

stische Gewichtsabnahme. In Übereinstimmung mit Cußler (1997) konnten Symptome einer Bewertung  $\geq 2$  gemeinsam mit einer Gewichtsabnahme  $\geq 15\%$  des Ausgangsgewichtes als klinische Endpunkte der Krankheit definiert werden. Diese klinischen Endpunkte könnten beispielsweise bei der Wirksamkeitsprüfung von Tollwut-Impfstoffen Anwendung finden. Diese Prüfung beruht derzeit noch auf dem Vergleich der Überlebensraten geimpfter und ungeimpfter Tiere. Aufgrund der Eindeutigkeit der hier beschriebenen Symptome der Tollwut-Erkrankung sollte erwogen werden, diese Bestimmung der Letalitätsrate dort zukünftig durch die Festlegung klinischer Endpunkte zu ersetzen. So würden, bei verkürzter Versuchsdauer, den Tieren die Krankheitsstadien mit der größten Belastung erspart bleiben.

Der Nachweis vermehrungsfähiger Tollwut-Viren erfolgte im IFT und Maustest mit gleicher Sensitivität. Die Nachweisgrenze war im Maustest unabhängig vom geprüften Produkt, im IFT lag die Nachweisgrenze in Anwesenheit von Aluminiumhydro-

xid und Thiomersal um den Faktor  $10^2$  höher, als in Abwesenheit dieser Substanzen. Die in der Europäischen Pharmakopöe (1998) am Endprodukt vorgeschriebene Prüfung der Virusinaktivierung bietet gegenüber einer Prüfung direkt im Anschluß an die Virusinaktivierung also keinerlei Vorteile. Im Gegenteil, als Nachteil der Endproduktprüfung ist anzusehen, daß das Viruskonzentrat durch den Zusatz von Puffer, Konservierungsmittel und Adjuvans verdünnt wird ( $\text{idR} \geq 10$ fach). Die Prüfung auf vollständige Virusinaktivierung ist dementsprechend mindestens 10fach sensitiver, wenn sie nicht erst nach Zusatz von Adjuvans und Konservierungsmittel, sondern direkt am inaktivierten Präparat erfolgt.

Im Hinblick auf größtmögliche Produktsicherheit ist daher die Prüfung am inaktivierten Präparat der Endprodukt-Prüfung unbedingt vorzuziehen. Bei Prüfung des inaktivierten Produktes ist der IFT bereits jetzt ebenso sensitiv, wie der bislang durchgeführte Maustest. In weiteren Versuchen soll die Nachweisgrenze des IFT unter die des Maustests gesenkt und auf

Grundlage dieser Ergebnisse schließlich der belastende Maustest durch die *in vitro* Methode IFT ersetzt werden.

#### Literatur

- Cußler, K. (1997). Impfstoffprüfung: Kann die Bestimmung der Letalitätsrate bei Belastungsversuchen durch eine Ermittlung klinischer Endpunkte ersetzt werden? In Zentrale Tierlaboratorien und Institut für Tierschutz, Verhaltenslehre und Versuchstierkunde der FU Berlin und BgVV (Hrsg.), *Tierlaboratorium 20* (30-39). Berlin: Eigenverlag.
- Kacber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* 162, 480.
- Rabies Vaccine (inactivated) for veterinary use. Monographie 0451. *European Pharmacopoeia - Supplement 1998*, 445-447.
- Spearman, C. (1908). *Brit. J. Psychol.* 2, 207. Zitiert nach Kaerber aaO.

#### Korrespondenzadresse

Dr. Stephanie Blum  
Paul-Ehrlich-Institut, Veterinärmedizin  
Paul-Ehrlich-Str. 51-59  
D - 63225 Langen



## Die Aviäre Enzephalomyelitis des Huhnes: Beitrag zur Reduktion der Tierzahlen bei der Impfstoffprüfung

Anja Langhardt, Laura Frank, Brigitte Küchler und Carmen Jungbäck  
Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen

#### Zusammenfassung

Die dargestellten Versuche befassen sich mit der Reduzierung der Tierzahlen bei der Prüfung der Geflügel-Lebendimpfstoffe gegen die Aviäre Enzephalomyelitis (AE). Nach dem Europäischen Arzneibuch (*European Pharmacopoeia*, EP) ist die Titration der AE-Impfstoffe in embryonierten Hühnereiern oder auf Zellkulturen durchzuführen. Ziel dieser Arbeiten ist es, die Virustitration in einem nicht kompetitiven ELISA durchzuführen, um die Eititration, bei der die Küken schlüpfen und auf Krankheitssymptome beobachtet werden müssen, zu ersetzen. Zu diesem Zweck wurde ein ELISA entwickelt, der die quantitative Bestimmung von AE-Virus suspensionen ermöglicht.

Als ein weiterer Punkt ist nach EP die Prüfung auf Wirksamkeit über einen Belastungsversuch durchzuführen. Um diesen Challenge in Zukunft zu vermeiden, soll versucht werden, ein serologisches Verfahren zu etablieren und einen Mindestantikörpertiter festzulegen, bei dem die geimpften Hühner als

gegen die Erkrankung der Aviären Enzephalomyelitis geschützt angesehen werden können. Dazu wurde zunächst die Wirksamkeit zweier Challengeviren von unterschiedlicher Herkunft getestet. Anschließend wurde in einem weiteren Versuch bei Küken unterschiedlichen Alters mit maternalen Antikörpern gegen AE deren Schutzdauer überprüft.

*Summary: Avian Encephalomyelitis of poultry: Contribution on the reduction of animals during vaccine testing. The testing of live avian encephalomyelitis (AE) virus vaccines according to the prescriptions of the European Pharmacopoeia (EP) requires a number of animal trials. The purpose of these trials presented is the replacement respectively of two of the animal trials. The first test to be replaced is the virus titration in eggs which includes the observation of the hatching and survival capacity of infected embryos. Therefore a non-competitive ELISA was developed which allows the quantitative determination of AE-virus preparations.*

*The second test to be refined is the efficacy testing of AE-vaccines. The challenge described in the European Pharmacopœia shall be replaced by the quantification of the serological response of the chickens and their progeny after vaccinati-*

*on. Therefore the minimum amount of protecting humoral antibodies has to be defined. First trials compared the pathogenicity of two challenge strains and evaluated the kinetic of maternal antibodies in chickens derived from vaccinated hens.*

*Keywords: avian encephalomyelitis, vaccine testing, animal reduction and replacement*

## 1 Einleitung

### 1.1 Die Aviäre Enzephalomyelitis des Geflügels

Die Aviäre Enzephalomyelitis (ansteckende Gehirn-Rückenmarks-Entzündung des Geflügels, AE) ist eine infektiöse Virus-erkrankung, die hauptsächlich Hühner betrifft, jedoch nur bei jungen Küken klinische Symptome hervorruft. Auftreten kann die Infektion auch bei Putenküken, Japanischen Wachteln, Fasanen, Birk- und Auerwildküken. Enten, Perlhühner und Jungtauben wurden schon experimentell infiziert. Der Erreger der AE ist ein nur 20-30 nm kleines Virus mit einer linearen einsträngigen RNA. Bis 1995 wurde es der Familie *Picornaviridae* als Enterovirus zugeordnet (Eisengarten, 1992), neuerdings gilt es zusammen mit den Viren der Entenhepatitis I+II und der Aviären Nephritis als unklassifiziertes Virus (Murphy et al., 1995). Das AE-Virus (AEV) wird horizontal und vertikal übertragen (Calnek, 1993). Die Inkubationszeit beträgt 1-7 Tage nach vertikaler und ca. 5-60 Tage nach horizontaler Infektion. Klinisch sind zu Beginn der Erkrankung Mattigkeit und Schläfrigkeit zu beobachten, später kommen Ataxien, Paresen, Paralysen und feiner Tremor hinzu. Überlebende Tiere zeigen teilweise schlaffe Lähmungen und Linsentrübungen, die bis zur Blindheit führen. Aufgrund der starken motorischen Störungen sind die Küken nicht mehr in der Lage, Futter oder Wasser aufzunehmen, und sterben durch Verhungern oder Verdursten (van Roekel et al., 1938). Die Mortalität liegt bei 70%, die Morbidität bei 70-90%. Ältere Tiere durchseuchen stumm. Die Infektion von Legetieren ist meist nur an einem Rückgang der Legerate um 15-30% und schlechten Brut- und Schlupfergebnissen zu erkennen.

Nach überstandener Infektion bilden die Tiere eine langanhaltende humorale Immunität aus. Die Antikörper werden auch als maternale Antikörper (mAK) an die Küken weitergegeben.

Bei dem Virus der AE kann man unterschiedliche Stämme unterscheiden, die zwar

in ihrer Pathogenität, nicht jedoch in ihrer Antigenität verschieden sind. Der nicht ei-adaptierte enterotrope Calnek Stamm 1143 wird als Impfvirus verwendet, als solches von den Hühnern oral aufgenommen und mit dem Kot ausgeschieden. Der Ei-adaptierte neurotrope van-Roekel Stamm wird als Challengevirus parenteral (intracerebral) auf Küken übertragen.

### 1.2. Impfung und Impfstoffe gegen die AE

Zum Schutz gegen die AE genügt eine einmalige Impfung der Hühner ab der 10. Lebenswoche, spätestens 4 Wochen vor Legebeginn. Ziel der Impfung ist es, sowohl die Legetiere aktiv zu immunisieren als auch die Küken über die maternalen Antikörper zu schützen. Es stehen zwei Lebendimpfstoffe zur Verfügung, die beide über das Trinkwasser verabreicht werden und beide den Stamm Calnek 1143 enthalten.

Im Europäischen Arzneibuch sind in der Monographie „Infektiöse Aviäre Enzephalomyelitis Lebend-Impfstoff für Geflügel“ die Versuche genannt und beschrieben, die im Rahmen von Zulassung und Chargenprüfung mit den Impfstoffen durchzuführen sind:

Für die Erteilung der Zulassung sind vorzulegen: Immunogenität, intrazerebrale Virulenz, Identität, Steigerung der Virulenz, Fremdvirusausschlüsse in Küken, Unbedenklichkeit, Wirksamkeit durch Belastungsversuch.

Bei der Chargenprüfung werden folgende Prüfungen vorgelegt: Unbedenklichkeit mit Fremdvirus-Ausschluß, Titration im embryonierten Ei mit Schlupftest.

### 1.3 Versuche zur Minimierung der Tierzahlen

Im Rahmen unserer Untersuchungen soll einerseits die Titration im Ei mit Schlupftest durch eine andere Virusquantifizierung, andererseits der Wirksamkeits-Belastungsversuch durch serologische Untersuchungen ersetzt werden.

#### 1.3.1 Ersatz der Titration im Ei

Der Virustiter von AE-Lebendimpfstoffen wird laut EP „auf Zellkulturen oder durch

Beimpfen des Dottersackes von Bruteiern im Alter von 5-6 Tagen“ bestimmt. Praktische Anwendung findet z.Zt. allein die Titration in Bruteiern, die als Tierversuch anzusehen ist, da die beimpften Eier zum Schlupf gebracht und die geschlüpften Küken 14 Tage lang auf die typischen nervösen Störungen der AE hin beobachtet werden. Dies ist nötig, da der Impfstamm Calnek 1143, wie bereits erwähnt, nicht ei-adaptiert ist und daher keine sichtbaren Läsionen an den Embryonen verursacht. Im Gegensatz dazu kann der ei-adaptierte van-Roekel Stamm in Eiern ohne Schlupftest titriert werden, die Embryonen weisen hier typische Läsionen auf.

Bei diesem Titrationsverfahren benötigt man ca. 70-80 Bruteier pro Charge bei 5-6 Chargen pro Jahr.

Die Titration auf Zellkulturen ist zwar als Alternative im EP genannt, ist aber in keiner Weise methodisch definiert oder gar standardisiert. Versuche, eine Methode zur Titration von AE-Lebendimpfstoffen auf Primärzellen (*Chicken-Embryo-Brain-Cells*, CEB) zu entwickeln, sind bisher gescheitert. In der Literatur finden sich darüber hinaus Hinweise, daß eine Titration von AEV auf Zellen erst nach mehrmaliger Passage des Virus gelingt (Nicholas et al., 1987). Damit erübrigt sich jedoch der Einsatz der Zelltitration zur direkten Bestimmung des Virusgehaltes aus einer Impfstoffcharge.

Aus diesem Grunde wurde ein ELISA zum quantitativen AE-Antigennachweis entwickelt. Gute Ergebnisse zeichnen sich mit einem nicht-kompetitiven ELISA ab.

#### 1.3.2 Ersatz des Belastungsversuches

Im Rahmen der Zulassung von Lebendimpfstoffen gegen die AE sowie für die Saatmaterialprüfung, Nachprüfungen aufgrund von Meldungen über unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) und Prüfungen gemäß § 25 (2) Tierimpfstoffverordnung wird die Prüfung auf Wirksamkeit über einen Belastungsversuch durchgeführt.

Dabei werden 3 Wochen alte Küken geimpft und vier Wochen später zusam-

men mit einer Kontrollgruppe einer Infektion unterzogen, welche durch intrazerebrale Injektion von virulentem AEV durchgeführt wird. Die Tiere werden 21 Tage lang *post infectionem* beobachtet, wobei mindestens 80% der geimpften Tiere ohne Krankheitszeichen überleben und mindestens 70% der ungeimpften Kontrolltiere eingehen oder Krankheitszeichen aufweisen müssen.

Für diesen Belastungstest werden 20 geimpfte Tiere und 20 ungeimpfte Kontrolltiere pro Impfstoff und Applikationsart verwendet. Bei einer Saatmaterialprüfung alle 5 Jahre, einer Prüfung aufgrund von unerwünschten Arzneimittelwirkungen pro Jahr, sowie einer Prüfung aufgrund von § 25 (2) Tierimpfstoff-Verordnung pro Jahr ergibt sich so für zwei Impfstoffe mit je zwei Applikationsarten ein Tierversuch von ca. 360 Küken pro Jahr.

Ziel ist daher die Abschaffung des Belastungsversuches zugunsten serologischer Untersuchungen, d.h. es sollen mit Hilfe eines kommerziellen AE-Antikörper-ELISAs Antikörpertiter geimpfter Tiere ermittelt und eine Korrelation zwischen Antikörpertiter und Schutz der Tiere im Challenge hergestellt werden. Für diese serologische Prüfung soll dann auch die vorgeschriebene Tierzahl von 20 Impflingen pro Versuch jeweils auf mindestens die Hälfte reduziert werden, und die ungeimpften Kontrolltiere sollen durch ein Standard-Negativserum ersetzt werden. Ist der schützende Mindestantikörpertiter ermittelt, soll ein Referenzserum hergestellt werden, um diese abgewandelte Wirksamkeitsprüfung zu standardisieren.

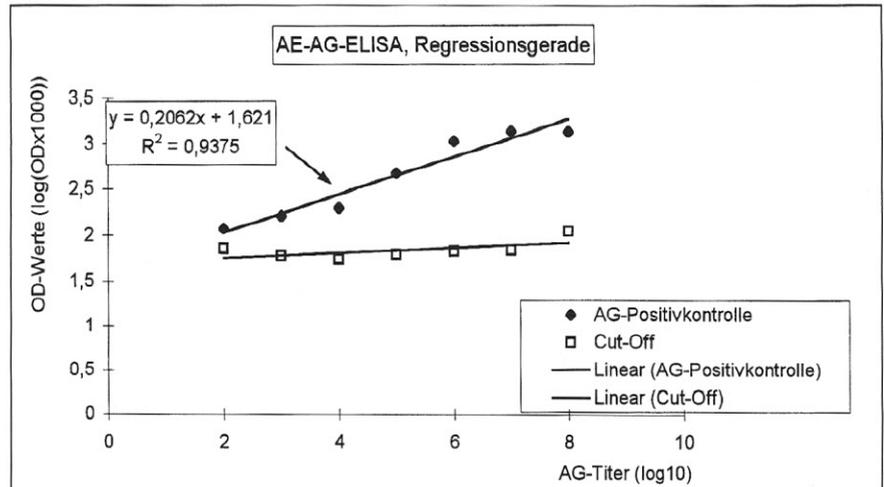
## 2. Tiere, Material und Methoden

### 2.1 ELISA-Titration

Bei dem nicht-kompetitiven ELISA wird zuerst das AE-Antigen an eine Polystyrolplatte gebunden. Anschließend wird die Platte mit einem Serum, das Antikörper gegen AEV enthält, beschichtet. Diese werden schließlich mit einem enzymmarkierten Antikörper einer anderen Tierart quantitativ nachgewiesen.

### 2.2 Wirksamkeit der zwei Challengeviren

Zuerst wurde in einem Versuch die Virulenz zweier AE-Challengeviren getestet. Gemäß EP werden die Tiere im Alter von 7 Wochen mit dem virulenten van Roekel



**Abbildung 1: Vergleich zwischen dem titrierten AE-Antigen und dem errechneten Cut-Off (Cut-Off = Mittelwert + 3x Standardabweichung des titrierten Negativantigens).**

Stamm infiziert. In diesem Alter sind die Küken jedoch unter Feldbedingungen nur noch geringgradig für die Erkrankung empfänglich. Um daher ein geeignetes Challengevirus zu finden, das auch Tiere in diesem Alter erkranken lässt, wurde dieser Versuch mit zwei van Roekel-Stämmen unterschiedlicher Herkunft an unterschiedlich alten Hühnern durchgeführt.

### 2.3 Untersuchung der maternalen Immunität

Hierbei wurden Tiere mit maternalen Antikörpern eingesetzt und in verschiedenen Altersgruppen infiziert: Zwei Elterntierherden wurden getrennt gehalten und mit je einem AE Lebendimpfstoff einmalig, wie von den Herstellern beschrieben, geimpft. Die Eier dieser zwei Elterntierherden wurden getrennt gesammelt und mit

SPF-Kontrolliern zu unterschiedlichen Zeitpunkten zum Schlupf gebracht.

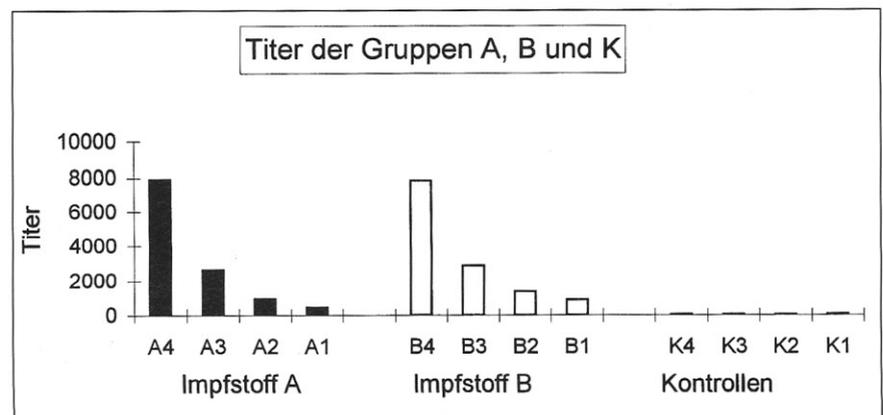
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Titration

Für den beschriebenen ELISA wurde eine Regressionsgerade ermittelt und der Cut-Off festgelegt (Abb. 1). Der Regressionskoeffizient  $R^2$  beträgt 0,9375.

### 3.2 Wirksamkeit

Der van Roekel Stamm 1 weist gegenüber dem van Roekel Stamm 2 eine deutlich pathogenere Wirkung auf: Es erkranken 100% der Eintagsküken, im Vergleich zu nur 50% Erkrankungsrate bei dem Virusstamm 2. Ähnlich sieht die Erkrankung bei 7 Wochen alten Hühnern aus: 100% erkranken durch Virusstamm 1 und nur 60%



**Abbildung 2: Titerhöhe bei den Nachkommen der mit Impfstoff A geimpften Elterntieren, den Nachkommen der mit Impfstoff B geimpften Elterntieren und den Kontrollen. Die Gruppen A4, B4, K4 sind Eintagsküken, die Gruppen A3, B3, K3 sind 2 Wochen alt, die Gruppen A2, B2, K2 sind 3 Wochen alt und die Gruppen A1, B1, K1 sind 4 Wochen alt zu Challengebeginn.**

durch Virusstamm 2. Für beide AE-Viren gilt, daß infizierte Eintagsküken früher nach Infektion erkranken als im Alter von 7 Wochen infizierte Hühner. Als Challengestamm für die weiteren Versuche wurde daher der van Roekel Stamm 1 gewählt.

### 3.3 Maternale Immunität

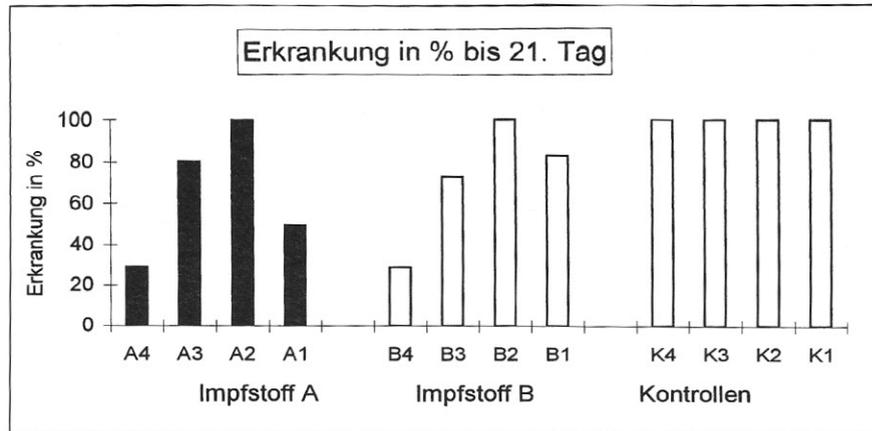
In diesem Versuch zeichnet sich ein deutlicher Hinweis auf die Ak-Titer-Abhängigkeit der Schutzrate gegenüber einer AE-Erkrankung ab: Je höher die Ak-Titer bei den Küken, desto höher ist die Schutzrate vor Erkrankung. Bei der Infektion von 4 Wochen alten Tieren ist ein Rückgang der Erkrankungsrate zu beobachten (Abb. 2 und 3).

## 4 Diskussion

Es wird versucht, zwei der Tierversuche, die das Europäische Arzneibuch in der Monographie 588 (Infektiöse-Aviäre-Enzephalomyelitis-Lebend-Impfstoff für Geflügel) vorschreibt, zu ersetzen. Der ELISA zum Ersatz der Eititration weist eine zufriedenstellende Regression im linearen Bereich auf und kann daher als Basis für die Quantifizierung von Viruspräparationen eingesetzt werden.

Als Ersatz für den Belastungsversuch soll der Antikörpertiter geimpfter Hühner ermittelt und mit einem Mindesttiter, bei dem die Hühner noch vor der Erkrankung geschützt sind, verglichen werden.

Anhand der ermittelten Ergebnisse sieht man eine eindeutige Korrelation zwischen maternalem Antikörper-Titer und Schutz im Challenge. Als problematisch erwies sich bisher, durch Impfung von Tieren mit unterschiedlichen Antigenmengen kontinuierliche Titerabstufungen zu erreichen. Vermutlich aufgrund von Impfvirusausscheidung und Reinfektion entwickelten alle geimpften Hühner annähernd gleich hohe Antikörpertiter. Deshalb wurden bisher Küken mit maternalen Antikörpern gegen AE verwendet, weil bei diesen Tieren mit zunehmendem Alter die Antikör-



**Abbildung 3:** Erkrankungsrate in % bei den Nachkommen der mit Impfstoff A geimpften Elterntieren, den Nachkommen der mit Impfstoff B geimpften Elterntieren und den Kontrollen.

Die Gruppen A4, B4, K4 sind Eintagsküken, die Gruppen A3, B3, K3 sind 2 Wochen alt, die Gruppen A2, B2, K2 sind 3 Wochen alt und die Gruppen A1, B1, K1 sind 4 Wochen alt zu Challengebeginn.

pertiter abfallen und so ein direkter Vergleich zwischen Titerhöhe und Schutz vor Erkrankung möglich ist.

Nachfolgend ist nun geplant, Hühner zu impfen, die Titer zu bestimmen und dann im Challenge einen schützenden Mindesttiter festzulegen.

Bei erfolgreichem Verlauf des Projektes sollen die Ergebnisse als *Request for Revision* zur Überarbeitung der EP-Monographie dienen.

Finanziert wird dieses Projekt vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF).

### Literatur

- Calnek, B. W. (1993). Avian Enzephalomyelitis. In J. B. McFerran and M. S. McNulty (eds), *Virus Infections of Birds* (469-478). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Eisengarten, H. J. (1992). Aviäre Enzephalomyelitis. In G. Heider und J. Monreal (Hrsg.), unter Mitwirkung von J. Mészáros *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels* (25, 504-510). Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. and Summers, M. D. (1995). Picornaviridae. In F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo and M. D. Summers, *Virus Taxonomy Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses* (329-336). Wien New York: Springer-Verlag.

- Nicolas, R. A., Ream, A. J. and Thornton, D. H. (1987). Replication of Avian Enzephalomyelitis Virus in chick embryo neuroglial cell cultures. *Archives of Virology* 96, 283-287.

- Roekel, van H., Bullis, K. L. and Clarke, M. K. (1938). Preliminary report of infectious avian enzephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 93, 372-375.

### Korrespondenzadresse

Anja Langhardt, Tierärztin  
Paul-Ehrlich-Institut  
Abteilung Veterinärmedizin  
Paul-Ehrlich-Str. 51-59  
D-63225 Langen

