

Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen für die Veterinärmedizin am Beispiel von Tollwutvakzinen

L. Bruckner, M. Palatini, M. Ackermann, H.K. Müller,
K. McCullough und U. Kihm
Eidgenössisches Vakzine Institut
Hagenastrasse 74, 4025 Basel

Zusammenfassung

Industriell produzierte Impfstoffe müssen auf ihre Unschädlichkeit und Wirksamkeit geprüft werden. Die Grundlage für jede Wirksamkeitsprüfung von Vakzinen bildet der Schutzversuch im Zieltier. Nachdem gezeigt wurde, dass ein Impfstoff eine bestimmte Tierart vor einer bestimmten Krankheit schützen kann, werden meistens Alternativmethoden für die Wirksamkeitsprüfung eines Impfstoffs erarbeitet. Die Begründung liegt darin, dass Schutzversuche nicht nur kostenintensiv sind, sondern auch viele Tiere verbrauchen und nur mässig reproduzierbar sind. Methoden wie Schutzversuch im Labortier, Induktion von Abwehrstoffen im Ziel- oder Labortier sowie in der Zellkultur oder quantitative Bestimmung der schutzinduzierenden Immunogene sind jedoch nur zulässig, wenn ihre Ergebnisse mit denen des Schutzversuchs im Zieltier korrelieren. Ein Tollwutglykoprotein ist hauptverantwortlich für die Induktion von Schutz gegen Tollwut. Je höher der Gehalt an Tollwutglykoprotein im Impfstoff ist, desto grösser ist das Potential, einen guten Schutz zu induzieren. Für die Bestimmung des Tollwutglykoproteingehalts in Impfstoffen stehen mehrere verschiedene Methoden zur Wahl (Immunodiffusionstest, Antikörperbindungstest, ELISA). In der Veterinärmedizin sind Impfstoffe meist an Adjuvantien gebunden, welche die Immunantwort verstärken. Alle in vitro Methoden sind für Impfstoffe, die an ein Adjuvans gebunden sind, beschränkt geeignet. Es werden die verschiedenen Methoden vorgestellt und Möglichkeiten der Adaptation für an Adjuvantien gekoppelte Impfstoffe diskutiert.

Summary: Potency testing of veterinary vaccines, rabies vaccines as an example

Vaccines which are produced commercially should be controlled with respect to their efficacy (potency) and their "harmlessness" to the recipient animal. The basis for any potency test is the protection test in the target animal species. When a vaccine has been shown to be capable of protecting a particular species from a certain disease, alternative methods for potency testing often can be developed. The justification of the latter is that experiments which analyse the protection are cost-intensive, require a large number of animals and give only a moderate degree of reproducibility. Methods such as protection experiments in laboratory animals, the induction of the substances responsible for protection (such as antibodies) in target or laboratory animals as well as with in vitro tissue culture systems, or the quantitative determination of the immunogens (the components of a vaccine which should be responsible for protection) may be used only if their results correlate with those obtained from protection experiments in the target animal species. Rabies glycoprotein has been implicated as the main agent responsible for the induction of protection against rabies. The higher the content of glycoprotein in a rabies vaccine, the greater will be the potential of the vaccine to induce protection against the disease. Analysis of the rabies glycoprotein content in vaccines can make use of a number of methods which have proven acceptable (the immunodiffusion test, the antibody binding assay and the ELISA). However, in veterinary medicine most vaccines are associated with an adjuvant - a substance which should amplify the immune response of an animal against a vaccine. Since the adjuvants and vaccines in such preparations are inseparable, the presence of an adjuvant in a vaccine reduces the applicability of many in vitro methods. Thus, the above mentioned methods and possibilities for their adaptation to the analysis of adjuvanted vaccines will be discussed.

Einleitung

Impfstoffe für Mensch oder Tier spielen seit langer Zeit eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Schon im Jahre 1798 beschrieb Edward Jenner, dass Menschen, die mit dem Kuhpockenvirus in Kontakt gekommen sind, vor einer weiteren Pockeninfektion geschützt waren. Aufgrund dieser Beobachtung wurde der erste



Impfstoff entwickelt, indem Menschen mit dem lebenden Kuhpockenvirus (Vacciniavirus, «vacca» lat. Kuh) vakziniert wurden. Der Impfstoff wurde aus Pockenläsionen von Rindern gewonnen. Im 20. Jahrhundert gelang es dann, Pockenviren auf embryonierten Hühnereiern zu vermehren, und damit grosse Mengen von Impfstoff einfach herzustellen. Durch die Impfung des Menschen mit dem Vacciniavirus konnten die Pocken weltweit ausgerottet werden.

Louis Pasteur entwickelte Ende letzten Jahrhunderts einen Impfstoff, mit dem Menschen vor einer Tollwutinfektion geschützt werden konnten. Dazu steckte er zuerst Kaninchen mit Hirnmaterial von tollwütigen Hunden an. Das Rückenmark der infizierten Kaninchen wurde mit Wärme getrocknet und zur Impfung von Hunden, später auch Menschen, benutzt. Durch die Wärmeeinwirkung wurde das Tollwutvirus abgetötet, oder mindestens soweit abgeschwächt, dass es seine krankmachende Wirkung verloren hatte. Auch heute werden Tollwutimpfstoffe vielfach noch in Tieren produziert. Wesentlich moderner ist die Produktion auf Zellkulturen oder in embryonierten Enteneiern. Zur Abtötung (Inaktivierung) des Tollwutvirus werden verschiedene Chemikalien wie β -propio-Lacton, Formalin, Phenol oder andere verwendet.

Impfstoffe werden klassischerweise in biologischen Systemen hergestellt. Die Produktion in einem biologischen System, sei dies nun ein ganzes Tier - Jenner benutzte Rinder, Pasteur Kaninchen -, ein Embryo oder eine Zellkultur, wird durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst. Es ist nicht von vornherein gesagt, dass Produktionsansätze, die an verschiedenen Tagen hergestellt werden, die gleiche Qualität aufweisen, genauso wie ein Sportler auch nicht jeden Tag exakt die gleiche Leistung erbringen kann. Jenner und Pasteur stellten anhand ihrer Beobachtungen am Patienten fest, dass ihre Impfstoffe die erhoffte Wirkung hatten. Mit dem Aufkommen der industriellen Produktion von Impfstoffen wurde es allerdings nötig, Qualitätskontrollen einzuführen.

Welche Faktoren bestimmen nun die Qualität einer Vakzine? Wie jedes Heilmittel, so darf auch ein Impfstoff keinen Schaden anrichten; Vakzine müssen also auf ihre Unschädlichkeit geprüft werden. Un-

schädlichkeit einer Vakzine bedeutet unter anderem, dass die darin enthaltenen Erreger zumindest so abgeschwächt sind, dass durch sie die Krankheit, gegen die sie wirken sollen, nicht ausgelöst wird, oder auch, dass keine unerwünschten Mikroorganismen im Impfstoff vorhanden sind (Sterilitätsprüfung). Als zweites, und darauf soll im Folgenden näher eingegangen werden, wird eine Wirkung gefordert. Die Wirksamkeit jeder einzelnen Produktionscharge eines Impfstoffs muss nachgewiesen werden.

Grundsätzliches zur Messung der Impfstoff-Aktivität

Welche Möglichkeiten haben wir nun, um die Wirksamkeit von Impfstoffen zu überprüfen? Impfstoffe sollen ja Schutz vor einer Infektion bieten. Es liegt deshalb nahe, diese Schutzwirkung in einem Schutzversuch mit der Tierart, für die der Impfstoff bestimmt ist (Zieltier, z.B. Hund, Katze), zu prüfen. Im Schutzversuch wird gezeigt, dass geimpfte Tiere nicht mehr an einer experimentellen Infektion erkranken. Diese Prüfung ist für jeden Impfstoff obligatorisch und muss vor der Kommerzialisierung durchgeführt werden. Schutzversuche verbrauchen Tiere und sind aufwendig. Es wurde darum nach anderen Möglichkeiten gesucht; es sind verschiedene denkbar:

1. Bestimmung der Schutzwirkung im Labortier (Maus, Meerschweinchen)
2. Bestimmung von induzierten Antikörpern
3. Bestimmung der Antigenmenge im Impfstoff

Ein anderer Test anstelle des Schutzversuchs in der Zielspezies ist allerdings nur dann zulässig, wenn gezeigt werden kann, dass zwischen der neuen Methode und dem Schutzversuch in der Zielspezies eine Korrelation besteht.

Für die Wirksamkeitsprüfung von Tollwutimpfstoffen wird von allen drei oben erwähnten Möglichkeiten Gebrauch gemacht.

1. Induktion von Schutz gegenüber einer Tollwutinfektion

Im Schutzversuch geht es darum, dass ein Impfling während eines gewissen Zeitraums nach der Impfung vor einer Tollwutinfektion geschützt ist. Damit der Versuch gültig ist, ist es unumgänglich, ungeimpfte Tiere (Kontrolltiere) mitzuführen. Diese müssen, im Gegensatz zu den geimpften Tieren, durch die experimentelle Infektion an Tollwut erkranken und sterben. Ein Schutzversuch wird beim Menschen nicht durchgeführt; beim Haustier (Hund, Katze, Rind, Pferd etc.) oder beim Wildtier (Fuchs!) sind solche Versuche mit grossem Aufwand verbunden, denn die Impflinge sind je nach der Dauer, während der die Schutzwirkung anhalten soll, möglicherweise über mehrere Jahre, zu halten und zu beobachten.

Zur Prüfung einzelner Produktionsansätze (Chargenprüfung) eignen sich Schutzversuche am Zieltier nicht; hier sind Schutzversuche mit Labortieren vorzuziehen. Für Tollwutimpfstoffe wurde 1953 eine entsprechende Versuchsanordnung beschrieben (1). Dabei werden Gruppen von Mäusen mit verschiedenen Verdünnungen der zu prüfenden Vakzine resp. eines Referenzimpfstoffs geimpft, zwei Wochen später mit Tollwutvirus infiziert und weitere zwei Wochen beobachtet. Aufgrund der Ueberlebensrate in den verschiedenen Gruppen wird diejenige Konzentration des zu prüfenden Impfstoffs errechnet, die die Hälfte der Mäuse vor einer Infektion schützt (PD50). Die gleiche Berechnung wird auch für die Referenzvakzine durchgeführt und aus dem Vergleich der beiden erhaltenen Werte das Mass der Wirksamkeit des zu prüfenden Impfstoffs bestimmt.

Diese Versuchsanordnung wird zur Wirksamkeitsprüfung von Tollwutimpfstoffen von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfohlen und mit kleinen Modifikationen von der Pharmakopöe vorgeschrieben (2). Der Mäusetest hat verschiedene Nachteile. Die Reproduzierbarkeit des Tests ist schlecht; um den Einfluss der einzelnen Maus zu minimieren, müssen grössere Tierzahlen verwendet werden. Für die Prüfung von Tollwutimpfstoffen werden allein in der Schweiz jährlich etwa 10'000 Mäuse verbraucht.

2. Induktion von Antikörpern

Es ist bekannt, dass im allgemeinen nach einer Impfung spezifische, neutralisierende Antikörper im Blut bei Menschen und Tieren gebildet werden, die als Mass für den Schutz herbeigezogen werden können. Es ist jedoch nicht möglich, bei jeder Impfstoffcharge die nach der Impfung auftretenden Antikörper bei Menschen, Haus- oder Wildtieren zu messen. Man ist deshalb auch hier zu Untersuchungen bei Labortieren übergegangen. Bei diesem Test gilt es die minimale Antikörpermengung zu bestimmen, die mit Schutz vor Tollwut einhergeht. Meistens kommt nur die Messung von Serumantikörpern in Frage. Es gibt jedoch weitere Faktoren, wie z.B. die zellvermittelte Immunität, die hier nicht berücksichtigt sind. Es wäre auch denkbar, durch Impfstoffe die Bildung von Abwehrstoffen in Zellkulturen zu stimulieren, und die Menge der induzierten Abwehrstoffe mit der Aktivität des Impfstoffs zu korrelieren. Auf dem Gebiet der Stimulation von Abwehrstoffen *in vitro* sind allerdings noch grundlegende Forschungsarbeiten nötig, bevor derartige Tests in der Routinekontrolle Eingang finden könnten.

3. Bestimmung der Antigenmenge *in vitro*

In vitro-Testsysteme zur Bestimmung der Wirksamkeit von Tollwutimpfstoffen beruhen auf der Erkenntnis, dass das Tollwutglykoprotein derjenige Teil des Tollwutvirus ist, der als Antigen für die Induktion des Schutzes gegenüber einer Tollwutinfektion hauptverantwortlich ist (3). Obwohl die Schutzinduktion von der Antigenmenge abhängt, sagt die Bestimmung des Antigengehalts allein nicht alles über das Immunisierungsvermögen einer Vakzine aus. Für eine erfolgreiche Immunisierung müssen die Antigene in einer Form vorliegen, die dem «natürlichen» Virus vergleichbar ist (Immunogen). Bei der Inaktivierung eines Impfstoffs können diese Antigene verändert werden. Es muss deshalb nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität der Immunogene bestimmt werden, was besonders schwierige Anforderungen an ein solches Testsystem stellt. Bislang kann mit einem *in vitro* Test die gesamte Tollwutglykoproteinmenge in einem Impfstoff zwar bestimmt werden, doch dabei kann nicht unterschieden werden, ob das

Glykoprotein in einer Form vorliegt, die auch wirklich immunogen ist, und somit Schutz vor einer Infektion zu induzieren vermag.

Im folgenden soll auf einige beschriebene in vitro-Methoden zur Bestimmung der Tollwutglykoproteinmenge in Impfstoffen näher eingegangen und ihre Praktikabilität für die Routine abgeschätzt werden.

3.1. Immunodiffusionstest

Der Single Radial Immunodiffusion Test (SRID) ist für die quantitative Bestimmung verschiedener Antigene beschrieben worden, 1982 auch für Tollwut (4). Für den SRID wird ein Agar-Gel verwendet, dem ein spezifisches anti-Tollwutglykoprotein Antiserum zugegeben wird.

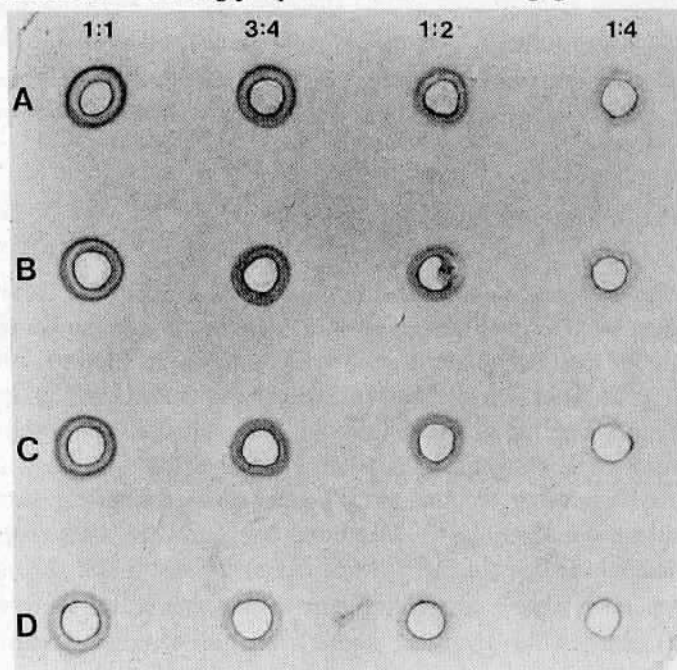


Abb.1 Single Radial Immunodiffusion. In den Reihen A,B,C und D wurde je ein Impfstoff in den Verdünnungen 1:1, 3:4, 1:2 und 1:4 zugegeben. Mit absteigender Konzentration des Impfstoffs nimmt der Durchmesser des um das zentrale Loch entstandenen Rings ab.



Ins Agar-Gel werden Löcher gestanzt und diese mit verschiedenen Konzentrationen des zu prüfenden Impfstoffs resp. einer Standardvakzine aufgefüllt. Der Impfstoff diffundiert dann ins Agar-Gel und bildet mit den im Gel enthaltenen Antikörpern einen Antigen-Antikörper-Komplex. Dieser Komplex kann durch eine Färbung sichtbar gemacht werden und erscheint ringförmig um das gestanzte Loch. Je mehr Antigen im Impfstoff enthalten ist, desto grösser wird der Ring (Abb. 1).

Der Durchmesser dieses Rings korreliert also mit der Konzentration des Tollwutglykoproteins im Impfstoff. Es kann dann im Vergleich mit einer Referenzvakzine der tatsächliche Gehalt an Tollwutglykoprotein im geprüften Impfstoff bestimmt werden. Diese Methode eignet sich gut für Impfstoffe, wie sie in der Humanmedizin verwendet werden, insbesondere die Reproduzierbarkeit des Tests ist sehr gut. Tollwutimpfstoffe für Tiere sind sehr oft mit einem Adjuvans versetzt. Durch den Zusatz eines Adjuvans entsteht eine vielfach bessere Immunität als durch das Antigen allein. Für den Menschen werden Adjuvantien nur selten verwendet, weil sie auch unerwünschte lokale Reaktionen an der Impfstelle auslösen können (Unschädlichkeit). Als Adjuvantien werden Aluminiumhydroxid, Saponin, Mineralöle etc. verwendet. Der Zusatz von Adjuvantien hat leider meistens zur Folge, dass das Antigen nicht mehr ins Agar-Gel diffundieren kann. Wir versuchten, mittels physikalischer oder chemischer Verfahren das Antigen vom Adjuvans zu trennen. Dies hat sich aber als ein sehr schwieriges Unterfangen erwiesen. Die Ausbeute beim Trennen kann je nach Produkt verschieden sein; bei einigen Impfstoffen entsteht gar eine nicht mehr trennbare Bindung zwischen Antigen und Adjuvans. Diese Besonderheit der Impfstoffe für Tiere macht den SRID für viele veterinärmedizinische Impfstoffe unbrauchbar. Immerhin ist es möglich, während der Produktion der Impfstoffe vor der Adjuvanszugabe, diese Methode zur Gehaltsbestimmung zu verwenden. Dadurch können unbefriedigende Chargen frühzeitig eliminiert werden und müssen nicht mehr im Tier geprüft werden.

3.2. Antikörperbindungstest

Im Antikörperbindungstest (5) erfolgt die Messung des Tollwutglykoproteingehalts ebenso mit Hilfe eines anti-Tollwutglykoprotein Antiserums. In diesem Test wird der zu prüfende Impfstoff mit dem anti-Tollwutglykoprotein-Antiserum gemischt, wobei das Antiserum im Überschuss vorhanden sein muss. Dann wird eine bestimmte Menge Tollwutvirus zugegeben; je mehr freie Antikörper im Gemisch noch vorhanden sind, d.h. je weniger Antigen im Impfstoff vorhanden war, umso mehr Virus wird gebunden. Das freie Tollwutvirus im Gemisch kann auf Gewebekultur austitriert werden. Aus dem Virustiter kann dann auf die Konzentration des Tollwutglykoproteins im Impfstoff geschlossen werden. Auch in diesem Test sind Impfstoffe für die Tiermedizin nur beschränkt prüfbar. Die meisten Adjuvantien haben die Eigenschaft, Proteine unspezifisch zu binden. Dadurch wird im Antikörperbindungstest das Antiserum wie auch das Tollwutvirus unspezifisch gebunden und so eine Messung des Glykoproteingehalts im Impfstoff verunmöglicht.

3.3. ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

Ein ELISA zur Bestimmung des Antigengehalts in Tollwutimpfstoffen wurde von Thraenhardt (6) beschrieben. Das Schema eines ELISA zur Messung des Tollwutglykoproteingehalts in Tollwutimpfstoffen ist in Abb. 2 dargestellt. Das Tollwutglykoprotein aus dem Impfstoff wird dabei an eine Polystyrolplatte gebunden. Anschliessend wird anti Tollwutglykoprotein Antiserum zugegeben und mittels eines anti-Spezies-Konjugates und einer Substratlösung eine Farbreaktion induziert.

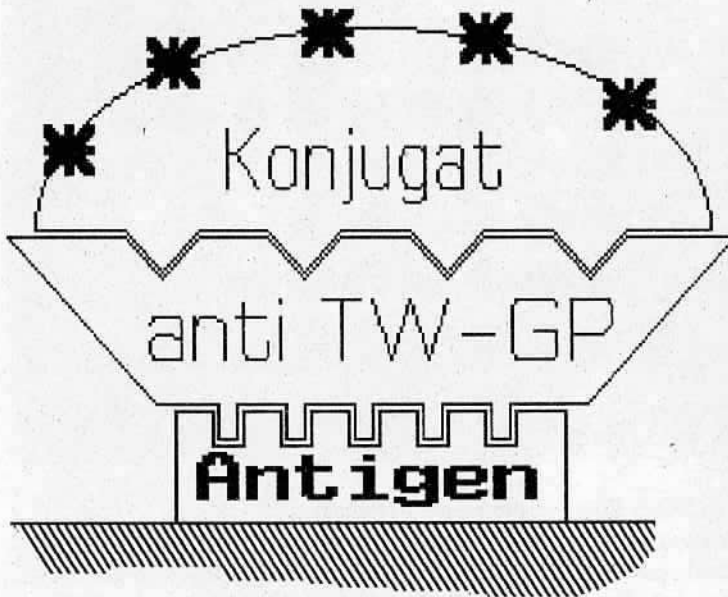


Abb.2 Schema eines ELISA zur Bestimmung des Glykoproteingehalts in Tollwutimpfstoffen. In drei Arbeitsschritten wird zuerst das Antigen (Tollwutimpfstoff) an die Platte gebunden, dann ein spezifisches anti-Tollwutglykoprotein-Antiserum (anti-TW-GP) zugegeben und schliesslich mit einem an ein Enzym gebundenen zweiten Antiserum (Konjugat) die Reaktion sichtbar gemacht.

Die Intensität der Farbreaktion ist abhängig von der Antigenmenge, die an die Platte gebunden wurde (Dosis-Wirkungsprinzip).

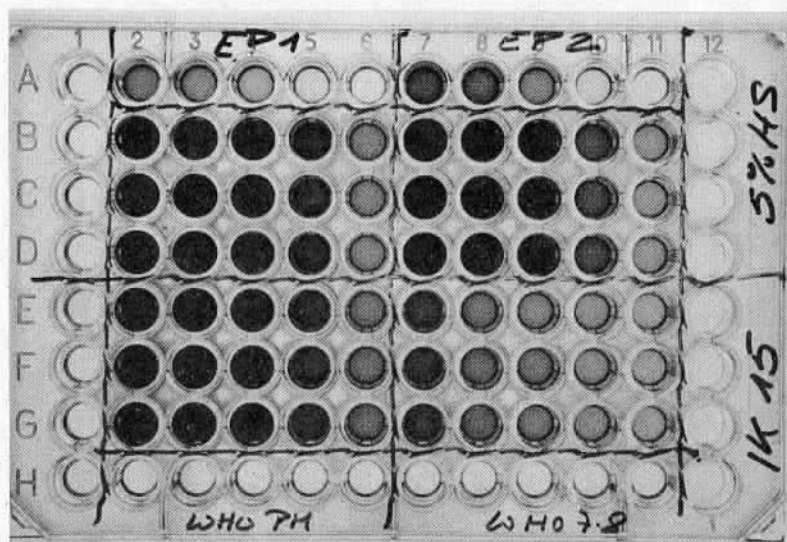


Abb.3 Bild einer ELISA-Platte bei der Ablesung.

Alle Reihen sind von oben nach unten mit A bis H, und von links nach rechts mit 1 bis 12 bezeichnet. In den Reihen A,B und C wurde der gleiche Impfstoff in Reihe 2 in einer Verdünnung von 1:25, in Reihe 3 in einer Verdünnung von 1:50, in Reihe 4 in einer Verdünnung von 1:100, in Reihe 5 in einer Verdünnung von 1:200 und in Reihe 6 in einer Verdünnung von 1:400 an die Platte gekoppelt. Von links nach rechts ist eine sich abschwächende Farbreaktion zu erkennen. In den andern drei Vierteln der Platte wurde jeweils ein anderer Impfstoff geprüft. Die Vertiefungen am Rand der Platte dienten für interne Kontrollen.

Hoch gereinigte Impfstoffe für den Gebrauch beim Menschen lassen sich im ELISA ohne grössere Schwierigkeiten prüfen. Vakzine für die Tiermedizin sind nicht in demselben Mass gereinigt wie Humanimpfstoffe. In diesen Impfstoffen sind neben dem eigentlichen Antigen immer noch eine grosse Zahl von andern Stoffen enthalten. Diese können einerseits absichtlich zugesetzt worden sein, sei es zur Erhöhung der Stabilität des Impfstoffs, sei es zur Hemmung des Wachstums von Bakterien oder Pilzen etc.; produktionsbedingt sind andererseits auch Bestandteile von Zellkulturen oder deren Medien in den fertigen Vakzi-

nen enthalten. Viele dieser Substanzen können im ELISA zu unerwünschten Verfälschungen der Messung führen, welche die eigentliche Reaktion des Tollwutantigens überdecken. Dazu kommen auch hier die Eigenschaften der Adjuvantien, insbesondere die Fähigkeit, Proteine unspezifisch zu binden. Es sollte gelingen, ein Verfahren zu finden, bei dem diese unerwünschten Reaktionen unterdrückt werden. Wir haben dies versucht, indem wir sogenannte Blockschritte im ELISA verwendeten. Durch Blockschritte wird versucht, zwischen den einzelnen Arbeitsgängen, also z.B. nach dem Binden des Impfstoffs an die Platte, mit einer Lösung eines unspezifischen Proteins (Gelatine, Bovines Serumalbumin, Normalserum) unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Es kann auch, zur Erzielung der gleichen Wirkung, das unspezifische Protein den verschiedenen Lösungen (anti-Tollwutglykoprotein, Konjugat) beigemischt werden. In unseren Versuchen konnten damit einige, aber nicht alle, unspezifischen Reaktionen unterdrückt werden.

Um den ELISA akzeptierbar zu gestalten, sehen wir im Moment folgende Möglichkeiten:

- Sandwich ELISA (catching ELISA)
- liquid phase ELISA

In beiden Verfahren wird der Impfstoff selbst nicht mehr direkt an die Polystyrolplatte gekoppelt. Er liegt dann für die späteren Arbeitsschritte in einer andern räumlichen Anordnung vor als bei der Koppelung an die Platte. So können dann eventuell unspezifische Bindungsstellen durch Blockschritte besser abgedeckt werden. Beim «sandwich ELISA» wird zuerst ein spezifischer anti-Tollwutglykoprotein Antikörper an die Platte gebunden. Dieser erste Antikörper hat die Aufgabe, den Impfstoff "einzufangen", die weiteren Schritte sind gleich wie im einfachen ELISA. Als erste(r) Antikörper könnten auch monoklonale Antikörper verwendet und damit die Spezifität vielleicht weiter erhöht werden. Beim «liquid phase ELISA» finden die ersten Reaktionsschritte (Bindung Impfstoff-anti-Tollwutglykoprotein Antikörper) in einem Glasröhrchen statt. Zur weiteren Verarbeitung im ELISA gelangt dann nur noch das Produkt dieser Reaktion. Es ist damit vielleicht möglich, den Impfstoff mit all seinen unspezifischen Komponenten aus den weiteren Reaktionen im ELISA zu eliminieren.

Schlussbemerkungen

Im jetzigen Zeitpunkt ist es mit dem von uns adaptierten ELISA möglich, Tollwutimpfstoffe für die Humanmedizin, die auf Zellkulturen hergestellt wurden, auf ihren Glykoproteingehalt zu prüfen. Für gewisse tiermedizinische Impfstoffe ist dies auch möglich. Die Messung des Tollwutglykoproteingehalts sagt aber noch nicht alles aus über die immunisierenden Eigenschaften eines Impfstoffs. Der Schutzversuch, bei dem die Wirkung einer Vakzine im Zieltier überprüft wird, bleibt die Basis, auf die sich alternative Methoden beziehen müssen. Um einen in vitro-Test - sei es einer der oben genannten oder z.B. ein Test wie die Stimulation von Abwehrstoffen in der Zellkultur - für die Routinekontrolle am Endprodukt gebrauchen zu können, muss es allerdings auch noch gelingen, eine Korrelation zwischen dem Mass, das in vitro bestimmt wurde, und dem Schutzvermögen des Impfstoffs im Zieltier herzustellen. Solche Versuche nehmen viel Zeit in Anspruch und bedürfen einer guten Koordination zwischen Impfstoffhersteller und der zulassenden Kontrollbehörde.

Literatur

- (1) Seligman Jr E.B. (1973). The NIH test for potency. In Laboratory Techniques in Rabies 3rd Edition, Eds. M.M. Kaplan & H.Koprowski, pp.279-286, WHO Monograph Series No 23, Geneva.
- (2) Pharmacopoea Helvetica Editio VII, (1987). Vaccinum Rabiei Inactivatum ad usum Veterinarium, Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern.
- (3) Cox J.H., Dietzschold B. and Schneider L.G. (1977). Rabies Virus glycoprotein II Biological and serological characterisation, Infection and Immunity 16, 754-759.
- (4) Ferguson M. and Schild G.C. (1982). A single radial immuno-diffusion technique for the assay of rabies glycoprotein antigen: application for potency tests of vaccines against rabies. Journal of General Virology 59, 197-201.
- (5) Barth R., Gross-Albenhausen Ester, Jaeger O. und Milcke L. (1981). The antibody-binding-test, a useful method for quantitative determination of inactivated rabies virus antigen. Journal of Biological Standardization 9, 81-89.
- (6) Thraenhart O. (1986). Enzyme immuno assay (ELISA), Unpublished document, WHO Geneva (WHO/VPH/86.63)

... JEDENFALLS MELDE ICH MICH NIE MEHR FÜR DIE LIEBER-
WACHUNG EINES TOLLWUT - SCHUTZVERSUCHS !

