

**VALIDIERUNG DER WIRKSAMKEITSPRÜFUNG
FÜR *CLOSTRIDIUM TETANI* IMPFSTOFFE
AD USUM VETERINARIUM DURCH DEN
DIREKTEN NACHWEIS VON TETANUS-
ANTITOXIN IM ZIELTIER MITTELS ELISA**

UTE ROßKOPF

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. biol. anim.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Institut für Hygiene- und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

und

dem Paul-Ehrlich-Institut
Bundesamt für Sera und Impfstoffe, Langen
Betreuer: Priv. Doz. Dr. A. Hoffmann

**Validierung der Wirksamkeitsprüfung
für *Clostridium tetani* Impfstoffe
ad usum veterinarium durch den
direkten Nachweis von Tetanus-Antitoxin
im Zieltier mittels ELISA**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. biol. anim.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Ute Roßkopf

Biologin aus Münster (Hessen)

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Priv. Doz. Dr. A. Hoffmann

Tag der Disputation: 22. Januar 2007

meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	2
2.1	<i>Clostridium (C.) tetani</i>	2
2.1.1	Wirkungsweise des Tetanospasmins (Tetanusneurotoxin)	4
2.1.2	Tetanolysin	6
2.2	Tetanus-Impfstoffe	7
2.2.1	Historische Betrachtung	7
2.2.2	Herstellung	8
2.2.3	Adjuvantien	9
2.2.4	Impfstoff-Neuentwicklungen	10
2.3	Wertbemessung von Antitoxinen und Impfstoffen	11
2.4	Protektiver Antitoxin-Titer	11
2.5	Wirksamkeitsprüfung im Rahmen der Zulassung	13
2.6	Ausgangssituation zum Ersatz des Tierversuchs	14
3	MATERIAL und METHODEN	16
3.1	Impfstoffe: Zusammensetzung, Dosierung und Anwendung	16
3.1.1	Pferde-Impfstoffe	16
3.1.2	Schaf-Impfstoffe	18
3.2	Versuchstiere	20
3.2.1	Pferde	20
3.2.2	Impf- und Blutentnahmeschemata beim Pferd	20
3.2.3	Schafe	22
3.2.4	Impf- und Blutentnahmeschemata beim Schaf	22
3.2.5	Untersuchung auf Kreuzreaktivität (Schaf)	23
3.3	Prüf- und Referenzsubstanzen	23
3.3.1	Interne Referenzseren (Pferd)	23
3.3.2	Interne Referenzseren (Schaf)	23
3.3.3	WHO-Standard „Tetanus-Antitoxin“	24
3.3.4	NIBSC-Standard „Tetanus-Antitoxin“	24
3.3.5	Tetanustoxoid	24
3.3.6	Biotin-markiertes Tetanustoxoid	24
3.4	Puffer und Lösungen	25
3.5	Entwicklung, Optimierung und Validierung der ELISAs	26
3.6	Nachweis von Tetanus-Antitoxin in Pferdeseren	28
3.6.1	Doppel-Antigen ELISA (DAE) zum Nachweis von Tetanus-Antitoxin in Pferdeseren	28
3.6.2	Indirekter ELISA zum Nachweis von Tetanus-Antitoxin in Pferdeseren	29

3.7	Nachweis von Tetanus-Antitoxin in Schafseren	30
3.7.1	DAE zum Nachweis von Tetanus-Antitoxin in Schafseren	30
3.7.2	Indirekter ELISA zum Nachweis von Tetanus-Antitoxin in Schafseren	31
3.8	Berechnung der ELISA Einheiten	32
3.9	Überprüfung ausgewählter Testseren im Mäuseneutralisationstest	33
4	ERGEBNISSE	34
4.1	Bestimmung der relativen Wirkstärke	34
4.2	Überprüfung des WHO-Standards „Tetanus-Antitoxin“ 2 I.E.	34
4.3	Bestimmung der Wirkstärke des internen Referenzserums vom Pferd	35
4.4	Bestimmung der Wirkstärke des internen Referenzserums vom Schaf	35
4.5	ELISA Ergebnisse	36
4.5.1	Testspezifität	36
4.5.2	Testsensitivität	36
4.5.3	Festlegung der Spezifikationen für den Doppel-Antigen ELISA Pferd	36
4.5.4	Festlegung der Spezifikationen für den indirekten ELISA Pferd	36
4.5.5	Ergebnisse des Nachweises von Tetanus-Antitoxin in Pferdeseren durch den Doppel-Antigen ELISA und den indirekten ELISA	37
4.5.5.1	Ergebnisse der Serumuntersuchungen nach zweiter Impfung	45
4.5.5.2	Vergleich der Ergebnisse von Doppel-Antigen ELISA und indirektem ELISA (Pferd)	46
4.5.5.3	Vergleich der Ergebnisse der Impfstoffgruppen P4 und P5	49
4.5.5.4	Vergleich der Ergebnisse der Impfstoffgruppen P4 und P8	50
4.5.5.5	Vergleich der Tetanus-Antitoxin-Titer aller Impfstoffgruppen P1 bis P10 nach zweiter Impfung	51
4.5.6	Festlegung der Spezifikationen für den Doppel-Antigen ELISA Schaf	53
4.5.7	Festlegung der Spezifikationen für den indirekten ELISA Schaf	53
4.5.8	Ergebnisse des Nachweises von Tetanus-Antitoxin in Schafseren durch den Doppel-Antigen ELISA und den indirekten ELISA	53
4.5.8.1	Verlauf der Antitoxin-Titer innerhalb der Schafgruppen S1 bis S7	59
4.5.8.2	Verlauf der Antitoxin-Titer der Schafgruppe S8 über zwei Jahre	61
4.5.8.3	Korrelationskoeffizienten von Doppel-Antigen ELISA und indirektem ELISA (Schaf)	62
4.5.8.4	Vergleich der Tetanus-Antitoxin-Titer aller Impfstoffgruppen S1 bis S8 nach zweiter Impfung	64
4.5.8.5	Ergebnisse der Untersuchung auf Kreuzreaktivität	65
4.6	Ergebnisse der Überprüfung einzelner Testseren im Mäuseneutralisationstest (<i>in vivo</i>)	66
5	DISKUSSION	69
5.1	Zur Aufgabenstellung	69
5.2	Probleme beim Vergleich von Doppel-Antigen ELISA und indirektem ELISA	71

5.3	Tetanus-Antitoxin-Status nach Grundimmunisierung (Pferd und Schaf)	73
5.4	Vergleich der Immunogenität verschiedener Impfstoffe im Pferd	74
5.4.1	Adjuvanseinfluss auf die Immunantwort	75
5.4.2	Einfluss mono- und polyvalenter Impfstoffe auf die Immunantwort	76
5.4.3	Vergleich der Immunantworten bei verschiedenen Pferderassen	77
5.4.4	Antitoxin-Status der Pferde zu Beginn der Immunisierungsversuche	77
5.5	Antikörperinduktion der verschiedenen Impfstoffe im Schaf	78
5.5.1	Einfluss des Adjuvans beim Schaf	79
5.5.2	Vergleich monovalenter Impfstoffe mit Kombinationsimpfstoffen	80
5.5.3	Kreuzreaktivität	80
5.6	Induktion protektiver Antikörper	81
5.7	Anwendbarkeit für Prüfbehörden und Impfstoffhersteller	82
5.8	Anwendbarkeit für die Diagnostik	83
6	ZUSAMMENFASSUNG	84
7	SUMMARY	86
8	LITERATURVERZEICHNIS	88
9	ANHANG	95
9.1	Abkürzungsverzeichnis	95
9.2	Beispiel CombiStats-Kalkulationsmodell	96
9.3	Datentabellen der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im Pferd	97
9.3.1	bis 9.3.10 Ergebnisse der Gruppen P1 bis P10	
9.4	Datentabellen der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im Schaf	107
9.4.1	bis 9.4.8 Ergebnisse der Gruppen S1 bis S8	
9.5	Statistical Analysis Software - Output des Vergleichs P4 versus P5	111
9.6	Statistical Analysis Software - Output des Vergleichs P4 versus P8	112
9.7	Statistical Analysis Software - Output, ANCOVA, Pferde-Impfstoffe	113
9.8	Statistical Analysis Software - Output der Clusteranalyse der Impfstoffgruppen Pferd	114
9.9	Statistical Analysis Software - Output, ANOVA, Schaf-Impfstoffe	115
9.10	Statistical Analysis Software - Output der Clusteranalyse der Impfstoffgruppen Schaf	116
9.11	Liste der Impfstoffhersteller und <i>in-vivo</i> Prüflabore	117
9.12	Liste der Kooperationspartner	118

1 EINLEITUNG

Die durch Clostridientoxine hervorgerufenen Intoxikationen stellen insbesondere für die Haustiere Pferd und Schaf eine erhebliche gesundheitliche Gefährdung dar. Aus diesem Grund kommt der Immunprophylaxe dieser Tiere mittels eines Toxoidimpfstoffs auf der Basis von *Clostridium tetani* eine außerordentliche praktische Bedeutung zu.

Für die Zulassung von Tetanus-Impfstoffen werden Versuche zum Nachweis der Belastbarkeit des Impfschutzes bei allen relevanten Tierarten gefordert. Aus Tierschutzgründen wird auf einen Belastungsversuch mit Tetanustoxin im Pferd oder Schaf zur Prüfung der Wirksamkeit verzichtet. Stattdessen erfolgt eine indirekte Prüfung auf Wirksamkeit durch Bestimmung der Tetanus-Antitoxin-Titer mit einem Toxinneutralisationstest (TNT) in Mäusen oder Meerschweinchen. Hierfür wird die Serumverdünnung, die notwendig ist, um Mäuse oder Meerschweinchen gegen die toxische Wirkung einer bestimmten Dosis Tetanustoxin zu schützen, mit einer Standardzubereitung von Tetanus-Antitoxin durch Vergleich ermittelt. Die dabei festgestellten Antitoxin-Titer werden aufgrund von Literaturangaben über protektive Tetanus-Antitoxin-Titer bewertet. Ein solcher Toxinbelastungstest ist mit großem Leiden für die Labortiere verbunden. Der Versuch erstreckt sich über mehrere Tage und endet für die Hälfte der Tiere tödlich. Außerdem handelt es sich um eine sehr arbeits-, zeit- und kostenintensive Methode mit einem hohen Tierbedarf. Das Testprinzip entspricht dem Toxinneutralisationstest zur Bestimmung der Wirksamkeit von Tetanus-Impfstoffen im Rahmen der Chargenprüfung mit der Methode A, die in der Monographie (0697) "Tetanus-Impfstoff für Tiere" letztmalig in der 4. Ausgabe [1] beschrieben ist. Entsprechend der überarbeiteten Monographie „Tetanus-Impfstoff für Tiere“, gültig seit dem 1. Januar 2003 [2], ist die Bestimmung der Wirksamkeit für die Chargenprüfung durch eine geeignete immunchemische Methode zu belegen.

Eine ursprünglich ausgewählte Testmethode [3], der Toxin-Bindungs-Inhibitionstest (ToBI), schien auch für die Wirksamkeitsprüfung von Tetanus-Impfstoffen im Rahmen der Zulassungsverfahren geeignet, da die Seren verschiedener Tierarten (Speziesunabhängigkeit) in diesem ELISA-System untersucht werden können. Für

die Chargenprüfung wurde der Test mittlerweile als Alternativmethode in die Veterinärmonographie „Tetanus-Impfstoff für Tiere“ [2] aufgenommen. Der ToBI erwies sich jedoch in Voruntersuchungen für den anvisierten Zweck als weniger geeignet.

In einem ebenfalls speziesunabhängigen System, einem so genannten Doppel-Antigen ELISA (DAE), untersuchten Kristiansen et al. [4] Humanseren auf ihren Tetanus-Antitoxin-Gehalt. Der Vergleich der Ergebnisse von DAE und Toxinneutralisationstest im Labortier ergab eine sehr gute Übereinstimmung.

Im Hinblick auf das Projektziel erwies sich die Methode des Doppel-Antigen ELISA als zweckmäßig und wurde deshalb für Bestimmungen des Gehaltes an Tetanus-Antitoxin bei Pferd und Schaf angestrebt. Zur Überprüfung und Einschätzung der Ergebnisse sollten die Seren in einem weiteren, speziesabhängigen indirekten ELISA getestet werden. Dafür wurden jeweils ein indirekter ELISA für Pferd- und für Schafsera etabliert.

2. SCHRIFTTUM

2.1 *Clostridium (C.) tetani*

Aktuell sind unter der Gattung *Clostridium* mehr als 150 sehr heterogene Arten beschrieben [5]. Die Klassifizierung von Prokaryonten basiert in der aktuellen Ausgabe von Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [6] auf dem Vergleich der 16S rDNA. Taxonomisch wird die Gattung „*Clostridium*“ der Domäne „Bakterien“, Phylum BXIII „*Firmicutes*“, Klasse 1 „*Clostridia*“, Gattung I „*Clostridium*“ zugeordnet [7]. Unter dem Stamm „*Firmicutes*“ sind grampositive Bakterien mit einem niedrigem Gehalt an Guanin (G) und Cytosin (C) in der DNA zusammengefasst.

Clostridium tetani ist ein stäbchenförmiges, grampositives, anaerobes Bakterium mit einer Größe von ca. 0,8 x 2,5 µm. Als anaerober Sporenbildner gehört es zur Substratgruppe der Pepto-Clostridien [8]. Serologisch werden zehn Typen unterschieden. Im Jahr 2003 wurde die komplette Genomsequenz von *C. tetani* publiziert [9]. Das Genom besteht aus 2799250 Basenpaaren mit 2372 offenen

Leserahmen. Das Tetanusneurotoxin ist plasmidcodiert und setzt sich aus 74082 Basenpaaren mit insgesamt 61 offenen Leserahmen zusammen, deren Guanin- und Cytosingehalt 24,5 % beträgt. Ebenfalls auf dem Plasmid befinden sich die Gene des Transkriptionsregulators des Neurotoxins sowie ein weiterer Virulenzfaktor, eine 114 kDa Kollagenase, die vermutlich für die Zersetzung des Gewebes nach Infektion verantwortlich ist.

Nicht der Erreger selbst, sondern das gebildete Neurotoxin Tetanospasmin (Tetanustoxin) verursacht den so genannten Starrkrampf oder Wundstarrkrampf, eine akut oder subakut verlaufende Erkrankung. Bei ca. 37 °C und anaerober Atmosphäre bestehen optimale Wachstumsbedingungen. Der ubiquitär vorkommende Erreger wird über Verletzungen der Haut oder Schleimhaut (auch bei Verbrennungen oder nach operativen Eingriffen) in den Körper eingebracht. Das Neurotoxin wird durch Autolyse freigesetzt. Das Krankheitsbild zeichnet sich durch einen spastisch-tonischen Dauerkrampf der quergestreiften Muskulatur aus.

Die klinischen Symptome beim Pferd zeigen sich nach durchschnittlich acht bis zehn Tagen und beginnen mit Steifheit bei der Lokomotion sowie indifferenten Krämpfen infolge äußerer Reize. Im weiteren Verlauf verstärken sich die Symptome mit Trismus, Nickhautvorfall, Schluckbeschwerden und einer sägebockartigen Körperhaltung [10,11]. Zusätzlich können Harn- und Kotverhalt, Störungen der Herz- und Atemfunktion sowie Hyperthermie hinzukommen. Die Diazepamgabe stellt zunächst die wichtigste medikamentöse Maßnahme dar [10,11]. Das weitere Vorgehen besteht in der Verabreichung hochdosierter Antibiotika, der Toxinneutralisation durch Gabe von Tetanus-Antitoxin (im frühen Stadium, um noch frei zirkulierendes Toxin zu binden) und bei auffindbarer Wunde mit entsprechender Wundversorgung.

Die Todesraten durch Tetanusintoxikationen sind bei Pferd und Schaf sehr hoch. Die Mortalität wird mit Werten zwischen 45 % und 90 % angegeben [12,13]. Vörös et al. [11] behandelten über einen Zeitraum von 12 Jahren 50 erkrankte Pferde und konnten 41% der Tiere retten. Aslani et al. [14] berichteten über einen Ausbruch von Tetanus nach der Fixierung von Ohrmarken in 19 Lämmern nicht geimpfter Muttertiere, von denen 18 Tiere verstarben.

Nur eine aktive Immunisierung schützt gegen das Tetanustoxin. Ein überstandener klinischer Tetanus vermag dies nicht. Daher sollte eine Tetanusprophylaxe generell zur Gesunderhaltung von Pferden und Schafen erfolgen.

2.1.1 Wirkungsweise des Tetanospasmins (Tetanusneurotoxin)

Das Neurotoxin Tetanospasmin wird neben dem Tetanolysin, einem sauerstofflabilen Hämolysin sowie einem nicht spasmogenen Toxin von *C. tetani* gebildet und aus der Zelle freigesetzt. Damit ist es der Gruppe der bakteriellen Exotoxine zuzuordnen. Innerhalb dieser Gruppe zählt es zu den Toxinen, die im Cytosol der Wirtszelle ihre Wirkung entfalten.

Das Tetanospasmin wird als einzelne, inaktive Polypeptidkette von etwa 150 kDa synthetisiert. Die genetische Information des Tetanusneurotoxins ist auf einem Plasmid hinterlegt [15]. Die Freisetzung aus dem Bakterium erfolgt mittels Autolyse durch eine Protease. Das Enzym spaltet die Disulfidbrücke des Tetanospasmins, das aus einer schweren H-Kette (engl.: heavy) von ca. 100 kDa und einer leichten L-Kette (engl.: light) von ca 50 kDa besteht [16]. Die H-Kette setzt sich aus einer N-terminalen Domäne (H_N) sowie einer C-terminalen Domäne (H_C) zusammen. Letztere wird nochmals in die Subdomänen H_C-C und H_C-N unterteilt [17,18].

Der Verlauf der Intoxikation ist in vier Prozesse gegliedert, der die Bindung an die Zelle, die Internalisierung, die Membrantranslokation und die enzymatische Wirkung im Cytosol umfasst [19]. Die neurospezifische Bindung (Bindung an die Membran des Motoneurons) und die Aufnahme in Vesikel erfolgt über die H_C-C -Subdomäne [17]. Unter den Clostridien-Neurotoxinen zeigt diese Subdomäne im Gegensatz zur H_C-N -Subdomäne eine starke Divergenz in der Aminosäurezusammensetzung. Auf diese Divergenz ist wahrscheinlich der Transport von Tetanustoxin und Botulismustoxin zu verschiedenen Wirkorten zurückzuführen: So verbleibt das Botulismustoxin in Vesikeln in der Synapse des α -Motoneurons, während das Tetanusneurotoxin nach der Endocytose in Vesikeln retrograd im Neuron transportiert wird [18]. Die neurospezifische Membranbindung erfolgt über Ganglioside (Sphingolipide, die mindestens einen sauren Zucker, Sialinsäure, enthalten), deren Konzentration speziell in der grauen Substanz des Rückenmarks

sehr hoch ist. Diskutiert wird auch die Bindung an so genannte „lipid rafts“: Membrandomänen, die Cholesterin, Sphingolipide und Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte Proteine enthalten [20,21].

Nach der Exocytose in den synaptischen Spalt zwischen α -Motoneuron und inhibitorischem Motoneuron werden die Vesikel mit dem Tetanusneurotoxin in das inhibitorische Neuron aufgenommen (dieser Mechanismus ist noch ungeklärt). Dann verbleibt das Toxin an der Synapse und die Membrantranslokation der L-Kette in das Cytosol wird initiiert. Die L-Kette hat die hydrophobe Barriere der Lipiddoppelschicht zu überwinden. Dafür verantwortlich ist wahrscheinlich eine Konformationsänderung der H_C-N-Subdomäne. Der Vorgang setzt einen pH-Wert im sauren Bereich voraus [22]. Eine weitere Bedingung für die Freisetzung ist die Reduktion der Disulfidbrücke zwischen L- und H-Kette, die möglicherweise durch einen Thioredoxin-Reduktase-Komplex erfolgt [23]. Im Cytosol entfaltet die L-Kette dann ihre Protease-Aktivität und spaltet ein Protein, welches sich in der Membran von mit Neurotransmittern gefüllten Vesikeln befindet. Dieses Synaptobrevin genannte Protein (entspricht dem vesicle-associated membran protein = VAMP) ist verantwortlich für die Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt [22,16]. Da das Tetanusneurotoxin im Cytosol inhibitorischer Neurotoxine ansetzt, werden durch die Protease-Aktivität die inhibitorischen Signale zur Entspannung der Muskeln nicht weitergeleitet. Dies führt zu den klassischen Symptomen des Tetanus [24].

2.1.2 Tetanolysin

Das zweite Exotoxin, Tetanolysin ist sauerstofflabil und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa [15]. Möglicherweise ist es bei der Etablierung der Infektion beteiligt, jedoch nicht verantwortlich für die Pathogenität des Erregers [25]. Funktionell ist Tetanolysin innerhalb der Familie der membranschädigenden Toxine in der Gruppe der porenbildenden Toxine zu finden [26,27]. Hier gehört Tetanolysin als cholesterolbindendes Cytolysin (CBC) zur Kategorie der congenerischen porenbildenden Toxine grampositiver Bakterien [26]; synonym der früher als sulfhydrylaktivierten bezeichneten Toxine [28]. Die cholesterolbindenden Cytolysine formen die größte Gruppe der porenbildenden Toxine mit 21 Toxinen gebildet von 23 Bakterienspezies der Gattungen *Streptococcus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Listeria* und *Arcanobakterium* [27]. Die 13 Strukturgene der CBC Toxine weisen insbesondere Sequenzhomologien des Bereichs auf, der die Information für die Primärstruktur der Proteine im Carboxy-terminalen Bereich enthält.

Ehrlich berichtete schon 1898 [29], dass neben dem spezifischen Tetanusgift ein zweites Gift existiert, welches die Blutkörperchen von Tieren, insbesondere von Kaninchen und Pferden, auflöst. Untersuchungen in Tieren durch Hardegree et al. [30] belegten die kardiotoxischen, hämolytischen, und letalen Eigenschaften des Tetanolysins. In Versuchen an Affen, die mit Tetanolysin und Tetanusneurotoxin belastet wurden, konnte eindeutig die Kardiotoxizität dem Tetanolysin durch Veränderungen im Elektrokardiogramm zugeordnet werden. Ein starker Anstieg des Plasma-Hämoglobins war nach Injektion in Kaninchen und Affen zu verfolgen. Intravenös in Mäuse appliziert, ruft Tetanolysin den schnellen Tod hervor.

Durch die Eigenschaft der Bildung relativ großer Poren mit einem Durchmesser von 25 bis 30 nm [26] ist Tetanolysin ein ideales Werkzeug, um zielgerichtet Moleküle in das Endoplasma von Zellen zu schleusen [31]. Eine weitere Eigenschaft ist die Änderung der Membranpermeabilität für Ionen. Raya et al. [32] zeigten den intrazellulären Anstieg von freiem Calcium⁺⁺ (Ca⁺⁺) nach Gabe von 20 nM Tetanolysin. Dementsprechend eignet es sich auch, um intrazelluläre Ionenkonzentrationen zu kontrollieren: Durch die Permeabilisierung von murinen T-Helfer-Zellen durch Tetanolysin konnten Conti et al. [33] die Rolle des intrazellulären Ca⁺⁺ bezüglich der Regulierung der Hydrolyse von Inositol-Phospholipid durch den

CD3-Rezeptor-Komplex untersuchen. Interessant ist auch die Wirkung von Tetanolysin auf 5-Fluorouracil, einem Zytostatikum, dessen Zytotoxizität in Leukämiezellen der Maus um 18,5 % gesteigert wurde [34].

2.2 Tetanus-Impfstoffe

2.2.1 Historische Betrachtung

Schon im Jahre 1892 konnte der Tierarzt Nocard zeigen, dass es möglich ist, Pferde und Rinder gegen Tetanus zu impfen und im Serum sowie in der Milch dieser Tiere Substanzen nachzuweisen, die eine Toxin neutralisierende Wirkung besaßen [35]. Die Aufhebung der toxischen Wirkung des Tetanospasmins durch chemische Behandlung unter Aufrechterhaltung der Antigenität wurde durch Ehrlich [36], Kitasato, Löwenstein und Ramon gezeigt [13]. Ehrlich bezeichnete ein solches Produkt als Toxoid [36], Ramon als Anatoxin [37].

Eingeführt wurde die aktive Schutzimpfung von Pferden gegen Tetanus 1931 durch Ramon und Lemetayer [38]. Sie hatten zuvor durch Zusatz von Tapioka bei Pferden eine starke Steigerung der Antikörperproduktion festgestellt [39]. Als Impfstoffzusatz für die Anwendung am Menschen war Tapioka allerdings nicht geeignet, da es Abszesse und Entzündungsreaktionen hervorrief. Im Kalialaun fanden Glenny und Mitarbeiter 1926 [40] schließlich ein geeignetes Adjuvans für den Einsatz am Menschen.

Die Gefahr einer Tetanusintoxikation ist für die verschiedenen Spezies sehr unterschiedlich. Besonders empfindlich sind neben dem Menschen das Pferd und das Schaf [12]. Daher ist eine hohe Durchimpfungsrate in den Pferdebeständen angezeigt. Für einen sofortigen Schutz bei Verletzungen und operativen Eingriffen stehen homologe Serumpräparate zur Verfügung.

Im Gegensatz zum Pferd werden in der Schafhaltung vorrangig Impfstoffkombinationen gegen verschiedene Erreger von Clostridiosen verwendet.

Die aktive Immunisierung gegen Tetanus induziert vorrangig humorale Antitoxin-Titer im Serum. Tetanustoxin neutralisierende Antikörper wurden der ImmunglobulinG-Klasse (IgG) zugeordnet [41,42]. Für das Pferd ist die IgG-Subklasse T beschrieben [43], die bei der Herstellung von Hyperimmunseren gegen Tetanus im Serum der Tiere dominiert.

2.2.2 Herstellung

Die immunogen wirksame Komponente ist das Tetanusneurotoxin. Der wesentliche Schritt der Herstellung ist die Inaktivierung dieses Toxins zum Toxoid durch Formaldehydbehandlung. Sie bewirkt eine Quervernetzung der Proteine, die zur Eliminierung der Toxizität führt, die immunogenen Eigenschaften jedoch erhält.

Die Herstellung umfasst allgemein folgende Schritte: Von dem gewählten Stamm wird einheitliches Saatmaterial angelegt. Nach einer maximal zulässigen Anzahl von Passagen werden davon alle Produktionsansätze hergestellt [44]. Die Anzucht erfolgt stufenweise über Vorkulturen und die Hauptkultur schließlich über mehrere Tage im Fermenter. Die Details der Kultivierung und Kulturbedingungen sind ganz wesentlich für die Ausbeute an Neurotoxin. Entsprechend bildet dieses Wissen das eigentliche „Knowhow“ der Impfstoffherstellung, was das Resultat eines langen Entwicklungsprozesses ist und vom entsprechenden Hersteller streng vertraulich behandelt wird. Nach Abschluss der Kultur wird das abgetrennte Toxin steril abfiltriert und mit Formalin (Endkonzentration von 0,4-0,6 Volumenprozenten) bei 37 °C über mehrere Wochen inaktiviert. Anschließend wird das Toxoid mittels Ultrafiltration konzentriert und steril filtriert. Aus diesem Tetanus-Rohtoxoid-Konzentrat wird durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung, Ultrafiltration und Sterilfiltration das hoch gereinigte Tetanustoxoid gewonnen. Durch die Aufbereitung kommt es zur Beseitigung von unspezifischen Bestandteilen und zur Herstellung einer sterilen Lösung des gereinigten Tetanustoxoids. Zur Gewinnung des fertigen Impfstoffes erfolgt in der Regel die Adsorption an Aluminiumhydroxid.

Zur Überwachung der verschiedenen Aufbereitungsschritte werden umfangreiche In-Prozess-Kontrollen durchgeführt: Die Einhaltung des pH-Bereiches ist wesentlich für eine erfolgreiche Kultivierung und Toxoidierung. Die mikrobielle Reinheit der Fermenterkultur muss nachgewiesen werden. Der Toxingehalt wird in Flockungs-

einheiten angegeben und gilt auch heute noch als das Maß für die Ausbeute und Konsistenz der Herstellung. Die Reinheit des Toxoids wird anhand der Bestimmung des Stickstoffgehaltes und der Flockungseinheiten spezifiziert. Ferner sind die Sterilität und der Formaldehydgehalt zu prüfen. Der kritische Punkt in der Herstellung ist die Vermeidung der Resttoxizität. Um eine Reversion zum Toxin auszuschließen, ist daher die vollständige Toxoidierung zu kontrollieren.

2.2.3 Adjuvantien

Bei der Herstellung inaktivierter Tetanus-Impfstoffe greift man hauptsächlich auf Aluminiumhydroxid als Adjuvans zurück. Das Aluminiumhydroxid ist eine oberflächenaktive, weiße, gelartige Substanz, die eine hohe Kapazität für die Adsorption des Antigens bietet [45]. Durch eine verzögerte Antigenfreisetzung und dadurch längerem Kontakt des Antigens mit dem Immunsystem kommt es zur Stimulation von Interleukin 4 und TH2-Helferzellen mit gesteigerter IgG1- und IgE-Produktion [46].

Weitere Aluminiumsalze, die als Adjuvans Verwendung finden, sind Aluminiumphosphat und Kaliumaluminiumsulfat. Beide Substanzen haben ähnliches Aussehen und ähnliche Eigenschaften wie Aluminiumhydroxid. Sie wirken präzipitierend auf das Antigen.

Anwendung als Adjuvans finden auch so genannte ISCOMs (Immune stimulating complex), die vor allem gegen virale Erreger, z. B. gemeinsam mit Influenza-Antigenen, eingesetzt werden. Dazu kombiniert man gereinigte Saponin-Komponenten (gewonnen aus dem südamerikanischen Baum *Quillaja saponaria* Molina) mit Cholesterol, Phosphatidylcholin und dem Antigen. Diese hydrophobe Matrix verstärkt u. a. die Antigenaufnahme und die Aktivierung von Antigen präsentierenden Zellen, wie dendritische Zellen und von B-Zellen sowie Makrophagen. Sie stimuliert eine TH1- und TH2-Antwort mit gesteigerter Produktion von Interleukin 2 und 4 sowie Interferon- γ und eine Induktion von Gedächtniszellen [47,48]. Eine solche Induktion lang anhaltender neutralisierender Antikörperspiegel zeigte Mumford [49] in einer Gruppe von vier Ponys, die 19 Monate nach der zweiten Impfung mit einem Tetanus-Impfstoff mit Influenza-Komponente noch Antitoxin-Titer im Bereich zwischen 2 bis 20 IE/ml aufwiesen.

Auf dem Europäischen Markt befinden sich auch Kombinationsimpfstoffe für das Schaf mit auf Öl basierenden Adjuvantien. Die in die Ölemulsion eingebetteten Antigene werden langsam freigesetzt. Dies führt primär zu einem starken Anstieg der humoralen Immunantwort [50]. Nachteilig ist, dass es an der Injektionsstelle häufig zu starken lokalen Reaktionen kommt.

2.2.4 Impfstoff-Neuentwicklungen

Seit März 2003 ist der Impfstoff ProteqFlu-Te durch die Europäische Arzneimittelagentur EMA (European Medicines Agency) zugelassen [51]. Arzneilich wirksame Bestandteile dieses Impfstoffes sind zwei Rekombinanten des Kanarienvogelgrippevirus, die die Hämagglutinin-HA-Gene der Pferde-Influenzastämme *A/equi-2/Kentucky/94* bzw. *A/equi-2/Newmarket/2/93* exprimieren [52]. Nach der intramuskulären Impfung werden die für den Impfschutz verantwortlichen Proteine im Muskelgewebe gebildet. Es kommt weder zu einer Verbreitung der Lebendviren im Pferd noch zu einer Replikation an der Injektionsstelle. Das Tetanustoxoid in einem Carbomer-Adjuvans ist die flüssige Komponente des Impfstoffes und dient damit zugleich als Lösungsmittel der Influenzainzidenz, die in Pulverform vorliegt [52]. ProteqFlu-Te ist der erste Influenza-Tetanus-Impfstoff, der eine gentechnische hergestellte Komponente beinhaltet.

Zwei weitere Produkte, denen im Juli 2005 eine zentrale Zulassung erteilt wurde, sind die Präparate Equilis Prequenza Te und Equilis Te [53,54]. Wie dem Namen zu entnehmen ist, enthält der erstgenannte Impfstoff als wirksame Bestandteile neben dem Tetanustoxoid gereinigte Hämagglutinin-Untereinheiten der drei Pferdeinfluenzaviren *A/eqine-1/Prag/1/56*, *A/eqine-2/Newmarket/1/93* sowie *A/eqine-2/Newmarket/2/93* [55]. Das Adjuvans basiert auf der ISCOM-Matrix-Technik und setzt sich aus gereinigtem Saponin, Cholesterin und Phosphatidolcholin zusammen. Im Gegensatz zu ISCOM werden die Antigene jedoch nicht inkorporiert. Sie liegen durch ein spezielles Verfahren in Partikelform vor und werden lediglich mit den Adjuvantien gemischt. Dadurch kommt es zu keiner oder nur geringfügigen hämolytischen Aktivität durch das Saponin. Der pharmazeutische Unternehmer konnte in Studien an Pferden die Induktion hoher Serum-Antikörper gegen equine Influenza und Tetanus sowie deren lang anhaltende Persistenz nachweisen [55]. Mit

dem Produkt Equilis Te steht erstmals ein monovalenter Tetanus-Impfstoff, der Adjuvantien enthält, die auf der ISCOM-Technik basieren, zur Verfügung [56].

2.3 Wertbemessung von Antitoxinen und Impfstoffen

Die biologische Aktivität und Wirksamkeit von Substanzen wie Antitoxinen und Impfstoffen wird unter Verwendung meist internationaler Standardpräparate in definierten Einheiten bemessen. Als „Internationaler Standard“ gilt ein Präparat, dem aufgrund einer internationalen kollektiven Studie eine Deklaration seiner Wirksamkeit in „Internationalen Einheiten (IE)“ durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) zuerkannt wurde [57].

Zur Wertangabe der spezifisch neutralisierenden Aktivität von Tetanus-Antitoxinen übernahm die WHO im Jahre 1950 die „Amerikanische Einheit“ als Internationale Einheit für die Bestimmung des Tetanus-Antitoxin-Gehaltes [57]. Die „Deutsche-Antitoxin-Einheit-1928“ wurde daraufhin umdeklariert (eine „amerikanische Einheit“ war zwei „Deutschen-Antitoxin-Einheiten-1928“ wirkungsgleich) und weiterverwendet. Die Einführung der WHO-Einheit ermöglichte es, die Wirksamkeit von Tetanus-Antitoxinen erstmals weltweit zu bewerten bzw. zu vergleichen.

2.4 Protektiver Antitoxin-Titer

Die im Toxinneutralisationstest ermittelte generell akzeptierte Schutzgrenze des Menschen gegenüber einer Tetanusintoxikation wird mit einem Antitoxin-Gehalt größer 0,01 IE pro ml Serum angegeben [58-62,25]. Als Schutzgrenze für das Pferd wird ebenfalls ein Antitoxin-Titer von 0,01 IE/ml und für das Schaf ein Grenzwert von 0,1 IE/ml angegeben [63-65,39].

Laut Wolters und Dehmel [39] ist die Höhe des Antitoxin-Titers nicht direkt prädiktiv für den wirksamen Impfschutz. Selbst in schutzgeimpften Pferden, bei denen kein wirksamer Serumtiter (kleiner 0,00125 IE/ml) vorlag, war ein Schutz nach Toxingabe dennoch gegeben. Das Herausfinden eines wirksamen Schutztiters beim Menschen ist ein sehr grundsätzliches Problem. Aus diesem Grunde wurde von Wolters und Dehmel ein durchaus risikoreicher Selbstversuch vorgenommen, welcher noch heute

zur Orientierung dient. Demnach tolerierten die beiden eine zwei- bis dreifache letale Toxindosis bei Serumwerten von 0,007 und 0,01 IE/ml [62].

Im Gegensatz zu Wolters und Dehmel zeigten jedoch Untersuchungen an Pferden durch Baljer et al. [66], dass ein Tier ohne nachweisbaren Seramtiter der Belastung mit Tetanustoxin nicht standhielt. Trotz zweimaliger intranasaler und intramuskulärer Tetanusimpfung entwickelte das Pferd keine spezifischen Antitoxine und verendete nach der Belastung mit Tetanustoxin.

Daneben gibt es auch Berichte über das Auftreten von Tetanusintoxikationen bei Menschen mit Antitoxin-Werten oberhalb des Schutztiters (ermittelt durch Toxinneutralisation) zum Zeitpunkt der Manifestation der Erkrankung [67-70], was auf den eingeschränkten Wert des Antitoxin-Titers als Indikator für einen wirksamen Schutz hinweist.

Veröffentlichungen über den Verlauf postvakzinaler Tetanus-Antitoxin-Titer bei Pferden sind rar. Jansen und Knoetze [38] führten an Pferden Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Antigenmenge (in Lf-Einheiten) und der Impfintervalle auf den Tetanus-Antitoxin-Titer durch. Sie zeigten, dass Pferde mit 8 und 16 Lf-Einheiten Tetanustoxoid (einer Wasser-in-Öl-Emulsion) intramuskulär immunisiert, noch 128 Wochen nach einmaliger Applikation Antitoxin-Titer von größer als 0,01 IE/ml aufwiesen. Eine Boosterimpfung mit 8 Lf-Einheiten nach diesem Zeitraum provozierte eine sehr schnelle Immunantwort mit Antitoxin-Titern, die um ein Vielfaches höher waren, als die erzielten Werte nach der ersten Immunisierung. Auch dreieinhalb Jahre nach der zweiten Impfung konnten noch Titer von 5 IE/ml und 10 IE/ml bei zwei Tieren nachgewiesen werden.

Erfolgt die Ermittlung des Tetanus-Antitoxin-Gehalts demgegenüber durch *in vitro* Techniken, wie Hämagglutination (HA), ELISA oder Radioimmunoassays (RIA), wird im Allgemeinen ein Antitoxin-Gehalt von 0,1 Einheiten pro ml als schützender Grenzwert angesehen [61,71]. Dieser, dem Neutralisationstest gegenüber 10fach höhere Wert, wurde auf Grund der geringeren Spezifität der *in vitro* Methoden zugrundegelegt.

2.5 Wirksamkeitsprüfung im Rahmen der Zulassung

In der *Europäischen Pharmacopoeia* sowie in der Direktive 2001/82/EG [72] sind die maßgeblichen gesetzlichen Standards für die Qualitätssicherung von Veterinär-Impfstoffen im Rahmen der Zulassung festgelegt. Die geforderten Versuche zum Nachweis der Wirksamkeit eines Impfstoffes beinhalten den Nachweis

- der Wirksamkeit des Impfstoffes bei Zieltieren im Mindestimpfalter.
- des Immunitätsbeginns nach der Grundimmunisierung.
- der Immunitätsdauer.
- des Immunitätsstatus im Zieltier nach der Wiederholungsimpfung.
- der Wirksamkeit für jede Zieltierart und Zieltierkategorie (Muttertiere, Jungtiere) separat und
- der Wirksamkeit gegenüber jedem einzelnen im Impfstoff enthaltenen Antigen.

Aus Tierschutzgründen wird bei Tetanus allerdings kein direkter Belastungsversuch mit Tetanustoxin im Pferd und Schaf gefordert. Vielmehr entspricht das Prüfprinzip, welches der pharmazeutische Unternehmer bislang vorrangig einsetzt, der ehemaligen Methode A der Monographie „Tetanus-Impfstoff für Tiere“ des Arzneibuchs für die Bestimmung der Wirksamkeit von Tetanus-Impfstoffchargen. In einem Toxinneutralisationstest wird den Versuchstieren Maus oder Meerschweinchen das Serum der geimpften Pferde bzw. Schafe in Form von verschiedenen Verdünnungen eines Toxin-Serum-Gemisches verabreicht. Die Schutzwirkung wird in Internationalen Einheiten (Abgleich am WHO-Standard) angegeben. Die Wirksamkeit dieser Seren wird folgendermaßen bestimmt: Diejenige Serumverdünnung, welche Mäuse (oder Meerschweinchen) gegen die toxische Wirkung einer bestimmten Dosis Tetanustoxin schützt, wird mit einer Standardzubereitung von Tetanus-Antitoxin verglichen. Hierbei orientiert man sich am WHO-Standard oder einem internen Referenzserum, das für denselben Schutz erforderlich ist. Zum Vergleich muss ein geeignetes Prüftoxin gewählt werden, dessen Belastungsdosis separat in der Maus vorab zu ermitteln ist. Diese wird anhand der Lp/10-Dosis und der paralytischen Dosis für 50 % der Tiere bestimmt. In einer weiteren Vorprüfung erfolgt dann die Austestung der Serum/Toxinmischung für die Hauptprüfung. Hierfür werden Verdünnungsreihen der Serum/Toxinmischung im Bereich der LD₅₀ injiziert. Die Prüfung muss mindestens einmal wiederholt werden. Dieser aufwendige Prozess

erfordert eine erhebliche Anzahl von Versuchstieren, von denen die Hälfte qualvoll stirbt.

Der Tierbedarf für die Chargenprüfung wurde in einer Studie [73] in für Deutschland zugelassene Tetanus-Impfstoffe über einen Zeitraum von zwei Jahren ermittelt. Demnach wurden ca. 3000 Mäuse und 4000 Meerschweinchen verwendet.

Neben der Qualitätssicherung von Impfstoffen sind daher auch tierschutzrelevante Aspekte zu berücksichtigen. Gemäß des 3R-Prinzipes (Reduction, Replacement and Refinement) von Russel und Burch [74] sollten, sofern verfügbar, entsprechende Alternativmethoden zum Tierversuch Anwendung finden. Die überarbeitete Version der Monographie 0697 [2] enthält unter dem Punkt „Immunogenicity“ folgende Formulierung: *„It shall also be demonstrated for each target species that the vaccine, administered by the recommended route, stimulates an immune response consistent with the claims for the product (for example, induction of antitoxic antibodies or induction of protective levels of antitoxic antibodies).“* Eine spezifische Methode für den Nachweis wird nicht vorgeschrieben.

2.6 Ausgangssituation zum Ersatz des Tierversuchs

Der Ersatz von Tierversuchen im Rahmen der Chargenprüfung von Tetanus-Impfstoffen im Human- und Veterinärbereich stellt ein breites Forschungsgebiet dar. Serologische *in-vitro*-Methoden wie ein kompetitiver ELISA [75] und der Toxin-Bindungs-Inhibitionstest (ToBI) [3,76] zeigten eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit dem im Toxinneutralisationstest (TNT) ermittelten Gehalt an Antitoxin von Seren. Beide Testmethoden weisen zuverlässig Antikörper nach, die Tetanustoxin bzw. -toxoid binden. Die gleichen Antikörper dienen *in vivo* einem Schutz vor einer Tetanusintoxikation. Hendriksen et al. verglichen sowohl den ToBI als auch einen indirekten ELISA mit dem TNT in Meerschweinchen, wobei die Korrelation der Ergebnisse von ToBI und TNT gegenüber dem indirekten Toxoid ELISA geringfügig besser war [3,77]. Aus den Ergebnissen dieser und weiterer Untersuchungen wurde gefolgert, dass sowohl ELISA als auch ToBI geeignet sind, den Neutralisationstest für die Chargenprüfung von Tetanus-Impfstoffen zu ersetzen [77,78].

Eine gute Korrelation der Ergebnisse eines indirekten ELISA für den Nachweis von Tetanusantikörpern in Schafseren und deren *in vivo* ermittelten Einheiten wurde durch Cox et al. [79] beschrieben. Auch Wood [80] verglich vier verschiedene Clostridienantigene (einschließlich *C. tetani*) mittels ELISA und TNT im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung multivalenter Schaf-Impfstoffe. Die in Kaninchen induzierten Antikörpertiter zeigten in den indirekten ELISAs eine gute Korrelation zum TNT. Die ELISAs wurden von den zuständigen Prüfbehörden als Methode für die Chargenprüfung akzeptiert. Aggerbeck et al. [81] entwickelten einen so genannten Doppel-Antigen-Fluoreszenz-Immunoassay zum gleichzeitigen Nachweis von Tetanus- und Diphtherieantikörpern in Humanseren, der eine gute Korrelation zum Toxinneutralisationstest aufwies. In einer verbesserten Version zeigten Kristiansen et al. [4] mit dem Doppel-Antigen ELISA (DAE) eine sehr gute Korrelation sowohl zum Toxinneutralisationstest als auch zum ToBI. Die Übereinstimmung von DAE und indirektem ELISA war geringer, was auf die Diskrepanz der ELISA Ergebnisse im Bereich kleiner 0,2 IE/ml zurückgeführt wurde. Die unterste Detektionsgrenze betrug für den Tetanus DAE 0,00001 IE pro ml. Ein weiterer Vorteil neben der guten Korrelation zum Toxinneutralisationstest und der niedrigen Nachweisgrenze war die Eigenschaft des Doppel-Antigen ELISA, Seren verschiedener Spezies testen zu können.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Impfstoffe: Zusammensetzung, Dosierung und Anwendung

Die hier besprochenen Impfstoffe wurden, der Tierart entsprechend, codiert. Pferde-Impfstoffe wurden mit P1 bis P10 bezeichnet. Schaf-Impfstoffe wurden entsprechend in die Gruppen S1 bis S8 eingeteilt. Die Zusammensetzung der Impfstoffe ist in den Tabellen 2 (für Pferde) und 3 (für Schafe) aufgeführt. Der Gehalt an Tetanustoxoid ist bei den meisten Impfstoffen in Lf-Einheiten angegeben. Laut Definition entspricht eine Lf-Einheit der Menge von Tetanustoxin oder -toxoid, die die schnellste Ausflockung mit einer IE Tetanus-Antitoxin zeigt. Neben der Angabe des Gehaltes an Tetanustoxoid in Lf-Einheiten ist dieser für drei Schaf-Impfstoffe vom Hersteller in so genannten Bindungseinheiten angegeben. Der Test zur Bestimmung der Bindungseinheiten basiert auf der Reaktion des Testtoxins oder -toxoids mit einem definierten Antitoxin, wobei das nicht verbrauchte Antitoxin mit einem Referenztoxin neutralisiert wird (*in vivo* Versuch in der Maus).

Die Reihenfolge in der Auflistung erfolgte jeweils zufällig.

3.1.1 Pferde-Impfstoffe

Tetanus-Impfstoffe für Pferde werden entweder als monovalente Produkte oder aber in Kombination mit Influenza-Antigenen angeboten. Zu Beginn des Projektes waren zehn Tetanus-Impfstoffe für Pferde in Deutschland zugelassen. Wie in der unten angeführten Tabelle 1 zu sehen ist, konnten vier monovalente Produkte sowie fünf Kombinationsimpfstoffe, mit Influenza-Virus-Antigenen, geprüft werden. Die Impfstoffe unterscheiden sich hinsichtlich der Virusstämme, ihres Gehalts an Adjuvantien und dem gegebenenfalls zugesetzten Konservierungsmittel.

Tabelle 1: Spezifikationen der verwendeten Pferde-Impfstoffe (P)

Nr.	Antigen/e	Adjuvans	Konservierungsmittel	Dosis / Anwendung
P1	Tetanustoxoid: 27 Lf/ml	Aluminiumhydroxid: 3 mg/ml	Natrium-timerfonat	1 ml (27 Lf), i.m.
P2	Tetanustoxoid: 50 Lf/ml	Aluminiumhydroxid: 5 mg/ml	Thiomersal	2 ml (100 Lf), i.m.
P3	Tetanustoxoid: 27 Lf/ml	Aluminiumphosphat: 3,5 mg/ml		1 ml (27 Lf), i.m.
*P4/5	Tetanustoxoid: 50 Lf/ml	Aluminiumphosphat: 2,5 mg/ml		2 ml (100 Lf), i.m.
P6	Tetanustoxoid: 100 Lf/ml A/Equi 1/Prag/1/56 A/Equi 2/Frankreich 79	Aluminiumhydroxid: 2 mg/ml	Merthiolat	1 ml (100 Lf), i.m.
P7	Tetanustoxoid: 40 Lf/ml A/Equi 1/Prag 56 A/Equi 2/Miami/1/63 A/Equi 2/Fontainebleau 1/79	Quil A: 125 µg/ml	Thiomersal	1 ml (40 Lf), i.m.
P8	Tetanustoxoid: 50 Lf/ml A/Equi 1/Newmarket 77 A/Equi 2/Brentwood 79 A/Equi 2/Borlänge 91	Quil A: 200 µg/ml Phosphatidylcholin Cholesterol Ammoniumacetat Aluminiumphosphat: 2,5 mg/ml		2 ml (100 Lf), i.m.
P9	Tetanustoxoid: 15 Lf/ml A/Equi 1/Prag/1/56 A/Equi 2/Newmarket 1/93 A/Equi 2/Newmarket 2/93	Aluminiumhydroxid: 4,5 mg/ml	Natrium-timerfonat	2 ml (30 Lf), i.m.
P10	Tetanustoxoid: 15 Lf/ml A/Equi 1/Prag/1/56 A/Equi 2/Miami/1/63 A/Equi 2/Newmarket 2/93	Aluminiumhydroxid: 4,5 mg/ml	Natrium-timerfonat	2 ml (30 Lf), i.m.

*P4/5: In Abweichung zur Festlegung in 3.1 kam in den Gruppen P4 und P5 identischer Impfstoff, jedoch in verschiedenen Gestüten, zur Anwendung.

3.1.2 Schaf-Impfstoffe

Die innerhalb des Projekts geprüften Schaf-Impfstoffe gegen Tetanusinfektionen umfassten alle für den deutschen Markt zugelassenen Produkte: Zwei monovalente sowie drei multivalente Produkte. Drei weitere untersuchte Kombinationsprodukte sind in anderen europäischen Ländern zugelassen (Tabelle 2). Zur Prophylaxe im Schaf werden aufgrund der Vielzahl von Erkrankungen Impfungen gegen verschiedene Clostridienarten empfohlen. Demzufolge finden in der Schafproduktion zweckmäßigerweise multivalente Toxoidimpfstoffe gegen Anaerobierinfektionen Anwendung [82]. Als weitere Antigene sind Toxoide und / oder inaktivierte Keime von *Clostridium (C.) perfringens* Typ B, C und D, *C. chauvoei*, *C. haemolyticum*, *C. novyi* und *C. septicum* sowie *Mannheimia haemolytica* und *Pasteurella trehalosi* in den Impfstoffen enthalten. Auch hier unterscheiden sich die Präparate hinsichtlich des Adjuvans und des Gehaltes an Konservierungsmitteln.

Tabelle 2: Spezifikationen der verwendeten Schaf-Impfstoffe (S)

Nr.	Antigen/e	Adjuvans	Konservierungsmittel	Dosis / Anwendung
S1	Tetanustoxoid: 50 Lf/ml	Aluminiumhydroxid: 5 mg/ml	Thiomersal	1 ml (50 Lf), i.m.
S2	Tetanustoxoid: 27 Lf/ml	Aluminiumhydroxid: 3 mg/ml	Natriumtimerfonat	1 ml (27 Lf), i.m.
S3	Tetanustoxoid: 12-24 Bindungseinheiten pro 2 ml <i>C. novyi</i> , Typ B, Toxoid <i>C. perfringens</i> , Typ B, Beta-Toxoid <i>C. perfringens</i> , Typ C, Beta-Toxoid <i>C. perfringens</i> , Typ D, Epsilon-Toxoid <i>C. septicum</i> Toxoid <i>C. chauvoei</i> <i>Mannheimia haemolytica</i> <i>Pasteurella trehalosi</i>	Aluminiumhydroxid: 12 mg/ml	Thiomersal	2 ml (12-24 Bind. einh.), s.c.
S4	Tetanustoxoid: 4 Lf/ml <i>C. perfringens</i> , Beta-Toxoid <i>C. perfringens</i> , Epsilon-Toxoid <i>C. chauvoei</i> <i>C. septicum</i> , Alpha-Toxoid <i>C. novyi</i> , Alpha-Toxoid <i>C. haemolyticum</i>	Kaliumaluminiumsulfat: 2,5 %	Thiomersal	1. Impfung: 5 ml (20 Lf), s.c. 2. Impfung: 2 ml (8 Lf), s.c.
S5	Tetanustoxoid: 5,75 Bindungseinheiten pro ml <i>C. perfringens</i> , Typ D <i>C. septicum</i> Toxoid <i>C. chauvoei</i>	Aluminiumhydroxid: 3,5 mg/ml	Thiomersal	2 ml (11,5 Bind. einh.), s.c.
S6	Tetanustoxoid: 6,5 Bindungseinheiten pro ml <i>C. perfringens</i> , Typ B <i>C. perfringens</i> , Typ C <i>C. perfringens</i> , Typ D	Aluminiumhydroxid: 2,5 mg/ml	Thiomersal	2 ml (13 Bind. einh.), s.c.
S7	Tetanustoxoid: 7 Lf/ml <i>C. perfringens</i> , Typ D	Kaliumaluminiumsulfat: 2,5 %	Thiomersal	2 ml (14 Lf), s.c.
S8	Tetanustoxoid: 5 Lf/ml <i>C. perfringens</i> , Typ B, Beta-Toxoid <i>C. perfringens</i> , Typ C, Beta-Toxoid <i>C. perfringens</i> , Typ D, Epsilon-Toxoid <i>C. septicum</i> Toxoid <i>C. novyi</i> Toxoid <i>C. chauvoei</i>	Oel-emulsion		2 ml (10 Lf), s.c.

3.2 Versuchstiere

3.2.1 Pferde

Für die Prüfung eines Impfstoffes war eine Ausgangsgruppengröße von zehn Tieren vorgesehen. Von insgesamt zehn Impfstoffen, die zu Beginn der Arbeit auf dem deutschen Markt zugelassen waren, konnten neun geprüft werden. Ein Impfstoff wurde zweifach, aber innerhalb verschiedener Gestüte (P4 und P5) getestet, so dass insgesamt zehn Gruppen gebildet wurden (P1 bis P10). Die Tiere waren im Alter von vier bis fünf Monaten und hatten noch keine Immunisierung mit einem Tetanus-Impfstoff erhalten. Kooperationspartner waren das Gestüt Radegast in Sachsen-Anhalt mit zwei Impfstoffgruppen (P2 und P9), das Haupt- und Landesgestüt Marbach mit zwei Gruppen (P1 und P5) sowie das Haflingergestüt in Meura mit sechs Impfstoffgruppen (P3, P4, P6, P7, P8 und P10). Die Tiere des Gestüts Radegast gehörten ausschließlich der Rasse „Sachsen-Anhalt“ an. Vom Gestüt Marbach wurden Tiere der Rassen „Araber“, „Württemberg“, „Trakehner“ und „Schwarzwälder Kaltblut“ immunisiert. Das Gestüt in Meura besitzt nur Haflinger.

3.2.2 Impf- und Blutentnahmeschemata beim Pferd

Die Tiere erhielten die Impfungen laut Herstellerangaben. Die Grundimmunisierung mit zwei Impfungen wurde im Abstand von vier Wochen vorgenommen, für ein Produkt im Abstand von sechs Wochen. Eine dritte Grundimmunisierung bzw. Auffrischungsimpfungen erfolgten soweit möglich in dem vom Hersteller vorgeschriebenen Zeitintervall (siehe unten, Tabelle 3). Das Blut wurde am Tag der ersten Impfung (Nullblutentnahme) entnommen, um den serologischen Ausgangsstatus der Tiere zu erfassen. Die zweite Entnahme fand vor der zweiten Impfung am selben Tag statt (in der Regel vier Wochen nach erster Impfung) und eine dritte vierzehn Tage später. Diese Blutentnahmen wurden nach der zu erwartenden zeitlichen Charakteristik des Vakzinationsvorgehens (Maximum der IgG Antwort) durchgeführt. Um den Verlauf des Antitoxinstatus verfolgen zu können, wurde Blut (sofern möglich) halbjährlich entnommen. Blutproben wurden darüber hinaus am Tag weiterer Grundimmunisierungen bzw. Auffrischungsimpfungen und, wenn möglich, vierzehn Tage später gewonnen. Drei Impfstoffgruppen konnten über einen Zeitraum von zwei Jahren beobachtet werden (acht Blutentnahmen). Bei den restlichen Gruppen konnten Seren aus fünf bis sieben Blutentnahmen untersucht werden.

Für die Blutentnahmen wurden Kanülen der Größe 20g x 11/2 und Serum-Gelröhrchen der Fa. Sarstedt eingesetzt. Ein Teil der Pferdeseren konnte unmittelbar vor Ort zentrifugiert werden, um das Serum zu gewinnen. Nicht aufbereitete Blutproben wurden nach dem Transport zunächst stehend für mindestens 1 Stunde bei 2° bis 8° C aufbewahrt und anschließend für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert.

Die Portionierung der Seren erfolgte unter Verwendung einer Einkanalpipette. Die Röhrchen wurden mit Angabe des Impfstoffes, Name des Gestüts bzw. Institutsname, Name des Tieres oder der Tiernummer sowie Entnahmedatum und Nummer der Blutentnahme etikettiert und bei -20° C eingefroren. In gleicher Weise wurde mit den als Serum gelieferten Proben verfahren.

Tabelle 3: Immunisierungsschemata der Pferdegruppen

Impfstoff- gruppe	Grundimmunisierung			Auffrischungsimmunisierung	
	1.	2.	3.	1.	2.
P1	2 Impfungen im Abstand von 4 Wochen			12 Monate nach 2. Impfung	
P2	2 Impfungen im Abstand von 4 Wochen			12 Monate nach 2. Impfung	12 Monate nach 3. Impfung
P3	2 Impfungen im Abstand von 4 Wochen		7 Monate nach 2. Impfung		
P4	2 Impfungen im Abstand von 4 Wochen				
P5	2 Impfungen im Abstand von 4 Wochen			17 Monate nach 2. Impfung	
P6	2 Impfungen im Abstand von 4 Wochen				
P7	2 Impfungen im Abstand von 4 Wochen		5 Monate nach 2. Impfung	6 Monate nach 3. Impfung	
P8	2 Impfungen im Abstand von 6 Wochen				
P9	2 Impfungen im Abstand von 4 Wochen		8 Monate nach 2. Impfung		
P10	2 Impfungen im Abstand von 4 Wochen		5 Monate nach 2. Impfung	13 Monate nach 3. Impfung	

3.2.3 Schafe

Die Gruppengröße betrug ebenfalls zehn Tiere pro Impfstoffgruppe. Es wurden fünf auf dem deutschen Markt und drei außerhalb von Deutschland auf dem europäischen Markt zugelassene Impfstoffe untersucht. Die in Deutschland zugelassenen Impfstoffe wurden durch das Institut für Tropentierhygiene, welches der Georg-August-Universität Göttingen angegliedert ist, geimpft. Die verwendeten Tiere gehörten den Rassen „Schwarzkopf“, „Rhönschaf“, „Chamoise“ sowie „Wilshire horn“ an (Impfstoffgruppen: S1, S2, S3, S4 und S7). Die nicht in Deutschland zugelassenen Impfstoffe (Impfstoffgruppen: S5, S6 und S8) wurden durch das Berliner Versuchsgut Marienfelde an Tieren der Rasse „Schwarzkopf“ geprüft. Die Verabreichung eines Impfstoffes ohne Tetanus-Komponente zur Untersuchung von Schafseren auf Kreuzreaktivität erfolgte ebenfalls am Versuchsgut Marienfelde.

3.2.4 Impf- und Blutentnahmeschemata beim Schaf

Die Tiere erhielten eine Grundimmunisierung bestehend aus zwei Impfungen im Abstand von vier bis sechs Wochen. Die Applikationsart, die Dosierung und das Impfintervall entsprachen den Angaben in der Gebrauchsinformation. Bis auf eine Gruppe, in der die Grundimmunisierung im Abstand von vier Wochen durchgeführt wurde, erfolgte bei den restlichen Impfstoffgruppen die Grundimmunisierung im Abstand von sechs Wochen. Die erste Blutentnahme wurde zeitgleich mit der ersten Impfung vorgenommen. Die zweite Blutentnahme erfolgte am Tag der zweiten Immunisierung, eine dritte dann vierzehn Tage später. Innerhalb einer Impfstoffgruppe war es möglich, die erste Auffrischungsimpfung ein Jahr nach der Grundimmunisierung durchzuführen, da noch sechs Tiere im Bestand verblieben waren. Zeitgleich wurden eine vierte Blutentnahme und eine fünfte Blutentnahme vierzehn Tage nach der Wiederholungsimpfung vorgenommen. Eine sechste Blutentnahme konnte ein Jahr später bei drei im Bestand verbliebenen Tieren durchgeführt werden. Bei einer weiteren Gruppe konnten ein Jahr nach erfolgter Grundimmunisierung noch Blutproben von vier Tieren gewonnen werden.

Für die Blutentnahmen wurden ebenfalls Kanülen der Größe 20g x 11/2 und Serum-Gelröhrchen der Fa. Sarstedt verwendet. Daneben fanden die Kanülen der Firma Bionic Größe 16 mm (#653V) Anwendung. Die Aufbereitung der Blutproben erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben.

3.2.5 Untersuchung auf Kreuzreaktivität (Schaf)

Die Untersuchung auf Kreuzreaktivität wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob ein verwandtes Antigen im Schaf Antikörper induziert, die *in vitro* mit dem Tetanustoxoid reagieren. Zur Untersuchung der Kreuzreaktivität im Schaf wurde fünf Tieren ein monovalenter, inaktiver *Clostridium chauvoei* Impfstoff appliziert. Die Schafe erhielten zweimalig eine Dosis von 2 ml im Abstand von vier Wochen subkutan appliziert. Es erfolgte eine Blutentnahme am Tag der ersten Impfung zur Erfassung des Ausgangsstatus sowie eine zweite Blutentnahme vierzehn Tage nach der zweiten Impfung.

3.3 Prüf- und Referenzsubstanzen

3.3.1 Interne Referenzseren (Pferd)

Das Referenzserum Pferd wurde aus zwei Impfstoffgruppen gewonnen. Dazu wurden die Serumproben von 20 Tieren vierzehn Tage nach der zweiten Immunisierung gepoolt. Die Prüfung der Wertigkeit dieses Referenzserums im Mäuseneutralisationstest (Ermittlung der Internationalen Einheiten) erfolgte unabhängig durch zwei Impfstoffhersteller. Zudem wurde das Serum im Doppel-Antigen ELISA getestet.

Als Negativserum kam das fetale Pferdeserum (#A06628-203) der Firma PAA, Deutschland, zum Einsatz. Das Serum wurde ebenfalls im MNT auf seinen Gehalt an Tetanus-Antitoxin getestet.

Die Lagerung der portionierten und gefriergetrockneten Seren erfolgte bei 2° - 8° C.

3.3.2 Interne Referenzseren (Schaf)

Zur Herstellung des Referenzserums wurden Serumproben vierzehn Tage nach erfolgter zweiter Immunisierung genutzt. In den Pool gingen die Seren von 57 Tieren aus sechs Impfstoffgruppen ein. Die Wertigkeit des Referenzserums wurde ebenfalls von zwei unabhängigen Impfstoffherstellern im Mäuseneutralisationstest ermittelt. Die Kalibrierung erfolgte im Doppel-Antigen ELISA.

Ein Negativserum wurde durch Mischen von sieben Einzelseren ungeimpfter Lämmer des Versuchsgutes Marienfelde hergestellt. Der Gehalt an Tetanus-Antitoxin wurde ebenso im MNT überprüft.

Die Lagerung der portionierten und gefriergetrockneten Seren erfolgte bei 2° - 8° C.

3.3.3 WHO-Standard „Tetanus-Antitoxin“

Es wurde der "WHO International Standard for Tetanus-Antitoxin" des International Laboratory for Biological Standards, Statens Seruminstitut, Kopenhagen, Dänemark verwendet. Der Inhalt einer Ampulle ist mit 1400 Internationalen Einheiten (IE) angegeben. Das gefriergetrocknete Antitoxin wurde insgesamt auf 2 IE pro ml verdünnt und 1 ml-weise in Gefrier Röhrchen abgefüllt. Diese wurden bei -20° C gelagert.

3.3.4 NIBSC-Standard „Tetanus-Antitoxin“

Dieser Standard wurde von dem National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertfordshire, England bezogen. Die Bezeichnung lautet: „Tetanus antitoxin, equine, for bioassay, 3rd British Standard, 1963. Der Inhalt beträgt 1 ml Pferdeserum mit 230 IE Tetanus-Antitoxin. Der Standard wurde insgesamt auf 5 IE pro ml verdünnt, portioniert zu je 0,5 ml und bei -20° C gelagert.

3.3.5 Tetanustoxoid

Die Bezugsquelle für das Tetanustoxoid war das Laboratory for Control of Biological Products (RIVM), Niederlande. Das Toxoid (#8501) enthält 150 Lf pro ml. Verwendet wurde die Charge Nr. 30. Die Lagerung erfolgte bei 2° – 8° C. Es handelte sich um gereinigtes Tetanustoxoid, welches für die Produktion von Human- und Veterinärimpfstoffen Verwendung findet. Es entspricht den Anforderungen der Monographie der *Europäischen Pharmacopoeia* für Tetanustoxoid.

3.3.6 Biotin-markiertes Tetanustoxoid

Die Herstellung erfolgte unter Verwendung des Biotin-X-NHS Kits (#203187) von Calbiochem. Ein ml (150 Lf/ml) des Tetanustoxoids (2.4.7) wurde gegen Natriumbicarbonatpuffer (NaHCO₃) 0,1 M bei pH 8,0 und Raumtemperatur (Rt) für 2 Stunden unter Rühren dialysiert. Dann erfolgte ein Pufferwechsel und die

Fortsetzung der Dialyse über Nacht bei 4° C. Elf mg Biotin-X-N-hydroxy-Succinimidester wurden in 250 µl Dimethylformamid (DMF) gelöst und 1 ml Tetanustoxoid zugegeben. Die Lösung wurde 1 Stunde bei Rt geschüttelt. Anschließend erfolgte die Dialyse über 2 Stunden bei Rt, dann über Nacht bei 4° C gegen 0,01 M Phosphatpuffer (PBS). Das biotinylierte Toxoid wurde 1+1 mit Glycerol versetzt, aliquotiert und bei -20° C gelagert.

3.4 Puffer und Lösungen

Carbonatpuffer 0,05 M; pH 9,6

Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	1,59 g
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	2,93 g
Aqua bidest.	<u>ad 1 l</u>

PBS; pH 7,2

di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O)	1,15 g
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄ 2H ₂ O)	0,2 g
Kaliumchlorid KCl	0,2 g
Natriumchlorid NaCl	8,0 g
Aqua bidest.	<u>ad 1 l</u>

Waschpuffer: PBS/Tween 20, 0,05 %

PBS pH 7,2	999,5 ml
Tween 20	<u>0,5 ml</u>

Blockierungs- und Verdünnungspuffer für Doppel-Antigen ELISA:

PBS/BSA 0,5 %

Bovines Serumalbumin	1 g
PBS pH 7,2	<u>ad 200 ml</u>

Blockierungs- und Verdünnungspuffer für indirekten ELISA:

PBS/Magermilch 5 % (PBSM)

Magermilch	25 g
PBS pH 7,2	<u>ad 500 ml</u>

Natriumacetatpuffer

Natriumacetat, wasserfrei	45,1 g
Aqua bidest.	<u>ad 500 ml</u>

Natriumphosphatpuffer

(zum Verdünnen der WHO und NIBSC Standards)

1) Phosphatpuffer:	150 mM Natriumphosphat
	0,5 M NaCl
	0,1 % BSA
	0,05 % Tween
	A. dest.
2) PBS	
1) und 2) werden 1 + 1 gemischt.	

Tetramethyl Benzidin (TMB) Stammlösung

TMB (SIGMA)	12 mg
Ethanol	<u>2 ml</u>

TMB Gebrauchslösung

Aqua bidest.	9 ml
Natriumacetatpuffer	1 ml
TMB Stammlösung (2.9.8)	167 µl
H ₂ O ₂ 30%	<u>2 µl</u>

Stopplösung: Schwefelsäure (H₂SO₄) 1,25 M

Aqua bidest.	200 ml
2,5 M H ₂ SO ₄	<u>200 ml</u>

Konjugatlösung DAE: Streptavidin, Peroxidase (PO) konjugiert
CALBIOCHEM #189733

Konjugatlösung: Indirekter ELISA Pferd

Affinitätsgereinigtes Ziege anti-Pferd IgG (H+L), Peroxidase (PO) markiert
(DIANOVA #108-035-003)
Verdünnt 1:100 in Gelatine / Glycerol

Konjugatlösung: Indirekter ELISA Schaf

Affinitätsgereinigtes Esel anti-Schaf IgG (H+L), PO markiert
(DIANOVA #713-035-003)
Verdünnt 1:100 in Gelatine / Glycerol

3.5 Entwicklung, Optimierung und Validierung der ELISAs

Für die Entwicklung der vier ELISAs, den Doppel-Antigen ELISA Pferd und Schaf und den indirekten ELISA Pferd und Schaf wurden die jeweiligen Testreagenzien gegeneinander austitriert, um deren optimalen Einsatz im Test zu ermitteln [83,84].

Die Entwicklung und Optimierung umfasste folgende Parameter:

- Festlegung der Beschichtungskonzentration durch die Austitration verschiedener Konzentrationen von Tetanustoxoid gegen verschiedene

Verdünnungsstufen eines Positivserums (WHO-Standard bzw. internes positives Referenzserum) sowie gegen verschiedene Verdünnungsstufen eines Negativserums;

- Prüfung der nichtspezifischen Bindung (NSB) anhand verschiedener Blockierungs- und Verdünnungspuffer;
- Festlegung der Konzentration des Biotin markierten Tetanustoxoids im DAE;
- Festlegung der Konjugatverdünnung (Zweitantikörper bzw. Streptavidin) durch Titration;
- Prüfung der intra-assay und inter-assay Variation (gleiche Testansätze wiederholt geprüft);
- Festlegung der Ausgangsverdünnung für WHO-Standard bzw. Referenzserum;
- Festlegung von Inkubationszeiten:
Für die Festlegungen der jeweiligen Spezifikationen (Kriterien für die Validität des Testes) wurden einbezogen:
 - der OD-Wert der ersten Verdünnungsstufe des WHO-Standards bzw. der internen Referenzseren;
 - der cut-off Wert;
 - ein Grenzwert für die Konjugatkontrolle.

Die Spezifikationen sind unter den jeweiligen ELISA Anleitungen aufgeführt.

Die Validierung der Testsysteme wurden anhand der wesentlichen Parameter:

- Testspezifität
 - Richtigkeit
 - Präzision (Wiederholbarkeit innerhalb eines und zwischen verschiedenen Testansätzen)
 - Linearität
 - analytische Sensitivität (Bestimmungsgrenze)
- belegt [85].

Folgende Vorgehensweise war bei allen vier Testmethoden identisch:

Für alle ELISA wurden Mikrotiterplatten der Firma GREINER GmbH mit Flachboden und mittlerer Bindungskapazität (#655001) verwendet.

Die Testplatten wurden zwischen den Inkubationsschritten mit Klebefolie abgedeckt, ausgenommen der Schritt der Substratinkubation.

Es erfolgte jeweils ein Waschschrift zwischen den einzelnen Auftragungen (bis auf den Schritt der Substratinkubation) mit 3x je 250 µl PBS/Tween 20 pro Kavität.

Die Inkubationsschritte bei 37° C fanden im Schüttelinkubator (Thermostar, Fa. Tecan) bei 150 rpm statt.

Die Puffer und Waschlösungen wurden bei Raumtemperatur eingesetzt. Der Beschichtungsschritt erfolgte bei 2° - 8° C.

3.6 Nachweis von Tetanus-Antitoxin in Pferdeseren

3.6.1 Doppel-Antigen ELISA (DAE) zum Nachweis von Tetanus-Antitoxin in Pferdeseren

- 1.) Beschichtung: 0,1 Lf/ml Tetanustoxoid in Carbonatpuffer 0,05 M
100 µl/Kavität (Kav.), Inkubation über Nacht bei 4° C;
- 2.) Blockierung: PBS/BSA 0,5 %, 250 µl/Kav.
Inkubation: 1 Stunde bei 37° C;
- 3.) Auftrag der Seren:

WHO Standard (2 IE/ml) ab 1:32, internes Referenzserum Pferd ab 1:128 und Testseren (verschiedene Anfangsverdünnungen), Verdünnungsfaktor 2, 100 µl/Kav. (PBS/BSA 0,5 %);

Negatives Kontrollserum: 1:64 verdünnt, 100 µl/Kav., (H5-H8) 4-fach;

Konjugat Kontrolle: PBS/BSA 0,5 %, 100 µl/Kav., (H1-H4) 4-fach;

Inkubation für 1 Stunde bei 37° C;
- 4.) Biotinyliertes Tetanustoxoid: 1:2800 verdünnt, 100 µl/Kav.

Inkubation für 1 Stunde bei 37° C;
- 5.) Konjugat: Streptavidin, PO markiert 1:10000 verdünnt, 100 µl/Kav.

Inkubation für 1 Stunde bei 37° C;
- 6.) Substrat: TMB Gebrauchslösung, 100 µl/Kav.

Inkubation im Dunkeln für 10 Minuten bei Rt;

- 7.) Stoppen der Reaktion: 1,25 M H₂SO₄, 50 µl/Kav.;
- 8.) Messen: bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm).

Für die Festlegung der Spezifikationen des DAE Pferd wurden zugrunde gelegt:

- Mittelwert des OD-Wertes der ersten Verdünnungsstufe (1:32) des WHO-Standards (Mittelwert aus zweifacher Auftragung) aus n = 25 Testergebnissen.
- Festsetzung des cut-off Wertes durch den Mittelwert (vierfache Auftragung) der Negativserumverdünnung 1:64 aus n = 51 Testergebnissen.
- Grenzwert für die Konjugatkontrolle durch den Mittelwert (vierfache Auftragung) aus n = 52 Testergebnissen.

3.6.2 Indirekter ELISA zum Nachweis von Tetanus-Antitoxin in Pferdeseren

- 1.) Beschichtung: 0,1 Lf/ml Tetanustoxoid in Carbonatpuffer 0,05 M 100 µl/Kav., Inkubation über Nacht bei 4° C;
- 2.) Blockierung: PBS/Magermilch (M) 5 %, 250 µl/Kav.
Inkubation: 1 Stunde bei 37° C;
- 3.) Auftrag der Seren:

Internes Referenzserum Pferd (6,92 IE/ml) ab 1:256 und Testseren (verschiedene Anfangsverdünnungen), Verdünnungsfaktor 2, 100 µl/Kav. (PBS/M 5 %);

Negatives Kontrollserum: 1:64 verdünnt, 100 µl/Kav., (H5-H8) 4-fach;

Konjugat Kontrolle: PBS/M 5 %, 100 µl/Kav., (H1-H4) 4-fach;

Inkubation: 1 Stunde bei 37° C;
- 4.) Konjugat: Ziege anti-Pferd IgG, PO markiert 1:20000 verdünnt, 100 µl/Kav.
Inkubation für 1 Stunde bei 37° C;
- 5.) Substrat: TMB Gebrauchslösung, 100 µl/Kav.

Inkubation im Dunkeln für 10 Minuten bei Rt;
- 6.) Stoppen der Reaktion: 1,25 M H₂SO₄, 50 µl/Kav.;

7.) Messen bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm).

Für die Festlegung der Spezifikationen des indirekten ELISA Pferd wurden zugrunde gelegt:

- Mittelwert des OD-Wertes der ersten Verdünnungsstufe (1:256) des internen Referenzserums Pferd (Mittelwert aus zweifacher Auftragung) aus $n = 46$ Testergebnissen.
- Festsetzung des cut-off Wertes durch den Mittelwert (vierfache Auftragung) der Negativserumverdünnung 1:64 aus $n = 46$ Testergebnissen.
- Grenzwert für die Konjugatkontrolle durch den Mittelwert (vierfache Auftragung) aus $n = 45$ Testergebnissen.

3.7 Nachweis von Tetanus-Antitoxin in Schafseren

3.7.1 Doppel-Antigen ELISA zum Nachweis von Tetanus-Antitoxin in Schafseren

- 1.) Beschichtung: 0,1 Lf/ml Tetanustoxoid in Carbonatpuffer 0,05 M
100 µl/Kav., Inkubation über Nacht bei 4° C;
- 2.) Blockierung: PBS/BSA 0,5 %, 250 µl/Kav.
Inkubation: 1 Stunde bei 37° C;
- 3.) Auftrag der Seren:

WHO Standard (2 IE/ml) ab 1:32, internes Referenzserum Schaf ab 1:64 und Testseren (verschiedene Anfangsverdünnungen), Verdünnungsfaktor 2, 100 µl/Kav. (PBS/BSA 0,5 %);

Negatives Kontrollserum: 1:64 verdünnt, 100 µl/Kav., (H5-H8) 4-fach;

Konjugat Kontrolle: PBS/BSA 0,5 %, 100 µl/Kav., (H1-H4) 4-fach;

Inkubation für 1 Stunde bei 37° C;
- 4.) Biotinyliertes Tetanustoxoid: 1:2000 verdünnt, 100 µl/Kav.

Inkubation für 1 Stunde bei 37° C;
- 5.) Konjugat: Streptavidin, PO markiert 1:10000 verdünnt, 100 µl/Kav.

- Inkubation für 1 Stunde bei 37° C;
- 6.) Substrat: TMB Gebrauchslösung, 100 µl/Kav.
Inkubation im Dunkeln für 10 Minuten bei Rt;
 - 7.) Stoppen der Reaktion: 1,25 M H₂SO₄, 50 µl/Kav.;
 - 8.) Messen: bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm).

Für die Festlegung der Spezifikationen des DAE Schaf wurden zugrunde gelegt:

- Mittelwert des OD-Wertes der ersten Verdünnungsstufe (1:32) des WHO-Standards (Mittelwert aus zweifacher Auftragung) aus n = 67 Testergebnissen.
- Festsetzung des cut-off Wertes durch den Mittelwert (vierfache Auftragung) der Negativserumverdünnung 1:64 aus n =74 Testergebnissen.
- Grenzwert für die Konjugatkontrolle durch den Mittelwert (vierfache Auftragung) aus n = 74 Testergebnissen.

3.7.2 Indirekter ELISA zum Nachweis von Tetanus-Antitoxin in Schafseren

- 1.) Beschichtung: 0,19 Lf/ml Tetanustoxoid in Carbonatpuffer 0,05 M
100 µl/Kav., Inkubation über Nacht bei 4° C;
- 2.) Blockierung: PBS/M 5 %, 250 µl/Kav.
Inkubation: 1 Stunde bei 37° C;
- 3.) Auftrag der Seren:

Internes Referenzserum Schaf (4,46 IE/ml) ab1:64 und Testseren
(verschiedene Anfangsverdünnungen), Verdünnungsfaktor 2, 100 µl/Kav.
(PBS/M 5 %);

Negatives Kontrollserum: 1:64 verdünnt, 100 µl/Kav., (H5-H8) 4-fach;
Konjugat Kontrolle: PBS/M 5 %, 100 µl/Kav., (H1-H4) 4-fach;

Inkubation: 1 Stunde bei 37° C;
- 4.) Konjugat: Esel anti-Schaf IgG, PO markiert 1:20000 verdünnt, 100 µl/Kav.
Inkubation für 1 Stunde bei 37° C;
- 5.) Substrat: TMB Gebrauchslösung, 100 µl/Kav.

- Inkubation im Dunkeln für 10 Minuten bei Rt;
- 6.) Stoppen der Reaktion: 1,25 M H₂SO₄, 50 µl/Kav.
 - 7.) Messen bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm)

Für die Festlegung der Spezifikationen des indirekten ELISA Schaf wurden zugrunde gelegt:

- Mittelwert des OD-Wertes der ersten Verdünnungsstufe (1:64) des internen Referenzserums Schaf (Mittelwert aus zweifacher Auftragung) aus n = 73 Testergebnissen.
- Festsetzung des cut-off Wertes durch den Mittelwert (vierfache Auftragung) der Negativserumverdünnung 1:64 aus n = 74 Testergebnissen.
- Grenzwert für die Konjugatkontrolle durch den Mittelwert (vierfache Auftragung) aus n = 74 Testergebnissen.

3.8 Berechnung der ELISA Einheiten

Eine Bewertung der Rohdaten und die Kalkulation der Testergebnisse erfolgte anhand internationaler Standards oder Referenzseren, die auf jeder Testplatte mitgeführt wurden. Für beide Doppel-Antigen ELISAs wurde der Internationale WHO-Standard „Tetanus Antitoxin (Equin)“ mit definierten Einheiten eingesetzt. Für die indirekten ELISAs wurden zwei interne Referenzseren, die von Tieren mit bekanntem Impfschema stammten, zur Berechnung mitgeführt. Diese Seren wurden vorab im DAE gegen den Internationalen Standard kalibriert und auch *in vivo* im Toxinneutralisationstest untersucht. Zur Auswertung wurde das Programm „CombiStats“ des „European Department for the Quality of Medicines“ (EDQM) [86] gewählt, mit dem Bioassays u.a. mit dem Parallelenmodell (synonym „Parallel-line-assay“) nach den im Europäischen Arzneibuch beschriebenen Methoden [87] ausgewertet werden können. Weitere statistische Auswertungen dieser Arbeit erfolgten anhand der Statistical Analysis Software (SAS/STAT), Version 9.1, SAS System für Windows [88].

3.9 Überprüfung ausgewählter Testseren im Mäuseneutralisationstest

Um eine Aussage bezüglich der Korrelation von den ermittelten Einheiten im ELISA (EE) (Nachweis neutralisierender Antikörper) und den in der Literatur (siehe Abschnitt 2.4) beschriebenen Schutztitern von 0,01/ml IE (Pferd) und 0,1 IE/ml (Schaf) treffen zu können, konnte eine kleine Anzahl verschiedener Pferde- und Schafseren *in vivo*, im Mäuseneutralisationstest, überprüft werden. Dazu wurden Serumproben verwendet, die, sofern möglich, ein Jahr nach letzter Impfung oder aber mit möglichst großem zeitlichem Abstand zur Grundimmunisierung entnommen worden waren. Außerdem wurden Seren ausgesucht, die Antitoxin-Gehalte im oder unter dem Bereich von 0,01 ELISA Einheiten (EE)/ml (Pferdeseren) und 0,1 EE/ml (Schafseren) im ELISA aufwiesen. Zusätzlich konnten die Seren eines Tieres (Nr. 7 der Pferdegruppe P4, siehe Anhang, Tabelle 9.3.4) aus vier verschiedenen Blutentnahmen (Verlauf) getestet werden. Die Untersuchungen wurden extern von zwei Prüflabors durchgeführt, wobei die verschiedenen Seren nur durch jeweils ein Labor getestet wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der relativen Wirkstärke

In der Regel erfolgen biologische Wertbestimmungen von Prüfsubstanzen im Vergleich mit einer Standardsubstanz. Dabei wird die biologische Wirkung der Prüfsubstanz relativ zu dem verwendeten Standard bestimmt („relative potency“) und in den Einheiten des Standards ausgedrückt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Auswertung der im ELISA ermittelten Extinktionswerte mit einem Parallelenmodell („Parallel line assay“) nach Finney [89]. Sowohl die zu prüfenden Seren als auch der WHO-Standard bzw. die internen Referenzseren wurden zweifach über sieben Verdünnungsstufen austitriert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm CombiStats, Version 2.01 [86]. Das Programm überprüft u.a. auch die Voraussetzungen des Parallelenmodells (Linearität und Parallelität) und berechnet die relative Wirksamkeit (Wirkstärke) bezüglich eines definierten Standards. Es entspricht den Vorgaben des Arzneibuches zur Statistik [87]. Zur Veranschaulichung ist der CombiStats-Ausdruck einer Berechnung im Anhang 9.2 zu finden.

Insgesamt wurden 564 Seren vom Pferd und 257 Seren vom Schaf ausgewertet. Für die Mehrzahl der Testergebnisse war keine Transformation der Extinktionswerte notwendig. In den verbleibenden Fällen konnte nach einer logarithmischen Transformation ($y' = \log(y)$) der Extinktionswerte die Linearität der Dosis-Wirkungskurven im Bereich der eingesetzten Dosen angenommen werden. In Einzelfällen wurde eine Wurzeltransformation der Extinktionswerte vorgenommen, um eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung annehmen zu können.

4.2 Überprüfung des WHO-Standards „Tetanus Antitoxin“ 2 IE

Die Überprüfung des WHO-Standards erfolgte anhand des NIBSC-Standards „Tetanus Antitoxin“, auf fünf Internationale Einheiten pro ml verdünnt (Abschnitt 2.4.6). Der NIBSC Standard wurde zehnmal im DAE mitgeführt und mit dem WHO-Standard verglichen. Aus dem Mittelwert der zehn Ergebnisse ergab sich eine

Wirkstärke von 4,81 EE pro ml. Diese Wirkstärke stimmt mit dem theoretischen Wert von 5 IE pro ml gut überein.

4.3 Bestimmung der Wirkstärke des internen Referenzserums vom Pferd

Das durch zwei Impfstoffhersteller im Mäuseneutralisationstest (*in vivo*) überprüfte Referenzserum vom Pferd wies eine Wirkstärke von 20 IE bzw. 17 IE pro ml Serum auf.

Für die Verwendung im ELISA wurde das Referenzserum vom Pferd am WHO-Standard (initial verdünnt auf 2 IE) im Doppel-Antigen ELISA kalibriert und der Mittelwert von 60 Testergebnissen zugrunde gelegt. Dieser betrug 6,92 Einheiten pro ml. Zur Abgrenzung der *in vitro* (im ELISA) ermittelten Einheiten gegenüber den *in vivo* (Toxinneutralisation) ermittelten Werten erfolgte die Bezeichnung als ELISA Einheit (EE). Für den indirekten ELISA resultierte der Abgleich der zu prüfenden Testseren vom Pferd anhand der Wertigkeit von 6,92 EE des Referenzserums.

4.4 Bestimmung der Wirkstärke des internen Referenzserums vom Schaf

Eine Überprüfung der Wirkstärke erfolgte auch für das Referenzserum vom Schaf. Der durch den *in vivo* Test in der Maus durch zwei Impfstoffhersteller bestimmte Wert betrug 18 bzw. 23 IE pro ml.

Die Kalibrierung des Referenzserums vom Schaf am WHO-Standard erfolgte im Doppel-Antigen ELISA anhand von 50 Tests. Aus dem Mittelwert ergab sich eine Wirkstärke von 4,46 EE pro ml Referenzserum. Im indirekten ELISA wurden die zu prüfenden Seren mit dem Referenzserum verglichen.

4.5 ELISA Ergebnisse

4.5.1 Testspezifität

Die Spezifität eines Testsystems ist die Fähigkeit, den gesuchten Analysenstoff (Tetanus-Antitoxin) eindeutig zu erfassen. Für alle vier Testsysteme konnte die Spezifität anhand eindeutiger Diskriminierung zwischen einem Positivserum (hohe Reaktion mit dem Antigen = hohe Extinktionswerte) und dem entsprechenden Negativserum (sehr geringe Reaktion mit dem Antigen = niedrige Extinktionswerte) belegt werden.

4.5.2 Testsensitivität

Die Testsensitivität (Bestimmungsgrenze) ist die niedrigste Menge, die mit einem Test unter den definierten Bedingungen noch nachweisbar ist. Für die Festlegung wurden die jeweiligen Testspezifikationen eingehalten und zur Berechnung waren Linearität und Parallelität nach logarithmischer Transformation gegeben. Für den indirekten ELISA Pferd und Schaf sowie den DAE Schaf wurde die Bestimmungsgrenze bei 0,0002 EE/ml ermittelt. Für den DAE Pferd lag die Grenze bei 0,00014 EE/ml.

4.5.3 Festlegung der Spezifikationen für den Doppel-Antigen ELISA Pferd

- Der obere und untere Grenzbereich für die erste Verdünnungsstufe des WHO-Standards wurde durch die optische Dichte (OD) = 1,783 plus / minus der zweifachen Standardabweichung bestimmt.
- Cut-off Festsetzung: Mit einer optischen Dichte < 0,060 galten die Seren als negativ.
- Der Grenzwert für die Konjugatkontrolle betrug $\leq 0,074$ OD.

4.5.4 Festlegung der Spezifikationen für den indirekten ELISA Pferd

- Der obere und untere Grenzbereich für die erste Verdünnungsstufe des internen Referenzserums Pferd wurde anhand der OD = 1,823 plus / minus der zweifachen Standardabweichung festgelegt.
- Cut-off Festsetzung: Mit einer optischen Dichte < 0,099 galten die Seren als negativ.
- Der Grenzwert für die Konjugatkontrolle betrug $\leq 0,093$ OD.

4.5.5 Ergebnisse des Nachweises von Tetanus-Antitoxin in Pferdeseren durch den Doppel-Antigen ELISA und den indirekten ELISA

Die mit dem DAE und dem indirekten ELISA ermittelten Ergebnisse sind grafisch unter Verwendung der Mittelwerte (pro Blutentnahme) und der Standardabweichung für die jeweiligen Impfstoffgruppen in den Abbildungen 1 bis 10 dargestellt. Die Ergebnisse der Serumuntersuchungen aller Pferde-Impfstoffgruppen, einschließlich der Einzeltiere, sind in den Anhängen 9.3.1 bis 9.3.10 aufgeführt.

Fast alle untersuchten Pferde reagierten mit der Bildung von Antikörpern auf die durchgeführten Immunisierungen. Als einzige Ausnahme konnte für das Tier Nr. 9 der Impfstoffgruppe P8 bei der vierten und fünften Blutentnahme im DAE kein Tetanus-Antitoxin nachgewiesen werden (siehe Anhang 9.3.8).

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Proben der ersten Blutentnahme stellten den serologischen Ausgangsstatus der Tiere zum Zeitpunkt unmittelbar vor der ersten Impfung dar. Nach Auswertung der Seren im DAE waren etwa die Hälfte als negativ einzustufen. Die restlichen Seren wiesen Werte im Bereich von 0,004 EE/ml bis 0,01 EE/ml auf. Eine Ausnahme bildete die Impfstoffgruppe P2 (siehe Abbildung 2 und Anhang 9.3.2). Für diese Gruppe wurde der Mittelwert durch das Tier Nr. 6 stark angehoben, da dieses Pferd einen Anfangstiter von 4,16 EE/ml im DAE bzw. 3,65 EE/ml im indirekten ELISA zeigte. Die Titer in den Proben der ersten Blutentnahme waren im indirekten ELISA höher und lagen im Bereich von 0,14 EE/ml bis 0,003 EE/ml. Nur zwei Tiere wurden mit dem indirekten ELISA als seronegativ bewertet.

Die Reaktion auf die erste Impfung war in den Serum-Antitoxin-Werten der zweiten Blutentnahme zu erkennen. Innerhalb aller Gruppen erfolgte ein leichter Titeranstieg. Die Werte lagen im Bereich von 0,28 EE/ml bis 0,003 EE/ml im DAE und im indirekten ELISA im Bereich von 0,55 EE/ml bis 0,007 EE/ml. Auch hier beeinflusste Tier Nr. 6 der zweiten Gruppe den Mittelwert dieser Gruppe, der in beiden Testsystemen um 1,0 EE/ml lag. Das Tier selbst zeigte eine starke Antwort auf die erste Immunisierung mit Werten von über 10 EE/ml, nachgewiesen in beiden Testsystemen (siehe Anhang 9.3.2).

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Seren, die zwei Wochen nach der zweiten Impfung entnommen wurden (dritte Blutentnahme) sind gesondert in Tabelle 4 (Abschnitt 4.5.5.1) dargestellt. Ebenso die Antitoxin-Werte von Seren der vierten und fünften Blutentnahme, die in Tabelle 5 (Abschnitt 4.5.5.1) zusammengefasst sind.

Die geplante halbjährliche Bestimmung der Tetanus-Antitoxin-Titer aller Pferde konnte nicht in allen Gruppen umgesetzt werden, da ein Teil der Tiere den Sommer auf der Weide verbrachte und damit für eine Blutentnahme nicht verfügbar war. Die Testung von Seren, die fünf bis zwölf Monate nach der zweiten Immunisierung gewonnen wurden (vierte Blutentnahme) ergab ein deutliches Absinken der Antikörperspiegel über die Zeit.

Unerwartet hohe Antikörperspiegel wurden in den Seren der Tiere der Impfstoffgruppe P5 achtzehn Monate nach zweiter Impfung bei der sechsten Blutentnahme (siehe Anhang 9.3.5) nachgewiesen. Auf Nachfrage stellte sich heraus, dass die Tiere dieser Gruppe im Rahmen der vorgesehenen Kastration erneut geimpft worden waren, obwohl dies laut Impfschema des Herstellers nicht hätte erfolgen müssen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse von Untersuchungen weiterer Serumproben aus den Impfstoffgruppen beschrieben, die über einen längeren Zeitraum verfolgt werden konnten.

Die Impfstoffgruppe P1 (siehe Abbildung 1 und Anhang 9.3.1) zeigten nach der dritten Impfung (12 Monate nach der zweiten Impfung) eine sehr starke Antikörperantwort mit Werten um die 30 EE/ml, nachgewiesen in beiden Testsystemen. Auch sechs Monate nach dieser dritten Impfung lagen die Serumwerte im Durchschnitt um die 7 EE/ml. Ein vergleichbarer Anstieg war auch innerhalb der Impfstoffgruppe P2 (siehe Abbildung 2 und Anhang 9.3.2) mit Werten von 18,47 EE/ml im DAE und 9,64 EE/ml im indirekten ELISA zu beobachten. Auch in dieser Gruppe waren neun Monate bzw. ein Jahr nach der dritten Impfung, die ebenfalls 12 Monate nach der zweiten Impfung erfolgte, hohe Antikörperspiegel im Bereich um 5 EE/ml mit beiden Testsystemen feststellbar. In den Seren der achten Blutentnahme (2 Wochen nach der vierten Impfung) zeigte sich erneut ein deutlicher Anstieg der

Werte auf 34,34 EE/ml im DAE und 20,09 EE/ml im indirekten ELISA. In der Gruppe P3 (siehe Abbildung 3 und Anhang 9.3.3) lagen die Antitoxin-Titer zwei Wochen nach der dritten Impfung (sieben Monate nach zweiter Impfung) mit 49,68 EE/ml bzw. 44,71 EE/ml ebenfalls sehr hoch. Nach weiteren sechs Monaten waren noch durchschnittliche Antitoxin-Titer von 6,81 EE/ml im DAE und 4,85 EE/ml im indirekten ELISA nachzuweisen.

Die Impfstoffgruppe P7 (siehe Abbildung 7 und Anhang 9.3.7) reagierte auf die dritte Impfung (fünf Monate nach der zweiten Impfung) mit Antitoxin-Werten von 6,41 EE/ml im DAE und 3,06 EE/ml im indirekten ELISA. Sechs Monate später lagen die Werte bei 0,38 EE/ml im DAE und 0,16 im indirekten ELISA. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die vierte Impfung. Zwei Wochen nach dieser vierten Impfung war ein Anstieg auf 17,18 EE/ml im DAE und 6,17 EE/ml im indirekten ELISA zu verzeichnen. Ein Jahr später betragen im Mittel die Antitoxin-Werte noch 3,28 EE/ml im DAE und 1,08 EE/ml im indirekten Test.

In den Seren der Tiere der Impfstoffgruppe P9 (siehe Abbildung 9 und Anhang 9.3.9) waren zum Zeitpunkt der dritten Impfung (acht Monate nach der zweiten Impfung) im Durchschnitt Werte von 0,31 EE/ml im DAE und 0,41 EE/ml im indirekten ELISA nachweisbar. Die nächste Blutentnahme erfolgte erst dreieinhalb Monate nach der dritten Impfung. Die Antitoxin-Titer dieser Seren lagen bei 7,62 EE/ml bzw. 5,45 EE/ml. Nach sechs Monaten waren noch Titer von 5,33 EE/ml im DAE und 3,40 EE/ml im indirekten ELISA messbar.

Der Titerverlauf in der Impfstoffgruppe P10 konnte über zwei Jahre verfolgt werden (siehe Abbildung 10 und Anhang 9.3.10). Die Antitoxin-Titer betragen zwei Wochen nach der dritten Impfung, die 5 Monate nach der zweiten Immunisierung erfolgte, 20,49 EE/ml im DAE und 13,73 EE/ml im indirekten ELISA. Bei der sechsten Blutentnahme (11 Monate nach der dritten Impfung) konnte nur Blut von drei Tieren gewonnen werden, daher ist der Mittelwert nicht repräsentativ. Dreizehn Monate nach der dritten Impfung (und Zeitpunkt der vierten Impfung) lagen die Titer im Durchschnitt bei 1,23 EE/ml im DAE und bei 0,8 EE/ml im indirekten ELISA. Fünf Monate später betragen die Antitoxin-Titer 7,06 EE/ml im DAE und 1,54 EE/ml im indirekten ELISA.

Abbildung 1: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe P1 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

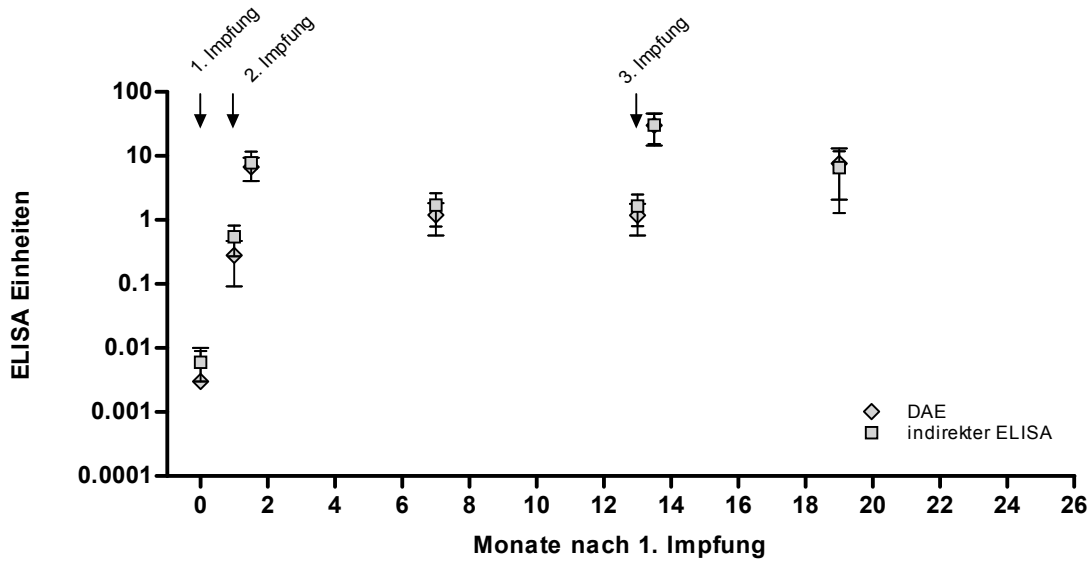


Abbildung 2: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe P2 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

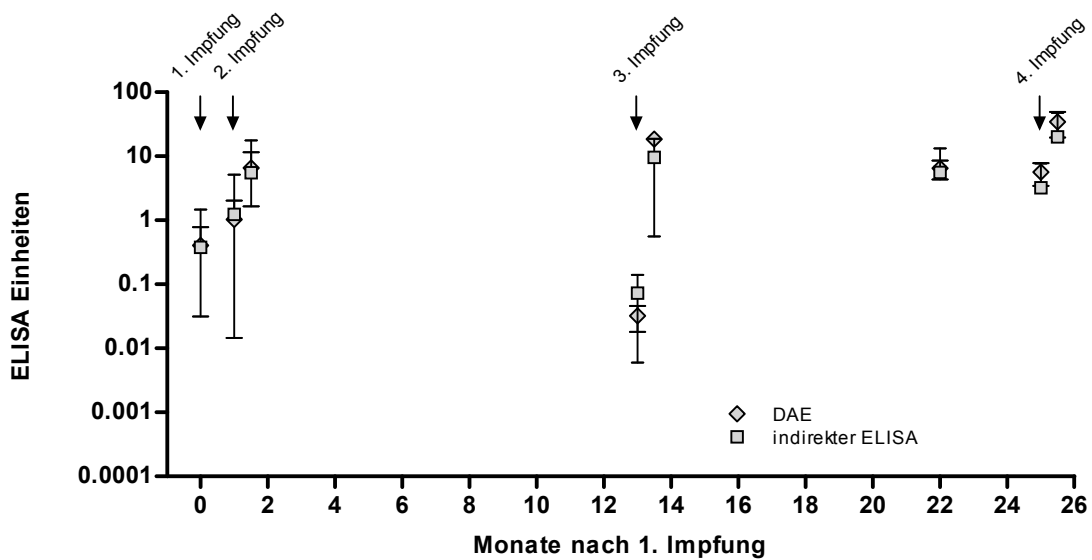


Abbildung 3: Prä- und postvaksinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe P3 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

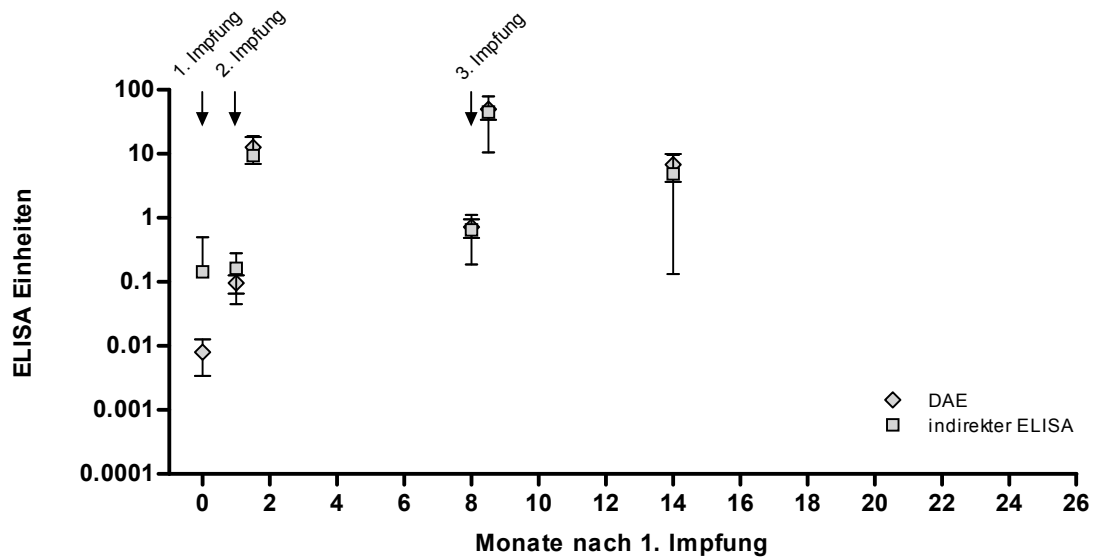


Abbildung 4: Prä- und postvaksinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe P4 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

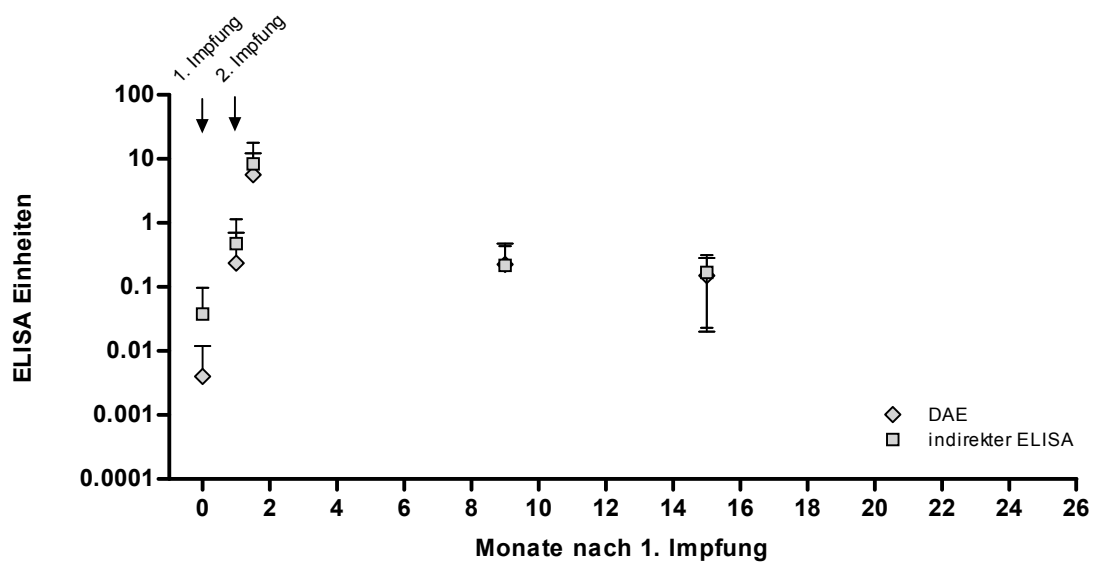


Abbildung 5: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe P5 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

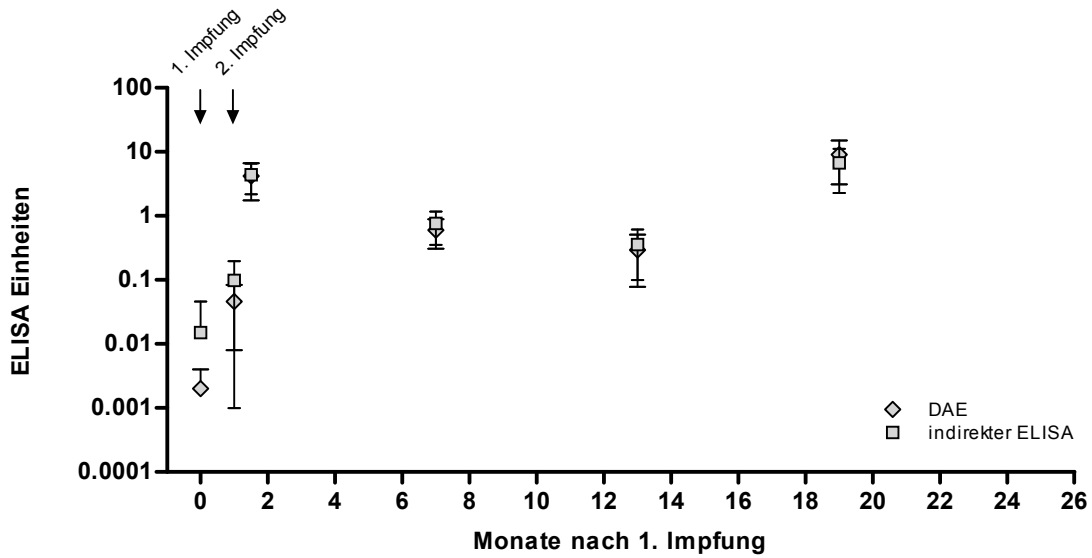


Abbildung 6: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe P6 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

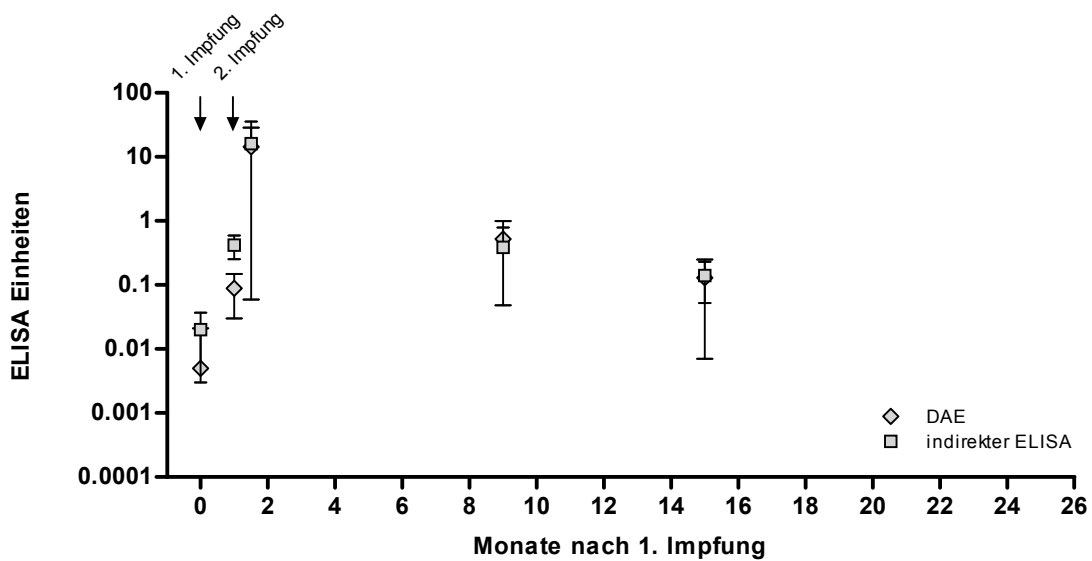


Abbildung 7: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe P7 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

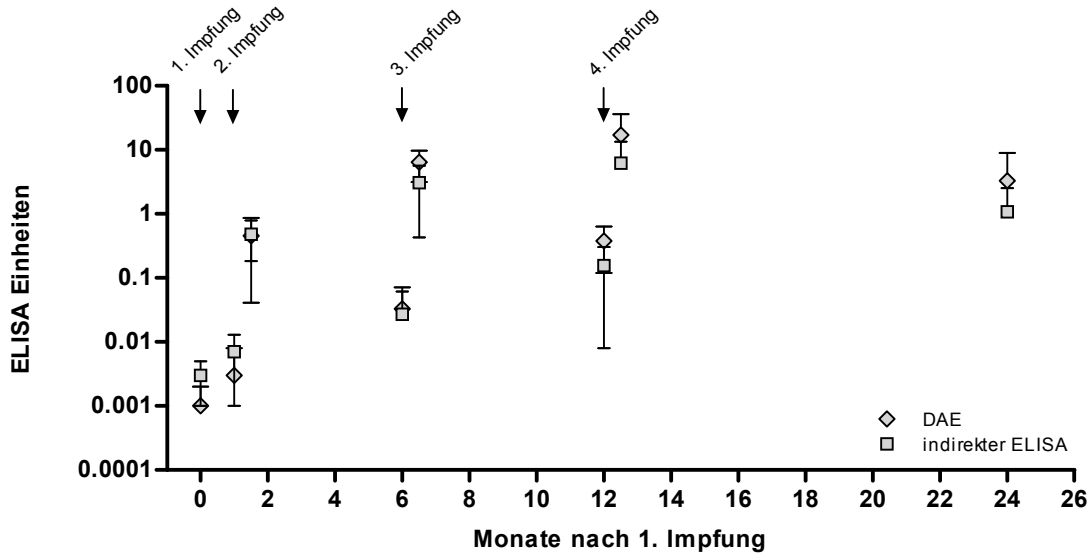


Abbildung 8: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe P8 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

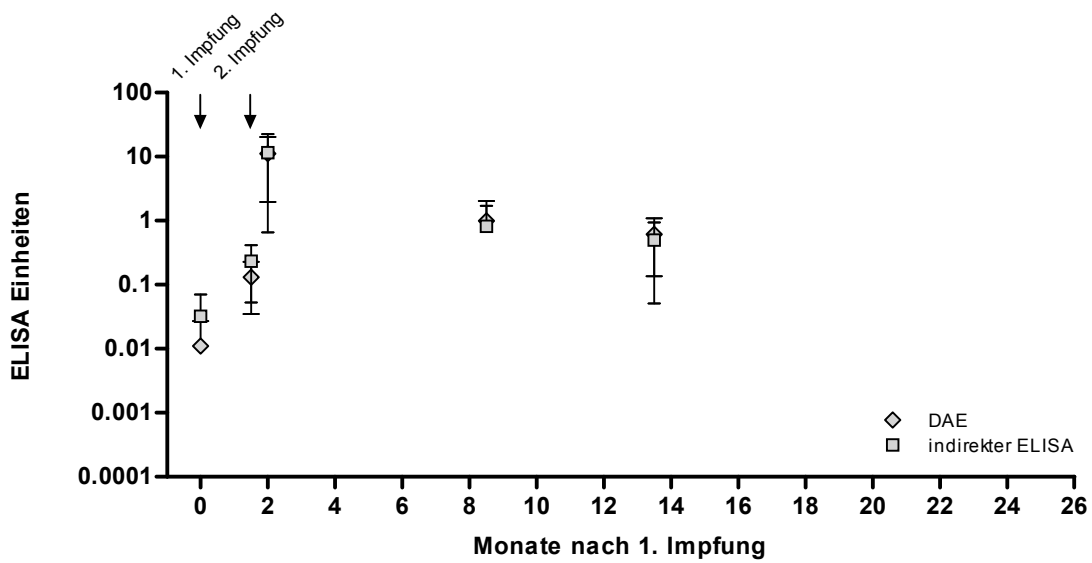


Abbildung 9: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe P9 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

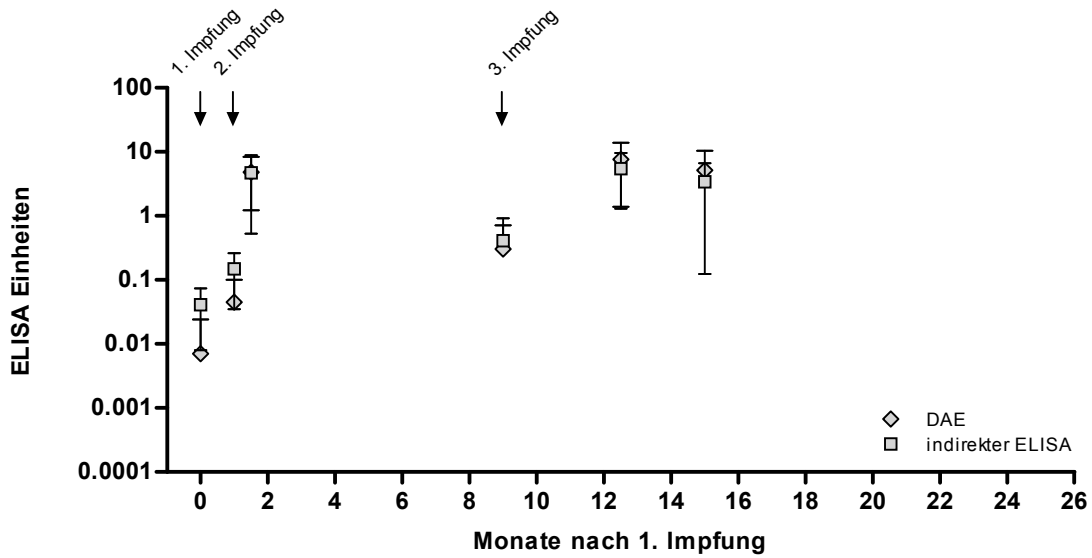
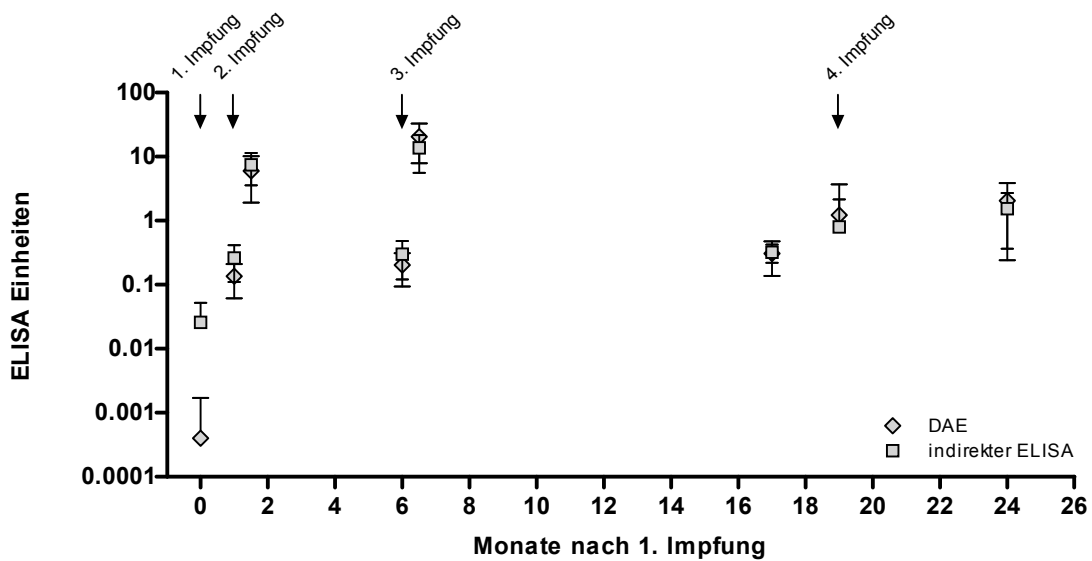


Abbildung 10: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe P10 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung



4.5.5.1 Ergebnisse der Serumuntersuchungen nach zweiter Impfung

Tabelle 4 zeigt das Ergebnis der Untersuchung von Seren, die zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung (dritte Blutentnahme) gewonnen wurden. Es sind für alle Impfstoffgruppen die Mittelwerte angegeben. Deutlich zu erkennen war hier die Sekundärantwort der Tiere der einzelnen Gruppen, mit Ausnahme der Impfstoffgruppe P7. Die Tiere entwickelten im Durchschnitt Titer zwischen 4,20 EE/ml und 14,38 EE/ml im DAE und zwischen 4,37 EE/ml und 16,15 EE/ml im indirekten ELISA. Die Mittelwerte der Antitoxin-Titer der Gruppe P7 lag im Vergleich in beiden Testsystemen deutlich niedriger. Mit dieser zweiten Impfung war entsprechend dem Impfschema die Grundimmunisierung für die Gruppen P1, P2, P4, P5, P6 und P8 abgeschlossen.

Tabelle 4: Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung bei Pferdeseren der dritten Blutentnahme in ELISA Einheiten pro ml (Mittelwert der Impfstoffgruppen) im DAE und indirekten ELISA

Impfstoff- gruppe	DAE	Indirekter ELISA
	EE / ml	EE / ml
P1	6,70	7,84
P2	6,57	5,55
P3	12,64	9,43
P4	5,64	8,36
P5	4,20	4,37
P6	14,38	16,15
P7	0,45	0,59
P8	11,13	11,53
P9	4,86	4,71
P10	6,02	7,48

Die Ergebnisse (Mittelwerte) der Untersuchungen der Seren der vierten und fünften Blutentnahme, die etwa ein Jahr nach der zweiten Impfung bzw. zum Zeitpunkt der dritten Impfung erfolgten, sind in der Tabelle 5 aufgeführt. Für sechs Gruppen (P1, P2, P4, P5, P6 und P8) lag der Abstand zur zweiten Impfung 12 bis 14 Monate zurück. Die restlichen vier Gruppen (P3, P7, P9 und P10) erhielten fünf bis acht Monate nach der zweiten Impfung entsprechend den Angaben des Herstellers eine dritte Immunisierung. Diese Gruppen wiesen zum Zeitpunkt der dritten Impfung Antitoxin-Titer im Bereich von 0,03 EE/ml bis zu 0,72 EE/ml im DAE bzw. bis zu 0,65 EE/ml im indirekten ELISA auf. Die Tiere der Impfstoffgruppe P1 zeigten Werte von 1,18 EE/ml im DAE und 1,65 EE/ml im indirekten ELISA. Die Titer der Pferde der

Gruppe P2 lagen mit Antitoxin-Werten von 0,03 EE/ml bzw. 0,07 EE/ml deutlich niedriger. Für beide Gruppen (P1 und P2) war eine dritte Impfung 12 Monate nach zweiter Impfung vorgeschrieben. Die durchschnittlichen Antitoxin-Werte der Gruppen P4, P5, P6 und P8 befanden sich im Bereich von 0,13 EE/ml bis 0,61 EE/ml im DAE und von 0,14 EE/ml bis 0,50 EE/ml im indirekten ELISA. Zu diesem Zeitpunkt war für die Pferdegruppen keine erneute Impfung gefordert. Der Vergleich der Serumproben der vierten und fünften Blutentnahme (Entnahme sechs bis acht Monate nach der zweiten Impfung) zeigte ein leichtes Absinken der Antitoxin-Werte innerhalb der Gruppen P4, P5, P6 und P8.

Tabelle 5: Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung bei Pferdeseren der vierten bzw. fünften Blutentnahme in ELISA Einheiten pro ml (Mittelwert der Impfstoffgruppen) im DAE und indirekten ELISA

Impfstoffgruppe	DAE EE / ml	Indirekter ELISA EE / ml	Blutentnahme	Monate nach 2. Impfung
P1	1,18	1,65	5.	12 Monate
P2	0,03	0,07	4.	12 Monate
P3	0,72	0,65	4.	7 Monate
P4	0,15	0,17	5.	14 Monate
P5	0,29	0,36	5.	12 Monate
P6	0,13	0,14	5.	14 Monate
P7	0,03	0,03	4.	5 Monate
P8	0,61	0,50	5.	12 Monate
P9	0,30	0,41	4.	8 Monate
P10	0,20	0,30	4.	5 Monate

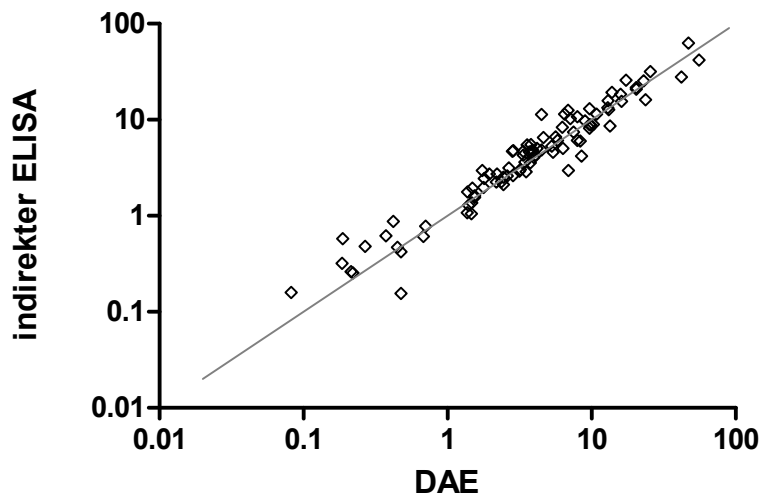
4.5.5.2 Vergleich der Ergebnisse von Doppel-Antigen ELISA und indirektem ELISA (Pferd)

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson misst die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen, in der vorliegenden Arbeit sind dies die beiden Messmethoden. Es wurden sowohl die Korrelationen zu den einzelnen Zeitpunkten der Blutentnahmen als auch die Gesamtkorrelation berechnet.

Bereits bei den einzelnen Blutentnahmen (Anhang, Tabellen 9.3.1 – 9.3.10) lässt sich eine relativ gute Übereinstimmung zwischen DAE und indirektem ELISA feststellen; nur in wenigen Fällen lag die Korrelation unterhalb von 0,7.

Die Gesamtkorrelation über alle Impfstoffe hinweg zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme betrug 0,935.

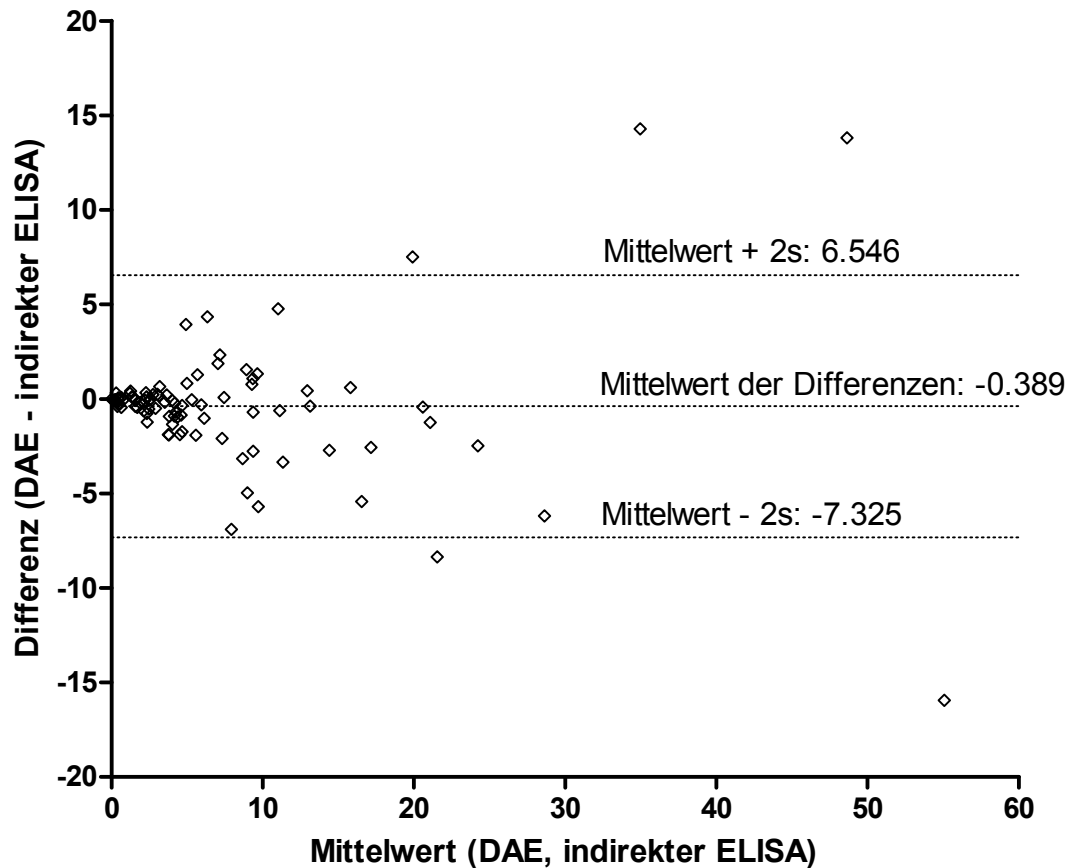
Abbildung 11: Korrelation der durch DAE und indirektem ELISA ermittelten Messwerte von Tetanus-Antitoxin in den Seren der dritten Blutentnahme aller Pferde-Impfstoffgruppen (in ELISA Einheiten)



Um eine genauere Aussage bezüglich der Übereinstimmung zwischen den im DAE und den im indirekten ELISA ermittelten Antitoxin-Einheiten treffen zu können, wurde der Ansatz von Bland und Altman [90] als Vergleich herangezogen. Mit der Bland-Altman-Graphik wurden die Differenzen der paarweise gemessenen Werte (im DAE ermittelter Antitoxin-Gehalt minus den im indirekten ELISA ermittelten Antitoxin-Gehalt) den Mittelwerten gegenübergestellt (siehe Abbildung 12). Zu erkennen ist, dass mit zunehmenden Antitoxin-Gehalten (Mittelwert aus DAE und indirektem ELISA) die Differenzen zwischen den beiden Methoden deutlich größer wurden.

Als Grenzen für eine hinreichende Übereinstimmung wird üblicherweise die mittlere Differenz plus bzw. minus der zweifachen Standardabweichung festgelegt. Diese Grenzen wurden lediglich bei großen Werten (Mittelwerte aus DAE und indirektem ELISA ab etwa 20) überschritten.

Abbildung 12: Darstellung der Ergebnisse der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung in den Pferde-Impfstoffgruppen anhand der Bland-Altman-Graphik: Die Differenzen der ELISA Einheiten (Tetanus-Antitoxin-Werte DAE minus Tetanus-Antitoxin-Werte indirekter ELISA) aufgetragen gegen die Mittelwerte aus DAE und indirektem ELISA



Eine statistische Aussage zur Güte der Übereinstimmung zweier Messverfahren mit gleichen Messgrößen lässt sich mit Hilfe des Konkordanz-Korrelationskoeffizienten nach Lin [91,92] treffen (siehe Tabelle 6). Gegenüber anderen Methoden-Vergleichen wird nicht nur der lineare Zusammenhang, sondern auch die Lage der Regressionsgeraden (d. h. die Genauigkeit) bei der Bewertung berücksichtigt.

Tabelle 6: Ergebnis für den Vergleich der DAE- und der indirekten ELISA-Methode (auf Basis der Messwerte der Seren zum Zeitpunkt zwei Wochen nach zweiter Impfung, alle Impfstoffe P1-P10):

Impfstoffgruppen	Lin'scher Konkordanz-Korrelationskoeffizient	95%-Konfidenzintervall	
P1 bis P10	0,934	0,908	0,953

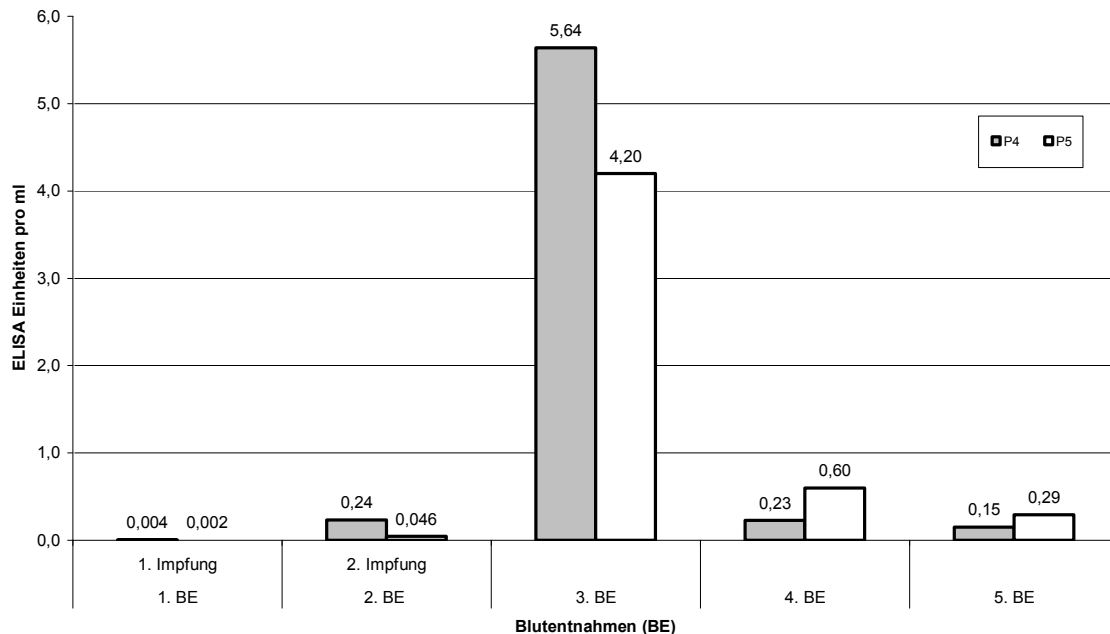
Damit konnten beide ELISA Methoden, bezogen auf die Ergebnisse aller Serumuntersuchungen der Pferde-Impfstoffgruppen, als gleichwertig angesehen werden.

4.5.5.3 Vergleich der Ergebnisse der Impfstoffgruppen P4 und P5

Aufgrund der guten Übereinstimmung von DAE und indirektem ELISA wurden hier nur die Ergebnisse des DAE betrachtet.

Die Pferde-Gruppen P4 und P5 erhielten den gleichen Impfstoff, gehörten jedoch verschiedenen Gestüten an. Der durchschnittliche Antitoxin-Titer der Seren (Mittelwerte) der Gruppe P4 lag innerhalb der ersten drei Blutentnahmen etwas über dem der Impfstoffgruppe P5 (siehe Abbildung 13). Bei der vierten und fünften Blutentnahme verhielt es sich umgekehrt. Hier wies die Impfstoffgruppe P5 im Durchschnitt höhere Antitoxinspiegel auf. Ein Unterschied zwischen den Impfstoffgruppen P4 und P5 zum Zeitpunkt 14 Tage nach Grundimmunisierung (dritte Blutentnahme) war mit $p=0,827$ statistisch nicht signifikant (siehe Anhang 9.5, Wilcoxon-Rangsummentest der nicht baseline-adjustierten Messwerte ermittelt im DAE).

Abbildung 13: Ergebnis der Serumuntersuchungen der Gruppen P4 und P5 ermittelt im DAE (mittlere Antitoxin-Titer)

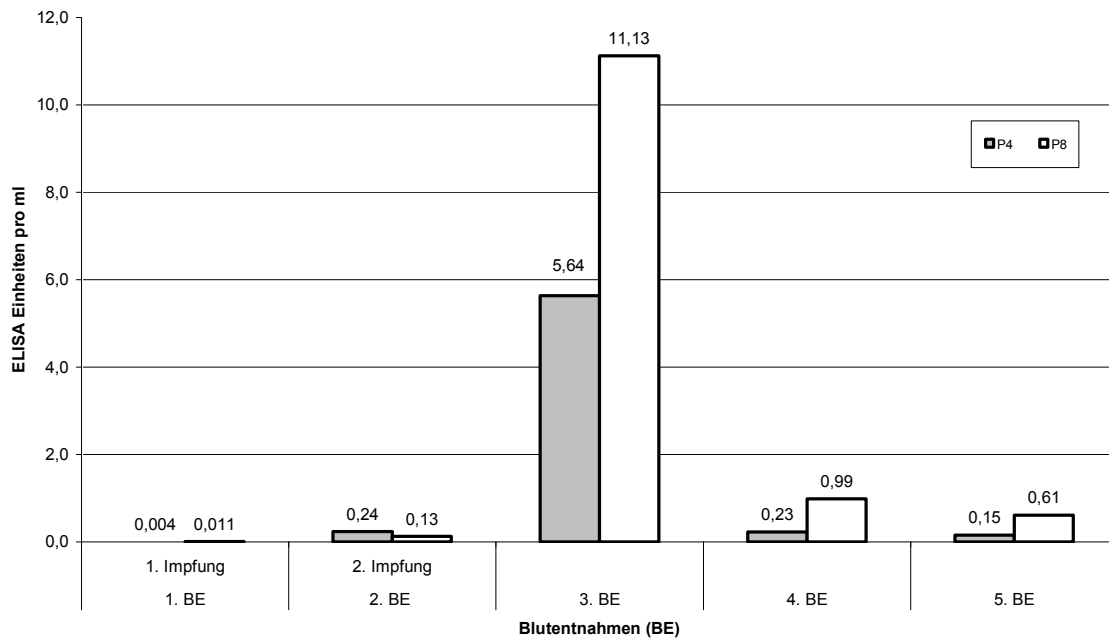


4.5.5.4 Vergleich der Ergebnisse der Impfstoffgruppen P4 und P8

Auch hier wurden aufgrund der guten Übereinstimmung von DAE und indirektem ELISA nur die Ergebnisse des DAE betrachtet.

In der Abbildung 14 sind vergleichend die Antitoxin-Titer (Mittelwerte) der beiden Impfstoffgruppen P4 (monovalenter Impfstoff) und P8 (gleicher Impfstoff mit Influenzacomponente) aufgezeigt. Die Impfstoffe wurden innerhalb eines Gestüts geprüft. Aus der Darstellung geht hervor, dass bei der ersten und zweiten Blutentnahme der durchschnittliche Antitoxin-Titer der monovalenten Impfstoffgruppe P4 geringfügig über dem der Kombinations-Impfstoffgruppe P8 lag. Dieses Ergebnis wurde mit dem DAE als auch dem indirekten ELISA erzielt. In den Serumuntersuchungen der dritten Blutentnahme wies die Impfstoffgruppe P8 im Durchschnitt höhere Titer auf und der Unterschied zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme war mit $p=0,0097$ statistisch signifikant (siehe Anhang 9.6, Wilcoxon-Rangsummentest der nicht baseline-adjustierten Messwerte ermittelt im DAE). Der höhere Anstieg der Serum-Titer konnte auch bei der vierten und fünften Blutentnahme beobachtet werden.

Abbildung 14: Ergebnis der Serumuntersuchungen der Gruppen P4 und P8 im DAE (mittlere Antitoxin-Titer)



4.5.5.5 Vergleich der Tetanus-Antitoxin-Titer aller Impfstoffgruppen P1 bis P10 nach zweiter Impfung

Aus dem unter 4.5.5.3 und 4.5.5.4 genannten Grund, fand hier ebenfalls nur die Darstellung der Ergebnisse des DAE statt. In der unten aufgeführten Tabelle 7 sind die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Seren nach zweiter Immunisierung (zwei Wochen postvakzinal) aller Pferde-Impfstoffgruppen mit den ELISA Einheiten der Einzeltiere, dem Mittelwert, dem Median, der Standardabweichung und des 95%-Konfidenzintervalls des Mittelwertes präsentiert.

Bezogen auf den Mittelwert der ELISA Ergebnisse existieren offensichtlich Differenzen in der Bildung von Antikörpern zwischen den verschiedenen Impfstoffen. Die drei Impfstoffgruppen P3, P6 und P8 fielen durch deutlich höhere Antitoxin-Werte auf (12,64; 14,38 und 11,13 EE/ml), während in der Impfstoffgruppe P7 ein auffallend niedriger Anstieg mit 0,45 EE/ml verzeichnet werden konnte. Die Antitoxin-Werte der restlichen Impfstoffgruppen (P1, P2, P4, P5, P9 und P10) lagen zwischen 4,20 und 6,70 EE/ml.

Tabelle 7: Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung (ELISA Einheiten zum Zeitpunkt zwei Wochen nach zweiter Impfung) mit verschiedenen Pferde-Tetanus-Impfstoffen (P1 – P10)

		Pferde-Impfstoffgruppen									
		P1	P2	P3	P4**	P5**	P6	P7	P8	P9	P10
1. Impfung 1. Blutentnahme	Zeitpunkt*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tetanustoxoid in Lf/Dosis	27	100	27	100	100	100	40	100	30	30
2. Impfung	Zeitpunkt*	1	1	1	1	1	1	1	1,5	1	1
	Tetanustoxoid in Lf/Dosis	27	100	27	100	100	100	40	100	30	30
3. Blutentnahme	Zeitpunkt*	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	2	1,5	1,5
Titer der Einzeltiere in ELISA Einheiten pro ml, 2 Wochen nach 2. Impfung											
		9,00	0,71	3,89	2,66	5,28	3,57	0,27	16,10	3,98	3,36
		2,44	2,59	23,66	13,83	9,89	8,51	0,19	1,40	6,31	7,48
		9,67	0,37	2,18	2,86	2,37	15,89	0,21	23,00	8,33	2,82
		7,10	1,78	42,11	17,37	4,50	3,76	1,37	13,40	3,90	4,62
		9,66	1,54	10,30	1,48	3,70	0,00	0,47	5,40	3,51	6,87
		2,20	55,55	3,16	6,50	1,47	20,46	0,68	4,07	3,44	12,95
		7,97	1,38	3,20	0,18	5,79	47,12	0,08	10,81	2,44	3,36
		7,97	1,80		0,22	4,18	20,39	0,36	0,42	1,46	1,74
		6,27	0,48			2,85	9,69		25,55	13,04	3,80
		6,90	0,45			1,95				1,54	13,15
4,48	5,62										
Mittelwert (in EE)		6,70	6,57	12,64	5,64	4,20	14,38	0,45	11,13	4,79	6,02
Median		7,10	1,54	3,89	2,76	3,94	9,69	0,31	10,81	3,70	4,21
Standardabweichung		2,64	16,31	15,06	6,53	2,45	14,32	0,41	9,16	3,57	4,10
95%-Konfidenz- intervall	Untergrenze	1,93	5,54	9,05	3,33	1,38	6,93	0,19	2,82	2,15	3,00
	Obergrenze	11,47	7,60	16,24	7,94	7,01	21,82	0,72	19,44	7,44	9,03

* Zeitpunkt in Monaten nach 1. Impfung bzw. 1. Blutentnahme

** die Impfstoffgruppen P4 und P5 erhielten identische Impfstoffe, gehörten aber verschiedenen Gestüten an

4.5.6 Festlegung der Spezifikationen für den Doppel-Antigen ELISA Schaf

- Der obere und untere Grenzbereich für die erste Verdünnungsstufe des WHO-Standards wurde durch die optische Dichte (OD) = 1,727 plus / minus der zweifachen Standardabweichung festgelegt.
- Cut-off Festsetzung: Mit einer OD < 0,093 galten die Seren als negativ.
- Der Grenzwert für die Konjugatkontrolle betrug $\leq 0,084$ OD.

4.5.7 Festlegung der Spezifikationen für den indirekten ELISA Schaf

- Der obere und untere Grenzbereich für die erste Verdünnungsstufe des internen Referenzserums Schaf wurde anhand der OD = 1,689 plus / minus der zweifachen Standardabweichung festgelegt.
- Cut-off Festsetzung: Mit einer OD von < 0,210 galten die Seren als negativ.
- Der Grenzwert für die Konjugatkontrolle betrug $\leq 0,100$ OD.

4.5.8 Ergebnisse des Nachweises von Tetanus-Antitoxin in Schafseren durch den Doppel-Antigen ELISA und den indirekten ELISA

Die ELISA Ergebnisse der Impfstoffgruppen Schaf sind in den Abbildungen 15 bis 22 und in den Anängen 9.4.1.bis 9.4.8 wiedergegeben. Bis auf die Impfstoffgruppen S6 und S8 erfolgten drei Blutentnahmen, wobei die Ergebnisse der Untersuchungen der Proben der ersten Blutentnahme wiederum den Ausgangsstatus der Tiere zum Zeitpunkt der ersten Impfung darstellen.

Im Serum des Tieres Nr. 2 der Impfstoffgruppe S4 konnte in keiner Serumprobe ein Antitoxin-Gehalt nachgewiesen werden. Offenbar reagierte es nicht auf die Impfungen (siehe Tabelle 21). Das Serum des Tieres Nr. 3 der Impfstoffgruppe S1 hatte einen sehr niedrigen Antitoxin-Gehalt in allen untersuchten Blutproben (siehe Tabelle 18). Die Auswertung der Ergebnisse der Untersuchungen der Proben der ersten Blutentnahme im DAE ergab einen Titer bei vier Tieren (zwei Tiere in der Gruppe S3 und zwei Tiere in der Gruppe S7). Alle restlichen Tiere erwiesen sich als negativ bezüglich Antikörpern gegen das Tetanustoxoid. Die Ergebnisse im indirekten ELISA ergaben dagegen, dass die Mehrzahl der Tiere einen geringen Titer aufwies, der im Durchschnitt zwischen 0,003 und 0,02 EE/ml lag.

Die Auswirkung der ersten Impfung zeigte sich sechs Wochen später in den Ergebnissen der Untersuchungen der Proben der zweiten Blutentnahme (in Gruppe 8 erfolgte die Entnahme vier Wochen später). Ein geringer Anstieg der Antikörperspiegel war innerhalb aller Impfstoffgruppen zu erkennen. Im DAE fanden sich Durchschnittswerte im Bereich von 0,01 bis 1,99 EE/ml und im indirekten ELISA von 0,05 bis 1,45 EE/ml.

An den Ergebnissen der Untersuchungen der Serumproben der dritten Blutentnahme war die Booster-Wirkung der zweiten Impfung zu erkennen. Einen deutlichen Anstieg der Antitoxinwerte zeigten die Gruppen S1 bis S7 mit Einheiten im Bereich von 1,11 bis 22,52 EE/ml im DAE und Werten von 0,55 bis 27,64 EE/ml im indirekten ELISA. Einen moderaten Anstieg wies die Impfstoffgruppe S8 auf. Hier lagen die Einheiten im Durchschnitt bei 0,9 im DAE und 0,39 im indirekten Testsystem.

Abbildung 15: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe S1 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

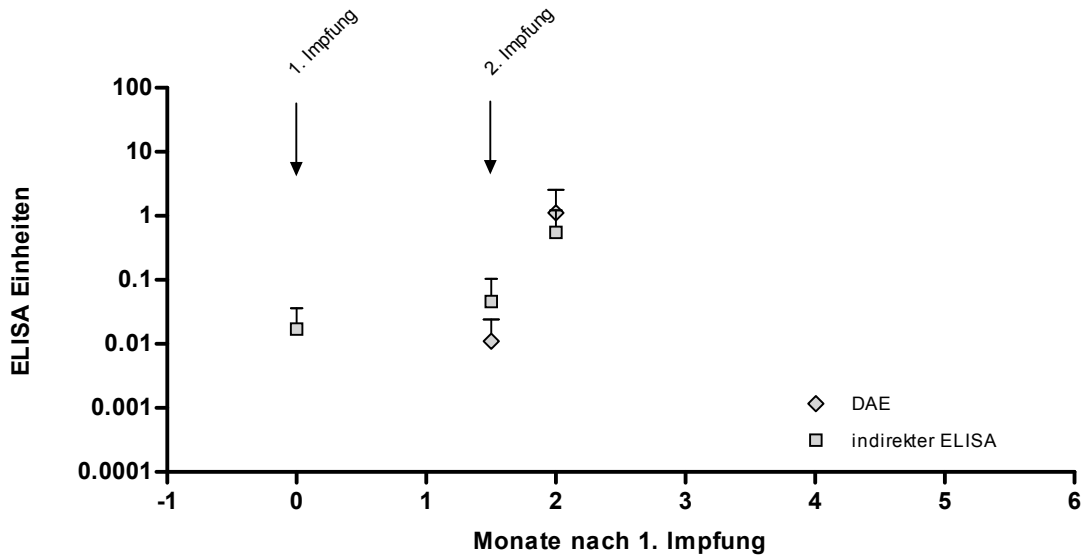


Abbildung 16: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe S2 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

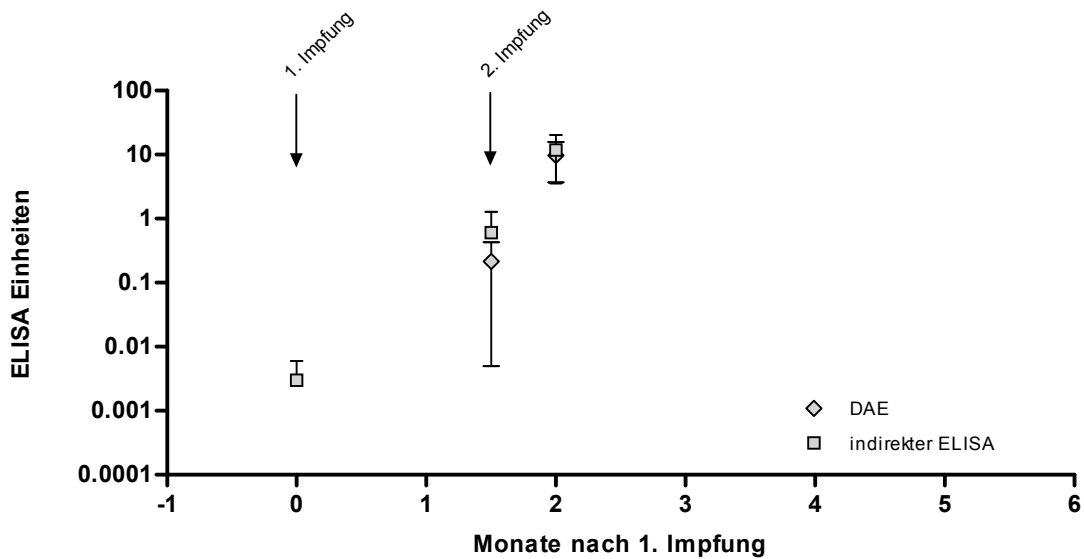


Abbildung 17: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe S3 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

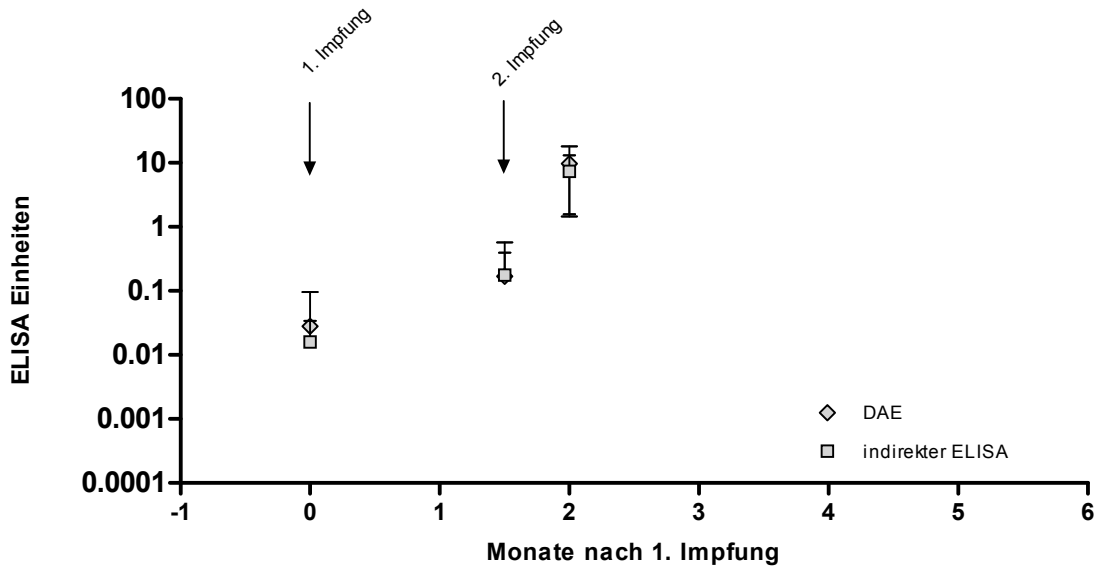


Abbildung 18: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe S4 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

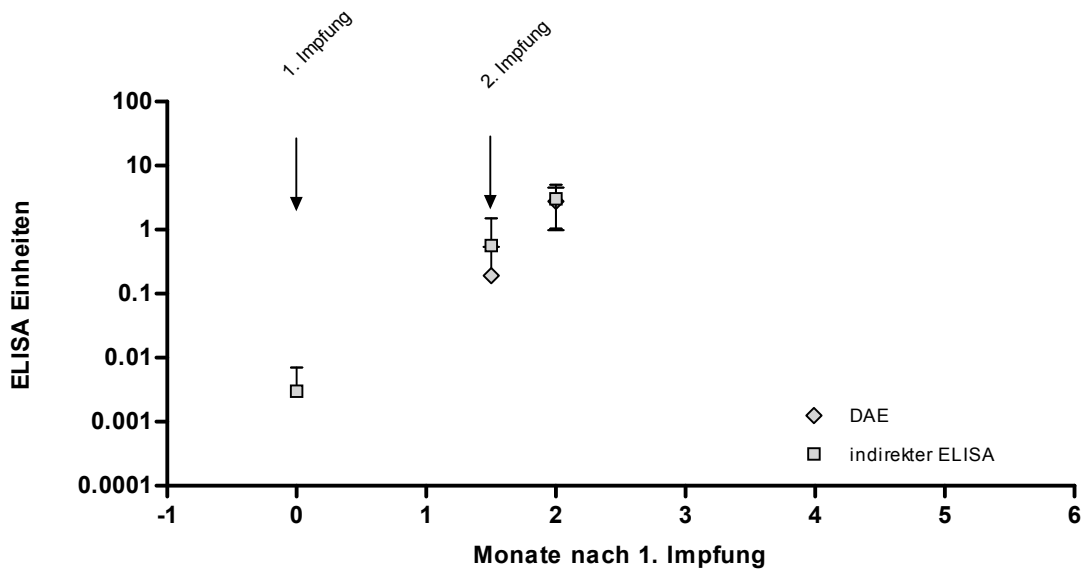


Abbildung 19: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe S5 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

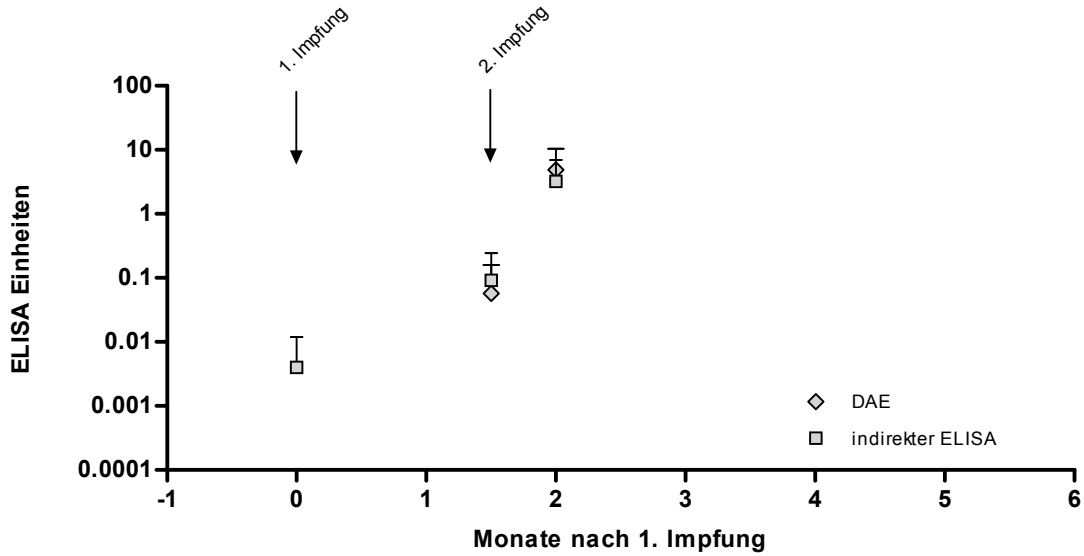


Abbildung 20: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe S6 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

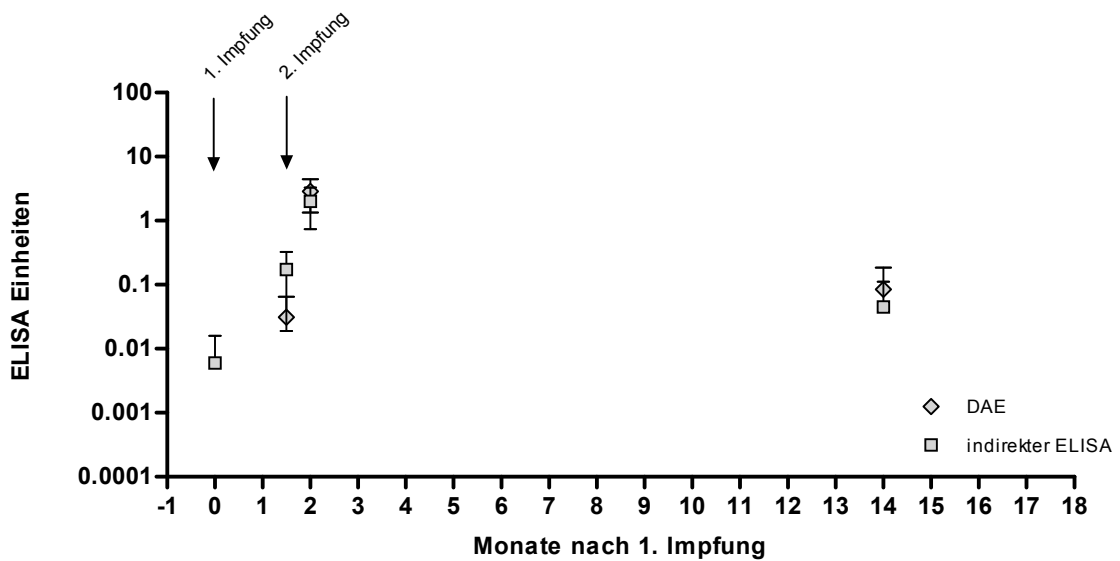


Abbildung 21: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe S7 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung

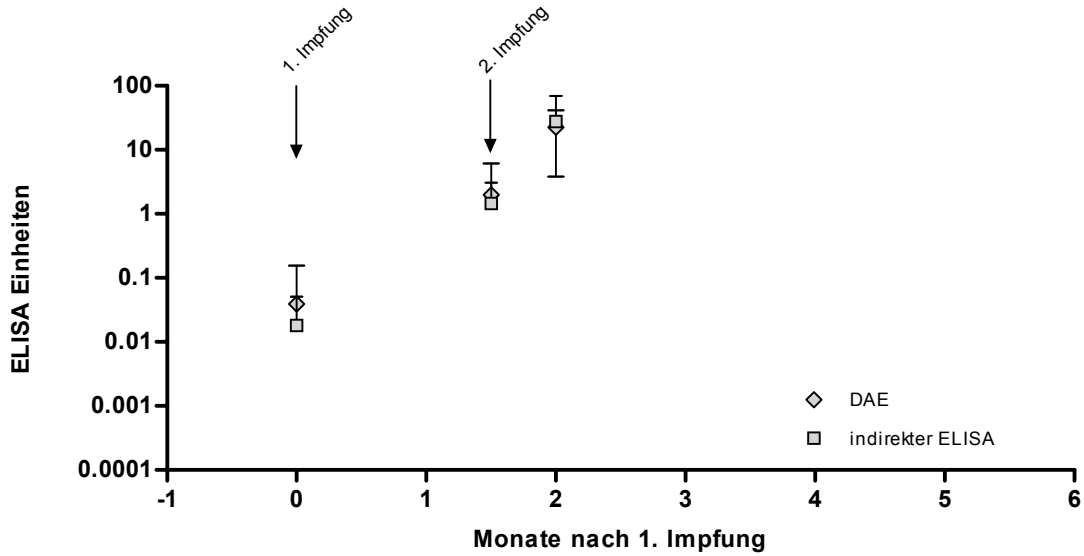
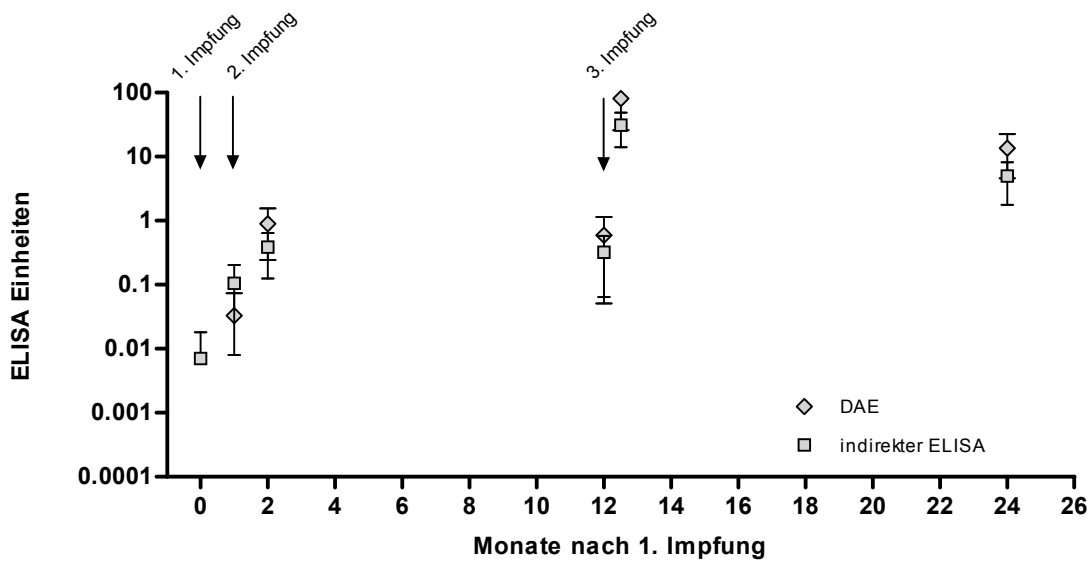


Abbildung 22: Prä- und postvakzinale Quantifizierung von Tetanus-Antitoxin der Impfstoffgruppe S8 durch DAE und indirekten ELISA – Ergebnisse in gemittelten ELISA Einheiten einschl. Standardabweichung



4.5.8.1 Verlauf der Antitoxin-Titer innerhalb der Schafgruppen S1 bis S7

In den Diagrammen 23a und 23b sind die Ergebnisse der Serumuntersuchungen als Durchschnittswerte der einzelnen Schafgruppen S1 bis S7 für die verschiedenen Blutentnahmen gezeigt. Die höchsten Titer erzielte die Gruppe S7 mit Werten von über 20 EE/ml. Die Impfstoffe S2 und S3 induzierten ebenfalls eine starke Antwort mit Antitoxin-Titern um die 10 Einheiten/ml, nachgewiesen in beiden Testsystemen. Im Bereich von 3 Einheiten/ml folgen die Impfstoffgruppen S4, S5 und S6. Im unteren Bereich lag die Gruppe S1 mit Werten von 1,11 EE/ml im DAE und 0,55 EE/ml im indirekten ELISA.

Ein Jahr nach der zweiten Impfung konnten von der Gruppe S6 Blutproben von vier Tieren gewonnen werden, die im Bestand verblieben waren. Die Untersuchung dieser Seren (vierte BE) ergab im Durchschnitt Antitoxin-Titer von 0,09 EE/ml im DAE und 0,05 EE/ml im indirekten ELISA.

Abbildung 23a: Verlauf der Tetanus-Antitoxin-Titer (Mittelwerte) innerhalb der Schafgruppen S1 bis S7 - Ergebnisse DAE

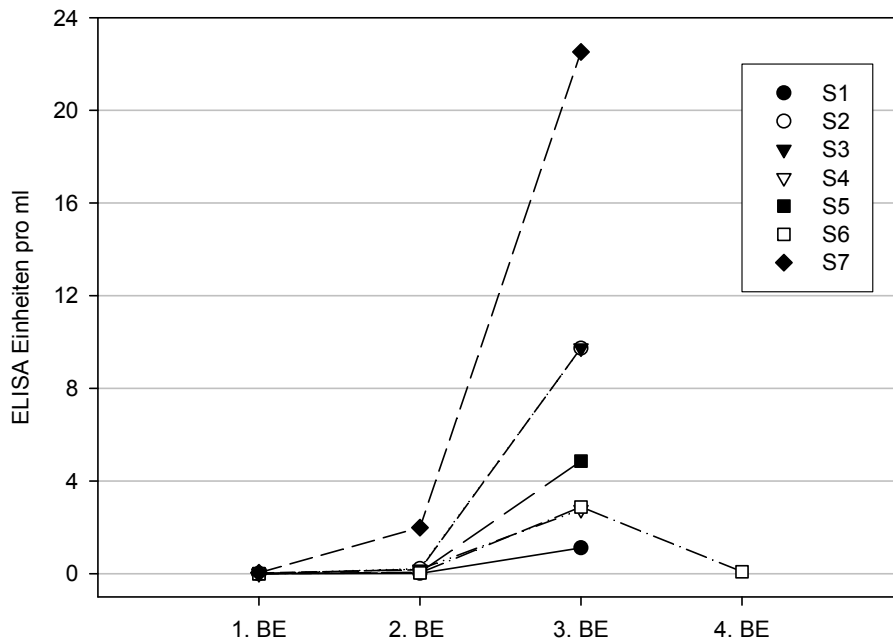
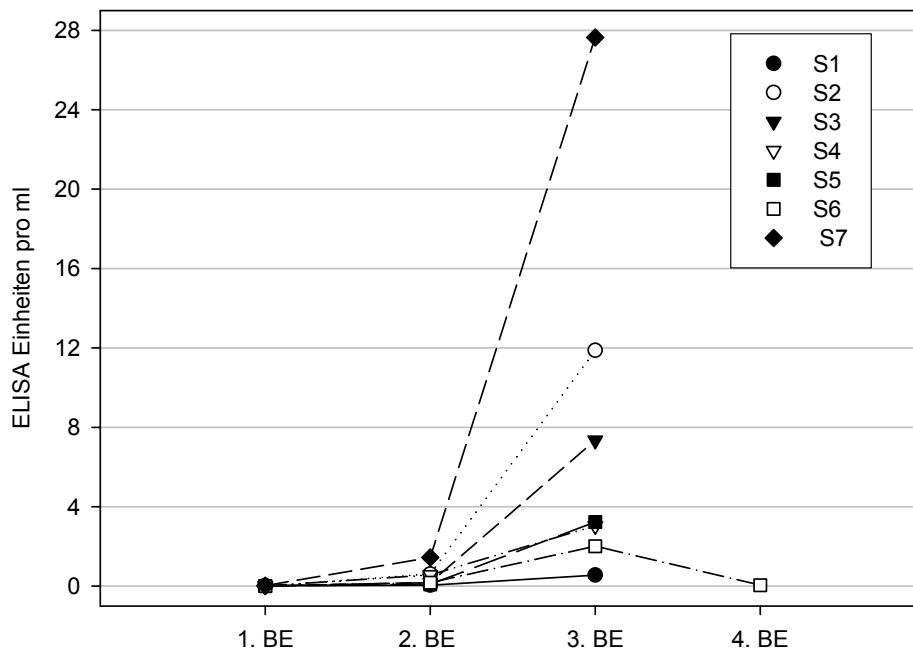


Abbildung 23b: Verlauf der Tetanus-Antitoxin-Titer (Mittelwerte) innerhalb der Schafgruppen S1 bis S7 - Ergebnisse indirekter ELISA



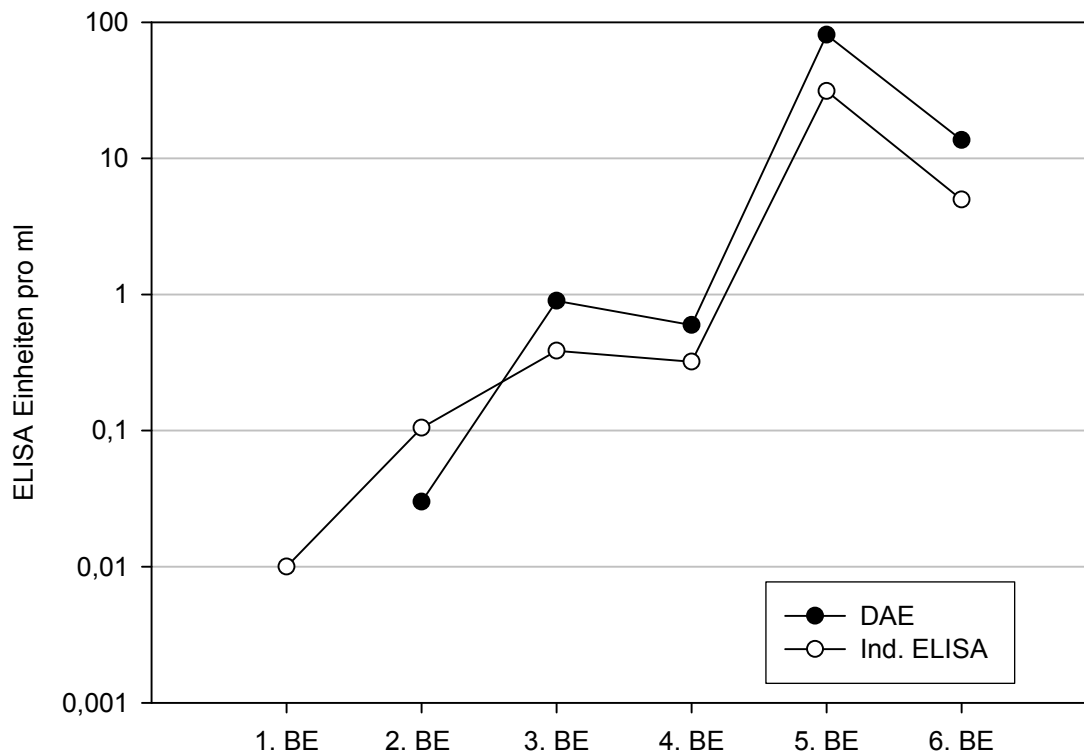
Legende:

- 1. BE (Blutentnahme) + Zeitpunkt der 1. Impfung
- 2. BE + Zeitpunkt der 2. Impfung, 6 Wochen nach 1. Impfung
- 3. BE 2 Wochen nach 2. Impfung
- 4. BE 1 Jahr nach 2. Impfung
- S1 – S7 Schaf-Impfstoffgruppen

4.5.8.2 Verlauf der Antitoxin-Titer innerhalb der Schafgruppe S8 über zwei Jahre

Im Diagramm 24 ist der Verlauf des Antikörperspiegels der Impfstoffgruppe S8 anhand der mit beiden Testsystemen erzielten Ergebnisse dargestellt. Zu erkennen ist, dass nur ein geringer Anstieg sowohl nach der ersten Impfung als auch nach der zweiten Impfung erfolgte. Zum Zeitpunkt der dritten Impfung lagen die Antitoxin-Titer im Durchschnitt bei 0,60 EE/ml im DAE und 0,32 EE/ml im indirekten ELISA. Zwei Wochen nach dieser dritten Impfung waren sehr hohe durchschnittliche Antitoxinspiegel von 80,92 EE/ml im DAE und 31,24 EE/ml im indirekten ELISA nachweisbar. Auch in den Proben einer sechsten Blutentnahme, die bei den restlichen drei Tieren der Gruppe ein Jahr nach der dritten Impfung durchgeführt wurde, waren im Durchschnitt noch Einheiten von 13,60 im DAE und 4,97 im indirekten ELISA zu finden.

Abbildung 24: Verlauf der Tetanus-Antitoxin-Titer (Mittelwerte) der Schafgruppe S8 über zwei Jahre



Legende:

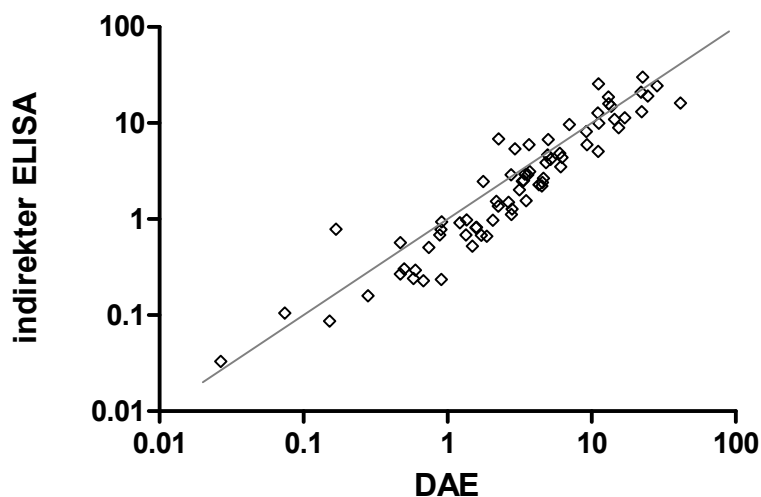
1. BE + Zeitpunkt der 1. Impfung
2. BE + Zeitpunkt der 2. Impfung, 4 Wochen nach 1. Impfung
3. BE 4 Wochen nach 2. Impfung
4. BE + Zeitpunkt der 3. Impfung, 1 Jahr nach 1. Impfung
5. BE 2 Wochen nach 3. Impfung
6. BE 1 Jahr nach 3. Impfung

4.5.8.3 Korrelationskoeffizienten von Doppel-Antigen ELISA und indirektem ELISA (Schaf)

Für die Ergebnisse der ersten Blutentnahme der Schafgruppen ist kein Korrelationskoeffizient angegeben, da sich sechs von acht Impfstoffgruppen im DAE als seronegativ zeigten (siehe Anhänge 9.4.1 bis 9.4.8). Die Korrelationskoeffizienten der Testergebnisse der Serumuntersuchungen der zweiten Blutentnahme lagen in einem Bereich von 0,46 bis 0,99, die der dritten Blutentnahme zwischen 0,72 und 0,98. Einen Koeffizienten von 1,0 ergaben die Ergebnisse der Untersuchung der vier Seren der vierten Blutentnahme der Gruppe S6. Die Serumuntersuchung von vierter bis sechster Blutentnahme der Impfstoffgruppe S8 wiesen Koeffizienten von 0,93 bis 0,99 auf.

Die Gesamtkorrelation zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme unter Einbeziehung aller Schaf-Impfstoffgruppen betrug 0,847 (siehe auch Abbildung 25).

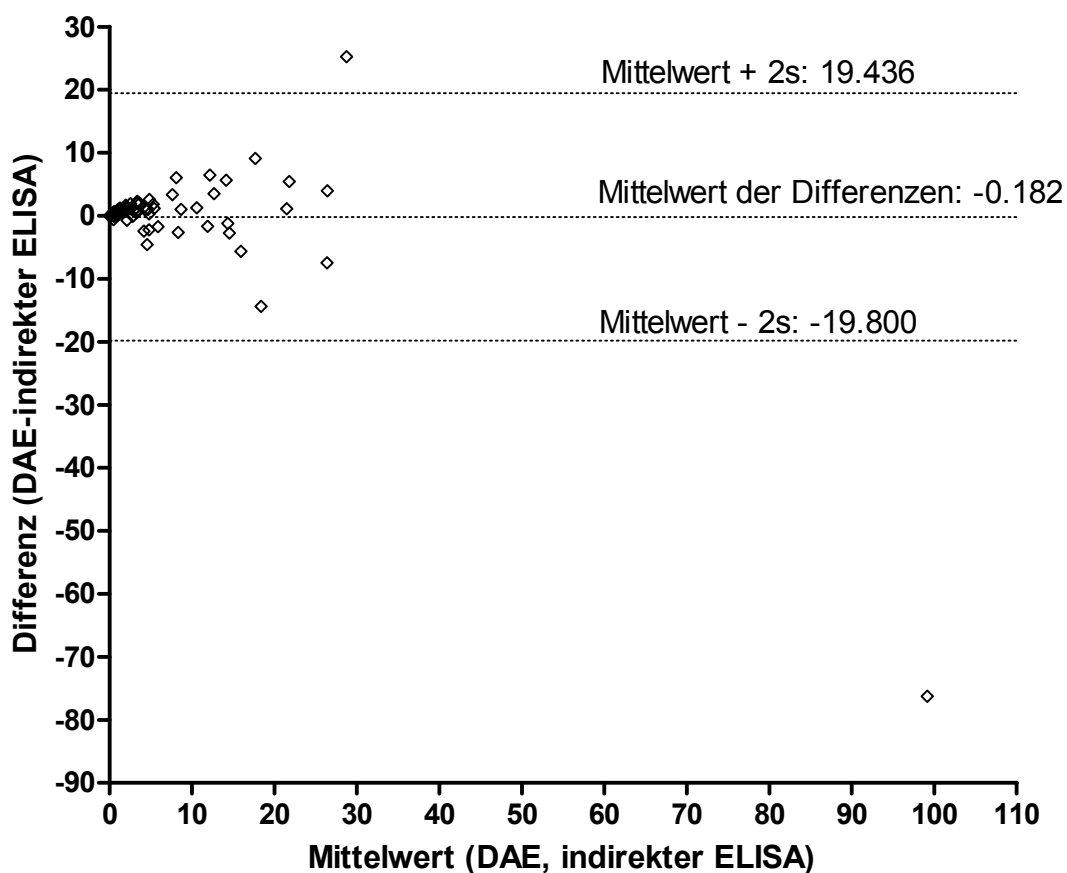
Abbildung 25: Korrelation der durch DAE und indirektem ELISA ermittelten Messwerte von Tetanus-Antitoxin in den Seren der dritten Blutentnahme aller Schaf-Impfstoffgruppen (in ELISA Einheiten)



Die grafische Darstellung der Ergebnisse nach Bland und Altman (im DAE ermittelter Antitoxin-Gehalt minus dem im indirekten ELISA ermittelten Antitoxin-Gehalt - den

Mittelwerten gegenübergestellt) ist in der u.a. Abbildung 26 zu sehen. Entsprechend den Ergebnissen der Pferde-Impfstoffgruppen war auch hier die Differenz zwischen den beiden Methoden mit zunehmenden Antitoxin-Gehalten deutlich größer.

Abbildung 26: Darstellung der Ergebnisse der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung in den Schaf-Impfstoffgruppen anhand der Bland-Altman-Graphik: Die Differenzen der ELISA Einheiten (Tetanus-Antitoxin-Werte DAE minus Tetanus-Antitoxin-Werte indirekter ELISA) aufgetragen gegen die Mittelwerte aus DAE und indirektem ELISA



Die Grenzen (mittlere Differenz plus bzw. minus der zweifachen Standardabweichung) wurden lediglich bei großen Werten (Mittelwerte aus DAE und indirektem ELISA ab etwa 30) überschritten. Dies kann als akzeptabel betrachtet werden. Der Korrelationskoeffizient nach Lin zeigte hier eine nicht so gute Übereinstimmung beider Methoden (siehe Tabelle 8); dadurch bedingt, dass im indirekten ELISA meist niedrigere Werte gegenüber dem DAE gemessen wurden (siehe Abbildung 25).

Tabelle 8: Ergebnisse für den Vergleich der DAE- und der indirekten ELISA-Methode (auf Basis der Messwerte der Seren zum Zeitpunkt zwei Wochen nach der zweiten Impfung, alle Impfstoffe S1-S8)

Impfstoffgruppen	Lin'scher Konkordanz-Korrelationskoeffizient	95%-Konfidenzintervall	
S1 bis S8	0,745	0,679	0,800

4.5.8.4 Vergleich der Tetanus-Antitoxin-Titer aller Impfstoffgruppen S1 bis S8 nach zweiter Impfung

Für den Vergleich aller Schaf-Impfstoffgruppen sind in der folgenden Tabelle 9 die im DAE ermittelten Ergebnisse der Einzeltiere (in ELISA-Einheiten) sowie der Mittelwert, der Median, die Standardabweichung und das 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes für alle Schaf-Impfstoffgruppen angegeben. Auch innerhalb der Schaf-Impfstoffgruppen waren deutliche Unterschiede in der Antikörperbildung festzustellen. Vier Impfstoffe induzierten relativ niedrige Tetanus-Antitoxin-Titer in den entsprechenden Impfstoffgruppen S1, S4, S6 und S8 gegenüber den Gruppen S2, S3 und S5 mit einem mittleren Gehalt an Antitoxin. Einen wesentlich höheren Antitoxin-Wert wies die Impfstoffgruppe S7 auf.

Tabelle 9: Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung (ELISA Einheiten zum Zeitpunkt zwei Wochen nach zweiter Impfung) mit verschiedenen Schaf-Tetanus-Impfstoffen (S1 – S8)

		Schaf-Impfstoffgruppen							
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
1. Impfung 1. Blutentnahme	Zeitpunkt*	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tetanustoxoid in Lf bzw. BiE**/ Dosis	50	27	12-24 BiE	20	5,75 BiE	13 BiE	14	10
2. Impfung	Zeitpunkt*	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1
	Tetanustoxoid in Lf bzw. BiE**/ Dosis	50	27	12-24 BiE	8	5,75 BiE	13 BiE	14	10
3. Blutentnahme	Zeitpunkt*	2	2	2	2	2	2	2	2
Titer der Einzeltiere in ELISA Einheiten pro ml, 2 Wochen nach 2. Impfung		0,07	11,04	9,29	3,68	1,35	2,81	22,64	1,49
		4,52	1,59	2,26	0,00	6,12	2,76	16,96	0,50
		0,00	13,11	22,24	1,77	4,83	2,18	41,37	0,68
		1,34	3,71	3,51	3,44	14,42	0,74	13,73	1,87
		0,15	5,01	7,02	4,64	15,40	3,61	28,41	0,47
		0,47	11,19	3,37	3,30	1,72	2,65	6,22	0,03
		0,60	11,24	24,50	4,95	0,91	2,25	3,16	0,58
		0,28	5,19	11,11	2,94	0,88	4,55	9,17	1,57
		0,91	22,05	4,31	0,17	2,06	1,22	61,04	
		2,78	13,18			0,90	6,02		
Mittelwert (EE)		1,11	9,73	9,73	2,77	4,86	2,88	22,52	0,90
Median		0,53	11,12	7,02	3,30	1,89	2,71	16,96	0,63
Standardabweichung		1,46	6,02	8,28	1,78	5,59	1,54	18,71	0,65
95%-Konfidenzintervall	Untergrenze	0,73	1,78	4,34	0,23	3,51	0,94	9,49	0,37
	Obergrenze	1,49	17,68	15,13	5,30	6,21	4,81	35,56	1,43

* Zeitpunkt in Monaten nach 1. Impfung / Blutentnahme

** BiE = Bindungseinheiten

4.5.8.5 Ergebnisse der Untersuchung auf Kreuzreaktivität

Die gewonnenen Seren der ersten Blutentnahme (Nullblutstatus) von den fünf mit einem monovalenten *C. chauvoei* Impfstoff geimpften Schafen sowie die Seren der zweiten Blutentnahme (vierzehn Tage nach der zweiten Impfung gewonnen) reagierten weder im DAE noch im indirekten ELISA mit Tetanustoxoid. Damit war keine Kreuzreaktivität in den Testsystemen durch die Verabreichung eines monovalenten *C. chauvoei* Impfstoffes festzustellen.

4.6 Ergebnisse der Überprüfung einzelner Testseren im Mäuseneutralisationstest (*in vivo*)

Für die im Mäuseneutralisationstest (MNT) geprüften einzelnen Schaf- und Pferdeseren wurden Seren aus Blutentnahmen gewählt, die einen möglichst großen zeitlichen Abstand zur zweiten Immunisierung (i. d. R. der Grundimmunisierung) hatten, eine dritte Immunisierung aber noch nicht erfolgt war. Für die Schaf-Impfstoffe standen ausschließlich Seren der Gruppen S6 und S8 zur Verfügung. Innerhalb der Pferdegruppen wurden auch Seren von Tieren untersucht, deren Tetanus-Antitoxin-Gehalt unter 0,01 EE/ml im ELISA lag. Die Ergebnisse der im ELISA ermittelten Einheiten sind in Tabelle 10 den im Mäuseneutralisationstest (*in vivo*) Ergebnissen gegenübergestellt.

Zusätzlich konnten Seren des Tieres 7 aus der Pferde-Impfstoffgruppe P4, die zu vier verschiedenen Zeitpunkten entnommen worden waren, im MNT untersucht werden. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 10: Tetanus-Antitoxin-Bestimmung einzelner Seren aus den Schaf- und Pferdegruppen - Gegenüberstellung der im ELISA ermittelten Einheiten (EE) und im Mäuseneutralisationstest bestimmten Internationalen Einheiten (IE)

Impfstoff- gruppe	Tier und Blutentnahme	Monate nach 2. Impfung	EE/ml <i>in vitro</i> DAE / Ind. ELISA		IE/ml <i>in vivo</i> MNT
S6	Tier 6, 4.	12	0,24	0,15	> 0,05
S8	Tier 5, 4.	12	0,24	0,12	> 0,05
S8	Tier 7, 4.	12	0,04	0,03	0,01
P10	Tier 7, 7.	5	0,09	0,09	> 0,05
P9	Tier 3, 4.	8	0,04	0,26	> 0,05
P8	Tier 7, 5.	12	0,16	0,13	> 0,05
P8	Tier 9, 5.	12	0	0,006	< 0,005 (negativ)
P7	Tier 6, 4.	5	0,004	0,001	0,005
P2	Tier 10, 4.	12	0,005	0,054	> 0,005<0,01

Die für die Schafseren der Gruppen S6 (Tier 6) und S8 (Tier 5) im MNT ermittelten Einheiten ergaben Werte größer 0,05 IE/ml (eine genauere Bewertung war durch das prüfende Labor nicht möglich). In beiden ELISAs lagen die ermittelten Einheiten oberhalb des in der Literatur beschriebenen Schutztiters von 0,1 IE/ml. Im Serum des Tieres 7 der Gruppe S8 war der Gehalt an Tetanus-Antitoxin geringer (0,04 EE/ml im

DAE bzw. 0,03 EE/ml im indirekten ELISA) und zeigte im Mäuseneutralisationstest einen Wert von 0,01 IE/ml, also unterhalb des Schutztiters für das Schaf.

Die drei Pferdeseren der Gruppen P10 (Tier 7), P9 (Tier 3) und P8 (Tier 7), die im ELISA Einheiten oberhalb 0,01 EE/ml aufwiesen, wurden auch im MNT mit größer 0,05 IE/ml bewertet und lagen damit über dem erforderlichen Schutztiter, der in der Literatur mit 0,01 IE/ml angegeben wird.

Antitoxin-Gehalte im DAE unter 0,01 EE/ml waren in Seren aus den Gruppen P8 (Tier 9), P7 (Tier 6) und P2 (Tier 10) gemessen worden. Im MNT zeigten diese Seren eine Wertigkeit von $\leq 0,005$ IE/ml. Damit ergab die Untersuchung der Seren sowohl im ELISA als auch im MNT Werte unterhalb des Schutztiters von 0,01 IE/ml.

Tabelle 11: Tetanus-Antitoxin-Bestimmung von Seren des Tieres Nr. 7 der Pferde-Impfstoffgruppe P4 - Gegenüberstellung der im ELISA ermittelten Einheiten (EE) und im Mäuseneutralisationstest bestimmten Internationalen Einheiten (IE)

Blutentnahme	Zeitpunkt der Blutentnahme	EE/ml <i>in vitro</i> DAE / Ind. ELISA		IE/ml <i>in vivo</i> MNT
1.	bei 1. Impfung	0	0,01	$\leq 0,01$
2.	bei 2. Impfung	0,002	0,07	$\leq 0,01$
3.	2 Wochen nach 2. Impfung	1,48	1,94	$\geq 3,0$
5.	14 Monate nach 2. Impfung	0,05	0,05	0,034

Die im MNT untersuchten Serumproben des Tieres 7 aus der Gruppe P4 ergaben für die ersten beiden Blutentnahmen Werte $\leq 0,01$ IE/ml pro ml (Anmerkung: Eine Prüfung der Seren im Mäuseneutralisationstest unterhalb 0,01 IE/ml war technisch durch das Labor nicht möglich). Damit befanden sie sich in dem Bereich der DAE Ergebnisse. Die im indirekten ELISA ermittelten Einheiten lagen mit 0,01 EE/ml (erste BE) bzw. 0,07 EE/ml (zweite BE) höher. Der Anstieg des Antikörperspiegels nach der zweiten Impfung war in den Ergebnissen der Untersuchungen der Proben der dritten Blutentnahme deutlich zu sehen. Das *in vivo*-Ergebnis ergab einen Wert ≥ 3 IE/ml und lag damit über den im ELISA ermittelten Einheiten von 1,48 EE/ml (DAE) und 1,94 EE/ml (indirekter ELISA). Vierzehn Monate nach der zweiten Impfung konnten noch Antitoxin-Werte von 0,05 Einheiten/ml in den ELISAs detektiert

werden. Im MNT zeigte das Serum eine Wertigkeit von 0,034 IE/ml. Damit wurde der Schutztiter mit der zweiten Impfung induziert und lag auch vierzehn Monate danach noch über dem geforderten Wert von 0,01 IE/ml für das Pferd. Die Ergebnisse aus ELISA und MNT der fünften Blutentnahme wiesen eine gute Übereinstimmung auf.

5 DISKUSSION

5.1 Zur Aufgabenstellung

Bei der Testung von Tetanusimpfstoffen ist eine Prüfung in den Zieltieren Pferd und Schaf durch Belastungsversuche nicht möglich. Daher wird die Entwicklung protektiver Antikörper im Zieltier durch passive Belastungsversuche in der Maus verfolgt. Dazu erhalten Mäuse abgestufte Verdünnungen des Pferde- bzw. Schafserums mit Toxin. Nachteilig daran ist der belastende Tierversuch und die schwierige Standardisierung. Daher soll die Quantifizierung spezifischer Antikörper nun anstelle des passiven Mäuseneutralisationstest in einem ELISA stattfinden. Da Tetanusvakzine für unterschiedliche Tierarten zugelassen sind, ist es notwendig, dass der ELISA auch Antikörper aus Seren verschiedener zu prüfender Spezies erkennt.

Ursprünglich wurde die Entwicklung eines Toxinbindungs-Inhibitionstest avisiert [3,76], welcher insbesondere Tetanustoxin neutralisierende Antikörper erfasst. Vorteilhafterweise können beim ToBI die Seren tierartunabhängig d.h. ohne markierte anti-Spezies-Antikörper geprüft werden. Dieser Test zur Chargenprüfung von Tetanusimpfstoffen für Tiere war im Jahr 2003 in die entsprechende Monographie [2] aufgenommen worden. Hierfür erhalten Meerschweinchen die zu prüfende Impfstoffcharge in der vorgeschriebenen Dosis zweimal im Abstand von 28 Tagen. Anschließend erfolgt die Bewertung anhand eines homologen Referenzserums. Durch die zweimalige Applikation der vollen Impfstoffdosis erfolgt im Meerschweinchen die Induktion sehr hoher Antitoxin-Titer.

Im Gegensatz dazu war die Anwendung des ToBI zur Untersuchung niedrigtitriger Pferde- bzw. Schafseren, die im Rahmen von Zulassungsuntersuchungen relevant sind, nicht immer erfolgreich. Bei diesen Seren war ein mehrmaliges Wiederholen des Tests mit verschiedenen Anfangsverdünnungen notwendig, bis verwertbare Daten, die eine Auswertung im Parallel-line-assay gestatteten, vorlagen.

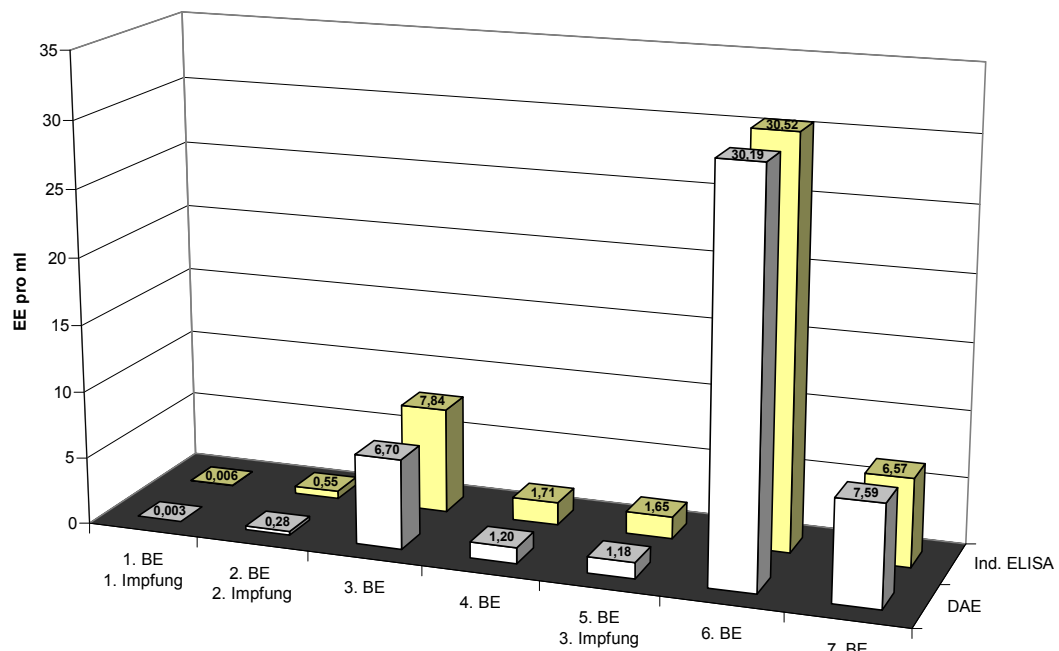
Zusätzlich ist die Vorinkubation von Serum mit Toxin bzw. Toxoid und das Überführen dieser Mischungen auf eine zweite Mikrotiterplatte sehr zeitaufwendig und führt zu einer Erhöhung der Fehleranfälligkeit des Tests.

Aufgrund dieser Beobachtungen bzw. Erfahrungen und im Hinblick auf unterschiedliche Anwender (Prüfbehörden, Impfstoffhersteller, Tierärzte) und Anwendungsbereiche (Erfolgskontrolle von Impfungen, Bestimmung des Immunstatus) wurde ein Doppel-Antigen ELISA [4] entwickelt. Der Vorteil liegt in der Eigenschaft der Spezies-unabhängigen Prüfung von Seren, vergleichbar dem ToBI, da auch hier ohne anti-Spezies-Antikörper gearbeitet wird. Kristiansen et al. [4] konnten außerdem eine gute Korrelation der Ergebnisse aus DAE und dem Mäuseneutralisationstest anhand des Vergleiches von insgesamt 214 Humanseren mit einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,96$ aufzeigen.

Zum Vergleich und zur Gegenprüfung erfolgte die Untersuchung der Pferde- und Schafseren überdies jeweils in einem parallel entwickelten, indirekten Festphasen ELISA mit peroxidase markierten anti-Pferde- bzw. anti-Schaf-Antikörpern.

Im Rahmen unserer Wirksamkeitsstudien konnte mit beiden Testsystemen, dem DAE und dem indirekten ELISA, der Antikörpergehalt nach Immunisierung zu verschiedenen Zeitpunkten erfasst und quantifiziert werden. Illustriert am Beispiel der Pferde-Impfstoffgruppe P1 (Abbildung 27) zeigte sich bei der Testung der Seren aus sieben Blutentnahmen eine hohe Übereinstimmung. Diese Gleichförmigkeit setzt aber voraus, dass die verwendeten Referenzseren gegeneinander sorgfältig kalibriert wurden.

Abbildung 27: Beispiel: Verlauf der Tetanus-Antitoxin-Titer (Mittelwerte von zehn Seren pro Blutentnahme) bei Prüfung am Pferd (Gruppe P1) Ergebnisse DAE und indirekter ELISA



Legende:

- x-Achse: Impftermin/Blutentnahme
- y-Achse: ELISA Einheiten / ml
- BE = Blutentnahme, EE = ELISA Einheiten
- 2. BE + 2. Impfung, 4 Wochen nach 1. Impfung
- 3. BE 2 Wochen nach 2. Impfung
- 4. BE 6 Monate nach 2. Impfung
- 5. BE + 3. Impfung, 1 Jahr nach 2. Impfung
- 6. BE 2 Wochen nach 3. Impfung
- 7. BE 6 Monate nach 3. Impfung

5.2 Probleme beim Vergleich von Doppel-Antigen ELISA und indirektem ELISA

Am oben beschriebenen Beispiel kann die gute Übereinstimmung bei hohen Titern deutlich präsentiert werden. Bei geringen Titern ließen sich tendenziell jedoch auch Unterschiede feststellen. Desgleichen weisen Simonsen et al. [75] darauf hin, dass ein indirekter ELISA für die Quantifizierung Tetanustoxoid neutralisierender Antikörper in Humansenen durch die Überbewertung von Seren mit niedrigen Antitoxin-Titern begrenzt einsetzbar sei. Dies dürfte spekulativ auf die Erfassung von nicht neutralisierenden Antikörpern zurückzuführen sein. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Seren der ersten Blutentnahmen bestätigten diese Tendenz im indirekten Testsystem, da die Tiere im Durchschnitt geringe Titer aufwiesen, während diese Seren im DAE überwiegend als negativ bewertet wurden. Auch in den

Serumproben der zweiten Blutentnahme (nach erfolgter erster Immunisierung) zeigten sich geringfügig höhere Antitoxin-Werte beim Nachweis mit dem indirekten ELISA. Bei der Untersuchung von Seren mit niedrigen Antitoxin-Gehalten hatten auch Kristiansen et al. [4] sowie Simonsen et al. [93] eine höhere Bewertung der Seren im indirekten Testsystem beschrieben. Die im indirekten ELISA ermittelten höheren Titer in den Proben der zweiten Blutentnahme könnten auch dadurch bedingt sein, dass noch vorhandene IgM-Antikörper mitdetektiert werden [94]. Das Konjugat (Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper gegen leichte und schwere Kette der Zieltierspezies gerichtet) kann an die leichte Kette eines IgM-Antikörpers binden und damit die Menge an gebundenen Antikörpern des IgG-Typs überschätzt werden.

Bei Seren mit einem mittleren oder hohen Antikörpergehalt besteht eine bessere Korrelation der ELISA Ergebnisse. Die im ELISA gemessene Bindungsaktivität der Antikörperpopulation ist abhängig von der Gesamtkonzentration der Antikörper und von ihrer Avidität, der Bindungsstärke. Es ist bekannt, dass im Laufe der Immunantwort, bei wiederholter Immunisierung, Antikörper mit immer höherer Affinität induziert werden [95]. Die bessere Übereinstimmung der Ergebnisse beider ELISAs könnte also auf die so genannte „Affinitätsreifung“ zurückzuführen sein, die sich sowohl innerhalb der Schafgruppen als auch der Pferdegruppen ab der dritten Blutentnahme zeigt.

Dass es bei sehr hohen Titern zu einer evtl. Überbewertung der Seren im DAE kommen kann, wurde ebenfalls durch Kristiansen et al. [4] beschrieben. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Proben zwei Wochen nach dritter Immunisierung (fünfte Blutentnahme) der Schafgruppe S8 divergieren hinsichtlich der in beiden Testsystemen ermittelten Einheiten stark. Im DAE wurden Titer mit einem Mittelwert von 81 Einheiten/ml gemessen, gegenüber 31 Einheiten/ml im indirekten Testsystem (siehe Anhang 9.4.8). Zur Klärung, welcher ELISA hier tatsächlich eher mit den Internationalen Einheiten übereinstimmt, müssten in späteren Untersuchungen Seren mit sehr hohen Antitoxin-Gehalten im Mäuseneutralisationstest vergleichend geprüft werden. Für den Schutzstatus der hier untersuchten Schafe ist dies allerdings nicht relevant, da die Antitoxin-Werte weit oberhalb des Schutztiters liegen.

Wie eingangs erwähnt wurde der Doppel-Antigen ELISA präferiert, um den Tetanus-Antitoxin-Status der Tiere zu untersuchen. Im folgenden werden daher die Ergebnisse, die aus der Bestimmung durch den DAE resultieren, diskutiert.

5.3 Tetanus-Antitoxin-Status nach Grundimmunisierung (Pferd und Schaf)

Um zu testen, ob die avisierte Bewertungstechnik für Impfstoffe anhand des Titers beim Zieltier (Pferd / Schaf) geeignet ist, wurden zugelassene Impfstoffe für die Immunisierung (Grund- und Auffrischungsimpfung) von Pferden und Schafen eingesetzt. In Abhängigkeit vom Impfstoff ist eine zwei- bzw. dreimalige Grundimmunisierung vorgegeben. Vergleicht man die im ELISA ermittelten Werte für das Pferd (Blutentnahme in der Regel vierzehn Tage nach der letzten Grundimmunisierung) mit dem im Toxinneutralisationstest festgelegten Schutztiter von 0,01 IE/ml, lagen von 92 untersuchten Pferdeseren 91 über diesem Wert. Das Tier Nr. 6 (P6, siehe Anhang 9.3.6) reagierte verzögert auf die Impfung. Die Untersuchung der Serumprobe der vierten Blutentnahme ergab für diesen „low responder“ einen Antitoxin-Gehalt von 1,35 EE/ml.

Schafe erhalten in der Regel eine Grundimmunisierung, die zwei Impfungen einschließt. Eine Auffrischungsimpfung ist nur für Muttertiere oder Böcke auf Grund der höheren Lebenszeit vorgegeben. Von 75 nach der Grundimmunisierung gewonnenen Serumproben wiesen 72 einen Tetanus-Antitoxin-Gehalt größer 0,1 EE/ml im DAE auf. Damit lagen sie oberhalb des geforderten Schutztiters von 0,1 IE/ml. Die Seren von zwei der drei restlichen Tiere enthielten einen geringeren Antitoxin-Gehalt von 0,07 EE/ml (Tier Nr. 1, Gruppe S1, siehe Anhang 9.4.1) und 0,03 EE/ml (Tier Nr. 7, Gruppe S8, siehe Anhang 9.4.8). Das Tier Nr. 2 der Impfstoffgruppe S4 (siehe Anhang 9.4.4) reagierte überhaupt nicht auf die Impfungen.

Zur endgültigen Implementierung der neuen Methode im Rahmen der Zulassung von Impfstoffen ist es jedoch notwendig, dass die Anwenderlaboratorien (Impfstoffhersteller) den DAE und den Toxinneutralisationstest zunächst vergleichend zur Untersuchung niedrigtitriger Seren (kleiner 1,0 EE/ml) einsetzen. Da hersteller-spezifisch unterschiedliche Toxine und Antitoxin-Standards (oder in-house Referenz-

Antitoxine) Anwendung finden, erfordert es das Abgleichen beider Methoden, um eine eindeutige Festlegung des schutzverleihenden Titers ermittelt im DAE festzulegen. Der Umfang der vorliegenden Ergebnisse erlaubt noch keine Aussage, ob die nach Neutralisationstest festgelegten Schutztiter direkt auf den Doppel-Antigen ELISA übertragbar sind.

5.4 Vergleich der Immunogenität verschiedener Impfstoffe im Pferd

Ein Vergleich der einzelnen Pferde-Impfstoffgruppen war schwierig, da für mono- und polyvalente Produkte unterschiedliche Immunisierungsschemata vorgegeben sind. So wird beispielsweise für Impfstoffe, die eine Influenzacomponente enthalten, eine dritte Immunisierung sechs Monate nach der zweiten Impfung im Rahmen der Grundimmunisierung vorgeschrieben.

Interessant für einen Vergleich ist jedoch, wie sich Impfstoffe verhalten, die unterschiedlich hohe Konzentrationen des Tetanustoxoids enthalten. Diese Antigenkonzentration schwankte von 27 bis zu 100 Flockulierungseinheiten pro Dosis (siehe Tabelle 7, Abschnitt 4.5.5.5). Es zeigte sich, dass die Tetanustoxoid-Lf-Konzentrationen der intramuskulär verabreichten Impfstoffdosen per se offenbar keinen prädiktiven Wert für die Vorhersage der später gemessenen Immunogenität im Zieltier besitzt. Jansen und Knoetze [38] stellten allerdings einen Unterschied in den Antitoxin-Titern bei Pferden fest, die einmalig mit 8 und 16 Flockulierungseinheiten geimpft worden waren. Demnach entwickelte die Gruppe mit den 16 Lf Einheiten Tetanustoxoid im Durchschnitt leicht höhere Titer. Auch Edsall [60] hatte eine Differenz bezüglich der Höhe der Antitoxin-Titer in Personengruppen festgestellt, die unterschiedliche Dosen Tetanustoxoid erhalten hatten. So hatten Personen, die mit 25 Flockulierungseinheiten Tetanustoxoid geimpft waren, eindeutig höhere Antitoxin-Werte als Personen, die nur 5 Flockulierungseinheiten pro Dosis bekommen hatten. Danach besteht anscheinend bei geringen Dosen an Immunisierungsantigen sehr wohl eine Dosis-Wirkungsbeziehung, die aber zwischen Gehalten von 25 bis 100 Flockulierungseinheiten in den Pferden nicht mehr beobachtet werden konnte.

Unabhängig vom Antigengehalt stellten wir deutliche Unterschiede in der Induktion von Antikörpern (ELISA) durch die verschiedenen Impfstoffe (siehe Tabelle 7,

Abschnitt 4.5.5.5) fest. Mittels Clusteranalyse ließen sich die Impfstoffgruppen in drei Kategorien einteilen (Pseudo-t-Statistik-Kriterium, Wards-Minimum-Varianz-Methode, siehe Anhang 9.8): Eine Kategorie mit hohen Titern, unter die die Impfstoffgruppen P3, P6 und P8 fielen, eine mit mittleren, denen die Impfstoffgruppen P1, P2, P4, P5, P9, und P10 zugeordnet wurden, sowie eine Kategorie mit niedrigen Titern mit der Impfstoffgruppe P7.

Damit waren innerhalb der Pferde-Impfstoffgruppen recht deutliche (aber statistisch nicht signifikante) Unterschiede in der Bildung von Antikörpern durch eine zweimalige Immunisierung festzustellen, ohne dass jedoch eine Korrelation zum Lf-Gehalt abzuleiten wäre.

5.4.1 Adjuvanseinfluss auf die Immunantwort

Zur Beurteilung des Adjuvanseinflusses wurde die Immunantwort zwei Wochen nach zweiter Immunisierung in allen Gruppen herangezogen. Bei einzelnen Impfstoffen wurden diese Aussagen ergänzt durch Ergebnisse aus Serumuntersuchungen nach zwei Jahren.

Einige Pferdegruppen (P6, P3 und P8), die Impfstoffe mit Aluminiumsalzen oder Quil A inklusive Aluminiumphosphat erhalten hatten, zeigten insbesondere zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung mit Antitoxin-Werten größer 10 EE/ml eine hohe Immunantwort. Andere Gruppen, die mit Aluminiumsalz adjuvierte Impfstoffe erhalten hatten (P1, P2, P4, P5, P9 und P10), erreichten mittlere Antitoxin-Werte von etwa 4 EE/ml.

In der Gruppe P7, immunisiert mit einem Produkt unter Verwendung des Adjuvans Quil A (ohne Aluminiumsalz), konnte zu diesem Zeitpunkt nur ein Durchschnittswert von 0,45 EE/ml ermittelt werden. Allerdings umfasste die Grundimmunisierung drei Impfungen und war damit noch nicht abgeschlossen. Die Induktion einer lang anhaltenden IgG Antwort [47] konnte aber nach weiteren Impfungen im Verlauf der Untersuchungen (Anhang, Tabelle 9.3.7) gezeigt werden. Auch ein Jahr nach der vierten Impfung lag der Durchschnittswert dieser Gruppe bei 3,28 EE/ml.

Serumuntersuchungen der Gruppen P2 und P10 (Aluminiumhydroxid adjuventierte Impfstoffe) zum Zeitpunkt der vierten Impfung (zwölf bzw. dreizehn Monate nach dritter Immunisierung) ergaben Antitoxin-Titer von durchschnittlich 5,65 EE und 1,23 EE pro ml (Anhang, Tabellen 9.3.2 und 9.3.10). Anhand dieser Ergebnisse waren bezüglich des Einflusses des Adjuvans auf die Antikörperbildung keine Tendenzen zu erkennen.

5.4.2 Einfluss mono- und polyvalenter Impfstoffe auf die Immunantwort

Diese Vergleiche wurden erschwert, da unterschiedliche Impfintervalle vorgeschrieben sind und verschiedene Impfantigene in den Produkten kombiniert sind.

Die in Tabelle 7 dargestellten Ergebnisse lassen keine Tendenz erkennen, dass die Zusammensetzung des Impfstoffes einen Einfluss auf die Immunantwort hat. Die monovalenten Produkte (P1-P5) fanden sich mit den Kombinationsprodukten (P6-P10) gleichermaßen innerhalb der Tabelle verteilt. Ausnahme war die Impfstoffgruppe P7 (Tetanus-Impfstoff mit Influenzacomponente), die, wie unter Punkt 4.5.1 beschrieben, einen im Vergleich zu den anderen Gruppen niedrigen Antitoxin-Wert nach zweimaliger Impfung aufwies.

Ein Unterschied zeigte sich beim Vergleich der Gruppen P4 und P8. Es handelte sich um den gleichen Tetanus-Impfstoff und zwar einmal ohne (P4) und einmal mit Influenzacomponente (P8). Beide Impfstoffe wurden innerhalb eines Gestüts getestet. In den Seren der dritten bis fünften Blutentnahme war ein höhere Antikörperantwort des ISCOM-haltigen Kombinationsimpfstoffes feststellbar (siehe auch Abschnitt 4.5.5.4). Eine lang andauernde Antikörperpersistenz zeigten Untersuchungen von Mumford et al. [49] mit ISCOM-haltigen Influenzaimpfstoffen mit Tetanuskomponente, bei denen noch 20 Monate nach Immunisierung protektive Titer von $\geq 0,01$ IE/ml im Pferd nachgewiesen wurden. Zu den Ergebnissen der Untersuchungen der Seren der vierten und fünften Blutentnahme ist allerdings anzumerken, dass diese Blutentnahmen nicht zeitgleich nach der zweiten Immunisierung geschahen. Die Entnahmen der Gruppe P4 erfolgten acht Monate (vierte BE) und 14 Monate (fünfte BE), die der Gruppe P8 sieben (vierte BE) und zwölf Monate (fünfte BE) nach zweiter Immunisierung (Anhang, Tabellen 9.3.4 und 9.3.8). D. h. die Seren der Gruppe P8 mit den höheren ELISA Werten entstammen Serumproben,

deren Entnahme zu einem früheren Zeitpunkt nach der Immunisierung erfolgte und daraus resultierend evtl. höhere Antikörperspiegel aufweisen könnten. Eine eindeutige Tendenz war daher nur im Ergebnis der dritten Blutentnahme zu sehen. Ob auch der Abstand zwischen den ersten beiden Impfungen eine Rolle spielte, kann nicht beurteilt werden. Der zeitliche Abstand der Impfungen betrug in der Gruppe P4 vier Wochen und in der Gruppe P8 sechs Wochen.

5.4.3 Vergleich der Immunantworten bei verschiedenen Pferderassen

Es war möglich, einen monovalenten Tetanus-Impfstoff unterschiedlichen Pferderassen zu verimpfen. Die Tiere der Gruppe P4 gehörten zu einem Gestüts mit reinem Haflinger Bestand. Die Gruppe P5 umfasste Pferde der Rassen „Araber“, „Württemberg“, „Trakehner“ und „Schwarzwälder Kaltblut“. Bis einschließlich der dritten Blutentnahme waren die Titer der Prüfseren der Gruppe P4 etwas höher, während bei der vierten und fünften Blutentnahme die Antitoxin-Titer der Gruppe P5 im Durchschnitt etwas höher lagen (siehe auch Abschnitt 4.5.5.3). Der Unterschied könnte dadurch begründet sein, dass die vierte und fünfte Blutentnahmen der Gruppen P4 und P5 nicht zu identischen Zeitpunkten durchgeführt wurden: Die der Gruppe P5 erfolgten sechs Monate (vierte BE) und zwölf Monate (fünfte BE) nach zweiter Immunisierung (Anhang, Tabelle 9.3.5), die der Gruppe P4 acht Monate (vierte BE) und vierzehn Monate (fünfte BE) nach der zweiten Impfung (Anhang, Tabelle 9.3.4). Daher ist von annähernd gleichen Immunantworten in den Beständen auszugehen, unabhängig von der Rasse.

5.5.4 Antitoxin-Status der Pferde zu Beginn der Immunisierungsversuche

Die Angaben der Hersteller bezüglich des Mindestalters der Pferde für die erste Immunisierung sind unterschiedlich und variieren zwischen vier und sechs Monaten. Wilson et al. [42] verweist auf Interferenzen von maternalen Antikörpern mit der Immunantwort der Fohlen. Seinen Untersuchungen zu Folge findet eine Serokonversion nach zweimaliger Impfung sowohl bei sechs Monate alten Tieren als auch bei Jährlingen in gleicher Weise statt. Dagegen zeigten drei Monate alte Fohlen von geimpften Stuten keine Serokonversion. Er empfiehlt demzufolge, Fohlen geimpfter Stuten nicht vor dem Alter von sechs Monaten zu immunisieren. Dies wurde schon durch Untersuchungen von Baljer et al. [66] belegt, wonach Fohlen grundimmunisiert im juvenilen Alter, nur mit einem geringen Anstieg der Antitoxin-

Titer reagierten. Daher leitete sich die Empfehlung ab, Fohlen beginnend ab dem fünften bis sechsten Lebensmonat einer Erstimpfung zu unterziehen. Auch Thein [96] empfiehlt eine aktive Immunisierung von Fohlen frühestens ab dem sechsten Lebensmonat. Vorausgesetzt, dass die Mutterstute ordnungsgemäß gegen Tetanus geimpft wurde und über deren Kolostrum Tetanus-Antikörper einen Immunschutz verleihen.

Die in Tabelle 12 dargestellten DAE Ergebnisse der ersten Blutentnahme lassen darauf schließen, dass anscheinend noch maternale Antikörper zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung in einigen Tieren nachgewiesen wurden. Einen sehr hohen Titer wies das Tier Nr. 6 der Gruppe P2 mit einem Wert von 4,16 EE/ml auf, das demzufolge einer Impfung erst zu einem späteren Zeitpunkt bedurft hätte.

Mit einer Testsensitivität von 0,00014 IE/ml konnten im DAE sehr geringe Antitoxin-Titer nachgewiesen werden.

Tabelle 12: „Nullblut-Status“ aller Pferde-Impfstoffgruppen (P1 – P10):
DAE Ergebnisse (EE/ml)

Tier Nr.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
1	negativ	negativ	0,003	negativ	0,002	negativ	negativ	negativ	0,002	negativ
2	0,02	0,005	0,002	0,006	negativ	negativ	negativ	0,05	0,007	negativ
3	negativ	0,01	0,04	ausg.	0,002	negativ	negativ	negativ	0,0003	negativ
4	negativ	negativ	negativ	negativ	0,0001	0,05	0,0006	0,02	negativ	0,0003
5	negativ	0,10	ausg.	0,0001	0,0007	negativ	negativ	0,002	0,0002	0,004
6	negativ	4,16	negativ	ausg.	0,002	negativ	negativ	0,01	negativ	negativ
7	negativ	0,08	0,01	negativ	0,007	negativ	0,002	0,02	0,06	negativ
8	0,008	0,003	ausg.	0,0001	0,0006	0,003	negativ	negativ	negativ	negativ
9	negativ	0,09	0,006	0,02	0,003	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
10	negativ	0,02	negativ	0,002	0,003	negativ	0,002	negativ	negativ	negativ
11	negativ	negativ								

Legende: ausg. = Tier ausgeschlossen

5.5 Antikörperinduktion der verschiedenen Impfstoffe im Schaf

Analog zu den Pferde-Impfstoffen wurde die Titerentwicklung nach zweimaliger Immunisierung in den geimpften Schafgruppen betrachtet. Für den Vergleich wurden ebenfalls die im DAE ermittelten Tetanus-Antitoxin-Titer der dritten Blutentnahme aller Gruppen gewählt.

Die Auswertung der Daten mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse ergab (im Gegensatz zu den Pferde-Impfstoffen) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Impfstoffgruppen ($p < 0,0001$) bezüglich des Antitoxin-Gehaltes induziert durch die Grundimmunisierung (Anhang 9.9). Mittels Clusteranalyse (Anhang 9.10) ließen sich die geimpften Schafgruppen ebenso in drei Kategorien einteilen: Einer Kategorie mit hohem Antitoxin-Titer, der die Gruppe S7 zugeordnet wurde, einer mit mittleren bis hohen Werten, unter die die Gruppen S2 und S3 fielen, sowie einer Kategorie mit eher niedrigem Antitoxin-Gehalt: Die Gruppen S1, S4, S5, S6 und S8 einschließend.

Bei den Schaf-Impfstoffgruppen waren demnach statistisch signifikante Unterschiede in der Antikörperbildung nach der Grundimmunisierung zu erkennen.

5.5.1 Einfluss des Adjuvans beim Schaf

Der Impfstoff S7 enthielt ebenso wie der Impfstoff S4 als Adjuvans Aluminiumsulfat, allerdings handelte es sich bei S4 um einen Kombinationsimpfstoff. In der Bildung der Antikörperantwort war dieser schwächer im Vergleich zu S7. Bis auf den Impfstoff S8 enthielten die anderen Impfstoffe Aluminiumhydroxid als Adjuvans. Bei der Impfstoffgruppe S3 (Kombinationsimpfstoff) war der Anteil an Aluminiumhydroxid mit 12 mg/ml gegenüber den anderen Produkten relativ hoch. Diese Gruppe war gemeinsam mit der Impfstoffgruppe S2 (Anteil Aluminiumhydroxid: 3 mg/ml) im mittleren Feld der Antikörperbildung zu finden. Einen Einfluss des höheren Gehalts an Aluminiumhydroxid auf die Ausbildung von Antikörpern war nicht zu erkennen.

Bei dem Impfstoff S8 diente als Adjuvans eine ölige Emulsion. Die Tiere hatten ein Jahr nach der zweiten Impfung im Durchschnitt noch Titer von 0,6 EE/ml im DAE (siehe Tabelle 25 und Abbildung 24). Nach der dritten Impfung zeigten die noch im Bestand verbliebenen Tiere sehr hohe Antikörpertiter von 81 EE/ml (DAE), die auch ein Jahr danach noch bei 13,6 EE/ml im DAE lagen. Das ölige Adjuvans führte zu einer langsamen Freisetzung des Antigens, was sich in den niedrigen Antitoxin-Titern nach der Grundimmunisierung widerspiegelte. Über einen längeren Zeitraum beobachtet, wurde dagegen eine starke Immunantwort induziert, die sich sowohl in einem deutlichen Boostereffekt nach der dritten Impfung als auch noch ein Jahr später durch die hohen Antikörpertiter äußerte.

Ein unterschiedlicher Einfluss auf die Ausbildung der Antikörperantwort durch Aluminiumsulfat oder -hydroxid konnte anhand der Ergebnisse nicht abgeleitet werden.

5.5.2 Vergleich monovalenter Impfstoffe mit Kombinationsimpfstoffen

Die Frage, ob ein Antigen als monovalenter Impfstoff oder als Komponente in einem Kombinationsimpfstoff eine stärkere Immunantwort auslöst, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Einerseits erwartet man, dass zusätzliche Komponenten das Immunsystem „ablenken“, andererseits können weitere Antigene quasi als Adjuvans oder „carrier“ eine Verstärkung bewirken. Beispielsweise wissen wir aus der Prüfung von Tetanusimpfstoffen beim Mensch, dass die *Haemophilus influenza* Typ B Komponente (gekoppelt an Tetanustoxoid) bei Mehrfachimpfstoffen, die als Antigene Diphtherie, Tetanus und azelluläre Pertussisantigene enthalten, die Tetanusantwort stark anhebt, die Diphtherieantwort jedoch senkt.

Ein Hinweis bezüglich des Einflusses mehrerer Antigene auf die Antikörperentwicklung, war beim Vergleich der Impfstoffgruppen S2 (monovalenter Impfstoff) und S3 (Mehrfachimpfstoff) nicht festzustellen. Diese beiden Impfstoffgruppen hatten annähernd gleiche Antikörperantworten nach der Grundimmunisierung (siehe Tabelle 9). Bei dem Impfstoff S7, der den höchsten Antikörpergehalt nach Grundimmunisierung induzierte, handelte es sich um ein Kombinationsprodukt.

5.5.3 Kreuzreaktivität

Darüberhinaus ist von Interesse, ob Vakzine mit anderen Clostridienantigenen ohne Tetanuskomponente Kreuzreaktionen gegenüber dem Tetanustoxoid bewirken. Praktische Versuche hierzu gestalteten sich schwierig, da Pferde zum einen im Verlauf ihres Lebens stets Kontakt mit Tetanusantigenen haben und zum anderen Pferdebesitzer nicht auf eine Impfung gegen Tetanus verzichten. Desweiteren sind monovalente Clostridienimpfstoffe ohne Tetanuskomponente nicht fürs Pferd zugelassen.

Besitzer von Schafen tolerieren eher die Auslassung einer Tetanusimpfung. Für das Schaf hingegen stand ein monovalenter *Clostridium chauvoei* Impfstoff zur aktiven Immunisierung gegen Rauschbrand („Blackleg“) zur Verfügung. Seren von Schafen, die

diesen Impfstoff erhielten, wurden auf Tetanus-Antitoxin untersucht, jedoch mit negativem Ergebnis. Die fehlende Kreuzreaktion spricht für die Spezifität des Testsystems. Auch in der Literatur fand sich kein Hinweis auf Kreuzreaktivität verschiedener Toxoide von Clostridienstämmen.

5.6 Induktion protektiver Antikörper

Mit beiden Testsystemen konnte die impfabhängige Induktion der Antitoxinbildung in Pferd und Schaf erfasst und damit die Immunogenität der Impfstoffe nachgewiesen werden. Die in den Tabellen 10 und 11 dargestellten Ergebnisse lassen eine gute Übereinstimmung der *in vivo* Überprüfung einzelner Testseren im MNT mit den Ergebnissen des DAE erkennen. Die Prüferseren der Pferde bzw. Schafe, die im MNT unter dem Schutztiter lagen (Tier 7 der Gruppe S8, Tier 6 der Gruppe P7 und Tier 10 der Gruppe P2) zeigten im DAE Werte kleiner 0,1 EE (Schaf) bzw. 0,01 EE (Pferd). Die Tiere wiesen diese Antitoxintiter zu einem Zeitpunkt auf, zu dem eine weitere Impfung vorgesehen war. Für die Gruppe P8 (Tier 9) war zu diesem Termin (ein Jahr nach der Grundimmunisierung) eine erneute Impfung laut Hersteller nicht empfohlen. Das Tier 9 reagierte insgesamt sehr schwach auf die Impfungen im Vergleich zu den restlichen Pferden der Gruppe P8. Im Falle des Schafes 7 der Gruppe S8 ergab die Untersuchung des Serums des Tieres vierzehn Tage nach erfolgter dritter Impfung (fünfte BE) einen Antitoxin-Wert von 13,36 EE/ml im DAE.

Die Prüferseren der Tiere 6 (Gruppe S6) und 5 (Gruppe S8) wiesen zum Zeitpunkt der nächsten anstehenden Immunisierung einen Wert größer 0,05 IE/ml im Mäuseneutralisationstest auf. Vierzehn Tage nach der Auffrischungsimpfung ergab die Überprüfung des Serums des Tieres 5 (Gruppe S8) im DAE einen Antitoxin-Wert von 62,87 EE/ml. Noch ein Jahr später lag der Antitoxin-Titer dieses Tieres bei 8,45 EE/ml. Es kam demnach zu einer starken Boosterreaktion auf die Grundimmunisierung, wie im vorherigen Absatz auch für das Tier 7 der Impfstoffgruppe S8 beschrieben.

Die Gegenüberstellung von im MNT und im DAE ermittelten Serumwerten des Tieres 7 der Gruppe P4 (Tabelle 11) ergab eine gute Übereinstimmung. Die Seren aus den ersten beiden Blutentnahmen wiesen Antitoxin-Werte kleiner (DAE) bzw.

kleiner/gleich 0,01 Einheiten/ml (MNT) auf. Nach der zweiten Impfung war der Schutzwert erreicht. Hier lag allerdings der im MNT ermittelte Wert von größer/gleich 3,0 IE/ml über den Einheiten im DAE von 1,48 EE/ml. Auch in den Ergebnissen der fünften Blutentnahme korrelierten die Antitoxin-Werte gut.

5.7 Anwendbarkeit für Prüfbehörden und Impfstoffhersteller

Mit dem DAE ist eine Methode gegeben, alle zulassungsrelevanten Parameter von Tetanusimpfstoffen zu untersuchen. Diese umfassen die Wirksamkeit des Impfstoffes bei Zieltieren im Mindestimpfalter, den Immunitätsbeginn nach der Grundimmunisierung sowie die Immunitätsdauer, den Immunitätsstatus im Zieltier nach der Wiederholungsimpfung, die Wirksamkeit für jede Zieltierart und Zieltierkategorie (wie Muttertiere, Jungtiere) und die Wirksamkeit gegenüber allen im Impfstoff enthaltenen Antigenen separat.

Dadurch bedarf es keiner weiteren Anwendung der belastenden Toxinneutralisationstests im Labortiermodell Maus oder Meerschweinchen. Dies bedeutet eine erhebliche Reduktion der Tierzahlen in diesem Bereich der Impfstoffprüfung durch einen kompletten Ersatz der Methode. In den allgemeinen Grundsätzen des Arzneibuches [97] ist zur Verwendung von Tieren folgender Wortlaut zu finden: „ In Übereinstimmung mit der „Europäischen Konvention zum Schutz von Tieren für experimentelle und andere wissenschaftliche Zwecke“ von 1986 fühlt sich die Kommission verpflichtet, wann immer möglich die Verwendung von Tieren bei Prüfungen im Arzneibuch zu reduzieren, und sie ermutigt alle, mit ihr nach alternativen Methoden zu suchen“. Zusätzlich wird in der allgemeinen Monographie „Impfstoffe für Tiere“ [98] zur Prüfung an Tieren darauf verwiesen, dass „Prüfungen so durchgeführt werden, dass die Anzahl der verwendeten Tiere möglichst gering ist und Schmerz, Leiden, Stress und bleibende Schäden so gering wie möglich gehalten werden“. Unterstützung sollen alternative Prüfmethoden insbesondere dann haben, wenn dadurch die Verwendung von Tieren überflüssig wird.

Daneben würde der Wegfall des Neutralisationstests auch zu einer Entlastung für das betroffene Laborpersonal führen, da der Umgang mit dem Toxin und den Tieren entfällt und der ELISA in wesentlich kürzerer Zeit durchgeführt werden kann.

Darüberhinaus erfolgt idealerweise die Erfassung der Wirksamkeit des zu prüfenden Impfstoffes im Zieltier, Pferd oder Schaf, und nicht im Labortiermodell [99]. Für die Validierung einer Methode zum Ersatz des Tierversuchs wurden die Kriterien: Geeignete Empfindlichkeit, Spezifität, Anwendbarkeit für den beabsichtigten Zweck und Bereitstellung von Testprotokollen erfüllt.

5.8 Anwendbarkeit für die Diagnostik

Wenn bei Pferden aufgrund fehlender Impfdokumentation eine erneute Grundimmunisierung bzw. frühzeitige Auffrischungsimpfung erfolgt, kann es zu schweren Nebenwirkungen kommen. Diese äußern sich in Form von lokalen und systemischen allergischen Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock. Aber auch bei Meldungen über mangelnde Wirksamkeit des Impfstoffes sowie vor operativen Eingriffen kann die Quantifizierung des Tetanus-Antitoxins im Serum von Interesse sein. Daher könnte der DAE auch hierfür Verwendung finden. Tizard [100] befürwortet die serologische Prüfung von Pferden und bezeichnet Tetanus als gutes Beispiel einer durch Antikörper vermittelten Immunantwort und die Serumkonzentrationen als direktes Maß für den Schutzstatus. Der einfachste, praktikabelste Test für einen praktizierenden Tierarzt stellt seiner Meinung nach der ELISA dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die dargelegten Ergebnisse zur Validierung einer neuen Wirksamkeitsprüfung von Tetanus-Impfstoffen resultieren aus umfangreichen Feldstudien, durchgeführt mit neun unterschiedlichen Impfstoffen für das Pferd sowie acht Impfstoffen für das Schaf. Insgesamt wurden 102 Pferde und 82 Schafe entsprechend den Angaben in der Gebrauchsinformation immunisiert. Blutentnahmen fanden nach einem vorgegebenen Schema von bis zu zwei Jahren nach der ersten Impfung statt. Die Impfstoffe waren entweder monovalent oder enthielten zusätzlich eine Influenzainkomponente (Pferd) oder weitere Clostridienantigene sowie Antigene von *Mannheimia haemolytica* und *Pasteurella trehalosi* (Schaf).

Im Ganzen konnten 564 Pferdesera und 257 Schafsera von geimpften Tieren auf ihren Tetanus-Antitoxin-Gehalt untersucht werden. Dazu wurde mit der vorliegenden Arbeit eine speziesunabhängige *in vitro*-Methode, der Doppel-Antigen ELISA, zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Tetanus-Antitoxin-Titern in Pferde- und Schafsera entwickelt und auf ihre Eignung geprüft. Ergänzend, zur vergleichenden Einordnung und Kontrolle der Ergebnisse, wurden die Sera in einem weiteren, anti-Spezies-Konjugat-abhängigen indirekten ELISA getestet.

Das Prinzip des Doppel-Antigen ELISA (DAE) beruht darauf, dass die Tetanus-Antikörper das Tetanustoxoid an zwei unterschiedlichen antigenen Determinanten binden. Damit wird der Test im Bereich niedriger Antikörperspiegel besonders spezifisch. Genau in diesem Bereich müssen relevante Aussagen über den Schutzstatus (neutralisierende Antikörper) getroffen werden. Die Nachweisgrenze von Tetanus-Antikörpern liegt hier im Bereich von 10^{-4} EE/ml. Der Vergleich von Werten einzelner Sera mit den im Mausneutralisationstest (MNT) ermittelten Ergebnissen ergab, dass Pferdesera mit einem Wert von 0,04 bzw. 0,05 EE/ml im DAE im Neutralisationstest eine Wertigkeit von größer 0,05 IE/ml bzw. 0,034 IE/ml aufwiesen und damit von der Tendenz her eine gute Übereinstimmung zeigten. Bei den Schafsera, die im Neutralisationstest mit $> 0,05$ IE/ml bewertet wurden, betrug der entsprechende Wert im DAE 0,24 EE/ml.

Die Untersuchungen der Pferdeguppen ließen einen offensichtlichen Unterschied in der Antitoxinbildung gegen verschiedene Impfstoffe nach der zweiten Immunisierung erkennen, der statistisch allerdings nicht als signifikant zu sichern war. Eine Korrelation zwischen Lf-Gehalt im Impfstoff und dem im Tier induzierten Antitoxin-Titer konnte nicht festgestellt werden. Dagegen waren in den Schafgruppen nach der Grundimmunisierung durchaus statistisch signifikante Unterschiede in der Antitoxinbildung zwischen einzelnen Impfstoffen zu verzeichnen.

Konsequenterweise könnte der Toxinneutralisationstest, der im Rahmen der Zulassung von Tetanus-Impfstoffen bislang angewandt wurde, durch den Doppel-Antigen ELISA ersetzt werden. Damit würde man auch den Anforderungen des Arzneibuches bezüglich der Verwendung von Tieren entsprechen, wonach einer Methode der Vorzug zu geben ist, die die Ablösung eines Tierversuches ermöglicht.

Darüberhinaus erföhre das Laborpersonal eine Entlastung durch den Wegfall der materiell aufwendigen Tierversuche und dem damit verbundenen Umgang mit dem Tetanustoxin.

7 SUMMARY

The presented results of the validation of a new method for testing the efficacy for tetanus vaccines follow from substantial field trials carried out with nine different equine vaccines as well as eight different vaccines of sheep. Overall, 102 horses and 82 sheep have been immunised according to the instructions for use. Blood collections have been carried out according to the stated schedule up to two years after the first immunisation. Either the vaccines were monovalent or additionally contained an influenza component (horse) or contained further clostridial antigens as well as antigens of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* (sheep).

All together, 564 horse sera and 257 sheep sera of immunised animals have been examined for their tetanus antitoxin content. For this purpose a species-independent *in vitro* method, the double antigen ELISA, for qualitative and quantitative verification of the tetanus antitoxin titers in horse and sheep sera has been developed and examined to verify the suitability of the method. In addition, for comparative classification and control of the results the sera have been examined in a further system, a species-conjugate dependent indirect ELISA.

Thanks to the principle of the double antigen ELISA, the tetanus antibodies are forced to bind to different antigen determinants. Therefore the test is very specific especially for low antibody titres, i.e. that area which is relevant for a judgement of the protective status (neutralising antibodies). The detection limit of tetanus antibodies is in the order of 10^{-4} EU/ml. A comparison of results of individual sera showed that horse sera with contents of 0.04 and 0.05 ELISA Units (EU)/ml during testing in the DAE showed values of > 0.05 International Units (IU) and 0.034 IU/ml respectively in the mouse neutralisation test (*in vivo*) thus showing good agreement. For tested sheep sera which were rated > 0.05 IU *in vivo*, the corresponding value in the DAE was 0.24 EU/ml.

A discrepancy in the generation of tetanus antitoxin within the different horse groups was obvious following the second immunisation. However, a statistical significance was not given. A correlation between the Lf content of the vaccine and the induced

antitoxin titer in the animal was unascertainable. In contrast a statistical significant difference in the induction of tetanus antitoxin by different vaccines could be observed within the sheep groups after the basic immunisation.

With the double antigen ELISA, efficacy can be determined within the marketing authorisation. As a consequence, the toxin neutralisation test would have to be replaced, since it requires too great a number of animals per test and involves considerable suffering for the animals. The test described here reduces the use of mice and guinea pigs within vaccine testing. In addition, it involves less exposure of the lab personal to toxin.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Tetanus vaccine for veterinary use. Monograph No. 0697. In: European Pharmacopoeia. 4th ed. Strasbourg: Council of Europe Publishing; 2002.
2. Tetanus vaccine for veterinary use. Monograph No. 0697. In: European Pharmacopoeia. 4th ed. Strasbourg: Council of Europe Publishing; 2002, Part 01/2003.
3. Hendriksen CFM, van der Gun JW, Nagel J, Kreftenberg JG. The toxin binding inhibition test as a reliable in vitro alternative to the toxin neutralization in mice for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. *J Biol Stand* 1988;16:287-97.
4. Kristiansen M, Aggerbeck H, Heron I. Improved ELISA for determination of anti-diphtheria and/or anti-tetanus antitoxin antibodies in sera. *APMIS* 1997;105:843-53.
5. Allen SD, Emery CL, Lysterly DM: Clostridium. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington: ASM Press; 2003, p. 835-56.
6. Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer Verlag; 2001. vol 1: The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria.
7. Brenner DJ, Krieg NR, Staley GM, Garrity GM, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer Verlag; 2005. vol 2. part A: The Proteobacteria.
8. Schlegel HG. *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1992.
9. Brüggemann H, Bäumer S, Fricke WF, Wiezer A, Liesegang H, Decker I et al. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:1316-21.
10. Schofer J. Tetanus beim Schwarzwälder Pferd. *Tierärztl Umsch* 1995;50:396-9.
11. Vörös K, Abonyi T, Bakos Z, Tothm J. Tetanus beim Pferd: Klinische Diagnostik und Therapie. *Tierärztl Umschau* 1997;52:278-81.
12. Mayr A. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 6. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1993.
13. Blobel H, Schliesser T. *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. 2. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1995. vol. 2. part 4: Clostridiosen.
14. Aslani MR, Bazargani TT, Ashkar AA, Movasaghi AR, Raoofi A, Atiabi N. Outbreak of tetanus in lambs. *Vet Rec* 1998;142:518-9.

15. Hatheway CL. Toxigenic Clostridia. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:66-98
16. Rosetto O, Seveso M, Caccin P, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. *Toxicon* 2001;39:27-41.
17. Herreros J, Lalli G, Schiavo G. C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. *Biochem J* 2000;347:199-204.
18. Lalli G, Bohnert S, Deinhardt K, Verastegui C, Schiavo G. The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol* 2003;11:431-37.
19. Montecucco C, Papini E, Schiavo G. Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Letters* 1994;346:92-8.
20. Herreros J, Ng T, Schiavo G. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Molecular Biology of the cell* 2001;12:2947-60.
21. Herreros J, Schiavo, G. Lipid micordomains are involved in neurospecific binding and internalisation of clostridial neurotoxins. *Int J Med Microbiol* 2002;291:447-53.
22. Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuro-exocytosis. *Physiol Rev* 2000;80:717-66.
23. Bigalke H, Shoer LF. Clostridial neurotoxins. In: Aktories K, Just I, editors. *Bacterial protein toxins*. Berlin: Springer Verlag, 2000, p. 407-33.
24. Veit M. Molekularbiologie der Neurosekretion und ihre Hemmung durch Tetanus- und Botulinumtoxin. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 1999;112:186-91.
25. Wassilak SGF, Roper MH, Murphy TV, Orenstein, WA. Tetanus Toxoid. In: Stanley A, Plotkin, MD, Orenstein, WA, editors. *Vaccines*. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2004, p. 745-81.
26. Alouf JE. Pore forming bacterial protein toxins: An overview. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001;257:1-14.
27. Alouf JE. Molecular features of the cytolytic pore-forming bacterial protein toxins. *Folia Microbiol* 2003;48:5-16.
28. Bernheimer AW. Sulfhydryl activated toxins. In: Bernheimer AW, editor. *Mechanisms in bacterial toxinology*. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 1976, p. 85-97.
29. Ehrlich P. Gesellschaft der Charité-Aerzte: Sitzung vom 3. Feb. 1898: Diskussionsbemerkingen zur Kenntnis der Antitoxinwirkung. *Berliner klinische Wochenschrift* 1898;35:273-4.

30. Hardegree MC, Palmer AE, Duffin N. Tetanolysin: In-vivo effects in animal. *J Infect Dis* 1971;123:51-60.
31. Murnane AC, Brown K, Keith CH. Preferential initiation of PC12 neurites in directions of changing substrate adhesivity. *J Neurosci Res* 2002;67:321-8.
32. Raya SA, Trembovler V, Shohami E, Lazarovici P. Cytolysins increase intracellular calcium and induce eicosanoids release by pheochromocytoma PC12 cell cultures. *Nat toxins* 1993;1:263-70.
33. Conti A, Brando C, DeBell KE, Alava MA, Hoffmann T, Bonvini E. CD3-induced preferential hydrolysis of polyphosphoinositides and calcium regulation of inositol phosphate metabolism in permeabilized murine T cell clone. *J Biol Chem* 1993;268:783-91.
34. Matsunaga T, Miyamoto K, Koshiura R. Cytotoxic effect of the culture supernatant of *Clostridium tetani*. *Chem Pharm Bull* 1982;30:702-7.
35. Desmettre Ph. Veterinary vaccines in the development of vaccination and vaccinology. In: Plotkin SA, Fantini B, editors. *Vaccina, vaccination, vaccinology: Jenner, Pasteur and their successors*. Paris: Elsevier; 1996, p. 43-50.
36. Ehrlich P. Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. *Klinisches Jahrbuch* 1897;6:299-326.
37. Ramon G. Sur le pouvoir flocculant et sur les proprietes immunisations d'une toxine diphtherique rendue anatoxique (anatoxine). *Compt. rend. Acad. Sci* 1923;177:1338-40.
38. Jansen BC, Knoetze PC. The immune response of horses to tetanus toxoid. *Onderstepoort J of Vet Res* 1979;46:211-16.
39. Gräßer R. Ein Beitrag zur Immunprophylaxe des Tetanus. Promotionsarbeit aus dem Institut für Impfstoffe, Dessau. Berlin; 1981.
40. Glenny AT, Pope CG, Waddington H.,Wallace U. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol* 1926;29:38-39.
41. Ourth DD, MacDonald AB. Neutralization of tetanus toxin by human and rabbit immunoglobulin classes and subunits. *Immunology* 1977;33:807-15.
42. Wilson WD, Mihalyi JE, Hussey S, Lunn DP. Passive transfer of maternal immunoglobulin isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. *Equine vet J* 2001;33:644-50.
43. Tizard I. *Veterinary immunology: an introduction*. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2000.
44. Schwanig M, Löwer J. Herstellung und Prüfung von Impfstoffen. In: Spiess H, Heininger, U, Hrsg. *Impfkompodium*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005, S. 24-37.

45. Matheis W, Zott A, Schwanig M. The role of the adsorption process for production and control combined adsorbed vaccines. *Vaccine* 2002;20:67-73.
46. Vogel RF, Powell FM, Alving RC. A compendium of vaccine adjuvants and excipients. *Pharm Biotechnol* 1995;6:141-228.
47. Morein B, Bengtsson KL. Immunmodulations by iscoms, immune stimulating complexes. *Methods* 1999;19:94-102.
48. Isconova: Innovative vaccine technology development at Isconova AB. Business Briefing: Life Sciences Technology 2003.
49. Mumford JA, Jessett DM, Rollinson EA, Hannant D, Draper ME. Duration of protective efficacy of equine influenza immunostimulating complex/tetanus vaccines. *Vet Rec* 1994;134:158-62.
50. Macy DW. Vaccine adjuvants. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1997;12:206-11.
51. Auszug aus Entscheidungen der Gemeinschaft über die Zulassung von Arzneimitteln vom 15. Februar 2003 bis 15. März 2003: Erteilung einer Zulassung (Artikel 34 der Verordnung (EWG) Nr. 2309/93): Annahme: ProteqFlu-Te. *Amtsblatt der Europäischen Union* 2003;46:C76/27.
52. EMEA. European Public Assessment Report. Available at: URL:<http://www.emea.eu.int/vetdocs/vets/Epar/proteqfluTe/proteqfluTe.htm/>. Accessed: Jan 10, 2006.
53. Auszug aus Entscheidungen der Gemeinschaft über die Zulassung von Arzneimitteln vom 1. Juli 2005 bis 31. Juli 2000: Erteilung einer Zulassung (Artikel 34 der Verordnung (EWG) Nr. 2309/93): Annahme: Equilis Prequenza Te. *Amtsblatt der Europäischen Union* 2005;48:C209/5.
54. Auszug aus Entscheidungen der Gemeinschaft über die Zulassung von Arzneimitteln vom 1. Juli 2005 bis 31. Juli 2000: Erteilung einer Zulassung (Artikel 34 der Verordnung (EWG) Nr. 2309/93): Annahme: Equilis Te. *Amtsblatt der Europäischen Union* 2005;48:C209/5.
55. EMEA. European Public Assessment Report. Available at: URL:<http://www.emea.eu.int/vetdocs/vets/Epar/equilisPrequenzaTe/equilisPrequenzaTe.htm/>. Accessed: Jan 10, 2006.
56. EMEA. European Public Assessment Report. Available at: URL:<http://www.emea.eu.int/vetdocs/vets/Epar/equilisTe/equilisTe.htm/>. Accessed: Jan 10, 2006.
57. Winkler D, Thilo W, Oberdoerster F. Beitrag zur Standardisierung immunbiologischer Präparate. *Z ges Hyg* 1978;24:262-6.
58. Scheibel I. Uses and results of active tetanus immunization. *Bull World Health Organ* 1955;13:381-94.

59. McComb JA. The prophylactic dose of homologous tetanus antitoxin. *N Engl J Med* 1964;270:175-8.
60. Edsall G. Problems in the immunology and control of tetanus. *Med J Aus* 1976;2:216-220.
61. Galazka AM. Module 3: Tetanus: Global programme for vaccines and immunization. Expanded programme on immunization. Geneva: World Health Organization, 1993. WHO/EPI/GEN/93.13 (The immunological basis for immunization series).
62. Tasman A, Huygen FJA. Immunization against tetanus of patients given injections of antitetanus serum. *Bull World Health Organ* 1962;26:397-407.
63. Löhner J, Radvila P. Aktive Tetanusprophylaxe beim Pferd und Immunitätsdauer. *Schw Arch Tierheilkd* 1970;112:307-14.
64. Radvila P, Löhner J. Passive und aktive Tetanusimmunität und ihr Verlauf. *Schw Arch Tierheilkd* 1965;107:123-57.
65. Liefmann CE. Combined active-passive immunisation of horses against tetanus. *Aust Vet J* 1980;56:119-22.
66. Baljer G, Thein P, Hechler H, Cronau P, Hasslacher D, Beck G et al. Untersuchungen zur intranasalen Schutzimpfung gegen Tetanus beim Pferd. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 1982;95:208-13.
67. Goulon M, Girard O, Grosbuis S, Desormeau JP, Capponi MF. Les anticorps antitetaniques. *Nouv Presse Med* 1972;1:3049-3050.
68. Passen EL, Andersen BR. Clinical tetanus despite a 'protective' level of toxin-neutralizing antibody. *JAMA* 1986;255:1171-73.
69. de Moraes-Pinto MI, Oruamabo RS, Igbagiri FP, Chan MC, Prado SM, Vancetto MD et al. Neonatal tetanus despite immunization and protective antitoxin antibody. *J Infect Dis* 1995;171:1076-7.
70. Pryor T, Onarecker C, Coniglione T. Elevated antitoxin titers in a man with generalized tetanus. *J Fam Pract* 1997;44:299-303.
71. Dagan R, Igbaria K, Piglansky L, van Brusteghem F, Melot V, Kaufhold A. Reactogenicity and immunogenicity of reduced antigen content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccines as a booster in 4-7-year-old children primed with diphtheria-tetanus-whole cell pertussis vaccine before 2 years of age. *Vaccine* 1999;17:2620-7.
72. Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Tierarzneimittel. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* 2001;L 311:1-66.

73. Weißer K, Hechler U. Animal welfare aspects in the quality control of immunobiologicals: a critical evaluation of the animal tests in pharmacopoeial monographs. Nottingham: Frame [Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments]; 1997.
74. Russel WM, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen & Co.; 1959.
75. Simonsen O, Schou C, Heron I. Modification of the ELISA for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. *J Biol Stand* 1987;15:143-57.
76. Hendriksen CFM, Woltjes J, Akkermans AM, van der Gun JW, Marsman FR, Verschure MH et al. Collaborative study: Interlaboratory validation of in vitro serological assay systems to assess the potency of tetanus toxoid in vaccines for veterinary use. *Biologicals* 1994;22:257-68.
77. Winsnes R, Hendriksen C. Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of tetanus toxoid vaccines for human use – Part 1. *Pharmeuropa Spec. Issue Biol.* 2000;1:85-124.
78. Winsnes R, Hendriksen C. (2002). Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of tetanus toxoid vaccines for human use – Summary of all three phases *Pharmeuropa Spec. Issue Biol.* 2001;2:75-78.
79. Cox JC, Premier RR, Finger W, Hurrell JGR. A comparison of enzyme immunoassay and bioassay for the quantitative determination of antibodies to tetanus toxin. *J Biol Stand* 1983;11:123-8.
80. Wood KR. An Alternative to the Toxin Neutralization Assay in Mice for the Potency Testing of *Clostridium tetani*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* Type B and *Clostridium perfringens* Type D epsilon Components of Multivalent Sheep. *Vaccines Biologicals* 1991;19:281-6.
81. Aggerbeck H, Norgaard-Pedersen B, Heron I. Simultaneous quantitation of diphtheria and tetanus antibodies by double antigen, time-resolved fluorescence immunoassay. *J Immunol Meth* 1996;190:171-83.
82. Selbitz HJ, Moos M. *Tierärztliche Impfpraxis*. 2. Aufl., Stuttgart: Enke Verlag; 2003
83. Crowther JR. *The ELISA guidebook*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2001. (Methods in molecular biology; vol 149).
84. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines: Lists A and B diseases of mammals, birds and bees*. 4th ed. Paris: O.I.E. Office International des Epizooties; 2000, p. 15-23.
85. EMEA. ICH Topic Q 2 B Validation of analytical procedures: Methodology: Note for guidance on validation of analytical procedures: Methodology CPMP [Committee

- for Proprietary Medical Products]/ICH/281/95. Available at: URL: <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/028195en.pdf/>. Accessed: Jul 30, 2004.
86. CombiStats. Das Statistik-Programm wurde von der EDQM entwickelt und enthält die wesentlichen in der Europäischen Pharmacopoeia beschriebenen Verfahren zur Auswertung von Bioassays .EDQM [European Directorate for the Quality of Medicines]. Strasbourg: Council of Europe; 2000.
87. Statistical analysis of results of biological assays and tests. In: European Pharmacopoeia. 5th ed. Strasbourg: Council of Europe Publishing; 2004, p. General chapter 5.3.
88. Statistical Analysis Software. SAS Institute Inc, Cary, NC USA.
89. Finney DJ. Statistical methods in biological assays. 3rd ed. London: Griffin; 1978.
90. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;327:307-10.
91. Lin L. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 1989;45:255-68.
92. Lin L. Assay validation using the concordance correlation coefficient. *Biometrics* 1992;48:599-604.
93. Simonsen O, Bentzon MW, Heron I. ELISA for the routine determination of antitoxic immunity to tetanus. *J Biol Stand* 1986;14:231-9.
94. Cox JC, Premier RR, Finger W, Hurrell JGR. A comparison of enzyme immunoassay and bioassay for the quantitative determination of antibodies to tetanus toxin. *J Biol Stand* 1983;11:123-8.
95. Klein J. Immunologie. 1. Aufl. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH; 1991.
96. Thein P. Schutzimpfung – welche Impfungen braucht das Pferd? *Prakt Tierarzt* 2003;84:220-2.
97. Europäisches Arzneibuch. II. Einleitung. Grundwerk. 5. Ausgabe, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2005. (p. XIV).
98. Europäisches Arzneibuch. Allgemeine Monographien: Impfstoffe für Tiere 5.0/0062. Grundwerk. 5. Ausgabe, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2005. (p. 816).
99. Hendriksen CFM, Spieser J-M, Akkermans A, Balls M, Bruckner L, Cussler K et al. Validation of Alternative Methods for the Potency Testing of Vaccines. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 31. *ATLA* 1998;26:747-61.
100. Tizard I. Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. *J. Am Vet Med Assoc* 1998;213:54-60.

9 ANHANG

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad us. vet.	ad usum veterinarium
Ak	Antikörper
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
BE	Blutentnahme
BSA	Bovines Serum Albumin
C.	<i>Clostridium</i>
DAE	Doppel-Antigen ELISA
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
g	Schleudertziffer: x-faches der Erdbeschleunigung
I+	Inhibitionsdosis
IE	Internationale Einheit (Äquivalent von 0,03384 mg des 2. Internationalen Standards)
EE	ELISA Einheit
Ig	Immunglobulin
I.S.	Internationaler Standard (WHO-Standard)
i. m.	intramuskulär
Kav.	Kavität
kDa	Kilo Dalton, Dalton: Einheit der Molekülmasse
LD ₅₀	Letale Dosis: Toxinmenge, die nach subkutaner Injektion in Mäuse (oder Meerschweinchen) tetanische Lähmungen bei der Hälfte der Tiere am oder vor dem 4. Tag nach Injektion verursacht
Lf	Limes der Flockung: diejenige Menge von Toxin oder Toxoid, die die schnellste Ausflockung mit 1 I.E. Antitoxin zeigt
Lp/10 Dosis	Limes paralyticum: kleinste Toxinmenge, die nach Mischung mit 0,1 I.E. Antitoxin, subkutan in Mäuse (oder Meerschweinchen) injiziert, tetanische Lähmungen bei den Tieren am oder vor dem 4. Tag nach Injektion verursacht
MNT	Mäuseneutralisationstest
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
nm	Nanometer (Angabe der Wellenlänge in nm)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBSM	Phosphate Buffered Saline mit Magermilch
<i>Ph.Eur.</i>	European Pharmacopoeia
PO	Peroxidase markiert
rDNA	ribosomale Desoxynukleinsäure
rpm	rounds per minute (Schüttelinkubator)
Rt	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
s.c.	subkutan
TH	Thymus Helferzelle
TH1	Untergruppe der CD4-T-Zellen, Wirken an der Aktivierung von Makrophagen mit
TH2	Untergruppe der CD4-T-Zellen, Wirken an der Aktivierung von B-Zellen mit
TMB	Tetramethyl-Benzidin
ToBI	Toxin-Bindungs-Inhibitionstest
TNT	Toxinneutralisationstest
WHO	World Health Organization

9.2 Beispiel CombiStats Kalkulationsmodell

CombiStats, Version 3.0, Tuesday, 2 November 2004, 09:47:30, Page 1 of 2



Substance	Tetanus	Remarks:
Method	DAE	
Assay number	Impfstoff	
Technician		
Date of assay		

Standard			Sample 1			Sample 2			Sample 3		
	WHO eqine			Ref. Pferd			Tier 18			Tier 20	
Ass. pot.	2 IU / ml		Ass. pot.	? IU / ml		Ass. pot.	? IU / ml		Ass. pot.	? IU / ml	
Doses	(1)	(2)	Doses	(1)	(2)	Doses	(1)	(2)	Doses	(1)	(2)
1/32	1.998	1.937	1/128	1.907	1.977	1/8	1.698	1.763	1/8	2.007	2.098
1/64	1.709	1.652	1/256	1.613	1.617	1/16	1.170	1.248	1/16	1.795	1.847
1/128	1.323	1.240	1/512	1.149	1.198	1/32	0.751	0.723	1/32	1.496	1.504
1/256	0.824	0.816	1/1024	0.673	0.740	1/64	0.477	0.448	1/64	1.073	1.030
1/512	0.467	0.456	1/2048	0.342	0.371	1/128	0.277	0.238	1/128	0.627	0.609
1/1024	0.265	0.260	1/4096	0.197	0.197	1/256	0.136	0.151	1/256	0.346	0.339
1/2048	0.154	0.146	1/8192	0.109	0.109	1/512	0.081	0.088	1/512	0.193	0.183

Model: Parallel lines
 Design: Completely randomised
 Transformation: $y' = y$
 Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 0.657238
 Correlation (r): 0.996007 (Weighted), 0.996007 (Unweighted)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	3	0.144100	0.0480332	37.874	0.000 [****]
Regression	1	3.32060	3.32060	>1000	0.000 [****]
Non-parallelism	3	0.0102037	0.00340123	2.682	0.094
Non-linearity	4	0.00241058	0.000602646	0.475	0.753
Standard	1	0.00130208	0.00130208	1.027	0.331
Sample 1	1	0.000216750	0.000216750	0.171	0.687
Sample 2	1	0.000816750	0.000816750	0.644	0.438
Sample 3	1	7.50000E-05	7.50000E-05	0.059	0.812
Treatments	11	3.47731	0.316119	249.256	0.000 [****]
Residual error	12	0.0152190	0.00126825		
Total	23	3.49253	0.151849		

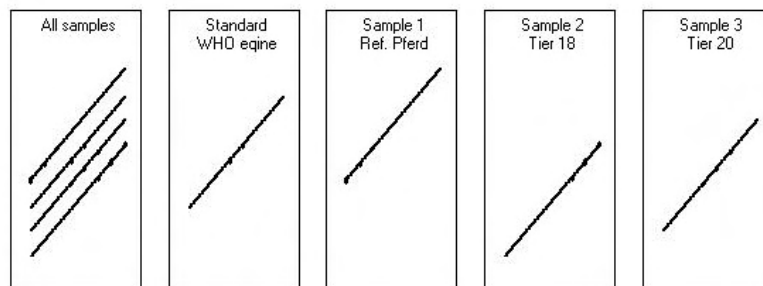
Sample 1				Sample 2			
Ref. Pferd				Tier 18			
(IU/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit	(IU/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	6.45667	6.91631	7.40477	Potency	0.221317	0.236975	0.253691
Rel. to Ass.	?	?	?	Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	93.4%	100.0%	107.1%	Rel. to Est.	93.4%	100.0%	107.1%

Sample 3			
Tier 20			
(IU/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	0.683379	0.732975	0.785284
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	93.2%	100.0%	107.1%

CombiStats, Version 3.0, Tuesday, 2 November 2004, 09:51:18, Page 2 of 2



Substance	Tetanus
Method	DAE
Assay number	Impfstoff
Technician	
Date of assay	



Executed by: Calculated by: Approved by:

9.3 Datentabellen der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im Pferd

9.3.1 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe P1

Tier Nr.	4 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.		6 Monate n. 2. I.		1 Jahr n. 2. I.		2 Wochen n. 3. I.		6 Monate n. 3. I.	
	1. BE / 1. Impfung	2. BE / 2. Impfung	3. BE	Ind. E.	4. BE	Ind. E.	5. BE / 3. Impfung	Ind. E.	6. BE	Ind. E.	7. BE	Ind. E.
1	0	0,59	9,00	9,71	1,32	2,08	1,14	1,70	39,11	43,77	3,10	2,44
2	0	0,07	2,44	2,11	0,67	0,54	0,38	0,49	8,21	6,45	1,59	1,27
3	0	0,07	9,67	8,89	2,20	3,21	2,69	3,02	37,36	43,47	7,30	6,24
4	0	0,05	7,10	10,26	1,24	1,92	1,23	1,98	12,37	12,63	6,80	5,22
5	0	0,006	9,66	13,02	0,88	1,34	0,85	1,70	36,35	36,53	6,60	6,53
6	0	0,007	2,20	2,73	1,09	1,44	1,06	1,97	36,26	33,18	7,74	7,08
7	0	0,08	7,97	10,75	0,88	1,74	1,59	2,29	57,46	53,55	15,72	16,51
8	0	0,05	7,97	6,10	2,42	3,16	1,57	2,27	26,88	30,14	5,61	5,16
9	0	0,09	6,27	8,36	0,26	0,37	0,84	0,16	13,95	17,44	2,81	0,52
10	0	0,06	6,90	2,96	1,08	1,07	0,72	0,81	46,28	41,38	18,61	14,72
11	0	0,01	4,48	11,39	1,15	1,90	0,95	1,71	17,87	17,15	n. m. i. B.	
MW	0,003	0,28	6,70	7,84	1,20	1,71	1,18	1,65	30,19	30,52	7,59	6,57
Median	0,000	0,20	7,10	8,89	1,09	1,74	1,06	1,71	36,26	33,18	6,70	5,73
s	0,007	0,003	2,64	3,80	0,62	0,91	0,61	0,85	15,61	15,11	5,50	5,28
Korr.		0,81		0,63		0,95		0,84		0,97		0,97

Legende: n. i. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.3.2 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe P2

Tier Nr.	Beginn		4 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.		1 Jahr n. 2. I.		2 Wochen n. 3. I.		9 Monate n. 3. I.		1 Jahr n. 3. I.		2 Wochen n. 4. I.							
	1. BE / 1. Impfung	Ind. E.	2. BE / 2. Impfung	Ind. E.	3. BE	DAE	Ind. E.	4. BE / 3. Impfung	Ind. E.	5. BE	DAE	Ind. E.	6. BE	DAE	Ind. E.	7. BE / 4. Impfung	Ind. E.	8. BE	DAE	Ind. E.		
1	0	0,02	0,007	0,06	0,71	0,78	0,10	0,02	0,10	8,86	5,98	0,82	0,81	0,69	0,42	46,32	17,76					
2	0,005	0,02	0,006	0,04	2,59	2,60	0,04	0,01	0,04	10,24	5,67	3,95	2,03	3,96	1,55	12,52	6,88					
3	0,01	0,06	0,004	0,05	0,37	0,62	0,06	0,03	0,06	36,42	18,74	11,77	7,54	8,61	4,34	19,32	11,82					
4	0	0,008	0,007	0,06	1,78	1,97	0,04	0,03	0,04	19,68	8,36	8,16	4,38	5,14	1,77	13,28	5,37					
5	0,10	0,09	0,03	0,09	1,54	1,62	0,04	0,02	0,04	11,30	7,72	n. m. i. B.										
6	4,16	3,65	11,15	13,08	55,55	41,74	0,26	0,16	0,26	44,57	31,96	15,46	22,01	17,28	13,07	118,16	82,19					
7	0,08	0,08	0,03	0,08	1,38	1,77	0,04	0,02	0,04	12,53	4,36	n. m. i. B.										
8	0,003	0,08	0,004	0,08	1,80	2,44	0,04	0,02	0,04	29,09	8,22	n. m. i. B.										
9	0,09	0,12	0,03	0,06	0,48	0,42	0,06	0,02	0,06	5,34	2,43	3,75	1,75	3,03	0,99	15,83	7,38					
10	0,02	0,03	0,008	0,03	0,45	0,47	0,05	0,005	0,05	6,69	2,95	1,30	0,82	0,82	0,28	14,97	9,26					
11	0	0,02	0,007	0,02	5,62	6,64	n. m. i. B.															
MW	0,41	0,38	1,03	1,24	6,57	5,55	0,07	0,03	0,07	18,47	9,64	6,46	5,62	5,65	3,20	34,34	20,09					
Median	0,01	0,06	0,01	0,06	1,54	1,77	0,05	0,02	0,05	11,91	6,85	3,95	2,03	3,96	1,55	15,83	9,26					
s	1,25	1,09	3,36	3,93	16,31	12,13	0,07	0,04	0,07	13,65	9,08	5,54	7,61	5,80	4,56	38,80	27,69					
Korr.				1,00		1,00	0,96		0,91		0,91	0,90		0,98			0,98					

Legende: n. i. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.3.3 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe P3

Tier Nr.	4 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.		7 Monate n. 2. I.		2 Wochen n. 3. I.		6 Monate n. 3. I.	
	1. BE / 1. Impfung	2. BE / 2. Impfung	3. BE	4. BE / 3. Impfung	5. BE	6. BE	Ind. E.	Ind. E.	Ind. E.	Ind. E.
1	0,003	0,12	3,89	0,74	40,03	2,99	4,85	40,42	2,99	2,23
2	0,002	0,27	23,66	1,22	111,29	18,86	16,15	84,20	18,86	12,64
3	0,04	0,10	2,18	n. m. i. B.			2,25			
4	0	0,002	42,11	0,80	74,45	6,71	27,82	86,37	6,71	5,76
5	ausgeschlossen									
6	0	0,003	10,30	0,002	1,91	n. m. i. B.	8,97	0,79	n. m. i. B.	
7	0,01	0,002	3,16	0,13	32,49	1,22	2,92	22,20	1,22	0,80
8	ausgeschlossen									
9	0,006	0,01	keine BE	1,43	37,92	4,29	0,18	34,26	4,29	2,81
10	0	0,03	3,20	n. m. i. B.			3,04			
MW	0,008	0,14	12,64	0,72	49,68	6,81	9,43	44,71	6,81	4,85
Median	0,002	0,003	3,89	0,77	38,97	4,29	4,85	37,34	4,29	2,81
s	0,01	0,36	15,06	0,57	38,00	7,03	9,48	34,23	7,03	4,72
Korr.			0,60	0,93		0,99	1,00	0,94		0,99

Legende: n. i. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.3.4 - Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe P4

Tier Nr.	Beginn		4 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.		8 Monate n. 2. I.		14 Monate n. 2. I.	
	1. BE / 1. Impfung	Ind. E.	2. BE / 2. Impfung	Ind. E.	3. BE	Ind. E.	4. BE	Ind. E.	5. BE	Ind. E.
1	0	0,17	0,05	0,20	2,66	3,15	0,17	0,14	0,17	0,17
2	0,006	0,008	0,13	0,28	13,83	19,26	0,69	0,45	0,31	0,20
3	ausgeschlossen									
4	0	0,08	0,18	0,73	2,86	4,75	0,08	0,08	n. m. i. B.	
5	0,0001	0,008	1,38	2,01	17,37	25,72	0,30	0,33	0,20	0,33
6	ausgeschlossen									
7	0	0,01	0,002	0,07	1,48	1,94	0,05	0,07	0,05	0,05
8	0,0001	0,02	0,14	0,46	6,50	11,48	0,49	0,61	0,31	0,37
9	0,02	0	0,004	0,04	0,18	0,32	0,01	0,04	0,009	0,01
10	0,002	0,005	0,005	0,01	0,22	0,26	0,02	0,02	0,02	0,04
MW	0,004	0,04	0,24	0,47	5,64	8,36	0,23	0,22	0,15	0,17
Median	0,000	0,011	0,09	0,24	2,76	3,95	0,13	0,11	0,17	0,17
s	0,01	0,06	0,47	0,67	6,53	9,57	0,25	0,22	0,13	0,14
Korr.				0,97		1,00		0,91		0,88

Legende: n. i. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.3.5 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe P5

Tier Nr.	Beginn		4 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.		6 Monate n. 2. I.		1 Jahr n. 2. I.		18 Monate n. 2. I.	
	1. BE / 1. Impfung	2. BE / 2. Impfung	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0,002	0,10	0,06	0,17	5,28	5,31	0,91	0,52	n. m. i. B.			
2	0	0,006	0,09	0,30	9,89	8,82	0,90	1,05	0,73	0,80	14,54	9,89
3	0,002	0,004	0,02	0,05	2,37	2,26	0,50	0,62	0,18	0,15	n. m. i. B.	
4	0,0001	0,02	0,11	0,20	4,50	4,84	0,57	0,75	0,30	0,40	10,63	6,53
5	0,0007	0,02	0,02	0,13	3,70	4,62	0,47	0,65	0,21	0,23	4,71	4,59
6	0,002	0,0006	0,01	0,01	1,47	1,36	n. m. i. B.					
7	0,007	0,003	0,02	0,02	5,79	6,10	0,94	1,59	0,28	0,44	3,80	3,92
8	0,0006	0,001	0,09	0,08	4,18	5,04	0,24	0,45	0,47	0,63	17,25	13,87
9	0,003	0,0005	0,02	0,01	2,85	2,62	0,15	0,20	0,06	0,07	n. m. i. B.	
10	0,003	0,0002	0,02	0,01	1,95	2,73	0,73	1,01	0,12	0,15	3,50	1,61
MW	0,002	0,02	0,05	0,10	4,20	4,37	0,60	0,76	0,29	0,36	9,07	6,74
Median	0,002	0,003	0,02	0,07	3,94	4,73	0,57	0,65	0,25	0,32	7,67	5,56
s	0,002	0,031	0,04	0,10	2,45	2,20	0,29	0,41	0,22	0,26	5,95	4,47
Korr.				0,77		0,97		0,76		0,97		0,96

Legende: n. i. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

Entgegen den Impfeffahrungen des Herstellers, erfolgte in dem Zeitraum 12 Monate bis 18 Monate nach 2. Impfung eine erneute Immunisierung im Hinblick auf die bevorstehende Kastration der Tiere.

9.3.6 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe P6

Tier Nr.	Beginn		4 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.		8 Monate n. 2. I.		14 Monate n. 2. I.	
	1. BE / 1. Impfung		2. BE / 2. Impfung		3. BE		4. BE		5. BE	
	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0	0,02	0,03	0,28	3,57	5,47	0,25	0,17	0,07	0,18
2	0	0,05	0,03	0,21	8,51	4,17	0,27	0,27	0,14	0,14
3	0	0,005	0,14	0,49	15,89	18,45	0,26	0,27	0,06	0,09
4	0,05	0,04	keine BE	keine BE	keine BE	1,11	0,73	keine BE	keine BE	keine BE
5	0	0,002	0,15	0,43	3,76	3,55	0,06	0,06	0,05	0,05
6	0	0,005	0,05	0,39	0	0,003	1,35	1,36	0,17	0,23
7	0	0,02	0,15	0,62	20,46	21,70	0,93	0,07	0,09	0,06
8	0,003	0,009	0,16	0,46	47,12	63,06	0,75	0,59	0,44	0,32
9	0	0,02	0,09	0,22	20,39	20,81	0,09	0,16	0,09	0,11
10	0	0,02	0,01	0,69	9,69	8,15	0,13	0,21	0,05	0,08
MW	0,005	0,02	0,09	0,42	14,38	16,15	0,52	0,39	0,13	0,14
Median	0,000	0,019	0,09	0,43	9,69	8,15	0,27	0,24	0,09	0,11
s	0,016	0,017	0,06	0,17	14,32	19,36	0,47	0,41	0,12	0,09
Korr.				0,24		0,99		0,79		0,87

Legende: n. I. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.3.7 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe P7

Tier Nr.	4 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.		5 Monate n. 2. I.		2 Wochen n. 3. I.		6 Monate n. 3. I.		2 Wochen n. 4. I.		1 Jahr n. 4. I.		
	1. BE / 1. Impfung	2. BE / 2. Impfung	3. BE	4. BE / 3. Impfung	5. BE	6. BE / 4. Impfung	7. BE	8. BE	9. BE	10. BE	11. BE	12. BE	13. BE	14. BE	
DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0	0,002	0,27	0,48	0,03	0,01	5,58	1,65	0,54	0,07	5,41	1,67	0,48	0,23	
2	0	0,003	0,19	0,58	n. m. i. B.										
3	0	0,004	0,21	0,26	0,01	0,008	11,16	4,08	0,02	0,31	16,57	4,43	1,37	0,50	
4	0,0006	0,004	1,37	1,07	0,05	0,10	6,97	2,99	0,46	0,11	51,39	17,65	15,86	4,14	
5	0	0,005	keine BE		0,008	0,006	5,72	2,62	0,52	0,13	8,22	2,98	0,94	0,57	
6	0	0,0004	0,47	0,16	0,004	0,001	2,70	0,98	0,30	0,06	0,95	0,20	n. m. i. B.		
7	0,002	0,0004	0,68	0,61	0,05	0,04	5,21	2,85	0,26	0,11	11,08	4,45	0,89	0,37	
8	0	0,0003	0,08	0,16	0,002	0	2,76	0,42	0,10	0,01	2,56	0,31	0,22	0,01	
9	0	n. m. i. B.													
10	0,002	0,02	0,36	0,55	0,12	0,05	11,19	8,87	0,81	0,45	41,22	17,69	3,24	1,74	
MW	0,001	0,003	0,45	0,48	0,03	0,03	6,41	3,06	0,38	0,16	17,18	6,17	3,28	1,08	
Median	0,000	0,003	0,31	0,51	0,02	0,01	5,65	2,74	0,38	0,11	9,65	3,71	0,94	0,50	
s	0,001	0,005	0,41	0,30	0,04	0,03	3,28	2,63	0,26	0,15	18,83	7,28	5,63	1,46	
Korr.		0,94		0,80	0,57	0,38	0,86	0,38	0,38	0,38	0,99	0,99	0,99	0,98	

Legende: n. i. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.3.8 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe P8

Tier Nr.	Beginn		6 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.		7 Monate n. 2. I.		1 Jahr n. 2. I.	
	1. BE / 1. Impfung	2. BE / 2. Impfung	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0	0,03	0,27	0,48	16,10	15,50	1,59	1,13	0,60	0,66
2	0,05	0,13	n. m. i. B.							
3	0	0,008	0,06	0,09	1,40	1,29	0,15	0,11	0,66	0,17
4	0,02	0,03	0,20	0,49	23,00	25,48	n. m. i. B.			
5	0,002	0,008	0,24	0,34	13,40	8,63	2,55	1,92	1,12	0,99
6	0,01	0,009	0,02	0,08	5,40	4,57	0,42	0,37	0,30	0,33
7	0,02	0,04	0,02	0,04	4,07	4,29	0,14	0,16	0,16	0,13
8	0	0,02	0,05	0,07	10,81	11,43	0,67	0,50	0,64	0,42
9	0	0,03	0,15	0,19	0,42	0,87	0	0,02	0	0,006
10	0	0,008	0,18	0,33	25,55	31,74	2,39	2,33	1,42	1,27
MW	0,01	0,03	0,13	0,23	11,13	11,53	0,99	0,82	0,61	0,50
Median	0,001	0,023	0,15	0,19	10,81	8,63	0,55	0,44	0,62	0,37
s	0,016	0,038	0,10	0,18	9,16	10,88	1,04	0,88	0,48	0,45
Korr.				0,94		0,97		0,98		0,93

Legende: n. i. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.3.9 - Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe P9

Tier Nr.	Beginn		4 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.		8 Monate n. 2. I.		3 1/2 Monate n. 3. I.		6 Monate n. 3. I.	
	1. BE / 1. Impfung	Ind. E.	2. BE / 2. Impfung	Ind. E.	3. BE	Ind. E.	4. BE / 3. Impfung	Ind. E.	5. BE	Ind. E.	6. BE	Ind. E.
	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0,002	0,02	0,02	0,05	3,98	4,04	0,21	0,35	23,55	15,49	17,23	10,33
2	0,007	0,02	0,04	0,08	6,31	5,04	0,05	0,16	5,78	3,09	3,57	1,65
3	0,0003	0,07	0,05	0,13	8,33	6,01	0,04	0,26	11,39	8,18	5,08	3,59
4	0	0,05	0,20	0,39	3,90	4,61	0,30	1,16	8,49	7,69	7,16	5,65
5	0,0002	0,01	0,02	0,03	3,51	2,86	0,28	0,17	5,82	3,55	n. m. i. B.	
6	0	0,01	0,02	0,16	3,44	3,63	0,12	0,09	2,85	1,79	1,54	0,91
7	0,06	0,10	0,01	0,11	2,44	2,51	0,28	0,06	5,09	4,03	3,82	3,07
8	0	0,008	0,03	0,13	1,46	1,05	0,25	0,24	1,60	1,45	0,39	0,35
9	0	0,09	0,03	0,31	13,04	15,76	1,44	1,52	4,71	4,48	2,26	1,63
10	0	0,03	0,02	0,11	1,54	1,55	0,06	0,11	6,91	4,80	n. m. i. B.	
MW	0,007	0,041	0,04	0,15	4,79	4,71	0,30	0,41	7,62	5,45	5,13	3,40
Median	0,000	0,026	0,03	0,12	3,70	3,84	0,23	0,20	5,80	4,25	3,70	2,36
s	0,017	0,033	0,06	0,11	3,57	4,18	0,41	0,50	6,23	4,15	5,32	3,27
Korr.				0,77		0,95		0,81		0,98		0,98

Legende: n. i. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.3.10 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe P10

Tier Nr.	Beginn		4 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.		5 Monate n. 2. I.		2 Wochen n. 3. I.		11 Monate n. 3. I.		13 Monate n. 3. I.		5 Monate n. 4. I.				
	1. BE / 1. Impfung	Ind. E.	2. BE / 2. Impfung	Ind. E.	3. BE	DAE	Ind. E.	4. BE / 3. Impfung	Ind. E.	5. BE	DAE	Ind. E.	6. BE	DAE	Ind. E.	7. BE / 4. Impfung	Ind. E.	8. BE	Ind. E.
1	0	0,02	0,12	0,13	3,36	4,29	0,14	0,13	6,87	10,45	keine BE	0,10	0,10	0,27	0,19				
2	0	0,002	0,07	0,34	7,48	7,41	0,12	0,09	9,49	13,03	keine BE	0,27	0,20	0,99	0,82				
3	0	0,09	0,13	0,09	2,82	4,71	0,21	0,33	32,38	49,58	keine BE	8,00	4,45	5,74	3,28				
4	0,0003	0,05	0,24	0,33	4,62	6,55	0,45	0,58	18,60	21,62	keine BE	0,17	0,21	1,78	1,38				
5	0,0004	0,03	0,18	0,59	6,87	12,57	0,23	0,47	15,33	15,33	keine BE	0,34	0,43	1,40	1,40				
6	0	0,01	0,27	0,31	12,95	13,33	0,15	0,20	10,07	20,04	0,47	0,44	0,23	1,42	0,94				
7	0	0,006	0,07	0,26	3,36	4,70	0,05	0,09	6,66	10,12	0,13	0,26	0,09	1,12	0,96				
8	0	0,04	0,08	0,16	1,74	2,97	0,27	0,52	7,22	10,76	keine BE	2,23	1,64	4,86	3,79				
9	0	0,008	0,05	0,09	3,80	5,53	0,19	0,22	12,53	19,52	0,32	0,27	0,18	0,58	0,55				
10	0	0,008	0,15	0,31	13,15	12,72	0,21	0,39	20,93	34,43	keine BE	0,50	0,45	2,46	2,11				
MW	0,0004	0,03	0,14	0,26	6,02	7,48	0,20	0,30	13,73	20,49	0,31	0,32	0,80	2,06	1,54				
Median	0,000	0,015	0,12	0,29	4,21	6,04	0,20	0,27	11,30	17,42	0,32	0,27	0,22	1,41	1,17				
s	0,001	0,026	0,07	0,15	4,10	3,92	0,11	0,18	8,14	12,60	0,17	0,10	1,36	1,82	1,18				
Korr.				0,45		0,91		0,89	0,97		0,86		1,00		0,97				

Legende: n. i. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.4 Datentabellen der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im Schaf

9.4.1 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe S1

Tier Nr.	Beginn		6 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.	
	1. BE / 1. Impfung		2. BE / 2. Impfung		3. BE	
	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0	0,04	0,03	0,06	0,07	0,11
2	0	0,001	0,01	0,06	4,52	2,22
3	0	0,003	0	0,009	0,0002	0,04
4	0	0	0,002	0,008	1,34	0,69
5	0	0,02	0,01	0,19	0,15	0,09
6	0	0,02	0,003	0,02	0,47	0,57
7	0	0,02	0,001	0,009	0,60	0,29
8	0	0,002	0,005	0,008	0,28	0,16
9	0	0,003	0,002	0,008	0,91	0,24
10	0	0,06	0,04	0,09	2,78	1,12
MW	0	0,02	0,01	0,05	1,11	0,55
Median	0	0,012	0,004	0,01	0,53	0,26
s	0	0,019	0,01	0,06	1,46	0,68
Korr.				0,46		0,98

Legende: n. I. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; MW = Mittelwert;
s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.4.2 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe S2

Tier Nr.	Beginn		6 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.	
	1. BE / 1. Impfung		2. BE / 2. Impfung		3. BE	
	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0	0,0007	0,24	0,55	11,04	12,72
2	0	0,0004	0,01	0,08	1,59	0,82
3	0	0,0004	0,08	0,35	13,11	18,74
4	0	0,0002	0,10	0,19	3,71	3,12
5	0	0,0004	0,13	0,44	5,01	6,76
6	0	0,005	0,43	2,32	11,19	25,58
7	0	0,002	0,03	0,19	11,24	9,95
8	0	0,009	0,06	0,11	5,19	4,19
9	0	0,002	0,59	0,78	22,05	20,93
10	0	0,006	0,49	1,07	13,18	15,92
MW	0	0,003	0,22	0,61	9,73	11,87
Median	0	0,002	0,12	0,39	11,12	11,34
s	0	0,003	0,21	0,68	6,02	8,31
Korr.				0,71		0,82

Legende: n. I. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; MW = Mittelwert;
s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.4.3 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe S3

Tier Nr.	Beginn		6 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.	
	1. BE / 1. Impfung		2. BE / 2. Impfung		3. BE	
	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0	0,02	0,02	0,20	9,29	5,95
2	0,06	0,02	1,24	0,72	2,26	6,86
3	0,21	0,05	n. m. i. B.			
4	0	0	0,09	0,17	22,24	13,12
5	0	0	0	0,01	3,51	1,56
6	0	0	0,02	0,06	7,02	9,65
7	0	0,03	0,05	0,24	3,37	2,52
8	0	0	0,05	0,07	24,50	19,08
9	0	0,03	0,05	0,10	11,11	5,07
10	0	0	0	0,03	4,31	2,28
MW	0,03	0,02	0,17	0,18	9,73	7,34
Median	0	0,010	0,05	0,10	7,02	5,95
s	0,068	0,018	0,40	0,22	8,28	5,77
Korr.			0,94		0,88	

Legende: n. I. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.4.4 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe S4

Tier Nr.	Beginn		6 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.	
	1. BE / 1. Impfung		2. BE / 2. Impfung		3. BE	
	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0	0,01	1,15	3,14	3,68	5,94
2	0	0,001	0	0	0	0
3	0	0,003	0,01	0,13	1,77	2,46
4	0	0,002	0,03	0,14	n. m. i. B.	
5	0	0,005	0,07	0,11	3,44	2,93
6	0	0	0,03	0,10	4,64	2,66
7	0	0,0005	0,01	0,13	3,30	2,47
8	0	0,0004	0,10	0,31	4,95	4,65
9	0	0,001	0,33	0,65	2,94	5,40
10	0	0,003	0,19	0,93	0,17	0,79
MW	0	0,003	0,19	0,56	2,77	3,03
Median	0	0,002	0,05	0,14	3,30	2,66
s	0	0,004	0,35	0,95	1,78	1,99
Korr.			0,99		0,72	

Legende: n. I. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.4.5 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe S5

Tier Nr.	Beginn		6 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.	
	1. BE / 1. Impfung		2. BE / 2. Impfung		3. BE	
	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0	0,0004	0,02	0,02	1,35	0,98
2	0	0,001	0,16	0,15	6,12	3,52
3	0	0	0,04	0,07	4,83	3,89
4	0	0,003	0,32	0,51	14,42	10,92
5	0	0,0007	0,02	0,05	15,40	8,95
6	0	0	0	0,006	1,72	0,68
7	0	0,003	0,004	0,01	0,91	0,93
8	0	0	0,005	0,008	0,88	0,69
9	0	0,004	0,005	0,03	2,06	0,97
10	0	0,03	0,007	0,06	0,90	0,78
MW	0	0,004	0,06	0,09	4,86	3,23
Median	0	0,001	0,01	0,04	1,89	0,98
s	0	0,008	0,10	0,15	5,59	3,75
Korr.			0,97		0,98	

Legende: n. I. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; MW = Mittelwert;
s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.4.6 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe S6

Tier Nr.	Beginn		6 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.		1 Jahr nach 3. BE	
	1. BE / 1. Impfung		2. BE / 2. Impfung		3. BE		4. BE	
	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0	0	0,03	0,17	2,81	1,27	n. m. i. B.	
2	0	0	0,04	0,19	2,76	2,89	n. m. i. B.	
3	0	0,01	0,12	0,38	n. m. i. B.			
4	0	0	0,01	0,03	2,18	1,53	n. m. i. B.	
5	0	0,02	0,02	0,07	0,74	0,51	0,037	0,007
6	0	0,01	0,008	0,09	3,61	2,90	0,24	0,15
7	0	0	0,008	0,06	2,65	1,50	0,05	0,02
8	0	0,02	0,002	0,08	2,25	1,37	n. m. i. B.	
9	0	0	0,03	0,17	4,55	2,41	0,02	0,01
10	0	0	0,02	0,12	1,22	0,91	n. m. i. B.	
11	0	0	0,05	0,53	6,02	4,84	n. m. i. B.	
MW	0	0,006	0,03	0,17	2,88	2,01	0,09	0,05
Median	0	0	0,024	0,12	2,71	1,52	0,04	0,01
s	0	0,010	0,034	0,15	1,54	1,28	0,10	0,07
Korr.			0,75		0,90		1,00	

Legende: n. I. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert;
s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.4.7 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe S7

Tier Nr.	Beginn		6 Wochen n. 1. I.		2 Wochen n. 2. I.	
	1. BE / 1. Impfung		2. BE / 2. Impfung		3. BE	
	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0	0,01	0,25	1,538	22,64	30,10
2	0,37	0,09	12,24	4,56	16,96	11,31
3	0	0	n. m. i. B.			
4	0,02	0,07	4,95	3,60	41,37	16,12
5	0	0,01	0,06	0,51	13,73	14,93
6	0	0	0,02	0,24	28,41	24,43
7	0	0	0,04	0,15	6,22	4,37
8	0	0	0,005	0,10	3,16	2,02
9	0	0	0,10	0,41	9,17	8,14
10	0	0,002	0,20	1,91	61,04	137,30
MW	0,04	0,018	1,99	1,45	22,52	27,64
Median	0	0,001	0,10	0,51	16,96	14,93
s	0,12	0,033	4,17	1,64	18,71	42,10
Korr.			0,89		0,85	

Legende: n. I. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.4.8 Ergebnis der Tetanus-Antitoxin-Bestimmung im DAE und indirekten ELISA in ELISA Einheiten der Impfstoffgruppe S8

Tier Nr.	Beginn		4 Wochen n. 1. I.		4 Wochen n. 2. I.		1 Jahr nach 1. I.		2 Wochen n. 3. I.		1 Jahr nach 3. I.	
	1. BE / 1. Impfung		2. BE / 2. Impfung		3. BE		4. BE / 3. Impfung		5. BE		6. BE	
	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.	DAE	Ind. E.
1	0	0,002	0,01	0,07	1,49	0,52	0,74	0,45	39,00	24,52	8,37	4,29
2	0	0,03	0,07	0,22	0,50	0,30	0,25	0,21	78,65	37,42	n. m. i. B.	
3	0	0,005	0,007	0,02	0,68	0,23	n. m. i. B.					
4	0	0,003	0,02	0,07	1,87	0,66	0,77	0,38	154,7	45,39	n. m. i. B.	
5	0	0,007	0,05	0,08	0,47	0,27	0,24	0,12	62,87	23,39	8,45	2,17
6	0	0,001	0,13	0,32	n. m. i. B.							
7	0	0,001	0	0,01	0,03	0,03	0,04	0,03	13,36	4,62	n. m. i. B.	
8	0	0,0003	0,007	0,05	n. m. i. B.							
9	0	0,002	0,06	0,17	0,58	0,24	n. m. i. B.					
10	0	0,002	0,004	0,01	n. m. i. B.							
11	0	0,02	0,006	0,12	1,57	0,82	1,53	0,73	136,97	52,09	23,99	8,47
MW	0	0,007	0,033	0,10	0,90	0,39	0,60	0,32	80,92	31,24	13,60	4,97
Median	0	0,002	0,010	0,07	0,63	0,29	0,50	0,30	70,76	30,97	8,45	4,29
s	0	0,011	0,041	0,10	0,65	0,26	0,54	0,26	55,20	17,25	8,99	3,21
Korr.			0,94		0,93		0,99		0,93		0,94	

Legende: n. I. = nach Impfung; BE = Blutentnahme; n. m. i. B. = nicht mehr im Bestand; MW = Mittelwert; s = Standardabweichung; Korr. = Korrelationskoeffizient

9.5 Statistical Analysis Software - Output des Vergleichs P4 versus P5

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable dae
Classified by Variable gestuet

gestuet	N	Sum of Scores	Expected Under H0	Std Dev Under H0	Mean Score
meura	8	73.0	76.0	11.254629	9.1250
marbach	10	98.0	95.0	11.254629	9.8000

Wilcoxon Two-Sample Test
Statistic 73.0000

Normal Approximation
Z -0.2221
One-Sided Pr < Z 0.4121
Two-Sided Pr > |Z| 0.8242

t Approximation
One-Sided Pr < Z 0.4134
Two-Sided Pr > |Z| 0.8269

Z includes a continuity correction of 0.5.

9.6 Statistical Analysis Software - Output des Vergleichs P4 versus P8

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable dae
Classified by Variable impfstoff

impfstoff	N	Sum of Scores	Expected Under H0	Std Dev Under H0	Mean Score
p4	8	103.0	72.0	10.392305	12.875000
p8	9	50.0	81.0	10.392305	5.555556

Wilcoxon Two-Sample Test
Statistic 103.0000

Normal Approximation
Z 2.9349
One-Sided Pr > Z 0.0017
Two-Sided Pr > |Z| 0.0033

t Approximation
One-Sided Pr > Z 0.0049
Two-Sided Pr > |Z| 0.0097

Z includes a continuity correction of 0.5.

9.7 Statistical Analysis Software - Output, ANCOVA, Pferde-Impfstoffe

ANCOVA Impfstoffe P1-P10 (Pferde)

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Impfstoff	9	P1 P10 P2 P3 P4 P6 P7 P8 P9
gestuet	3	Marbach Meura Radegast
	Number of Observations Read	93
	Number of Observations Used	93

Dependent Variable: dae_ee2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	1361.685381	151.298376	1.79	0.0826
Error	83	7021.146539	84.592127		
Corrected Total	92	8382.831920			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	dae_ee2 Mean
0.162437	129.0641	9.197398	7.126226

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Impfstoff	6	1108.526831	184.754472	2.18	0.0526
gestuet	1	9.226115	9.226115	0.11	0.7420
Lf_Dosis	0	0.000000	.	.	.

9.8 Statistical Analysis Software - Output der Clusteranalyse der Impfstoffgruppen Pferd

Elisa-Einheiten (Pferdeimpfstoffe)

The CLUSTER Procedure
Ward's Minimum Variance Cluster Analysis
Eigenvalues of the Covariance Matrix

	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
1	17.9213509		1.0000	1.0000

Root-Mean-Square Total-Sample Standard Deviation = 4.233362
Root-Mean-Square Distance Between Observations = 5.986877

Cluster History

NCL	-- Clusters	Joined---	FREQ	SPRSQ	RSQ	ERSQ	CCC	PSF	PST2	Tie
9	OB1	OB2	2	0.0001	1.00	.	.	2405	.	
8	OB4	OB10	2	0.0004	1.00	.	.	579	.	
7	OB5	OB9	2	0.0011	.998	.	.	312	.	
6	CL9	CL8	4	0.0040	.994	.	.	141	16.3	
5	OB3	OB8	2	0.0071	.987	.	.	96.8	.	
4	CL6	CL7	6	0.0248	.962	.	.	51.2	17.7	
3	CL5	OB6	3	0.0256	.937	.	.	51.8	3.6	
2	CL4	OB7	7	0.1436	.793	.813	-.29	30.7	23.6	
1	CL2	CL3	10	0.7932	.000	.000	0.00	.	30.7	

9.9 Statistical Analysis Software - Output, ANOVA, Schaf-Impfstoffe

ANOVA Impfstoffe S1-S8 (Schafe)

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values						
Impfstoff	8	S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8						
	Number of Observations Read							75
	Number of Observations Used							75

Dependent Variable: dae_ee2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	3328.121583	475.445940	7.91	<.0001
Error	67	4025.688011	60.084896		
Corrected Total	74	7353.809594			

R-Square	0.452571	Coeff Var	114.3968	Root MSE	7.751445	dae_ee2 Mean	6.775926
----------	----------	-----------	----------	----------	----------	--------------	----------

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Impfstoff	7	3328.121583	475.445940	7.91	<.0001

9.10 Statistical Analysis Software - Output der Clusteranalyse der Impfstoffgruppen Schaf

Elisa-Einheiten (Schafimpfstoffe)

The CLUSTER Procedure
Ward's Minimum Variance Cluster Analysis

Eigenvalues of the Covariance Matrix

	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
1	52.4269391		1.0000	1.0000

Root-Mean-Square Total-Sample Standard Deviation = 7.240645
Root-Mean-Square Distance Between Observations = 10.23982

Cluster History

NCL	-- Clusters	Joined--	FREQ	SPRSQ	RSQ	ERSQ	CCC	PSF	PST2	Tie
7	OB2	OB3	2	0.0000	1.00	.	.	1E7	.	.
6	OB4	OB6	2	0.0000	1.00	.	.	23E3	.	.
5	OB1	OB8	2	0.0001	1.00	.	.	9400	.	.
4	CL6	OB5	3	0.0075	.992	.	.	174	428	.
3	CL5	CL4	5	0.0204	.972	.	.	86.8	8.0	.
2	CL3	CL7	7	0.2035	.769	.	.	19.9	36.4	.
1	CL2	OB7	8	0.7685	.000	.000	0.00	.	19.9	.

9.11 Liste der Impfstoffhersteller und *in vivo* Prüflabore

Chiron Behring
Emil-von-Behring-Straße 76
35041 Marburg
Deutschland

Essex Tierarznei
Im Langen Felde 5
30938 Burgwedel
Deutschland

Fort Dodge
Veterinär GmbH
52146 Würselen
Deutschland

Impfstoffwerk Dessau Tornau
Stretzer Weg 15a
06862 Rodleben
Deutschland

Intervet
Deutschland GmbH
85716 Unterschleißheim

Intervet UK
Walton Manor, Milton Keynes
Bucks MK7 7AJ
England

Mérial GmbH
85399 Hallbergmoos
Deutschland

Mérial Laboratoire Lyon Gerland
254, rue Marcel Merieux
69342 Lyon
Frankreich

WDT
Serumwerk Memsen
27318 Hoyerhagen
Deutschland

9.12 Liste der Kooperationspartner

Die Untersuchungen am Pferd wurden durchgeführt von den Gestüten:

Landgestüt Sachsen-Anhalt, Parkstraße 13, D-06780 Spören
Betreuender Tierarzt: Dr. Waselau

Haflinger Gestüt Meura, Ortsstraße 116, D-98744 Meura
Betreuender Tierarzt: Dr. Leib

Haupt- und Landgestüt Marbach, D-72532 Gomadingen
Betreuende Tierärzte: Dr. Eßich und Dr. Röhm

Die Untersuchungen am Schaf wurden durchgeführt von den Einrichtungen:

Georg-August-Universität, Institut für Tropentierhygiene, Kellnerweg 6,
D-37077 Göttingen
Prof. Dr. Böhnelt und Dr. Gessler

Versuchsgut Marienfelde, Alt Marienfelde 17-21, D- 12277 Berlin
Dr. Pfeffer und Dr. Henrion

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Finanzierung des Projektes „Validierung serologischer Wirksamkeitsprüfungen für Clostridien-Impfstoffe ad us. vet.“ (Förderkennzeichen 0312636). Die vorliegende Arbeit ergab sich aus dem Teilprojekt: Ersatz des *in vivo* Neutralisationstests bei der Wirksamkeitsbestimmung von Tetanus-Impfstoffen am Zieltier.

Besonderer Dank geht an die Gestüte Marbach, Meura und Sachsen-Anhalt für die Durchführung der Versuche am Pferd sowie an das Institut für Tropentierhygiene in Göttingen und dem Versuchsgut Marienfelde für die Untersuchungen am Schaf.

Für die *in vivo* Untersuchungen der Seren möchte ich mich herzlich bei Chiron-Behring GmbH & Co KG, Marburg und Essex Animal Health, Burgwedel bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. A. Hoffmann bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung der Arbeit im Paul-Ehrlich-Institut Langen.

Herrn Priv. Doz. Dr. G. Werner danke ich für die wertvolle Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt den Projektleiterinnen Frau Dr. E. Werner und Frau Dr. K. Noeske für die informativen Gespräche und freundliche Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön an Frau M. Schindler für die technische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt ebenso allen Kolleginnen unseres Forscherinnentreffens für die anregenden Diskussionen und den Informationsaustausch: Dr. V. Fachinger, Dr. S. Kaul, Dr. M. Krug und Dr. K. Silberbach und insbesondere Frau Dr. B. Kegel.

Bei Herrn Dr. Volkers und Herrn Hanschmann möchte ich mich vornehmlich für die Hilfestellungen bei der Auswertung bedanken.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5124-6

