

für den Zytotoxinhemmungstest. Ebenso wird ein Abgleich der ermittelten Werte, angegeben in SNE/ml, mit dem internationalen Standardserum durchgeführt. Um die Gleichwertigkeit der *in vitro* Methode zu demonstrieren, ist des weiteren ein direkter Vergleich zwischen dem Neutralisationstest in der Maus und der Ersatzmethode geplant.

Die Untersuchungen werden im Rahmen eines vom BMBF geförderten Projektes durchgeführt.

Literatur

- Ballard, J., Bryant, A., Stevens, D. and Tweten, R. K. (1992). Purification and characterization of the lethal Toxin (α -Toxin) of *Clostridium septicum*. *Infection and Immunity* 60 (3); 784-790.
- Cortiñas, T. I., Mattar, M. A. and Stefani de Guzmán, A. M. (1997). α -Toxin Production by *Clostridium septicum* at different Culture Conditions. *Anaerobe* 3 (2-3); 199-202.
- Deutsches Arzneibuch (1992). *Monographie: Pararouschbrandimpfstoffe für*

Tiere. 10. Ausgabe. Stuttgart: Deutscher Arzneibuchverlag.

Gräßer, A. (1964). Probleme der Toxin-gewinnung aus *Clostridium-septicum*-Kulturen. *Archiv experimenteller Veterinärmedizin* 19 (1); 307-310

Korrespondenzadresse

Dipl.-Biol. Katja Jansen
Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen
Bereich Tierhygiene
Kellnerweg 6
D-37077 Göttingen



Entwicklung und Prävalidierung von Alternativmethoden zur Wirksamkeitsprüfung von *Clostridium perfringens*-Impfstoffen

Elvira Ebert, Volker Öppling, Esther Werner und Klaus Cußler
Paul-Ehrlich-Institut, D- Langen

Zusammenfassung

Die Wirksamkeit von *Clostridium* (*C.*) *perfringens*-Impfstoffen wird nach der Monographie 363 der Europäischen Pharmakopöe in einem Tierversuch geprüft. Als Ersatz für die nach Arzneibuch geforderten Mäuse-Neutralisations-Tests (MNT) für Clostridientoxine wurde ein Capture-ELISA zum Nachweis von Betaantitoxin sowie ein Competitive-ELISA zum Nachweis von Epsilonantitoxin entwickelt. Beide Testsysteme arbeiten mit monoklonalen Antikörpern zur quantitativen Bestimmung der zu überprüfenden Antitoxine.

Der Beta- und Epsilonantitoxingehalt von insgesamt 523 Proben wurde parallel zur Routinechargenkontrolle im MNT mit den ELISA-Methoden geprüft. Beide ELISAs erwiesen sich als sehr spezifische, reproduzierbare und geeignete Methoden, um den geforderten MNT ersetzen zu können. Im Rahmen einer Prävalidierungsstudie wurde die Anwendbarkeit der Standardarbeitsanweisungen sowie die Übertragbarkeit der ELISA-Methoden in andere Laboratorien überprüft. Die Studie konnte die Eignung beider ELISAs als Ersatzmethoden zum MNT für die Chargenprüfung von beta- und epsilontoxoidhaltigen Veterinärimpfstoffen bestätigen.

Keywords: *C. perfringens*, potency testing, alternative methods, ELISA, prevalidation

Summary: Development and prevalidation of alternative methods for the potency testing of *C. perfringens* vaccines

The requirements for the quality control of *C. perfringens* vaccines for veterinary use are described in the monograph 363 of the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). In the current used potency test neutralising antibodies against *C. perfringens* beta- and epsilontoxin are determined in a mouse neutralisation test (MNT). Two ELISA methods were developed for the replacement of the MNT. Both methods use monoclonal antibodies to determine the quantity of specific antibodies against beta toxin (Capture-ELISA) and epsilon toxin (Competitive-ELISA) *in vitro*. In parallel to the routine batch potency test in mice, the beta- and epsilonantitoxin levels in 523 samples were estimated in the ELISA procedures. A high specificity and a good reproducibility are evident for both test systems. An interlaboratory prevalidation study was carried out to evaluate the relevance and the transferability of the ELISA procedures. It is concluded that both ELISA systems seems to be suitable alternative methods for assessing the potency of beta- and epsilontoxoid in batches of vaccines for veterinary use.

1 Einleitung

Für die Wirksamkeitsprüfung von *C. perfringens* beta- und epsilontoxoidhaltigen Veterinärimpfstoffen ist in der Monographie „*Clostridium perfringens* vaccine for veterinary use“ der Europäischen Pharma-

kopöe (Ph. Eur.) ein zweigeteilter Tierversuch vorgeschrieben. Zunächst werden 10 Kaninchen mit dem zu prüfenden Impfstoff immunisiert. Der Pool aus den gewonnenen Kaninchenserum wird danach in einem Mäuse-Neutralisations-Test (MNT) auf seinen Gehalt an Antitoxinen unter-

sucht. Es ist davon auszugehen, daß allein für die Prüfung der in Deutschland zugelassenen Clostridien-Immunpräparate mindestens 16.300 Mäuse pro Jahr eingesetzt werden (Weißer und Hechler, 1997). Das Ziel der vorgestellten Untersuchungen war es, den stark belastenden MNT

bei der Qualitätskontrolle von *C. perfringens*-Veterinärimpfstoffen durch serologische Methoden zu ersetzen. Hierfür wurden ELISA-Systeme zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern gegen Beta- und Epsilon-toxin unter der Verwendung von monoklonalen Antikörpern (mAk) entwickelt und optimiert.

Im Rahmen einer Prävalidierung wurde die Durchführbarkeit der erstellten Standardarbeitsanweisungen (SOPs) sowie die Übertragbarkeit der Methoden in andere Laboratorien überprüft. Neben dem Entwicklungslabor waren drei weitere Institute einbezogen, die jeweils drei codierte Kaninchenserum im Capture- und Competitive-ELISA wiederholt austesteten.

2 Material und Methoden

Die in den ELISA-Systemen eingesetzten Antigene (Beta- und Epsilon-toxin) sowie die Kaninchenreferenzseren waren kommerziell nicht erhältlich und wurden daher in größerer Menge selbst hergestellt. Die Referenzseren wurden im Tierversuch an den internationalen Standardpräparaten der WHO auf ihre jeweilige Antitoxinwertigkeit überprüft und definiert. Für die Produktion der mAk wurden die Hybridomzellen in Bioreaktoren kultiviert und affinitätschromatographisch aufgereinigt.

Die geprüften Kaninchenserum wurden von den Impfstoffherstellern zur Verfügung gestellt.

2.1 Capture-ELISA

In diesem ELISA werden mAk gegen Betatoxin als Beschichtungsantikörper eingesetzt, die im nachfolgenden Schritt aus einem Bakterienkulturüberstand spezifisch Betatoxin herausfängen und binden. Die zu untersuchenden Kaninchenserum, die polyklonale Antikörper (pAk) gegen Betatoxin enthalten, werden austitriert und binden an den präsentierten Antigenen. Über einen enzymmarkierten Zweit-Antikörper werden die pAk schließlich detektiert (Ebert, 1995; Ebert et al., 1996).

2.2 Competitive-ELISA

Die Kaninchenserum mit pAk werden auf antigenbeschichteten Mikrotiterplatten austitriert und konkurrieren dort mit konstant eingesetzten mAk um die gleiche Bindungsstelle am Epsilon-toxin. Nachgewiesen werden nur die gebundenen mAk. Indirekt wird dann die Menge der „ver-

drängten“ pAk berechnet. Die Detektion erfolgt mittels eines enzymmarkierten Zweit-Antikörpers.

2.3 Auswertung

Die relative Wertigkeit der Kaninchenserum wurde über ihren Antitoxingehalt in Bezug zu einem Referenzserum mit definierter Wertigkeit, das auf jeder Testplatte mitgeführt wurde, mittels *parallel line assay* (RelPot 3.1, National Veterinary Service Laboratory, USA) bestimmt. Die ermittelten *in vitro* Ergebnisse wurden mit den bekannten *in vivo* Daten (MNT) aus der Chargenprüfung verglichen und Korrelationsstudien erstellt. Des weiteren wurde die Reproduzierbarkeit der ELISA-Systeme mittels intra- und inter-assay-Variationskoeffizienten bestimmt.

2.4 Prävalidierung

Im Rahmen einer Prävalidierungsstudie wurde nach Curren et al. (1995) die Gültigkeit der erstellten Standardarbeitsanweisungen sowie die Übertragbarkeit der ELISA-Systeme in 3 weiteren Laboratorien überprüft. Variationen innerhalb sowie zwischen den Laboratorien wurden ermittelt. Des weiteren wurde das *Ranking* der Testseren, basierend auf den *in vivo* und den *in vitro* Daten, verglichen.

3 Ergebnisse

Die Spezifität der ELISA-Systeme wurde untersucht und konnte bestätigt werden.

Für den Capture-ELISA konnte die Reproduzierbarkeit mit einem intra-assay-Variationskoeffizienten (Vk) von 2% und

einem inter-assay-Vk von 18% angegeben werden. Reproduzierbarkeitsstudien im Competitive-ELISA zeigten einen intra-assay-Vk von ebenfalls 2% und einen inter-assay-Vk von 20%.

Beim Vergleich der Daten aus dem MNT mit den ermittelten Capture-ELISA-Ergebnissen für 346 untersuchte Kaninchenserumproben konnte ein Korrelationskoeffizient von $r=0,88$ errechnet werden. Dieser zeigt eine signifikante Korrelation für $p<0,01$ an (Cavalli-Sforza, 1972). Wertigkeitsbestimmungen von 177 Kaninchenserum, die im Competitive-ELISA vergleichend zum MNT geprüft wurden, zeigen ebenfalls eine signifikante Korrelation ($r=0,41$; $p<0,01$).

Die Ergebnisse der Prävalidierungsstudie sind in der Abbildung 1 für den Capture-ELISA und in Abbildung 2 für den Competitive-ELISA dargestellt. Die codiert untersuchten Testseren (1 bis 3) zeigten bei allen vier Laboratorien (A bis D) im Capture-ELISA dasselbe *Ranking* wie im MNT. Die inter-assay-Vk sowie die Vk zwischen den Laboratorien lagen bei 20%. Die nach dem MNT bestehende Rangfolge der im Competitive-ELISA untersuchten Seren (4 bis 6) konnte von 3 der 4 Laboratorien bestätigt werden. Nach den Daten von Labor B zeigten die Testseren 5 und 6 eine umgekehrte Rangfolge im Competitive-ELISA. Die inter-assay-Vk lagen zwischen 10% und 40%, die Vk zwischen den Laboratorien stets unter 20%.

4 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl der Capture-ELISA zum Nachweis von Beta-

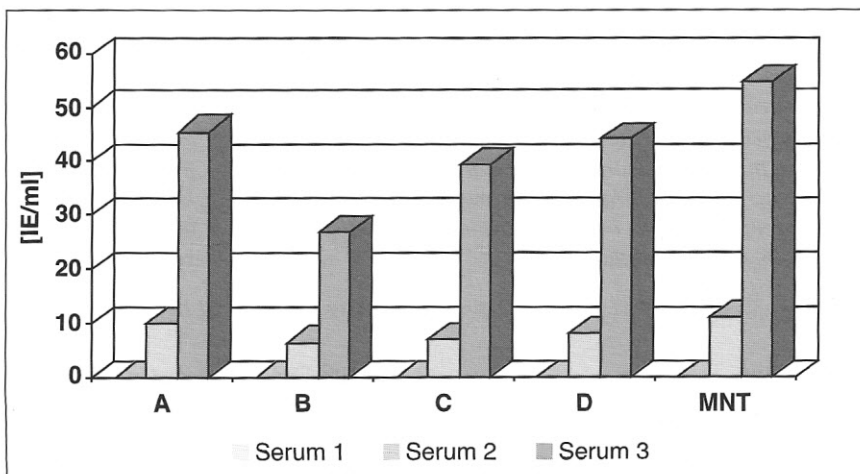


Abbildung 1: Prävalidierungsstudie des Capture-ELISA zum Nachweis von Betaantitoxin in Kaninchenserum. Teilnehmende Laboratorien: A bis D, Serenbezeichnung: 1 bis 3, vergleichende Mäusenutralisationstest-Daten: MNT.

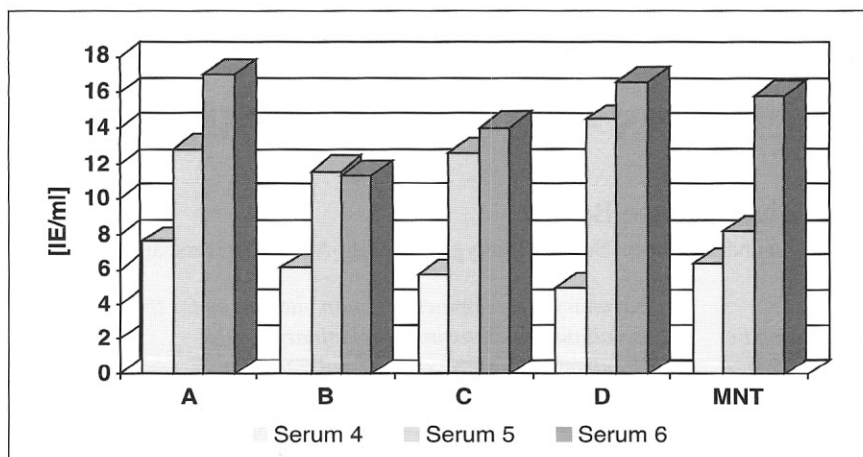


Abbildung 2: Prävalidierungsstudie des Competitive-ELISA zum Nachweis von Epsilonantitoxin in Kaninchenserum. Teilnehmende Laboratorien: A bis D, Serenbezeichnung: 4 bis 6, vergleichende Mäuseneutralisationstest-Daten: MNT.

antitoxin als auch der Competitive-ELISA zum Nachweis von Epsilonantitoxin in Kaninchenserum als geeignete *in vitro* Methoden für den MNT angesehen werden können. Beide serologischen Methoden sind durch die Verwendung von mAk hoch spezifisch. Die ermittelten Reproduzierbarkeiten innerhalb einer Testplatte ($V_k = 2\%$) und zwischen den Testplatten ($V_k = \max. 20\%$) liegen für beide ELISA-Systeme in einem für Immunoassays zulässigen Bereich (Tijssen, 1988; Kemeny, 1994; DAB 10 Immunchemische Methoden, 1996). Die Korrelationsstudien zwischen den MNT-Daten und den Wertigkeitsbestimmungen im Capture-ELISA zeigten eine hohe Signifikanz an. Damit konnte bestätigt werden, daß die Aussagekraft beider Testsysteme in Bezug auf den Nachweis von Betaantitoxin sehr ähnlich ist.

Die Vergleichsstudien zwischen MNT und Competitive-ELISA zeigten mit $r=0,41$ einen nur niedrigen Korrelationskoeffizienten an. Für eine Probenmenge von $n=177$ zeigt dieser aber dennoch eine Signifikanz für $p<0,01$ an.

Nach diesen Ergebnissen im Entwicklungslabor wurde die Übertragbarkeit in weitere Laboratorien untersucht. Die Spezifität sowie die Reproduzierbarkeit der ELISA-Systeme konnte in diesen Studien bestätigt werden. Alle Teilnehmer erkannten Serum Nr. 1 im Capture-ELISA eindeutig als Betaantitoxin-Negativ. Das Ranking der Testseren aller Labors stimmt mit dem Ranking aus dem MNT überein. Damit konnte die Relevanz und Validität des Capture-ELISA als mögliche Ersatzmethode zum Betaantitoxinnachweis im

MNT eindeutig belegt werden. Die Prävalidierung des Competitive-ELISA bestätigte dessen Eignung als Ersatzmethode zum MNT für den Nachweis von Epsilonantitoxin nur bedingt. Drei von vier Labors konnten das vom MNT vorgegebene Ranking der Testseren mittels ELISA bestätigen. Labor B jedoch ermittelte eine umgedrehte Rangfolge der Seren Nr. 5 und 6.

Mit der Entwicklung und Prävalidierung der beiden beschriebenen ELISAs sind entscheidende Vorarbeiten geleistet worden, um als *in vitro* Systeme bei der Wirksamkeitsprüfung von beta- und epsilonantitoxinhaltigen *Clostridium perfringens*-Impfstoffen eingesetzt zu werden. Eine internationale Validierungsstudie mit einer höheren Teilnehmerzahl sowie einem größeren Probenumfang, der insbesondere auch grenzwertige Proben enthält, sollte durchgeführt werden. Wenn eine solche Studie bestätigt, daß die hier vorgestellten Methoden geeignet sind, können diese der Arzneibuchkommission als serologische Referenzmethoden zum Ersatz des MNT vorgeschlagen werden.

Unabhängig hiervon können Hersteller die Methoden produktspezifisch für ihre Impfstoffe prüfen und validieren. Eine Neufassung der Monographie, die bisher aber erst im Entwurf vorliegt, wird den Einsatz validierter *in vitro* Verfahren erlauben (Pharmeuropa, 1997).

Literatur

Cavalli-Sforza, L. (1972). *Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Stati-*

stik. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Curran, R. D., Southee, J. A., Spielmann, H., Liebsch, M., Fentem, J. H. and Balls, M. (1995). The role of prevalidation in the development, validation and acceptance of alternative methods. *ATLA* 23, 211-217.

Deutsches Arzneibuch, 10. Auflage (1996). *Kommentar: zu Kapitel V.2.1.10 Immunchemische Methoden*. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag. Frankfurt: Govi-Verlag GmbH.

Ebert, E. (1995). *Entwicklung einer in vitro-Methode zum Nachweis von Antikörpern gegen C. perfringens Betatoxin*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Ebert, E., Kusch, M., Öppling, V., Werner, E. und Cußler, K. (1996). Serologische Wirksamkeitsprüfung von *Clostridium perfringens* betatoxinhaltigen Veterinärimpfstoffen: Eine Alternative zum gesetzlich vorgeschriebenen Mäuseneutralisationstest. *ALTEX* 13, 66-75.

European Pharmacopoeia (1995).

Kemeny, D. M. (1994). *ELISA: Anwendung des enzyme linked immunosorbent assay im biologisch/medizinischen Labor*. Nach der amerikanischen Auflage von Hans Lippa (1991). Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.

Pharmeuropa (1997). *Clostridium Perfringens Vaccine for Veterinary Use. Pharmeuropa Vol. 9, No. 4*, 648-651.

Tijssen, P. (1988). *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Practice and theory of enzyme immunoassays*. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Science Publishers B.V..

Weißer, K. and Hechler, U. (1997). *Animal Welfare Aspects in the Quality Control of Immunobiologicals. A Critical Evaluation of the Animal Tests in Pharmacopoeia Monographs*. Nottingham: FRAME.

Danksagung

Die Arbeit wurde mit der Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie durchgeführt (BMBF 0310622).

Wir danken Frau Dr. Borrmann (BgVV-Jena), Frau Dr. Roth (ITTH-Göttingen) sowie Frau Dr. Halder (ECVAM-Ispira, Italien) für die Teilnahme an den Prävalidierungsstudien.

Korrespondenzadresse

Dipl.-Biol. Elvira Ebert
Paul-Ehrlich-Institut
Abteilung Veterinärmedizin
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
D-63225 Langen