

- Transplantation Proceedings* 1, 403-407
- Balner, H., Eysvoogel, V. P. and Cleton, F. J. (1968). Testing of anti-human lymphocyte sera in chimpanzees and lower primates. *Lancet* 1, 19-22.
- Balner, H., Dersjant, H. and van Bekkum, D. W. (1969). Testing of antihuman lymphocyte sera in chimpanzees and lower primates. *Transplantation* 8, 281-290.
- Bonnefoy-Berard, N., Genestier, L., Flacher, M., Rouault, J. P., Lizard, G., Mutin, M. and Revillard, J. P. (1994). Apoptosis induced by polyclonal antilymphocyte globulins in human B-cell lines. *Blood* 83, 1051-1059.
- Bonnefoy-Berard, N. and Revillard, J. P. (1996). Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. [Review] [52 refs]. *Journal of Heart & Lung Transplantation* 15, 435-442.
- Bunn, D., Lea, C. K., Bevan, D. J., Higgins, R. M. and Hendry, B. M. (1996). The pharmacokinetics of anti-thymocyte globulin (ATG) following intravenous infusion in man. *Clinical Nephrology* 45, 29-32.
- Dreikorn, K., Horsch, R., Rohl, L., Rossler, W. and Olschewski, M. (1985). A randomized trial with different immunosuppressive regimens after renal transplantation. *Transplantation Proceedings* 17, 2663-2665.
- Genestier, L., Fournel, S., Flacher, M., Assosou, O., Revillard, J. P. and Bonnefoy-Berard, N. (1998). Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 91, 2360-2368.
- Grosse-Wilde, H., Jakubowski, H. D., Eigler, W. and Kuwert, F. K. (1981). *In vitro* immunounresponsiveness in recipients of cadaveric renal allografts during ATG therapy. *Proc. EDTA* 18, 481-485.
- Johnson, K., Niblack, G., Richie, R., MacDonnell, R., Nylander, W., Walker, P., Sterling, W., Ross, G., Humphries, A. and Peterson, D. (1989). Multicenter comparison of rejection reversal: rabbit anti-human lymphocyte serum (ATS) versus horse anti-human lymphocyte globulin (ATGAM). *Transplantation Proceedings* 21, 1734-1735.
- Kaden, J., May, G., Schönemann, C., Groth, J., Seeger, W., Seibt, F., Henkert, M. and Lippert, J. (1992). Effect of ATG prophylaxis in sensitized and non-sensitized kidney graft recipients. *Transplant. International* 5, 75-78.
- Kormos, R. L., Armitage, J. M., Dummer, J. S., Miyamoto, Y., Griffith, B. P. and Hardesty, R. L. (1990). Optimal perioperative immunosuppression in cardiac transplantation using rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation* 49, 306-311.
- Marsh, J. C. W., Hows, J. M., Bryett, K. A., Al-Hashimi, S., Fairhead, S. M. and Gordon-Smith, E. C. (1987). Survival after antilymphocyte globulin therapy for aplastic anemia depends on disease severity. *Blood* 70, 1046-1052.
- Platanias, L., Gascon, P., Bielory, L., Griffith, P., Nienhuis, A. and Young, N. (1987). Lymphocyte phenotype and lymphokines following anti-thymocyte globulin therapy in patients with aplastic anaemia. *British Journal of Haematology* 66, 437
- Teramura, M., Kobayashi, S., Iwabe, K., Yoshinaga, K. and Mizoguchi, H. (1997). Mechanism of action of antithymocyte globulin in the treatment of aplastic anaemia: *in vitro* evidence for the presence of immunosuppressive mechanism. *British Journal of Haematology* 96, 80-84.
- Thomas, F., Thomas, J., Flora, R., Mendez-Picon, G., Peace, K. and Lee, H. M. (1977). Effect of antilymphocyte globulin potency on survival of cadaver renal transplants. *Lancet* 2, 671-674.
- Touraine, J. L., LeFrancois, N., Dubernard, J. M., Garnier, J. L., Eygonnet, J. P., Gibelin, N., Bétuel, H. and Traeger, J. (1987). Place of antilymphocyte globulins in the immunosuppressive regimen for kidney transplantation. *Transplantation Proceedings* 19, 1881-1881.

Danksagung

Das Projekt wird gefördert durch das BMBF (Projekt BEO/21 0311238).

Korrespondenzadresse

Dipl.-Biol. Christoph Conrad
Paul-Ehrlich-Institut
Abteilung Immunologie
Paul-Ehrlich-Straße 51-59
D-63225 Langen
Fax: +49-6103 77 1253
Tel.: +49-6103 77 5100/5104
E-mail: Ch.Conrad@em.uni-frankfurt.de



Optimierung und Etablierung von serologischen Methoden für die Wirksamkeitsprüfung von Immunglobulinen gegen *Clostridium tetani*-Toxoid

Elvira Ebert¹, Annett Abu Karim¹, Tanja Kayser¹, Renate Wenig¹, Karin Weißer¹, Maria Wirz², Giulio Pisani², Gabriele Schäffner¹ und Klaus Cußler¹

¹ Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen, ² Istituto Superiore di Sanità, I-Roma

Zusammenfassung

Die Wirksamkeitsprüfung von Tetanus-Immunglobulin (Ig)-Präparaten für den Menschen wird nach Monographie 398 der Europäischen Pharmakopöe (Ph. Eur.) in einem Toxin-Neutralisations-Test in Mäusen (MNT) oder Meerschweinchen durchgeführt. Diese Monographie erlaubt jedoch auch den Einsatz serologischer Methoden, sofern deren Eignung zuvor belegt werden konnte. Nach den ersten Untersuchungsergebnissen dieser Studie kann gezeigt werden, daß sowohl ein indirekter Enzyme-Linked-

Immunsorbent-Assay (ELISA), eine Rocket-Immunelektrophorese (RIE) als auch ein Toxin-Bindungs-Inhibitionstest (ToBI) als mögliche Alternativmethoden zum *in vivo* MNT einsetzbar sind. Die Reproduzierbarkeit der *in vitro* Methoden kann derzeit mit inter-assay-Variationskoeffizienten von 2 bis 27% angegeben werden. Der ELISA ist mit einer Nachweisgrenze von 0,005 IE/ml am sensitivsten, gefolgt vom ToBI (Nachweisgrenze von 0,04 IE/ml) und der RIE (Nachweisgrenze von 5,0 IE/ml). Bislang konnte die Transferierbarkeit des ELISA-Systems in andere Laboratorien

eindeutig gezeigt werden. Die Übertragbarkeit der RIE und des ToBI-Tests muß noch nachgewiesen werden.

Summary: Optimisation and establishing of serological methods for the potency testing of immunoglobulins against Clostridium tetani-toxin. The quality control of human tetanus immunoglobulin requires animal experiments according to European Pharmacopoeia monograph 398. The potency estimation has to be done in a toxin neutralisation test in mice (MNT) or guinea pigs. Immunoassays could also be used if they show a suitable sensitivity and specificity.

Keywords: human tetanus immunoglobulin, potency, alternative methods, ELISA, RIE, ToBI

1 Einleitung

Für die Wirksamkeitsprüfung bei der Chargenkontrolle von Tetanus-Immunglobulinen (Ig) werden jährlich allein in Deutschland mehr als 1000 Mäuse in Neutralisationstests (MNT) eingesetzt (Weisser und Hechler, 1997). Bei dem nach Ph. Eur. Monographie „*human tetanus immunoglobulin*“ durchgeführten Tierversuch wird Mäusen eine Mischung aus dem zu überprüfenden Präparat in unterschiedlichen Verdünnungen mit einer bestimmten Menge Tetanus-Toxin verabreicht. Lähmungserscheinungen der Tiere sind bei 96 stündigen Beobachtungen das Auswertungskriterium. Nach einem zusätzlich aufgenommenen Absatz in dieser Monographie ist es auch erlaubt, serologische Methoden für die Wirksamkeitsprüfung einzusetzen. Die Eignung dieser Ersatzmethoden muß zuvor in Form von Spezifitäts- und Sensitivitätsuntersuchungen belegt werden.

In der vorgestellten Studie wurden drei unterschiedliche serologische Methoden für den quantitativen Nachweis von Tetanus-Ig etabliert und optimiert. In einer ersten Vergleichsstudie wurde ihre Eignung untereinander sowie im Vergleich zum Tierversuch untersucht. Das Ziel dieser Untersuchungen ist es, der Arzneibuchkommission ein geeignetes Testsystem als serologische Referenzmethode für den Ersatz des MNT vorschlagen zu können.

2 Material und Methode

Um die Vergleichbarkeit der eingesetzten *in vitro* Methoden gewährleisten zu können, wurde sowohl ein einheitliches Tetanus-Toxoid (TEFT, 1000 Lf pro Ampulle) als auch ein Tetanus-Ig-Standard (Human Tetanus Ig, 120 IU pro Ampulle), beides *biological reference preparations* (BRPs) der WHO, eingesetzt.

The first results of our study verify that an indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), a rocket immunoelectrophoresis (RIE) and a toxin binding inhibition test (ToBI) could be used as serological alternative methods to the MNT. Studies on the reproducibility of the in vitro methods resulted inter-assay coefficients of variation between 2 and 27%. The ELISA is more sensitive (limit of detectability: 0,005 IE/ml) than the ToBI (0,04 IE/ml) and the RIE (5 IE/ml). The transferability of the ELISA to other labs is proofed. The transferability of the RIE and the ToBI will be tested in the near future.

2.1 Aufbau des indirekten enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

96-well Mikrotiterplatten werden zunächst über 16 h mit dem Tetanus-Toxoid beschichtet. In diesen Kavitäten werden die zu testenden Präparate sowie die Standardlösung austitriert und über 2 h inkubiert. Die gegen Tetanus-Toxoid gerichteten Ig aus der Test- und Standardlösung binden spezifisch an dem Toxoid und werden im folgenden durch einen enzymmarkierten, gegen Human-IgG gerichteten Zweitantikörper detektiert. Die Auswertung erfolgt über einen *parallel-line-assay*, bei dem die Dosis-Wirkungs-Kurven der Testpräparate und des Standards auf ein und derselben Mikrotiterplatte zueinander in Bezug gesetzt werden.

2.2 Aufbau der Rocket Immunelektrophorese (RIE)

Flüssiges Agarosegel, dem Tetanus-Toxoid zugefügt ist, wird auf eine Glasplatte gegossen. In ausgestanzte Depots werden danach in mindestens 4 Verdünnungsstufen die Standardlösung sowie jeweils in einer Verdünnungsstufe die zu testenden Präparate gegeben. Unter Anlegen einer Spannung findet über 5 h eine elektrophoretische Wanderung der Ig aus den Depots in das toxoidhaltige Agarosegel statt. Dabei bilden sich spezifische Immunpräzipitate aus, deren Fläche proportional zu dem Antigen/Antikörper-Verhältnis ist. Die Höhe der angefärbten Präzipitate aus den Proben wird mit denen der Standardlösung über Regressionsanalyse direkt in Beziehung gesetzt.

2.3 Aufbau des Toxin Bindungs Inhibition Testes (ToBI)

Sowohl die zu prüfenden Präparate als auch die Standardlösung werden in einer 96-well Mikrotiterplatte austitriert und 16 h mit einer konstanten Tetanus-Toxo-

id Menge inkubiert. Jede dieser Mischungen wird in eine zweite, mit anti-Tetanus-Toxoid beschichtete Mikrotiterplatte überführt. Ungebundenes (nicht „neutralisiertes“) Tetanus-Toxoid aus den zugeführten Mischungen bindet an diese Fangantikörper und wird über einen zweiten zugefügten enzymmarkierten anti-Tetanus-Toxoid-Antikörper detektiert. Die Auswertung erfolgt wie beim indirekten ELISA über einen *parallel-line-assay*.

3 Ergebnisse

Die Nachweisgrenze für den indirekten ELISA kann mit 0,005 internationalen Einheiten pro Milliliter (IE/ml), für den ToBI mit 0,04 IE/ml und für die RIE mit 5 IE/ml angegeben werden. Nach der Optimierung aller drei Methoden wurden acht Ig-Präparate parallel in den *in vitro* Methoden wiederholt auf ihren spezifischen Tetanus-Ig-Gehalt überprüft. In Abbildung 1 sind die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte aus drei Bestimmungen der *in vitro* Methoden, im Vergleich zu den Tierversuchsdaten aus dem MNT, in IE/ml aufgetragen. Die Buchstaben (A bis D) stehen für die Hersteller/Präparate, die Zahlen (1 und 2) für unterschiedliche Chargen. Die unter A1 bis B2 aufgeführten Proben sind Tetanus-Ig-Präparate mit einem produktspezifischen Grenzwert von ≥ 250 IE/ml. Die übrigen vier Produkte sind Ig-Präparate, die lediglich einen geringen Tetanus-Ig-Anteil besitzen. Für Präparat D sind keine MNT-Daten in der Abbildung aufgeführt, da sich hier der Tetanus-Ig-Gehalt zwischen 5 und 10 IE/ml bewegt.

Alle drei *in vitro* Methoden sind in der Lage, die ersten vier Testprodukte als Tetanus-Ig-Präparate mit hohen spezifischen Ig-Mengen von den letzten vier allgemein Ig-Präparaten mit niedrigen Tetanus-Ig-Mengen zu unterscheiden. Mittels RIE konnten

in Produkt D keine Tetanus-Ig bestimmt werden. Der indirekte ELISA bewertet die Tetanus-Ig-Präparate (A1 bis B2) niedriger als der Tierversuch, die RIE hingegen stets etwas höher. Der ToBI liegt mit seiner Bewertung der Tetanus-Ig-Präparate in drei von vier Proben sehr eng am MNT. Nach den Ergebnissen dieser Studie kann die Reproduzierbarkeit der *in vitro* Methoden mit den in Tabelle 1 aufgeführten inter-assay-Variationskoeffizienten angegeben werden. Diese bewegen sich je nach Methode und Testpräparat zwischen 2 und 27%.

4 Diskussion und Aussicht

Es konnte gezeigt werden, daß alle drei untersuchten *in vitro* Methoden in der Lage sind, Ig-Präparate mit hohen spezifischen anti-Tetanus Mengen von allgemeinen Ig-Produkten zu unterscheiden. Nach der Ph. Eur. Monographie 398 müssen gültige Tetanus-Ig-Produkte mindestens 100 IE/ml enthalten. In Bezug auf diesen Grenzwert konnte mittels aller drei Methoden die Wirksamkeit der vier entsprechenden Präparate (A1 bis B2) bestätigt werden. Es ist allerdings zu bedenken, daß der produktspezifische Grenzwert der untersuchten „gültigen“ Produkte bei ≥ 250 IE/ml lag. In Bezug auf diesen Grenzwert konnte jedoch lediglich mittels RIE und ToBI diese Spezifikation für die Präparate A und B bestätigt werden. Produkt D konnte nur mittels ELISA und ToBI bestimmt werden, da die Nachweisgrenze der RIE mit 5 IE/ml zu hoch ist, um diese geringen Tetanus-Ig-Mengen noch detektieren zu können. Es muß jedoch bedacht werden, daß es bei der Wirksamkeitsprüfung von Tetanus-Ig-Präparaten unerheblich ist, ob eine Methode solch niedrige Mengen noch zu detektieren vermag. Viel wesentlicher ist es, zwischen Produkten unterscheiden zu können, deren Tetanus-Ig-Menge über bzw. unter der geforderten „Mindestmenge“ von 100 IE/ml liegt. Die Reproduzierbarkeit der *in vitro* Methoden liegt nach den ermittelten Variationskoeffizienten der Literatur entsprechend in einem akzeptablen Bereich für RIE und ToBI, sollte aber insbesondere für den ELISA verbessert werden (TIJSSSEN 1988, KEMENY 1994, DAB 10). An dieser Stelle muß auch erwähnt werden, daß für den MNT Vertrauensgrenzen zwischen 80 und 125% nach Arzneibuch akzeptiert sind. Dies entspricht einem Variationskoeffizienten von 25%, der von zwei *in vitro* Methoden unterboten wird.

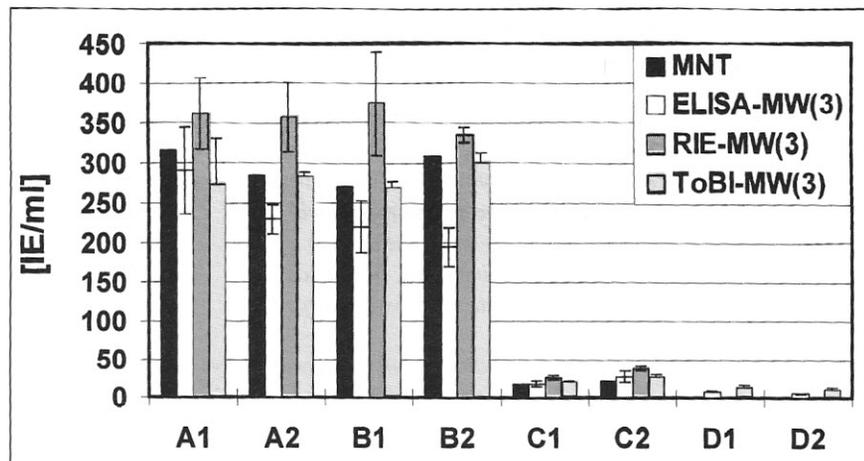


Abbildung 1: Vergleichende *in vivo* und *in vitro* Bestimmung von Tetanus-Ig. Die Produkte A und B sind Tetanus-Ig-Präparate, Produkte C und D allgemein Ig-Präparate, wobei die Zahlen unterschiedliche Chargen kennzeichnen. Angegeben sind die ermittelten *in vitro* Ergebnisse als arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichungen (aus 3-fach Bestimmungen) sowie die *in vivo* Daten nach Herstellerangaben.

Tabelle 1: Sensitivität und Reproduzierbarkeit der *in vitro* Methoden

Methode	Nachweisgrenze	Inter-assay-Variationskoeffizient
ELISA	0,0005 IE/ml	8 - 27 % (meist > 15 %)
RIE	5,0 IE/ml	3 - 17 % (meist < 15 %)
ToBI	0,04 IE/ml	2 - 21 % (meist < 5 %)

Standardarbeitsanweisungen und alle benötigten Materialien für die Durchführung von ELISA und RIE wurden an ein zweites Labor verschickt. Acht Tetanus-Ig-Präparate wurden mehrfach im Entwicklungs- und im Testlabor parallel untersucht und verglichen. Die Variationen der ermittelten Daten im ELISA lagen zwischen den Labors durchweg unter 10%. Im Vergleich zum MNT wurden mittels ELISA in beiden Labors die Produkte stets niedriger bewertet. Die Übertragbarkeitsstudie für die RIE ist derzeit noch nicht abgeschlossen. Untersuchungen zur Transferierbarkeit des ToBI stehen noch aus.

Alle drei *in vitro* Methoden sollen künftig mit einem Testpanel, das insbesondere auch grenzwertige Produkte enthält, in einer Prävalidierungsstudie überprüft werden, um danach die am besten geeignete Methode als serologische Referenzmethode für die Wirksamkeitsprüfung von Tetanus-Ig vorzuschlagen.

Literatur

Deutsches Arzneibuch, 10. Auflage (1996).
Kommentar: zu Kapitel V.2.1.10 Immunchemische Methoden.

Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag. Frankfurt: Govi-Verlag GmbH. European Pharmacopoeia (1995).
Kemeny, D. M. (1994). *ELISA: Anwendung des enzyme linked immunosorbent assay in biologisch/medizinischen Labor*. Nach der amerikanischen Auflage von Hans Lippa (1991). Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
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 wird mit der Unterstützung von ECVAM durchgeführt.

Korrespondenzadresse

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