

# Untersuchungen zur Entwicklung alternativer Wirksamkeitsprüfungen von Rotlaufimpfstoffen

Heike Gyra<sup>1</sup>, Renate Volmer<sup>2</sup> und Dorothea Hausleithner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung 4 : Veterinärmedizin, D-Langen

<sup>2</sup>Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Südhessen, D-Frankfurt/Main

## Zusammenfassung

Rotlaufimpfstoffe sind das wichtigste Prophylaktikum gegen eine durch *Erysipelothrix rhusiopathiae* verursachte Infektion der Schweine. Üblicherweise werden sie durch eine Infektionsbelastung schutzgeimpfter Schweine im Vergleich zu Kontrolltieren auf ihre Wirksamkeit überprüft. Die Bemühungen, den Infektionsversuch durch eine serologische Überwachung nach Impfstoffapplikation zu ersetzen, waren bisher nur auf kleine Versuchstiere ausgerichtet. Um zu zeigen, daß eine Titerentwicklung auch im Zieltier nachweisbar ist, wurden Schweineseren nach Applikation verschiedener Impfstoffe sowie nachfolgender Belastungsinfektionen auf ihren Antikörpergehalt untersucht. Weiterhin wurden Seren, gewonnen im Rahmen einer Feldstudie, in die Erhebung einbezogen. Als serologisches Werkzeug wurde ein ELISA genutzt.

Nach einer ein- bzw. zweimaligen Impfung wurden Antikörper (Ak)-Titer von 1:94–1:1411 bzw. 1:420–1:3095 nachgewiesen. Die Effizienz der Impfstoffe wurde über einen Schutzversuch bestätigt.

Die ermittelten Ergebnisse verdeutlichen, daß nach einer erfolgten Impfung gegen Rotlauf ein Ak-Nachweis beim Schwein mittels ELISA grundsätzlich möglich ist. Eine zweimalige Immunisierung ist gegenüber einer Einzelimmunisierung wesentlich günstiger hinsichtlich Ak-Entwicklung. Die Methode scheint zum Ersatz der Infektionsversuche im Rahmen der Wirksamkeitsbestimmung von Rotlaufimpfstoffen geeignet.

*Summary: Investigation about development of alternative efficacy verifications of swine erysipelas vaccines.*

*Vaccination is the most effective prophylaxis against swine erysipelas. Vaccines are usually tested for efficacy by a challenge of vaccinated and untreated pigs. Up to now the efforts to replace the infection test by a serological method have been limited to the potency test in laboratory animals. Here we provide evidence that the measurement of antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after vaccination and challenge is also possible in the target species. Pig sera were tested for titer development after a single and repeated vaccination in clinical trials. The efficacy of the vaccines was confirmed by a challenge, which demonstrated that all immunized pigs survived with no signs of disease whereas all control animals became severely ill. The ELISA was also used to measure erysipelas antibodies after immunization of pigs with several vaccines in a field trial. The ELISA may be a suitable alternative to replace the challenge methods currently used for testing of erysipelas vaccines.*

**Keywords:** swine erysipelas vaccine, alternative potency test, erysipelas antibody, ELISA

## 1. Einführung

*Erysipelothrix rhusiopathiae* (*E.rh.*) ist unter natürlichen Haltungsbedingungen bei landwirtschaftlichen Nutztieren weit verbreitet. Allgemeine Hygienemaßnahmen können lediglich eine Keimreduzierung bewirken, eine Infektion und somit eine mögliche Rotlaferkrankung aber nicht ausschließen. Unter den gegebenen Umständen bildet somit die Immunprophylaxe die wesentlichste Präventivmaßnahme.

Der Rotlaufimpfstoff ist das wichtigste Prophylaktikum gegen eine durch *E.rh.* verursachte bakterielle Infektion der Schweine. Im Jahr 1992 wurden in Deutschland über 4.300.000 Impfdosen eingesetzt.

Neben den Rotlauflebendimpfstoffen werden Totimpfstoffe unterschieden; letztere unterteilen sich in Adsorbatimpfstoffe und Lysatimpfstoffe. Diese Palette wird durch die Kombinationsimpfstoffe ergänzt, die neben *E.rh.* meistens Viren enthalten.

Die Rotlaufimpfstoffe werden im Rahmen des Zulassungsverfahrens durch eine Infektionsbelastung schutzgeimpfter Schweine im Vergleich zu Kontrolltieren auf ihre Wirksamkeit überprüft (Möhlmann et al., 1963; Hubrig et al., 1964; Eissner und Ewald, 1973).

Für die Chargenprüfung von Rotlauflebendimpfstoffen schreibt die amerikanische Prüfvorschrift (Code of Federal Regulations [CFR]) vor, daß nach einer intramuskulären Injektion des Referenzstammes mindestens 75% der geimpften Tiere geschützt sind und mindestens 75% der Kontrolltiere deutliche Rotlafer-

scheinungen zeigen müssen. Vergleichbare Anforderungen gelten in anderen Ländern.

In Deutschland kann die Lebendkeimzahlbestimmung als alleiniger Nachweis der Potency für die Chargenprüfung akzeptiert werden, sofern die Wirksamkeit des Rotlauflebendimpfstoffes im Schweineschutzversuch an mehreren aufeinanderfolgenden Chargen parallel zur Lebendkeimzahlbestimmung nachgewiesen wurde.

Für inaktivierte Impfstoffe (Adsorbatimpfstoffe, Lysatimpfstoffe) ist nach dem Europäischen Arzneibuch (EAB) und dem Deutschen Arzneibuch 10 (DAB 10, Arzneibuchmonographie „Schweinerotlaufimpfstoff“) ein Mäuseschutztest als Kriterium der Wertbemessung vorgeschrieben. Für Kombinationsimpfstoffe gelten die gleichen Anforderungen.

Schweinebelastungsversuche sind mit erheblichen Leiden für die Tiere verbunden und sollten daher reduziert bzw. mit einem serologischen Verfahren zur Wertbemessung ersetzt werden.

Zur Bestimmung humoraler protektiver Antikörper sowie einer Einschätzung des Immunstatus beim Schwein gelangten verschiedene serologische Methoden zur Anwendung. Die auf Watts (1949) zurückzuführende Wachstumsprobe, verschiedene Agglutinationsverfahren sowie der ELISA wurden zum Nachweis von Ak gegen *E. rh.* herangezogen (Binder und Mathois, 1985; Hubrig, 1961; Kovalenko et al., 1970; Sawada et al., 1979; Sawada et al., 1987; Kirchhoff et al., 1985; Dahms et al., 1989; Schilow et al., 1991). Auswertung und Diskussion der Ergebnisse dieser Methoden waren jedoch auf die Anforderungen der klinischen Diagnose gerichtet bzw. wurden zur Untersuchung von hochtitrigen Immunsereen eingesetzt (Dahms et al., 1991).

Mittels serologischer Verfahren, denen eine Agglutinationsreaktion zugrunde liegt, werden beide Ak-Klassen (IgG und IgM) gleichermaßen erfaßt. Da die Ergebnisse aber je nach dem Verhältnis beider Immun-

globulin-Klassen unterschiedlich ausfallen können, wird der direkte Vergleich weiter erschwert.

Tasker (1981) kam ebenfalls zum Schluß, daß der Agglutinationstiter und die Schutzrate des Schweines in keiner sicheren Abhängigkeit zueinander stehen; der Test kann nur als unzulänglicher Anzeiger für den Immun- bzw. Infektionsstatus der Tiere angesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob eine Titerentwicklung auch im Zieltier Schwein, nach Applikation verschiedener Impfstoffe sowie nachfolgender Belastungsinfektionen, mit einem ELISA nachweisbar ist. In die Untersuchungen wurden Seren aus verschiedenen Infektionsversuchen sowie einer Feldstudie einbezogen.

## 2. Tiere, Material und Methoden

### 2.1 Der ELISA

#### 2.1.1 Die Präparation des ELISA-Antigens

Die Präparation des Rotlaufantigens wurde an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Beckmann und Cußler, S. 39).

#### 2.1.2 Die Durchführung des Testes

Ein Antigenlyophilisat wurde in *aqua dest.* resuspendiert und 1:100 in Carbonatpuffer, pH 9,6, verdünnt. Mit 100 µl/Depot dieser Lösung wurden Mikrotiterplatten (MTP) (Nr.650101, Greiner GmbH, Deutschland) beschichtet, bei 4°C 16 h über Nacht inkubiert und anschließend dreimalig in einem Waschautomaten für MTP (PW 96, Fa. SLT, Crailsheim) gewaschen. Für alle folgenden Reaktionsschritte gilt, wenn nicht anders beschrieben, daß bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C pro Testschritt jeweils 100 µl Reaktionslösung je Kavität verwendet wurde. Zwischen den Reaktionsschritten wurde dreimal mit PBS, 0,05% Tween gewaschen, wobei die Inkubationszeit des Waschpuffers pro Platte jeweils 30 Sekun-

den betrug. Alle Verdünnungspuffer entsprachen der Zusammensetzung des Waschpuffers. Nach dem Blockieren der Platten mit 150 µl Blockierungspuffer (PBS, 3%iges boviner Serumalbumin) je Depot, wurde eine log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe, beginnend mit einer Verdünnung von 1:125, mit den Testseren und dem hauseigenen Rotlaufschweineserumstandard (Rs7) hergestellt. Die Auswertung dieser Titrationsreihe versteht sich als Doppelbestimmung. Der Nachweis der Antikörper im Serum erfolgte mit einem Anti-Schwein-IgG-Peroxidase-Konjugat (Dianova, Hamburg) in einer Gebrauchsverdünnung von 1:6000. Als Substrat zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität wurde Tetramethylbenzidin (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).

### 2.2 Infektionsversuche

#### 2.2.1 Erster Versuch: Wirksamkeitsnachweis bei einem Rotlauflebendimpfstoff

Die Tiere, zehn Masthybriden im Alter von 8–10 Wochen, wurden in eine Impfgruppe und eine Kontrollgruppe von jeweils 5 Schweinen eingeteilt. Die Impfung erfolgte mit der vorgeschriebenen Dosis *s.c.* am rechten Ohrgrund. Drei Wochen später wurden alle Tiere mit verschiedenen Rotlaufstämmen der Serotypen 1, 2 und N *intradermal* infiziert. Die Infektion wurde mit 0,1 ml einer Suspension, die 10<sup>6</sup> koloniebildende Einheiten (KBE) enthielt, *intradermal* an drei Stellen des Rückens an beiden Körperseiten vorgenommen. Die Schweine wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen *post infectionem* beobachtet.

Von allen Tieren wurden vor der Impfung, drei Wochen nach der Impfung (zum Zeitpunkt der Infektion)

und eine Woche nach der Infektion Blutproben aus der *vena cava cranialis* entnommen. Die Serumgewinnung erfolgte durch eine 15minütige Zentrifugation bei  $2000 \times g$  in einer Varifuge RF (Hereaus Zebatech, Osterrode). Das Serum wurde in Kryoröhrchen (Nunc Dänemark) portioniert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.2 Zweiter Versuch: Wirksamkeitsnachweis eines Rotlaufkombinationsimpfstoffes

Die Seren wurden uns freundlicherweise von einer Firma, die im Rahmen des Zulassungsverfahrens einen Belastungsversuch durchgeführt hat, zur Verfügung gestellt.

Von den 10 in den Infektionsversuch einbezogenen Tiere wurden fünf Schweine im Alter von 10 Wochen das erste Mal mit 2 ml Impfstoff geimpft und 3 Wochen später geboostert. Die Infektion dieser Tiere sowie der fünf Kontrolltiere erfolgte im Alter von 15 Wochen durch *intradermale* Injektion mit einem Stamm des Serotyps 1 und 2 in mehreren Verdünnungsstufen.

Den Tieren wurde vor jeder Impfung jeweils eine Blutprobe entnommen. Die dritte Blutentnahme erfolgte erst 10 Tage nach dem *Challenge*. Leider stand kein Serum zur Verfügung, das unmittelbar vor der Infektion, also 3 Wochen nach der 2. Impfung, gewonnen wurde.

Die Aufbereitung der Seren erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben.

### 2.2.3 Dritter Versuch: Wirksamkeitsnachweis bei zwei inaktivierten Rotlaufimpfstoffen

Von einer zweiten Firma wurden uns ebenfalls Seren aus einem Schweinebelastungsversuch zur Verfügung gestellt. In den Versuch waren 15 Tiere eingebunden, die in Gruppen von je 5 Schweinen aufgeteilt waren; je eine Impfgruppe für beide Vakzinen und eine Kontrollgruppe. Die Blutentnahmen erfolgten direkt vor der Impfung und 3 Wochen später, kurz vor der *intradermalen* Infektion mit verschiedenen Rotlaufstämmen (siehe analog Versuch 1). Die letzten Blutproben wurden 3 Wochen nach der Infektion gewonnen.

Die Aufbereitung der Seren erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben.

### 2.3 Praxisversuch – Titeruntersuchungen nach Einsatz verschiedener Rotlaufimpfstoffe in einem Praxisbetrieb

Die zur Impfung herangezogenen 23 Sauen gehörten zu einem Qualitätsferkel-Erzeugerbetrieb. In die Prüfung wurden ein Rotlaufadsorbattimpfstoff (Impfstoff 1) und drei Rotlauf-Parvo-Kombinationsimpfstoffe (Impfstoff 2–4) einbezogen, die an unterschiedlich große Gruppen von Tieren verimpft wurden.

Nach der Nullblutentnahme erfolgte die erste Impfung. Alle Jungsaunen wurden nach 3 Wochen erneut geblutet und immunisiert. Nach weite-

ren 3 Wochen wurde den Tieren nochmals Blut entnommen.

Die Aufbereitung der Seren erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben.

### 2.4 Mäuseschutztest

Der laut DAB 10 zur Berechnung der Wirksamkeit jeder Rotlaufcharge vorgeschriebene Mäuseschutztest ist detailliert bei Beckmann und Cußler, S. 39, beschrieben. Für eine Chargenfreigabe ist eine Mindestwirksamkeit von 50 Internationalen Einheiten (I.E.) pro Dosis gefordert.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Klinische Bewertung der Wirksamkeit in den Belastungsversuchen

Nach der Infektion zeigten alle Impflinge ein gleichbleibend gutes Allgemeinbefinden ohne Anzeichen einer Rotlaufinfektion.

Alle Kontrolltiere zeigten ein bis vier Tage nach der Infektion einen starken Fieberanstieg sowie Abgeschlagenheit, Freßunlust, Apathie und zum Teil Schüttelfrost. Die meisten Tiere ließen einen ausgeprägten Hautrotlauf erkennen. Aus Gründen des Tierschutzes wurden alle deutlich erkrankten Schweine mit Penicillin bzw. Rotlaufimmunserum behandelt. Die in Versuch drei angewandte Therapie mit homologem Se-

Tabellen 1a und 1b: Titerentwicklung nach Applikation eines Rotlauflebendimpfstoffes mit nachfolgender Belastung bei Impflingen und Kontrolltieren

a					
Zeitpunkt	Tier-Nr. 401	Tier-Nr. 402	Tier-Nr. 403	Tier-Nr. 404	Tier-Nr. 405
0-Blutprobe	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Probe nach 1. Impfung	1:581	1:445	1:153	1:112	1:94
nach 2. Impfung	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
nach Infektion	1:1294	1:2383	1:427	1:357	1:132
b					
Zeitpunkt	Tier-Nr. 2176	Tier-Nr. 2177	Tier-Nr. 2178	Tier-Nr. 2179	Tier-Nr. 2180
0-Blutprobe	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Probe nach 1. Impfung	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
nach 2. Impfung	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
nach Infektion	1:82	1:67	1:283	1:51	1:54

rum führte zu einem sehr hohen Rotlauffiter. Dieser artifizielle Anstieg wurde daher nicht grafisch dargestellt. Die mit einem Sternchen gekennzeichneten Kontrolltiere verstarben vor einer Behandlung an einer akuten Rotlaufferkrankung.

### 3.2 Serologische Bewertung der Versuche

Die über den Zeitraum des Versuchs gewonnenen Serumproben wurden mit dem ELISA auf Rotlauf-Ak überprüft. Bei keinem der Tiere konnte vor Versuchsbeginn Ak gegen den Erreger des Rotlaufs nachgewiesen werden.

#### 3.2.1 Erster Versuch

Die Überprüfung der Einzelseren ergab eine deutliche Differenzierung zwischen den geimpften Tieren und den Tieren, die ohne Impfpfrophylaxe infiziert wurden.

Die Einzeltiter sind der Tabelle 1a/ b zu entnehmen. Um die Titerentwicklung in der Versuchstier- sowie in der Kontrolltiergruppe graphisch darzustellen, wurden die Werte gemittelt. Die Verlaufskurven (siehe Abbildung 1) zeigen einen deutlichen Anstieg des Ak-Titers nach der Immunisierung der Versuchstiere. Dieser Titer wird durch den mit der Infektion verbundenen Booster-Effekt um das Doppelte bis Fünffache erhöht. Alle Kontrolltiere zeigten bis zum Zeitpunkt der Infektion keine

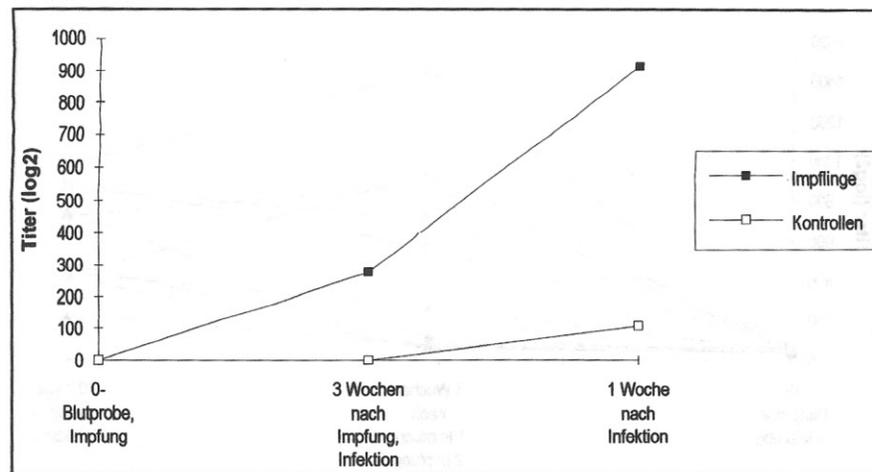


Abbildung 1: Titerverlauf nach Applikation eines Rotlauflebendimpfstoffes mit nachfolgender Belastung bei Impfungen und Kontrolltieren

Ak-Entwicklung. Lediglich nach der Infektion konnte ein geringer Ak-Anstieg nachgewiesen werden.

#### 3.2.2 Zweiter Versuch

In diesem Versuch zeigten die geimpften Tiere nach der Immunisierung einen Titeranstieg von 1:500 bis 1:1400. Die ungeimpften Kontrollen wiesen bis auf eine Ausnahme erst nach der Infektion einen leichten Ak-Anstieg auf. Ein Tier zeigte schon vor dem *Challenge* einen leichten Titer, wofür jedoch keine Erklärung gefunden werden konnte. Die Titer-einzelwerte sind der Tabelle 2a/b zu entnehmen.

Der Titerverlauf aller Einzeltiere ist in Abbildung 2 dargestellt.

Da direkt vor der Infektion keine Blutentnahme mehr erfolgte, kann der Boostereffekt nach Zweitimpfung hier nicht gezeigt werden. So kann auch der leichte Titerabfall bei den meisten Tieren zum Ende des Versuchs nicht zeitlich genau eingeordnet werden.

Der Impfstoff wies im Mäuseschutztest einen Wert von 449,6 I.E./ Dosis auf.

#### 3.2.3 Dritter Versuch

Bei allen im Versuch befindlichen Tieren konnte anhand der ersten Serumprobe kein Rotlauf-Grundtiter nachgewiesen werden. Nach der Immunisierung, entwickelten alle Schweine der Impfgruppen einen

Tabellen 2a und 2b: Titerentwicklung nach Applikation eines Rotlauf-Parvo-Kombinationsimpfstoffes mit nachfolgender Belastung bei Impfungen und Kontrolltieren

a					
Zeitpunkt	Tier-Nr.27	Tier-Nr.28	Tier-Nr.29	Tier-Nr.30	Tier-Nr.31
0-Blutprobe	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Probe nach 1. Impfung	1:880	1:562	1:1441	1:932	1:710
nach 2. Impfung	k. Probe				
nach Infektion	1:717	1:895	1:971	1:420	1:856
b					
Zeitpunkt	Tier-Nr.32	Tier-Nr.33	Tier-Nr.34	Tier-Nr.35	Tier-Nr.36
0-Blutprobe	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Probe nach 1. Impfung	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
nach 2. Impfung	k. Probe				
nach Infektion	1:412	1:486	1:437	1:734	1:224

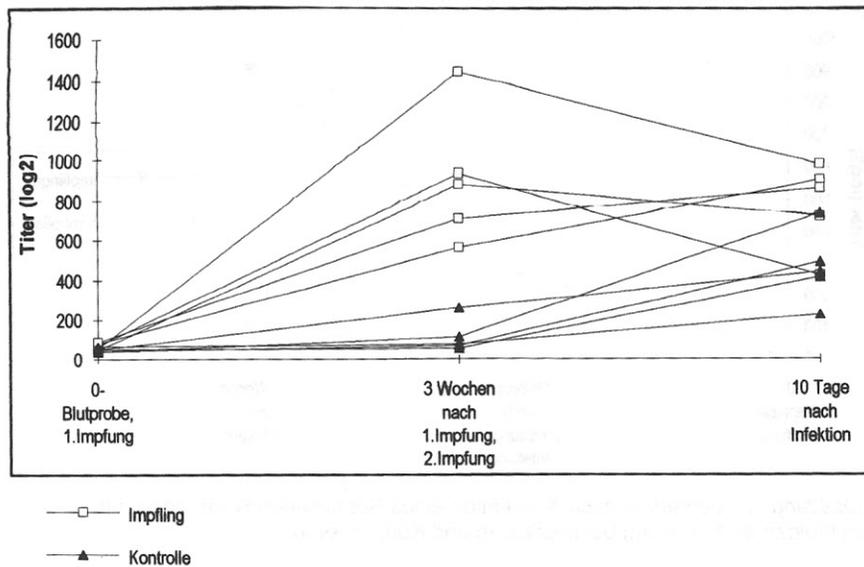


Abbildung 2: Titerverlauf nach Applikation eines Rotlauf-Parvo-Kombinationsimpfstoffes mit nachfolgender Belastung bei Impfungen und Kontrolltieren

meßbaren Titer, der sich allerdings durch die Infektion sehr stark erhöhte. Dieser Effekt ist in der Abbildung 3 dargestellt; die zu den Mittelwerten zusammengefaßten Einzelwerte sind den Tabellen 3a/b/c zu entnehmen.

Diese Impfstoffe wiesen im Mäuseschutztest laut DAB 10 eine Wirksamkeit von 217 bzw 244 I.E./ml auf.

### 3.2.4 Vierter Versuch

In Tabelle 4 sind für jeden geprüften Impfstoff die Mittelwerte aus den

Untersuchungen der jeweils immunisierten Tiere den ermittelten Wirksamkeiten aus dem Mäuseschutztest gegenübergestellt. Die Tabelle enthält weiterhin Angaben über die Höhe der Dosis und die Größe der geimpften Tiergruppen.

Die Ergebnisse machen deutlich, daß bereits nach der ersten Immunisierung im Vergleich zur Nullblutprobe ein geringer Titeranstieg zu erkennen ist, der sich durch den Boostereffekt der Folgeimpfung erhöht. Zugleich ist eine gewisse Differenzierung zwischen den einzelnen

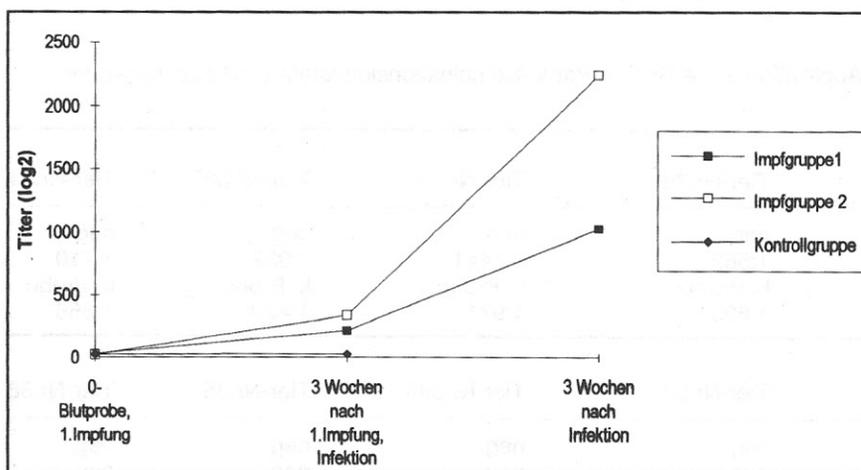


Abbildung 3: Titerverlauf nach Applikation zweier inaktivierter Rotlaufimpfstoffe mit nachfolgender Belastung bei Impfungen und Kontrolltieren

Impfstoffen zu erkennen (siehe Abbildung 4).

Die Mittelwerte (Serumtiter) liegen nach Erstimmunisierung noch dicht beieinander. Nach der Zweitvakzination werden größere Unterschiede zwischen den einzelnen Impfstoffen deutlich.

Vergleicht man die Einzelwerte der Tiere bzw. Impfstoffe, so sind erhebliche Schwankungen hinsichtlich der Reaktionen der einzelnen Tiere auf die Vakzine zu erkennen (siehe Abbildung 5: Impfgruppe 1 – Monovalenter Impfstoff; Impfgruppe 2 – Kombiimpfstoff).

## 5. Diskussion

Um eventuell Parallelen zwischen der Wertigkeit einer Vakzine im Mäuseschutzversuch und der Höhe des induzierten Titers im Schwein aufzuzeigen, erschien der Versuch wichtig, die Entwicklung der Immunantwort nach Impfung anhand gezielter Untersuchungen von Schweineseren zu charakterisieren.

Zur Bestimmung humoraler protektiver Antikörper sowie einer Einschätzung des Immunstatus beim Schwein gelangten verschiedene serologische Methoden zur Anwendung. Die auf Watts (1949) zurückzuführende Wachstumsprobe, verschiedene Agglutinationsverfahren sowie der ELISA wurden zum Nachweis von Ak gegen *E.rh.* herangezogen (Binder und Mathois, 1985; Hubrig, 1961; Kovalenko et al., 1970; Sawada et al., 1979; Sawada et al., 1987; Kirchoff et al., 1985; Dahms et al., 1989; Schilow et al., 1991). Auswertung und Diskussion der Ergebnisse dieser Methoden waren jedoch auf die Anforderungen der klinischen Diagnose gerichtet bzw. wurden zur Untersuchung von hochtitrigen Immunsereen eingesetzt (Dahms et al., 1991).

Die vorliegenden Ergebnisse und die großen methodischen Unterschiede erlauben aber bisher noch keine klare Aussage über die Beziehung von Ak-Titern und der protektiven Wirkung im Zieltier Schwein.

Tabellen 3a, 3b und 3c: Titerentwicklung nach Applikation zweier inaktivierter Rotlaufimpfstoffe mit nachfolgender Belastung bei Impfungen und Kontrolltieren

a (1. Impfgruppe)					
Zeitpunkt	Tier-Nr.22	Tier-Nr.23	Tier-Nr.24	Tier-Nr.25	Tier-Nr.26
0-Blutprobe	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Probe nach 1. Impfung	1:252	1:360	1:195	1:137	1:198
nach 2. Impfung	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
nach Infektion	1:438	1:867	1:451	1:1918	1:1461
b (2. Impfgruppe)					
Zeitpunkt	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.
0-Blutprobe	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Probe nach 1. Impfung	1:217	1:134	1:205	1:703	1:452
nach 2. Impfung	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
nach Infektion	1:8447	1:3274	1:2692	1:505	1:1265
c (Kontrollgruppe)					
Zeitpunkt	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.
0-Blutprobe	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Probe nach 1. Impfung	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
nach 2. Impfung	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
nach Infektion	xxx*	xxx*	1:10126**	1:9332**	xxx*

\* verendete Tiere; \*\* mit homologem Antiserum behandelte Tiere

Tabelle 4: Titerentwicklung (Mittelwerte) nach Applikation von drei Rotlauf-Parvo-Kombinationsimpfstoffen (Impfstoff 2-4) und eines Monoimpfstoffes, Wirksamkeit aus dem Mäuseschutztest, Dosis pro Impfstoff und Größe der geimpften Tiergruppen im Überblick

Impfstoff	Dosis (ml)	Gruppengröße	Ergebnis Mäuseschutztest (I.E./Dosis)	Titer nach 1. Impfung	Titer nach 2. Impfung
1	2	8 Tiere	78,83	1:338	1:941
2	2	7 Tiere	109,91	1:137	1:540
3	2	4 Tiere	95,00	1:176	1:559
4	2	4 Tiere	185,25	1:525	1:3095

\* vor der Impfung war kein Rotlaufvirus nachweisbar

Die Ergebnisse der hier vorgestellten vier Versuche waren vergleichbar, obwohl Versuch eins und drei nur eine einmalige Impfung beinhaltete.

Nach der Immunisierung mit dem Rotlauflebendimpfstoff entwickelten sich nur relativ geringe Titer, obwohl die Tiere ausreichend geschützt waren. Dieses Ergebnis trägt der Tatsache Rechnung, daß bei Lebendvakzinen mit einer zusätzlichen Stimulierung der zellulären Immunabwehr zu rechnen ist. Danach ist nach unserer Auffassung die alleinige serologische Erhebung nicht zur Beurteilung des Impfstoffes geeignet. Als Alternative steht hier die Keimzählung als

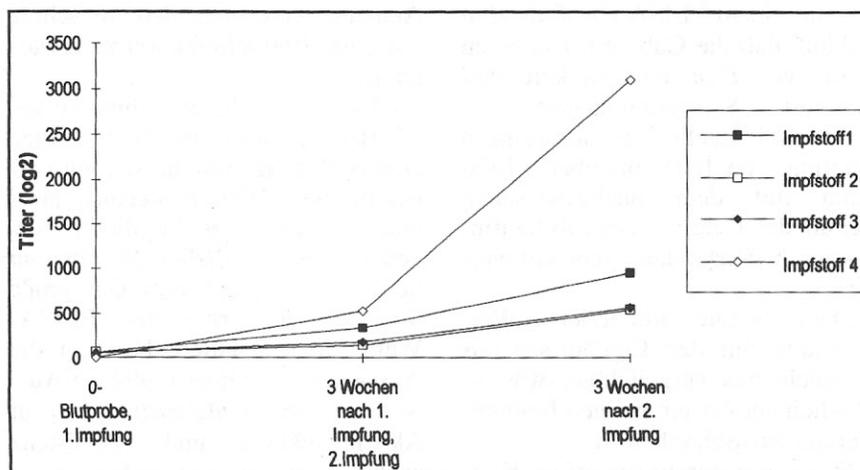


Abbildung 4: Titerverlauf (Mittelwerte) nach Applikation von drei Rotlauf-Parvo-Kombinationsimpfstoffen (Impfstoff 2-4) und eines Monoimpfstoffes an 23 Jungsaunen

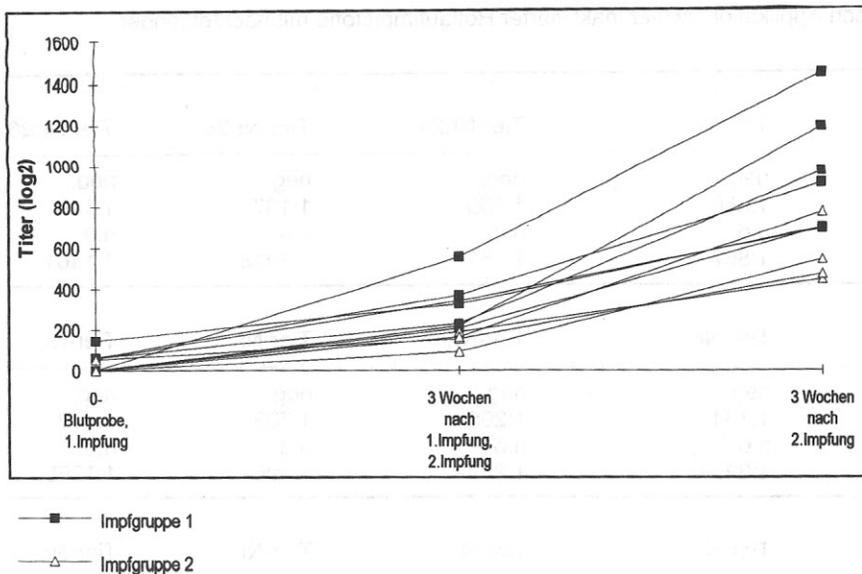


Abbildung 5: Titerverlauf (Einzelwerte) nach Applikation eines Rotlauf-Parvo-Kombinationsimpfstoffes (Impfstoff 3) und eines Monoimpfstoffes (Impfstoff 1) an 12 Jungsauen

Möglichkeit einer Wertbemessung zur Verfügung. Die in Versuch zwei und vier erzielten Titer waren im Gegensatz zu Versuch drei sehr aussagekräftig, da alle Tiere einen Titer über 1:500 entwickelten.

Die sehr gute Reaktion der Tiere nach der Erstimpfung in Versuch zwei ist sicherlich darauf zurückzuführen, daß der Impfstoff einen hohen Gehalt an I.E. aufwies. Im Mäuseschutztest konnte ein Wert von 449,6 I.E./Dosis nachgewiesen werden.

Eamens et al. (1989) kamen nach der Untersuchung von Schweineseren mit einem ELISA ebenfalls zum Schluß, daß die Gabe einer höheren Dosis von *E.rh.* eine stärkere Ak-Antwort im Schwein induziert.

Der individuelle Titeranstieg nach Impfung von 1:500 bis über 1:1400 kann mit dem nachgewiesenen Schutz der Tiere vor einer Rotlaufinfektion in Verbindung gebracht werden.

Die in Versuch drei erzielten Werte waren mit den Ergebnissen aus Versuch eins vergleichbar, was sicherlich der nur einmaligen Immunisierung zuzuschreiben ist.

Die Seren der ungeimpften Kontrollen blieben bis zur Infektion negativ. Alle vakzinierten Tiere aus

Gruppe 1 und 2 wiesen durch die einmalige Vakzinierung einen ausreichenden Schutz gegen eine Rotlaufkrankung auf, obwohl der nachgewiesene Titer gegenüber Versuch zwei vergleichsweise niedrig war.

Im Praxisversuch wurden nach einmaliger Impfung Titer bis zu 1:525, nach Boosterung Titer bis zu 1:3095 erzielt. Obwohl der wirkliche Schutz der Tiere in dieser Studie nicht über einen Belastungsversuch bestätigt wurde, erscheint auf Grund der Ak-Antwort im Vergleich mit den Versuchen eins bis drei ist die Annahme berechtigt, daß ein Schutz vor einer Rotlaufinfektion zu erwarten ist.

Um einen sicheren Schutz zu gewährleisten, ist für fast alle Vakzinen eine zweimalige Immunisierung vorgeschrieben. Wie in Versuch zwei und vier gezeigt, ist bei dieser Vorgehensweise deutlicher Ak-Titer im Schwein zu induzieren. Die große Streuung der ermittelten ELISA-Werte der Einzeltiere bestätigt die Aussage von Blömer (1992) in Auswertung von Untersuchungen zur Ak-Entwicklung und -Persistenz nach Immunisierung von Jungsauen. Die Autorin wies nach, daß die Erstimpfung einen hochsignifikanten

Ak-Anstieg induziert, der aber nach 11 Wochen bereits wieder abfällt. Diese Tatsache spricht ebenfalls für den Vorteil einer Boosterung (Ausnahme: Lebendimpfstoffe). Die Autorin kam jedoch im Gegensatz zu unseren Resultaten zu der Schlußfolgerung, daß die Anwendung der Kombi-Präparate im Vergleich zu den monovalenten Vakzinen zur deutlichen, aber nicht signifikanten Anhebung des Rotlauf-Ak-Spiegel führt.

Die Dauer der Immunität wird nach einmaliger Impfung in der Literatur mit 6–12 Monaten angegeben (Ose, 1972) und ist durch eine Zweitimpfung noch erheblich zu verlängern.

Cußler und Beckmann (1991) kommen zu dem Schluß, daß eine einmalige Injektion von Impfstoffen keinen sicheren Schutz bewirkt und nur bei Mastschweinen in Betrieben mit geringem Infektionsdruck zu vertreten ist.

Die Auswertung der Ergebnisse des Mäuseschutztestes ließ bei wiederholten Ansätzen innerhalb geforderter Haltbarkeitsstudien große Schwankungen erkennen. Diese Tatsache weist auf die Unzulänglichkeit und die geringe Aussagekraft dieses Tierversuchs an der Maus hin.

Schweine reagieren ebenfalls individuell auf eine Impfung. Zieht man jedoch die Mittelwerte der Einzelseren zur Bewertung der Impfstoffe heran, so ist eine klare Unterscheidung zwischen geimpften Tieren und ungeimpften Kontrollen möglich.

Wie die dargestellten Ergebnisse weiterhin verdeutlichen, steht der induzierte Titer in Zusammenhang mit der Wertigkeit eines Impfstoffes. Demnach müßte das erforderliche Mindestmaß an wirksamen Bestandteilen auch eine Mindesttiterentwicklung nach sich ziehen. Darauf bezugnehmend wäre die Festlegung eines Grenzwert-Titers denkbar, der drei Wochen nach Impfung erreicht werden muß. Gezielte Untersuchungen in diese Richtung eröffneten die Möglichkeit, auf der Basis der humoralen Immunantwort eine Wertbe-

messung von Rotlaufimpfstoffen zu etablieren.

Von den in der Einleitung bereits erwähnten etablierten Testmethoden wurde der ELISA ausgewählt. Er zeichnet sich gegenüber der Agglutination durch eine höhere Sensitivität und Spezifität aus, da mit dem ELISA durch den entsprechenden Einsatz spezifischer Konjugate im Gegensatz zur Agglutination nur die IgG erfaßt werden. Das trägt letztlich zur besseren Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse bei. Außerdem ist aus Untersuchungen an Labortieren bekannt, daß lediglich IgG-Antikörper in der Lage sind, eine Schutzwirkung im Versuchstier hervorzurufen, während IgM-Antikörper eine Infektion nicht verhindern können (Yokomiso und Isayama, 1972; Sawada et al., 1987).

Es bleibt demnach abzuklären, welcher protektive Wert einer Vakzine ausreicht, ein Schwein zu schützen und wie sich diese Bemessung in einem Mindesttiter im ELISA widerspiegelt.

### Schlußfolgerung

Grundsätzlich ist der Nachweis eines Ak-Titers beim Schwein nach einer Impfung gegen Rotlauf mit ELISA möglich. Eine zweimalige Immunisierung ist gegenüber einer Einzelimmunisierung wesentlich günstiger hinsichtlich Ak-Entwicklung und -Titerpersistenz.

Der ELISA hat sich als serologisches Werkzeug bewährt; er erfaßt im Gegensatz zu Techniken, die auf einer Agglutinationsreaktion basieren, nur IgG und läßt eine gute Reproduzierbarkeit zu. Er zeichnet sich außerdem durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus.

Der induzierte Titer steht offenbar in Zusammenhang mit der Wertigkeit des Impfstoffes; demnach müßte ein Mindestmaß an wirksamen Bestandteilen auch eine Mindesttiterentwicklung nach sich ziehen. Auf dieser Basis wäre die Festlegung eines Grenzwert-Titers denkbar.

Die Titerentwicklung im Schwein könnte auf dieser Grundlage als Maßstab für die Wirksamkeit von Rotlaufimpfstoffen herangezogen werden. Durch eine Kombination der vorgeschriebenen Unschädlichkeitsprüfung an jeweils 2 Schweinen pro Charge und der serologischen Wirksamkeitsbestimmung kann der Bedarf an Versuchstieren (Maus, Schwein) stark reduziert werden. Darüberhinaus könnte der ELISA eine breite Anwendung in der serologischen Begleituntersuchung von Infektionsversuchen sowie klinischer Erhebungen und Feldstudien (Immunitätsdauer) finden.

### Literatur

- Bakos, K. (1951). Über die Herstellung und Prüfung eines konzentrierten Adsorbatimpfstoffes gegen den Schweinerotlauf. *Nord. Vet. Med.* 3, 109–127.
- Binder, W. P. und Mathois, H. (1985). Zur Bestimmung der Wertigkeit von Rotlaufhyperimmunseren von Pferden und Rindern. *Wien. tierärztl. Mschr.* 1, 1–7.
- Blömer, A. (1992). Impfversuche bei Jungsauern zur Rotlauf- und Parvoviroseprophylaxe mit Mehrfach- und Einfachvakzine. *Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Code of Federal Regulations (CFR) 9 (1991). §113.119 *Erysipelothrix rhusiopathiae* Bacterin. *Animal and Animal Products, Parts 1 to 199*. Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration. Washington: U.S. Government Printing Office.
- Cußler, K. und Beckmann, R. (1991). Impfungen gegen bakterielle Erkrankungen. 3. Schweinerotlauf. *Vet.* 6 (10), 15–19.
- Dahms, H., Hagemann, G. und Hlinak, A. (1991). Vergleichende Untersuchungen zur Wertbemessung von Rotlauf-Immunseren „Dessau“ vom Schwein mittels Mäuseschutz-Test und ELISA. *J. Vet. Med.* 38, 581–588.
- Dahms, H., Schilow, W. F. und Hagemann, G. (1989). Nachweis von *Erysipelothrix rhusiopathiae*-spezifische Antikörpern in Seren experi-

mentell infizierter Schweine mit ELISA und Immunoblotting. *Arch. exper. Vet. med.* 43, 907–916.

- Delpy, P. und Hars, L. E. (1953). Observations sur le mode d'action des vaccins tues. Vaccin soluble immunogene contre le rouget du porc. *Bul. Acad. Vet. France* 26, 539–546.
- Deutsches Arzneibuch (DAB), 10. Ausgabe (1991). *Schweinerotlauf-Impfstoff*. Deutscher Apothekerverlag Stuttgart, 1285–1288.
- Eamens, G. J., Chin, J. C. und Nicholls, P. J. (1989). Comparison of inoculation regimes for the experimental production of swine erysipelas arthritis, II. Serological findings in a gel diffusion precipitin test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Austral. Vet. J.* 66, 216–220.
- Eissner, G. und Ewald, F.W. (1973). *Rotlauf. Infektionskrankheiten und ihre Erreger, Band 13*. Jena: Gustav Fischer Verlag.
- European Pharmacopoeia (EAB), Second Edition, Fourteenth Fascicule (1990). *Monograph 64: Vaccinum erysipielatis suillae inactivatum* (1980). Maisonneuve S.A. Sainte-Ruffine France.
- Hubrig, T. (1961). Infektion, Immunität, Allergie am Beispiel des Schweinerotlaufs. *Sitzungsberichte der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften* 10, Heft 9, Berlin.
- Hubrig, Th., Kielstein, P., Maas, A. und Meese, M. (1964). Rotlaufschutzimpfung und Antikörpernachweis. *Arch. exper. Vet. med.* 16, 929–944.
- Kirchhoff, H., Dubenkopp, H., Kerlen, G., Steffens, H.-W., Trautwein, G., Hermanns, W. und Böhm, K. W. (1985). Application of the indirect enzyme immunoassay for the detection against *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet. Microbiol.* 10, 549–559.
- Kovalenko, J. R., Siderow, M. A. und Tatarinuw, N. T. (1970). Antikörper im Blutserum und die Steigerung der Immunität bei Schweinerotlauf (russ.). In: *Akademie der Landwirtschaftswissenschaften Vortrag* 8, 25–27.
- Möhlmann, H., Maas, A., Boden, W. und Meese, M. (1963). Erfahrungen bei der Anwendung von Rotlauf-Lebendimpfstoff „Dessau“ – lyophil getrocknet – zur aktiven Schutz-



- impfung gegen Rotlauf der Schweine. *Mh. Vet.-Med.* 18, 829–832.
- Ose, E. E. (1972). Evaluation of erysipelas vaccines. *J. A. V. M. A.* 160, 9–14.
- Sawada, T., Muramatsu, M. und Seta, K. (1979). Responses of growth agglutinating antibody and protection of pigs inoculated with swine erysipelas live vaccine. *Jpn. J. Vet. Sci.* 41, 593–600.
- Sawada, T., Tekahashi, T. und Tamura, Y. (1987). Antiserum against culture filtrate is cross protective for various serovars of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet. Microbiol.* 14, 87–93.
- Schilow, W. F., Hagemann, G. und Dahms, H. (1991). Praktische Bedeutung des ELISA bei der Wertmessung der Rotlaufimmunsere (Kurzmitteilung). *Mh. Vet. Med.* 46, 262.
- Tasker, J. (1981). Problems associated with the use of swine erysipelas vaccine. *Pig Vet. Soc. Proceed.* 7, 82–86.
- Traub, E. (1947). Immunisierung gegen Schweinerotlauf mit konzentrierten Adsorbatimpfstoffen. *Mh. Vet.-Med.* 2, 165.
- Watts, P. S. (1949). Studies on *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J. Bacter. Path.* 50, 355–369.
- Yokomizo, Y. and Isayama, Y. (1972). Antibody activities of IgM and IgG fractions from rabbit anti-Erysipelothrix rhusiopathiae sera. *Res. vet. Sci.* 13, 294–296.

### Korrespondenzadresse

Heike Gyra  
Paul-Ehrlich-Institut  
Bundesamt für Sera und Impfstoffe  
Paul-Ehrlich-Str. 51–59  
53225 Langen

## Buchbesprechung

### Ways of replacing, reducing or refining the use of animals in the quality control of veterinary vaccines

Margot D. O. van der Kamp,  
107 Seiten, Institute for Animal  
Science and Health (ID-DLO),  
Lelystad, 1994  
ISBN 90-75124-01-5

Das soeben erschienene Buch über Alternativmethoden bei der Qualitätsprüfung von Veterinärimpfstoffen ist in vielfacher Hinsicht äußerst lesenswert und zwar nicht nur für den mit der Impfstoffprüfung unmittelbar betroffenen Personenkreis. Die gut und klar gegliederte Literaturstudie ist sehr flüssig und anschaulich geschrieben, eignet sich durchaus auch als Nachschlagewerk und bringt sehr viel Detailwissen in die Diskussion ein.

Das Buch ist in sieben Kapitel gegliedert: Veterinär-Vakzinen, Qualitätskontrolle, das „regulatorische Klima“ um die Vakzinen, Tierexperimente und Alternativen, Mög-

lichkeiten für Alternativmethoden – allgemeine Diskussion, Möglichkeiten für Alternativmethoden – nach Tierarten gegliedert, Empfehlungen und Perspektiven.

Eine ansehnliche Liste mit Namen von „those who cooperated“ aus Wissenschaft, Zulassungsbehörden, Industrie und Tierschutz aus den Niederlanden, England, Deutschland, Belgien und der Schweiz ist bezeichnend für die Gründlichkeit und Aktualität, mit der das Werk recherchiert wurde. Besonders wohl-tuend wird vom Leser empfunden, daß die dem Außenstehenden nicht immer ganz klaren Zulassungsrichtlinien in Westeuropa eingehend erklärt werden. Das „regulatorische Klima“ um die Vakzinen (Kapitel 3) ist ja auch letztlich für die Akzeptanz oder Nicht-Akzeptanz von 3R Methoden ausschlaggebend. Knappe historische Einblendungen führen zu den einzelnen Themen hin. Sowohl die traditionellen Tierversuche zur Batch-Kontrolle als auch die Vor- und Nachteile der Alternativen werden nüchtern und illusionslos geschildert. Die besondere Verantwortung von Industrie und Behörden bei der Entwicklung von Alternativen

wird ausdrücklich betont. Diese seien nicht nur aus Tierschutzgründen, sondern auch weil sie effektiver und kostengünstiger sein können, gefordert. Die Entwicklung von Alternativmethoden dürfe aber nicht mehr Tierleben fordern als bei der Beibehaltung der alten Methoden eingesetzt würden. Vor allem dürfe eines nicht vorkommen, daß nämlich die Alternativmethoden von Zulassungsbehörden zusätzlich zu den Tierversuchen verlangt würden. Frau van der Kamp geht auch auf die Probleme ein, die sich durch behördliche Impfverbote (MKS, Schweinepest) ergeben. Auch der Trend zu inaktivierten Vakzinen und die Verwendung gentechnologisch hergestellter Impfstoffe als Verfahren, die zu größerer Impfsicherheit beitragen, werden in die Diskussion eingebracht.

Kurzum, nach der Lektüre dieses Buches hat man wirklich das Gefühl, endlich einmal umfassend und kompetent zu einem wichtigen Thema informiert worden zu sein. Sollte eine Tierschutzorganisation noch einen Preis zu vergeben haben: Frau van der Kamp sei wärmstens empfohlen.

fpg