

Impfstoffkontrolle ohne Tierversuche?

Hans-Peter Ottiger¹ und Silke Bruhn²

¹Institut für Viruskrankheiten und Immunophylaxe, CH-Mittelhäusern

²Bundesamt für Veterinärwesen (BVET), CH-Bern

Zusammenfassung

Impfstoffe müssen nicht nur wirksam Krankheiten vorbeugen, sie dürfen auch keine schädlichen Nebenwirkungen haben. Zentral ist dabei die Reinheit der Impfmittel, die bislang in Tierversuchen überprüft wird. Der wachsende Erkenntnisstand macht es jedoch vielerorts möglich, Alternativmethoden einzusetzen. So auch auf dem Gebiet der Reinheitsprüfung von Geflügelimpfstoffen. Dank der in vitro Methode PCR (Polymerase-Kettenreaktion) eröffnet sich hier die Möglichkeit, die Anzahl Tierversuche zu reduzieren.

Summary: Vaccine testing without animal experiments?

Vaccines must provide effective protection against disease without any harmful side effects. Antigen purity is a crucial factor which until now has had to be tested on animals. However, recent scientific developments allow the use of alternatives to animal experiments in many cases, e.g. poultry vaccine purity testing. The in vitro Polymerase Chain Reaction method (PCR) is one advance which could reduce the number of animal experiments.

Keywords: vaccine testing, PCR, animal experiments, 3R's

1 Vorbemerkung

Impfstoffe werden einer besonders gründlichen Qualitätskontrolle unterzogen, damit sie Krankheiten vorbeugen können und zudem keine Gefahren von ihnen ausgehen: Sie müssen wirksam, unschädlich und rein sein. Damit ein Impfstoff vor einer bestimmten Viruskrankheit schützen kann, muss er das krankheitsverursachende Virus in abgeschwächter oder abgetöteter Form enthalten. Dieses löst eine Immunantwort und damit den Impfschutz aus. Impfmittel können aber durch andere Viren, so genannte Fremd-viren, verunreinigt sein. Diese Fremd-viren können schwerwiegende Folgen haben – etwa einen Seuchenausbruch. Daher ist die so genannte Fremd-virusprüfung ein sehr wichtiger Bestandteil der Qualitätskontrolle von Impfstoffen.

zusiedeln und zu vermehren. Impfstoffe können grundsätzlich auf zwei Wegen durch Fremd-viren verunreinigt werden. Zum einen können Ausgangsmaterialien – wie Zellkulturen, Nährmedien – unrein sein. Besonders problematisch sind befruchtete Hühnereier und primäre Hühnerzellkulturen¹, die für die Herstellung von Geflügelimpfstoffen verwendet werden. Zum anderen können unsaubere Behälter und Produktionsanlagen eine Kontaminationsquelle während des Herstellungsprozesses darstellen. Kritisch sind auch Rückstände von Impfstoffen, die zuvor in derselben Anlage produziert wurden.

Aufgrund der Gefahr, die von Fremd-viren ausgehen kann, schreibt die europäische Pharmakopö vor, dass die Herstellungsverfahren so geschaffen sein müssen, dass eine Verunreinigung durch Fremd-viren ausgeschlossen wird².

1. Tierversuch: Hier wird Hühnern der zu testende Impfstoff in einen Muskel gespritzt und in die Augen geträufelt. Nach einigen Wochen wird den Hühnern Blut entnommen und ihre Immunantwort (Bildung von Antikörpern) getestet. Die Hühner dürfen nur auf das Impfvirus reagiert haben: Es dürfen keine Antikörper gegen andere Geflügelviren nachweisbar sein.

2. Befruchtete Eier: Nach Beimpfung der Eier dürfen die ungeschlüpften Küken keine Missbildungen entwickeln oder absterben.

3. Primäre Hühnerzellkulturen: Nach Beimpfung dürfen sich die Zellen nicht krankhaft verändern oder absterben. Die Fremd-virusprüfung muss im Tierversuch durchgeführt werden. Die Tests mit befruchteten Eiern und Zellkulturen können nur als Ergänzung zu anderen Methoden eingesetzt werden.

2 Gründe für die Fremd-virusprüfung

Die für die Herstellung von Impfstoffen verwendeten Zellen und Nährstoffe bieten den Fremd-viren die Möglichkeit, sich an-

3 Tests für den Ausschluss von Fremd-viren

Bislang sind im europäischen Arzneimitteibuch drei Tests als Fremd-virusprüfung rechtlich zugelassen:

4 Die 3R's in der Impfstoffprüfung

Etliche Tests sind notwendig, bevor ein Impfstoff auf den Markt kommt.

¹ Primäre Hühnerzellkulturen sind Zellkulturen, die aus Organen oder dem Skelett von ungeschlüpften Hühnerküken immer wieder neu hergestellt werden müssen. Sie sterben nach kurzer Zeit ab und können daher nicht wie viele andere Zellen zur Herstellung einer so genannten Zelllinie verwendet werden.

² Die europäische Pharmakopö, ein Arzneimittelbuch, ist auch hierzulande verbindlich, da sich die Schweiz zur Einhaltung dieser Vorschriften ver-

traglich verpflichtet hat. Hier sind alle Herstellungsvorschriften, die für Impfstoffe beim Tier gelten, in den allgemeinen Ausführungen der Ph. Eur. sowie in ihren spezifischen Datenblättern, den so genannten „Monographien“, niedergeschrieben. Neben der allgemeinen Monographie „Impfstoffe für Tiere“ gibt es insgesamt 13 weitere Monographien zu bestimmten Geflügelvirus-Impfstoffen.



Weltweit werden schätzungsweise 10 bis 20 Millionen Tiere pro Jahr in der Qualitätskontrolle von Impfstoffen eingesetzt. Für einige dieser Tests gilt auch heute noch, dass ein Versuch im lebenden Tier unumgänglich ist. Durch den stetig wachsenden Erkenntnisstand wird es aber vielerorts möglich, Tierversuche zu ersetzen, zu reduzieren oder wenigstens zu optimieren (3R Prinzip). Da die 3Rs mittlerweile in nationalen und internationalen Gesetzgebungen verankert sind, ist es sogar gesetzlich vorgeschrieben, sie umzusetzen.

5 Reduzierung von Tierversuchen mittels PCR

Die Impfstoffkontrolle am Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe (IVI) prüft und entscheidet über die Zulassung aller in der Schweiz verwendeten Impfstoffe für Tiere. Hier wird seit einiger Zeit daran gearbeitet, die Fremd-virusprüfung von Geflügelimpfstoffen ohne Tierversuche durchführen zu können. Mit der *in vitro* Methode PCR (Polymerase-Kettenreaktion)³ können vorhandene Fremd-viren schnell und sicher anhand ihrer Genomsequenzen nachgewiesen werden. Die PCR ist daher in der Lage, die Tierversuche auf dem Gebiet der Fremd-virusprüfung von Geflügelimpfstoffen zu ersetzen.

Da das Genom jedes Virus unterschiedlich ist, muss für jedes wichtige Geflügelvirus eine eigene PCR-Methode entwickelt werden. Den Forderungen des europäischen Arzneimittelbuches entsprechend sind dies bei den Geflügelimpfstoffen insgesamt 16, wovon für 9 (Stand November 2003) PCRs verfügbar sind (Tab. 1). Bei der Entwicklung der PCRs wird besonders darauf geachtet, dass diese so einheitlich wie möglich ablaufen, damit sie im Labor einfach und mit geringstem Arbeitsaufwand angewendet werden können. Nur wenn die

Tab. 1: PCR Methoden für die Fremd-virusprüfung von Geflügelimpfstoffen

PCR Methoden vorhanden	PCR Entwicklung noch ausstehend
Aviäres infektiöses hämorrhagisches Enteritis Virus	Aviäres Adenovirus
Aviäres Leukose Virus	Aviäres Nephritis Virus
Aviäres Reovirus	Egg drop syndrome Virus
Aviäres Reticuloendotheliose Virus	Infektiöses aviäres Encephalomyelitis Virus
Anämie Virus der Hühner	Influenza A Virus
Infektiöses Bronchitis Virus	Marek's disease Virus
Infektiöses bursal disease Virus	Rhinotracheitis Virus der Puten
Infektiöses Laryngotracheitis Virus	
Newcastle disease Virus	

Anwendung der PCR wirtschaftlich ist, hat sie eine Chance, die bislang durchgeführten Tierversuche zu ersetzen. Es wird daher auch versucht, den Ablauf der Fremd-virusprüfung mittels PCR noch weiter zu vereinfachen, indem gleichzeitig mehrere Virus-Nachweise in einer einzigen PCR durchgeführt werden (Multiplex-PCR).

6 Ausblick

Auch wenn es bald möglich sein wird, alle 16 wichtigen Geflügelviren mit Hilfe der PCR nachzuweisen, sind noch einige Hindernisse zu überwinden, bis die PCR die Tierversuche auf dem Gebiet der Fremd-virusprüfung von Geflügelimpfstoffen ersetzen kann. Da sich die Impfstoffhersteller an die Vorgaben im Arzneimittelbuch halten müssen, ist dies somit erst dann möglich, wenn die PCRs als anerkannte Prüfmethode in die europäische Pharmakopöe aufgenommen werden. Dies gelingt nur durch eine Zusammenarbeit von Wissenschaft, Behörden und Industrie.

Damit die PCRs anerkannt werden können, verlangt die europäische Pharmakopöe zum einen, dass die Ergebnisse der Alternativmethode (PCR) mit denen der Standardmethode (Tierversuch) vergleichbar sind. Der direkte Vergleich der beiden Methoden steht jedoch bislang

noch aus. Zum anderen muss die Zuverlässigkeit dieser Methoden nachgewiesen sein (Validierung), was heisst, dass die Tests auch in anderen Labors und von anderen Personen durchgeführt, zu denselben Ergebnissen führen. Das IVI organisiert und führt diese Validierungsstudien durch.

Des Weiteren müssen die neuen Prüfverfahren den Behörden und Impfstoffherstellern vermittelt werden (auf nationaler wie internationaler Ebene). Das IVI hält daher Trainingskurse für behördliche Labors und Impfstoffhersteller ab, in denen der Einsatz der PCR auf dem Gebiet der Fremd-virusprüfung erlernt wird.

Nichtsdestotrotz kann die PCR bereits bei den Kontrollbehörden eingesetzt werden. Es bedarf allerdings der Zustimmung der jeweils zuständigen Behörde. In der Schweiz ist diese Zustimmung erfolgt, und so werden die bereits entwickelten PCRs in den Fremd-virusprüfungen von Geflügelimpfstoffen am IVI heute schon angewendet.

Dr. Hans-Peter Ottiger
Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe
Sensemattstrasse 293
CH-3147 Mittelhäusern
E-Mail: hanspeter.ottiger@ivi.admin.ch
Tel.: +41-31-848 93 54
Fax: +41-31-848 92 22

² Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) hat sich mittlerweile in der Wissenschaft als eine grossartige Entdeckung herausgestellt. Mit ihr kann man schnell und relativ einfach Erbmateriale (Genom) nachweisen. Die Bausteine des Genoms sind so genannte Basenpaare, die in einer bestimmten Reihenfolge aneinandergelagert sind. Die Kenntnis über die Basenpaarabfolge macht es der PCR möglich, ein definiertes Teilstück des Zielgenoms millionenfach zu vervielfältigen. Ziel dieser Vervielfältigung ist, die Genomstücke so stark zu vermehren, dass sie sichtbar gemacht werden können.