

Klinische Endpunkte als Ersatz für die Bestimmung der Letalitätsrate bei Tollwutinfektionsversuchen zur Impfstoffprüfung

Klaus Cußler¹, David Morton² und Coenraad F. M. Hendriksen³

¹Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen, ²Universität Birmingham, UK-Birmingham und ³RIVM, NL-Bilthoven

Zusammenfassung

Impfstoffe zur Vorbeugung einer Tollwutinfektion werden beim Menschen und vielen Tierarten erfolgreich eingesetzt. Die Anforderungen an die Qualitätskontrolle für diese Produkte sind hoch. Auch nach erteilter Zulassung sind bei der Chargenprüfung zur Dokumentation der Wirksamkeit Infektionsversuche vorgeschrieben. Dabei wird registriert, wieviele Tiere in den immunisierten Gruppen innerhalb eines bestimmten Zeitraumes nach der Belastung verenden oder Tollwutsymptome aufweisen.

Eine ECVAM-Arbeitsgruppe untersucht derzeit, inwiefern klinische Zeichen als Ersatz des Letalitätskriteriums bei Belastungsversuchen zur Impfstoffprüfung ersetzt werden können. Aufgrund des hohen Belastungsgrades und der ausgeprägten Krankheitserscheinungen bot sich die Tollwutinfektion für derartige Untersuchungen an. Als mögliche Kriterien für klinische Endpunkte wurden neben der Erfassung der Körpertemperatur und des Körpergewichtes die klinischen Zeichen dokumentiert. Dabei zeigte sich, daß die Reduktion des Körpergewichtes und das Auftreten typischer Krankheitszeichen als klinische Endpunkte geeignet sind. Durch eine Festschreibung dieser Kriterien in den entsprechenden Prüfvorschriften kann ein erheblicher Beitrag zur Leidensbegrenzung der Tiere geleistet werden.

Keywords: rabies vaccine, potency test, humane endpoints

Summary: Humane endpoints as a replacement for the estimation of lethality rates in the potency testing of rabies vaccines
Vaccines are successfully used to prevent rabies infections in humans and animals. The quality requirements for these products are high. After licensing it is still necessary for batch release to perform animal challenge tests to demonstrate the potency of the vaccines. In these experiments it is registered how many animals in the immunized groups die or show symptoms of rabies within a defined time frame.

An ECVAM working group has examined whether clinical signs can be used in challenge tests for vaccine control to replace lethality as criterion.

The severe distress and the typical signs of the disease made the rabies infection a promising example for this study. Clinical signs, body temperature and body weight were the criteria used to define humane endpoints.

It could be shown, that the reduction of body weight and the appearance of typical clinical signs are suitable to define humane endpoints. Pain and distress could be considerably reduced by the implementation of these criteria in to the legal requirements for potency tests of rabies vaccines.

1 Einleitung

Für die Wirksamkeitsprüfung von Tollwut-Impfstoffen werden derzeit noch in allen internationalen Prüfvorschriften Belastungsversuche gefordert. Mit einer Ablösung dieser gesetzlich vorgeschriebenen Versuche ist erst mittel- bzw. langfristig zu rechnen. Lediglich die Neufassung der Monographie für inaktivierte Tollwut-Impfstoffe *ad us. vet.* erlaubt bisher den Einsatz von Alternativmethoden (Europäische Arzneibuchkommission, 1997a).

Für eine Wirksamkeitsprüfung werden derzeit mehr als 100 Tiere eingesetzt. Das Tierexperiment ist so zu planen, daß mindestens 50% der Tiere an den Folgen der Tollwutinfektion versterben. Bisher benennt keine Prüfanweisung Zeichen von Tollwut, die als typisch für die Infektion angesehen werden können und die eine Euthanasie der Tiere rechtfertigen.

Es erscheint daher sinnvoll, kurzfristig umsetzbare Möglichkeiten der Leidensverminderung für die Versuchstiere im Sinne des *refinement* zu überprüfen (Balls et al., 1995). Aufgrund der hohen Tierzahlen, die in einer Wirksamkeitsprüfung eingesetzt werden, müssen die Untersuchungsparameter leicht erfaßbar sein. Es wurde deshalb überprüft, inwiefern klinische Zeichen sowie Gewichtsentwicklung und Körpertemperatur für die Festlegung klinischer Endpunkte bei der Tollwutwirksamkeitsprüfung geeignet sind.

2 Tiere, Material und Methoden

Die Tierversuche wurden entsprechend der derzeit gültigen Monographie für Tollwut-Impfstoffe *ad us. hum.* im Europäischen Arzneibuch durchgeführt (Europäische Arzneibuchkommission, 1997b). Da jeweils mehr als 100 Mäuse pro Versuch eingesetzt werden müssen, konnten aufgrund des erheblichen zeitlichen und personellen Mehraufwandes nur einzelne repräsentative Versuchsgruppen untersucht werden. Hierzu wurden die Gruppen herangezogen, bei denen aufgrund der Immunisierungs-dosis mit einer Sterblichkeit der Tiere um die 50% zu rechnen war.

Die Untersuchungen wurden ausschließlich bei routinemäßig durchzuführenden anzeigepflichtigen Tierversuchen durchgeführt. Die für diese Versuche erforderlichen Abweichungen vom Versuchsprotokoll (Implantation der Transponder) wurden der zuständigen Überwachungsbehörde mitgeteilt.

Die Körpertemperatur der Mäuse wurde mit Hilfe von Transpondern (IPPT, Fa. PLEXX, Elst, Niederlande) gemessen. Die Transponder wurden unter Narkose subkutan unter die Rückenhaut transplantiert. Die Ablesung erfolgte mit dem Gerät 5004 der Fa. PLEXX. Hierzu wurden die Tiere einzeln vor dem Wiegevorgang mit dem Meßstab untersucht.

Die Körpertemperatur der Mäuse wurde mit Hilfe von Transpondern (IPPT, Fa. PLEXX, Elst, Niederlande) gemessen. Die Transponder wurden unter Narkose subkutan unter die Rückenhaut transplantiert. Die Ablesung erfolgte mit dem Gerät 5004 der Fa. PLEXX. Hierzu wurden die Tiere einzeln vor dem Wiegevorgang mit dem Meßstab untersucht.

Tabelle 1: Kontrollblatt zur Tollwutwirksamkeitsprüfung

Tabelle 1: Kontrollblatt zur Tollwutwirksamkeitsprüfung																															
Tag der ersten Impfung				Mausestamm				Geschlecht				Tag der zweiten Impfung				Alter/Gewicht															
Tag der Infektion				Herkunft																											
Name des Impfstoffes								Ch.-B.:								Dosierung								Impfdosis							
Infektionsstamm								Verdünnung								Passage								Injektionsvolumen							
				Tage nach der Infektion																											
				-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14												
Befund erhoben von	morgens																														
	abends																														
Uhrzeit	morgens																														
	abends																														
Maus-Nr.	Befunde			-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14												
1	Gewicht:																														
	-morgens																														
	-abends																														
	Temperatur:																														
	-morgens																														
	-abends																														
	Symptome:																														
	-gestr. Fell																														
	-verl. Bew.																														
	-Kreisbew.																														
	-Zittern																														
	-Krämpfe																														
	-Parese																														
	-Paralyse																														
-Koma																															

Das Körpergewicht wurde mit Hilfe einer Labortierwaage (LP 2200, Fa. Sartorius) erfasst.

Zur Erfassung der Daten wurde ein Formblatt entwickelt. Neben der Körpertemperatur und dem Gewicht wurde das Auftreten typischer Krankheitszeichen für jedes Tier einzeln dokumentiert (siehe Tab. 1). Die Tiere wurden zweimal täglich kontrolliert.

3 Ergebnisse

In Vorversuchen zeigten sich sowohl bei der Gewichtsentwicklung als auch beim Temperaturverlauf deutliche Schwankungen zwischen den am Morgen und am Nachmittag genommenen Werten. Die zweimalige tägliche Kontrolle brachte für diese Parameter keinen wesentlichen Informationsgewinn. Die Nachmittagskontrolle beschränkte sich deshalb in den weiteren Versuchen auf die Dokumentation der klinischen Zeichen.

Weiterhin wurde festgestellt, daß die Belastung durch die intrazerebrale Injektionstechnik eine geringfügige Gewichtsabnahme und gelegentlich zentralnervöse Störungen, die in der Regel innerhalb von 1-2 Tagen wieder verschwanden, bewirken kann.

Ein Gewichtsverlust war häufig das erste Zeichen der beginnenden Tollwutinfektion. Zwischen dem 4. und 7. Tag nach der Infektion begann die Gewichtskurve abzufallen. Der Gewichtsverlust steigerte sich

rapide und erreichte kurz vor dem Tod 20-40% des Ausgangsgewichtes. Wegen des möglichen injektionsbedingten Gewichtsverlusts zu Beginn des Untersuchungszeitraumes wurde der 3. Tag nach der Injektion als Grundlage für die Berechnung der Gewichtsentwicklung herangezogen.

Die Temperaturkurven der erkrankten Tiere zeigten während der gesamten Versuchsdauer keine Fieberreaktion. Erst zum Ende der Infektion, in der Regel erst während der beiden letzten Tage, wurde ein starker Temperaturabfall deutlich.

Die ersten klinischen Zeichen der Infektion traten in aller Regel zwischen dem 5. und 9. Tag nach der Infektion auf. Der Tod erfolgte 3-5 Tage nach Auftreten der Krankheitszeichen.

Die Tollwuterkrankung zeigt bei der Maus nach der intrazerebralen Infektion einen sehr typischen Verlauf. Die ersten klinischen Erscheinungen treten in Form eines gesträubten Haarkleides und eines leicht aufgekrümmten Rückens auf. Später verlangsamt sich der Bewegungsablauf der Tiere. Bei deutlicher Ausprägung erscheint die Fortbewegung der Tiere wie in Zeitlupe. Dazu kommen häufig noch Kreisbewegungen, die allerdings aufgrund der langsamen Grundbewegung oft erst bei längerer Beobachtung erkennbar sind.

Zittern und Krämpfe sind bei vielen, aber nicht bei allen Tieren ausgebildet.

Deutliche Lähmungserscheinungen der Gliedmaßen, insbesondere der Hinterhand, sind zumindest am Ende der Infektion regelmäßig vorhanden. Die Bewegungslosigkeit führt in einen komatösen Zustand, der noch 24-48 Stunden andauern kann. Die Tiere zeigen in diesem Stadium, neben der deutlichen Gewichtsabnahme, eine ausgeprägte Exsikkose.

Um eine möglichst einheitliche Bewertung zu erhalten und Fehler durch eine subjektive Beurteilung gering zu halten, wurden die typischen Krankheitserscheinungen in Videosequenzen dokumentiert. Der Schweregrad der klinischen Zeichen wurde dann anhand einer Bewertungsskala

Tabelle 2: Bewertung klinischer Zeichen bei der Tollwuterkrankung der Labormaus

Krankheitserscheinung	Bewertungszahl
gesträubtes Fell aufgekrümmter Rücken	1
verlangsamte Bewegung Kreisbewegung	2
Zittern wackliger Gang Krämpfe	3
Lähmungserscheinungen Paralyse	4
Koma	5

Tabelle 3: Übersicht der Untersuchungsergebnisse am Beispiel von 3 Tieren

Maus 1												
Tage nach Infektion	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Klinik	0	0	0	0	0	1	1	1	2	4	5	
Gewicht	27,1	26,7	26,1	26,2	25,7	23,5	21,7	20,1	18,3	17,3	15,8	
Temperatur	38,5	38,4	39,3	38,6	39,0	38,0	37,6	37,4	37,4	36,6	27,4	
Maus 2												
Tage nach Infektion	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Klinik	0	0	0	0	0	2	2	4	5			
Gewicht	24,6	22,3	22,7	21,8	20,3	18,7	17,1	15,4	13,8			
Temperatur	37,6	37,7	37,3	39,0	37,4	37,3	35,2	32,1	25,5			
Maus 2												
Tage nach Infektion	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Klinik	0	0	0	0	0	1	3	4	5			
Gewicht	28,1	26,4	27,4	25,1	23,1	21,2	19,8	18,34	17,0			
Temperatur	38,0	37,1	38,6	38,1	36,9	37,0	36,2	34,4	31,9			
Erläuterungen	Klinik (Bewertung siehe Tabelle 2)	1	Gewicht (bezogen auf Tag 3)	- 10%	Temperatur	< 36°C						
		2 - 5		- 15%		< 34°C						
				- 20%								

Empfehlung: Bei Erreichen einer klinischen Bewertungszahl von ≥ 2 und einem Gewichtsverlust von $\geq 15\%$ könnte der Versuch vorzeitig abgebrochen werden. Dies reduziert die Versuchsdauer und erspart den Tieren die Infektionsphasen mit der höchsten Belastung (dunkel unterlegte Tage)

la in ein Punktesystem übertragen (siehe Tab. 2). Symptome, die nach der Bewertungsskala mit Stufe 2 zu beurteilen sind, können bereits als charakteristisch für die beginnende Tollwutinfektion angesehen werden. Alle Tiere, die diese Anzeichen aufwiesen, sind nachfolgend auch an der Infektion eingegangen.

Ein aggressives Verhalten der Mäuse konnte bei den Untersuchungen in keiner Krankheitsphase festgestellt werden.

4 Diskussion

Bei dem sehr schleichenden Verlauf der Tollwutinfektion bei der Labormaus ist nach den hier durchgeführten Untersuchungen eine klare Festlegung klinischer Endpunkte möglich. Hierbei haben die klinischen Zeichen und die Entwicklung des Körpergewichtes bereits im frühen Krankheitsstadium eine sehr hohe Aussagekraft. In der Tabelle 3 sind die Untersuchungsergebnisse für 3 Tiere exemplarisch zusammengestellt. Legt man die Kriterien Gewichtsverlust (mehr als 15%) und klinische Zeichen (ab Bewertungszahl 2) zu Grunde, ist eine Verkürzung der Versuchsdauer und vor allem der Zeit, in der die Tiere unter dem Versuch besonders leiden, um ca. 3 Tage möglich (schwarz unterlegte Felder in Tab. 3)

Bei den Untersuchungen zum Temperaturverlauf fiel auf, daß bei den Mäusen zu

keinem Zeitpunkt eine Fieberreaktion, wie sie typischerweise bei der Tollwutkrankung des Menschen auftritt, meßbar war. Der Temperaturverlauf zeigte erst gegen Ende des Infektionsgeschehens einen deutlichen Abfall und ist daher als klinischer Endpunkt von nur geringem Wert.

Am Beispiel der Tollwutinfektion wird deutlich, daß klinische Endpunkte einen erheblichen Beitrag zur Leidensbegrenzung der Tiere leisten können. Aus diesem Grund sollten möglichst viele Infektionsmodelle dahingehend überprüft werden. Dabei ist es ratsam, die charakteristischen klinischen Merkmale der Infektion im Foto, oder noch besser im Video, festzuhalten.

Die bisherigen Erfahrungen mit anderen Infektionen (z.B. Rotlauf) zeigen aber, daß eine Festlegung klinischer Endpunkte nicht immer praktikabel ist (Cußler, 1997). Ersatzmethoden zu Infektionsmodellen, wie sie jetzt erstmals in der revidierten Monographie für inaktivierte Tollwutimpfstoffe *ad us. vet.* genannt werden, müssen deshalb auch zukünftig höchste Priorität haben.

Literatur

Balls, M., Goldberg, A. M., Fentem, J. H., Broadhead, C. L., Burch, R. L., Festing, M. F. W., Frazier, J. M., Hendriksen, C. F. M., Jennings, M., van der Kamp, M. D. O., Morton, D. B., Rowan, A. N., Russell, C., Russell, W. M. S., Spielmann, H., Stephens, M. L., Stokes, W. S.,

Straughan, D. W., Yager, J. D., Zurlo, J. and van Zutphen, B. F. M. (1995). The Three Rs: The Way Forward. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 11. *ATLA* 23, 838-866.

Cußler, K. (1997). Impfstoffprüfung: Kann die Bestimmung der Letalitätssrate bei Belastungsversuchen durch eine Ermittlung klinischer Endpunkte ersetzt werden? *Tierlaboratorium* 20, 30-39.

Europäische Arzneibuchkommission (1997a). *Tollwut-Impfstoff für Tiere, Monographie Nr. 451*, Europäisches Arzneibuch, 3. Ausgabe 1997, Amtliche deutsche Ausgabe. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.

Europäische Arzneibuchkommission (1997b). *Tollwut-Impfstoff für Menschen aus Zellkulturen, Monographie Nr. 216*, Europäisches Arzneibuch, 3. Ausgabe 1997, Amtliche deutsche Ausgabe. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.

Danksagungen

Die Durchführung dieser Untersuchungen war nur durch die Mithilfe und den engagierten Einsatz vieler wissenschaftlicher Mitarbeiter, des technischen Personals und der Tierpfleger möglich.

Die Arbeiten wurden im Rahmen eines ECVAM-Forschungsprojektes (*3R Approaches in Vaccine Quality Control*) finanziell unterstützt.

Korrespondenzadresse

Dr. Klaus Cußler
Paul-Ehrlich-Institut, Veterinärmedizin
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
D-63225 Langen