerem Umfang schon jetzt *in vitro* durchgeführt. Die Methode der Wahl bei der Bestimmung ist der Enzymimmuntest, der sich im Vergleich zu anderen Tests wie Immundiffusion, Gegenstrom-Elektrophorese und Haemagglutination als der praktikabelste erwiesen hat (Henne et al., 1983; Pietsch und Pietsch, 1989; Werner et al., 1983). Die Bestimmung antitoxischer Tetanus-Antikörper mittels Enzymimmuntechnik auf Mikrotiterplatten weist gegenüber der Wirksamkeitsprüfung am Tier mehrere Vorteile auf, weil Versuchstiere nicht benötigt werden, die Versuchsdauer kürzer ist und eine gute Standardisierbarkeit nachgewiesen werden konnte (Henne et al., 1983; Pietsch und Pietsch, 1989; Schröder und Kuhlmann, 1990; Werner et al., 1983). Darüberhinaus werden von diesen Untersuchern die hohe Nachweisempfindlichkeit, die gesteigerte Präzision und die Möglichkeit zur Automatisierung hervorgehoben.

Bedingung für die Freigabe einer Produktionscharge durch das Paul-Ehrlich-Institut ist für normale Immunglobuline vom Menschen unter anderem der Nachweis von zwei Antikörpern, eines antiviralen und eines antibakteriellen, für die ein Internationales Standardpräparat zur Verfügung steht, bei den bakteriellen Antikörpern zum Beispiel gegen Tetanustoxin. Diese Prüfungen finden beim Hersteller und in regelmäßigen Abständen bei der Kontrollbehörde statt. Da beim Hersteller der Tierversuch durchgeführt werden muß, ist es höchst wünschenswert, bei der Kontrollbehörde auf ein Alternativverfahren zurückgreifen zu können. Die von uns geprüften intravenösen Immunglobuline zeigten im Tetanus-Antikörpergehalt wesentlich größere Schwankungen bei den einzelnen Präparaten, nicht bei den einzelnen Chargen, wie aus der Tabelle 2 ersichtlich ist. Eine Erklärung dafür ist die unterschiedliche Immunisierung der Spender, bedingt durch die verschiedene Durchimpfung der Bevölkerung in den einzelnen Herkunftsländern der Blutspenden. Zusätzlich spielt der Proteingehalt der intravenösen Immunglobuline eine Rolle: je höher er ist, desto mehr Tetanus-Antikörper sind in der Regel in ihnen nachweisbar. Besonders wichtig für die Höhe des spezifischen Antikörpergehaltes ist auch das Herstellungsverfahren der Präparate. Es gibt Methoden, die eine chemische Spaltung der Immunglobuline bewirken. Diese gespaltenen Immunglobuline enthalten in der Regel signifikant weniger im ELISA-Test nachgewiesene Tetanus-Antikörper als nativ belassene Immunglobuline, wie sich in unserer Untersuchungsreihe nachweisen ließ (Tabelle 2).

Aus der Tabelle 2 ist auch ersichtlich, daß einige Präparate mit den zugehörigen Chargen ohne weiteres 50 I.E./ml überschreiten. Sie sind somit theoretisch sehr gut geeignet zur Therapie von akuten Tetanus-Fällen. Die Bioverfügbarkeit der intravenösen Präparate ist im Vergleich zu den i.m. verabreichten Im-

immunglobulinen (2–3 Tage) sofort gegeben, und es besteht die Möglichkeit der Applikation größerer Mengen. In der Literatur wird ein Gehalt von 0.01 I.E./ml Tetanus-Antitoxin im menschlichen Serum als ausreichend angenommen, d.h. 250 I.E. pro Dosis bieten einen ausreichenden präventiven Schutz des Menschen gegen Tetanus (Eckhardt et al., 1989). Diese relativ niedrige Dosis wird mitunter angezweifelt, da sie vom tierischen Modell abgeleitet wurde. Klinische Studien zum Beleg der minimalen menschlichen Dosis sind in der Literatur nicht zu finden, jedoch gibt es glaubwürdige Angaben aus Indien mit hoher Tetanus-Inzidenz, daß 1000 I.E. Tetanus-Antitoxin (human) ausreichen, um Wundstarrkrampf jedweden Schweregrades zu behandeln (Furste, 1980). Aus diesem Grunde erscheint es angebracht, den Gehalt der Tetanus-Antikörper in i.v. Immunglobulinen zu ermitteln und anzugeben. Die Prüfung könnte kostengünstig und ohne Versuchstierbedarf im ELISA erfolgen. Besonders wichtig wäre diese Festlegung bei der Behandlung von Unfall-Patienten, bei denen eine Immunglobulin-Therapie bzw. Prophylaxe vorgenommen

wird, wenn über einen gesicherten Tetanus-Schutz nichts bekannt ist. So schließt diese Behandlung gleichzeitig eine rasche Vorbeugung gegen eine Tetanus-Infektion ein, und das Risiko des Ausbruches der Erkrankung wird minimiert.

Der Enzymimmunttest ist gut geeignet und hat sich in der Praxis als zuverlässig erwiesen. Es ist deshalb empfehlenswert, den Test an Mäusen, der für die Versuchstiere qualitativ verläuft, in allen vertretbaren Fällen durch den Enzymimmunttest zu ersetzen. Wir haben in der staatlichen Chargenprüfung von Tetanus-Immunglobulinen aufgrund der hier dargestellten zuverlässigen Prüfungsergebnisse auf Tierversuche seit 1992 verzichtet.

Literatur

- Buchwald, G. (1988). Über Todesfälle nach der Wundstarrkrampf-(Tetanus-) Impfung. *Erfahrungsheilkunde* 1/88, 38–41.
- Eckhardt, R., Thomssen, R. und Mössner, G. (1989). Bacillaceae. In H. A. Kühn und J. Schirrmeyer (Hrsg.), *Innere Medizin*. (140–146). Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.

- Furste, W. (1980). Editorial: The Fifth International Conference on Tetanus, Ronneby, Sweden, 1978. *The Journal of Traumatology* 20, 101–105.
- Haase, M. und Mengel, H. (1983). Bakterielle Antikörper und Isoagglutinine in intravenösen Immunglobulinpräparaten. *Immun. Infekt.* 11, 135–139.
- Henne, G., Tiller, F.-W., Thilo, W. und Becker, V. (1983). Enzym-Immunoassay zur Bestimmung von Tetanus-Antitoxin in Humanseren. *Z. Klin. Med.* 40, 291–293.
- European Pharmacopoeia (1991). 2nd edition, 17th fascicule. Monograph „Human Tetanus Immunoglobulin“, „Human Normal Immunoglobulin“ and „Human Normal Immunoglobulin for Intravenous Administration“. Sainte-Ruffine: Maisonneuve S.A.
- Pietsch, M. und Pietsch, R. (1989). Einsatz der ELISA-Technik zur Messung antitoxischer Tetanus-Antikörper. *Wehrmed. Mschr.* 6, 258–262.
- N.N. (1994). Human Tetanus Immunoglobulin. *Pharmaceutica* 6, 89–90.
- Schröder, J. P. und Kuhlmann, W. D. (1990). Serologische Bestimmung von Tetanus-Antitoxin mit einem Enzymimmunoassay zur Beurteilung der Tetanus-Immunität bei Soldaten der Bundeswehr. *Wehrmed. Mschr.* 5, 222–226.
- Sesardic, D., Wong, M. Y. and Corbel, J. (1993). Proposed International and European Standard for human anti-tetanus immunoglobulin; pharmaceutical evaluation and international collaborative study. *European pharmacopoeia Commission*. 6, 1–15.
- Werner, G. T., Berdel, W. E., Frühwein, N. und Ulm, K. (1987). Untersuchungen zur Tetanusimmunität der Münchner Bevölkerung. *Munch. med. Wschr.* 129, 157–159.
- Werner, G. T., Frühwein, N., Spiess, F. und Ulm, K. (1983). Tetanusimmunität im Alter. *Zeitschr. für Gerontologie* 16, 130–133.

Korrespondenzadresse

Christian Mainka
Paul-Ehrlich-Institut
Paul-Ehrlich-Straße 51–57
D-63225 Langen

