Wirksamkeitsprüfung von Rotlaufimpfstoffen an der Labormaus.

ELISA kontra Infektionsversuch

Rolf Beckmann und Klaus Cußler

Paul-Ehrlich-Institut, Abt. Veterinärmedizin, D-Langen

Zusammenfassung

Zur Prophylaxe des Rotlaufs bei landwirtschaftlichen Nutztieren werden inaktivierte Rotlaufimpfstoffe in großem Umfang eingesetzt. Als Wirksamkeitsprüfung dieser biologischen Präparate ist entsprechend den Arzneibuchanforderungen ein Mäuseinfektionsversuch vorgeschrieben. Hierbei werden die Überlebensraten von Mäusen, die mit dem Prüfimpfstoff geimpft wurden, und von Mäusen, denen ein internationaler Standardimpfstoff verabreicht wurde, verglichen. Dieser Versuch ist mit erheblichen Leiden für die Tiere verbunden. Die Entwicklung eines Enzym linked immunosorbent assays (ELISA), basierend auf einem alkalischen Extrakt von Erysipelothrix rhusiopathiae als Beschichtungsantigen, erlaubt die Bestimmung von Rotlaufantikörpern im Serum geimpfter Mäuse. Die in vitro Methode gibt verläßliche und reproduzierbare Ergebnisse. Durch den Vergleich der Antikörpertiter geimpfter Mäuse mit den Resultaten des Infektionsmodells konnte eine Korrelation der in vivo und in vitro Daten aufgezeigt werden. Der ELISA erscheint geeignet, den derzeit vorgeschriebenen Tierversuch zu verbessern. Die benötigte Tierzahl reduziert sich insgesamt erheblich.

Summary: Potency Testing of Erysipelas Vaccines in Mice. ELISA vs. Challenge

Vaccins are widely used for the prophylaxis of swine erysipelas. According to national pharmacopoiea requirements, potency of these biologicals has to be tested in a mouse challenge model. Many animals are needed and the test causes much suffering. The development of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using an alkaline extract of Erysipelothrix rhusiopathiae as antigen for coating the microtiter plate allows us to measure antibody titres in the serum of vaccinated mice. By comparing the antibody titres of vaccinated mice with the results of the animal challenge model it could be demonstrated that the in vitro method gives reliable and reproducible data which correlate with the results of the in vivo model. The ELISA offers the possibility to refine the currently used animal test, by replacing the challenge procedure and reducing the number of animals.

Keywords: erysipelas vaccines, potency, challenge, ELISA

1. Einleitung

Impfstoffe werden zur Prophylaxe der Rotlaufinfektion bei Schweinen, Puten und Schafen eingesetzt. Im Jahr 1992 wurden allein für den deutschen Markt über 4,3 Millionen Impfdosen freigegeben. Damit sind Rotlaufimpfstoffe die meist benutzten bakteriellen Vakzinen. Die meisten Produkte sind inaktivierte Impfstoffe. In zunehmendem Maße werden Kombinationsimpfstoffe mit anderen Tierseuchenerregern benutzt.

Für die Prüfung von Rotlaufimpfstoffen schreibt das Deutsche Arzneibuch (DAB) in einer speziellen Monographie mehrere Tierversuche vor (DAB 10, 1991). Ein besonders hoher Bedarf an Versuchstieren wird für den Wirksamkeitsnachweis, der für jede Produktionscharge durchgeführt werden muß, benötigt. Allein im Jahr 1992 war der Einsatz von ungefähr 10.000 Mäusen für diesen Test erforderlich.

Bei dieser Methode wird die Schutzwirkung des zu prüfenden Impfstoffs anhand der Überlebensrate von Mäusen beurteilt, die mit bestimmten Verdünnungen des Impfstoffs bzw. eines Referenzpräparates immunisiert wurden und später einer Infektion mit Rotlaufbakterien unterzogen werden. Um eine Berechnung der Wirksamkeit in Internationalen Einheiten (I.E.) vornehmen zu können, müssen die Impfstoffverdünnungen so gewählt werden, daß insgesamt etwas mehr als 50% aller Versuchstiere an einer Rotlaufseptikämie versterben. In der Tabelle 1 ist eine Kurzbeschreibung dieses Tierversuchs aufgeführt.

Die beachtlichen Tierzahlen und vor allem die extreme Belastung der Tiere im Infektionsversuch erfordern eine Überprüfung dieser Testmethode. Eine serologische Bestimmung von impfbedingten Antikörperspiegeln könnte eine praktikable Alternative zum Belastungsversuch darstellen. Neuere Untersuchungen über protektive Antigenstrukturen beim Rotlaufbakterium lassen eine derartige Prüfmethode möglich erscheinen.

Basierend auf den Untersuchungen von Groschup und Mitarbeitern (1991) und Weiß und Mitarbeitern (1994) über das protektive Antigen

Tabelle 1: Wirksamkeitsprüfung für inaktivierte Rotlaufimpfstoffe im Mäuseschutztest nach DAB 10

Versuchstiere		
Verwendete Tiere	weiße Mäuse Stamm NMRI, 17–22 g	
Benötigte Tierzahl	106, 6 Gruppen á 16 Tiere 1 Gruppe á 10 Tiere	
Gruppeneinteilung	Gruppen 1–3	WHO Standardpräparat
	Gruppen 4–6	Prüfimpfstoff
	Gruppe 7	10 Kontrolltiere
Impfstoffapplikation		
Dosis für Gruppe	Gruppe 1+4 :	4,5 IE/Maus
	Gruppe 2+5 :	1,5 IE/Maus
	Gruppe 3+6 :	0,5 IE/Maus
	Die Verdünnungen des Prüfstoffes werden nach dem Ergebnis des vorher durchgeführten Mäuseschutztests beim Hersteller durchgeführt.	
Verdünnungsmedium	0,9% NaCl-Lösung	
Applikationsmenge	0,5 ml für jedes Tier der Gruppen 1-6 Die Tiere der Gruppe 7 dienen als Kontrollen und erhalten keine Injektion.	
Applikationsart	*subcutan*	
Belastung		
Zeitpunkt	21 Tage nach Impfstoffapplikation	
Infektionsstamm	Lebende mäusevirulente Rotlaufbakterien, Stamm Ffm XI	
Belastungsdosis	Die Dosis muß so eingestellt sein, daß alle Kontrolltiere zwischen dem zweiten und fünften Tag *post infectionem* sterben (ca. 500 LD_{50}).	
Applikationsmenge	0,3 ml für jedes Tier der Gruppen 1–7	
Applikationsart	*intraperitoneal*	
Beobachtungszeit	8 Tage *post infectionem*	
Auswertung		
Vergleich der Überlebensrate der Mäuse aus den Standardgruppen mit der der Prüfimpfstoffgruppen mittels Probitanalyse (Maximum-Likelihood-Schätzer)		
Geforderte Mindestwirksamkeit für Prüfimpfstoffe: 50 I.E./Schweinedosis		

(pAg) wurde ein *enzym linked immunosorbent assay* (ELISA) entwikkelt und hinsichtlich seiner Eignung als Alternative zum Rotlaufinfektionsversuch geprüft.

2. Versuchstiere, Material und Methoden

2.1 Impfstoffe

Alle für den deutschen Markt zugelassenen inaktivierten Rotlaufimpfstoffe wurden in die Untersuchung einbezogen. Ferner konnten einige Impfstoffe, die in einem anderen europäischen Land zugelassen sind oder sich in einem Zulassungsverfahren befinden, getestet werden. Insgesamt wurden 12 Produkte geprüft.

Der Internationale Standardimpfstoff der WHO wurde in allen Versuchen mitgeführt.

2.2 Wirksamkeitsprüfung im Tierversuch

Der Mäuseschutztest wurde entsprechend den Vorgaben des DAB (siehe Tabelle 1) durchgeführt.

Es wurden ausschließlich weibliche SPF-Mäuse (Stamm NMRI) im Gewicht von 17-22 g eingesetzt. Die Tiere wurden jeweils in Gruppen in Makrolon-Käfigen unter Standardbedingungen gehalten.

Zur Überprüfung der serologischen Methode wurden zusätzlich je Impfstoffverdünnung 5 Tiere immunisiert. Diese Tiere wurden nach 3 Wochen (Zeitpunkt der Belastungsinfektion) in letaler Narkose entblutet.

2.3 Unschädlichkeitsprüfung an der Maus

Mäuse, die entsprechend der Arzneibuchmonographie zur Prüfung auf Unschädlichkeit zum Einsatz kamen, wurden für die Untersuchung der Antikörperentwicklung nach der Rotlaufimpfung verwendet (DAB, 1991).

2.4 ELISA

Das Beschichtungsantigen wurde aus einem aufgereinigten Lysatüberstand des Rotlaufstammes Frankfurt XI (Serotyp N) hergestellt, auf einen Proteingehalt von 1,7 mg/ml eingestellt und lyophilisiert. Die Protein-

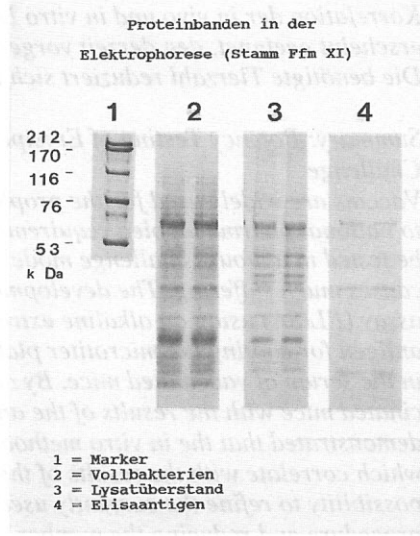

Abbildung 1: ELISA-Antigen, gewonnen aus Bakterien des Rotlaufstammes Frankfurt XI. Darstellung der Proteinbanden in einer 7,5%igen reduzierten SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Coomassie-Färbung).
Spalte 1 = Banden des Molekulargewichtsmarkers in Kilodalton (kDa)
Spalte 2 = Stamm Frankfurt XI, Vollbakterien
Spalte 3 = Überstand nach alkalischer Lysierung der Frankfurt XI Bakterien
Spalte 4 = Filtrat des Lysatüberstandes, das als ELISA-Antigen eingesetzt wird

zusammensctzung des Antigens ist in Abbildung 1.

Für die Beschichtung wurde das Antigenlyophilisat auf das Ausgangsvolumen mit *aqua dest.* resuspendiert und 1:100 in Carbonatpuffer, pH 9,6 verdünnt. Mit 100 µl/Depot dieser Lösung wurden Maxisorb Immunoplatten (Nunc, Dänemark) ca. 16 Stunden bei 4°C beschichtet. Für alle folgenden Reaktionsschritte gilt, wenn nicht anders beschrieben, daß jeweils 100 µl Reaktionslösung je Kavität verwendet wurden und die Inkubationszeit eine Stunde bei 37°C betrug. Zwischen den Reaktionsschritten wurde jeweils dreimal mit PBS(0,05%)-Tween 20 gewaschen (PW 96, SLT, Crailsheim), wobei die Inkubationszeit des Waschpuffers jeweils 30 Sekunden betrug. Alle Verdünnungspuffer entsprachen der Zusammensetzung des Waschpuffers. Nach dem Beschicken der Platten mit 150 µl Blockierungspuffer/Depot (PBS, 2% Polyvinylpyrolidon) wurde, beginnend mit einer Verdünnung von 1:100, aus den Testseren und dem positiven Kontrollserum eine log2 Verdünnungsreihe in Doppelbestimmung hergestellt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte über ein biotinyliertes Anti-Maus-IgG-Fc-Fragment von der Ziege (Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:10 000 und über ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:75 000. Als Substrat zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität wurde Tetramethyl-Benzidin (TMB) (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Der Substratumsatz vollzog sich bei Raumtemperatur und wurde nach fünf Minuten durch Zugabe von 50 µl 2.5 molarer Schwefelsäure je Reaktionseinheit beendet. Die Ermittlung der Extinktionswerte erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm (340 AT, SLT, Crailsheim).

Der Aufbau des ELISA ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

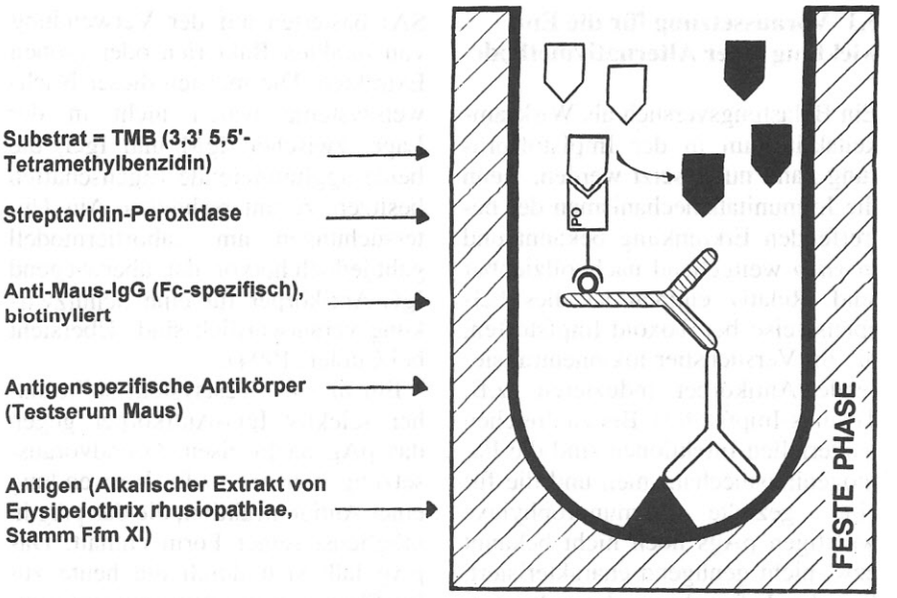

Abbildung 2: Prinzip des Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Rotlaufantikörper-Bestimmung von Mäuseseren

2.5 Statistik

Die I.E. im Mäuseschutzversuch wurden mittels Probitanalyse berechnet.

Die Bestimmung der ELISA-Einheiten (EE) wurde mit einem *parallel line assay*, der für Wirksamkeitsprüfungen von Diphtherie-, Pertussis- und Tetanusimpfstoffen entwikkelt wurde, durchgeführt (WHO, 1992).

Eine lineare Regressionsanalyse (Trend) wurde für den Vergleich beider Testsysteme benutzt. Die Ergebnisse wurden in Harward Graphics 3.0 (Fa. Microsoft) ausgewertet.

3. Ergebnisse und Diskussion

Inaktivierte Impfstoffe gegen die Rotlaufinfektion der Schweine wurden bereits in den fünfziger Jahren entwickelt. Die Impfstoffe wurden in großem Umfang eingesetzt und haben entscheidend zum Rückgang der Rotlaufinfektion beigetragen. Wegen der herausragenden Bedeutung der Impfstoffe wurden schon frühzeitig staatliche Vorschriften für die Prüfung dieser Produkte erlassen.

Im Laufe von Zulassungsverfahren werden Infektionsversuche am Schwein zur Bestimmung der Wirksamkeit verlangt. Für Routineprüfungen zur Chargenfreigabe ist die Verwendung von landwirtschaftlichen Nutztieren viel zu aufwendig. Deshalb wurden schon frühzeitig Infektionsmodelle an der Labormaus, die für eine Rotlauferkrankung sehr empfänglich ist, entwickelt. Ein solcher Mäuseschutzversuch wurde folglich in der DAB-Monographie für inaktivierte Rotlaufimpfstoffe festgeschrieben (siehe Tabelle 1). Dieser Wirksamkeitstest hat sich bewährt und dazu beigetragen, daß die Rotlaufimpfstoffe eine sehr gute und von Herstellungsgang zu Herstellungsgang relativ gleichmäßige Wirksamkeit aufweisen. Die heute auf dem Markt befindlichen Produkte liegen in ihrer Schutzkraft deutlich über der geforderten Mindestwirksamkeit von 50 I.E. .

Die Versuchstiere sind bei der Wirksamkeitsprüfung sehr starken Leiden ausgesetzt. Die Versuchsvorschriften schreiben eine Lebend-Tot-Auszählung bindend vor. Das Einschläfern von Tieren beim Auftreten typischer Krankheitssymptome ist nicht vorgesehen, weil dies das Versuchsergebnis stark beeinflussen könnte. Eine Änderung dieser Prüfmethoden ist aus Tierschutzgründen dringend geboten.

3.1 Voraussetzung für die Entwicklung einer Alternativmethode

Ein Belastungsversuch als Wirksamkeitskriterium in der Impfstoffprüfung kann nur ersetzt werden, wenn die Immunitätsmechanismen der betreffenden Erkrankung bekannt und *in vitro* weitgehend nachvollziehbar sind. Relativ einfach ist dies beispielsweise bei Toxoid-Impfstoffen, die im Versuchstier toxinneutralisierende Antikörper induzieren (z.B. Tetanus-Impfstoffe). Bei zahlreichen bakteriellen Infektionen sind die Pathogenitätsmechanismen und die für eine gezielte Immunprophylaxe wichtigen pAgs noch nicht bekannt bzw. nicht genügend charakterisiert. Bei der Erforschung des pAg von *Erysipelothrix rhusiopathiae* wurden in den letzten Jahren entscheidende Fortschritte erzielt. Aus mehreren Arbeiten ist zu entnehmen, daß ein Proteinantigen im 66-64 kD-Molekulargewichtsbereich als wesentliches pAg des Rotlaufbakteriums beschrieben wurde (Übersicht bei Weiß und Mitarbeitern,1994).

Es ist schon sehr lange bekannt, daß der Schutz vor einer Rotlaufinfektion durch eine passive Immunisierung erzielt werden kann. Natürlicherweise sind Ferkel durch die Aufnahme mütterlicher Antikörper über einen relativ langen Zeitraum gegenüber Rotlauf geschützt. Dies bedeutet, daß die humorale Immunantwort bei der Rotlaufinfektion eine entscheidende Rolle spielt. Die Bestimmung schützender Rotlaufantikörper im Serum geimpfter Tiere erlaubt somit einen Rückschluß auf die Immunitätslage. Die Entwicklung einer serologischen Wirksamkeitsprüfung für Rotlaufimpfstoffe, basierend auf dem Nachweis Impfstoff-induzierter Antikörper gegen das pAg, sollte daher möglich sein.

3.2 Serologischer Nachweis schützender Antikörper

Die bisher zur Verfügung stehenden serologischen Nachweismethoden für Rotlaufantikörper (Langsamagglutination, Wachstumsprobe, ELISA) basierten auf der Verwendung von intakten Bakterien oder groben Extrakten. Die meisten dieser Nachweissysteme waren nicht in der Lage, zwischen IgM und IgG, die beide agglutinierende Eigenschaften besitzen, zu unterschieden. Aus Untersuchungen am Labortiermodell geht jedoch hervor, daß überwiegend IgG-Antikörper für eine Schutzwirkung verantwortlich sind (Übersicht bei Cußler, 1994).

Ein *in vitro* Testsystem sollte daher selektiv IgG-Antikörper gegen das pAg nachweisen. Grundvoraussetzung hierfür ist die Verwendung einer Antigenfraktion, die das pAg in möglichst reiner Form enthält. Das pAg läßt sich durch die heute zur Verfügung stehenden immunchemischen Methoden in hochreiner Form darstellen. Die verbleibenden Antigenmengen sind allerdings derart gering, daß sie höchstens für Immunisierungen und wenige, exemplarische Versuchsansätze ausreichen. Die zur Herstellung von Referenzmaterialien notwendigen Mengen an pAg lassen sich im Labor nicht produzieren. Es wurde daher ein aufgereinigter Antigenextrakt verwendet. Durch alkalische Lyse läßt sich das pAg sehr gut gewinnen (Groschup und Mitarbeiter, 1991). Dieses Verfahren wird auch bei der Impfstoffherstellung angewandt. Der alkalische Extrakt wurde durch Filtrierung gereinigt und lyophilisiert. Der Rotlaufstamm Frankfurt XI (Serotyp N) wurde verwendet, weil dieser als Infektionsstamm für den Belastungsversuch eingesetzt wird. Der Antigenextrakt enthält zwar noch weitere Rotlaufantigene, die pAg-Fraktion ist jedoch deutlich angereichert (Abb. 1).

Die Mikrotiterplatten wurden mit diesem Antigen beschichtet. Durch die Verwendung eines Mäuse-IgG-spezifischen Konjugats ist der Nachweis dieser als schützend beschriebenen Immunglobulinfraktion gegeben. Der ELISA-Aufbau ist in Abbildung 2 in einer Übersicht dargestellt. Es wurde darauf geachtet, daß die Methodik einfach durchführbar ist und die Reagenzien (mit Ausnahme der Referenzmaterialien) frei verfügbar sind, damit der Test gut nachvollziehbar ist.

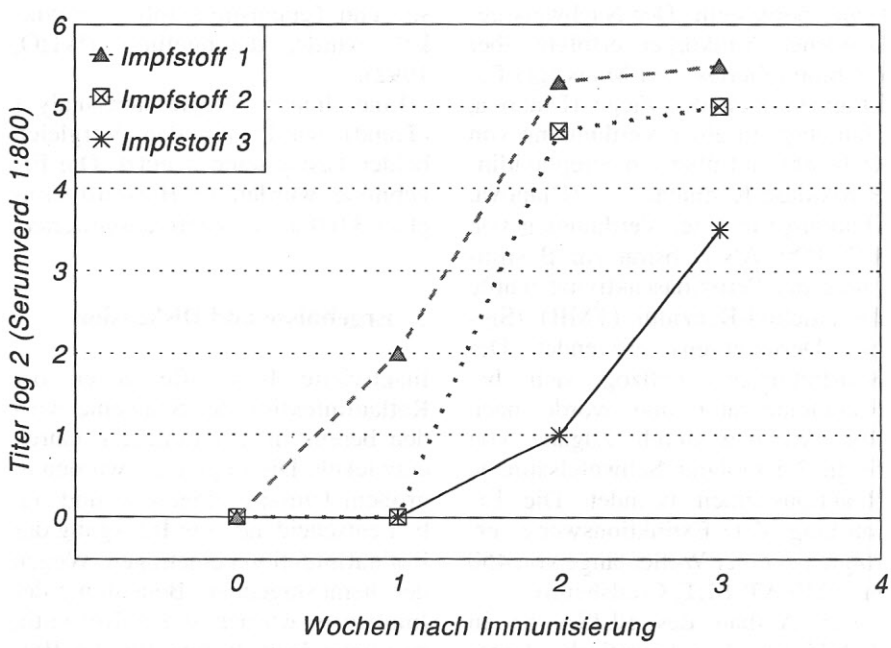

Abbildung 3: IgG Antikörperentwicklung von NMRI Mäusen nach einmaliger Immunisierung mit 0.5 ml inaktiviertem Rotlaufimpfstoff
Die Serumtiter wurden in einer log2 Verdünnungsreihe, beginnend mit der Serumvorverdünnung 1:800, im ELISA bestimmt. Die einzelnen Punkte stellen den Mittelwert von 3 Mäuseseren dar.

3.3 Antikörperbildung bei der Maus nach einer Rotlaufimpfung

Um einen Überblick über den Antikörpertiterverlauf nach einer Rotlaufimpfung bei der Maus zu gewinnen, wurden Tiere, die ohnehin für die Prüfung der Unschädlichkeit von Rotlaufimpfstoffen bereits im Versuch waren, zusätzlich auf ihre Antikörperspiegel hin untersucht. Wie der Abbildung 3 zu entnehmen ist, kann schon zwei Wochen nach der Immmunisierung eine Antikörperentwicklung nachgewiesen werden. Nach drei Wochen ist bei allen Tieren ein hoher Antikörperspiegel vorhanden. Dieser Zeitpunkt, an dem auch die Belastungsinfektion gesetzt wird, ist für eine serologische Bewertung des erreichten Immunstatus gut geeignet.

Weiterhin wurde überprüft, auf welche Antigendosen die Maus mit einer meßbaren Antikörperantwort reagiert. Dabei wurde festgestellt, daß eine Antigenmenge unterhalb von 0,5 I.E. pro Dosis nur bei wenigen Tieren eine nachweisbare Immunantwort induziert. Die Verabreichung von 5 I.E. bewirkt dagegen eine maximale Antikörperbildung. Durch höhere Antigendosen ist hier keine Steigerung mehr möglich. Die nach der Arzneibuchmonographie zu verabreichenden Antigendosen zwischen 0,5 und 5 I.E. können daher auch für das serologische Nachweissystem eingesetzt werden.

Mäuse, die entsprechend der Arzneibuchmonographie mit abgestuften Dosen des Internationalen Standardpräparats geimpft wurden, zeigten dementsprechend eine deutlich von der Impfdosis abhängige Antikörperentwicklung. Zwischen den einzelnen Tieren einer Gruppe gab es allerdings deutliche Schwankungen. Daraus ist zu schließen, daß Untersuchungen an Einzeltieren wenig aussagekräftig sind. Nach den bisherigen Erfahrungen halten wir den Einsatz von mindestens 6 Tieren je Verdünnungsstufe für angebracht.

3.4 Ergebnisvergleich von ELISA und Tierversuch

Zwölf Impfstoffe wurden vergleichend im Tierversuch und im ELISA untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 und der Abbildung 4 dargestellt. Es ist ersichtlich, daß die serologische Bestimmung in ELISA-Einheiten eine höhere Bewertung der Wirksamkeit ergibt als der entsprechende Tierversuch. Dies läßt sich durch einen Korrekturfaktor ausgleichen. Der Korrelationskoeffizient zwischen den mit beiden Testmethoden ermittelten Ergebnissen beträgt 0,65. Damit ist die Korrelation deutlich schlechter als dies beispielsweise bei dem Vergleich von *in vivo* und *in vitro* Methoden zur Bewertung der Wirksamkeit von Toxoidimpfstoffen der Fall ist (van der Ark et al., 1994).

Tabelle 2: Gegenüberstellung der Ergebnisse aus ELISA und Tierversuch

Testimpfstoff	EE (ELISA)	I.E. (TV)
Nr. 1	174	97
Nr. 2	101	56
Nr. 3	178	174
Nr. 4	52	145
Nr. 5	30	18
Nr. 6	111	218
Nr. 7	13	18
Nr. 8	86	53
Nr. 10	34	103
Nr. 11	254	204
Nr. 12	24	31

Die Werte zeigen die Wirksamkeit von einem ml Impfstoff.
Die ELISA-Ergebnisse (ELISA) resultieren aus der Doppelbestimmung von 30 Mäuseseren eines Versuches. Sie sind in ELISA-Einheiten (EE) angegeben. Die Tierversuchsergebnisse (TV) sind die Mittelwerte aus 2 Tierversuchen. Sie sind in Internationalen Einheiten (I.E.) angegeben.

Zur Erklärung seien folgende Sachverhalte angeführt:

1. Es ist zu bedenken, daß im ELISA kein reines pAg eingesetzt werden konnte. Nicht schützende Antikörper werden in gewissem Umfang miterfaßt. Hier könnte die Herstellungsweise eines Impfstoffs ebenfalls eine Rolle spielen, indem z.B. Lysatimpfstoffe in diesem Testsystem höhere Antikörpertiter induzieren als Adsorbatimpfstoffe.
2. Die Ergebnisse des Tierversuchs unterliegen beachtlichen Schwankungen. Folgende Beispiele seien hier angeführt:

a) Bei der Validierung des Standards für Rotlaufimpfstoffe in einem internationalen Ringversuch zeigten die Ergebnisse der Tierversuche starke Differenzen zwischen den Laboratorien. Ein Labor wurde wegen zu stark abweichender Ergebnisse bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

b) Impfstoffproben, die zur Untersuchung der Verwendbarkeitsdauer beim gleichen Hersteller regelmäßig im Tierversuch getestet werden, zeigen ebenfalls deutliche Ergebnisschwankungen (eigene Beobachtung).

c) Ein Vergleich der Tierversuchsergebnisse der hier eingesetzten Impfstoffchargen von Herstellern und Prüfbehörde hat einen Korrelationskoeffizienten von 0,8 ergeben.

3. Der Vergleich des ELISA mit dem Mäusemodell ist ebenfalls als problematisch anzusehen, da der Mäuseschutztest seinerseits niemals in aussagekräftigen vergleichenden Untersuchungen mit den Ergebnissen am Zieltier Schwein untersucht wurde. Daher liegen auch keine Angaben über die schützende Antigendosis in I.E. beim Schwein vor. Ferner gibt es Aussagen darüber, daß Impfstoffe, obwohl sie im Mäusemodell als wirksam beurteilt wurden, das Schwein nicht ausreichend schützen (persönliche Mitteilungen von Hendersen, 1994; Knight, 1993). Die Aussagekraft des Mäusemodells bezogen auf die Zieltierspezies Schwein ist daher sicherlich nicht sehr hoch. Es wäre zu fordern, die Ergebnisse der serologischen Arbeiten an der Labormaus mit Untersuchungen direkt am Schwein zu vergleichen.

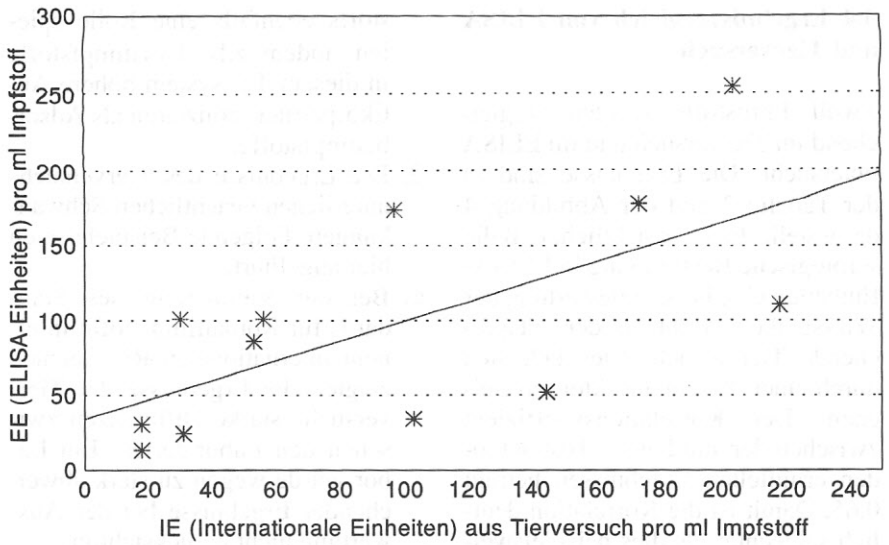

Abbildung 4: Vergleich der Ergebnisse von Tierversuch nach DAB 10 und ELISA-Technik bei der Wirksamkeitsprüfung von Rotlaufimpfstoffen
Jeder Stern repräsentiert einen Impfstoff. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,6521.

4. Bei der Untersuchung von Rotlaufimmunseren im Tierversuch und im ELISA (unter Verwendung des gleichen Beschichtungsantigens) konnte eine wesentlich bessere Korrelation der Versuchsergebnisse erreicht werden (0,89 für Antiseren vom Pferd; 0,88 für Antiseren vom Schwein). Immunseren können allerdings direkt im ELISA gemessen werden und müssen nicht erst wie Impfstoffe einen zwischengeschalteten Tierversuch durchlaufen.

Da der Mäuseschutztest nur unzureichend auf seine Aussagekraft für die Zieltierart Schwein untersucht wurde und selbst keine sehr gute Reproduzierbarkeit besitzt, stellt sich die Frage, ob es überhaupt sinnvoll sei, eine Alternativmethode mit dem Mäuseschutzmodell zu vergleichen, Ein Vergleich serologischer Parameter zwischen Labormaus und Schwein wäre hier sicherlich vorzuziehen. Der hier beschriebene ELISA läßt sich für die Untersuchung von Schweineseren modifizieren (Gyra und Mitarbeiter, 1994).

* *Die Arbeitsanleitungen können bei den Verfassern angefordert werden.*

4. Ausblick

Die Durchführung des Mäuseschutztests ist im DAB genau festgelegt. Um diesen stark belastenden Tierversuch durch eine serologische Testmethode ablösen zu können, sind mehrere Vorgehensweisen denkbar:

1. Änderung der Arzneibuchmonographie
   Eine Änderung der Arzneibuchmonographie würde für alle im Gültigkeitsbereich des EAB zugelassenen Rotlaufimpfstoffe gelten. Eine Arzneibuchmethode wird jedoch in aller Regel erst geändert, wenn die serologische Methode in einem groß angelegten Ringversuch geprüft wurde. Hierzu wird eine gute Korrelation zu den Ergebnissen des Mäuseschutzmodells gefordert. Auf die zu erwartenden Probleme wurde bereits hingewiesen. Derartige Ringversuche sind zudem enorm zeit- und arbeitsaufwendig. Sie müssen daher von internationalen Organisationen (EP, EU oder WHO) initiiert und finanziert werden.
2. Ergänzung der Arzneibuchmonographie
   Die serologische Testmethode könnte zusätzlich in die Monographie aufgenommen werden. Auch andere Arzneibuchvorschriften enthalten zwei Prüfmethoden. Der weitaus überwiegende Anteil der Prüfungen könnte dann mit dem ELISA durchgeführt werden. Für die ersten Chargen neuer Impfstoffe und für die Fälle, in denen die serologische Methode eine grenzwertige oder ungenügende Wirksamkeit aufzeigt, könnte der Tierversuch als Bestätigungs- bzw. Entscheidungsprüfung herangezogen werden.
3. Nachweis der Vergleichbarkeit beider Methoden für ein Einzelprodukt
   Die Verordnung zum Deutschen Arzneibuch bietet einem Hersteller in §2 die Möglichkeit, eine im Arzneibuch vorgeschriebene Methodik dann zu verlassen, wenn eine gleichwertige Testmethode zur Verfügung steht. Dies ist bei der zuständigen Zulassungsbehörde für jedes Produkt gesondert zu beantragen. Für Impfstoffe, die nur in wenigen Ländern zugelassen sind, ist dies sicherlich ein praktikabler Weg. Es gilt zu bedenken, daß die vorliegende Untersuchung die breite Palette aller zugelassenen Präparate eingeschlossen hat. Für den Impfstoff eines einzelnen Herstellers, der unter gleichmäßigen Bedingungen produziert, dürften die Resultate bedeutend besser ausfallen.

In allen Fällen ist jedoch der Ergebnisvergleich von serologischer Methode und Belastungsversuch erforderlich. Um diese Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden bei der Entwicklung der serologischen Methode möglichst viele Parameter des Belastungsversuchs (Immunisierungsschema, Immunisierungsdosen, etc.) beibehalten.

Es wurden ausführliche Arbeitsanleitungen zur Herstellung des Beschichtungsantigens und zur ELISA-Durchführung erstellt (*). Damit sollten die Hersteller, aber auch andere Zulassungsbehörden in der

Tabelle 3: Vor- und Nachteile von Tierversuch nach DAB 10 und Alternativmethode im ELISA

Aspekt	Mäuseschutztest nach DAB 10	Rotlaufantikörperbestimmung im ELISA
Tierschutz	Tierversuch verbunden mit schweren Leiden und großer Tierzahl	Tierversuch verbunden mit geringer Belastung und reduzierter Tierzahl
Personalgefährdung	mäßig: Infektionsversuch mit Zoonoseerregern	keine
Versuchsdauer	lang: 29 Tage	geringer: 22 Tage
Personalaufwand	hoch	mäßig
Techn. Aufwand	gering	hoch

Lage sein, eine serologische Wirksamkeitsprüfung aufzubauen und die Vergleichbarkeit mit den Schutzversuchen zu prüfen.

Zum Schluß sei noch darauf hingewiesen, daß eine Wirksamkeitsprüfung mit ELISA gegenüber dem Tierversuch neben den Tierschutzaspekten noch weitere erhebliche Vorteile in den Bereichen Personalschutz und Prüfungskosten bietet (Tabelle 3).

5. Literaturverzeichnis

Ark, A., van der, Gun, J, van der, Straaten-van de Kappelle, I. und Hendriksen, C. (1994). Assessment of the potency of Diphtheria, Pertussis and Tetanus component in combined vaccines by the use of *in vitro* serological assay systems. *Proceedings of the World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences,* 1993, Baltimore, USA (im Druck)

Cußler, K. (1994). Rotlaufprophylaxe. In H. Blobel und Th. Schließer (Hrsg.), *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band II, Teil 2* (232–248). Jena: Gustav Fischer.

Deutsches Arzneibuch (DAB), 10. Ausgabe (1991). Stuttgart: Deutscher Apothekerverlag.

Groschup, M., Cußler, K., Weiß, R. und Timoney, J. F. (1991). Characterization of a protective protein of *Erysipelothrix rhusiopathiae. Epidem. Inf. 107,* 637–649.

Gyra, H., Volmer, R. und Hausleithner, D. (1994). Untersuchungen zur Entwicklung alternativer Wirksamkeitsprüfungen von Rotlaufimpfstoffen. *ALTEX 11, Suppl.* 46–54.

Weiß, R., Groschup, M. und Nakov, C. (1994). Zum derzeitigen Kenntnisstand über das protektive Antigen von *Erysipelothrix rhusiopathiae. ALTEX 11, Suppl.* 35–38.

WHO (1992). Laboratory methods for the testing for potency of diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines. Restricted document BLG/92.1

Danksagung

Dieses Projekt wird vom Bundesministerium für Forschung und Technologie im Rahmen des Förderprogrammes „Ersatzmethoden zum Tierversuch" gefördert.

Korrespondenzadresse

Rolf Beckmann
Paul-Ehrlich-Institut,
Abt. Veterinärmedizin
D-63207 Langen