



# Tierversuche in Arzneibuchmonographien

## Aktueller Stand und Möglichkeiten zur Verbesserung

Ute Hechler und Klaus Cußler

Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung Veterinärmedizin, D-Langen

### Zusammenfassung

*Das Deutsche Arzneibuch enthält eine Vielzahl von Tierversuchen, die zur Prüfung von Impfstoffen und Immunsereen vorgeschrieben sind. Häufig werden relativ große Tierzahlen verlangt. Insbesondere die Infektionsversuche bei Wirksamkeitsbestimmungen bedeuten extreme Belastungen bei den eingesetzten Tieren. Die meisten dieser Prüfmethoden erscheinen unter Tierschutzaspekten verbesserungswürdig.*

*In der vorliegenden Untersuchung wird aufgezeigt, daß allein durch eine Angleichung von bestehenden Prüfbestimmungen, die in verschiedenen Monographien trotz ähnlicher Zielsetzung unterschiedlich formuliert sind, deutliche Verbesserungen möglich sind. Bei Unschädlichkeits- und Wirksamkeitsprüfungen, die z.T. stark variierende Tierzahlen fordern, ist ein erheblicher Einspareffekt zu erzielen.*

*Summary: Animal tests in pharmacopoeia monographs. Current state and possibilities for improvements.*

*The German pharmacopoeia contains many monographs on sera and vaccines which require animal tests. Large numbers of animals are used and very often suffering is extreme. Considering animal welfare many of these animal tests may be improved.*

*This study gives examples that the number of animals might be reduced and the test systems refined only by harmonization of existing requirements which use different animal numbers or experimental design for comparable procedures.*

*Keywords: Pharmacopoeia, animal welfare, reduction/refinement of animal tests*

### Einleitung

Immunologische Arzneimittel (IAM), worunter man Impfstoffe, Immunsereen und Tuberkuline versteht, müssen aufgrund unvermeidbarer biologischer Schwankungen während des Herstellungsprozesses einer ausführlichen Qualitätskontrolle unterzogen werden. Entsprechende Prüfungen erfolgen beim Hersteller für jede Charge schon während der Produktion (sogenannte Inprozeß-Kontrollen) und vor allem am Endprodukt. Im Rahmen der staatlichen Chargenprüfung kann die Kon-

trollbehörde die materiellen Untersuchungen am Endprodukt nochmals nachvollziehen. Festlegungen über den notwendigen Prüfungsumfang für die einzelnen Präparate finden sich im Deutschen Arzneibuch (DAB). Die Monographien enthalten Anweisungen, wie die Qualitätsmerkmale von IAM zu prüfen sind. Hierzu werden Tierversuche in erheblichen Umfang gefordert. Durch die Arzneibuch-Verordnung ist die Durchführung dieser Tierversuche sowohl für den Hersteller als auch für die im Bedarfsfall den Test wiederholende Kontrollbehörde bin-

dend. Weitergehende Prüfungsbestimmungen können im Rahmen der Zulassung eines Produktes festgelegt werden.

Die derzeit gültige 10. Ausgabe des DAB (DAB 10) beinhaltet 38 Einzelmonographien für IAM. Zusätzlich gibt es noch jeweils eine Allgemeine Monographie für Impfstoffe bzw. Immunsereen. Diese kommen dann zur Anwendung, wenn für ein Produkt noch keine spezielle Monographie existiert. Schließlich finden sich im Abschnitt „Allgemeine Methoden“ des DAB 10 weitere Prüfungsvorschriften, auf deren Anwendung in den Einzelmonographien verwiesen wird.

Eine genaue Aussage über den Tierverbrauch für die Entwicklung und Prüfung von Immunpräparaten ist bisher nicht möglich. Schätzungen gehen jedoch davon aus, daß bis zu 20% aller Tierversuche in diesem Bereich vorgenommen werden (Hendriksen, 1988; Cußler, 1993).

In einer Untersuchung zur Notwendigkeit von Tierversuchen bei der Prüfung von Immunpräparaten sollen alle derartige Tierversuche einer kritischen Prüfung bezüglich der 3R unterzogen werden. Im folgenden sollen Verbesserungsvorschläge, die sich allein aus der Gegenüberstellung vergleichbarer Prüfungsanforderungen in verschiedenen Monographien ergeben, vorgestellt werden.

### Methodik

Einige Arzneibuchmonographien enthalten Anforderungen, die nicht produktspezifisch sind und daher an mehreren Stellen bei unterschiedlichen IAM gefordert werden. Dies trifft auch für viele Tierversuche zu.

Die Formulierungen und Durchführungsbestimmungen dieser Prüfungen unterscheiden sich teilweise erheblich. Vergleichbare Anforderungen wurden tabellarisch zusammengestellt, um diese Widersprüche aufzuzeigen.

## Ergebnisse und Diskussion

Impfstoffmonographien werden normalerweise nur isoliert, eben für die Beurteilung eines bestimmten Präparates, gelesen. Unstimmigkeiten zwischen verschiedenen Monographien können daher leicht übersehen werden. Im Rahmen unserer Untersuchung, die eine vergleichende Betrachtung aller Produkte mit sich bringt, fielen diesbezügliche Ungeheimheiten auf. Einige anschauliche Beispiele sollen hier aufgezeigt und tierschutzkonforme Änderungsvorschläge unterbreitet werden.

### 1. Untersuchungen zum Fremd-virusausschluß

Bei der Verabreichung von biologischen Arzneimitteln besteht naturgemäß die Gefahr einer Übertragung

von infektiösen Agenzien. Die Abwesenheit von Bakterien, Pilzen und Mycoplasmen kann relativ leicht über eine Sterilitätsprüfung untersucht werden. Wesentlich schwieriger ist die Untersuchung auf Virus-kontamination. Viren können direkt mittels Zellkultur oder Tierversuch oder bei massiver Kontamination indirekt durch den Antikörpernachweis in Tieren, die mit dem Medikament behandelt wurden, nachgewiesen werden. Für den Antikörpernachweis könnten Tiere aus der Unschädlichkeitsprüfung, die ohnehin immer durchgeführt werden muß, verwendet werden. Bei Impfstoffen gegen die Aujeszky'sche Krankheit wird hierauf hingewiesen. Dieser Zusatz fehlt aber in der Monographie *Newcastle-Krankheit-Impfstoff (inaktiviert)*.

Nur bei neun Säugerimpfstoffen wird ein Fremdvirusausschluß ausdrücklich gefordert. Dabei sind die verlangten Nachweismethoden unterschiedlich (siehe Tabelle 1). Zellkulturen stellen hierbei sicherlich die Methode der Wahl dar. Daneben wird aber auch noch der sogenannte „Babymaus-Test“ verlangt. Hierunter versteht man die intrazerebrale

Injektion von 0,03 ml des zu prüfenden Impfstoffs in Jungmäuse. Diese Injektionstechnik ist sehr belastend. Spontane Todesfälle innerhalb von 24 h oder 48 h in geringem Umfang werden als „methodisch bedingt“ toleriert. Es ist nicht angegeben, welche Viren mit diesem Test erfaßt werden sollen bzw. können. Meist werden (mindestens) 10 Tiere verlangt. Beim Panleukopenie-Lebend-Impfstoff für Katzen sind es jedoch nur 8 Mäuse.

Für Geflügel-Lebend-Impfstoffe ist der Fremdvirusausschluß einheitlich geregelt und im Abschnitt „Allgemeine Methoden der Biologie“ im DAB ausführlich erläutert.

Im Sinne des Tierschutzes wäre zu fordern, daß

1. der Fremdvirusausschluß für Säugerimpfstoffe einheitlich geregelt wird. Dabei sollten *in vitro* Methoden (Zellkulturtechniken, PCR) Priorität haben. Antikörperbestimmungen, möglichst unter Verwendung von Tieren aus der Unschädlichkeitsprüfung, können im Bedarfsfall herangezogen werden.
2. die Prüfung durch den Babymaus-Test gestrichen wird. Die-

Tabelle 1: Vergleich der DAB 10-Vorschriften für den Fremdvirussausschluß

Aujeszky'sche-Krankheit-Lebend-Impfstoff für Schweine zur parenteralen Anwendung (gefriergetrocknet)	Zellkultur und Antikörper-Nachweis; Tiere aus der Unschädlichkeitsprüfung sollen verwendet werden
Infektiöse-Bovine-Rhinotracheitis-Lebend-Impfstoff für Rinder (gefriergetrocknet)	Zellkultur
Tollwut-Lebend-Impfstoff für Fuchse (peroral)	Zellkultur
Panleukopenie-Lebend-Impfstoff für Katzen (gefriergetrocknet)	Zellkultur und Mäuse (8 Tiere)
Klassische Schweinepest-Lebend-Impfstoff (gefriergetrocknet)	Zellkultur und Mäuse (mind. 10 Tiere)
Infektiöse-Hepatitis-Lebend-Impfstoff für Hunde (gefriergetrocknet)	Zellkultur und/oder Mäuse (mind. 10 Tiere) *
Staupe-Lebend-Impfstoff für Frettchen und Nerze (gefriergetrocknet)	Zellkultur und/oder Mäuse (mind. 10 Tiere) *
Staupe-Lebend-Impfstoff für Hunde (gefriergetrocknet)	Zellkultur und/oder Mäuse (mind. 10 Tiere) *

\* Es geht aus dem Monographie-Text und dem Kommentar zum DAB 10 nicht hervor, ob die Prüfungen alternativ oder ergänzend durchzuführen sind.

ser Test wäre allenfalls akzeptabel, wenn ein infektiöses Agens nicht durch andere Methoden zu erfassen ist.

Sollte ein Verzicht auf diesen Tierversuch nicht durchsetzbar sein, muß zumindest der Versuch unternommen werden, ein weniger belastendes Injektionsverfahren einzusetzen. Außerdem muß die erforderliche Tierzahl für diesen Test begründet werden. Da in der Monographie für Katzenleukopenie-Impfstoff mit 8 Mäusen die geringste Tierzahl verlangt wird und somit akzeptabel ist, müßte im Sinne des Tierschutzgesetzes die Tierzahl in den anderen Monographien entsprechend reduziert werden.

## 2. Prüfung auf Unschädlichkeit

IAM können Unverträglichkeitsreaktionen lokaler und generalisierter Natur hervorrufen. Um diese Nebenwirkungen möglichst auszuschließen, ist jede Impfstoffcharge auf Unschädlichkeit zu prüfen. Dabei unterscheidet man im Veterinärbereich zwei grundsätzlich unterschiedliche Prüfmethoden. Zum einen wird, wie auch in der Humanmedizin üblich, die Prüfung auf anomale Toxizität durchgeführt. Andererseits hat man in der Tiermedizin auch die Möglichkeit, direkt an der Zieltierart eine Prüfung durchzuführen. Da die Prüfung auf anomale Toxizität bereits an anderer Stelle ausführlich behandelt wurde (siehe „Duchow und Krämer“, Seite 11), soll hier nur auf die Prüfung an der Zieltierart eingegangen werden.

Bei inaktivierten Impfstoffen ist es allgemein üblich, die doppelte Impfstoffdosis an zwei Tieren der Zieltierart zu verabreichen. Auch in den Vorgaben der Kommission der Europäischen Union (EU) wird für die Prüfung auf Unschädlichkeit im Rahmen der Chargenprüfung für diese Produktgruppe der Einsatz von (mindestens) 2 Tieren gefordert. Natürlich ist eine solch geringe Tierzahl statistisch wenig aussagekräftig. Man muß sich jedoch auch vor Augen halten, daß diese Prüfung direkt am Zieltier eine sehr hohe

Aussagekraft hat. In der Humanmedizin ist eine derartige Prüfung ohnehin nicht möglich. Damit sind die Veterinärimpfstoffe in Bezug auf die Unschädlichkeit sicherlich besser geprüft als Humanimpfstoffe. Die Arzneimittelsicherheit erscheint auch mit dieser geringen Tierzahl gewährleistet. Zudem hat sich die Prüfung in der Praxis bewährt.

Es ist daher unverstänlich, daß einzelne Impfstoffmonographien hiervon deutlich abweichen (siehe Tabelle 2). Die höchste Tierzahl wird mit 15 Küken bei dem Gumboro-Lebendimpfstoff gefordert. Offensichtlich besteht bei Geflügelimpfstoffen ganz allgemein die Tendenz, wesentlich höhere Tierzahlen zu verlangen. Dies mag sich mit der leichten Verfügbarkeit entsprechender Versuchstiere erklären lassen. Unter Tierschutzaspekten ist eine derartige Vorgehensweise jedoch nicht akzeptabel.

Beim Tetanusimpfstoff, der üblicherweise bei Pferden eingesetzt wird, ist überhaupt keine spezifische Toxizität gefordert. Hier findet sich lediglich eine Prüfung auf ausreichende Inaktivierung des Tetanustoxins an 5 Meerschweinchen.

Lebend-Impfstoffe werden bei gefriergetrockneten Zubereitungen üblicherweise einer Prüfung mit 10-facher Dosis unterzogen. So ist es auch in den entsprechenden EU-Anforderungen festgeschrieben. Hier stehen die DAB-Vorschriften bei einigen Impfstoffen hinter diesen Maßgaben zurück, in dem sie nur eine Prüfung mit doppelter Dosis fordern.

Schließlich erscheint in einigen Monographien vorwiegend neueren Datums die zusätzliche Forderung, eine Wiederholungsimpfung mit einfacher oder doppelter Dosierung nach einem Zeitraum von 4 Tagen bis zu 4 Wochen durchzuführen. Fachlich fundierte Gründe für diese Prüfungsverlängerung sind uns bisher nicht bekannt. Allergisierungsphänomene, die bei Tieren selten sind, dürften durch diesen erweiterten Test im Rahmen der Chargenprüfung kaum erfaßt werden. Die

Wahrscheinlichkeit, daß ein Tier aus anderen, nicht impfstoffbedingten Gründen erkrankt, oder gar verstirbt, dürfte wesentlich größer sein.

Schließlich wird der Sinn der Prüfung auf Unschädlichkeit mit doppelter Dosis generell in Frage gestellt (Hendriksen, 1988). Bedenkt man, daß heutzutage bei einer Impfstoffzulassung umfangreiche Studien bezüglich möglicher Überdosierungen vorzulegen und diese Prüfungen an mindestens 3 Chargen vorzunehmen sind, dann kann man diesen Standpunkt sicherlich rechtfertigen. Zudem ist durch die Einführung der „Guten Herstellungspraxis“ (GMP) ein wesentlicher Schritt zur gleichförmigeren Herstellung von biologischen Arzneimitteln getan. Grobe Produktionsfehler, die in der Vergangenheit zu schädlichen Chargen geführt haben, sind hierdurch sehr unwahrscheinlich geworden. Inzwischen ist die Anzeigepflicht für Arzneimittelnebenwirkungen auf den Tierimpfstoffbereich ausgedehnt worden. Dies sollte gewährleisten, daß schädliche Impfstoffchargen, die trotz aller Vorsichtsmaßnahmen in den Verkehr gekommen sind, unverzüglich vom Markt genommen werden und keinen größeren Schaden anrichten können.

Eine Ablösung der Prüfung auf Unschädlichkeit mit doppelter Dosis durch eine Prüfung mittels normaler Dosierung entsprechend der Gebrauchsanleitung, wäre ein wesentlicher Beitrag zur Einsparung von Versuchstieren, vor allem im Großtierbereich. Damit eröffnet sich nämlich die Möglichkeit, die Prüfung auf Unschädlichkeit mit der Prüfung auf Wirksamkeit durch serologische Untersuchungsmethoden direkt am Zieltier zu kombinieren. Bisher war ein solches Vorgehen bei der Prüfung mit der mehrfachen Dosis wegen des zu hohen Antigengehaltes nicht möglich. Eine derartig kombinierte Prüfung könnte bei vielen Impfstoffen eingesetzt werden und würde die Aussagekraft mancher Wirksamkeitsprüfung beträchtlich erhöhen. Dies sollte dann zu einer entsprechenden Reduktion der La-

Tabelle 2 : Vergleich der DAB 10-Vorschriften für die Prüfung auf Unschädlichkeit: Inaktivierte Impfstoffe

Monographie	Tierzahl	Immunisierungsmodus
Botulismus-Impfstoff für Tiere Leptospirose-Impfstoff für Tiere	2 Tiere	doppelte Dosis
Panleukopenie-Impfstoff für Katzen (inaktiviert) Parvovirose-Impfstoff für Hunde (inaktiviert)		
Tollwut-Impfstoff für Tiere	2 Tiere	das Doppelte der kleinsten Dosis
Clostridium-Novyi-(Typ B)-Impfstoff für Tiere Clostridium-Perfringens-Impfstoff für Tiere	2 Tiere	das Doppelte der Höchstdosis
Pararuschbrand-Impfstoff für Tiere Ruschbrand-Impfstoff für Tiere		
Newcastle-Krankheit-Impfstoff (inaktiviert)	10 Küken	doppelte Dosis
Pferdeinfluenza-Impfstoff	2 Pferde	doppelte Dosis und Wiederholung nach 4 Wochen
Aujeszkysche-Krankheit-Impfstoff für Schweine (inaktiviert)	mind. 3 Ferkel	doppelte Dosis und nach 14 Tagen einfache Dosis
Maul- und Klauenseuche-Impfstoff für Wiederkäuer (inaktiviert)	3 Rinder	20 x 0,1ml intradermolingual und nach 4 Tagen dreifache Dosis
Schweinerotlauf-Impfstoff	2 Schweine <u>und</u> 10 Mäuse	Schweine: doppelte Dosis; Mäuse: 0,5ml
Tetanus-Impfstoff für Tiere	nicht vorgeschrieben (Toxizitäts-Prüfung)	
Infektiöse-Aviäre-Enzephalomyelitis-Lebend-Impfstoff für Geflügel		
Infektiöse-Bronchitis-Lebend-Impfstoff für Geflügel (gefriergetrocknet)		
Geflügelpocken-Lebend-Impfstoff (gefriergetrocknet)	mind. 10 Küken	10 Impfdosen
Mareksche-Krankheit-Lebend-Impfstoff für Geflügel (gefriergetrocknet)		
Newcastle-Krankheit-Lebend-Impfstoff (gefriergetrocknet)		
Infektiöse-Bursitis-Lebend-Impfstoff für Geflügel (gefriergetrocknet)	mind. 15 Küken	10 Impfdosen
Infektiöse-Bovine-Rhinotracheitis-Lebend-Impfstoff für Rinder (gefriergetrocknet)	2 Kälber	10 Impfdosen
Klassische Schweinepest-Lebend-Impfstoff (gefriergetrocknet)	3 Ferkel	10 Impfdosen
Aujeszkysche-Krankheit-Lebend-Impfstoff für Schweine zur parenteralen Anwendung (gefriergetrocknet)	mind. 3 Ferkel + 3 Kontrollen	10 Impfdosen
Infektiöse-Hepatitis-Lebend-Impfstoff für Hunde (gefriergetrocknet)		
Milzbrandsporen-Lebend-Impfstoff für Tiere	2 Tiere	doppelte Dosis
Panleukopenie-Lebend-Impfstoff für Katzen (gefriergetrocknet)		
Staupe-Lebend-Impfstoff für Frettchen und Nerze (gefriergetrocknet)		
Staupe-Lebend-Impfstoff für Hunde (gefriergetrocknet)		
Brucellose-Lebend-Impfstoff für Tiere (gefriergetrocknet)	2 Schafe	1 Impfdosis
Tollwut-Lebend-Impfstoff für Füchse (peroral)	nicht vorgeschrieben	

bortierzahlen bei Wirksamkeitsprüfungen führen.

Zusammenfassend wären folgende Änderungen für die Prüfung auf Unschädlichkeit an der Zieltierart vorzuschlagen:

1. Die vorgeschriebenen Tierzahlen sollten vereinheitlicht werden. Zwei Tiere, unabhängig von der Tierart, erscheinen ausreichend.
2. Der Versuchsaufbau sollte einheitlich sein. Abweichende Impfschemata sollten nur bei begründeten Ausnahmefällen in Betracht kommen.
3. Eine Abänderung der bestehenden Vorschrift hin zu einer Prü-

fung mit einfacher Dosierung ist anzustreben. Die hierdurch mögliche Kombination mit Wirksamkeitsprüfungen könnte zu einer erheblichen Reduzierung von Versuchstieren führen.

### 3. Tierzahlen bei Wirksamkeitsprüfungen nach der 3 Punkt-Methode

Bei einigen inaktivierten Impfstoffen wird die Wirksamkeitsprüfung an kleinen Labortieren durch den Vergleich der Schutzwirkung des Prüfimpfstoffs mit einem internationalen Standardpräparat bemessen. Hierbei werden Impfstoff und Standard in

mindestens 3 unterschiedlichen Verdünnungen, die in der Regel so bemessen sind, daß die Dosierungen zwischen 5 und 95% Schutzwirkung verleihen, eingesetzt. Meist versterben während einer solchen Prüfung etwas mehr als 50% der eingesetzten Tiere unter zum Teil schwersten Krankheitssymptomen (z.B. bei Tollwut oder Tetanus). Bei einigen dieser Prüfmethode, z.B. bei Rotlaufimpfstoffen (siehe Beitrag von Beckmann und Cußler, Seite 39) oder Tetanusimpfstoff (siehe Beitrag Hendriksen, Seite 30), ist eine Ablösung des Infektionsversuchs durch serologische Methoden mög-

lich. Bei den anderen Impfstoffmonographien, die diese Prüfmethode weiterhin vorschreiben, ist die Begrenzung der Tierzahl auf das unbedingt erforderliche Maß notwendig.

Bei einem Vergleich der Prüfmethoden in unterschiedlichen Monographien fällt auf, daß die geforderten Tierzahlen erheblichen Schwankungen unterliegen, obwohl die Bewertungskriterien vergleichbar sind (siehe Tabelle 3). Bei einer Überarbeitung von Monographien für Impfstoffe beim Menschen wird keine feste Tierzahl mehr angegeben. Hier bleibt die Wahl der Gruppengröße dem Hersteller überlassen. Dies wird es einigen Herstellern mit sehr gleichförmiger Produktion erlauben, wesentlich weniger Tiere einzusetzen.

Auch sollte bei derartigen Prüfbestimmungen in Erwägung gezogen werden, die Leiden der Tiere dadurch zu verringern, daß Letalität als Bewertungskriterium zu Gunsten klar definierter Krankheitssymptome ersetzt wird. Die erkrankten Tiere könnten dann umgehend euthanasiert werden. Das Durchlaufen der vollen klinischen Symptomatik bis zum Tod, der teilweise erst nach vielen Stunden bzw. einigen Tagen eintritt, bliebe den Tieren erspart. Bei der Wirksamkeitsprüfung von Tetanusimpfstoffen ist diese Möglichkeit bereits eröffnet. Ein frühzeitiges Euthanasieren erkrankter Tiere sollte, sobald die charakteristischen Symptome erkennbar sind, eigentlich bei allen Infektionsversuchen gefordert werden.

Schließlich soll noch darauf hingewiesen werden, daß die Angaben zur statistischen Auswertung dieser Prüfung in vielen Monographien unzureichend ist. Durch unterschiedliche Auswertemethoden, die das gleiche Tierversuchsprotokoll zugrunde legten, konnten variierende Wirksamkeiten errechnet werden (Zott, persönl. Mitteilung). Mit anderen Worten: allein die statistische Auswertemethode kann darüber entscheiden, ob ein grenzwertiger Impfstoff die Prüfung besteht, oder ob ein Tierversuch wiederholt werden muß.

Zusammenfassend sollen folgende Verbesserungsvorschläge für Wirksamkeitsprüfungen nach der 3-Punkt-Methode, die nicht durch serologische Methoden ersetzbar sind, unterbreitet werden:

- Die einzusetzende Tierzahl sollte freigestellt werden.
- Die Auswertung der Prüfung sollte für alle Monographien einheitlich geregelt und verbindlich festgelegt werden.
- Letalität als Bewertungskriterium sollte zugunsten klar definierter Krankheitssymptome ersetzt werden.

**4. Unterschiedliche Anforderungen an inaktivierte Tollwutimpfstoffe in Veterinär- und Humanmedizin**  
Tollwut-Impfstoffe werden sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eingesetzt. Sie unterscheiden sich in ihrer Herstellungsweise und in der Zusammensetzung (Tollwut-Impfstoffe *ad usum humanum* enthalten kein Adjuvans).

Es ist daher verständlich, daß sich beide Monographien inhaltlich unterscheiden (Tabelle 4). Während die Prüfung auf Unschädlichkeit in der Veterinärmedizin an der Tierart, bei der der Impfstoff am häufigsten eingesetzt wird, geprüft werden kann, wird in der Humanmedizin die Prüfung auf anomale Toxizität gefordert. Wenig verständlich ist dagegen die Forderung einer Überprüfung der Inaktivierung durch den „Babymaus-Test“ oder ein Zellkulturverfahren. Sowohl das Deutsche Tierschutzgesetz als auch die entsprechende EU-Richtlinie und Europaratkonvention lassen hier die Verwendung eines Tierversuchs beim Vorhandensein gleichwertiger Alternativmethoden nicht zu. Der Inaktivierungsnachweis durch intrazerebrale Injektion in infantile Mäuse darf daher nicht mehr durchgeführt werden und sollte konsequenterweise gestrichen werden.

Auch bei der Wirksamkeitsprüfung gibt es stark differierende Durchführungsbestimmungen, obwohl das Testprinzip (3 Punkt-Methode) und der Auswertemodus (Berechnung von Internationalen Einheiten) gleich ist. Selbst die Bewertung spontaner Todesfälle, die aufgrund der höchstbelastenden intrazerebralen Injektionstechnik auftreten, ist unterschiedlich geregelt. Derart abweichende Prüfbestimmungen für prinzipiell gleichartige Impfstoffe sind kaum zu erklären. Hier besteht offensichtlich ein mangelhafter Informationsaustausch zwischen den entsprechenden Expertengruppen der Arzneibuchkommission.

**Tabelle 3:** Unterschiedliche Tierzahlen bei Wirksamkeitsprüfungen nach der 3-Punkt-Methode

Monographie	Arzneibuchvorschrift	Gesamt-tierzahl
Schweinerotlauf-Impfstoff	mind. 6 Gruppen zu je 16 Mäusen 1 Kontrollgruppe zu 10 Mäusen	mind. 106 Mäuse
Schweinerotlauf-Serum	mind. 6 Gruppen zu je 10 Mäusen 1 Kontrollgruppe zu 10 Mäusen	mind. 70 Mäuse

Siehe auch Tabelle 4 zu den Tierzahlen bei der Tollwutprüfung.

**Tabelle 4: Vergleich der im DAB 10 vorgeschriebenen Tierversuche für die Prüfung von inaktivierten Tollwut-Impfstoffen**

Prüfungsvorschrift	Tollwut-Impfstoff ad us. hum.	Tollwut-Impfstoff ad us. vet.
<b>Prüfung auf Reinheit</b>		
1. Unschädlichkeit	Anomale Toxizität	Spezifische Unschädlichkeit am Hund
2. Inaktivierung	nicht vorgeschrieben	"Babymaus"- oder Zellkultur-Test
<b>Prüfung auf Wirksamkeit</b>		
1. Impftiere/Gruppe Anzahl der Gruppen	mindestens 16 Mäuse/Gruppe 6 Impfgruppen	mindestens 10 Mäuse/Gruppe mindestens 6 Impfgruppen
2. Immunisierungsmodus	zweifache Immunisierung im Abstand von 7 Tagen	einfache Immunisierung
3. Challenge-Dosis	5-50 LD <sub>50</sub> /0,03 ml i.c.; 7 Tage nach der 2. Immunisierung	50 ID <sub>50</sub> /0,03 ml i.c.; 14 Tage p.vacc.
3. Auswertungskriterien: a) unspezifische Todesfälle nach i.c. Infektion	a) alle Todesfälle vor dem 5. Tag p.i. werden als unspezifisch gewertet	a) maximal 2 Mäuse/Gruppe dürfen innerhalb der ersten 4 Tage p. i. sterben
b) zulässige Belastungsdosis	b) 5-50 LD <sub>50</sub> /0,03 ml	b) mindestens 10 ID <sub>50</sub> /0,03 ml
c) Mindestgehalt in I.E./Dosis	c) mindestens 2,5 I.E.	c) mindestens 1 I.E.

Zeichenerklärungen:

p. vacc. = post vaccinationem; p. i. = post infectionem; i.c. = intracerebral

LD<sub>50</sub> = Die statistisch ermittelte Menge einer Substanz, die nach Verabreichung in der vorgeschriebenen Weise den Tod der Hälfte der Versuchstiere innerhalb einer bestimmten Zeit herbeiführt.

ID<sub>50</sub> = Die statistisch ermittelte Menge eines Virus, die 50 Prozent der damit behandelten Versuchstiere infiziert.

### Schlußfolgerungen und Ausblick

Allein durch die Gegenüberstellung von vergleichbaren Prüfungsbestimmungen, die allerdings in unterschiedlichen Monographien festgeschrieben sind, kann veranschaulicht werden, wie stark Tierversuche, die zum selben Versuchszweck durchgeführt werden, bezüglich der Tierzahlen und des Versuchsaufbaus variieren. Diese Prüfbestimmungen sollten vereinheitlicht werden, wobei aus Tierschutzgründen stets die geringste Tierzahl und der am wenigsten belastende Versuchsaufbau gewählt werden muß. Diese Verpflichtung ergibt sich aus der nationalen und internationalen Tierschutzgesetzgebung.

Insgesamt entsteht der Eindruck, daß Tierschutzaspekte bei der Abfassung von Impfstoffmonographien bisher nur ungenügend durchsetzbar waren. Es bleibt die Hoffnung, daß das Aufzeigen dieser Mängel zu einer baldigen Angleichung oder Aufhebung der entsprechenden Prüfbestimmungen führt.

Bereits dieser kurze Abgleich gängiger Prüfbestimmungen zeigt, welches Einsparungspotential und wieviele Verbesserungsmöglichkeiten es bei Tierversuchen zur Prüfung von IAM gibt.

### Literatur

- Cußler, K. (1993). Gesetzlich geforderte Tierversuche und mögliche Alternativen bei der Prüfung von Impfstoffen und Immunseren ad us. vet. In H. Schöffl, H. Spielmann, F.-P. Gruber, B. Koidl und Ch. A. Reinhardt (Hrsg.), *Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen Band II: Alternativen zu Tierversuchen in Ausbildung, Qualitätskontrolle und Herz-Kreislauf-Forschung* (156–162). Wien, New York: Springer Verlag.
- Deutsches Arzneibuch, 10. Auflage (DAB 10), Band 3 (1991). Stuttgart: Deutscher Apothekerverlag.
- Europäisches Arzneibuch (EAB), englische Fassung, Second Edition, Fourteenth Fascicule (1990). Sainte-Ruffine France: Maisonneuve S. A.

Hendriksen, C. F. M. (1988). *Laboratory animals in vaccine production and control. Replacement, reduction and refinement*. Dordrecht Boston London: Kluwer Academic Publishers.

### Danksagung

Das im Paul-Ehrlich-Institut durchgeführte Projekt „Tierversuche bei der Prüfung von Immunpräparaten – Eine kritische Bewertung der Tierversuche in den Arzneibuchmonographien“ wird vom Bundesministerium für Forschung und Technologie im Rahmen des Förderprogrammes „Ersatzmethoden zum Tierversuch“ gefördert.

### Korrespondenzadresse

Ute Hechler  
Paul-Ehrlich-Institut  
Bundesamt für Sera und Impfstoffe  
Abteilung Veterinärmedizin  
D-63207 Langen