(1996). Regulation of IL-6 expression in porcine immune cells. *Journal of Interferon and Cytokine Research 16*, 289-296.

Tracey, K. and Cerami, A. (1993): Tumor Necrosis Factor: An updated review of its biology. *Critical Care Medicine 21*,415-422.

Webel, D. M., Finck, B. N., Baker, D. H., and Johnson, R. W. (1997). Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *The Journal of Animal Science 75*, 1514-1520.

Zanetti, G., Heumann, D., Gérain, J., Kohler, J., Abbet, P., Barras, C., Lucas, R., Glauser M.-P., and Baumgartner, J.-D. (1993). Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. *The Journal of Immunology 148*, 1890-1897.

Danksagung
Wir danken für die finanzielle Förderung unseres Projektes durch die Stiftung Forschung 3R, CH-Münsingen

Korrespondenzadresse
Martina Ecker, Tierärztin
Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin,
FG 421 - Immunologie
D-07749 Jena

Untersuchungen zur Relevanz der Prüfung auf spezifische Unschädlichkeit an der Zieltierspezies. Ergebnisse bei bakteriellen Impfstoffen im Zeitraum von 1994-1997

Angela Pößnecker und Klaus Cußler
Paul-Ehrlich-Institut, D-63207 Langen

Zusammenfassung
Die gesetzlichen Vorschriften zur Impfstoffprüfung verlangen, daß jede neue Charge auf Unschädlichkeit und Wirksamkeit getestet werden muß. Bei Tierimpfstoffen wird die „Prüfung auf spezifische Unschädlichkeit an der Zieltierspezies" in der Europäischen Pharmakopöe als eine Untersuchung am Endprodukt verlangt. Dieser Tierversuch wird ebenfalls in den „General requirements for the production and control of live mammalian viral and bacterial vaccines (GRLMV)" und den „General requirements for the production and control of inactivated mammalian viral and bacterial vaccines (GRIMV)" der europäischen Union gefordert.
In der Zeit von Januar 1994 bis Dezember 1997 wurden 1934 Chargenfreigaben beim Paul-Ehrlich-Institut im Bereich der bakteriellen Tierimpfstoffe (einschließlich der Kombinationsimpfstoffe mit Virusanteilen), der parasitologischen Impfstoffe, der Pilzimpfstoffe und der Seren beantragt. Die Hersteller benötigten für die Unschädlichkeitsuntersuchung an der Zieltierspezies 5250 Tiere.
Der Wert des Unbedenklichkeitsversuchs am Zieltier wird verschiedentlich in Frage gestellt. Insbesondere ist unklar, ob dieser Tierversuch unter den heutigen Anforderungen an die Qualitätskontrolle von Tierimpfstoffen noch einen wesentlichen Beitrag zur Arzneimittelsicherheit leisten kann. Bisher liegt allerdings noch nicht genügend Datenmaterial zum Unbedenklichkeitsversuch als Diskussionsgrundlage vor.
In dieser Arbeit werden vorläufige Daten einer Untersuchung vorgestellt, die sich mit den Ergebnissen der Prüfung „Prüfung auf spezifische Unschädlichkeit an der Zieltierspezies" bei den in Deutschland zugelassenen bakteriellen Impfstoffen der Jahre 1994 bis 1997 befaßt.

Summary: Evaluation of the relevance of the target animal safety test for the quality control of veterinary immunological medicinal products
The legal requirements for veterinary vaccines require the testing of each new vaccine batch for safety. In the European Pharmacopoeia a target animal safety test (TAST) is regularly required as a final product test for almost all vaccine batches. This test is also required in the „General requirements for the production and control of live mammalian viral and bacterial vaccines (GRLMV)" and the „General requirements for the production and control of inactivated mammalian viral and bacterial vaccines (GRIMV)" by the European Union.
In several publications the relevance of this TAST has been questioned. Particularly, it is questionable whether this animal test is able to give a significant contribution to the safety of immunologicals considering today's standards of the quality control of animal vaccines, e.g. Good manufacturing practice and Good laboratory practice. However, due to a lack of sufficient amount of data the relevance of this animal test is discussed contradictorily.
1934 batch release protocols were sent to the Paul-Ehrlich-Institut between January of 1994 and December of 1997 for bacterial

vaccines including combinations with viral antigens, vaccines against parasitic or fungal diseases and sera. During that period the manufacturers needed 5250 animals to perform the TAST. Obviously, the requirement for the TAST has a great impact on the animal numbers needed for the quality control of veterinary vaccines. The deletion of the TAST as a routine test could reduce the number of animals considerably. Preliminary results of a survey on this problem are presented and discussed.

Keywords: bacterial vaccines, fungal vaccines, parasitic vaccines, immunosera, drug safety, target animal safety test

1 Einleitung

Bei der Qualitätskontrolle von immunologischen Arzneimitteln nehmen Tierversuche noch immer eine zentrale Stellung ein. In der Veterinärmedizin werden zudem Versuche bei allen Tierarten durchgeführt, für die eine Anwendung des Impfstoffes vorgesehen ist. Es kommen daher vom Pferd bis zum Fisch sehr viele unterschiedliche Tierarten zum Einsatz. Die weitaus größten Zahlen dieser Heim- und Nutztiere werden für eine einzige Prüfung, die Prüfung auf Unschädlichkeit an der Zieltierart (englisch: *Target animal safety test*, TAST) benötigt.

Die TAST wird im europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) und von der Europäischen Union (in den GRLMV, GRIMV) als eine Untersuchung am Endprodukt verlangt. Somit muß jede neu hergestellte Impfstoffcharge an mindestens zwei Tieren der Spezies, bei der der Impfstoff angewendet werden soll, auf ihre Unschädlichkeit geprüft werden.

Die gesetzlichen Vorgaben (Ph. Eur. Monographien) zur TAST lassen sich wie folgt zusammenfassen:

▶ Bei Lebend-Impfstoffen wird die 10fache Erregerzahl, bei Tot-Impfstoffen die doppelte Dosis eingesetzt.

▶ Das Alter der Tiere soll entsprechend der Gebrauchsanweisung gewählt werden, meist ist das Mindestimpfalter gefordert.

▶ Die Tiere sollen häufig Antikörper-negativ in bezug auf den entsprechenden Krankheitserreger sein.

▶ Die Injektion soll meistens einmalig, manchmal auch zweimalig durchgeführt werden.

▶ Die Beobachtung beträgt 7 bis 28 Tage bei einmaliger Applikation, und 28 bis 38 Tage bei zweimaliger Injektion.

▶ Teilweise ist gefordert, daß die Temperatur während der Beobachtungszeit gemessen werden muß.

Das Ergebnis der Versuche muß der Forderung entsprechen, daß „nennenswerte lokale oder systemische Reaktionen", bzw. „anomale lokale oder systemische Reaktionen nicht auftreten dürfen". Nennenswert (in der englischen Formulierung „*significant*") bedeutet, daß keine deutlichen Reaktionen auftreten dürfen. Anomal bedeutet, daß Reaktionen im bekannten und in der Gebrauchsinformation festgelegten Umfang auftreten können. Wann, und mit welchem Grund die eine oder andere Formulierung für eine Monographie gewählt wurde, ist unklar.

Inzwischen wird an der TAST als Routineprüfung von mehreren Seiten starke Kritik geübt (Roberts and Lucken, 1996; Zeegers et al., 1997; Weißer and Hechler, 1997). Insbesondere wird angeführt, daß beim heutigen Standard der Anforderungen an die Herstellung und Qualitätskontrolle von immunologischen Arzneimitteln eine solche Prüfung entbehrlich sei. Aussagekräftiges Zahlenmaterial zur TAST liegt bisher allerdings nicht vor. Im Rahmen eines vom BMBF geförderten Forschungsvorhabens soll daher die Relevanz der TAST für die Arzneimittelsicherheit bei immunologischen Veterinärarzneimitteln überprüft werden.

2 Problemstellung

Während der Produktion der ersten Impfstoffe war die Fabrikation schwierig und die Kontinuität der Herstellung nicht immer gegeben. Durch Verunreinigungen oder bei zu starker bzw. zu geringer Erregervermehrung konnten Impfzwischenfälle eintreten. Dies hatte häufig die Einführung neuer Tierversuche zur Folge. Beispielsweise sind Vorläufer der Anomalen Toxizitätsprüfung bereits seit 1906 bekannt. Nach Zwischenfällen mit dem Polio-Lebend-Impfstoff im Jahr 1955 wurde der Neurovirulenztest eingeführt (Hendriksen, 1996).

Es ist uns bisher nicht bekannt geworden, daß spezielle Vorkommnisse im Veterinärbereich für die Einführung der TAST verantwortlich sind. Es muß vielmehr angenommen werden, daß dies der allgemeinen Tendenz früherer Jahre, durch Unschädlichkeitsversuche am Tier eine möglichst große Sicherheit von Arzneimitteln zu gewährleisten, entsprach.

Da die TAST am Zieltier durchgeführt wird, wird ihr naturgemäß eine hohe Aussagekraft zugebilligt. Es kann erwartet werden, daß auch spezies-spezifische Nebenwirkungen (z.B. Sensibilisierungsreaktionen) erkannt werden. Die Problematik von Labortierprüfungen mit der Übertragbarkeit dort erhaltener Ergebnisse auf die eigentliche, für die Anwendung des Arzneimittels vorgesehene Tierart, entfällt. Tot-Impfstoffe enthalten außer dem Antigen noch andere Substanzen, wie z.B. Adjuvantien, die teilweise keiner chemischen Analytik unterzogen werden können. Hier könnte die TAST schädliche Nebenwirkungen dieser Substanzen aufzeigen. Bei attenuierten Lebend-Impfstoffen kann die TAST nachweisen, ob der Attenuierungsgrad des Erregers gewährleistet ist.

Andererseits ist offenkundig, daß die geringe Anzahl von Prüflingen keine allzu große Aussage für die Gesamtzahl der mit dem entsprechenden Impfstoff behandelten Tiere haben kann. Weiterhin wird angeführt, daß die Prüfung in der Praxis fast immer bestanden wird (in Ausnahmefällen mußte der Versuch aus Gründen, die nicht mit der Impfstoffanwendung in Zusammenhang standen, wiederholt werden) und der Aufwand an Tieren im Verhältnis zur Aussagekraft des Testes viel zu hoch sei.

Die TAST ist einerseits in den europäischen Requirements und der allgemeinen Arzneibuchmonographie Nr. 62 „Impfstoffe für Tier" als Routinetest angelegt. Dies gilt für die Impfstoffe, für die (noch) keine eigene Monographie erarbeitet wurde. Dies sind in der Regel neuartige Produkte oder Impfstoffe gegen vergleichsweise seltene Erkrankungen. Es handelt sich in diesen Fällen also um eine allgemeine Anforderung, die unabhängig von der Art des Impfstoffs ist.

Andererseits wird die TAST aber ausdrücklich in den speziellen Arzneibuchmonographien zu den jeweiligen Impfstoffen gefordert. Hier werden dann häufig Abweichungen von der allgemeinen Vorschrift in der Monographie Nr. 62 festge-

legt. Bei *E. coli*-Impfstoffen beispielsweise mußte (laut allgemeiner Vorschrift) die Prüfung über 2 Wochen dokumentiert werden. Nach Inkrafttreten der neuen Monographien im Jahr 1995 dauert der Test jetzt doppelt so lange, weil nunmehr für *E. coli*-Produkte eine Wiederholungsimpfung gefordert ist. (Monographie-Nr. 962 für Schwein, Monographie-Nr. 961 für Wiederkäuer).

Von der bei Säugerimpfstoffen geforderten Mindestzahl von 2 Tieren wird bei Geflügel- und Fischimpfstoffen deutlich abgewichen. Hier werden meist 10 oder mehr Küken bzw. Hühner eingesetzt. Bei Fischen sind die Zahlen noch höher und beginnen bei 30 Tieren je Prüfung.

Zur Bearbeitung dieser komplexen Thematik wird eine Datensammlung zu diesen Tierversuchen angelegt. In einer ersten Phase wird die TAST bei allen im Zeitraum vom Januar 1994 bis Dezember 1997 von den Herstellern eingereichten Impfstoffchargen bakterieller Impfstoffe (einschließlich der Kombinationsprodukte mit viraler Komponente), Parasiten- und Pilzimpfstoffe sowie der Immunseren ausgewertet. In der zweiten Phase werden die rein viralen Präparate beurteilt.

3 Ergebnisse

Von Januar 1994 bis Dezember 1997 wurden bei bakteriellen Mono- und Kombinationsimpfstoffen sowie bei Parasiten- und Pilzimpfstoffen 1.934 Chargen zur staatlichen Prüfung beim Paul-Ehrlich-Institut eingereicht. Hierfür wurden insgesamt 5.250 Tiere der unterschiedlichsten Spezies benötigt (siehe Tabelle 1).

In Tabelle 2 sind beispielhaft die Angaben bezüglich einiger Arzneibuchmonographien zu speziellen Impfstoffen zusammengestellt

Die Prüfung entsprach in allen Fällen den Anforderungen. Bei 6 Untersuchungen (ca. 0,3% der Prüfungen) wurde eine Wiederholungsprüfung aus Gründen, die nicht mit der Impfstoffanwendung in Zusammenhang standen (z.B. Verletzungen während des Versuchszeitraums), erforderlich.

Bei der Erfassung der Tierzahlen ergaben sich zahlreiche Probleme. Bei Kombinationsimpfstoffen, welche die Anforderungen mehrerer Monographien erfüllen müssen, wird der Tierversuch naturgemäß nicht für jede Einzelkomponente separat

Tabelle 1: Teirzahlen und Prüfvorschriften zur Prüfung auf spezifische Unschädlichkeit, ermittelt an Hand der in Deutschland zwischen Januar 1994 und Dezember 1997 eingereichten Chargenunterlagen für Bakterien-, Pilz- und Parasitenimpfstoffe (einschließlich der Kombinationsprodukte) sowie der Immunseren

Tierart	Ph. Eur. Monographien und EU-Requirements	Tierzahl
Pferd	Impfstoffe für Tiere, Nr. 62 Specific Requirements for the Production and COntrol ,of Equine Live and Inactivated Viral and Bacterial Vaccines Specific Requirements for the Production and Control of Immunosera ans Colostrum Subtitutes	116
Schwein	Schweinerotlauf-Impfstoff (inaktiviert), Nr. 64 Schweinerotlauf-Serum, Nr. 342 Clostridium-Perfringens-Impfstoff für Tiere, Nr. 363 Colibazillosis-Impfstoff für neugeborene Ferkel (inaktiviert), Nr. 962 Impfstoffe für Tiere, Nr. 62 Specific Requirements for the Production and Control of Pig Live and Inactivated Viral and Bacterial Vaccines Specific Requirements for the Production and Control of Immunosera and Colostrum Substitutes	867
Rind	Clostridium-Chauvoei-Impfstoff für Tiere, Nr. 361 Colibazillosis-Impfstoff für neugeborene Wiederkäuer (inaktiviert), Nr. 961 Impfstoffe für Tiere, Nr. 62 Specific requirements for the production and control of bovine live and inactivated viral and bacterial vaccines Specific requirements for the production and control of immunosera and Colostrum substitutes	361
Schaf	Clostridium-Chauvoei-Impfstoff für Tiere, Nr. 361 Clostridium-Novyi-(Typ B)-Impfstoff für Tiere, Nr. 362 Clostridium-Perfringens-Impfstoff für Tiere, Nr. 363 Pararauschbrand-Impfstoff, Nr. 364 Impfstoffe für Tiere, Nr. 62 Specific requirements for the production and control of ovine and caprine live and inactivated viral and bacterial vaccines Specific requirements for the production and control of immunosera and Colostrum substitutes	82
Hund	Leptospirose - Impfstoff für Tiere, Nr. 447 Impfstoffe für Tiere, Nr. 62 Specific requirements for the production and control of live and inactivated viral and bacterial vaccines for dogs and cats Specific requirements for the production and control of immunosera and Colostrum substitutes	1006
Katze	Impfstoffe für Tiere, Nr. 62 Specific requirements for the production and control of live and inactivated viral and bacterial vaccines for dogs and cats	60
Kaninchen	Impfstoffe für Tiere, Nr. 62 General requirements for the production and control of inactivated mammalian bacterial and viral vaccines for veterinary use	9
Nerz	Botulismus-Impfstoff für Tiere, Nr. 360 Impfstoffe für Tiere, Nr. 62 General Requirements for the Production and Control of Inactivated Mammalian Bacterial and Viral Vaccines for Veterinary Use	4
Huhn	Impfstoffe für Tiere, Nr. 62 Specific requirements for the production and control of avian live and inactivated viral and bacterial vaccines	2260
Taube	Impfstoffe für Tiere, Nr. 62 Specific requirements for the production and control of avian live and inactivated viral and bacterial vaccines	100
Gans / Ente	Impfstoffe für Tiere, Nr. 62 Specific Requirements for the production and control of avian live and inactivated viral and bacterial vaccines Specific requirements for the production and control of immunosera and Colostrum substitutes	25
Fisch (Forelle)	Impfstoffe für Tiere, Nr. 62 Specific requirements for the production and control of live and inactivated vaccines intended for fish	360
Gesamttierzahl im Untersuchungszeitraum		5250
Jährlicher Durchschnitt		1312

Tabelle 2: Angaben zu speziellen Arzneibuch-Monographien im Untersuchungszeitraum: Januar 1994 und Dezember 1997

Ph. Eur. Monographie	Tierart	Anzahl Impfstoffe*	Anzahl Chargen	Anzahl Tiere	Anzahl Impfdosen
Clostridium - Perfringens - Impfstoff für Tiere, Nr. 363	Schaf	3	23	44	15.061.000
	Schwein	2	16	30	1.838.895
Leptospirose-Impfstoff für Tiere, Nr. 447	Hund	35	547	938	13.821.123
Colibazillosis-Impfstoff für neugeborene Wiederkäuer (inaktiviert), Nr. 961	Rind	5	59	78	3.002.959
Colibazillosis-Impfstoff für neugeborene Ferkel (inaktiviert), Nr. 962	Schwein	10	118	148	18.815.755
Schweinerotlauf-Impfstoff (inaktiviert), Nr. 64	Schwein	10	141	197	22.734.065
Impfstoffe für Tiere, Nr. 62: Rotlauf, Lebendimpfstoff	Schwein	2	23	44	3.901.075
Impfstoffe für Tiere, Nr. 62: Trichophytie	Rind	6	62	92	7.562.200

*** einschließlich der Kombinationsimpfstoffe**

angesetzt. Hier wird dann üblicherweise der Versuch mit der längsten Dauer und der höchsten Dosierung angesetzt. Eine genaue Zuordnung der Tierzahlen zu den einzelnen Impfstoffmonographien ist in diesen Fällen nicht möglich. Die Tiere wurden dann bei jeder für den Impfstoff zutreffenden Monographie gezählt. Hierdurch ergeben sich Abweichungen zwischen der verwendeten Gesamttierzahl in Tabelle 1 und der Addition der Tierzahlen bei den einzelnen Monographien in Tabelle 2.

Andererseits wird die Prüfung bei einigen Präparaten nicht am Endprodukt, sondern bereits am Impfstoffbulkmaterial durchgeführt. Da aus einem Bulk meistens mehrere Chargen abgefüllt werden, ist hier die gefundene Tierzahl geringer, als es sich rein rechnerisch aus der Chargenanzahl und der erforderlichen Mindesttierzahl ergibt. Das Gleiche trifft für bezugnehmende Chargen (Produkte, die in unterschiedlichen Behältnisgrößen angeboten werden oder unter verschiedenen Handelsnamen in Verkehr kommen) zu.

Einige Hersteller verwenden zusätzlich Kontrolltiere oder überschreiten die geforderte Mindesttierzahl.

4 Diskussion

Die TAST ist eine Routineprüfung für Veterinärimpfstoffe. Es werden zwar nur relativ wenige Tiere für eine Prüfung benötigt, und die Belastung im Versuch ist als gering einzustufen. Die insgesamt hohe Anzahl von Chargen führt dennoch zu dem hohen jährlichen Gesamtbedarf von mehr als 1.300 Tieren bei den bisher untersuchten Produktgruppen. Die TAST ist zudem zeitaufwendig und (abhängig von der einzusetzenden Tierart) sehr teuer.

Die Auflistung der Tierzahlen, die für die TAST bei den bisher untersuchten Produktgruppen benötigt werden, macht deutlich, wie hoch der Anteil an landwirtschaftlichen Nutztieren, aber auch an Hunden und Katzen, für diese Prüfbestimmung ist. Die in Tabelle 1 aufgelisteten Zahlen berücksichtigen noch nicht die reinen Virusimpfstoffe. Die Gesamtzahlen (insbesondere bei den landwirtschaftlichen Nutztieren) werden hier noch deutlich höher liegen.

Obwohl der TAST ein gemeinsames Grundkonzept zugrunde liegt, wird die Prüfung in zahlreichen speziellen Arzneibuchmonographien modifiziert (Weißer and Hechler, 1997). Diese Abweichungen lassen größtenteils keinen fachlichen Hintergrund erkennen. Hierdurch ist es notwendig, die Erfassung der Daten für jede Arzneibuchmonographie gesondert durchzuführen.

Die bisher ausgewerteten Unterlagen wurden von den Impfstoffherstellern bei der Einreichung zur Chargenprüfung vorgelegt. Diese Unterlagen enthalten logischerweise keine Prüfergebnisse, die zu einer Rückweisung durch die interne Qualitätskontrolle geführt haben. Es sind daher Nachfragen bei den Herstellern notwendig, um den Umfang und die Gründe derartiger firmeninterner Zurückweisung zu erfahren. Alle Hersteller haben ihre Bereitschaft zur Zusammenarbeit bekundet.

Weiterhin müssen noch die im Untersuchungszeitraum angefallen Pharmacovigilance-Meldungen überprüft werden, um festzustellen, in welchem Umfang Nebenwirkungsmeldungen bei Tierimpfstoffen, die in der TAST unauffällig waren, aufgetreten sind.

Eine Schlußfolgerung ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, da noch nicht genügend Material bewertet werden konnte, um eine generelle Aussage über den Wert dieser Unschädlichkeitsprüfung machen zu können. Die bisherigen Ergebnisse bestärken jedoch die kritische Aussage von Roberts und Lucken (1996) sowie von Zeegers und Mitarbeitern (1997) zu dieser Prüfbestimmung.

Literatur

Europäische Arzneibuchkommission, Europäisches Arzneibuch, 3. Ausgabe 1997. Amtliche deutsche Fassung. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.

European Commission, The Rules governing Medicinal Products in the European Union, Volume VII, Guidelines for the Testing of Veterinary Medicinal Products, July 1994

Hendriksen, C. F. M. (1996): A Short History of the Use of Animals in Vaccine Development and Quality Control. In F. Brown, K. Cussler and C. Hendriksen (eds.), *Replacement, reduction and refinement of animal experiments in the development and control of biological products* (3-10). Basel: Karger Verlag.

Roberts, B. and Lucken, R. N. (1996). Reducing the Use of the Target Animal Batch Safety Test for Veterinary Vaccines. In F. Brown, K. Cussler and C. Hendriksen (eds.), *Replacement, Reduction and Refinement of Animal Experiments in the Development and Control of Biological Products* (97-102). Basel: Karger Verlag.

Weißer, K. and Hechler, U. (1997). *Animal Welfare Aspects in the Quality Control of Immunologicals, a critical Evaluation of the Animal Tests in Pharmacopoeial Monographs*. Nottingham: FRAME.

Zeegers, J. J. W., Vries, de, W. F. and Remie, R.(1997). Reducing the use of animals by abolishment of the safety test as a routine batch control test on veterinary vaccines. In L. F. M. B. van Zutphen and M. Balls (eds.), *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. (1003-1005). Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Science Publishers B.V.

Danksagung

Diese Arbeit wird vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie finanziert (BMBF-Projekt-Nr. 0311 423).

Korrespondenzadresse

Dr. Angela Pößnecker
Paul-Ehrlich-Institut,
Abteilung Veterinärmedizin
Paul-Ehrlich-Str. 51 - 59
D-63225 Langen
Tel.: +49-6103-778051
Fax: +49-6103-771254
E-mail: Poessnecker@em.uni-frankfurt.de

Entwicklung eines Lymphozytentransformationstests für die Überprüfung von Fischimpfstoffen

Ralf Peter Pund, Katrin Nold und Elke Henrion
Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), D-Berlin

Zusammenfassung

Ziel des Forschungsvorhabens ist es, die für die Impfstoffchargen-Überprüfung notwendigen und gesetzlich vorgeschriebenen Letalchallengeversuche bei Fischen durch einen in vitro Test (Lymphozytentransformationstest, LTT) zu ersetzen.
Für die Entwicklung des LTT als in vitro Testsystem müssen folgende zwei Fragen beantwortet werden: Reagieren die Lymphozyten von geimpften Fischen anders als die von ungeimpften Fischen, wenn sie mit einem Antigen konfrontiert werden (antigener-mitogener Effekt)? Gibt es eine Korrelation zwischen der Reaktion der Zellen in der Zellkultur und den Ergebnissen der Letalchallengeversuche, d.h. korreliert eine hohe Reaktivität der Lymphozyten mit einem Schutz der Vakzine gegenüber Infektionen?
Für die Etablierung des LTT mußten als Vorbedingungen eine geeignete Blutentnahmetechnik und eine Separationsmethode gefunden werden, um die Lymphozyten aus dem Vollblut zu isolieren. Da die Stimulationsbereitschaft von Lymphozyten von einer Vielzahl von exogenen (kulturelle Versuchsbedingungen) Einflußgrößen beeinflußt wird, wurde überprüft, welche kulturellen Ansprüche Fischlymphozyten besitzen. Weiterhin wurde getestet, inwieweit der sog. MTT-Reduktionstest (Mikrotetrazoliumtest) für die Sichtbarmachung und Quantifizierung der Zellproliferation geeignet ist.

Summary: Testing fish vaccines with an in vitro lymphocyte blastogenesis assay
Lethal-challenge experiments are provided by German law till now for testing fish vaccines. Finding an in vitro-assay which could replace this experiments was subject of our work.
Two questions must have been answered to develop the lymphocyte blastogenesis assay: Do lymphocytes of immunised fish react the same way as lymphocytes of naive fish, being incubated with antigen and is there a coherence between the lymphocyte's in-vitro-response and the immune status of challenged fish.
Methods to take blood samples from anaesthetised fish and to obtain lymphocytes by centrifugation on gradients were worked out and the lymphocyte's demands on culture requirements were evaluated thoroughly because the ability to proliferate depends on many exogenous parameters. Proliferation was represented and measured by a tetrazolium based colorimetric assay (MTT).

Keywords: fish vaccines, cellular immune reactivity, lymphocyte proliferation, MTT