

Serologische Wirksamkeitsprüfung von *Clostridium perfringens*-betatoxoidhaltigen Veterinär-impfstoffen – eine Alternative zum gesetzlich vorgeschriebenen Mäuseneutralisationstest

Elvira Ebert, Manuela Kusch, Volker Öppling, Esther Werner und Klaus Cußler

Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, D-Langen

Zusammenfassung

Zur Qualitätskontrolle von *Clostridium (C.) perfringens* Typ B- und Typ C-haltigen Impfstoffen sind im Europäischen Arzneibuch (EAB; Monographie 363) Tierversuche vorgeschrieben. Als Kriterium für die Wirksamkeit eines Impfstoffes werden die in Kaninchen gegen *C. perfringens*-Betatoxin hervorgerufenen Antikörper (Ak) quantitativ in einem Toxinneutralisationstest in der Maus bestimmt.

Es wurde untersucht, ob es möglich ist, Ak gegen *C. perfringens*-Betatoxin in Seren immunisierter Kaninchen spezifisch und quantitativ *in vitro* nachzuweisen. Damit könnte künftig der stark belastende Mäuseschutzversuch ersetzt werden.

Nach verschiedenen Ansätzen, diese Ak mittels eines Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) zu detektieren, wurde ein Capture-ELISA entwickelt, bei dem ein monoklonaler Antikörper (mAk) gegen Betatoxin als Fänger eingesetzt wird. Ein für diese Untersuchungen erforderliches Referenzserum vom Kaninchen wurde hergestellt und lyophilisiert. Dieses Serum kann künftig für Ringversuche zur Verfügung gestellt werden.

Durch den Vergleich von Prüf- und Referenzserum im Capture-ELISA können Ak gegen *C. perfringens*-Betatoxin quantitativ bestimmt werden. Die Berechnung der Wertigkeit der Prüfseren erfolgte mit einem von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Verfügung gestellten Computerprogramm.

In Seren von Kaninchen, die mit Antigenen anderer Clostridienspezies immunisiert waren, konnten keine kreuzreagierenden oder unspezifisch bindenden Antikörper beobachtet werden. Hinsichtlich seiner Reproduzierbarkeit erbrachte der ELISA, in Abhängigkeit von der Serumverdünnung, einen Intra-Assay-Variationskoeffizienten von unter 10 % und einen Inter-Assay-Variationskoeffizienten von 12–25 %.

Ein Vergleich der Antitoxintiter von 4 Kaninchenseren, gemessen im Tierversuch und im ELISA, ergab eine Korrelation von $r = 0,81$ bzw. $0,84$ (für Berechnungen am Mittelwert und am Median). Die durchgeführten

Untersuchungen stellen die Grundlage für weitere Korrelationsstudien zwischen *in vivo* und *in vitro* Modell dar. Sofern sich die Ergebnisse in Ringversuchen mit weiteren Seren bestätigen lassen, ist ein Ersatz des Tierversuches durch eine serologische Methode denkbar.

Summary: An *in vitro* alternative to the mouse neutralisation assay for potency testing of betatoxoid containing *Clostridium perfringens* type B and type C vaccines for veterinary use.

The quality control of *Clostridium (C.) perfringens* type B and type C vaccines requires animal experiments according to European Pharmacopoeia monograph 363. For potency estimation, the vaccine is first administered to rabbits. In a second step antibodies from these rabbits against *C. perfringens* betatoxin are measured quantitatively in a mouse neutralization assay using lethal doses of betatoxin for the challenge.

We report about the development of an *in vitro* assay enabling specific and reproducible measurement of antibodies against *C. perfringens* betatoxin in rabbit sera.

A Capture-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) using a monoclonal antibody against betatoxin as catching antibody was used. A rabbit serumpool freeze dried in 3500 aliquots was always used as reference. This reference serum can be supplied for further national or international collaborative studies.

The estimation of relative potency of unknown sera in a parallel line assay was calculated with a computer programme provided by the World Health Organization (WHO).

The capture-ELISA did not show unspecific reactivity with prevaccination sera or crossreactivity with sera from rabbits immunized with other clostridial antigens e.g. *C. perfringens* type D, *C. chauvoei* or *C. tetani*. Reproducibility studies focused on the linear parts of the dose-response curves resulted in intra-assay coefficient of variations of less than 10 %. The inter-assay coef-

ficient varied between 12–25% depending on the serum dilutions used.

Correlation studies between the result of the animal experiment (only one test) and the capture-ELISA (10 repetitions) from four rabbit serum pools revealed a coefficient of correlation of 0.81–0.84 depending on the basis for calculation of r (Mean or Median from ELISA repetitions). Therefore this test may be a suitable alter-

native for the currently required mouse neutralization assay.

For acceptance of this test by the European Pharmacopoeia further validation studies are necessary.

Keywords: *C. perfringens*, vaccines, quality control, alternative, capture-ELISA

1 Einleitung

Das von *Clostridium* (*C.*) *perfringens* Typ B und Typ C gebildete Betatoxin spielt eine essentielle Rolle in der Ätiologie der nekrotisierenden Enteritis der Saugferkel bzw. der *C. perfringens* Typ C-Enterotoxämie (Struck) der Schafe (Sakurai und Duncan, 1978; Smith und Williams, 1984; Köhler, 1987 und Niilo, 1987).

Bei Saugferkeln wurde nachgewiesen, daß das Betatoxin toxisch auf Dünndarmepithelien wirkt und nach dem Übertritt in die Blutbahn rasch zum Tod führt (Niilo, 1980 und Johannsen et al., 1986).

Um beim Impfling schützende Antikörper zu induzieren, enthalten Impfstoffe, die vorbeugend gegen diese Erkrankung eingesetzt werden, Betatoxin in inaktivierter Form (Toxoid).

Für jede neue Impfstoffcharge muß der Hersteller die Wirksamkeit seines Produkts nachweisen. Für die Prüfung der Wirksamkeit des Betatoxoids ist im Europäischen Arzneibuch (EAB, Monographie 363) ein Schutzversuch mit Mäusen vorgeschrieben (Abb. 1). Hierbei werden die durch den Prüfmimpfstoff in Kaninchen induzierten Antikörper (Antitoxine) in einem Toxinneutralisationstest mit Mäusen quantitativ bestimmt.

Zunächst werden 10 Kaninchen im Abstand von 21–28 Tagen zweimal mit der für das Zieltier (Schwein oder Schaf) vorgesehenen Dosis des betatoxoidhaltigen Impfstoffs immunisiert. Mit dem Serum dieser Tiere, das 10–14 Tage nach der zweiten Immunisierung gewonnen wird und welches Antikörper gegen *C. perfringens*-Toxine enthält, werden Schutzversuche an Mäusen durchgeführt.

Hierfür werden unterschiedliche Verdünnungen von Prüfserum (Serumpool der 10 immunisierten Kaninchen) und Referenzserum (Internationales Standardserum vom Pferd gegen *C. perfringens*-Betatoxin) jeweils mit letalen Dosen von *C. perfringens*-Betatoxin gemischt und

anschließend Mäusen intraperitoneal oder intravenös injiziert. Durch den Vergleich der Sterberaten von Referenz- und Prüfserumgruppen läßt sich, aufgrund der für das Referenzserum bekannten Wirksamkeit (5000 internationale Einheiten/ml bzw. 68,5 mg Trockensubstanz), die

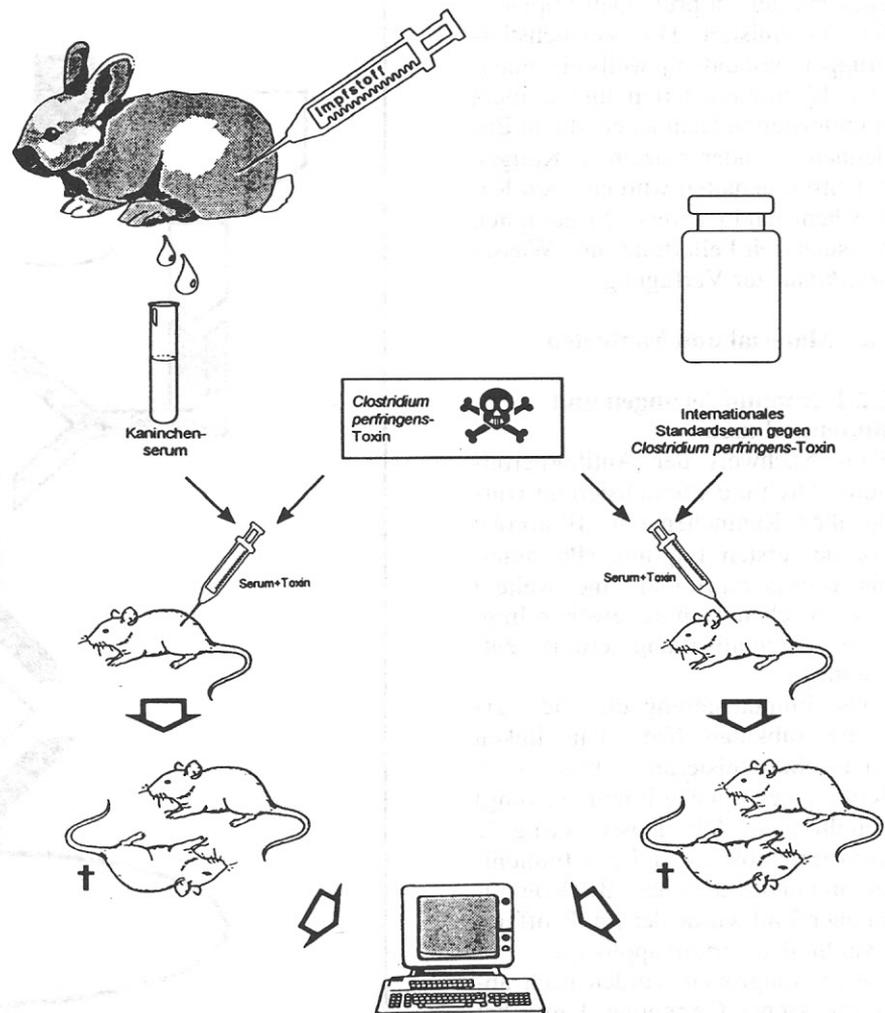


Abbildung 1: Schematische Darstellung des nach EAB vorgeschriebenen Tierversuches, der im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung von betatoxoidhaltigen *Clostridium perfringens*-Impfstoffen durchgeführt wird

Wertigkeit des Prüfserums berechnen.

Ziel der Untersuchungen war es, einen *in vitro* Test für den Nachweis von Antikörpern gegen *C. perfringens*-Betatoxin in Kaninchenseren zu entwickeln und dessen Eignung als Ersatzmethode für den Mäuse-neutralisationstest zu überprüfen.

2 Versuchstiere, Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Spezifisch pathogenfreie (SPF)-Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer mit einem Körpergewicht von etwa 1800 g wurden nach der Vorschrift des Europäischen Arzneibuches mit den zu prüfenden Impfstoffen immunisiert. Die Versuchstiergruppen bestanden jeweils aus maximal 10 immunisierten und 2 nicht immunisierten Kaninchen, die in Bodenhaltung oder einzeln in Käfigen auf Stroh gehalten wurden. Den Kaninchen stand während der gesamten Versuchszeit Pelletfutter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Immunisierungen und Blutentnahmen

Zum Nachweis der Antikörperbildung durch die Immunisierung wurde allen Kaninchen eine Blutprobe vor der ersten Impfung (Präimmunisierungsserum) und eine weitere zwei Wochen nach der zweiten Impfung (Immunisierungsserum) entnommen.

Die Immunisierung der Tiere erfolgte subkutan über dem linken (erste Immunisierung) bzw. über dem rechten (zweite Immunisierung) Schulterblatt. Die Dosis betrug je nach Impfstoff 2–5 ml pro Immunisierung und Kaninchen. Bei Volumina über 2 ml wurde der Impfstoff auf zwei Stellen verteilt appliziert.

Alle Blutproben wurden nach abgeschlossener Gerinnung 4 min bei 4000 × g zentrifugiert, das Serum vom Blutkuchen abpipettiert, aliquotiert und bei –80°C tiefgefroren.

Bei den verwendeten Impfantigenen handelte es sich ausschließlich um in Deutschland zugelassene inaktivierte Impfstoffe, die unter anderem die in der Legende von Abb. 3 aufgeführten Antigene enthielten.

2.2.2 Herstellung von Referenzserum

Zur Herstellung eines Referenzserums wurden Immunisierungsseren gepoolt und über einen SFCA-Filter der Porengröße 0,22 µm (Fa. Nalgene) sterilfiltriert. Das Serumgemisch

wurde in definierter Menge steril in Rollrandflaschen abgefüllt, 24 h gefriergetrocknet und nach Substitution des in den Flaschen vorhandenen Vakuums durch reinen Stickstoff mit Gummistopfen verschlossen.

Die Kaninchen waren zuvor nach dem bereits beschriebenen Schema mit einem β-toxoid- und/oder ε-toxoidhaltigen (gebildet von *C. perfringens* Typ B und/oder Typ D) Präparat immunisiert worden. Das Referenzserum erhielt die Bezeichnung „aBetaEps1a“.

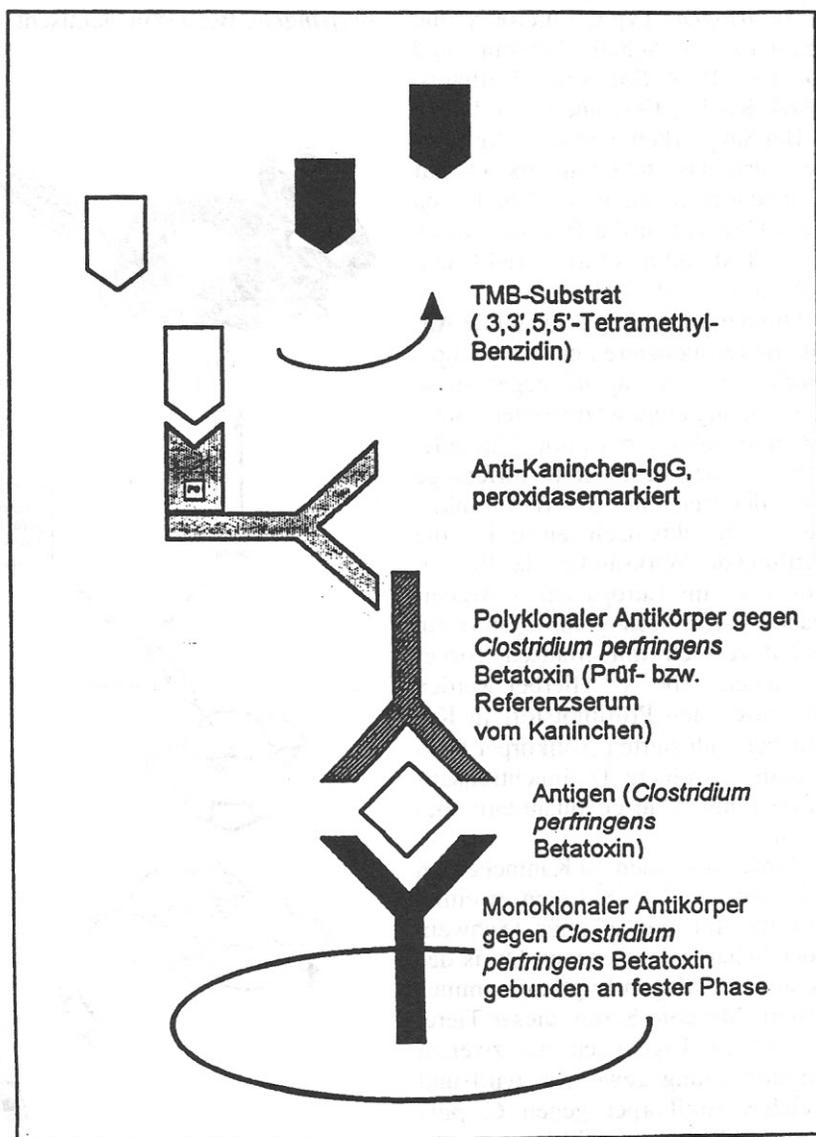


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Capture-ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *Clostridium perfringens*-Betatoxin in Kaninchenseren

2.2.3 ELISA

Das Prinzip des Capture-ELISA ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten (NUNC, Maxisorb plus, U-Form) erfolgte mit 0,19 µg/ml des monoklonalen Antikörpers (mAk) in Carbonatpuffer (pH 9,6). Der mAk gegen *C. perfringens*-Betatoxin wurde uns freundlicherweise von Dr. P. Hauer (National Veterinary Service Laboratory, Ames, Iowa, USA) zur Verfügung gestellt. Er wurde vor Verwendung über Protein G-Superose (Pharmacia, D-Freiburg) nach den Vorgaben des Herstellers gereinigt.

Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die restlichen freien Bindungsstellen in den Kavitäten mit 5% Magermilchpulver (DIFCO, Best. Nr. 0032-17-3) in phosphatgepuffertem Kochsalzlösung (PBS) für 2 h bei 37°C blockiert. Danach wurde 1 h bei 37°C mit einem Brückenantigen in einer Konzentration von 10 µg/ml in Blockierungspuffer inkubiert. Das Betatoxin-Brückenantigen (filtrierter *C. perfringens* Typ C Bakterienkulturüberstand) wurde von Dr. Frauke Roth (Institut für Tropentierhygiene, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. Das Toxinfiltrat wurde aus dem Überstand einer 3 l-Fermenterkultur des Stammes *C. perfringens* Typ C (NCTC 3180) hergestellt und mit einem 20 kDa Filter auf 1 l aufkonzentriert. Die Lagerung der aliquotierten Filtrate erfolgte bei -80°C.

Anschließend wurden die zu prüfenden Kaninchenserum in log₂- bzw. log₃-Verdünnungsstufen in 5% Magermilch/PBS für 60 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Nachweis der am Brückenantigen gebundenen Kaninchenantikörper erfolgte mittels peroxidasemarkierten anti-Kaninchen-Immunglobulinen ([anti-Kaninchen IgG (H+L)] DIANOVA, Hamburg). Die Inkubation dauerte 45 min bei 37°C. Als Peroxidase-Substrat kam 3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidin (TMB) zur Anwendung. Für die Substratlösung wurden 6 mg TMB in 1 ml Ethanol gelöst, davon 167 µl mit 9

ml *aqua destillata*, 1 ml Natriumacetatpuffer (pH 5,5) und 2 µl H₂O₂ vermischt. Nach Zugabe des Substrates wurden die Platten 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der Substratumsatz wurde durch die Zugabe von 1N Schwefelsäure gestoppt und bei einer Wellenlänge von 450 nm quantitativ erfaßt, wobei grundsätzlich die bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessene Extinktion subtrahiert wurde. Die Reaktionsbedingungen waren insgesamt so gewählt, daß bei Auftrag der ersten Verdünnungsstufe der Testseren (1:64) eine Absorption von 1,4-1,6 erreicht wurde.

Zwischen den einzelnen Schritten, mit Ausnahme vor der Zugabe der Stopplösung, wurden die Mikrotiterplatten dreimal mit 0,05% Tween 20/PBS (250 µl/Kavität) mittels eines Waschautomaten gewaschen. Mit Ausnahme der Blockierlösung (200 µl/Kavität) und der Stopplösung (50 µl/Kavität) wurden während des Tests immer 100 µl der jeweiligen Substanz in die Vertiefungen einpipettiert.

Auf jeder Mikrotiterplatte wurde neben dem Prüfserum (Dreifachbestimmung) das Referenzserum der Charge aBetaEps1a in Doppelbestimmung titriert. Zur Kontrolle des Testsystems wurde auf jeder Platte in der letzten Spalte statt des jeweiligen Kaninchensersums nur 5% Magermilchpulver in PBS einpipettiert.

Um zu untersuchen, ob mit dem Capture-ELISA nur Antikörper gegen Betatoxin nachgewiesen werden (Spezifität), wurden in einer Versuchsreihe auch Seren von Kaninchen getestet, die mit nicht betatoxoidhaltigen Impfstoffen immunisiert waren.

2.2.4 Berechnung und Bewertung der im Capture-ELISA nachgewiesenen Antikörpertiter

Die Berechnung der Wertigkeit des Prüfserums wurde mit einem von der World Health Organization (WHO) empfohlenen Auswerteprogramm (*Parallel line assay*, F.R. Marsman, RIVM, NL-Bilthoven, Version 94-1) durchgeführt.

Zur Berechnung wurden alle (jedoch mindestens drei) im linearen Bereich der Dosis-Wirkungskurven von Referenz- und Prüfserum liegenden Meßwerte herangezogen. Jedes Prüfserum wurde immer gegen das auf der gleichen Mikrotiterplatte mitgeführte Referenzserum aBetaEps1a berechnet.

Das Auswerteprogramm prüfte die für jedes Serum ermittelten Daten auf Linearität der Dosis-Wirkungsbeziehung. Zudem wurden die für Referenz- und Prüfserum erstellten Regressionsgeraden auf ihre Parallelität zueinander getestet. Unzureichende Linearität und Parallelität wurden von dem Programm erkannt und erlaubten dann keine Berechnung. Die Wertigkeit des Prüfserums wurde von dem Programm über den Abstand der errechneten Regressionsgerade zu der des Referenzserums in X-Achsenrichtung ermittelt.

Für Vergleichsstudien zwischen Tierversuch und ELISA wurden 4 Kaninchenserpools von einem Impfstoffhersteller zur Verfügung gestellt, deren Wertigkeit im Tierversuch gemäß EAB bekannt war.

Für die Berechnungen wurde dem Referenzserum aBetaEps1a eine fiktive Wirksamkeit von 100 Units pro Milliliter [U/ml] zugeordnet.

3 Ergebnisse

3.1 Spezifität des Capture-ELISA

Aus der Abb. 3 ist ersichtlich, daß im Capture-ELISA nur Antikörper in Kaninchenserum nachgewiesen werden, wenn das entsprechende Versuchstier zuvor mit einem *C. perfringens*-β-toxoidhaltigen Impfstoff immunisiert wurde. Seren von Kaninchen, die mit *C. perfringens*-ε-toxoidhaltigem Impfstoff, tetanustoxoidhaltigem (*C. tetani*) Impfstoff oder mit einem Impfstoff gegen Rauschbrand (*C. chauvoei*) immunisiert wurden, rufen auch in hohen Konzentrationen keine positive Reaktion im ELISA hervor. Im weiteren konnten in allen Präimmunisierungsseren einheitlich keine Antikörper gegen Betatoxin nachgewiesen werden.

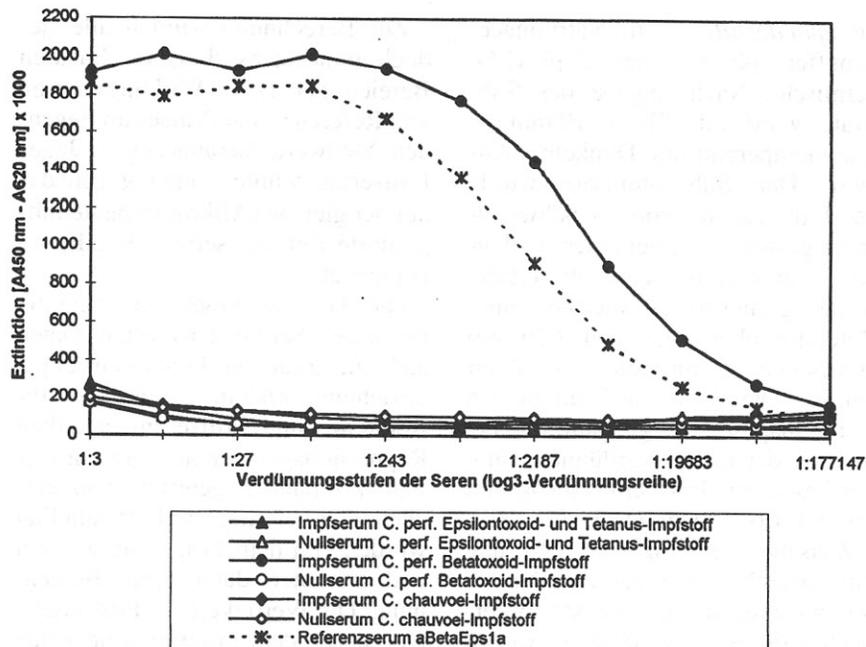


Abbildung 3: Ermittlung der Spezifität des Capture-ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *Clostridium perfringens*-Betatoxin durch Untersuchung von Seren unterschiedlich immunisierter Kaninchen

3.2 Reproduzierbarkeit des Capture-ELISA

Um festzustellen, wie reproduzierbar die ELISA-Untersuchungen sind, wurden der Intra-Assay-Variationskoeffizient (Vk) und der Inter-Assay-Vk berechnet.

Zusätzlich wurden einzelne Testseren auf unterschiedlichen Mikrotiterplatten an verschiedenen Tagen untersucht, ihre Wertigkeit mehrmals bestimmt und die errechneten Ergebnisse miteinander verglichen.

Zur Ermittlung des Inter-Assay-Vk wurden die Ergebnisse aus 32 Testplatten bei jeweiliger Vierfachbestimmung des aBetaEps1a-Referenzserums herangezogen, wobei sich die Vk je nach Serumverdünnung zwischen 12 und 25 % bewegen.

Der Intra-Assay-Vk wurde ebenfalls anhand von Wiederholungsbestimmungen des Referenzserums berechnet und ergab bei einer Vierfachbestimmung auf einer Platte (Tab. 1) einen Wert von unter 10%.

Die Werte wurden lediglich für Referenzserumverdünnungen zwischen 1:512 und 1:4096 ermittelt, da nur diese den linearen Teil der Do-

sis-Wirkungskurve bildenden Verdünnungen für weitere Berechnungen herangezogen wurden.

3.3 Vergleich der Wirksamkeit von Impfstoffen im Tierversuch und im ELISA

4 Impfstoffchargen gegen *C. perfringens* Typ C wurden entsprechend EAB-Vorschrift an Kaninchen verabreicht, das von ihnen gewonnene Serum gepoolt und anschließend im

Mäuseneutralisationstest vom Hersteller untersucht und bewertet.

Dieselben Kaninchenserumpools wurden im Rahmen dieser Arbeit, wie bereits beschrieben, im Capture-ELISA untersucht und bewertet. Die Bewertung im ELISA wurde für jedes Serum zehnmal wiederholt.

Die Ergebnisse aus Tierversuch und ELISA sind nicht direkt miteinander vergleichbar, da die ELISA-Berechnungen auf einer zunächst hypothetisch festgelegten Wertigkeit des Referenzserums von 100 U/ml beruhen. Eine Angabe über die tatsächliche Wertigkeit des eigens hergestellten Referenzserums aBetaEps1a kann nicht gemacht werden, da dieses bislang nicht im Mäuseneutralisationstest untersucht wurde.

Um die Ergebnisse der Untersuchungen der Seren mit beiden Methoden dennoch vergleichen zu können, wurden den Seren, die im Tierversuch und im ELISA getestet wurden, Rangfolgen zugeteilt, die in Tab. 2 und in der daraus folgenden Abb. 4 direkt miteinander vergleichbar sind.

Aus Tab. 2 und Abb. 4 geht hervor, daß die Rangfolge der Kaninchenserum sowohl im Tierversuch als auch im Capture-ELISA, gemessen am Mittelwert der Berechnungen, die gleiche ist. Verwendet man jedoch den Median zur Vergabe der Ränge, vertauschen die ersten beiden Seren ihre Rangfolgen, und die Ergebnisse aus dem Tierversuch sind

Tabelle 1: Reproduzierbarkeit des Capture-ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *Clostridium perfringens*-Betatoxin

| Intra-Assay- Variationskoeffizient für Vierfachbestimmung pro Mikrotiterplatte | | Inter-Assay- Variationskoeffizient für 128 Bestimmungen auf 32 Mikrotiterplatten | |
|---|--|---|----------------------------|
| bei Referenzserumverd.* | Mittelwert der Variationskoeffizienten aus 10 Versuchen in % (minimal-maximal) | bei Referenzserumverd.* | Variationskoeffizient in % |
| 1:512 | 4,37 (1,14–8,66) | 1:512 | 12,10 |
| 1:1024 | 7,00 (1,98–10,73) | 1:1024 | 18,40 |
| 1:2048 | 5,48 (3,10–8,70) | 1:2048 | 20,90 |
| 1:4096 | 6,86 (2,20–20,34) | 1:4096 | 25,00 |

* Es wurden die Serumverdünnungen gewählt, die im linear abfallenden Bereich der Referenzserum-Titrationskurve liegen, da diese für die Berechnung der Prüfsereen verwendet werden

Tabelle 2: Quantitative Bewertung von Antikörpern gegen *C. perfringens*-Betotoxin in Kaninchen-seren: Vergleich Tierversuch / Capture-ELISA

| | Serum 1 | Serum 2 | Serum 3 | Serum 4 |
|---|------------|------------|------------|------------|
| Mittelwert im ELISA: | 822 U/ml | 813 U/ml | 799 U/ml | 609 U/ml |
| Median im ELISA: | 739,5 U/ml | 767,5 U/ml | 698,5 U/ml | 595,5 U/ml |
| Variationskoeffizient (von 10 Wiederholungsbestimmungen im ELISA) | 42,9 % | 18,3 % | 27,2 % | 20,4 % |
| Anzahl von Bestimmungen mit max. $\pm 10\%$ zum Median | 5 | 6 | 6 | 4 |
| Anzahl von Bestimmungen mit max. $\pm 20\%$ zum Median | 6 | 8 | 8 | 7 |
| Rangfolge nach ELISA Mittelwert | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Wirksamkeit im Tierversuch: | 90 IE/ml | 80 IE/ml | 76,5 IE/ml | 67,5 IE/ml |
| Rangfolge nach Tierversuch | 1 | 2 | 3 | 4 |

Korrelationskoeffizienten: von Ergebnis Tierversuch zu Mittelwert ELISA = 0,84;
von Ergebnis Tierversuch zu Median ELISA = 0,81

nach Rängen nicht mehr identisch mit den Ergebnissen aus dem ELISA.

Der Variationskoeffizient für die wiederholte Berechnung der Wertigkeit einzelner Seren liegt zwischen 18,3% und 42,9%. Für den Tierversuch liegen keine Variationskoeffizienten oder Standardabweichungen

vor, da der Versuch aus Tierschutzgründen nur einmal beim Hersteller durchgeführt wurde.

Die Tatsache, daß 40–60% aller Wiederholungsbestimmungen eines Serums nur maximal 10% bzw. 60–80% maximal 20% vom Median abweichen, zeigt, daß der überwie-

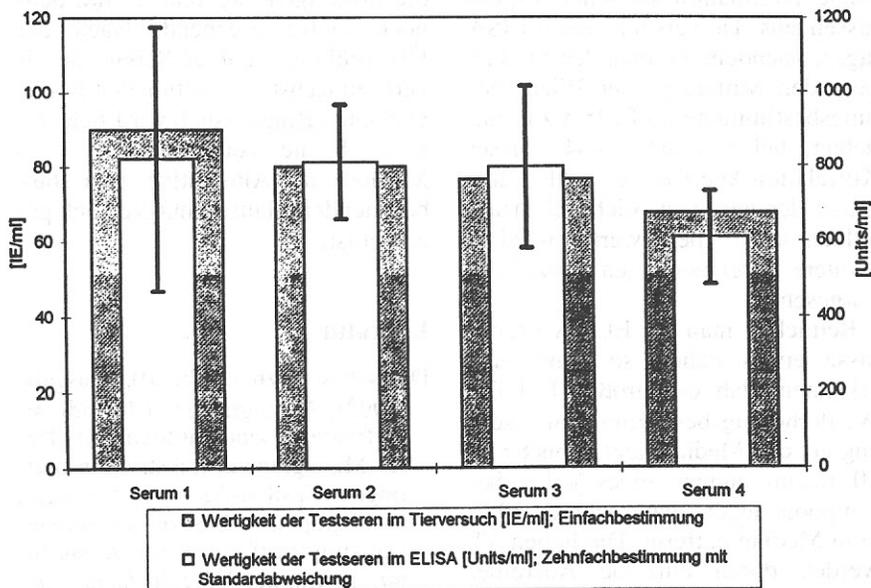


Abbildung 4: Vergleich der ermittelten Wertigkeiten der Kaninchenserenspools im Tierversuch und im Capture-ELISA.

Die nach dem Tierversuch ermittelten Wertigkeiten sind als dunkle Balken dargestellt und werden an der linken Y-Achse in [IE/ml] angegeben. Die hellen Balken stellen die gemittelten Wertigkeiten einer zehnmaligen Bestimmung mit Standardabweichung der gleichen Seren, berechnet über den Capture-ELISA in [U/ml] (rechte Y-Achse) dar

gende Teil der Werte aus den Wiederholungsbestimmungen sehr eng beieinander liegt.

4 Diskussion

Hendriksen et al. (1994) berichten in ihrem ECVAM (*European centre for the validation of alternative methods*) Workshop-Report über unterschiedliche serologische Systeme zur Detektion von Antikörpern gegen *C. perfringens*-Toxine, die sich bis jetzt jedoch unter anderem aufgrund von fehlenden Referenzmaterialien nicht etablieren konnten. Ein Teil unserer Aufgabe bestand in der Herstellung solchen Referenzmaterials. Mit dem in großen Mengen (über 3500 Ampullen) hergestelltem Kaninchen-Referenzserum aBetaEps1a steht ausreichend Material für nationale bzw. internationale Ringversuche zur Verfügung, das gegenüber dem derzeit existierenden internationalen Referenzserum vom Pferd den Vorteil aufweist, daß es von der gleichen Spezies wie die zu untersuchenden Prüfseren stammt. Hierdurch ist auch dann ein direkter Vergleich von Prüf- und Referenzserum in Enzymimmunoassays möglich, wenn mit speziesspezifischen Konjugaten gearbeitet wird. Anfängliche Bemühungen, mit insgesamt 5 uns zur Verfügung gestellten mAk gegen Betotoxin speziesunabhängig arbeitende kompetitive Enzymimmunoassays zu entwickeln, scheiterten daran, daß alle mAk eine sehr hohe Bindungsaffinität zum Betotoxin aufweisen. Eine Verdrängung des mAk von seiner Bindungsstelle durch konkurrierende Antikörper in Kaninchenserum war nur in geringem Umfang möglich (Daten nicht gezeigt).

Auch van der Kamp (1994) beschreibt in ihrem Report „*Ways of replacing, reducing or refining the use of animals in the quality control of veterinary vaccines*“ zum einen die Notwendigkeit, den Mäuseneutralisationstest durch *in vitro* Methoden zu ersetzen, und zum anderen die Problematik der bis jetzt entwick-

kelten serologischen Methoden, die sich durch ihre unzureichende Spezifität nicht durchgesetzt haben.

Ein ELISA ist ein hochempfindliches System für den Nachweis der Bindung von Antikörpern an ein Antigen. Diese hohe Sensitivität hat jedoch nicht nur Vorteile, sondern birgt auch Gefahren in sich. So kann beispielsweise die Bindung geringster Mengen an unspezifischen Ak zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Die Spezifität des entwickelten Capture-ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *C. perfringens*-Betatoxin konnte nachgewiesen werden. Sowohl Präimmunisierungsseren als auch Immunisierungsseren von Kaninchen, die mit anderen Clostridienantigenen als *C. perfringens* Typ B oder Typ C immunisiert wurden, waren selbst bei Einsatz nahezu unverdünnter Seren im ELISA negativ. Diese Untersuchung war besonders wichtig, da nicht bekannt ist, ob das Betatoxin in den verwendeten Kulturüberständen eventuell mit einem oder mehreren weiteren Clostridienantigenen assoziiert ist. Wäre dies der Fall, dann würde der monoklonale Fangantikörper nicht nur Betatoxin, sondern ebenfalls diese anderen Antigene aus der Lösung herausfangen, wodurch dann im nächsten Schritt Kaninchenantikörper auch gegen diese nachgewiesen würden.

Bei Versuchen zur Reproduzierbarkeit des ELISA ergab der über die gemessene Extinktion ermittelte Vk zwischen den verschiedenen Testplatten (Inter-Assay) Werte zwischen 12 und 25%. Der Vk einer Mehrfachbestimmung auf einer Platte (Intra-Assay) liegt mit 4-7% jedoch deutlich darunter.

Die relativ hohen Vk-Werte im Inter-Assay zeigen, daß zur sicheren quantitativen Bestimmung auf jeder Testplatte das Referenzserum mitgeführt werden sollte, um mögliche Inter-Assay Schwankungen auszugleichen.

Für immunochemische Methoden sind in Anbetracht der ohnehin sehr hohen biologischen Streuung Schwankungsbreiten im Intra-Assay,

nach dem Kommentar zum Kapitel Immunochemische Methoden im Deutschen Arzneibuch, 10. Ausgabe (DAB 10), von bis zu 10% durchaus vertretbar. Tijssen (1988) ist der Auffassung, daß im Intra-Assay ein Vk bis 10 % und das zwei- bis dreifache davon für den Inter-Assay-Vk noch als akzeptabel angesehen werden können.

Bei einem Vergleich der Wertigkeitsränge, die nach den Mittelwerten der untersuchten Kaninchenserumpools im ELISA und den im Tierversuch nach EAB (Monographie 363) ermittelt wurden, konnte über beide Methoden die gleiche Rangfolge vergeben werden. Dies trifft allerdings für die Rangvergabe nach den Medianwerten im ELISA nicht mehr ganz zu, da sich in diesem Fall die Rangfolge der ersten beiden Seren vertauscht. Der Umstand, daß die 4 untersuchten Seren hinsichtlich ihrer Wirksamkeit im Tierversuch sehr eng beieinander liegen (67,5-90 IE/ml), unterstreicht die Leistungsfähigkeit des ELISA, da mit ihm auch diese geringen Wertigkeitsunterschiede noch weitestgehend nachvollziehbar sind.

Die Korrelation zwischen Ergebnissen aus Tierversuch und ELISA lag, je nachdem, ob man den Median oder den Mittelwert der Wiederholungsbestimmung im ELISA zugrundelegt, bei $r = 0,81-0,84$. Dieser Korrelationskoeffizient sollte aufgrund der geringen Stichprobenzahl jedoch nicht überbewertet werden. Weitere Untersuchungen hierzu sind vorgesehen.

Betrachtet man die ELISA Ergebnisse etwas näher, so kann man erkennen, daß der größte Teil der Wiederholungsbestimmungen sehr eng um den Median liegt. 6 bis 8 von 10 Bestimmungen eines jeden Serumpools liegen nicht mehr als 20 % vom Median entfernt. Die hohen Vk werden durch einzelne Ausreißer hervorgerufen. Um künftig diese bei Mehrfachbestimmung einzeln auftretenden Ausreißer nicht mit in die Gesamtbewertung eines Serums eingehen zu lassen, könnte man, eine ausreichende Anzahl von Wiederho-

lungsbestimmungen vorausgesetzt, statt des Mittelwertes den Median berechnen. Der Median wird im Gegensatz zum Mittelwert von vereinzelt auftretenden sehr hohen oder sehr niedrigen Bestimmungen nicht beeinflusst.

In der vorgestellten Untersuchung wurden nur Kaninchenserumpools überprüft, da die Wertigkeitsbestimmung von Kaninchen einzeln im Mäusenutralisationstest vor allem aus ethischen, aber auch aus ökonomischen Gründen nicht vertretbar ist. Der ELISA könnte jedoch in Zukunft auch zur Bestimmung von Einzelseren verwendet werden. Sollte sich dabei herausstellen, daß ein einheitlich immunisiertes Kollektiv von 10 Kaninchen keine großen Schwankungen im Titer aufweist, könnte auch die Anzahl der Kaninchen für diese Prüfung reduziert werden, ohne daß diese wesentlich an Aussagekraft verliert.

Die Anzahl der parallel im Tierversuch und im ELISA bewerteten Seren ist zwar noch zu gering, um die vorgestellte Methode hinsichtlich ihrer Eignung als Ersatzmethode abschließend bewerten zu können, aber die bisherigen Ergebnisse sind dennoch vielversprechend. Nach der Überprüfung weiterer Seren und einem zunächst auf nationaler Ebene geplanten Ringversuch wird sich zeigen, ob die vorgestellte *in vitro* Methode als Alternative zum stark belastenden Mäuseschutzversuch geeignet ist.

Literatur

- Deutsches Arzneibuch, 10. Ausgabe (1992). Monographie: Clostridium-perfringens-Beta-Antitoxin für Tiere. Monographie: Clostridium-perfringens-Epsilon-Antitoxin für Tiere. Monographie: Clostridium-perfringens-Impfstoff für Tiere. *Kommentar: zu Kapitel V.2.1.10 Immunochemische Methoden*. Stuttgart: Deutscher Apothekerverlag.
- Hendriksen, C. F. M., Garthoff, B., Aggerbeck, H., Bruckner, L., Castle, P., Cußler, K., Dobbelaer, R., Donk, H. van de, Gun, J. van der, Lefran-

- cois, S., Milstien, J., Minor, P. D., Mougéot, H., Rombout, B., Ronneberger, H. D., Spieser, J.-M., Stolp, R., Straughan, D. W., Tollis, M. und Zigtermans, C. (1994). Alternatives to Animal Testing in the Quality Control of Immunobiologicals: Current Status and Future Prospects. *ATLA* 22, 420–434.
- Johannsen, U., Erwerth, W., Kunz, G. und Köhler, B. (1986). Untersuchungen zur Clostridium perfringens-Typ-C-Enterotoxämie (nekrotisierende Enteritis) der Saugferkel 2. Mitteilung: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Pathologie und Pathogenese der experimentellen Clostridium perfringens-Typ-C-Toxinvergiftung. *Arch. exper. Vet. med.* 40, 881–894.
- Kamp, M. D. O. van der (1994). *Ways of replacing, reducing or refining the use of animals in the quality control of veterinary vaccines*. Lelystad (Netherlands): Drukkerij de Boer.
- Köhler, B. (1987). Klostridien-Infektionen und -Intoxikationen. In J. Beer (Hrsg.), *Infektionskrankheiten der Tiere* (693–726). Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Niilo, L. (1980). Clostridium perfringens in animal disease: A review of current knowledge. *Can. Vet. J.* 21, 141–148.
- Niilo, L. (1987). Toxigenic Characteristics of Clostridium perfringens Type C in Enterotoxemia of Domestic Animals. *Can. J. Vet. Res.* 51, 224–228.
- Sakurai, J. und Duncan, C. L. (1978). Some properties of beta-toxin produced by Clostridium perfringens type C. *Infect. Immun.* 21, 678–680.
- Smith, L. und Williams, B. L. (1984). *The pathogenic anaerobic bacteria*. 3rd. ed. (101–136). Springfield IL, USA: Charles C. Thomas.
- Tijssen, P. (1988). *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology; Practice and theory of enzyme immunoassays*, Vol. 15. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Science Publishers B.V.

Danksagung

Die Arbeiten wurden mit Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie durchgeführt (BMBF 0310622).

Korrespondenzadresse

Dipl. Biol. Elvira Ebert
Paul-Ehrlich-Institut
Paul-Ehrlich-Straße 51-59
D-63225 Langen

Pharmakokinetik-Simulationen für den Unterricht

Die Gruppe Biopharmazie an der ETH Zürich hat ein neues Pharmakokinetik-Lehrprogramm entwickelt: PharmaSim (s. *ALTEX* 12,3 S. 152–155).

Es simuliert Plasmaspiegelkurven basierend auf Kompartiment-Modellen. Das wirklich Neue an PharmaSim ist, daß die Kurven sehr leicht erzeugt werden können und daß sie extrem schnell angezeigt werden. Studierende können die Kurven-Parameter einzeln verändern und gleich zuschauen, wie sich die Kurve verändert. Die Verzögerungszeit beim Neuberechnen und Neuzeichnen beträgt beispielsweise auf einem Mac Quadra 650 etwa 0.08 sec. So können die Einflüsse der einzelnen

Parameter auf die Verlaufsform der Kurven eindrucklich illustriert werden.

Die Simulationen sind eingebettet in HyperCard-ähnlichen elektronischen Büchern. Die Inhalte der Seiten – Texte und Bilder – sowie die Voreinstellungen zu den Simulationen werden in Textform in Script-Dateien gespeichert. Dadurch können mit PharmaSim leicht neue Übungen erstellt oder bestehende Tutorials abgeändert werden.

PharmaSim Merkmale

- Ein- und Zwei-Kompartimentmodelle
- i.v. Bolus, i.v. Infusion und extravasale Verabreichung
- lineare und halblogarithmische Darstellung der Kurven
- sehr schnelle Simulationen
- Mehrfachdosierungen
- komplexe Dosierungsschemata: Initial- und Erhaltungsdosis, vergessene Dosis, Änderung von Parametern während der Behandlungszeit
- Texte, Bilder und Simulations-Einstellungen sind in editierbaren Scripts gespeichert
- benutzerdefinierbare Namen für die Parameter
- ausführliche Tutorials mit über 20 Simulationen, mehrere Script-Beispiele
- Vorgesehen für Sommer 96: eine PowerPC native Version und eine Version für MS-Windows

Das Programm ist gratis erhältlich und frei verteilbar. Systemanforderungen: Apple Macintosh mit System 7 und mind. 12"-Bildschirm. Für mehr Information kontaktieren Sie bitte die unten angegebene Adresse.

Pharmacokinetic Simulations for Teaching

The Biopharmacy group at the ETH Zurich has developed a new computer simulation program for teaching pharmacokinetics: PharmaSim (*ALTEX* 12,3 p.152–155).

It is focused on the simulation of drug plasma levels based on compartment models. The novel features of PharmaSim are the easy visualization of curves and the high speed of the simulations. Students can change the value of a parameter with a scroll bar. The resulting change in the display of the curves is almost immediate (delay time < 0.1 sec.). This allows to visualize the effects of one parameter in a formula, a concept which was hard to illustrate so far.

The simulations are embedded in a HyperCard-like electronic book. The contents of the tutorial pages – texts and graphics – as well as the preset values for the simulations can be saved in script files. This makes PharmaSim a tool which lets you easily create many different tutorials.

PharmaSim features:

- one- and two-compartment models
- i.v. bolus, i.v. infusion, and extravasal administration
- linear and half-log plots
- very fast simulations
- multiple doses
- complex dosing schemes: loading & maintenance dose, missing dose, or change of parameters during treatment.
- fully scriptable
- custom definition of parameter names
- extensive tutorials with more than 20 simulations, good script samples
- a PowerPC native version and a version for Windows are in the pipeline (planned for summer 96)

The program is available free of charge. System requirements: Apple Macintosh with System 7 and min. 12" screen. For more information please contact:

Daniel Keller
ETH Biopharmazie
Winterthurerstr. 190
8057 Zürich
Switzerland

Tel: +41-1-257 60 35 / 60 41
Fax: +41-1-262 52 23
e-mail: keller@pharma.ethz.ch