# Untersuchungen zur Festlegung tierschutzkonformer Grenzwerte bei der Prüfung endotoxinhaltiger Schweineimpfstoffe

Marion Wegener, Lukas Bruckner[1], Klaus Cußler
Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen, [1]Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe, CH-Mittelhäusern

Zusammenfassung
*Endotoxin (syn. LPS = Lipopolysaccharid) ist als Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien in vielen Veterinärimpfstoffen enthalten. Im Organismus lösen hohe Endotoxindosen eine Reihe pathophysiologischer Reaktionen aus. Nach der Anwendung dieser Impfstoffe können Unverträglichkeitsreaktionen auftreten.*
*Zur Untersuchung kamen zugelassene Schweineimpfstoffe, die an Tiere unterschiedlicher Gewichts- und Altersgruppen verabreicht wurden. Der Endotoxingehalt des jeweiligen Impfstoffes wurde mit dem LAL (Limulus-Amöbozyten-Lysat)-Test nach EP (Europäische Pharmacopoeia) bestimmt.*
*Der Versuchsaufbau entsprach den Vorschriften der EP zur Prüfung auf Unschädlichkeit von Veterinärimpfstoffen. Nach der Impfstoffapplikation wurden die Tiere über einen Zeitraum von 48 Std. intensiv überwacht, die Körperinnentemperatur erfaßt sowie Blutentnahmen zur Bestimmung der Plasmaendotoxinkonzentration und zur Anfertigung eines großen Blutbildes durchgeführt.*
*Die Veränderungen im Blutbild und die Ergebnisse der klinischen Beobachtung zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der mit dem Impfstoff verabreichten Endotoxinmenge. Eine anfängliche Leukopenie mit sich anschließender Leukozytose, Temperaturerhöhungen sowie klinischen Zeichen von Futterverweigerung, Niedergeschlagenheit bis hin zu schockartigen Symptomen waren mit erhöhten Endotoxinkonzentrationen im Plasma verbunden. Diese Erscheinungen waren in der Regel nach 24 Std. wieder abgeklungen. Besonders empfindlich auf einen erhöhten Endotoxingehalt im Impfstoff reagierten junge Tiere mit einem Körpergewicht zwischen 10 und 40 kg. Weitere Ursachen für die großen Unterschiede in der individuellen Reaktionslage können neben der Endotoxinkonzentration im Impfstoff auch die enthaltenen Bakterienarten bzw. ihre Aufbereitungsweise sein.*

*Summary: The establishment of endotoxin limits which satisfy animal welfare considerations in the testing of porcine vaccines*
*Endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) is a constituent of the cell walls of gram-negative bacteria and is found in many vaccines produced from these bacteria. High levels of endotoxin can give rise to a range of pathophysiological reactions, and adverse reactions tend to be seen in animals following vaccination.*
*In this study, pigs of various ages and weights were vaccinated with licensed porcine vaccines and the endotoxin content of the vaccines was determined with the LAL, conducted according to EP (European Pharmacopeia). The experiments followed the EP guidelines relating to the safety testing of veterinary vaccines. The animals were monitored for 48 h after vaccination, their body temperatures were measured, and blood samples were taken for analysis and for the determination of plasma endotoxin levels.*
*There was a clear relationship between vaccine endotoxin content and changes in blood cell counts and in the clinical picture. Elevated plasma endotoxin levels correlated with the occurrence of initial leucopenia followed by leucocytosis as well as with clinical symptoms ranging from refusal of food and depression to shock-like symptoms. After 24 h, normal physiological values were regained. Young animals weighing between 10 and 40 kg were found to be very sensitive to elevated endotoxin content in vaccines. The differences in individual reactions could be due not only to differences in vaccine endotoxin content, but also to differences in the reactivity of the organism, and in the type of bacteria used or in the composition of the vaccine.*

*Keywords: bacterial porcine vaccines, endotoxin, safety test, adverse reactions*

## 1 Einleitung

Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS). Sie bilden als Zellwandbestandteil die äußere bakterielle Membran gramnegativer Bakterien und sind an deren Oberfläche lokalisiert. Sie bestehen aus einer Polysaccharidkette und dem Lipoid A. Der Lipoidanteil ist für die toxische Wirkung des LPS verantwortlich (Rietschel et al., 1993). Das LPS ist normalerweise fest in der Zellwand integriert. Es wird erst bei Bakterienzerfall frei.

Endotoxine lösen eine Vielzahl unspezifischer pathophysiologischer Reaktionen aus. Hierzu gehören Fieber (Cort und Kindahl, 1980), Blutdruckabfall, Gerinnungsstörungen und Veränderungen im weißen Blutbild (Hussaini und Ready, 1981). Der Organismus reagiert bereits auf kleinste Mengen dieser Komponenten. Nach Applikation hoher Dosen kann es zu irreversiblen Schockzuständen und zu Fehlgeburten kommen. Endotoxine werden daher als wichtige Pathogenitätsfaktoren gramnegativer Bakterien angesehen (Culbertson und Osburn, 1980).

Während geringe Mengen in Impfstoffen aufgrund ihres immunstimulierenden Effektes durchaus erwünscht sind, führen höhere Dosen zu deutlichen Nebenwirkungen (Scarnell, 1980).

Für die Prüfung von Tierimpfstoffen gelten die Vorschriften des Deutschen (DAB) und des Europäischen Arzneibuchs (EP). Detaillierte Anforderungen an die einzelnen Impfstoffe sind in den Monographien beschrieben. So ist bislang für inaktivierte Colibacillosis-Impfstoffe, inaktivierte porcine Actinobacillosis- Impfstoffe und inaktivierte porcine Impfstoffe gegen die progressive atrophische Rhinitis eine maximale Endotoxinkonzentration von $1x10^6$ IU/Dosis, gemessen im Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL), einzuhalten. Die Unschädlichkeit nach Überdosierung muß außerdem routinemäßig am Zieltier überprüft werden. Zwei Dosen (= Doppeldosistest) eines inaktivierten Impfstoffes oder 10 Dosen eines Lebend-Impfstoffes werden auf dem empfohlenen Wege injiziert. Treten keine „anomalen oder systemischen Reaktionen auf", so gilt der Test auf Unschädlichkeit als bestanden. Der Begriff „anomale Reaktion" ist jedoch nicht näher definiert. Bei einigen Impfstoffen werden daher deutliche systemische Reaktionen nach der Vakzinierung als für das Produkt „normal" erachtet.

Ziel der Untersuchungen ist es, durch einen Vergleich der Endotoxinausgangskonzentrationen im Impfstoff mit den resultierenden Werten im Plasma nach der Immunisierung unter Berücksichtigung weiterer klinischer Parameter eine wissenschaftlich fundierte Grundlage für die Beurteilung Endotoxin-bedingter Unverträglichkeitsreaktionen beim Schwein zu finden, um sowohl den Aspekten der Arzneimittelsicherheit als auch des Tierschutzes Rechnung zu tragen.

## 2 Versuchstiere, Material und Methoden

### 2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere standen weibliche und männlich-kastrierte Masthybriden im Alter von 2 bis 4 Monaten und einem Körpergewicht von 8-65 kg zur Verfügung. Die 13 Versuchstiergruppen bestanden jeweils aus 5 bis 6 Tieren.

### 2.2. Material und Methoden

#### 2.2.1 Impfstoffe

Es wurden nur zugelassene bakterielle Schweineimpfstoffe untersucht, davon 8 Mono-, 3 Kombinations- und 2 Lebend-Impfstoffe.

#### 2.2.2 Immunisierung und Blutentnahme

Zu Versuchsbeginn (0h) erhielten jeweils zwei Tiere innerhalb jeder Versuchsgruppe die nach Anweisung des Herstellers einfache Dosierung des Impfstoffes, zwei weitere Tiere die doppelte bzw. zehnfache Dosierung. Ein oder zwei weitere Tiere dienten als Kontrollen. Ihnen wurde anstelle des Impfstoffes physiologische Kochsalzlösung injiziert. Den Tieren wurde unmittelbar vor der Immunisierung sowie 1, 2, 4, 6, 24 und 48 Std. p.imm. unter sterilen Bedingungen Blut entnommen. Das heparinisierte Vollblut wurde anschließend zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde portioniert und bis zur späteren Endotoxinbestimmung bei -20° C gelagert. Die Leukozytenzahlen wurden mit Hilfe eines Analysengerätes (Coulter-JT, Coulter USA) aus EDTA-Vollblut ermittelt.

#### 2.2.3 Beobachtung der Tiere nach Immunisierung

Vor den Blutentnahmen wurden die Tiere klinisch untersucht. Es wurde Bewegungsaktivität, Atmung, Nahrungs- und Tränkeaufnahme, Kreislauf, Kot- und Urinabsatz beurteilt sowie die Körperinnentemperatur erfaßt.

#### 2.2.4 Endotoxinbestimmung in den Impfstoffen

Die Bestimmung der Endotoxinkonzentration in den Impfstoffen erfolgte nach EP.

#### 2.2.5 Endotoxinbestimmung im Plasma

Die Endotoxinkonzentration im Plasma wurde kinetisch in einem Mikroplattenspektrophotometer (SpectraMax 250, *Molecular Devices Corporation,* California) mit Hilfe eines chromogen Substrates (Pyrochrome LAL, Pyroquant Diagnostik GmbH, Weiterstadt) gemessen.

## 3 Ergebnisse

Die Auswertung der Beobachtungsmerkmale ergab deutliche Verhaltensänderungen während der ersten 24 Std. nach der Verabreichung endotoxinhaltiger Impfstoffe. Bei Endotoxinkonzentrationen > $1x10^6$ IU/Impfstoffdosis reagierten die Tiere mit einer verminderten bis gänzlich fehlenden Nahrungsaufnahme. Im weiteren waren eine verstärkte Atmung, Beeinträchtigungen des Kreislaufsystems, Unruhe, Zittern, Teilnahmslosigkeit und Festliegen zu beobachten.

Die Körperinnentemperatur erhöhte sich im Anschluß an die intramuskuläre Immunisierung während der ersten beiden Stunden um mehr als 1,5° C. Nach subkutaner Applikation war die Temperaturerhöhung weitaus geringer.

Die Analyse des Plasmas zeigte eine deutliche Erhöhung der Endotoxinkonzentrationen im Anschluß an hohe Endotoxininjektionen, während bei Impfstoffen mit < $1x10^6$ IU/Impfstoffdosis nur geringe Endotoxinkonzentrationen im Organismus nachweisbar waren (Abb.1)

Nach der Gabe hoher Endotoxindosen sanken die Leukozytenzahlen des zirku-

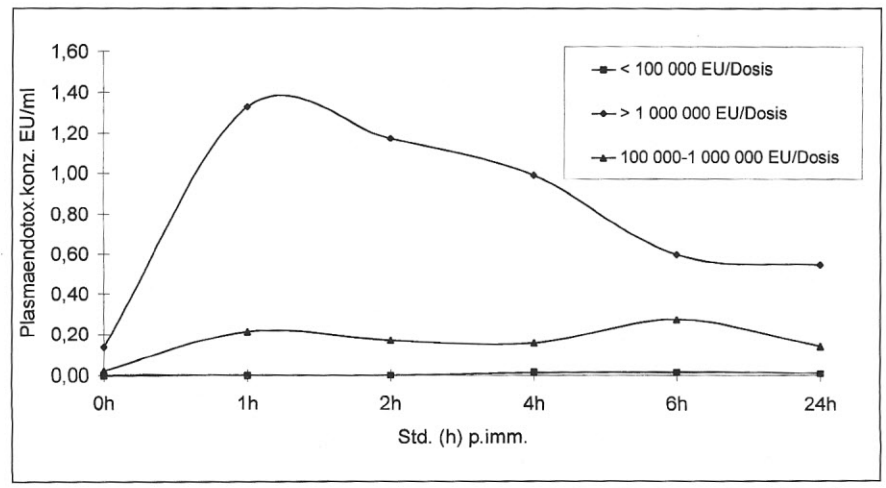


**Abbildung 1: Endotoxinkonzentration im Plasma nach Applikation endotoxinhaltiger Impfstoffe**

lierenden Blutes initial während der ersten zwei Stunden, um dann kontinuierlich über die Ausgangswerte anzusteigen. Geringere Endotoxindosen wurden vom Organismus sofort mit einem Anstieg der Leukozytenzahlen beantwortet.

## 4 Diskussion

Aus den bisher durchgeführten Untersuchungen läßt sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe der mit dem Impfstoff applizierten Endotoxindosis und der Ausprägung der auftretenden Unverträglichkeitsreaktionen aufzeigen. Reaktionen treten insbesondere nach Endotoxinapplikationen von > $1 \times 10^6$ IU/Impfstoffdosis auf.

Die Ergebnisse zeigen, daß nach Applikation von Impfstoffen mit hohen Endotoxinkonzentrationen eine gesteigerte Resorption des Endotoxins in den Organismus stattfindet. Der Organismus reagiert auf aufgenommenes Endotoxin mit Erhöhung der Körperinnentemperatur. Abbildung 2 zeigt den Zusammenhang zwischen Plasmaendotoxinkonzentration und Temperaturerhöhung.

Die Ergebnisse zeigen weiter, daß bei einzelnen Impfstoffen deutliche endotoxinbedingte Nebenwirkungen auftreten können. Der Schweregrad der Erscheinungen ist abhängig von der Dosis und dem Applikationsweg. Aber es bestehen auch sehr große individuelle Unterschiede in der Reaktionslage der Einzeltiere. Neben der Endotoxinkonzentration im Impfstoff scheint auch seine Zusammensetzung (Art der Bakterienaufbereitung, zugefügte Adjuvantien, Konservierungsstoffe) von Bedeutung zu sein. Auch Körpergewicht bzw. Alter, Gesundheitszustand, Hormonstatus sowie Haltung der Tiere können eine Rolle bei der Empfindlichkeit gegenüber Endotoxin spielen.

Schweine werden als landwirtschaftliche Nutztiere vorwiegend in Großbeständen gehalten. Durch Zucht und Haltung sind die Tiere sehr kreislaufanfällig geworden. Erschöpfungsreaktionen nach einer Bestandsimmunisierung sind häufig. Endotoxinbedingte Nebenwirkungen können hierdurch verschleiert werden.

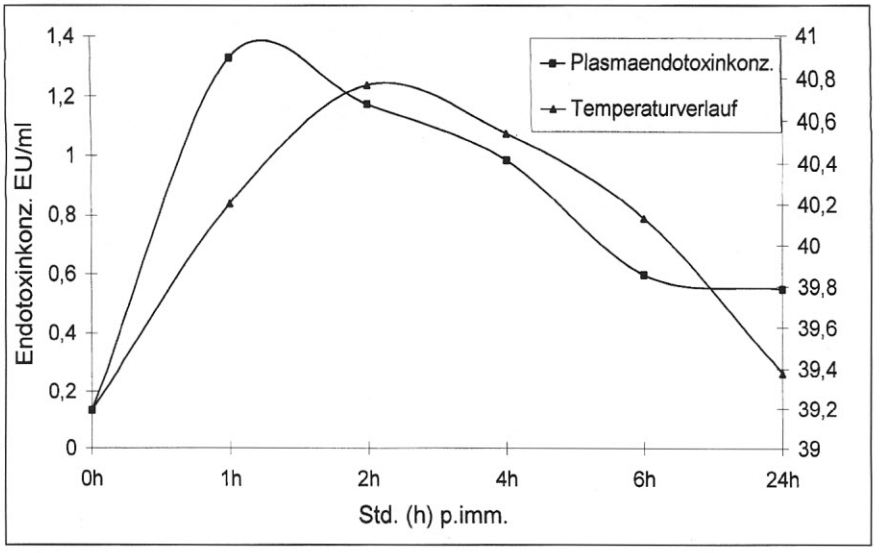


**Abbildung 2: Zusammenhang zwischen Endotoxinkonzentration im Plasma und Anstieg der Körperinnentemperatur**

Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse ist eine erneute Diskussion der bislang festgeschriebenen Maximalwerte für den Endotoxingehalt in Veterinärimpfstoffen wünschenswert. Möglichst geringe Endotoxinkonzentrationen in Impfstoffen und eine klare Festlegung der Beurteilungskriterien bei Unschädlichkeitsprüfungen am Schwein sind als wichtiger Beitrag zur Arzneimittelsicherheit und zum Tierschutz anzusehen.

## Literatur

Culbertson, Jr. R. and Osburn, B. I. (1980). The biologic effects of bacterial endotoxin: A short review. *Vet. Sci. Comm. 4*, 3-14.

Colibacillosis-Impfstoff für neugeborene Ferkel (inaktiviert), Monographie Nr.962, Europäisches Arzneibuch, 3.Ausgabe 1997, Amtliche deutsche Ausgabe. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.

Cort, N. and Kindahl, H. (1980). Endotoxin-induced abortion in early pregnant gilts and its prevention by flunixin meglumine. *Acta vet. scand. 31*, 347-358.

Hussaini, S. N. and Ready, R. A.; (1981). Studies on escherichia coli vaccines: estimation of endotoxin in veterinary vaccines. *Vet. Res.Comm. 5,* 171-175.

Impfstoffe für Tiere, Monographie Nr. 62, Europäisches Arzneibuch, 3.Ausgabe 1997, Amtliche deutsche Ausgabe. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.

Porcine actinobacillosis vaccine (inactivated), Monographie-Entwurf, *Pharmeuropa 8 (1),* march 1996.

Porcine progressive atrophic rhinitis vaccine (inactivated), Monographie-Entwurf, *Pharmeuropa 8 (3)*, september 1996.

Rietschel, E. Th.; Brade, L.; Schade, F. U.; Seydel, U. und Zähringer,U. (1993). Bakterielle Endotoxine: Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und biologischer Wirkung. *Immun.Infekt. 21*, 26-35.

Scarnell, J.; (1980). Field experiences with gletvax K88 E. coli vaccine. *Pig Veterinary Society Proceedings 6*, 91-97.

**Danksagung**

Die Arbeiten werden unterstützt von der Stiftung Forschung 3R, CH-Münsingen

**Korrespondenzadresse**

Marion Wegener, Tierärztin
Paul-Ehrlich-Institut
Abteilung Veterinärmedizin
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
D-63225 Langen